

Effekt der genetischen Deletion des LDLR-/- in Yucatan minipigs auf die koronare Herzkrankheit

Christoph Alexander Hegenauer

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

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Lars Mägdefessel
2. Priv-Doz. Dr. Albert F. J. Busch

Die Dissertation wurde am 02.12.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 30.04.2025 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	4
2.	Einleitung	9
2.1	Kardiovaskuläre Krankheiten	9
2.2	Koronare Herzerkrankung	9
2.3	Arteriosklerose	10
2.4	Herzklappenerkrankungen	20
2.5	Non-coding RNA	22
2.6	Tiermodelle der Atherosklerose	34
	Maus-Modelle	34
	Schweine-Modelle	37
3.	Problemstellung - Ziel dieser Arbeit	44
4.	Methodik	45
4.1	Schweinemodelle	45
	LDLR-/- Yucatan-minipigs	45
	D374Y-PCSK9-Yucatan-minipigs	46
4.2	Histologische Untersuchung	47
	Vorbereitung	47
	Histologische Färbungen	48
4.3	Molekularbiologische Untersuchung	54
5.	Ergebnisse	56
5.1	Ergebnisse qRT-PCR	56
5.2	Ergebnisse Histologie	60
	Koronargefäße	60
	Herzklappen	69
	Myokard	77
6.	Diskussion	83
6.1	Vergleich von Maus und Schwein	84
	Limitationen des Maus-Modells	84
	Schweine-Modell	86
6.2	Histologische Untersuchung der Herzen von LDLR-/- Yucatan-Minipigs und D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs	89
	Koronararterien	89
	Myokard	91
	Herzklappen	92

6.3 Untersuchung der Herzen von LDLR-/- Yucatan-Minipigs und D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs auf veränderte genetische Expressionsmuster.....	95
Koronararterien	96
Myokard	100
Herzklappen	103
7. Zusammenfassung.....	107
8. Literaturverzeichnis	109
9. Abbildungsverzeichnis.....	136
10. Tabellenverzeichnis.....	138
11. Danksagung	139

1. Abkürzungsverzeichnis

Alpha-smA

alpha-smooth-muscle-actin

ApoE

Apolipoprotein E

ApoE -/-

Apolipoprotein E knockout

ABCA1

ATP-binding cassette transporter A1

ABCG1

ATP-binding cassette Subfamily G Member 1

CD

Cluster of differentiation

CETP

Cholesterinester-Transferprotein

COL

Kollagen

COL1A1

Kollagen Typ 1alpha1

COLA1A2

Kollagen Typ 1alpha2

COL3A1

Kollagen Typ 3alpha1

CSE

Cystathionine-gamma-lyase

CVD

Kardiovaskuläre Erkrankungen

DGCR8

DiGeorge critical region 8

EvG

Elastica van Gieson

EZM

Extrazelluläre Matrix

HDL

high density lipoprotein

Hämatoxylin-Eosin

HE

HFHC

high-fat-high-cholesterol

H₂S

Schwefelwasserstoff

ICAM-1

Intercellular-adhesion-molecule-1

INF

Interferon

KHK

Koronare Herzerkrankung

KLF4

Krüppel-like-factor 4

LAD

Arteria interventricularis anterior

lncRNA

Long-non-coding-RNA

LDL

low density lipoprotein

LDLR -/-

LDL-Rezeptor knockout

LOX-1

Lectin-like oxLDL receptor-1

MMP

Matrix-Metalloprotease

mRNA

Messenger-RNA

MI

Myokardinfarkt

MPO

Myeloperoxidase

miRNA

Micro-RNA

ncRNA

Nicht-kodierende RNA

NZW

New Zealand White Rabbit

oxLDL

oxidiertes LDL-Cholesterin

PCR

Polymerase-Kettenreaktion

PCSK9

Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9

rAAV

Rekombinantes adeno-assoziiertes Virus

RCA

Arteria coronaria dextra

RISC

RNA-induced-silencing-complex

RLC

RISC-loading-complex

rRNA

ribosomaleRNA

RT-PCR

Reverse-Transkriptase-PCR

SCNT

Somatischer Zellkerntransfer

smA

smooth-muscle Actin

SR

Scavenger-receptor

SR-B1 -/-

Scavenger-receptor B1 knockout

TGF

transforming growth factor

TNF-alpha

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha

tRNA

transportRNA

TRBP

Tar-RNA-binding-protein

UTR

untranslated region

qRT-PCR

quantitative Echtzeit-PCR

VCAM-1

Vascular-cell-adhesion-molecule-1

VIC

valvuläre interstitielle Zellen

VLDL

very low density lipoprotein

VSMC

glatte Gefäßmuskelzelle

2. Einleitung

2.1 Kardiovaskuläre Krankheiten

Kardiovaskuläre Krankheiten (CVD) stellen, mit fast doppelt so vielen Todesfällen als durch Krebs, in Europa die Haupttodesursache dar. Jedes Jahr sterben in Europa über 4 Millionen Menschen an kardiovaskulären Krankheiten. 41% der Todesfälle des Mannes und 49% der Todesfälle der Frau sind darauf zurückzuführen. Die koronare Herzerkrankung (KHK) stellt dabei mit 19% der Todesursachen bei Männern und 20% bei Frauen den größten Anteil als Manifestation der CVD dar. (Townsend et al., 2015) Trotz insgesamt rückläufiger Todesfälle, sterben noch immer ein Drittel aller Menschen über 35 Jahren an den Folgen einer KHK. (Sanchis-Gomar et al., 2016) Im Zentrum der pathophysiologischen Hintergründe der CVD steht die Arteriosklerose. Je nach Manifestationsort kann es zu verschiedenen Krankheitsbildern kommen, wie Schlaganfällen, peripherer arterieller Verschlusskrankheit, KHK oder Myokardinfarkten.

2.2 Koronare Herzerkrankung

Die Koronare Herzkrankheit bezeichnet alle Erkrankungen, bei denen es zu einer Einengung der Koronargefäße kommt. Als mit Abstand häufigsten Grund dafür gilt die Atherosklerose der Koronargefäße. In Deutschland ist die KHK eine häufige Erkrankung, mit einer Lebenszeitprävalenz von 15,1% bei den 60-69-jährigen und 22,3% bei den 70-79-jährigen. (Gößwald et al., 2013)

2.3 Arteriosklerose

Unter Arteriosklerose versteht man allgemein die Verhärtung und Verdickung arterieller Gefäßwände, unabhängig von ihrer Genese. Dadurch kommt es zu einem Verlust an Elastizität und zu einer Verkleinerung des intraluminalen Durchmessers. Als wichtigste Ursache lässt sich insbesondere die Atherosklerose nennen. Aber auch andere Erkrankungsformen wie die Mönckeberg-Mediasklerose oder die Arteriolohyalinose können zu einer Arteriosklerose führen. Die Atherosklerose als Hauptursache für eine Arteriosklerose beim Menschen betrifft vor allem elastische, sowie große und mittelgroße muskuläre Arterien. Pathogenetisch handelt es sich bei der Atherosklerose um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung (Falk, 2006), deren Entstehung aus mehreren Phasen besteht.

Entsprechende Phasen werden im Folgenden kurz pathophysiologisch umrissen.

Endotheliale Dysfunktion

Eine Voraussetzung für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques stellt dabei die endotheliale Dysfunktion dar. Als endotheliale Dysfunktion wird der Zustand veränderter endothelialer Funktionen bezeichnet, welche unter anderem Auswirkungen auf die Regulation von Entzündungsreaktionen innerhalb der Gefäßwand haben. (Gimbrone & García-Cardena, 2016) Inzwischen sind viele verschiedene Stimuli bekannt, welche mit der Entstehung einer endothelialen Funktionsstörung vergesellschaftet sind. Hierzu zählen beispielsweise Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, sowie Hypercholesterinämie. (Landmesser et al., 2004) Ein ebenfalls gut untersuchter Stimulus stellt ein gestörter Blutfluss mit Veränderung der am Endothel wirkenden Scherkräfte dar. Hierbei kommt es durch Mechanotransduktion zu einer Reihe von Veränderungen, welche unter anderem über die Aktivierung der GTPase Rac1 und der damit verbundenen Aktivierung des NF-kB Weges zu erklären sind. (Cunningham & Gotlieb, 2005) (Y. Liu et al., 2013) NF-kB ist ein Transkriptionsfaktor. Er ist in der Regulation verschiedener pro-inflammatorischer Gene mitverantwortlich, welche in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose stehen. Das vermehrte

Vorkommen von aktiviertem NF- κ B in atherosklerotischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe lässt dabei auf eine Schlüsselrolle in der Atherogenese schließen. (Brand et al., 1996) So reguliert NF- κ B die Expression der Adhäsionsmoleküle Vascular-cell-adhesion-molecule-1 (VCAM-1) und intercellular-adhesion-molecule-1 (ICAM-1), sowie Monocyte-chemoattractant-protein, Interleukin-8, Gewebsthromboplastin und E-Selectin. Neben der Aktivierung durch Mechanotransduktion kann NF- κ B noch durch viele weitere Stimuli aktiviert werden, wie zum Beispiel durch Bindung von Angiotensin II, oxidierten Lipiden oder Chemokinen. (Collins & Cybulsky, 2001; Hajibabaei et al., 2020)

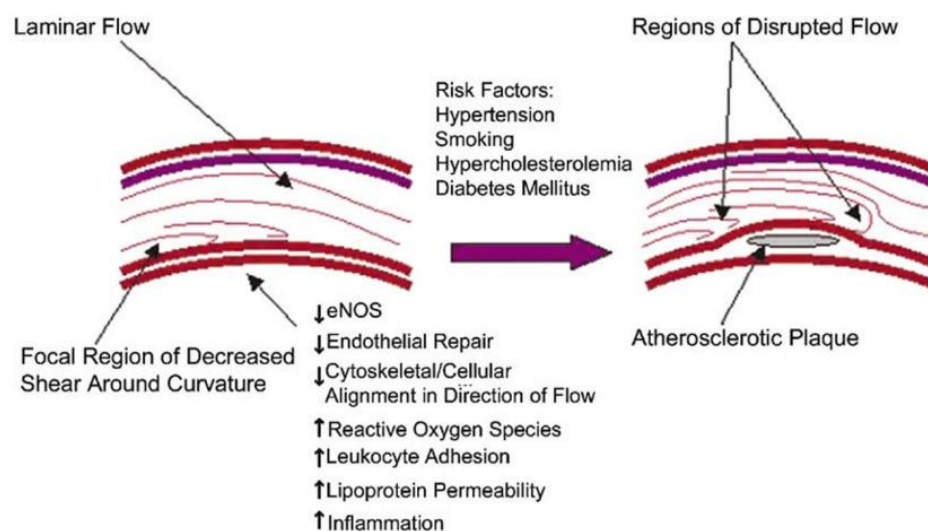


Abbildung 1: gestörter Blutfluss als Auslöser endothelialer Dysfunktion (Cunningham & Gotlieb, 2005)

Schaumzellbildung:

Bedingt durch die pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels kommt es im Verlauf der Atherogenese zu erhöhter Permeabilität des Endothels für LDL-Cholesterin und oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL) mit daraus resultierender Akkumulation in der Intima der Gefäßwand. Dies geschieht unter anderem durch erhöhte Expression des lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1) und verminderte Expression von Desmogleinen auf endothelialen Zellen. (Y.-B. Li et al., 2015) Das Eindringen und die Retention von Lipoproteinen in der Gefäßwand nimmt

eine Schlüsselfunktion in der Initiation der Atherosklerose ein (Tabas et al., 2007).

Ebenfalls bedingt durch die pro-inflammatorische Aktivierung des Endothels und Akkumulation von oxLDL kommt es zur Migration und Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand. Hier nehmen Makrophagen über spezielle Rezeptoren, wie die Scavenger-Rezeptoren SR-A1 oder LOX-1, oxLDL auf. Die Expression von SR-A1 wird wiederum von NF- κ B reguliert. Innerhalb der Makrophagen kommt es nun zur einer Prozessierung des oxLDL zu freiem Cholesterol und Cholesteryl-Ester. Die Cholesteryl-Ester können im endoplasmatischen Retikulum der Makrophagen gespeichert und durch Enzyme, wie der Neutral-cholesterylesterhydrolase, wiederum in freies Cholesterol umgewandelt werden. Das freie Cholesterol kann nun über membranständige Transporter, wie ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), ATP-binding cassette Subfamily G Member 1 (ABCG1) und Scavenger-Rezeptor SR-BI, durch Bindung an extrazelluläre Transportproteine, wie High-density-lipoprotein (HDL), die Makrophagen wieder verlassen. In atherosklerotischem Gewebe findet sich eine Dysbalance zwischen Influx und Efflux von Cholesterin. So wird beispielsweise LOX-1 überexprimiert, während ABCA1 und ABCG1 vermindert exprimiert werden. Es kommt zu vermindertem Efflux von freiem Cholesterol und zu vermehrter Speicherung von Cholesteryl-Estern und dadurch resultierender Bildung von Schaumzellen. (Chistiakov et al., 2016; Chistiakov et al., 2017; Steinberg, 2009) Die Bildung von Schaumzellen stellt ein Schlüsselement in der Entstehung atherosklerotischer Plaques dar. (Herrero-Fernandez et al., 2019) Lipidbeladenen Schaumzellen gehen im Verlauf der Erkrankung durch Apoptose und Nekrose zugrunde. Dies führt nach und nach zur Bildung eines initial weichen, lipidreichen, nekrotischen Kerns innerhalb fortgeschrittener Plaques und zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. (Falk, 2006) In aktivierten Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques konnte beispielsweise eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukin-1 oder monocyte chemotactic protein-1 nachgewiesen werden, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion aufrechterhalten wird. (Herrero-Fernandez et al., 2019)

(Stary et al., 1994) Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Schaumzellen nicht nur aus Makrophagen entstehen. Ein Großteil der Schaumzellen scheint aus vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen zu entstehen. (Dubland & Francis, 2016; Feil et al., 2014) Durch Akkumulation von Cholesterol innerhalb von vaskulären glatten Muskelzellen und bedingt durch die pro-inflammatorische Umgebung in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden durchlaufen glatte Gefäßmuskelzellen teilweise einen phänotypischen Wandel. Es kommt zur Expression von Makrophagen-Markern. (Chistiakov et al., 2017) Die Umwandlung in makrophagenartige Schaumzellen und die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen verstärkt das Voranschreiten der Plaquebildung. Einen Teil dieses Prozesses sehen Vengrenyuk *et al.* in der Herunterregulation der miRNA-143/145 und der damit verbunden verminderten Expression von Myocardin, als einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die Differenzierung als glatte Gefäßmuskelzelle. (Vengrenyuk et al., 2015)

Bildung einer fibrösen Kappe

In fortgeschrittenen Plaques zeigt sich die Ausbildung einer fibrösen Kappe zwischen dem lipidreichen Kern und der luminalen Oberfläche des Plaques. Diese fibröse Kappe zeichnet sich durch das vermehrte Vorhandensein von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie von ihnen gebildeter Extrazellulärmatrix aus, und stabilisiert den Plaque. Hierfür ändert sich ebenfalls der Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzelle von einem kontraktilen, zu einem synthetisierenden Typ (Allahverdian et al., 2018; Laffont & Rayner, 2017). Der Transkriptionsfaktor Krüppel-like-factor 4 (KLF4) nimmt in der Änderung des Phänotyps eine Schlüsselrolle ein. In einem Knock-out Modell der Maus für KLF4 zeigte sich eine verminderte Größe atherosklerotischer Läsionen, sowie Anzeichen eines stabileren Plaques im Vergleich zu Kontrollen. (Salmon et al., 2012; Shankman et al., 2015) Die Gesamtzahl der glatten Gefäßmuskelzellen unterschied sich dabei nicht wesentlich von Kontrollen, jedoch zeigte sich eine verminderte Anzahl Makrophagen-ähnlicher Gefäßmuskelzellen. (Leeper & Maegdefessel, 2018) Über Interleukin-1beta kommt es des Weiteren zu einer Aktivierung des NF-kB

Weges in den Gefäßmuskelzellen mit resultierender Ausbildung pro-inflammatorischer Prozesse (Alexander et al., 2012).

Ausdünnung der fibrösen Kappe – Plaqueruptur

Durch Voranschreiten der Erkrankung und weiterhin aufrechterhaltener Entzündungsreaktion kann es zu zunehmender Instabilität der Läsion kommen. Dies geschieht unter anderem durch eine gestörte Produktion von Extrazellulärmatrix durch intimale glatte Gefäßmuskelzellen, sowie durch vermehrten enzymatischen Abbau der stabilisierenden Extrazellulärmatrix beispielsweise durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13, welche von lipid-beladenen Makrophagen gebildet und ausgeschüttet werden. (Libby, 2013; Tabas et al., 2015) Dies bedingt ein Ausdünnen der fibrösen Kappe, was im Verlauf Plaquerupturen begünstigt (Davies, 1997). Die Assoziation zwischen vermehrtem Auftreten von Makrophagen im Plaque und zunehmender Instabilität des Plaques konnte von Redgrave *et al.* in einer groß angelegten Studie mit menschlichen Proben von Patienten mit symptomatischen Stenosen der Carotiden nachgewiesen werden (Redgrave et al., 2006). Stabile Plaques können, je nach Ausprägung, das Lumen des Gefäßes einengen, den Blutfluss minimieren und Krankheitsbilder, wie die koronare Herzkrankheit, bedingen. Instabile Plaques neigen vermehrt zu Plaquerupturen, welche dann durch Thrombusbildung bekannte Krankheitsbilder, wie Myokardinfarkte oder Schlaganfälle, auslösen können (Jacob Fog Bentzon et al., 2014).

Histopathologische Einteilung:

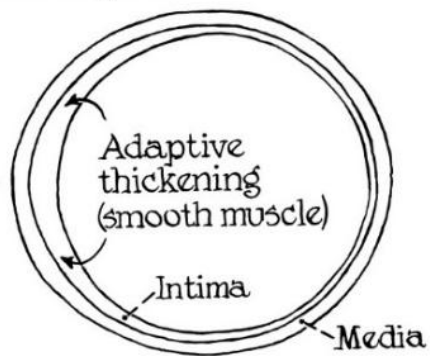
Histopathologisch lassen sich atherosklerotische Plaques nach Sary (Sary et al., 1995; Sary et al., 1994) in verschiedene Typen unterscheiden, welche im Folgenden mit ihren Charakteristika dargestellt sind (Vergleich Abbildung 2, Tabelle 1) Allgemein wird dabei in frühe Läsionen (Typ I-III) und fortgeschrittene Läsionen (Typ IV-VI) unterschieden.

Typ	Charakteristika
Typ I	- Verdickte Intima - mikroskopisch vereinzelt lipidbeladene Makrophagen nachweisbar
Typ II	- verdickte Intima - lipidbeladene Schaumzellen kommen geschichtet in der Gefäßwand vor - auch intimale glatte Gefäßmuskelzellen enthalten kleine Lipidtröpfchen - vereinzelt finden sich T-Zellen in der Gefäßwand - zu geringen Teilen lässt sich extrazellulär Fettansammlungen nachweisen Typ IIa (progression-prone Läsionen): finden sich an Stellen mit hoher mechanischer Belastung der Gefäßwand und gehen mit höherer Wahrscheinlichkeit in Typ III Läsionen über Typ IIb (progression-resistant Läsionen): zeigen eine weniger verdickte Intima, sowie weniger glatte Gefäßmuskelzellen in der Intima und zeigen keine, oder kaum, Progression
Typ III	(zusätzliche Charaktereigenschaften zu Typ II) - mikroskopisch sichtbare extrazelluläre Lipidablagerungen unterhalb der Makrophagen - viele intimale glatte Gefäßmuskelzellen enthalten Lipidtröpfchen - die Kohärenz der glatten Gefäßmuskelzellen ist durch Fettablagerungen teilweise unterbrochen

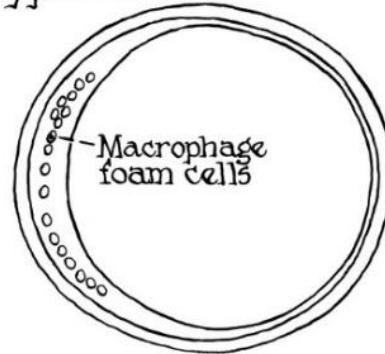
Typ IV (Atherom)	- ein zusammenhängender Lipid-Kern hat sich unterhalb der Makrophagen gebildet - die Intima erscheint weiterhin verdickt, jedoch noch mit relativ normaler Struktur - zwischen Lipid-Kern und luminaler Oberfläche befinden sich Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen; eine fibröse Kappe fehlt
Typ V	(zusätzlich zu Typ IV) - Vorhandensein einer fibrösen Kappe zwischen Lipid-Kern und luminaler Oberfläche - Typ Va: mit normalem Lipid-Kern - Typ Vb: mit teilweise verkalktem Plaque - Typ Vc: ausgeprägte fibröse Kappe; kaum vorhandener Lipid-Kern
Typ VI	- Zusätzlich zu Typ IV oder V vorhandene Komplikationen, wie: - Typ VIa: Oberflächendefekt - Typ VIb: Hämatom oder Hämorrhagie - Typ VIc: thrombosiertes Material

Tabelle 1 Stadieneinteilung der Atherosklerose nach Stary (Stary et al. 1995)

Coronary artery at
lesion-prone location



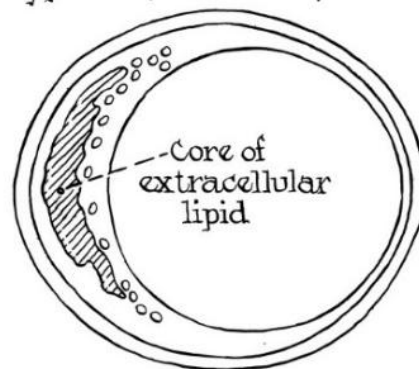
Type II lesion



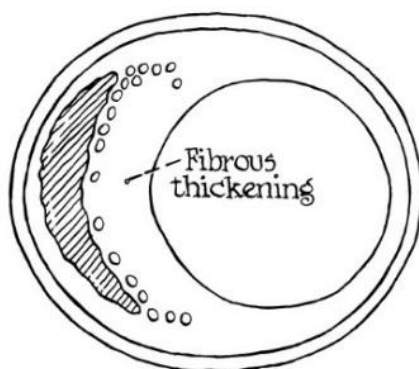
Type III (preatheroma)



Type IV (atheroma)



Type V (fibroatheroma)



Type VI (complicated lesion)

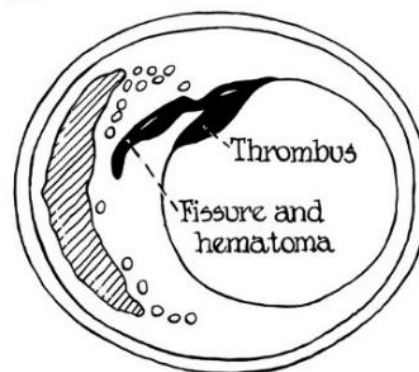


Abbildung 2: Stadieneinteilung der Atherosklerose nach Stary (Stary et al. 1995)

Virmani *et al* etablierten eine weitere Klassifikation für atherosklerotische Gefäßveränderungen (Vgl. Abbildung 3) Sie zeigten Limitationen der Klassifikation nach Stary auf und modifizierte sie. Als Limitation brachten sie unter anderem an, dass das Krankheitsgeschehen oft nicht in der Linearität, wie sie Stary beschreibt, stattfindet. Ebenfalls als Limitation sahen sie die Tatsache an, dass viele kardiovaskuläre Ereignisse ohne Plaquerupturen oder Thrombose auftreten, oder, dass Thrombosen auch ohne rupturierte Plaques auftreten. Außerdem konnten Arbustini *et al.* feststellen, dass auch in Patienten, die nicht an kardiovaskulären Ursachen verstarben, koronar rupturierte Plaques vorkamen. Virmani *et al* sahen ebenfalls die Notwendigkeit das zahlenbasierte System von Stary, durch eine morphologische Beschreibung zu ersetzen. Beachtenswert ist dabei die Unterteilung in nicht-atherosklerotische intimale Läsionen, die noch die Möglichkeit des Regresses haben, und progressive atherosklerotische Läsionen. Virmani *et al.* schrieben dabei jedem Stadium der progressiven Läsionen die Möglichkeit der Erosion und Thrombusbildung zu. Stary III entsprach dabei weitestgehend der pathologischen intimalen Verdickung, Stary IV weitestgehend dem Atherom mit normal ausgeprägter fibröser Kappe. Neu eingeführt wurde die Kategorie der dünnen fibrösen Kappe. Die meisten Typ VI Läsionen nach Stary wären demnach Atherome mit dünner fibröser Kappe mit rupturiertem Plaque. (Arbustini et al., 1991; Virmani et al., 2000)

Sowohl die Klassifikation nach Stary, als auch die nach Virmani werden in der Beschreibung atherosklerotischer Läsionen verwendet.

	Description	Thrombosis
Nonatherosclerotic intimal lesions		
Intimal thickening	The normal accumulation of smooth muscle cells (SMCs) in the intima in the absence of lipid or macrophage foam cells	Absent
Intimal xanthoma, or "fatty streak"	Luminal accumulation of foam cells without a necrotic core or fibrous cap. Based on animal and human data, such lesions usually regress.	Absent
Progressive atherosclerotic lesions		
Pathological intimal thickening	SMCs in a proteoglycan-rich matrix with areas of extracellular lipid accumulation without necrosis	Absent
Erosion	Luminal thrombosis; plaque same as above	Thrombus mostly mural and infrequently occlusive
Fibrous cap atheroma	Well-formed necrotic core with an overlying fibrous cap	Absent
Erosion	Luminal thrombosis; plaque same as above; no communication of thrombus with necrotic core	Thrombus mostly mural and infrequently occlusive
Thin fibrous cap atheroma	A thin fibrous cap infiltrated by macrophages and lymphocytes with rare SMCs and an underlying necrotic core	Absent; may contain intraplaque hemorrhage/fibrin
Plaque rupture	Fibroatheroma with cap disruption; luminal thrombus communicates with the underlying necrotic core	Thrombus usually occlusive
Calcified nodule	Eruptive nodular calcification with underlying fibrocalcific plaque	Thrombus usually nonocclusive
Fibrocalcific plaque	Collagen-rich plaque with significant stenosis usually contains large areas of calcification with few inflammatory cells; a necrotic core may be present.	Absent

Abbildung 3: Klassifikation atherosklerotischer Gefäßveränderung nach Virmani (Virmani et al. 2000)

2.4 Herzklappenerkrankungen

Erworbene nicht-rheumatische kalzifizierte Aortenklappenstenosen sind die häufigste Klappenerkrankung der älteren Bevölkerung und der westlichen Welt (Helske et al., 2007). Bedingt durch das vermehrte Auftreten der Erkrankung in höheren Lebensdekaden dachte man lange Zeit, dass die Pathogenese dieser Art der Aortenklappenstenose degenerativer Natur ist. Neuere Studienergebnisse lassen jedoch vermuten, dass eine Assoziation zur Atherosklerose besteht. (Thaden et al., 2014) Insbesondere das gemeinsame Auftreten von Aortenklappenstenosen und koronarer arterieller Atherosklerose wurde daraufhin vermehrt untersucht. So zeigen sich histopathologische Ähnlichkeiten in koronarer arteriellen Plaques und verkalkten Aortenklappen in frühen Stadien. Es findet sich im Verlauf der Initiation und Progression eine extrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen und Immunzellen, wie Makrophagen, Schaumzellen und T-Lymphozyten, mit resultierender Verdickung der Intima u.a. bedingt durch eine endotheliale Dysfunktion aufgrund veränderter Scherkräfte an den Herzklappen. (Boudoulas et al., 2015; O'Brien et al., 1996; Rajamannan et al., 2011) Es folgt eine chronische Entzündungsreaktion, die, ausgelöst durch oxidative Modulation von LDL, zum Teil auch über den NF- κ B-Weg reguliert wird. Über den NF- κ B-Weg kommt es in den Klappen neben der Aktivierung pro-inflammatorischer Gene, auch zur Aktivierung von BMP2, einem Schlüsselenzym der Osteogenese (Nsaibia et al., 2017). Kalzifizierungen im Bereich der Klappen fallen dabei deutlicher aus, als im Bereich koronarer arterieller atherosklerotischer Läsionen und zeigen vermehrt Eigenschaften von Knochenbildung (Helske et al., 2007).

Weitere Hinweise auf eine gemeinsame Pathogenese sind die Überschneidungen der Risikofaktoren beider Erkrankungen. Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertension, männliches Geschlecht und Hypercholesterinämie sind sowohl mit Atherosklerose, als auch mit Aortenklappenstenosen assoziiert.

Studien in hypercholesterinämischen Mäusen und Kaninchen zeigten frühe Stadien der Aortenklappenstenose bei gleichzeitigem Auftreten von Atherosklerose. (Sathyamurthy & Alex, 2015) In Versuchen am Rapacz-Schwein

wurden nach 2-3 Jahren ebenfalls frühe Aortenklappenstenosen gefunden. Das Vorhandensein fortgeschrittener Läsionen an den Klappen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, sodass die Forscher zum Schluss kamen, dass sich die Initiation der Atherosklerose und Aortenklappenstenose gleicht, jedoch zur Progression der Erkrankung weitere Cofaktoren notwendig sind. Hypercholesterinämische Schweinemodelle wie das Rapacz-Schwein könnten zur Erforschung der initialen Pathogenese der frühen Aortenklappenstenose beitragen. (Porras et al., 2015)

2.5 Non-coding RNA

In den letzten Jahren rückte die Bedeutung nicht-kodierender RNA, also nicht für ein Protein kodierende RNA, immer weiter in den Fokus der Forschung. Forschung auf diesem Gebiet erscheint sinnvoll, da ca. 97-98% des Transkriptoms einer Zelle aus nicht-kodierender RNA besteht. (Costa et al., 2012) Innerhalb der Übergruppe der nicht-kodierenden RNA (ncRNA) gibt es verschiedene Subgruppen. Man kann sie weiter unterteilen in transferRNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) und regulierende ncRNA. Neben small nuclear RNA und small interfering RNA zählen auch micro-RNA (miRNA) und long-non-coding RNA (lncRNA) zur Gruppe der regulatorischen ncRNA. In dieser Doktorarbeit wird unter anderem die Expression einer bestimmten miRNA untersucht, weshalb im Folgenden das Augenmerk auf der Biogenese und Funktionsweise von miRNAs liegt.

miRNA-Biogenese und Funktion

miRNAs sind ca. 22 Nukleotide lange regulierende ncRNAs. (Matsuyama & Suzuki, 2019) Sie spielen durch ihre regulatorischen Eigenschaften auf Translation, Stabilität und Abbau von messenger-RNA (mRNA) eine Schlüsselrolle in nahezu allen biologischen Abläufen einer Zelle. (L. Maegdefessel, 2014)

Biogenese:

Den Start in der Biogenese von miRNA stellt die Bildung von pri-miRNA dar. Pri-miRNA zeichnet sich durch eine Haarnadelstruktur aus. (Winter et al., 2009)

Pri-miRNA kann sowohl durch RNA-Polymerase II, als auch durch RNA-Polymerase III transkribiert werden. (Borchert et al., 2006; Y. Lee et al., 2004) (Yang et al., 2006). Die entstandene pri-miRNA wird noch im Nukleus durch den Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNase Drosha und dem Protein DGCR8 (DiGeorge critical region 8), zu pre-miRNA prozessiert. (Han et al., 2004; Y. Lee et al., 2003) (Perron & Provost, 2008) ((Han et al., 2006). Drosha und DGCR8 regulieren sich dabei gegenseitig in ihrer Expression. DRGC8 stabilisiert

Drosha, wohingegen Drosha die mRNA für DRGC8 abbauen kann. (Han et al., 2009)

Pre-miRNA kann auch Drosha-unabhängig im Rahmen des Splicings aus Introns entstehen und werden entsprechend ihrer Herkunft Mirtrons genannt (Ruby et al., 2007).

Die entstandene pre-miRNA wird im nächsten Schritt aus dem Nukleus ins Zytoplasma geschleußt (BOHNSACK et al., 2004; Yi et al., 2003). Im Zytoplasma wird die pre-miRNA vom RISC-loading-complex (RLC), erkannt und gebunden. (MacRae et al., 2008) Die RNase Dicer erkennt die terminale Schleife der Haarnadel und spaltet sie ab, sodass ein doppelsträngiges miRNA-Duplex entsteht. (Bartel, 2004; Costa et al., 2012; Stavast & Erkeland, 2019) Um den RNA-induced-silencing-complex (RISC) zu bilden, muss nun der führende Strang durch ein Protein der Ago-Familie ausgewählt werden. (Suzuki et al., 2015) Der beistehende Strang wird durch den Endonuklease-Komplex C3PO abgebaut (Ye et al., 2011). Dicer und TRBP dissoziieren vom RLC, während die miRNA am Ago-Protein verbleibt und den RISC bildet.

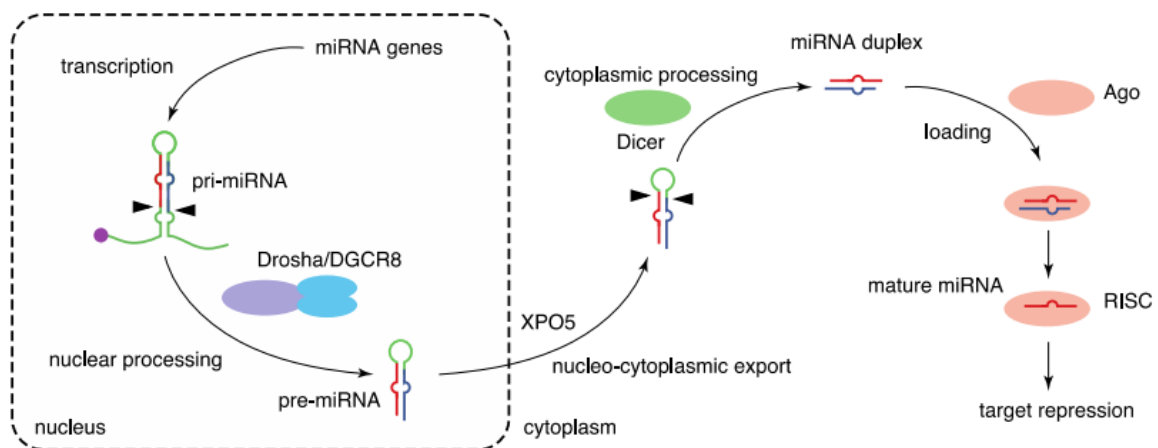


Abbildung 4 Biogenese der miRNA (Matsuyama und Suzuki 2019)

Funktion des RISC:

Der RISC bindet nun durch komplementäre Basenpaarung der enthaltenen miRNA an seine Ziel-mRNA. Eine miRNA kann dabei viele verschiedene mRNA-Ziele haben. Genauso kann jede mRNA Ziel von mehreren miRNA sein. (Costa et al., 2012) Es existieren 4 bekannte Ago-Proteine, die im RISC aktiv sein können. Ago2 ist das einzige, welches eine deutliche Slicing-Aktivität besitzt. (Costa et al., 2012) Um die Ziel-mRNA zu slicen benötigt Ago2 jedoch eine nahezu komplette komplementäre Basenpaarung der miRNA mit der Ziel-mRNA (Diederichs et al., 2008). Alle Ago-Proteine rekrutieren im RISC weitere Proteine um ihre Funktionen, wie die Hemmung der Translation, das De-Capping oder die Deadenylierung der Ziel-mRNA auszuführen, welche dann die Zerlegung der Ziel-mRNA ermöglichen. (Piao et al., 2010; Stavast & Erkeland, 2019)(Huntzinger et al., 2013)

Durch den Abbau der Ziel-mRNA oder durch Verhinderung der Translation wird das vorangeschaltete Gen der mRNA vermindert exprimiert.

Modulation von microRNA:

Die Entdeckung der Funktionen von miRNA eröffnet Forschenden eine neue Möglichkeit Einfluss auf verschiedene Genexpressionen zu nehmen.

Durch die Verwendung von sogenannten Antisense oligonucleotides/ Antagomirs kann die Wirkung einer miRNA unterbunden werden.

Antagomirs sind künstlich hergestellte und modifizierte komplementäre Oligonukleotide. Durch Bindung an die Ziel-miRNA wird diese entweder an ihrer Bindung an ihre Ziel mRNA gehindert oder durch Rekrutierung von RNAsen abgebaut. (Cannataro & Cione, 2023; Simonson & Das, 2015)

Andere Möglichkeiten der Einflussnahme sind sogenannte miRNA-Schwämme. Diese sind Plasmide und beinhalten mehrere Bindungsstellen für miRNA und können so ganze miRNA-Familien unterdrücken, wenn die Bindungsstellen für gleiche Sequenzen innerhalb der miRNA-Familie komplementär sind. (Kluiver et al., 2012; Simonson & Das, 2015)

Durch Small Molecular Inhibitors of Specific miRNA (SMIR) kann die Wirkung von miRNA sowohl im Bereich ihrer Prozessierung im Zellkern als auch im

Zytoplasma beeinträchtigt werden. Hier besteht jedoch das Problem dass diese Moleküle zu unspezifisch sind und unerwünschte Wirkungen gehäuft auftreten. (Watashi et al., 2010)

Auch wird versucht durch das Einbringen von miRNA-Mimics Genexpression in Zielzellen zu verändern. miRNA-Mimics sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die dieselbe Wirkung wie die natürliche miRNA haben.

Als weiterhin bestehende Herausforderung wird die Applikation der eben beschriebenen Therapeutika angesehen. Das gezielte Einbringen der Substanzen in die Zielzellen ohne größere systemische (Neben-)Wirkungen oder vorzeitigen Abbau stellt ein Problem dar und ist aktuell Bestandteil vieler Experimente. Während der vorzeitige Abbau durch Modifikationen an den Oligonukleotidsträngen beherrschbar scheint, bleibt die systemische Applikation ohne Nebeneffekte weiterhin Teil intensiver Forschung. Hierfür wird u.a. der Einsatz von viralen Vektoren, Nanopartikel und Lipid-Vektoren erforscht. Eine lokale Applikation, wie beispielsweise das Einbringen von miRNA29-Mimics in kutanes Gewebe zur Vermeidung von Keloiden, ist vielversprechend, je nach betroffenem Organ(-system) jedoch nicht möglich. (Gallant-Behm et al., 2019; Ho et al., 2022; Simonson & Das, 2015)

Aktuell laufen mehrere Phase I und II Studien, welche mittels Antagomir oder miRNA Mimics Einfluss auf verschiedene Krankheiten untersuchen (z.b. Miravirsen als Antagomir für die miRNA-122 im Rahmen einer Hepatitis C Infektion). (Ho et al., 2022)

miRNA in Atherosklerose

miRNAs nehmen über die Regulation der Translation auch auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose Einfluss. Zur Verdeutlichung der Relevanz werden im Folgenden einige Beispiele in der Pathophysiologie der Atherosklerose aufgezeigt.

Schon im Bereich der Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose spielen miRNAs eine tragende Rolle. In einer genomweiten Untersuchung wurden 69 miRNAs entdeckt, die an der Homöostase des Blut-Lipidspiegels beteiligt sind (Wagschal et al., 2015). Beispielsweise beeinflusst miRNA-122 indirekt die Expression der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese, sowie des SREBP2, einem Bindeprotein in der Fettsäuresynthese. Durch Reduktion funktionsfähiger miRNA-122 konnte im Mausmodell eine Reduktion der Plasmaspiegel von low-density-lipoprotein (LDL), HDL und Gesamt-Cholesterin beobachtet werden. (Esau et al., 2006) miRNA-30c reguliert die Bildung von LDL und very-low-density-lipoprotein (VLDL) in der Leber durch Regulation des Enzyms LPGAT1. Bei einer Reduktion von miRNA-30c in Mäusen zeigte sich eine Verschlechterung der Hyperlipidämie und ein verstärkter Progress der Atherosklerose. (Soh et al., 2013)

Auch im Bereich der Endothelaktivierung sind miRNAs wirksam. miRNA-31 und miRNA-17-3p regulieren die Aktivierung des Endothels durch TNF-alpha. Bei vermehrter Expression der beiden miRNAs werden die Adhäsionsproteine ICAM-1 und E-Selectin vermindert gebildet. (Suárez et al., 2010) miRNA-181b beeinflusst über die Regulation von Importin-alpha-3 die pro-inflammatorische Aktivierung der Endothelzellen. Importin-alpha-3 wird benötigt, um NF-kB in den Nukleus zu transportieren. Niedrige Spiegel an miRNA-181b gehen mit einer Verstärkung des NF-kB Wegs einher, welcher im Verlauf unter anderem mit einer erhöhten Expression von VCAM-1 an der Zelloberfläche und dementsprechend erhöhter Transmigration von Leukozyten in die Gefäßwand einhergeht. (X. Sun et al., 2012)

Die Bildung der Schaumzellen wird durch miRNA-19b mitbestimmt. Die Ziel-mRNA von miRNA-19b codiert für ABCA1. Durch weniger ABCA1 ist der Efflux von Cholesterin aus Makrophagen weniger effektiv und es kommt zu vermehrter Akkumulation von Lipiden innerhalb der Zelle. (Lv et al., 2014) miRNA-33 zielt ebenfalls auf ABCA1 ab. In LDL-Rezeptor-Knockout (LDLR^{-/-}) Mäusen konnte nach Behandlung mit einer miRNA-33-Antagomir eine erhöhte Expression von Abca1, eine Verkleinerung der Plaquegrößen, sowie ein erhöhter HDL-Spiegel beobachtet werden. (Rayner et al., 2011) miRNA-155 reguliert den Transkriptionsfaktor BCL6, welcher den NF-kB Weg in Makrophagen

abschwächen würde. Die Bildung von miRNA-155 wird dabei von oxLDL und Interferon-gamma (INF-gamma) hochreguliert. (Nazari-Jahantigh et al., 2012)

Die Schlüsselrolle von miRNAs in Bezug auf die Plastizität vaskulärer glatter Gefäßmuskeln (VSMC) wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht und bestätigt. (Lars Maegdefessel et al., 2015) Die Behandlung von Apolipoprotein E-Knockout (ApoE^{-/-}) Mäusen mit miRNA-145 zeigte zum Beispiel eine vermehrte Expression von Myocardin und verminderte Expression von Klf4. Zudem wurden vermehrte Areale mit smooth-muscle-actin (smA) identifiziert. miRNA-145 scheint demnach den Phänotyp der VSMC im kontraktile Bereich zu halten. (Lovren et al., 2012)

Im Bereich der fibrösen Kappe atherosklerotischer Plaques konnten Eken *et al.* vermehrt miRNA-210 nachweisen. Erwiesen sich die Plaques als instabil, so war das Level an miRNA-210 niedriger als in stabilen Plaques. Als Grund dafür identifizierten sie die Hemmung des Wnt-Signalweges in VSMC. Bei verminderter Expression von miRNA-210 kommt es zu vermehrter Apoptose der VSMC und dadurch zur Bildung instabilerer Plaques. (Eken et al., 2017) Die zunehmende Instabilität der Plaques in der Progression der Erkrankung wird in einem anderen Aspekt durch miRNA-24 beeinflusst durch das Ausdünnen der fibrösen Kappe. In Makrophagen koronararterieller Plaques in ApoE^{-/-} Mäusen zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Expression von miRNA-24 und der Bildung der Metalloprotease Mmp-14. Bei hoher Expression von miRNA-24 zeigten sich histologisch stabilere Plaques und eine verminderte Aktivität und Bildung von Mmp-14. Im Umkehrschluss konnte bei Inhibierung der miRNA-24 eine Größenzunahme der Plaques und vermehrte Aktivität von Mmp-14 beobachtet werden. (Di Gregoli et al., 2014) Die von Makrophagen gebildete Metalloprotease Mmp-9 steht hingegen unter anderem unter Kontrolle von miRNA-21 (Fan et al., 2014). Metalloproteasen sind, wie bereits beschrieben, durch Abbau der Extrazellulärmatrix maßgeblich an der Destabilisierung der Plaques beteiligt.

Auch im Bereich der KHK und ihrer Folgen spielen miRNA eine wichtige Rolle.

In Modellen von Myokardinfarkten wurde eine erhöhte Expression der miRNA-30-Familie beobachtet. Gleichzeitig war die Cystathionine-gamma-lyase (CSE) vermindert exprimiert und es wurden entsprechend verminderte Werte an Schwefelwasserstoff (H₂S) festgestellt, welches durch die CSE gebildet wird. Bei verminderter Expression von miRNA-30 zeigten erhöhte CSE- und H₂S-Werte. Beides korrelierte mit einer kleineren Infarktgröße, kleinerer Anzahl apoptotischer Zellen und verbesserter post-Infarkt-Herzfunktion. Eine Überexpression von miRNA-30b verschlimmerte die Herzverletzung. (Y. Li & Maegdefessel, 2016; Shen et al., 2015)

Im Bereich von Fibrose scheint miRNA-21 einen bedeutenden Beitrag in der Regulation zu leisten. Durch Hemmung von Sprouty1 durch miRNA-21 wird die Aktivität der ERK-MAP-Kinase in kardialen Fibroblasten verstärkt. Dies beeinflusst sowohl das Überleben der Fibroblasten als auch deren Sekretion von Wachstumsfaktoren. Durch Hemmen der miRNA-21 zeigte sich eine verminderte kardiale Fibrose im Mausmodell. (Thum et al., 2008) Erhöhte Expression von miRNA-21 fördert des Weiteren Fibrose durch vermehrte Bildung der Metalloprotease Mmp-2 in Ischämie-Reperfusions-Modellen. MiRNA-21 aktivierte das Fibroblasten-Überleben und triggerte fibrotisches Remodeling. (Fiedler & Thum, 2013; Roy et al., 2009)

miRNA29b

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich, neben der Histologie und Expression bestimmter Gene, auch mit der Expression der miRNA-29b.

Die Familie der miRNA-29 besteht aus mirRNA-29a,b und c, die auf zwei Loci auf Chromosom 1 und 7 kodiert sind. (He et al., 2013; Lars Maegdefessel et al., 2014) Der Einfluss von miRNA-29 konnte in einer Vielzahl fibrotischer Krankheiten nachgewiesen werden. So beeinflusst miRNA-29 die Entstehung pulmonaler, renaler, hepatischer, dermalen und kardialer Fibrose. (Deng et al., 2017; Lars Maegdefessel et al., 2014; O'Reilly, 2016) Bei Mäusen mit hypertensiv bedingter kardialer Fibrose konnte beispielsweise die Progression der Fibrose

durch Behandlung mit miRNA-29 gehemmt und die kardiale Dysfunktion gebessert werden (Y. Zhang et al., 2014) Verschiedene Gene, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) kodieren, werden von ihr kontrolliert und reguliert. Neben verschiedenen Kollagenen, wie Kollagen I und III, zählen dazu auch Elastin und Fibrilline. (Deng et al., 2017; He et al., 2013; Lars Maegdefessel et al., 2012; van Rooij et al., 2008)

Die Relevanz der miRNA-29 für kardiovaskuläre Erkrankungen war in den letzten Jahren Bestandteil der Forschung.

Im Herzen wird miRNA-29 überwiegend in kardialen Fibroblasten exprimiert. In experimentell ausgelösten Myokardinfarkten im Mausmodell zeigten sich 3 Tage nach dem Infarkt verminderte Level an miRNA-29 im Bereich des Infarkts, korrelierend mit erhöhten Level von Kollagen Typ 1alpha1 (Col1a1), Kollagen Typ 1alpha2 (Col1a2), Kollagen Typ 3alpha1 (Col3a1) und Fibrillin-1. (van Rooij et al., 2008) Hypoxie löste in Kardiomyozyten in vitro eine verminderte Expression von miRNA-29b aus. Eine Überexpression von miRNA-29b verringerte zudem die Zahl hypoxisch bedingter apoptotischer Kardiomyozyten in vitro. (Cai & Li, 2019) Dies verdeutlicht die Bedeutung im kardialen post-infarkt Remodelling und der kardialen Fibrose.

Im vaskulären System rückte die miRNA-29 Familie in den Fokus der Arteriosklerose und der mit ihr vergesellschafteten Krankheiten.

Boon *et al.* zeigten mit ihrer Forschung, dass in der aortalen Gefäßwand gealterter Mäuse die Expression von miRNA-29 erhöht war. Dies war verbunden mit einer Verminderung der EZM, was einen Zusammenhang zwischen miRNA-29 und der Produktion vaskulärer EZM vermuten ließ. Im Mausmodell für abdominelle Aortenaneurysmata, ausgelöst durch Infusionen mit Angiotensin 2, konnten ebenfalls erhöhte Werte für miRNA-29b im Bereich der Aneurysmabildung festgestellt werden. Eine Inhibierung der miRNA29-b stoppte die Dilatation der Aorta im gleichen Modell und zeigte eine vermehrte Bildung von Col1a1, Col3a1 und Elastin. Die Bildung der Metalloprotease Mmp9 war zudem

vermindert. (Boon et al., 2011) Maegdefessel *et al.* transfizierten humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen und humane aortale adventitiale Fibroblasten mit Hemmstoffen der miRNA-29b *in vitro*. In beiden Zellreihen stieg die Bildung von COL1A1 und COL3A1 und in den humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen Elastin signifikant an. Eine Behandlung mit pre-miRNA-29b zeigte gegenteilige Effekte. (Lars Maegdefessel et al., 2012)

Beim Vergleich früher koronarer atherosklerotischer Plaques mit gesunden Kontrollen im Menschen sind die Werte für miRNA-29 in den atherosklerotischen Läsionen hochreguliert (R. Wang et al., 2015). Hochregulierte Werte für miRNA-29 sind ebenfalls im Plasma von Patienten mit instabileren atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu Patienten mit stabilen Plaques zu finden (Fasolo et al., 2019), sowie im Plasma von Patienten mit subklinischen verdickten Carotiden (Huang et al., 2017).

Die Angriffspunkte der miRNA-29 in der Entstehung und Progression der Atherosklerose sind vielfältig.

In Experimenten mit ApoE^{-/-} Mäusen und C57BL/6J Mäusen, die eine high-fat-diet erhielten, war die Expression von miRNA-29b in der Aorta erhöht. (Chen et al., 2012; Zhu et al., 2014) Chen *et al.* fanden zudem heraus, dass in Aorten von Mäusen, die high-fat-diet erhielten, Mmp2 und Mmp9 überexprimiert waren (Chen et al., 2012). Bei der Behandlung der ApoE^{-/-} Mäuse mit einem miRNA-29b Mimic stieg die Permeabilität des Gefäßendothels, sowie die Apoptose-Aktivität an. Bei einer Behandlung mit Inhibitoren der miRNA-29b sank sowohl die Permeabilität als auch die apoptotische Aktivität. Die verminderte apoptotische Aktivität erklären sich Zhu *et al.* dabei durch die von miRNA-29b regulierte Expression des Melatonin-Rezeptors-1. (Chen et al., 2012; Zhu et al., 2014)

In durch oxLDL stimulierten menschlichen endothelialen Zellen aus der Nabelschnurvene, konnte durch miRNA-29b Mimics zudem die Expression von NF-κB und ICAM-1 hochreguliert werden. (Zhu et al., 2014) In menschlichen aortalen VSMC führte eine Stimulation mit oxLDL zu einer erhöhten Expression von miRNA-29b mit verstärkter Bildung der Metalloproteasen MMP2 und MMP9.

Durch Bindung an LOX-1 führt oxLDL dabei zu einer Hochregulation von miRNA-29b (Chen et al., 2012; Chen et al., 2011). Eine Behandlung mit Inhibitoren der miRNA-29b könnte dementsprechend das Voranschreiten atherosklerotischer Plaques durch gehemmte Expression der MMPs verhindern (J. Lee et al., 2015; Lars Maegdefessel et al., 2014). Die Regulation von VSMC durch miRNA-29b ist ebenfalls in einigen Studien untersucht. Sie zielt auf Gene, die für Elastizität, Kalzifizierung und Zellmigration verantwortlich sind (Lars Maegdefessel et al., 2015). So beeinflusst miRNA-29b die Expression von ADAMTS7. Verminderte Werte von miRNA-29b sind mit einer erhöhten Expression von ADAMTS7 assoziiert. ADAMTS7 nimmt eine entscheidende Rolle im Kalzifizierungsprozess von VSMC ein. (Churov et al., 2019; Du et al., 2012)

Der Einfluss von miRNA-29b auf fibrotische Erkrankungen durch Regulation verschiedener Bestandteile der EZM wurde bereits beschrieben. Im Bereich der Plaqueprogression und –stabilität zeigten Ulrich *et al.* den Einfluss der miRNA-29b auf. Sie behandelten ApoE^{-/-} Mäuse mit Inhibitoren der miRNA-29b. Daraufhin zeigten sich deutliche Verkleinerungen atherosklerotischer Plaques im Bereich der Aortenwurzel und der brachiocephalen Arterien, mit verkleinerten nekrotischen Kernen. Ebenfalls zeigte sich histologisch eine dickere fibröse Kappe innerhalb der Plaques im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen, mit vermehrter Expression von smooth-muscle-actin. VSMC, die mit pre-miRNA-29b transfiziert wurden, bildeten signifikant weniger Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col4a1, Col5a2, Fibronectin-1 und Mmp-2. Entsprechend behandelte man die ApoE^{-/-} Mäuse mit Hemmern der miRNA-29b, mit resultierender erhöhter Bildung von Col1a1 und Col3a1 und verdickter fibröser Kappe innerhalb der Plaques. Interessanterweise blieb dieser Effekt auf bereits atherosklerotisch veränderte Bereiche des Gefäßsystems beschränkt. Auch andere Organsysteme zeigten keine verstärkte Fibrose. (Ulrich et al., 2016)

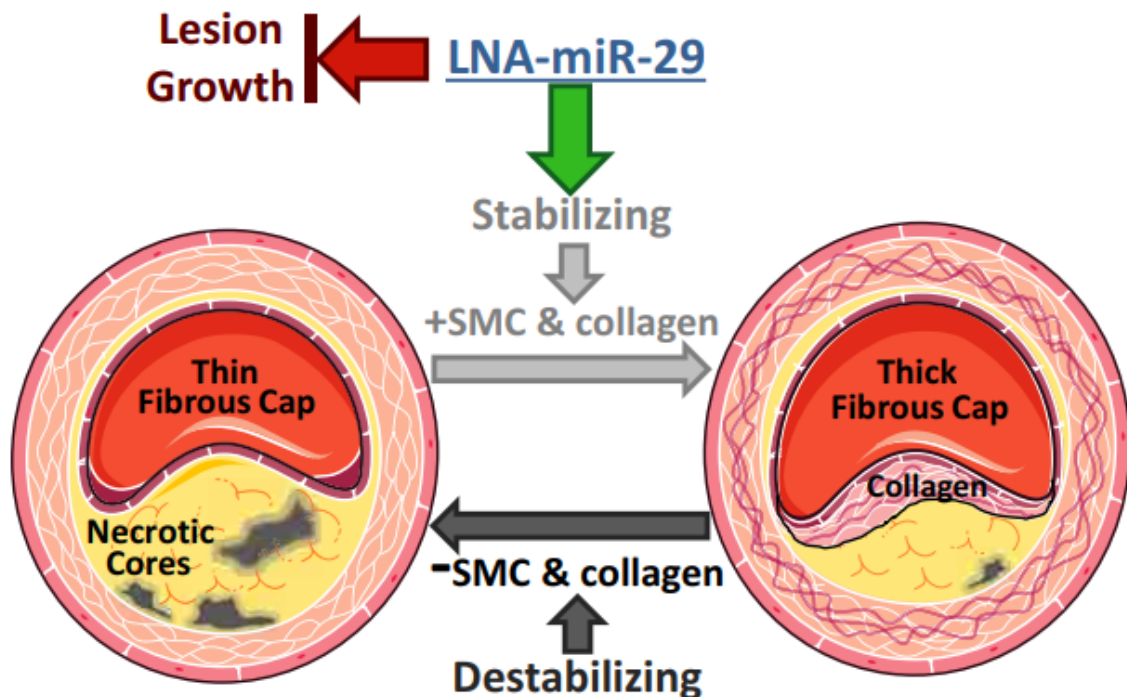


Abbildung 5: durch Applikation eines Inhibitors der miRNA29 (LNA-miR-29) zeigten Ulrich *et al.* die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques im Modell der ApoE^{-/-} Maus (Ulrich *et al.* 2016)

Die Regulation auf Ebene der Fibroblasten entfaltet miRNA-29b seine Wirkung unter anderem durch Blockade der Signalkaskade, die durch transforming-growth-factor beta (TGF-beta) ausgelöst wird. TGF-beta vermittelt Zell-Proliferation, -Differenzierung, -Überleben und -Motilität. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Narbenbildung und Fibrose. (Abonnenc *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2011) Gleichzeitig wird die Expression der miRNA-29 durch TGF-beta kontrolliert. In verschiedenen Organen suppressierte TGF-beta miRNA-29 in Fibroblasten. (Cushing *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2010; Roderburg *et al.*, 2011; B. Wang *et al.*, 2012)

Wie bereits beschrieben ist NF-kB in atherosklerotische Läsionen vermehrt aktiviert und vermittelt pro-inflammatorische Signale. Mott *et al.* konnten in diesem Zuge auch regulatorische Wirkung auf die Expression der miRNA-29

nachweisen. (Mott et al., 2010) Dadurch schließt sich der Kreis zur Pathogenese und Progression, wie sie oben bereits beschrieben wurde.

Die Regulation der Atherosklerose stellt sich insgesamt als ein sehr komplexes System dar, in dem noch viele Faktoren unbekannt oder unzureichend erforscht sind. Auch die Rolle verschiedener miRNA ist noch nicht endgültig beleuchtet. Klar ist jedoch, dass man durch die Entdeckung und Erforschung der miRNAs Möglichkeiten erschlossen hat, die Entstehung und Progression der Atherosklerose zu beeinflussen.

2.6 Tiermodelle der Atherosklerose

Zur Erforschung der Pathogenese und Progression der Atherosklerose wurden in den vergangenen Dekaden eine Vielzahl an verschiedenen Tiermodellen entwickelt, die die Erkrankung des Menschen möglichst optimal widerspiegeln sollen. Die meisten Modelle finden sich dabei in der Maus, Kaninchen, Primaten und Schweinen. Im Folgenden werden einige gängige Tiermodelle kurz umrissen, um die Notwendigkeit der Verwendung und Weiterentwicklung von Großtiermodellen, wie z.B. im Schwein, hervorzuheben.

Maus-Modelle

Die Maus als Tiermodell für Atherosklerose bringt eine Vielzahl an Vorteilen mit sich, die insbesondere auf logistischer Ebene entscheidend sind. Mäuse zeigen eine schnelle Reproduktionszahl und sind leicht und billig zu halten. Da das Mausgenom ausgiebig untersucht wurde und Möglichkeiten der Genmanipulation in der Maus etabliert sind, lässt sich an der Maus der Einfluss verschiedener Gene leicht untersuchen. (Emini Veseli et al., 2017; Getz & Reardon, 2012, 2015; Leong et al., 2015; Mushenkova et al., 2019; Smith et al., 2003)

ApoE^{-/-} Modell:

Das ApoE^{-/-} Modell der Maus ist eines der am weitesten verbreiteten Tiermodelle für Atherosklerose (Millon et al., 2014). ApoE ist Bestandteil nahezu aller Lipoproteine, außer LDL. Durch den Knockout von ApoE zeigen diese Mäuse einen gestörten Lipoprotein-Stoffwechsel. Im Plasma finden sich massiv erhöhte Cholesterin-Werte bereits unter Standard-Ernährung mit ca. 400-600mg/dl (Norm: 75-110mg/dl), welche durch Fütterung von westlicher Diät noch weiter erhöht werden können. Dabei geht der Anstieg des Gesamt-Cholesterins vor allem auf einen Anstieg der VLDL-Werte zurück. (Jacob Fog Bentzon & Falk, 2010; Emini Veseli et al., 2017) In diesem Modell kommt es zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen (Jawień et al., 2004; Millon et al., 2014). Nach ca. 6 Wochen kommt es in der ApoE^{-/-} Maus zur Anlagerung von Monozyten an der Gefäßwand, nach 8 Wochen finden sich Schaumzellen. Nach 15 Wochen hat sich eine fibröse Kappe aus VSMC über einem nekrotischen Kern gebildet. Das

Ausmaß der Läsionen war dabei bei Mäusen, die eine westliche Diät erhielten, größer. (Nakashima et al., 1994) Bemerkenswert ist dabei, dass bei der ApoE^{-/-} Maus menschen-ähnliche Läsionen auftraten, auch wenn nur Standard-Ernährung verwendet wurde. Eine Ernährung mit erhöhtem Fettgehalt war nicht notwendig. (Getz & Reardon, 2012) Dies ist wichtig, da eine dauerhafte Ernährung gesunder Mäuse mit high-fat-high-cholesterol eine starke systemische Entzündungsreaktion auslöste. Auf diese kann im ApoE^{-/-} Modell zur Erforschung fortgeschrittener Läsionen verzichtet werden. (Y. T. Lee, Lin et al., 2017; Vergnes et al., 2003) Ähnlich wie beim Menschen fanden sich in der ApoE^{-/-} Maus die atherosklerotische Veränderungen im Bereich veränderter Scherkräfte im Gefäßsystem (Suo et al., 2007). Die Entwicklung des ApoE^{-/-} Modells der Maus hat geholfen die Rolle der chronischen Inflammation, sowie Initiation und Progression der Atherosklerose zu verstehen (Poznyak et al., 2020) Durch weitere Modifikationen der ApoE^{-/-} Maus konnten kardiale Ischämien ausgelöst werden. Diese wurden jedoch am Ehesten durch Okklusion der kardialen Gefäße bedingt und nicht durch eine Plaqueruptur oder Thrombusbildung. (Jacob Fog Bentzon & Falk, 2010; Yesilaltay et al., 2009)

Das ApoE^{-/-}-Modell birgt jedoch auch Nachteile, die die Übertragbarkeit auf den Menschen vermindern.

Die Lokalisation der atherosklerotischen Gefäßveränderungen finden sich im ApoE^{-/-} Mausmodell insbesondere im Bereich der Aortenwurzel, des Aortenbogens, den großen Abgängen der Aorta, sowie den brachiocephalen Arterien und den Karotiden. (Getz & Reardon, 2012; Nakashima et al., 1994) Beim Menschen finden sie sich v.a. im Bereich der abdominalen Aorta, der Iliakalgefäße, der Herzkranzgefäße und der Karotiden (Getz & Reardon, 2012).

Menschen-ähnliche koronare atherosklerotische Läsionen sind im ApoE^{-/-} Modell nur selten zu beobachten (Emini Veseli et al., 2017). In der ApoE^{-/-} Maus konnten im Bereich der Aortenwurzel Läsionen gefunden werden, die leicht in die Koronararterien hineinragten, dann jedoch abrupt endeten. Im Bereich der Koronarien, in denen der Mensch verstärkt atherosklerotische Plaques ausbildet, schien die Maus geschützt zu sein. (Hu et al., 2005)

Ein weiterer wichtiger Kritikpunkt im ApoE^{-/-} Modell ist, dass ApoE, neben der Rolle auf die Homöostase der Lipoproteine im Plasma, noch andere Funktionen im menschlichen Körper besitzt. Es hat Einfluss auf Gehirn, das Fettgewebe, auf endokrine Zellen, sowie u.a. auch auf VSMC. ApoE besitzt anti-oxidative, anti-proliferative und anti-inflammatorische Eigenschaften. Entsprechend konnte die Ausbildung der Atherosklerose hier durch weitere, nicht explizit betrachtete Faktoren begünstigt werden. (Fuster et al., 2012; Getz & Reardon, 2009; Mushenkova et al., 2019)

Im ApoE^{-/-} Modell ist, wie bereits erwähnt, insbesondere die VLDL-Fraktion im Serum deutlich erhöht. Dies entspricht jedoch nur bedingt der Situation in der menschlichen Erkrankung. Hier sind vor allem erhöhte LDL-Werte in der Pathogenese beteiligt. (Fuster et al., 2012; Plump et al., 1992) Ein Modell, das eine für diese Situation bessere Lipoproteinverteilung aufweist, ist das LDL-Rezeptor-Knockout-Modell (LDLR^{-/-}).

LDLR^{-/-} Modell:

Im LDLR^{-/-} Modell präsentierten sich insbesondere die Werte für LDL bereits bei Standard-Ernährung leicht erhöht, welche unter high-fat Ernährung noch deutlich anstiegen. (Ishibashi et al., 1993) Den Hauptanteil des Gesamt-Cholesterins nimmt in diesem Modell die LDL-Fraktion ein. (Poznyak et al., 2020) LDLR^{-/-} Mäuse entwickelten nach ca. 6 Wochen mit high-fat Ernährung an den gleichen Stellen atherosklerotische Plaques, wie ApoE^{-/-} Mäuse (Getz & Reardon, 2015). Die Plaques entsprachen weitestgehend den Plaques im ApoE^{-/-} Modell, jedoch entwickelten sie sich in ApoE^{-/-} Modellen der Maus schneller (Emini Veseli et al., 2017; Knowles & Maeda, 2000). Der Vorteil von LDLR^{-/-} Modellen findet sich in einem dem Menschen ähnlicheren Lipoprotein-Profil, sowie fehlender Nebeneffekte eines fehlenden ApoE. (Emini Veseli et al., 2017) Um fortgeschrittene Plaques zu entwickeln, benötigten LDLR^{-/-} jedoch pro-atherogene Diät, mit erhöhten Anteilen an Fett und Cholesterol. (Getz & Reardon, 2012)

Schweine-Modelle

Das Schwein als Großtiermodell zur besseren Übertragbarkeit erlangte in den letzten Jahren, durch verbesserte Möglichkeiten der Genmanipulation, erneut große Aufmerksamkeit.

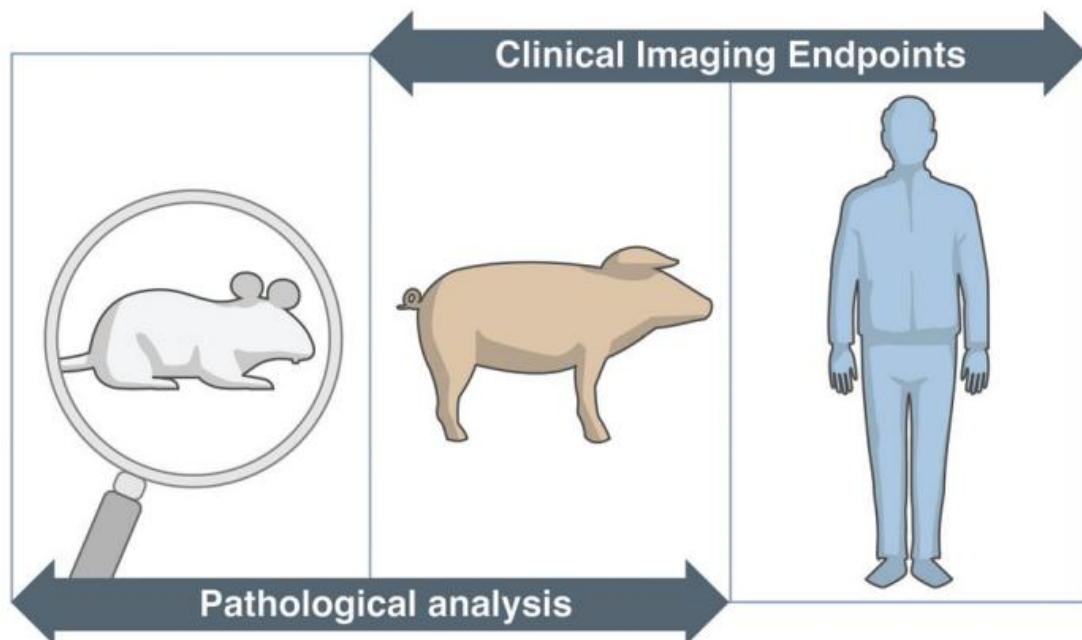


Abbildung 6 Schweinemodelle als fehlendes Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung (Shim et al. 2016)

Bereits 1954 veröffentlichten Gottlieb und Lalich ihre Untersuchungen an über 2000 Schweine-Aorten. Sie konnten feststellen, dass Schweine, im Gegensatz zu den am meisten verwendeten Kleintiermodellen, spontane Atherosklerose entwickelten. (GOTTLIEB & LALICH, 1954) Die atherosklerotischen Läsionen entwickelten sich mit dem Alter der Schweine und konnten durch atherogene Fütterung verstärkt werden (Getz & Reardon, 2012; Skold et al., 1966). Die Plaques gingen dabei jedoch meist nicht über Schaumzell-Ansammlungen hinaus und bedurften langer Zeit, bis sie sich entwickelten (Mushenkova et al., 2019; J. Shim et al., 2016).

Rapacz-Schweinemodell:

Um die Limitation des normalen Schweins bezüglich Dauer und Ausprägung atherosklerotischer Läsionen zu überwinden entwickelten Rapacz *et al.* ein Schweinemodell durch selektive Züchtung von Schweinen, die natürliche Mutationen in den Genen des LDL-Rezeptors und ApoB enthielten. (Hasler-Rapacz *et al.*, 1998; Prescott *et al.*, 1995; J. Shim *et al.*, 2016; D. Wang *et al.*, 2020) In einer Zeitspanne von 3 Jahren unter Standard-Fütterung entwickelten die Tiere fortgeschrittene atherosklerotische Plaques mit nekrotischem Kern, fibröser Kappe, Kalziumablagerungen und Neovaskularisation. Die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen war dabei, wie beim Menschen, koronar stärker als aortal. (Prescott *et al.*, 1991) Die Entwicklung zu fortgeschrittenen Plaques konnte auch in diesem Modell durch Fütterung mit high-fat-high-cholesterol Nahrung beschleunigt werden (D. Wang *et al.*, 2020). Trotz der Ausbildung mensch-ähnlicher Läsionen limitierten einige Faktoren den weitläufigen Einsatz dieses Modells. Neben der Dauer konnte inter-individuell bei diesem Schweinemodell eine ausgeprägte Variabilität in den gemessenen Cholesterin-Werten und der Ausprägung der atherosklerotischen Plaques festgestellt werden. Auch limitieren Größe und Gewicht der Schweine. Nach 2 Jahren wogen die Schweine unter Standard-Ernährung im Durchschnitt 210kg. (Davis *et al.*, 2014; Hamamdzcic & Wilensky, 2013; Prescott *et al.*, 1995; Prescott *et al.*, 1991; D. Wang *et al.*, 2020) Durch selektive Züchtung mit kleineren Schweinen konnte das Problem der Größe und des Gewichts vermindert werden, jedoch stieg dadurch die Variabilität in der Krankheitsausprägung weiter an (Davis *et al.*, 2014; Thim, 2010).

Andere Modelle am Hausschwein, wie beispielsweise von Gerrity *et al.* am Yorkshire-Schwein mit induziertem Typ 1 Diabetes und ernährungsbedingter Hypercholesterinämie, scheiterten durch eingeschränkte Reproduzierbarkeit und inter-individuelle Variabilität der Läsionen (Gerrity *et al.*, 2001; Hamamdzcic & Wilensky, 2013; J. Shim *et al.*, 2016)

Um dem Problem der Größe der Tiere beizukommen wurden Modelle mit kleineren Schweinen entwickelt. Hierzu zählen u.a. das Ossabaw und das Yucatan Minipig. Sie zeigen dem Menschen ähnlichere Körpermaße.

Ossabaw-Schweine:

Das Ossabaw-Schwein entstand durch natürliche Selektion auf der Ossabaw Insel vor Georgia in den USA. Unter Fütterung von high-fat-high-cholesterol und fruktosehaltigem Futter entwickelt es eine Form des metabolischen Syndroms mit Dyslipidämie, Übergewicht, Bluthochdruck und leichtem, nicht-insulinpflichtigen Diabetes. Die Tiere bildeten darunter frühe koronare atherosklerotische Läsionen aus. (Hamamdzcic & Wilensky, 2013; Neeb et al., 20)

Durch die Erleichterung der Genmanipulation im Schwein erfolgte die Modifikation vieler Schweinemodelle. So auch im Fall des Ossabaw-Schweins.

PCSK9 spielt eine Rolle in der Lipoprotein-Homöostase. Nach Bindung an hepatische LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche werden diese internalisiert und abgebaut. Die Gain-of-Function Mutation D374Y-PCSK9 erhöht die Affinität für den LDL-Rezeptor, sodass vermehrt Rezeptoren internalisiert und degradiert werden. Dies wiederum führt zu erhöhten LDL-Spiegeln im Serum. (Akram et al., 2010; Al-Mashhadi et al., 2013; Horton et al., 2009)

Yuan *et al.* entwickelten ein D374Y-PCSK9-Gain-of-function Modell am Ossabaw-Schwein. Bereits unter Standard-Ernährung erzielten die Schweine doppelt so hohe Plasma-Cholesterin-Werte, wie Landrassen-Schweine, welche eine high-fat-high-cholesterol (HFHC) Diät erhielten. Ossabaw-D374Y-PCSK9 Schweine entwickelten unabhängig davon, ob sie eine Standard- oder HFHC-Diät erhielten, fortgeschrittene atherosklerotische Plaques in den Herzkranzgefäßen. Die Zeit bis dies eintrat war in der HFHC-Gruppe, mit 24 vs. 43 Wochen, knapp 50% kürzer als in der Gruppe mit Standard-Diät. Die gebildeten Plaques waren zu einem hohen Grad okklusiv und in ihren histopathologischen Eigenschaften mit denen des Menschen vergleichbar. (F. Yuan et al., 2018)

Das Ossabaw-Schwein scheint, durch die oben genannten Charakteristika, das Krankheitsgeschehen des Menschen mit seinen verschiedenen Komponenten in der Entstehung widerzuspiegeln. Eine differenzierte Betrachtung einzelner Faktoren wird in diesem Modell jedoch erschwert.

Yucatan-Minipig

Shim *et al.* verwendeten ein ApoE^{-/-} Modell des Yucatan-Minipigs. Nach 8 Wochen Standard-Diät zeigten sich erhöhte Cholesterin-Werte, die sich, wie im Maus-Modell, insbesondere durch erhöhte VLDL- und IDL-Werte erklären ließen. In männlichen Tieren kam es zudem zu einer Triglyceriderhöhung. (Vergleich Abbildung 7) Diese Erhöhung fehlte bei weiblichen Tieren. Überraschend war auch, dass bei weiblichen Tieren die Werte für LDL und HDL nach dieser Zeit signifikant erniedrigt waren, bei gleichzeitig signifikanter Erhöhung für VLDL und IDL. Nach 52 Wochen wurden die Gefäße der Tiere untersucht. In den Herzkranzgefäßen der ApoE^{-/-} Tiere konnten nur kleine Plaques festgestellt werden, wobei große Teile der Gefäße keine Veränderungen aufwiesen. Signifikante Unterschiede fehlten. In allen Schweinen beschränkte sich die Ausprägung der Läsionen zu großen Teilen auf Xanthome bzw. pathologische intimale Verdickung. (Jeong Shim et al., 2017)

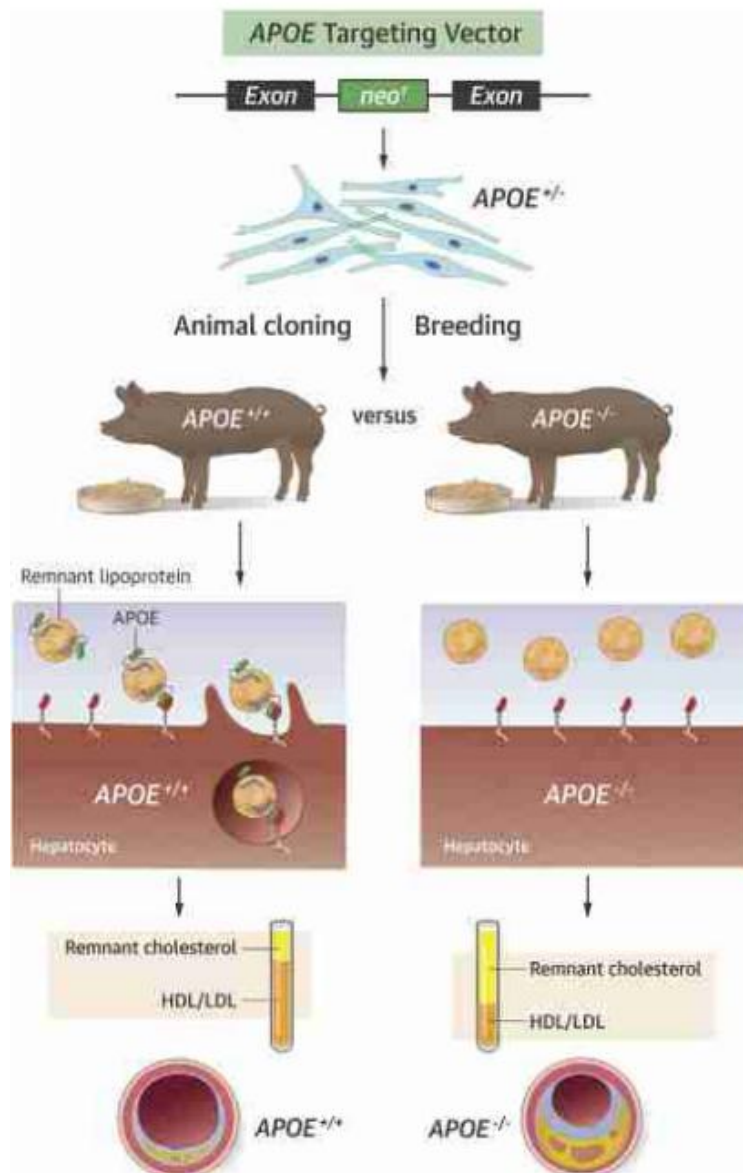


Abbildung 7: Vergleich der Lipoproteinverteilung und Ausbildung von Plaques im ApoE^{-/-} und ApoE^{+/+} Yucatan-Minipig (Shim et al. 2017)

D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipig

Al-Mashhadi *et al.* verwendeten das Yucatan-Minipig zur Generierung eines weiteren Großtiermodells, welches auch im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde. Sie entwickelten ein Modell, das die D374-PCSK9-Gain-of-Function enthielt. Bereits unter Standard-Ernährung zeigten die Schweine erhöhte LDL-Werte, ähnlich dem Menschen mit familiärer Hypercholesterinämie,

die unter HFHC-Diät weiter anstiegen. Auch VLDL stieg im Rahmen der HFHC-Diät an. Nach 43-48 Wochen HFHC-Diät zeigten die Gefäße ein breites Spektrum an atherosklerotischen Veränderungen, die nach Virmani von Xanthoma bis normal ausgeprägte fibröse Kappe reichten. In der Arteria interventricularis anterior (LAD) zeigten sich bei 100% der D374Y-PCSK9- Schweine fortgeschrittene Läsionen vs. 28% bei den Kontrollschweinen. Auch aortal und iliofemoral zeigten sich entsprechende Läsionen. Dabei entwickelten sich die Plaques, nicht wie bei der Maus, in einer Intima, die bereits VSMCs enthielt. (Al-Mashhadi et al., 2013)

LDLR-/- Yucatan-Minipig:

Als weiteres Schweinemodell entwickelten Davies *et al.* Yucatan-Minipigs mit einer Deletion des LDL-Rezeptors. Dieses Modell wurde ebenfalls im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet. Bereits vor dem ersten Säugen wurden bei LDLR-/- Ferkeln signifikant erhöhte Gesamt-Cholesterin-Werte gemessen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Unter Standard-Ernährung war nach 7 Monaten 45% der abdominalen Aorta der LDLR-/- Schweine atherosklerotisch verändert vs. 0% in der Vergleichsgruppe. Auch in den Koronararterien wurden in der LDLR-/- Gruppe kleine atherosklerotische Läsionen gefunden, welche in der Vergleichsgruppe fehlten. Wurden die Schweine, nach anfänglich 5 Monaten Standard-Ernährung, fortan mit HFHC-Diät gefüttert, so konnten deutliche Anstiege der Cholesterin-Werte beobachtet werden. Obwohl daraufhin sowohl LDLR+/+, als auch LDLR+/- und LDLR-/- vergleichbaren Befall in der abdominalen Aorta zeigten, war die Dicke der Läsionen in den LDLR-/- Schweinen signifikant erhöht. Nach insgesamt 11 Monaten wurden die Herzkranzgefäße der Tiere untersucht. In LDLR+/+ Schweinen fanden sich nur kleine Stellen mit intimaler Verdickung und in LDLR+/- Schweinen zusätzlich kleine Areale mit atherosklerotischen Veränderungen. In LDLR-/- Schweinen konnten hingegen fortgeschrittene Läsionen mit fibröser Kappe, Kalzifikationen und Hämorrhagien im Bereich der rechten Koronararterie (RCA), der LAD und der Ramus circumflexus gefunden werden, auch und insbesondere in distalen

Bereichen der Gefäße. (Davis et al., 2014) Im Vergleich zu D374Y-PCSK9-Schweinen entwickelten die LDLR^{-/-} schneller und stärker ausgeprägte Atherosklerose. (Mushenkova et al., 2019)

Vergleichbare Ergebnisse zeigten auch Burke *et al.*, obwohl bei ihnen weniger Cholesterol zugefüttert wurde. (Burke et al., 2018)

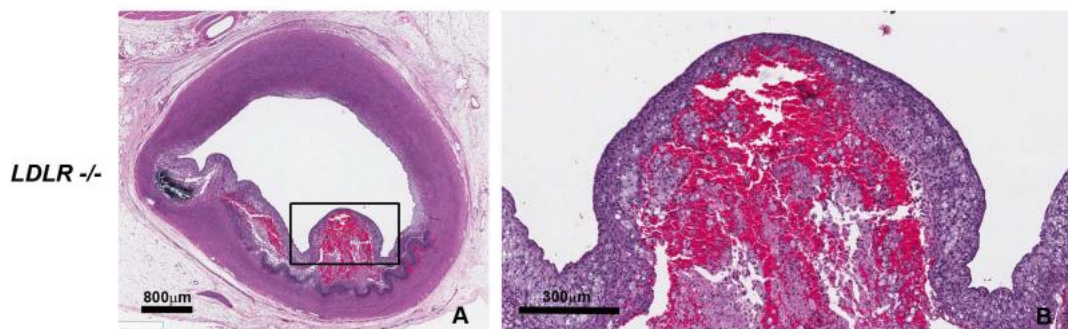


Abbildung 8: Darstellung eines koronararteriellen Plaques in HE-Färbung eines 11 Monate alten LDLR^{-/-} Yucatan-minipig (Davis et al. 2014)

3. Problemstellung - Ziel dieser Arbeit

Da gesellschaftlich relevant, besteht unzweifelhaft Forschungsbedarf an atherosklerotisch bedingten Erkrankungen. Im Laufe der Jahre haben sich hierfür verschiedenste Klein- und Großtiermodelle etabliert, welche jedoch, insbesondere am kardialen Manifestationsort, im Bereich der Translation häufig limitiert sind. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei seit wenigen Jahren vorhandene Großtiermodelle der Atherosklerose an Yucatan-Minipigs sowohl histologisch als auch auf molekularbiologischer Ebene erweitert untersucht.

Ziele dieser Arbeit waren entsprechend:

- Die Bestätigung vorangegangener Arbeiten zur sicheren Ausbildung atherosklerotischer Gefäßveränderungen in den jeweiligen Modellen
- Die erweiterte histologische Untersuchung kardialer Strukturen mit Augenmerk auf die Koronargefäße, Herzklappen und das Myokard, jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen
- Die Untersuchung bestimmter Gene auf ihr Expressionsmuster in den entsprechenden Geweben im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen
- Die Untersuchung der Expression von Micro-RNA29b in den entsprechenden Geweben im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen
- Die Untersuchung der Ergebnisse auf Frage der Translation zum Menschen

4. Methodik

4.1 Schweinemodelle

Die Tierhaltung und alle durchgeführten Versuche wurde von der Ethikkommission für Tierforschung der Regierung Oberbayern unter dem TVA-Aktenzeichen: ROB-55.2-2532.Vet_02-18-53 genehmigt.

LDLR-/- Yucatan-minipigs

Das verwendete Schweinemodell ExeGenLDLR Miniswine wurde von Exemplar Genetics (Coralville, Iowa, United States of America) entwickelt.

Die LDLR-/- Schweine wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und erhielten ab einem Alter von 6 Monaten high-fat-diet. Nach Überführung der ausgewachsenen Schweine durch Exemplar Genetics erhielten sie für weitere 28 Tage high-fat-diet (Altromin C9061 #900005 Atherogene Diät, Lage, Deutschland). 28 Tage nach Überführung wurden die Tiere in einem Alter von ca. 12 Monaten euthanasiert und es erfolgte die Probengewinnung.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit liegt der Fokus auf entnommenen Proben des Herzens. Es wurden Proben von Myokard, Herzklappen und Koronararterien entnommen. Ein Teil der Proben wurde als Fresh-Frozen bei -80°C gelagert, ein anderer Teil 2% zinc-paraformaldehyde für 48h konserviert und im Verlauf zur Durchführung histologischer Experimente in Paraffin fixiert. Um in den folgenden Experimenten eine Kontrollgruppe vorweisen zu können, wurden, entsprechen der Haltung und des Prozederes der LDLR-/- Schweine, Proben von Wildtyp-Schweinen entnommen.

D374Y-PCSK9-Yucatan-minipigs

Das verwendete Schweinemodell mit D374Y-PCSK9 transgenic pigs wurde von Rozh H. Al-Mashhadi *et al.* entwickelt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen von Tieren, welche von PixieGene (Kopenhagen, Dänemark) erworben wurden.

Die D374Y-PCSK9-Gain-of-function Schweine wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten und erhielten Nahrung mit erhöhtem Fett- und Cholesterinanteil. Zum Zeitpunkt der Überführung waren die Tiere ca. 1 Jahr alt. Für 6 Monate erhielten die Tiere eine von der Firma PixieGene nicht näher definierte hochkalorische "Western-Diet" Nahrung. Nach 16 Monaten wurden die Tiere euthanasiert und die entsprechenden Proben entnommen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit liegt der Fokus auf entnommenen Proben des Herzens. Es wurden Proben vom Myokard, Herzklappen und Koronararterien entnommen. Ein Teil der Proben wurde als Fresh-Frozen bei -80°C gelagert, ein anderer Teil in 2% zinc-paraformaldehyde für 48h konserviert und im Verlauf zur Durchführung histologischer Experimente in Paraffin fixiert. Als Kontrollgruppe dienten, auch in Bezug auf die PCSK9 Gain-of-Function Schweine, die oben bereits erwähnten Wildtyp Yucatan minipigs.

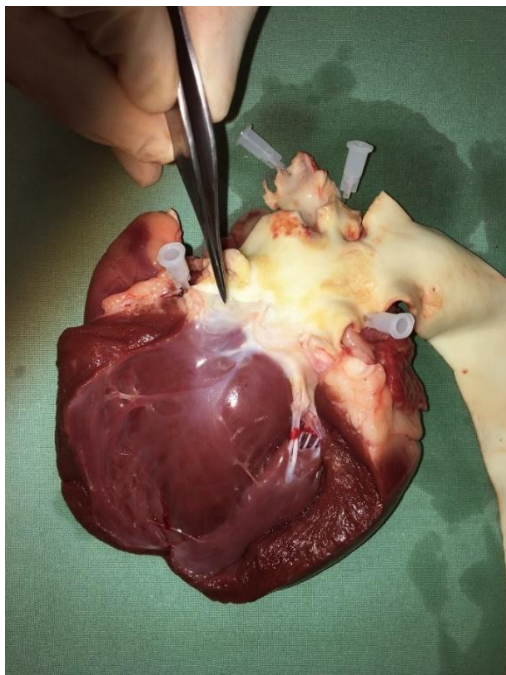


Abbildung 9:
Entnommenes Herz
eines LDLR-/-
Yucatan minipigs.
Die Pinzette hält
eine Tasche der
Aortenklappe.

4.2 Histologische Untersuchung

Vorbereitung

Silanisieren der Objektträger für eine immunhistochemische Färbung:

Material:

SIGMA Life Science Poly-L-Lysin solution 0,1%, Catalog Number P 8920

Objektträger der Firma Thermo Scientific, Menzel-Gläser Superfrost-Plus REF: J1800AMNZ

Vorgehen:

- 1.) Poly-L-Lysin solution 0,1% mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnen
- 2.) Bei Raumtemperatur die entsprechenden Objektträger für 5 Minuten in ein Gefäß mit verdünnter Poly-L-lysin-Lösung platzieren
- 3.) Objektträger abtropfen lassen
- 4.) Objektträger für mindestens 1 Stunde in einem Brutkasten bei 56°C trocknen

Schneiden

Das Schneiden der bereits eingebetteten Proben wurde an einem Mikrotom der Firma MICROM-GmbH, Type HM335E, Seriennummer 5107, bei einer Dicke der Schnitte von 2µm durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen. Bei anschließender Färbung nach Elastica van Gieson oder einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf Objektträger der Firma Thermo Scientific, Menzel-Gläser Superfrost Microscope Slides REF: AAAA80##000032E. Bei anschließender immunhistochemischer Färbung auf silanisierte Objektträger der Firma Thermo Scientific, Menzel-Gläser Superfrost-Plus REF: J1800AMNZ.

Histologische Färbungen

Verwendete Lösungs- und Färbemittel

	Hersteller	REF
Xylol	Roth	CN80.5
Isopropanol	Roth	7343.2
Ethanol 70%	Roth	T913.3
Ethanol 96%	Roth	T171.4
Ethanol reinst	Roth	5054.1
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth	T865.1
Eosin G-Lösung 1%	Roth	3137.2
Eukitt® Eindeckmittel	Sigma	03989
Automat Star Deckgläser	Engelbrecht	K12450A1,0
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Roth	X877.2
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Roth	X906.1
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Roth	X907.1
Pikrofuchsin	Roth	3925.1
Natrium-Citrat	Roth	4088.1
TRIS-Puffer	Roth	A411.2
Wasserstoffperoxid 30%	Merck	1.085.971.000

Tabelle 2 verwendete Lösungsmittel

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung):

Zu Beginn der Färbung wurden entsprechende Objektträger (Firma: Thermo Scientific; Menzel-Gläser Superfrost Microscope Slides; REF: AAAA80##000032E) mit dem entsprechenden Präparat für 20min bei 60°C in einem Brutschrank gelagert.

Entparaffinierung und Rehydratisierung

- 1.) Objektträger für jeweils 10 min in zwei Behälter mit Xylol tauchen
- 2.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Isopropanol tauchen
- 3.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 4.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 70% tauchen
- 5.) Objektträger für 1 min in einen Behälter mit destilliertem Wasser tauchen

Anschließende Färbung:

- 1.) Objektträger für 10 min in einen Behälter mit saurem Hämalaun nach Mayer tauchen
- 2.) Objektträger für 5 min in ein Wasserbad tauchen
- 3.) Objektträger für 2 min in einen Behälter mit Eosin 1% Tauchen

Anschließendes Entwässern

- 1.) Objektträger für 30sec in einen Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 2.) Objektträger für jeweils 30sec in zwei Behälter mit Isopropanol tauchen
- 3.) Objektträger für jeweils 2 min in zwei Behälter mit Xylol tauchen

Anschließendes Eindecken mit Eukitt® und Deckgläsern

Elastica van Gieson Färbung

Zu Beginn der Färbung wurden entsprechende Objektträger (Firma: Thermo Scientific; Menzel-Gläser Superfrost Microscope Slides; REF: AAAA80##000032E) mit dem entsprechenden Präparat für 20min bei 60°C in einem Brutschrank gelagert.

Entparaffinierung und Rehydratisierung

- 1.) Objektträger für jeweils 10 min in zwei Behälter mit Xylol tauchen
- 2.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Isopropanol tauchen
- 3.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 4.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 70% tauchen
- 5.) Objektträger für 1 min in einen Behälter mit destilliertem Wasser tauchen

Anschließende Färbung:

- 1.) Objektträger für 25min in einen Behälter mit Resorcinfuchsin tauchen
- 2.) Objektträger für jeweils 1,5min in zwei Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 3.) Objektträger für 15min in einen Behälter mit HTX-Weigert (Weigert Lösung A + Weigert Lösung B in Mischung 1:1) tauchen
- 4.) Objektträger für 5min in ein Wasserbad tauchen
- 5.) Objektträger für 2min in Pikrofuchsin tauchen

Anschließendes Entwässern

- 1.) Objektträger für 30sec in einen Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 2.) Objektträger für jeweils 30sec in zwei Behälter mit Isopropanol tauchen
- 3.) Objektträger für jeweils 2 min in zwei Behälter mit Xylol tauchen

Anschließendes Eindecken mit Eukitt® und Deckgläsern

Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurde das System Dako Real™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse REF: K5001 verwendet.

Zu Beginn der Färbung wurde der entsprechende silanisierte Objektträger (Firma Thermo Scientific, Menzel-Gläser Superfrost-Plus REF: J1800AMNZ) mit aufgebrachter Probe für mindestens 24h bei 60°C in einem Brutschrank gelagert.

Entparaffinierung und Rehydratisierung

- 1.) Objektträger (OT) für jeweils 10 min in zwei Behälter mit Xylol
- 2.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Isopropanol tauchen
- 3.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 4.) Objektträger für jeweils 5 min in zwei Behälter mit Ethanol 70% tauchen
- 5.) Objektträger für 1 min in einen Behälter mit destilliertem Wasser tauchen

Färbung:

- 1) Objektträger für 7 min in einem Schnellkochtopf mit Citratpuffer kochen (2l destilliertes Wasser + 4,2g Natrium-Citrat, mit Natronlauge auf einen pH von 6,0 titriert)
- 2) Anschließend die Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 3) Objektträger für 15 min in einen Behälter mit 3%-iger Wasserstoffperoxid-Lösung tauchen
- 4) Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 5) Objektträger abtropfen und in eine Feuchtkammer legen
- 6) Pro Objektträger 100µl verdünntes Goat-Serum (1:100 in Antikörper-Diluent von DAKO, Normal Goat-Serum by Vector Laboratories LOT: ZA0811, Antibody Diluent by Dako REAL™ REF: S2022) auf das Präparat pipettieren und für 25min einwirken lassen. Anschließend abklopfen.
- 7) Pro Objektträger 100µl des Primärantikörpers mit entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 3) auf das Präparat pipettieren und 1h einwirken lassen.

- 8) Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 9) Sekundären biotinylierten Antikörper (Reagenz A des Dako Systems) auf das Präparat geben und 25min einwirken lassen
- 10) Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 11) Streptavidin Peroxidase (Reagenz B des Dako Systems) auf das Präparat geben und 25min einwirken lassen
- 12) Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 13) 15µl DAB (Reagenz C) mit 750µl HRP-Substratpuffer (Reagenz D) mischen und 100µl davon pro Objektträger auf das Präparat pipettieren.
- 14) Farbentwicklung unter einem Mikroskop beobachten
- 15) Anschließend Objektträger 3x für jeweils 2-3min in einen Behälter mit TRIS-Puffer tauchen
- 16) Objektträger für 20sec in einen Behälter mit Hämalun tauchen
- 17) Objektträger unter warmen Leitungswasser klar spülen und anschließend in einen Behälter mit destilliertem Wasser stellen

Anschließendes Entwässern

- 1.) Objektträger für 3 min in einen Behälter mit Ethanol 70% tauchen
- 2.) Objektträger für 3 min in einen Behälter mit Ethanol 96% tauchen
- 3.) Objektträger für 3 min in einen Behälter mit Isopropanol tauchen
- 4.) Objektträger für 3 min in einen Behälter mit Xylol tauchen

Anschließendes Eindecken mit Eukitt® und Deckgläsern

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
CD3	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Referenz Art. No. CI597R06	1:100
MPO	Thermo scientific Myeloperoxidase Ab-1 Referenz Cat. No. #RB- 373-A	1:200
CD31	Abcam (Referenz ab28364)	1:100
Iba1	Fujifilm Wako (Referenz Code No. 019-19741	1:2000
Ki67	IL Immunology (Referenz VWRKILM9252-C	1:500
smA	Abcam (Referenz ab7817)	1:200

Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper in der immunhistochemischen Färbung, mit entsprechenden Verdünnungen

Antikörper	Zielstruktur
smA	Smooth muscle actin
Iba1	Makrophagen
CD31	Endothelzellen
Myeloperoxidase (MPO)	Neutrophile Granulozyten
Ki67	Zellen in Zellteilung
CD3	T-Lymphozyten

Tabelle 4: Zielstrukturen der immunhistochemischen Färbungen

4.3 Molekularbiologische Untersuchung

RNA-Isolation und qRT-PCR

Die verwendeten Proben wurden vor Durchführung der PCR-Experimente bei -80°C gelagert.

Für die Experiment-Reihe wurden für die Untersuchung der Herzklappen Proben von vier LDLR-/- Schweinen, sowie zwei von PCSK9 Gain-of-function Schweinen mit vier Wildtyp-Schweinen verglichen.

Für die Untersuchung des Myokards wurden Proben von vier LDLR-/- Schweinen, sowie drei PCSK9 Gain-of-function Schweinen, mit vier Wildtyp-Schweinen verglichen.

Für die Untersuchung der Koronarien wurden Proben von vier LDLR-/- Schweinen, sowie vier PCSK9 Gain-of-function Schweinen, mit 5 Wildtyp-Schweinen verglichen.

Die RNA-Isolierung wurde mit dem miRNeasy Mini Kit (QIAGEN; LOT: 163015960, REF: 1038703) gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der RNA-Menge wurde die Nanodrop-Technologie verwendet (Thermo Scientific NanoDrop 2000c Serial No. F654). Zur Generierung von cDNA wurde das RNA-to-cDNA Kit von appliedbiosystems (ThermoFisher Scientific, LOT:00744555, REF: 4387406) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Dabei wurden 300ng RNA eingesetzt. Im Fall von miR-29b und U6 SNRNA wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Trancription Kit von appliedbiosystems (ThermoFisher Scientific, LOT: 00468216, REF: 4366597) mit den RT-Primern (siehe Tabelle 5) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die Inkubation erfolgte dabei im Eppendorf Mastercycler nexus gradient (Seriennummer 6331CH803778) Die TaqMan qRT-PCR wurde mit 3x verdünnter cDNA für miRNA29-b, LGALS3, COL3A1 und ACTA2 durchgeführt. Als Kontrollen dienten RPLPO, ACTB und U6 SNRNA. Die entsprechenden Assay-IDs finden sich in Tabelle 5. Die Vorbereitung der qRT-PCR erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers mit dem TaqMan Universal Master Mix II von appliedbiosystems

(ThermoFisher Scientific, LOT: 00664460, REF: 4426710). Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit dem QuantStudio3 Real-Time PCR Instrument (ThermoFisher Scientific, Produktnummer: A28131). Zur Analyse wurde die QuantStudio Design&Analysis Software v1.4.3 verwendet. $\Delta\Delta C_t$ wurde mit Hilfe von Excel berechnet.

<u>Gen</u>	<u>Assay-ID</u>	<u>Hersteller</u>
LGALS3	HS00173587_M1	ThermoFisher
COL3A1	HS00943809_M1	ThermoFisher
ACTA2	HS00426835_G1	ThermoFisher
miRNA29-b für Reverse Transkriptase	HSA-mir-29B RT:000413	ThermoFisher
miRNA29-b für TaqMan	HSA-mir-29B TM:000413	ThermoFisher
ACTB	SS03376081_U1	ThermoFisher
RPLPO	HS00420895_gH	ThermoFisher
U6 Reverse SNRNA Transkriptase	RT:001973	ThermoFisher
U6 SNRNA TaqMan	TM:001973	ThermoFisher

Tabelle 5: verwendete TaqMan-Assays für die entsprechenden Gene

Statistik

Die statistische Auswertung der qRT-PCR wurde mit Prism7 von GraphPad Software durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $<0,05$ angenommen. Graphisch dargestellt wird eine statistische Signifikanz mit einem Stern gekennzeichnet. Besteht keine statistische Signifikanz, so wird der entsprechende Graph mit „ns“ gekennzeichnet. Verwendet wurde hierfür ein ungepaarter T-Test.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse qRT-PCR

Koronararterien

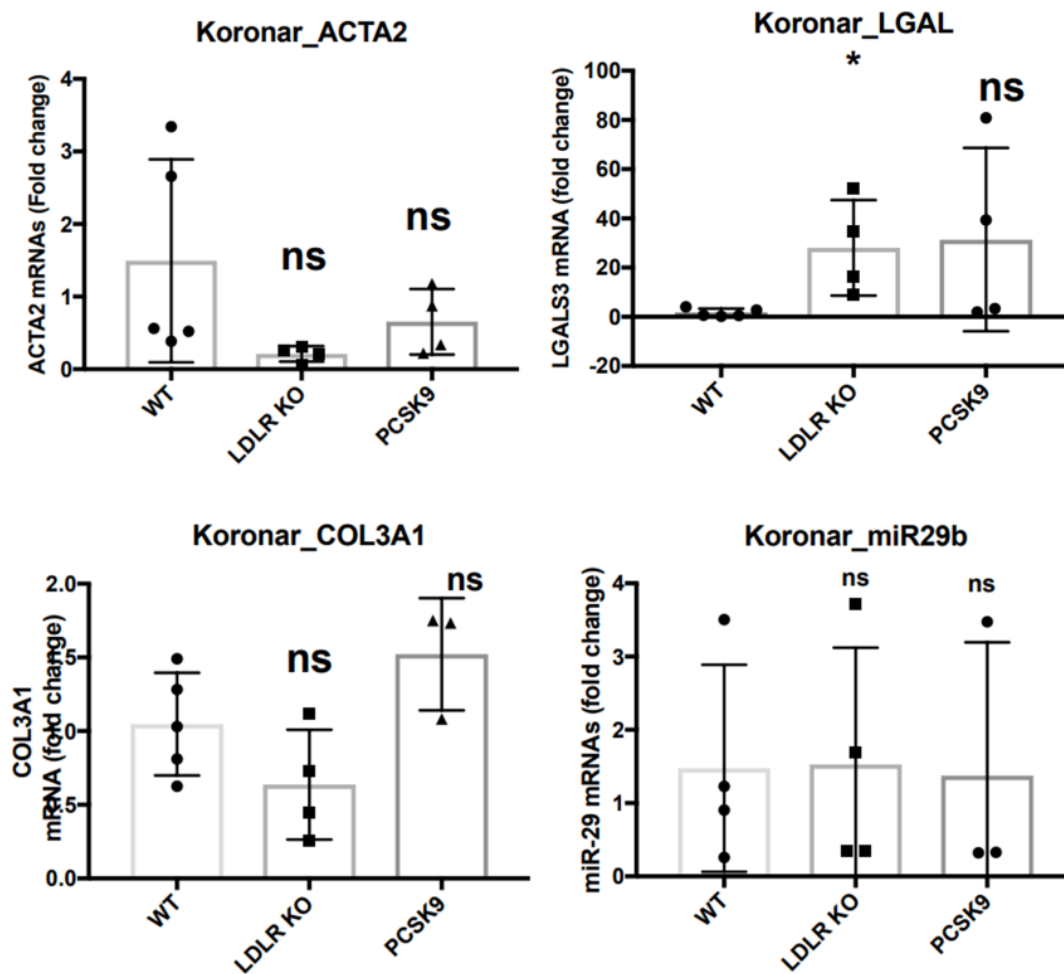


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben der Koronargefäße von LDLR^{-/-} Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Gain-of-function Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).

Die Untersuchung der Koronargefäße mittels qRT-PCR bezüglich der Expression von *Acta2*, *miRNA29b*, *Col3a1* und *Lgals3* ist in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Hierbei zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zu LDLR^{-/-} und Wildtyp zu D374Y-PCSK9 im Fall von *Acta2*, *miRNA29b* und *Col3a1* kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression. Es fand sich jedoch eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Menge an mRNA des Gens *Lgals3* in den LDLR^{-/-} Schweinen. Auch wenn im Fall der D374Y-PCSK9 Schweine kein signifikanter Unterschied feststellbar war, so zeigt sich dennoch eine Tendenz in Richtung erhöhter Expression in den D374Y-PCSK9 Schweinen.

Myokard

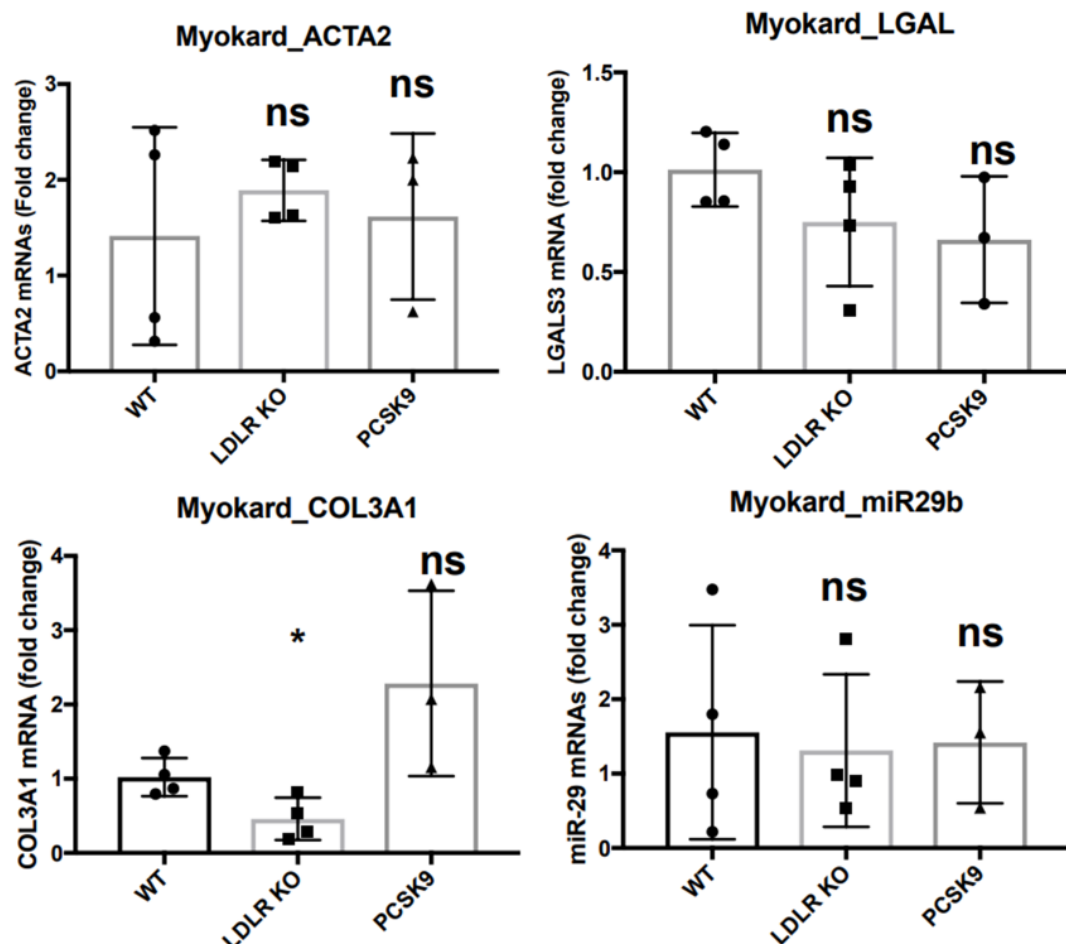


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben des Myokards von LDLR^{-/-} Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).

Die Untersuchung des Myokards mittels qRT-PCR bezüglich der Expression von *Acta2*, *miRNA29b*, *Col3a1* und *Lgals3* ist in Abbildung 11 graphisch dargestellt. Hierbei zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zu LDLR^{-/-} und Wildtyp zu D374Y-PCSK9 im Fall von *Acta2*, *miRNA29b* und *Lgals3* kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression. Betrachtet man die Ergebnisse für *Col3a1*, so zeigte sich eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) verminderte Menge an mRNA in LDLR^{-/-} Proben im Vergleich zum Wildtyp. Im Vergleich Wildtyp zu D374Y-PCSK9 blieben die Unterschiede in der Expression ohne statistische Signifikanz.

Herzklappe

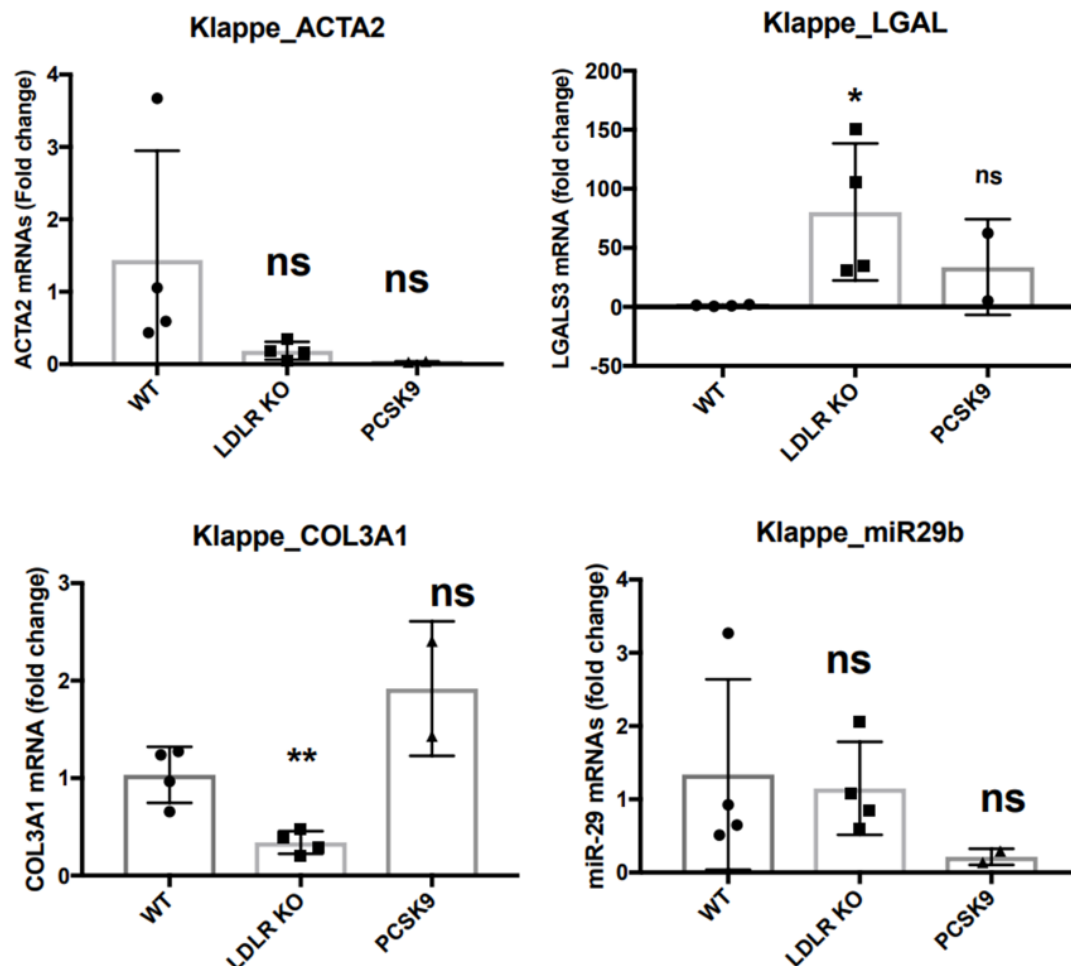


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben der Herzklappen von LDLR^{-/-} Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).

Die Untersuchung der Herzklappen mittels qRT-PCR bezüglich der Expression von *Acta2*, *miRNA29b*, *Col3a1* und *Lgals3* ist in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Hierbei zeigte sich im Vergleich von Wildtyp zu LDLR^{-/-} und Wildtyp zu D374Y-PCSK9 im Fall von *Acta2* und *miRNA29b* kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression. Im Graphen für *Col3a1* ist im Vergleich Wildtyp zu LDLR^{-/-} eine statistisch signifikant verminderte Expression für *Col3a1* ablesbar. Im Vergleich Wildtyp zu D374Y-PCSK9 war hier kein signifikanter Unterschied feststellbar. Im Fall von *Lgals3* zeigte sich im Vergleich Wildtyp zu LDLR^{-/-} eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Expression in den LDLR^{-/-} Proben.

5.2 Ergebnisse Histologie

Ziel dieser Dissertation war u.a. eine Bestätigung vorangegangener Arbeiten und erweiterte histopathologische Untersuchungen zur Aussagekraft der LDLR-/- Yucatan-minipigs, sowie der D374Y-PCSK9-Yucatan-minipigs als Großtiermodelle der Atherosklerose im kardiovaskulären Gebiet.

Mit Augenmerk auf LDLR -/- Yucatan minipigs wurden zudem Myokard und Herzklappen immunhistochemisch untersucht.

Hierfür wurden sowohl von Yucatan-minipig Wildtyp-Modellen als auch von LDLR-/- und D374Y-PCSK9-Yucatan minipigs immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Die Färbungen zeigen einen gelb-bräunlichen Farbton bei Bindung an die Zielstruktur an.

Koronargefäße

Zur Vereinfachung und Veranschaulichung werden pro Probe die entstandenen Präparate mit Fokus auf die Gefäßwände dargestellt. Lediglich die Färbung in HE und EvG werden zur Übersicht in Gänze gezeigt.

Yucatan Minipig Wildtyp-Koronarien

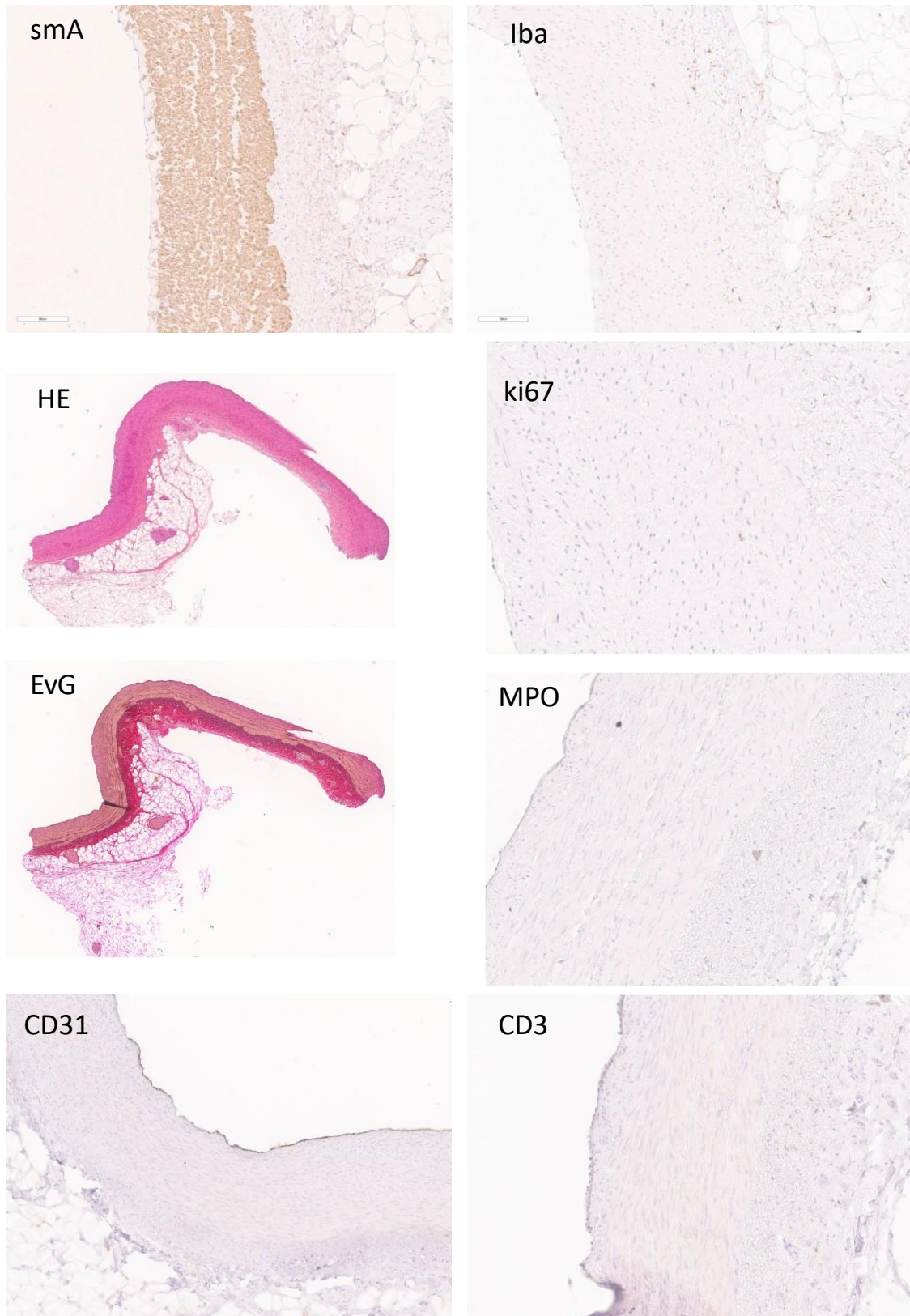


Abbildung 13: Yucatan Minipig Wildtyp-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG

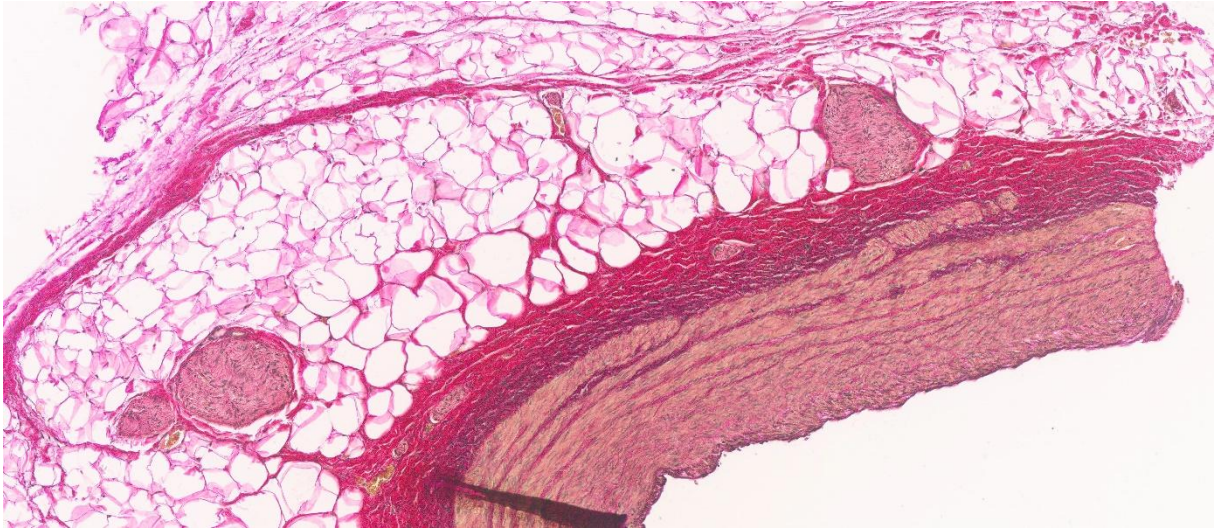


Abbildung 14: Wildtyp-Koronarie EvG-Färbung

In den Präparaten des Wildtyp-Yucatan-minipigs der Koronargefäße zeigte sich der typische histologische Aufbau einer Arterie vom muskulären Typ. Dieser ist in drei Schichten unterteilt mit Ausbildung einer Tunica intima, media und adventitia. Die Intima, bestehend aus Endothel (Vgl. Abb. 13 CD3) und subendothelialer Schicht war schmal. Sichtbar in der Färbung nach EvG als dunkelviolette Linie grenzte eine schmale Membrana elastica interna direkt unterhalb der subendothelialen Schicht die schmale Intima zur Media ab. Vereinzelt fanden sich in die subendotheliale Schicht eingestreute glatte Muskelzellen. Folgende Tunica media war gekennzeichnet durch glatte Gefäßmuskulatur (Vgl. Abb. 13 smA). Insbesondere in der EvG-Färbung zeigte sich dabei die spiralförmige Anordnung der Muskelzellen (gelb-orange in der EvG-Färbung Vgl. Abb 14) durch sowohl Längs-, als auch Queranschnitte. Diese spiralförmige Anordnung ist typisch für Koronararterien und unterscheidet sich von üblicherweise longitudinal verlaufenden Muskelfasern anderer Arterien vom muskulären Typ. Angeschlossen an die Media stellte sich die Adventitia als bindegewebige Schicht mit viel Kollagen (rot in der EvG-Färbung) mit nur vereinzelt glatten Gefäßmuskelzellen dar.

Zellen des Immunsystems waren insgesamt nur vereinzelt nachweisbar. Mit Blick auf das Modell der Atherosklerose waren dabei insbesondere Makrophagen (Vgl. Abb. 13 Iba) in der Intima und Media nur vereinzelt nachweisbar. Ebenfalls waren

nur vereinzelt T-Lymphozyten oder neutrophile Granulozyten darstellbar (Vgl. Abb. 13 CD3 und MPO) Als Gewebe mit geringem Zellumsatz fanden sich entsprechend kaum sich in Zellteilung befindliche Zellen (Vgl. Abb. 13 ki67).

LDLR^{-/-} Yucatan Minipig-Koronarien

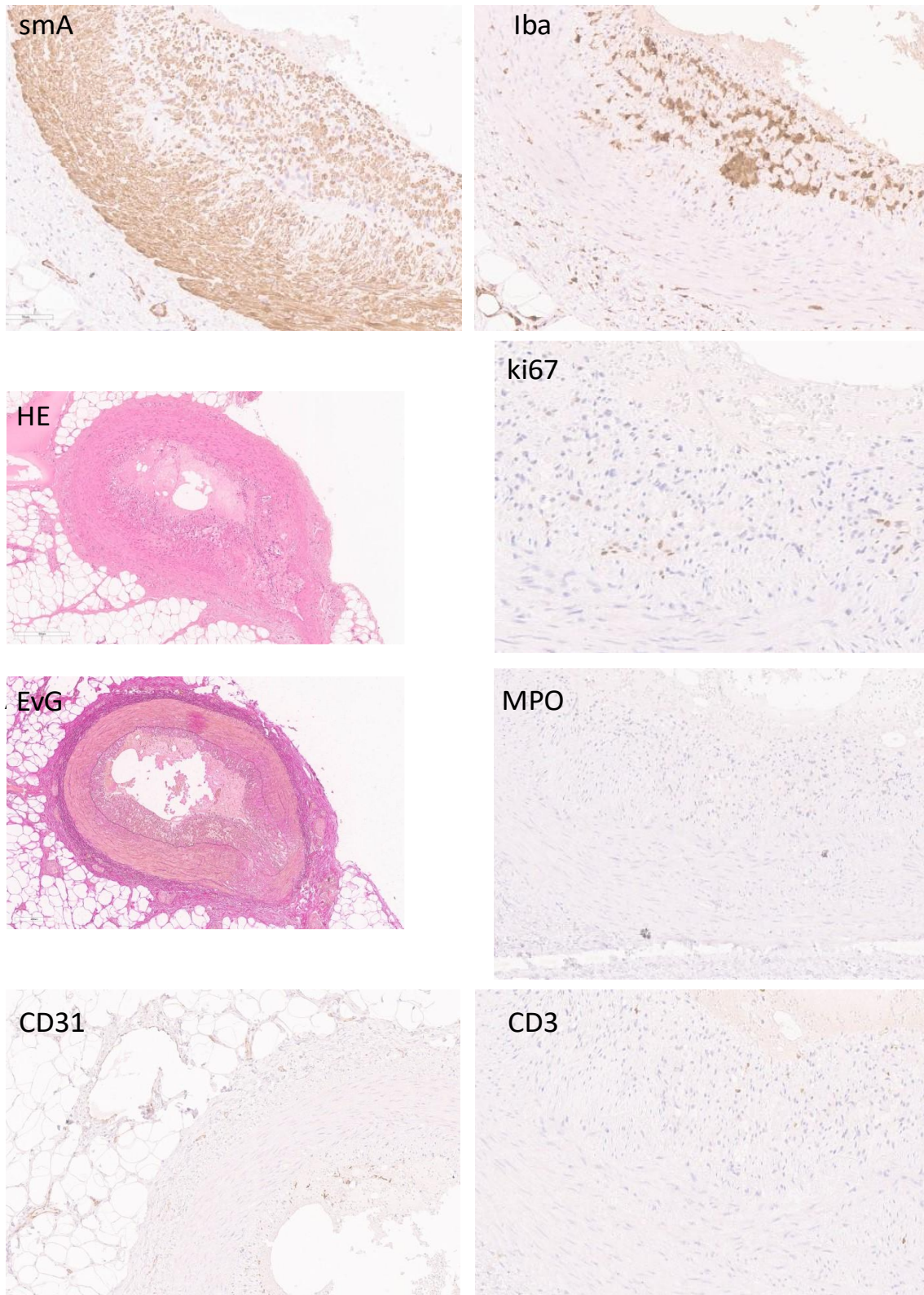


Abbildung 15: LDLR^{-/-} Yucatan Minipig-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. CD31 mutmaßlich durch Fixierung verlorenes Endothel im untersuchten Gefäß.

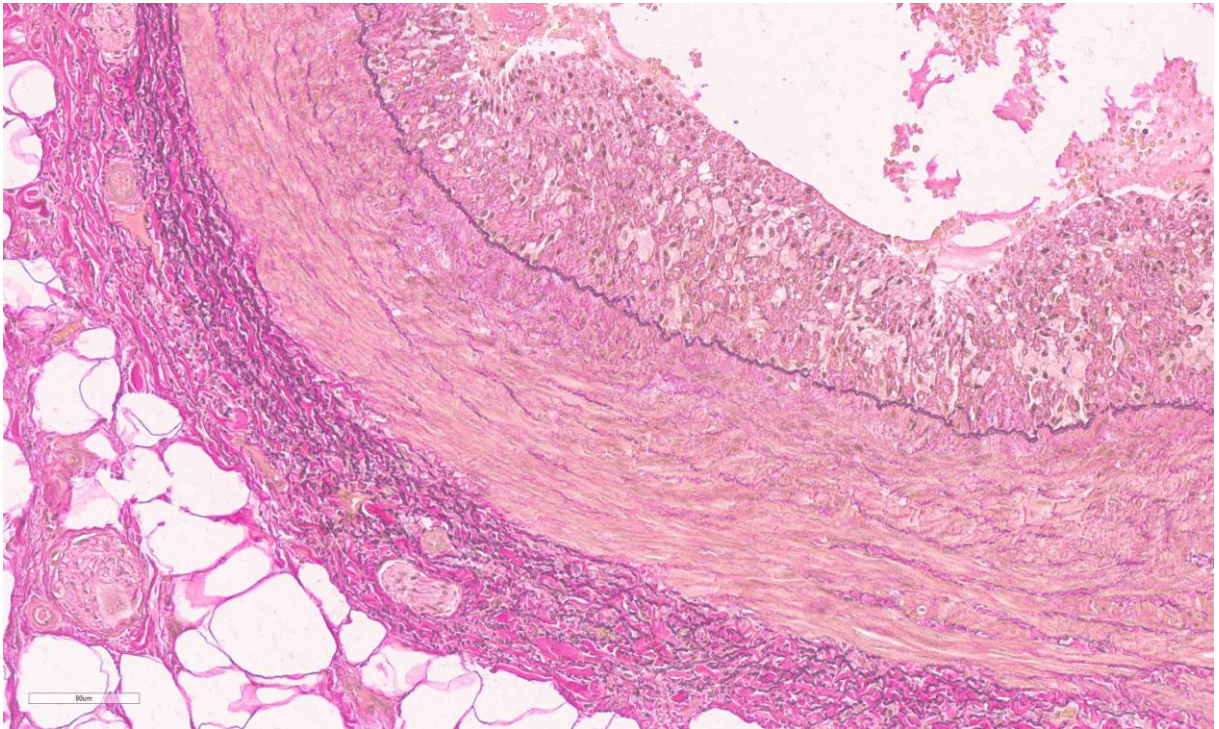


Abbildung 16: LDLR-/- Koronarie EvG

Im Koronargefäß des LDLR-/- zeigte sich im Vergleich zum Wildtypen eine veränderte Gefäßwand. Der prinzipielle Aufbau blieb vorhanden, jedoch kam es insbesondere in der Intima und Media zu Veränderungen.

Bereits in der EvG-Färbung (Vgl. Abb. 15 EvG und 16) sah man eine deutliche Verbreiterung der Intima. Dies zeigte sich insbesondere dadurch, dass die dunkelviolette Membrana elastica interna erst viele Zellschichten unterhalb des Endothels zu finden war. Der subendotheliale Raum war entsprechend deutlich verbreitert und zellreich. In der Gefäßwand des hypercholesterinämischen Schweins kam es zu einer Ansammlung von Makrophagen (Vgl. Abb. 15 Iba) und glatter Gefäßmuskelzellen (Vgl. Abb. 15 smA), die sich im Wildtyp nicht fanden. Neben dieser deutlichen Ansammlung fanden sich, wenn auch weniger deutlich, vermehrt T-Lymphozyten im Bereich der verbreiterten Intima (Vgl. Abb. 15 CD3). Mit Nachweis von Ki67 positiven Zellen schien diese Zellakkumulation zumindest teilweise aus Zellproliferation hervorzugehen (Vgl. Abb. 15 ki67). Nicht verstärkt nachweisbar waren wiederum neutrophile Granulozyten (Vgl. Abb. 15 MPO)

Bemerkenswert war zudem das Auftreten von Makrophagen in der Media. Diese erschienen zwischen den Schichten glatter Gefäßmuskelzellen (Vgl. Abb. 15 lba).

Zusammenfassend zeigten die Präparate des LDLR-/- Yucatan-Minipigs ausgebildete atherosklerotische Plaques mit bereits eingesetzter Einengung des Gefäßlumens. Man sah eine deutlich verdickte Intima mit Makrophagenakkumulation und glatten Gefäßmuskelzellen, deren Koherenz teilweise aufgehoben war. Entsprechend der in der Einleitung beschriebenen Klassifikation atherosklerotischer Plaques nach Stary (Stary et al., 1995; Stary et al., 1994) war der dargestellte Plaque dem Stadium IIa-III zuzuordnen.

D374Y-PCSK9-Yucatan Minipig-Koronarien

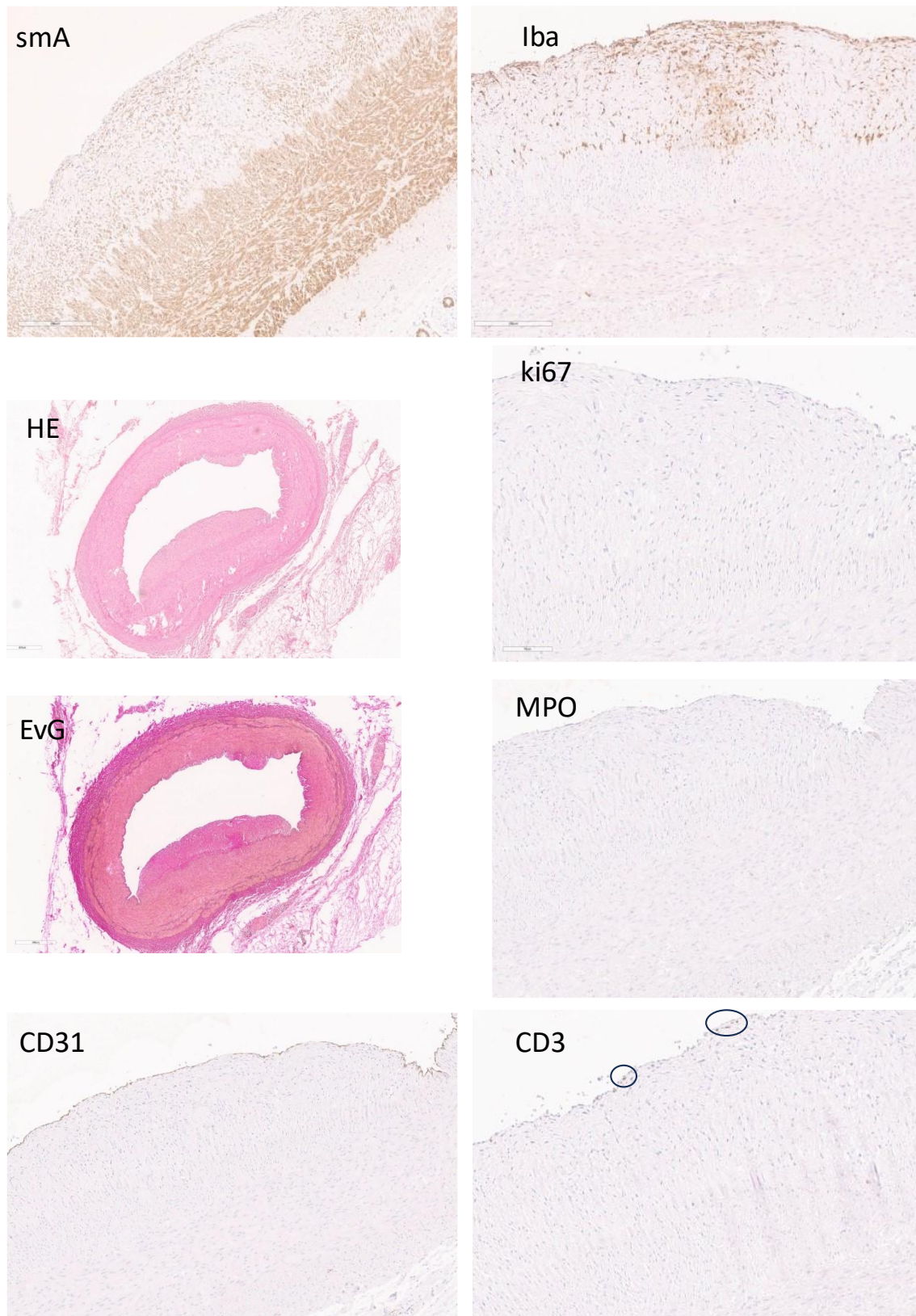


Abbildung 17: D374Y-PCSK9-Yucatan Minipig-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG.

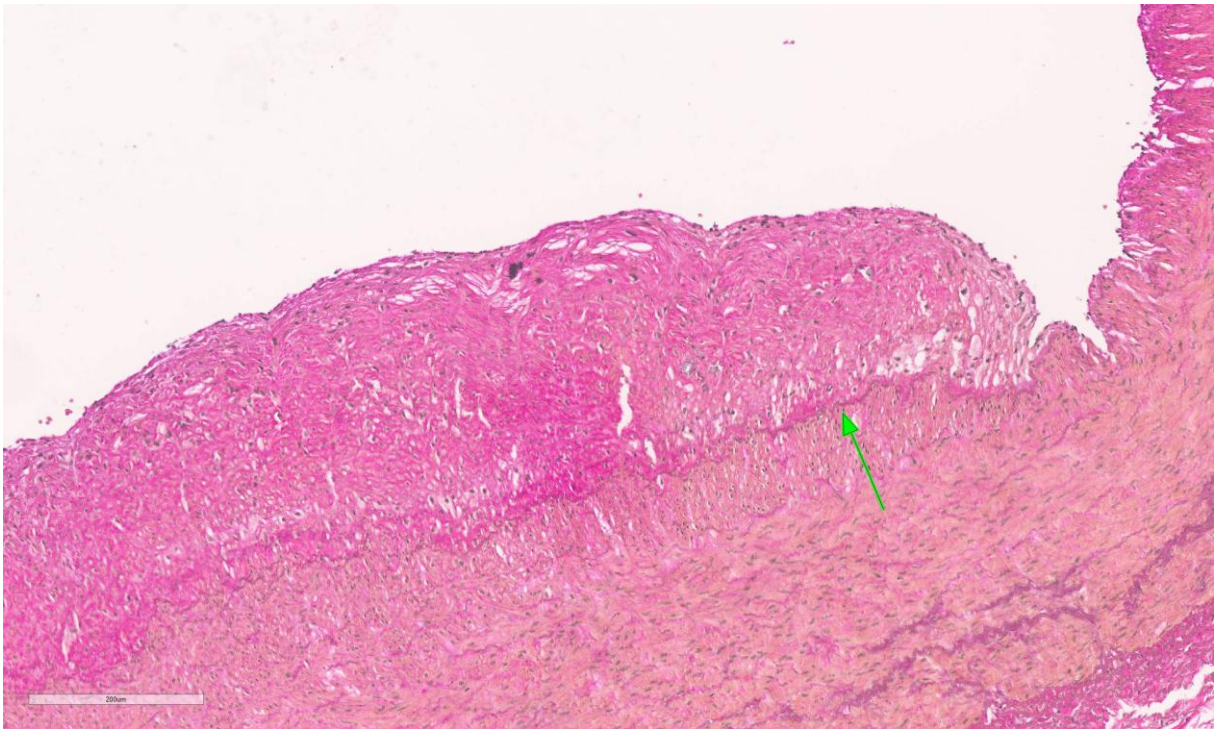


Abbildung 18: D374Y-PCSK9 Yucatan Minipig-Koronarie EvG; Membrana elastica interna mit Pfeil markiert

Im Koronargefäß des D374-PCSK9-Yucatan-minipigs fand sich im Vergleich zum Wildtypen ebenfalls eine veränderte Gefäßwand. Die Befunde ähnelten dabei denen im LDLR^{-/-} Yucatan-minipig. Auch hier kam es zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques.

Es fand sich eine deutlich verdickte Intima im Vergleich zum Wildtyp. Zur Verdeutlichung wurde im gezeigten Präparat mit EvG-Färbung die Membrana elastica interna mit einem Pfeil markiert (Vgl. Abb. 18). Ebenfalls in der EvG-Färbung sah man die typische spiralförmige Ausrichtung der glatten Muskelzellen im Bereich der Media. Im subendothelialen Raum nahmen glatte Gefäßmuskelzellen einen Großteil der Zellen ein (Vgl. Abb. 17 smA). Zusätzlich kamen, wie beim LDLR^{-/-} Yucatan-Minipig, vermehrt Makrophagen im subendothelialen Raum vor. Im Bereich der Media hingegen fanden sich, im Vergleich zum LDLR^{-/-} Schwein, nur vereinzelt positive Zellen für den Makrophagen-Marker Iba. (Vgl. Abb. 17 Iba)

T-Lymphozyten fanden sich fast ausschließlich direkt unterhalb des Endothels (Vgl. Abb. 17 CD3). Im Wildtyp-Schwein waren T-Lymphozyten v.a. in der Adventitia nachweisbar. Im LDLR-/- Schwein auch in tieferen Schichten des subendothelialen Raums der Intima.

Im Gegensatz zum LDLR-/- Schwein fanden sich beim D374-PCSK9-Yucatan-minipig im Bereich des Plaques keine positiven Zellen für ki67. (Vgl. Abb. 17 ki67)

Negativ fiel, wie zuvor beim LDLR-/- Schwein, die Färbung für neutrophile Granulozyten aus. (Vgl. Abb. 17 MPO)

Entsprechend der Einteilung nach Stary ergab sich auch hier ein Stadium IIa-III.

Herzklappen

Zur Vereinfachung und Veranschaulichung werden pro Probe die entstandenen Präparate mit Fokus auf die Klappenstruktur dargestellt. Lediglich die Färbung in HE und EvG werden zur Übersicht in Gänze gezeigt. Proben des D374Y-PCSK9 Yucatan Minipig standen nicht zur Verfügung.

Da sich diese Dissertation insbesondere um die Untersuchung bzgl. Atherosklerose dreht wurden die entnommenen Proben den gleichen Färbungen wie die Koronargefäße unterzogen.

Yucatan Minipig Wildtyp-Herzklappen

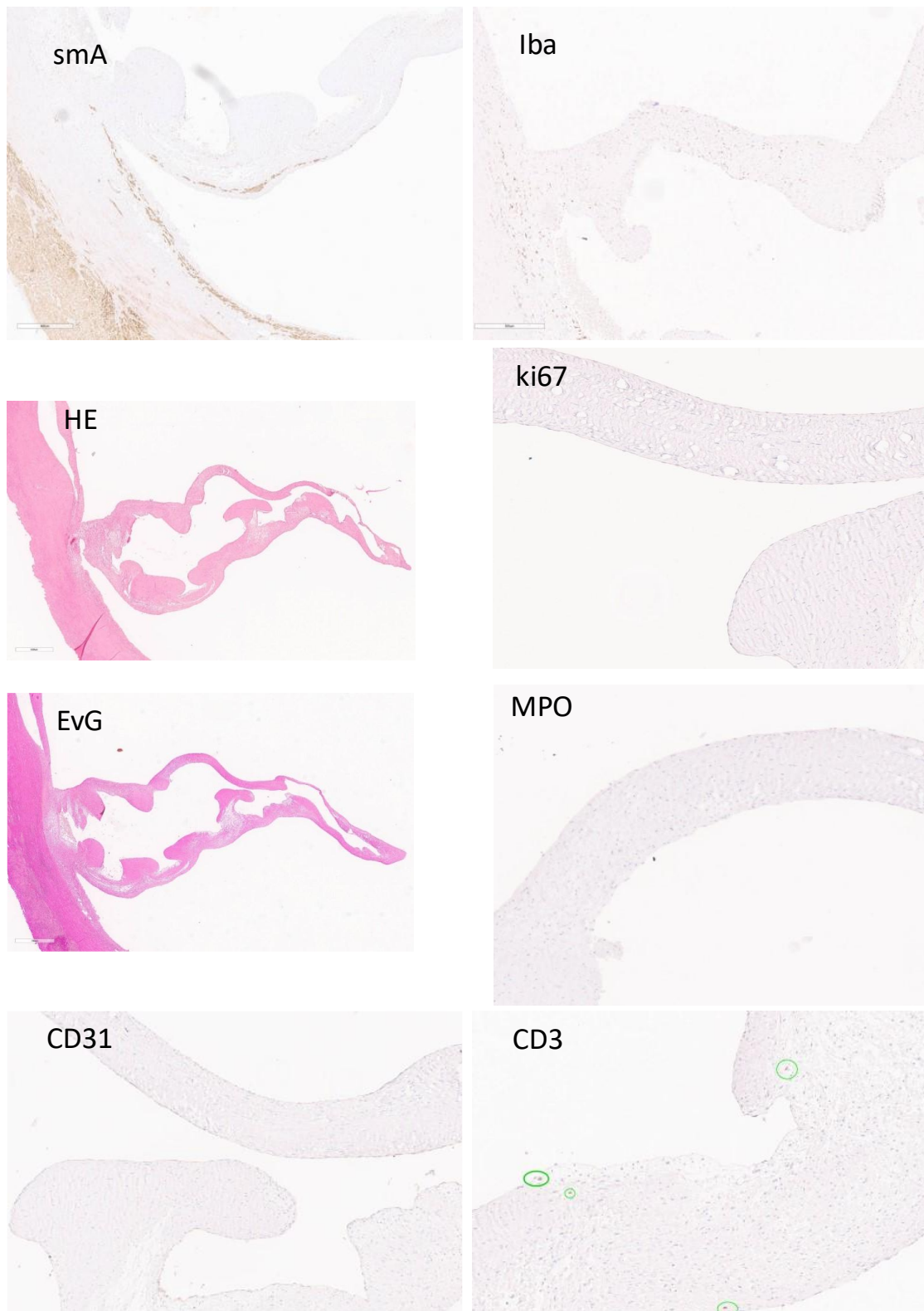


Abbildung 19: Yucatan Minipig Wildtyp-Herzklappen mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in CD3 markiert



Abbildung 20: Yucatan Minipig Wildtyp-Herzklappe EvG; Übergang Spongiosa/Fibrosa markiert

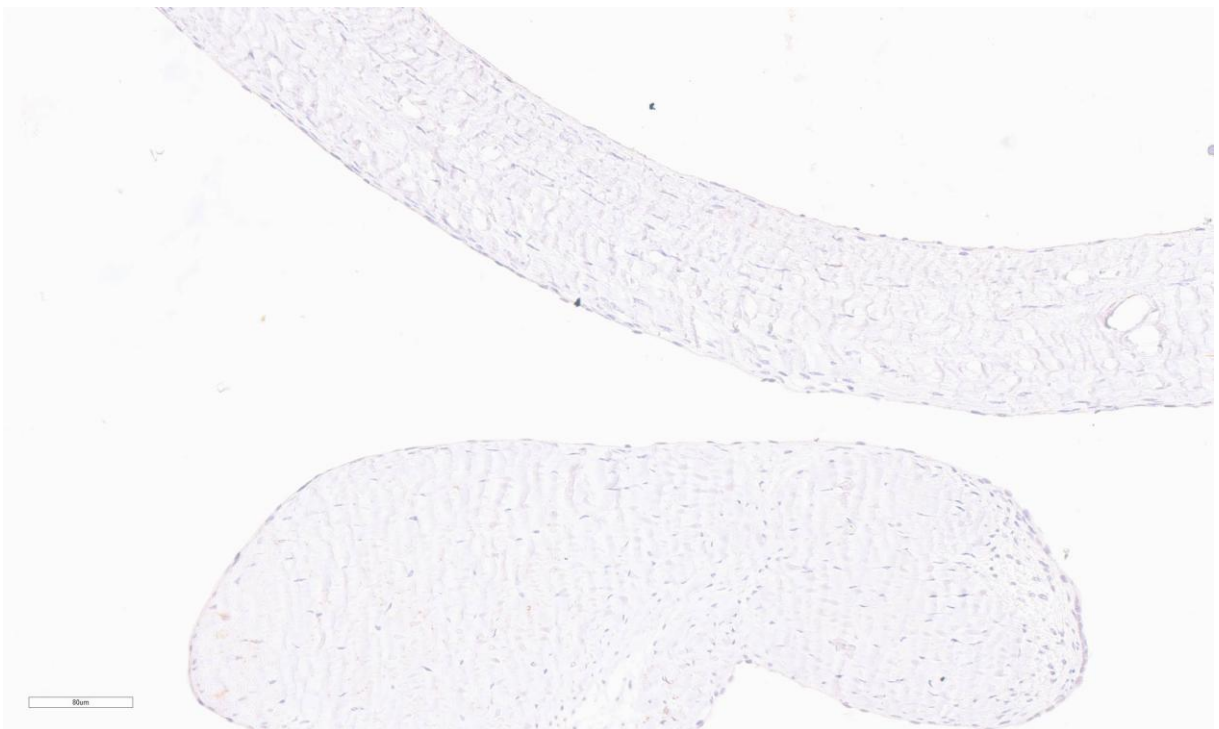


Abbildung 21: Wildtyp Herzklappe peripher smA

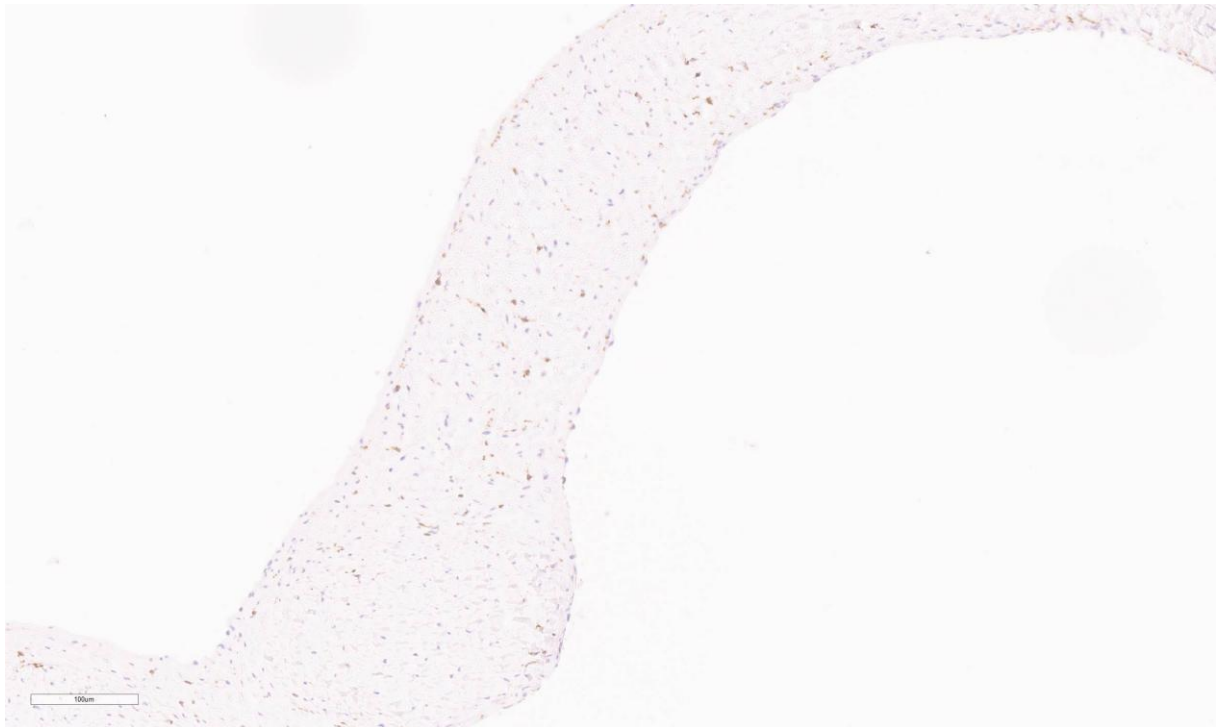


Abbildung 22: Wildtyp Herzklappe peripher Iba

Oben dargestellt sind die Präparate der Herzklappe des Yucatan Minipig Wildtyp-Schweins.

Histologisch ist der Aufbau einer Herzklappe, unabhängig ob Taschenklappe oder Segelklappe, gleich. Es handelt sich um ein mit Endothel (Vgl. Abb. 19 CD31) überzogenen bindegewebigen Grundstock aus einer aus straffem Kollagen bestehender Fibrosa und einer lockereren Spongiosa. Die Spongiosa ist dabei der Seite zuzuordnen, die bei geöffneter Klappe dem Blutstrom ausgesetzt ist.

Die histologische Schichtung lässt sich insbesondere in Abb. 20 in EvG Färbung erkennen.

Zur Darstellung von glatten Muskelzellen kam es im Bereich des Übergangs zum Anulus fibrosus. Dies ist insbesondere bei Segelklappen ein physiologischer Zustand. Weiter entfernt vom Anulus fibrosus fanden sich keine glatten Muskelzellen mehr in den angefertigten Präparaten (Vgl. Abb. 19 smA und Abb. 21)

Das versprengte Vorkommen von Makrophagen innerhalb des Klappenapparates ist physiologisch und konnte auch in den hier angefertigten Färbungen dargestellt werden (Vgl. Abb. 19 Iba und Abb. 22). Vereinzelt konnten CD3-positive T-Lymphozyten dargestellt werden (Vgl. Abb. Abb. 19 CD3). Ki67- oder MPO-positiven Zellen konnten nicht nachgewiesen werden. (Vgl. Abb. 19)

LDLR ^{-/-} Yucatan Minipig-Herzklappen

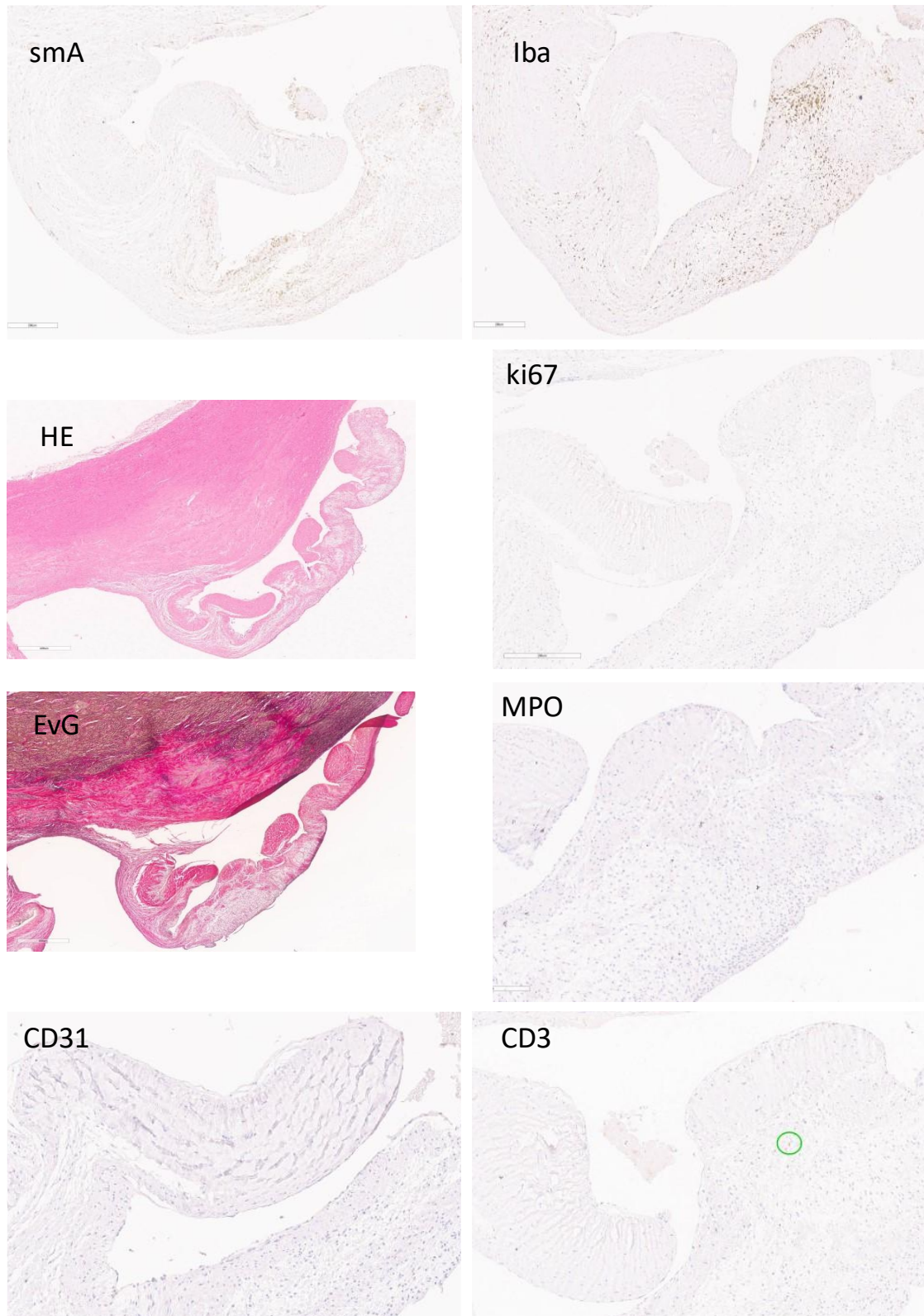


Abbildung 23: LDLR ^{-/-} Yucatan Minipig Herzklappen mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in CD3 markiert

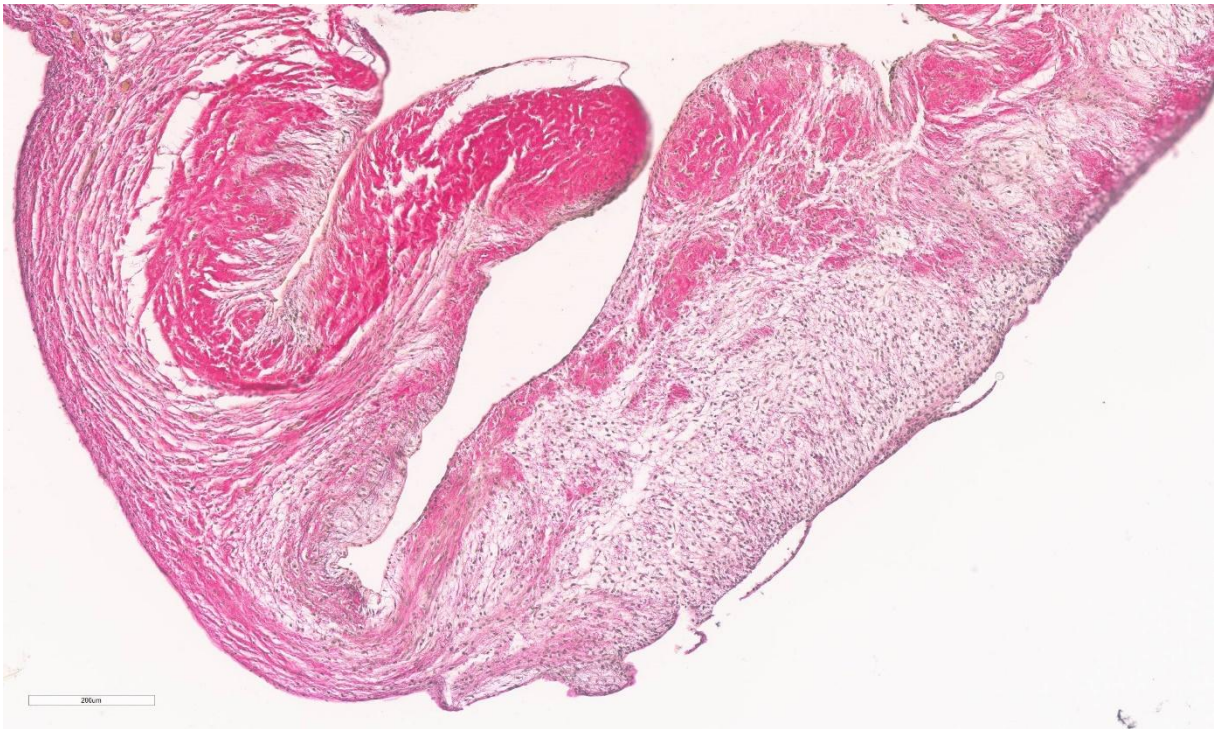


Abbildung 24: LDLR-/- Yucatan Minipig-Herzklappe EvG

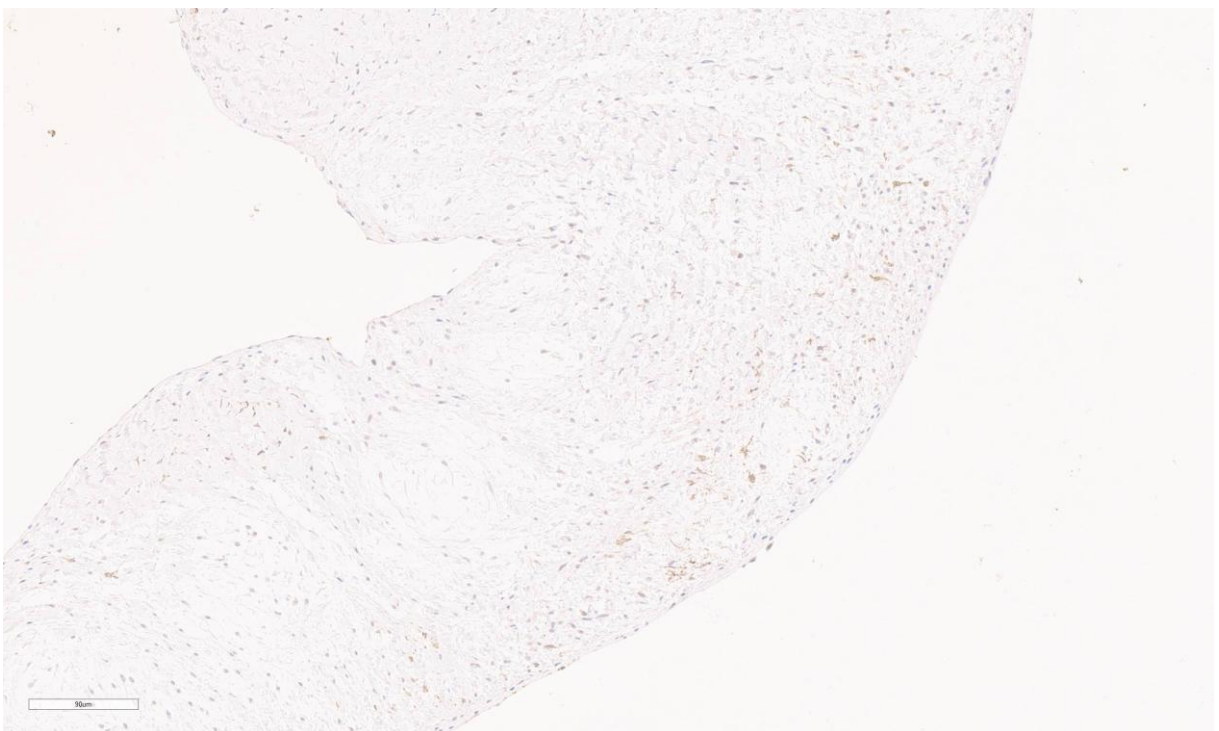


Abbildung 25: LDLR-/- Yucatan Minipig-Herzklappe smA peripher

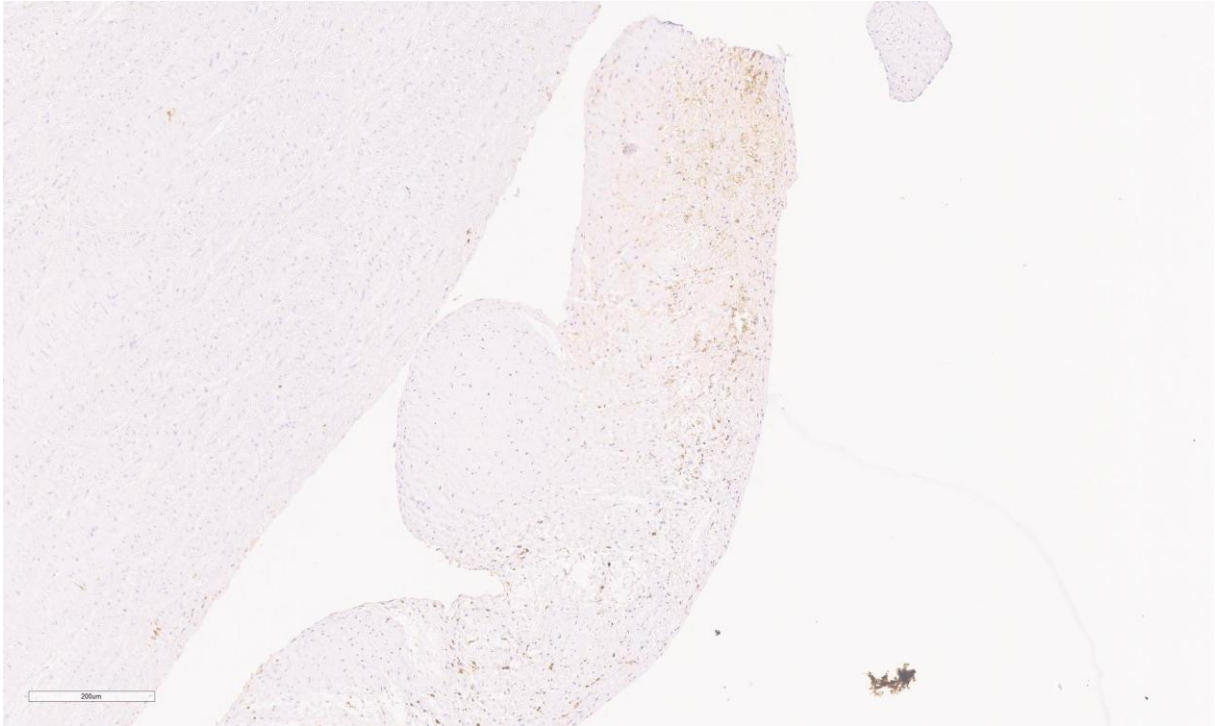


Abbildung 26: LDLR -/- Yucatan Minipig-Herzklappe Iba peripher

Oben dargestellt sind nun die Präparate der hypercholesterinämischen LDLR-/- Yucatan-Minipigs. Die Architektur der Herzklappe mit Spongiosa und Fibrosa ließ sich erneut in der EvG-Färbung deutlich erkennen (Vgl. Abb. 23 EvG und 24).

Im Vergleich zum Wildtyp auffällig waren die nun nicht mehr lediglich verstreuten Makrophagen innerhalb des Klappenapparates. Sie kamen vermehrt als Anhäufungen zur Darstellung (Vgl. Abb. 23 Iba und 26). Dieses Makrophagen-Nest war insbesondere basisnah zu beobachten. Auffällig ebenfalls, dass sich die Ansammlung von Makrophagen auf Bereiche Spongiosa projizierten. Die Spongiosa ist der Teil der Herzklappe, der den Scherkräften des Blutes bei Klappenöffnung ausgesetzt ist.

Glatte Muskelzellen kamen im Vergleich zum Wildtypen versprengt auch peripher in der Herzklappe vor. Auch hier insbesondere im Bereich der Spongiosa. (Vgl. Abb. 23 smA und 25)

In Bezug auf die Färbungen für ki67, MPO oder CD3 ergaben sich keine Unterschiede zum Wildtyp. Ki67 und MPO-positive Zellen konnten nicht nachgewiesen werden. CD3-positive T-Lymphozyten vereinzelt.

Myokard

Auch im Bereich des Myokards wurden, mit Ausnahme von Färbungen für MPO, entsprechende immunhistochemische Färbungen, wie zuvor, durchgeführt. Auch hier wurden dabei lediglich Proben der LDLR -/- Yucatan minipigs verwendet. Erneut kommen nur die Präparate in HE und EvG gänzlich zur Darstellung. Bei den immunhistochemischen Färbungen steht der Fokus auf auffälligen Abschnitten der Präparate.

Yucatan Minipig Wildtyp-Myokard

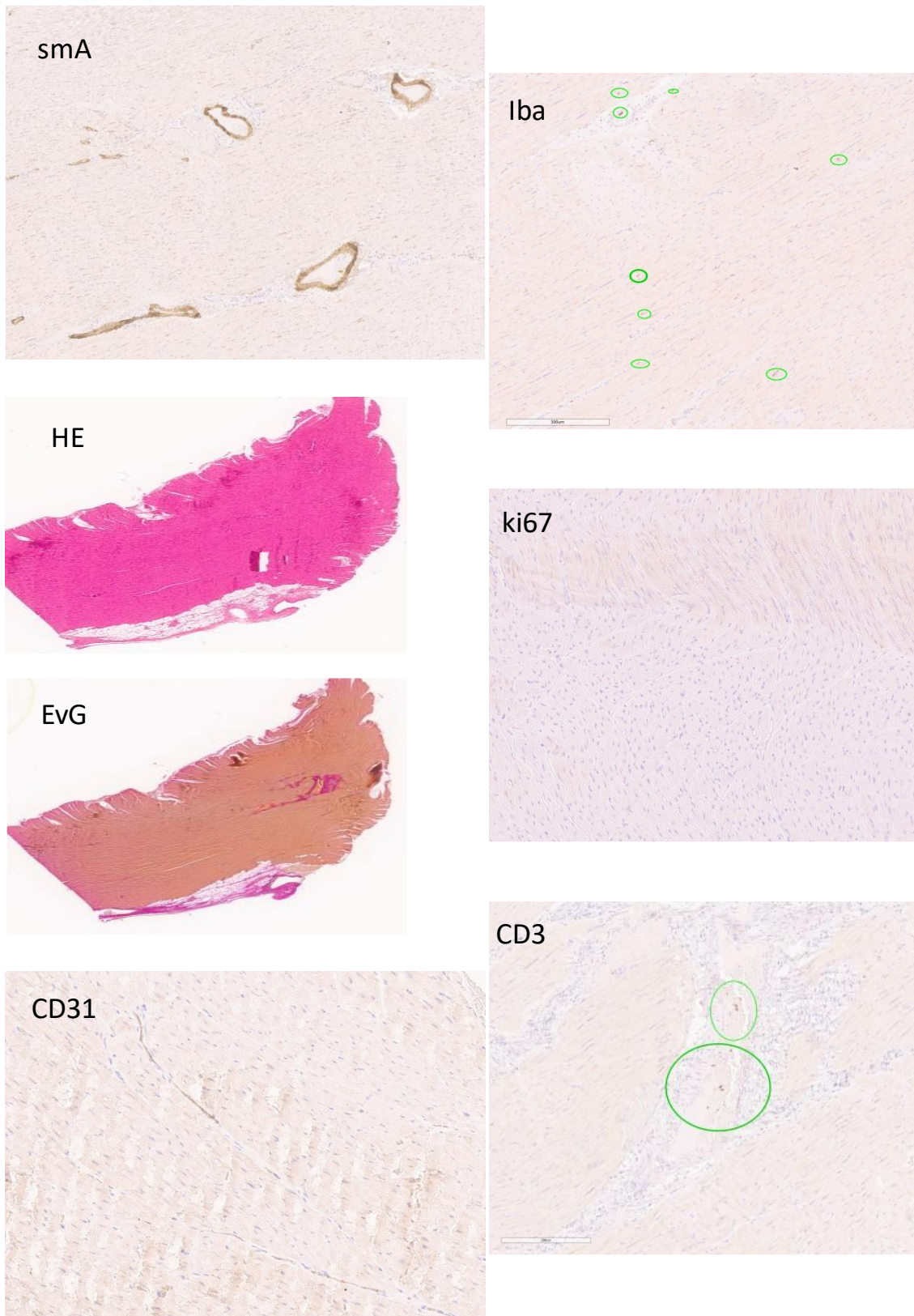


Abbildung 27: Yucatan Minipig Wildtyp-Myokard mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in Iba und CD3 markiert.

Oben dargestellt sind die Präparate des Myokards des Wildtyps der Yucatan Minipigs. Das Myokard besteht aus Kardiomyozyten, einkernigen Zellen, die an ihren Enden an den Glanzstreifen durch Haftkontakte und tight-junctions verbunden sind. Durchzogen wird das Myokard vom bindegewebigem Endomysium, kleinste Gefäße beherbergt.

In den durchgeführten Färbungen fanden sich entsprechend glatte Muskelzellen in Blutgefäßen (Vgl. Abb. 27 smA) Außerhalb dieser waren keine positiven Zellen für smA nachweisbar. Dasselbe gilt für CD31-positive Zellen. Innerhalb des Myokards durchzogen feinste Stränge CD31-positiver Zellen die Kardiomyozyten (Vgl. Abb. 27 CD31).

Es fanden sich ebenfalls Makrophagen innerhalb des Myokards. Positive Zellen für Iba traten dabei insbesondere peri- und intravaskulär auf, sowie vereinzelt von größeren Gefäßen entfernt (Vgl. Abb. 27 Iba). CD3-positive Zellen ließen sich außerhalb des Gefäßsystems nicht im Myokard darstellen. Ebenfalls nicht zur Darstellung kamen ki67 positive Zellen (Vgl. Abb. 27 CD3 und ki67).

LDLR^{-/-} Yucatan Minipig-Myokard:

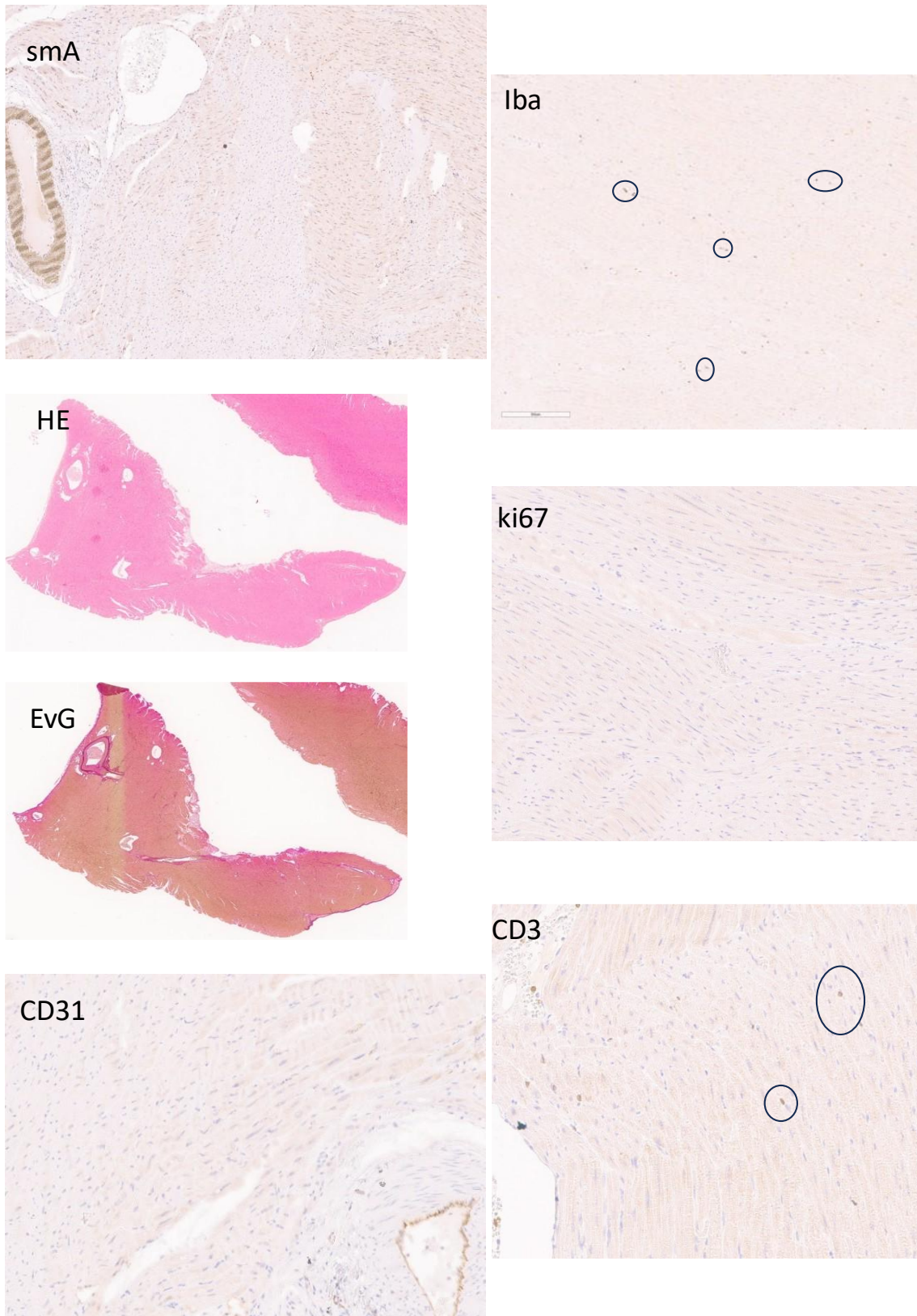


Abbildung 28: LDLR^{-/-} Yucatan Minipig-Myokard mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in Iba und CD3 markiert.

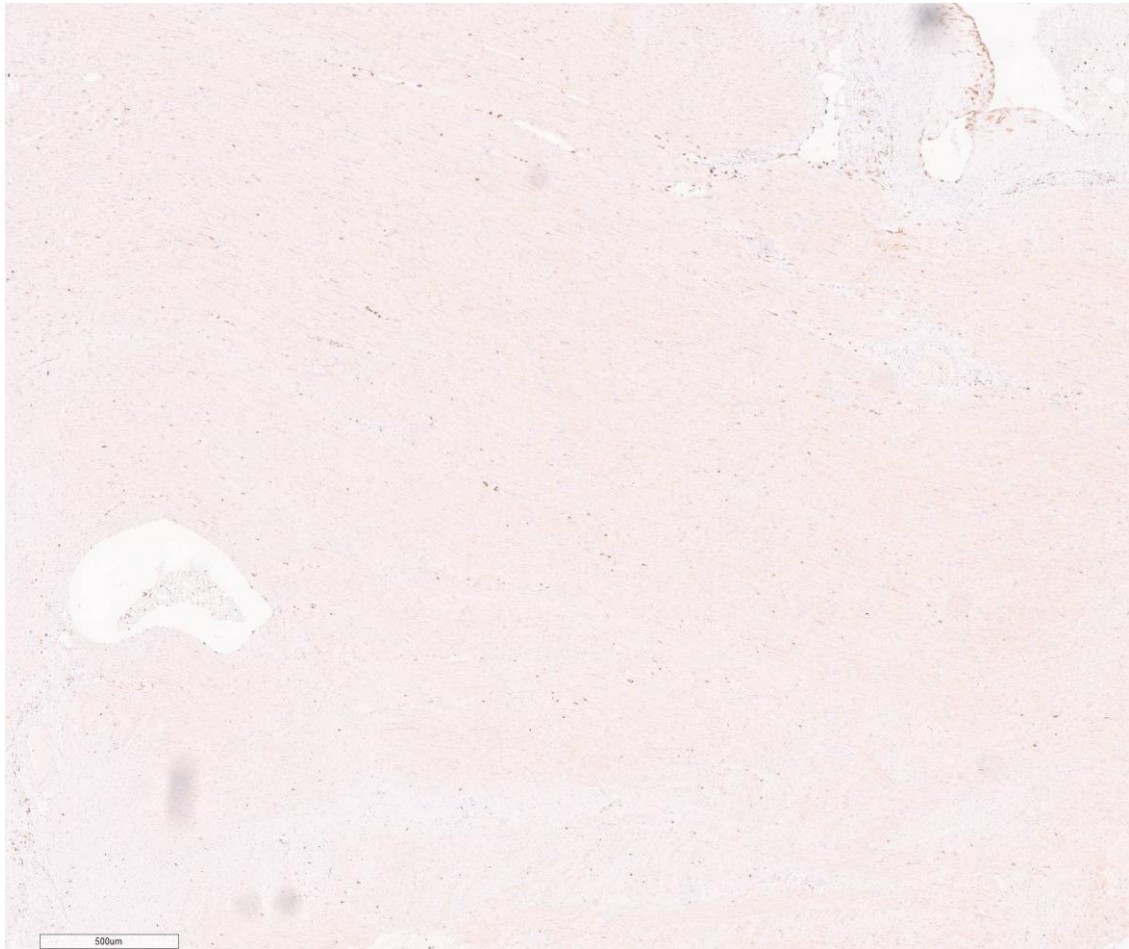


Abbildung 29: LDLR-/- Yucatan Minipig-Myokard Iba; man erkennt diffus im Myokard verstreut Makrophagen. Nebenbefundlich zeigt sich oben rechts im Bild ein intravaskulärer Plaque



Abbildung 30: LDLR-/- Yucatan Minipig-Myokard Iba in höherer Vergrößerung; man erkennt die verstreuten positiven Zellen im Myokard (Vgl Abb. 27 Iba und Abb. 28)

In den Präparaten des Myokards der LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs kam es im Vergleich zum Wildtyp insbesondere in der Färbung von Makrophagen (Iba) und T-Lymphozyten (CD3) zu Unterschieden.

Auch innerhalb des Myokards kam es beim hypercholesterinämischen Schwein zu einer deutlich erhöhten Anzahl positiver Zellen für Iba. Dabei war dies unabhängig von der Nähe zu größeren Gefäßen. Das Myokard erschien wie gesprenkelt durch die entsprechende Färbung. (Vgl. Abb. 28 Iba, 29 & 30)

Für CD3-positive Zellen entfiel der Unterschied weniger deutlich, doch auch hier fanden sich vermehrt Zellen außerhalb des Gefäßsystems. (Vgl. Abb. 28 CD3)

Bei den restlichen immunhistochemischen Färbungen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Obwohl nicht beabsichtigt, konnte in der Färbung des Myokards, wie in Abb. 29 ersichtlich, ein intravaskulärer Plaque dargestellt werden. Die atherosklerotischen Veränderungen, die in dieser Dissertation in den Koronararterien dargestellt wurden, schienen also auch kleinere Gefäße der kardialen Vaskularisation zu betreffen.

6. Diskussion

Sowohl das LDLR^{-/-}, als auch das D374Y-PCSK9- Yucatan-minipig stellen neu in Erscheinung getretene Großtiermodelle bzgl. Atherosklerose dar, im Sinne der Ausbildung einer Hypercholesterinämie. Ein regelhafter Gebrauch dieser Modelle steht noch aus, sodass eine Bestätigung und Erweiterung vorangegangener Untersuchungen Ziel dieser Doktorarbeit waren.

Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte eine erweiterte histopathologische und genetische Untersuchung kardialer Strukturen entsprechender Modelle. Hierfür wurden Proben aus Koronararterien, Herzklappen und Myokard immunhistochemischen Färbungen unterzogen, sowie bestimmte Genexpressionen mittels qRT-PCR untersucht.

Als Limitation ist zu nennen, dass nicht zwischen männlichen und weiblichen Schweinen differenziert wurde. Intersexuelle Unterschiede wurden nicht beleuchtet.

Des Weiteren ist als Limitation hervorzuheben, dass bei der Entnahme der Proben keine genauen Angaben zum Entnahmeort gemacht wurden. Dies ist insbesondere bei den Proben der Herzklappen von Bedeutung, da im Nachgang nicht zwischen Taschen- und Segelklappe unterschieden wurde.

Bei der histologischen Untersuchung ist insbesondere auf mögliche Rotationen der Herzklappen im Fixierungsprozess hinzuweisen.

6.1 Vergleich von Maus und Schwein

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Großtiermodelle der Atherosklerose im Schwein verwendet. In der Einleitung wurden zudem gängige Kleintiermodelle der Maus beleuchtet. Die Notwendigkeit der Verwendung und Weiterentwicklung von Großtiermodellen sollen durch Betrachtung von Vor- und Nachteilen der jeweils verwendeten Spezies im Folgenden diskutiert werden.

Limitationen des Maus-Modells

Die gesunde Maus entwickelt keine spontane Atherosklerose. (Moghadasian et al., 2001)

Das Lipidprofil von Mäusen unterscheidet sich in gesunden Mäusen enorm von Menschen. Sie sind von Natur aus sehr resistent gegenüber Atherosklerose. Ein Großteil des Cholesterins wird in der Maus an HDL gebunden transportiert. Die atherogenen LDL und VLDL nehmen nur einen kleinen Teil im Lipoprotein-Profil der Mäuse ein. (Emini Veseli et al., 2017; Getz & Reardon, 2012; Priyadharsini, 2015; Silva et al., 1994)

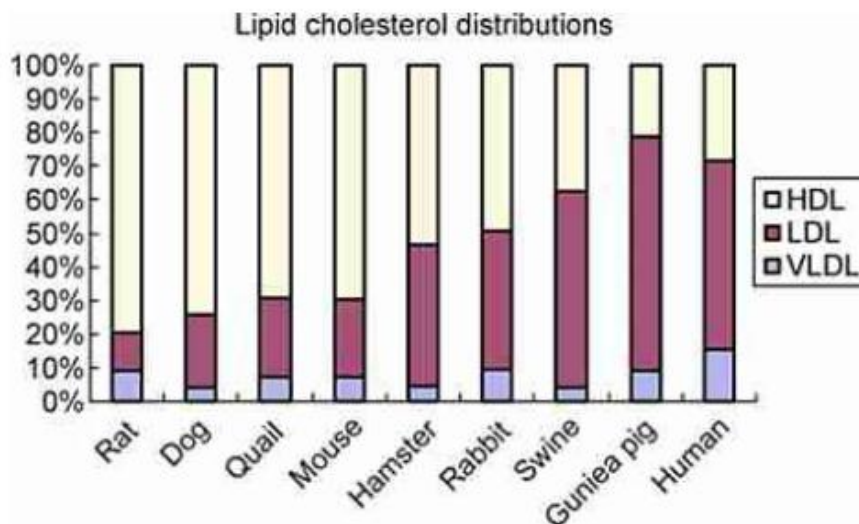


Abbildung 31: Prozentuale Verteilung der Lipoprotein-Fraktion im Vergleich (Xiangdong et al. 2011)

Zudem erfolgt die Regulation des Lipoprotein-Profiles der Maus über teilweise andere Mechanismen als beim Menschen.

Im Mausmodell fanden Forscher keine Expression des Cholesteryl-Ester-Transfer-Proteins. Barter *et al.* assoziierten diese Erkenntnis mit erhöhten HDL Spiegeln, sowie verminderten LDL-Spiegeln im Plasma und verminderter Ausbildung koronararterieller Plaques. (Barter et al., 2003; Moghadasian et al., 2001)

Der Gefäßaufbau der Maus unterscheidet sich von dem des Menschen. Während beim Menschen und größeren Säugetieren bereits in der Intima der Gefäßwand VSMC und vermehrt bindegewebige Proteine in der Extrazellulärmatrix zu finden sind, folgt in der Maus auf das Endothel direkt die Lamina elastica interna. Bei der Ausbildung der fibrösen Kappe fortgeschrittener Plaques, müssen die VSMC bei der Maus deshalb aus dem Bereich der Media in die Intima migrieren, während beim Menschen bereits VSMC vorhanden sind. Des Weiteren ist die Media von Mäusen dünner, als die des Menschen und es fehlen Vasa vasorum. (Jacob F. Bentzon et al., 2006; Y. T. Lee, Lin et al., 2017; J. Shim et al., 2016; Xu, 2004) Allgemein findet sich in der Gefäßwand von Mäusen eine geringere Anzahl an Zellen. Die koronar-arterielle Gefäßwand der Maus hat ca. 3000 Zellen weniger, als ein vergleichbarer menschlicher Gefäßabschnitt. (Xu, 2004)

Histopathologisch unterschied sich der Aufbau früher atherosklerotischer Plaques in der ApoE^{-/-} Maus vom Menschen. Im Menschen erschienen Schaumzellen früher Plaques in intimale VSMC eingebettet zu sein, wohingegen diese VSMC im Mausmodell fehlten. (Jacob Fog Bentzon & Falk, 2010; J. Shim et al., 2016)

Unterschiede, die die Translation erschweren, finden sich auch im Bereich der kardiovaskulären Physiologie. So fanden sich beispielsweise Unterschiede in der Elektrophysiologie des Herzens (London, 2001) und hämodynamischen Parametern, wie Herzfrequenz, Blutdruck und Scherkräften an der Gefäßwand (Fuster et al., 2012; James R. Turk & M. Harold Laughlin; Suo et al., 2007). Bedingt durch die kleine Größe der Gefäße eignen sich Mäuse schlecht für

wiederholte Blutentnahmen, Bildgebung oder Entnahme von Gefäßproben (Millon et al., 2014; J. Shim et al., 2016).

Da die Atherosklerose, wie oben beschrieben, bestimmt ist durch ein chronisches inflammatorisches Geschehen, stellt sich zudem die Frage, ob die Unterschiede im Immunsystem von Mensch und Maus eine Translation zulassen (Kapourchali et al., 2014; Mestas & Hughes, 2004).

Betrachtet man das ApoE^{-/-} oder LDLR^{-/-} Modell der Maus, fanden sich nur selten instabile und/oder koronare Plaques (Emini Veseli et al., 2017; Fuster et al., 2012; Getz & Reardon, 2012). Beides sind gefürchtete Manifestationen der Atherosklerose im Menschen. In weiterentwickelten Modellen, wie z.B. im ApoE-scavenger-receptor B1 Knockout (SR-B1^{-/-}) Modell konnten sowohl die Entwicklung fortgeschrittener Plaques, als auch spontane Plaquerupturen in den Koronarien mit Ausbildung eines Myokardinfarkts beobachtet werden (Braun et al., 2002). Neben den Limitationen des ApoE^{-/-} Modells kamen hier jedoch weitere dazu, wie beispielsweise eine beeinträchtigte Thrombozytenfunktion durch Ausschalten des SR-B1 (Nofer & van Eck, 2011), was die Translation zusätzlich erschwert.

Schweine-Modell

Durch die bereits genannten Limitationen ist die Übertragbarkeit vom Kleintiermodell auf den Menschen mit Problemen behaftet, insbesondere im Bereich von Therapiestudien, Präventionsmaßnahmen oder Diagnostik (Emini Veseli et al., 2017). So versagten therapeutische Ansätze, wie beispielsweise der Einsatz von Succinobucol und Varespladib, in Phase 3 Studien, die zuvor im Kleintiermodell erprobt wurden und dort anti-atherosklerotische Eigenschaften zeigten (Agarwala et al., 2013).

Gottlieb und Lalich zeigten an über 2000 Schweine-Aorten, dass Schweine, im Gegensatz zu den am meisten verwendeten Kleintiermodellen, spontane Atherosklerose entwickelten. (GOTTLIEB & LALICH, 1954)

Durch größere phylogenetische Nähe, die großen Ähnlichkeiten in der Anatomie, dem Herz-Kreislaufsystem, der Physiologie und Größe des Herzens und der Gefäße, sowie dem des Menschen ähnlichen Lipoproteinprofil, erscheint das Schwein als ideales Großtiermodell, um die Schwierigkeiten der Übertragbarkeit zu lösen (Hamamdzcic & Wilensky, 2013; Hryhorowicz et al., 2020; James R. Turk & M. Harold Laughlin). In Bezug auf kardialen Output, Puls und Blutdruck sind sie auf den Menschen übertragbar (James R. Turk & M. Harold Laughlin). Im Schwein fand sich eine hohe Homologie bezüglich der Genomsequenzen und Struktur der Chromosomen (Lunney, 2007). Schweine sind, wie Menschen, Allesfresser und die Reaktion des vaskulären Systems auf erhöhten Fettgehalt der Nahrung gleichen sich (Hamamdzcic & Wilensky, 2013). Insbesondere bei Minipigs können durch ihre Größe, im Gegensatz zu Kleintiermodellen, intravaskuläre Interventionen, Diagnostik und Therapien in ähnlichem Setting erfolgen, wie beim Menschen (Y. T. Lee, Laxton et al., 2017; Mushenkova et al., 2019; Poulsen et al., 2018; van Houten et al., 2019). So konnte am LDLR-/- Yucatan-Minipig die Wirkung der inzwischen zugelassenen Bempedoidsäure untersucht werden (Burke et al., 2018). Am LDLR+/- Yucatan-Minipig wurde der Effekt von Statinen erfolgreich untersucht (Amuzie et al., 2016). Der starke Einfluss veränderter Scherkräfte auf die Entwicklung fortgeschrittener Atherosklerose in Koronararterien wurde von Pedrigi *et al.* am D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipig erforscht (Pedrigi et al., 2015). Durch Verwendung von Schweinemodellen könnte gleichzeitig präklinische und klinische Forschung betrieben werden (J. Shim et al., 2016). Durch die Größe ließen sich Probenentnahmen erleichtern und repetitiv durchführen (Sturek et al., 2020). Auftretende atherosklerotische Läsionen finden sich an den gleichen Stellen, wie beim Menschen und zeigen ähnliche Charakteristika. (Priyadharsini, 2015) Nachteilig am Schwein sind höhere Haltungskosten und Anforderungen an die Haltung. Genmanipulationen sind im Schwein schwieriger durchzuführen und benötigen mehr Zeit, als bei Kleintiermodellen. In Arzneimittelstudien muss mit höheren Substanzmengen gearbeitet werden, was wiederum mehr Kosten nach sich zieht. (Priyadharsini, 2015; Sturek et al., 2020) Schweinen fehlt zudem sowohl CETP und Lp(a) im Lipoproteinstoffwechsel. Auch kamen im Schwein kaum spontane Plaquerupturen vor und die Zeit bis zur Ausbildung

fortgeschrittener Plaques ist vergleichsweise lang. (Mushenkova et al., 2019; J. Shim et al., 2016)

Yucatan-Minipigs sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Menschen in Bezug auf Größe, Gewicht, Anatomie, Physiologie und Genetik ein vielfältig genutztes Modell in der kardiovaskulären Forschung (Davis et al., 2014). Im Bereich kardialer Kapazitäten, Trainingseffekte und Versorgung durch Kollateralen im experimentellen kardialen Infarkt-Modell sind Yucatan-Minipigs mit dem Menschen vergleichbar (James R. Turk & M. Harold Laughlin). Die bekannte Herkunft und Genetik erleichtern ihren Einsatz (J. Shim et al., 2016).

6.2 Histologische Untersuchung der Herzen von LDLR-/- Yucatan-Minipigs und D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs

Ausgehend von einer Literaturrecherche auf PubMed erfolgte bei den LDLR-/- Yucatan minipigs und DY374-PCSK9 nach meinem Kenntnisstand bisher keine erweiterte immunhistochemische Untersuchung atherosklerotischer Läsionen der Koronargefäße, der Herzklappen oder des Myokards. Die entstandenen Ergebnisse sollten entsprechend als Anfang einer weiterhin notwendigen Forschung gesehen werden.

Koronararterien

Im Vergleich zum Wildtyp eines Yucatan-minipigs fanden sich sowohl im LDLR-/-, als auch im D374Y-PCSK9 Yucatan-minipig in den Koronararterien atherosklerotische Veränderungen. Diese ließen sich entsprechend der Klassifikation nach Stary dem Stadium IIa-III zuordnen (Stary et al., 1995; Stary et al., 1994).

Histopathologisch konnten für beide Modelle deutliche intimale Verdickungen festgestellt werden, die durch deutliches Mehrvorhandensein glatter Muskelzellen und Makrophagen innerhalb der Tunica intima der Gefäßwände erklärt werden konnte. Auch T-Lymphozyten traten gehäuft intimal auf.

Vergleicht man die erhobenen Daten mit den Daten von Davis *et al.* und Al-Mashhadi *et al.* so kam es auch in den Proben dieser Dissertation zur Bildung fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques. Die Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen im Koronargefäß konnte bestätigt werden. Diese schienen jedoch weniger fortgeschritten zu sein, als vorbeschrieben. Hämorrhagische Läsionen konnten nicht dargestellt werden. (Al-Mashhadi et al., 2013; Davis et al., 2014)

Histopathologisch auffällig waren die Ansammlung von glatten Muskelzellen. Dabei erschienen diese nicht allein an der luminalen Seite, sondern durchzogen die ganze Breite der Intima innerhalb des Plaques, teilweise überlappend mit den Gebieten positiver Zellen für Makrophagen-Marker. In den Ergebnissen dieser Arbeit fanden sich bei LDLR^{-/-} Schweinen zudem positive Zellen für den Makrophagen-Marker im Bereich der Media. Dies stützt vorangegangene Annahmen, dass Teile der Schaumzellen aus glatter Gefäßmuskulatur hervorgehen, die einen phänotypischen Wandel durchgehen. (Chistiakov et al., 2016; Dubland & Francis, 2016; Feil et al., 2014; F. Zhang et al., 2021)

Ein Auftreten von T-Lymphozyten konnte in beiden Modellen festgestellt werden. In tieferen intimalen Abschnitten konnte dies jedoch nur im LDLR^{-/-} Schwein beobachten werden. Die Rolle von T-Lymphozyten in der Genese der Atherosklerose war bisher insbesondere in Mäusemodellen erfolgt. Dort wurde ihnen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Atherosklerose zugeschrieben. (Saigusa et al., 2020; Schäfer & Zerneck, 2020)

Der Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Atherosklerose ist in den vergangenen Jahren ebenfalls ins Blickfeld der Forschung geraten. Insbesondere durch Aktivierung des Endothels und Bildung eines pro-inflammatorischen Settings innerhalb der Gefäßwand. (Bonaventura et al., 2019; Silvestre-Roig et al., 2020; Warnatsch et al., 2015) Histopathologisch ließen sich in den Proben dieser Arbeit jedoch keine neutrophilen Granulozyten im Plaque nachweisen.

Vergleicht man die hier verwendeten Modelle so könnte ein Vorteil in der Verwendung von LDLR^{-/-} Modellen gegenüber D374Y-PCSK9-Modellen die vom hepatischen LDL-Rezeptor und LDL-Werten unabhängigen Funktionen von PCSK9 sein. In Studien konnte der Einfluss von PCSK9 unter anderem auf Makrophagen und die Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Giunzioni et al., 2016). Zudem wird eine Assoziation mit der Höhe des Blutdrucks und mit Expression von ApoE und VLDL vermutet (Mousavi et al., 2009; Tran et al., 2015).

Insbesondere im verwendeten LDLR-/- Modell könnte die Rolle der T-Lymphozyten weiter erforscht werden. Dabei erscheint die Durchführung einer Subgruppenanalyse notwendig und geboten. Durch längere Haltung der Tiere könnten noch weiter fortgeschrittene Plaques entstehen, um weitere Stadien der Atherosklerose inklusive Plaqueruptur zu beobachten. Zu bedenken bleiben dabei die bereits genannten Limitationen des Schweins an sich.

Myokard

Immunhistochemisch auffällig war im Myokard der LDLR-/- Yucatan-minipigs ein deutlich erhöhtes Vorkommen von Iba-positiven Makrophagen. Diese erschienen diffus im Myokard. Das Myokard an sich, ist ein mit vielen Gefäßen durchzogenes Gewebe.

Das Vorhandensein einer gewissen Menge an Makrophagen im Myokard stellt einen physiologischen Zustand dar. Diese sind größtenteils embryonaler Herkunft und verbleiben im Herzmuskel für den Fall einer Verletzung. Neben diesen können jedoch auch über das Blut Makrophagen ins Myokard einwandern. Im Lauf des Lebens werden manche der embryonalen Makrophagen durch eingewanderte ersetzt. Diese zeigen meist pro-inflammatorische Eigenschaften. Insgesamt spielen Makrophagen eine herausragende Rolle im Fall einer kardialen Verletzung, Entzündungs- oder Anpassungsreaktion. Sie sind maßgeblich an kardialer Fibrose beteiligt. Hierbei können die Stimuli vielfältig sein. Eine entsprechende Reaktion kann beispielsweise durch Hypoxie im Rahmen eines Infarktes, bei infektiöser oder nicht-infektiöser Myokarditis, oder bereits durch arterielle Hypertension getriggert sein. (Lafuse et al., 2020; Maruyama & Imanaka-Yoshida, 2022; Oishi & Manabe, 2016)

Für einen Infarkt oder myokardiale Fibrose ließen sich in den hier verwendeten Proben kein Hinweis finden. Die genetische Untersuchung im LDLR-/- Schwein zeigte sogar eine verminderte Expression für Col3a1 an. Den abschließenden Grund für das vermehrte Vorhandensein der Makrophagen in den hier

untersuchten Myokardproben lässt sich aufgrund der großen Anzahl der möglichen Stimuli nicht bestimmen. Zur Frage, ob bereits die reine Hypercholesterinämie Auslöser dafür sein kann, benötigt es weitere Untersuchungen. Insbesondere sollten dabei andere Stimuli gleichgeschaltet werden. Eben diese, z.B. die arterielle Hypertension, wurden in den Proben dieser Dissertation nicht betrachtet. Des Weiteren sollte dann die Identifizierung der Subklassen der Makrophagen erfolgen, um die genauen Aufgaben gefundener Zellen zu identifizieren. Eine solche Subklassenanalyse war in dieser Arbeit nicht erfolgt.

Herzklappen

In dieser Arbeit erfolgte ebenfalls die histopathologische Untersuchung der Herzklappen von LDLR^{-/-} Yucatan minipigs.

Eine Assoziation zwischen Aortenklappenstenose und Atherosklerose ist Teil der Forschung und wird angenommen. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der Aortenklappenstenose sind dabei nicht zur Gänze geklärt. Die Aortenklappenstenose in frühen Stadien scheint dabei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen zu folgen. (Boudoulas et al., 2015; O'Brien et al., 1996; Rajamannan et al., 2011)

Entsprechende Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit festgestellt werden. Auffällig waren Makrophagen-Akkumulationen auf der den Scherkräften des Blutes zugewandten Seite der Herzklappen im Bereich der Spongiosa. Pathophysiologisch passt dies zur Phase der endothelialen Dysfunktion in der Genese der Atherosklerose. (Cunningham & Gotlieb, 2005; Y. Liu et al., 2013) Das vermehrte diffuse Vorhandensein smA exprimierender Zellen auf histologischer Ebene im Bereich der Makrophagen-Akkumulation in der Spongiosa ähnelt dem vermehrten Auftreten von VSMC im Bereich atherosklerotischer Plaques. Wie auch in der Diskussion um die genetische Expression von Acta2 in den Gewebeproben der LDLR^{-/-} Schweinen beschrieben wird, zeigte die Hälfte der valvulären interstitiellen Zellen

kalzifizierter menschlicher Aortenklappen eine Expression von smA (X. Liu et al., 2021). Die nun beobachteten Zellen mit Expression von smA könnten nun einerseits der Link zur Atherosklerose darstellen im Falle glatter Gefäßmuskelzellen, andererseits der beginnende Wandel von interstitiellen Fibroblasten hin zu Myofibroblasten, welche in fortgeschrittenen Aortenklappenstenosen gefunden wurde. Eine genauere Untersuchung im LDLR^{-/-} Yucatan-minipig erscheint sinnvoll und sollte zur weiteren Forschung herangezogen werden.

Bisherige Tiermodelle zur Erforschung der kalzifizierten Aortenklappenstenose beschränkten sich zu großen Teilen auf Mausmodelle oder andere Kleintiermodelle. Mäuse besitzen jedoch Herzklappen, die nur aus einer histologisch abgrenzbaren Schicht bestehen und nicht, wie beim Menschen oder beim Schwein, aus drei Schichten. Die Übertragbarkeit von Studien im Mausmodell ist entsprechend eingeschränkt. Bisherige Schweinemodelle waren zumeist diätisch bedingte hypercholesterinämische Schweine, die in histologischen Untersuchungen zwar phänotypische Veränderungen aufwiesen, die zu frühen Aortenklappenstenosen passen, jedoch kaum entzündliche Reaktionen aufwiesen, wie sie im Menschen vorkommen. (Goody et al., 2020; Honda et al., 2014; Ngo et al., 2011; Niepmann et al., 2019; Sider et al., 2011) Diese entzündlichen Veränderungen sind im LDLR^{-/-} Yucatan-Minipig vorhanden und stellen somit eine Verbesserung bisher verwendeter Schweinemodelle dar. Zu Kalzifizierungen kam es jedoch auch in den hier verwendeten Großtiermodellen nicht, sodass davon auszugehen ist, dass nur initiale pathophysiologische Veränderungen in diesen Großtiermodellen zu erforschen sind. Weitere Beobachtungen sind notwendig, ob es bei längerem Leben der Schweine zur Ausbildung entsprechender Stenosen kommt. Problematisch könnte dabei ein eventuelles Versterben der Tiere aufgrund der atherosklerotischen Gefäßveränderungen sein.

Bis heute gibt es keine pharmakologische Möglichkeit den Kalzifizierungsprozess in Aortenklappenstenosen zu unterbinden (Goody et al., 2020). Forschung an frühen, nicht kalzifizierten Aortenklappenstenosen erscheint demnach wichtiger denn je. Eine Untersuchung früher Klappenstenosen an lebenden

Großtiermodellen war bisher selten möglich. Die hier verwendeten Großtiermodelle, insbesondere das LDLR-/- Modell an Yucatan-Minipigs, könnten als die notwendige Grundlage für weitere Forschung dienen.

6.3 Untersuchung der Herzen von LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs und D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs auf veränderte genetische Expressionsmuster

Es ist, nach meinem Kenntnisstand, das erste Mal, dass Proben der Koronararterien, des Myokards und der Herzklappen dieser Großtiermodelle auf die Expression von *Lgals3*, *miRNA29b*, *Acta2* und *Col3a1* hin untersucht wurden. Aufgrund der relativ geringen Probenzahl, insbesondere der Proben von D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs, sollten die Ergebnisse jedoch mit Bedacht betrachtet werden.

Als wichtige Limitation ist zu nennen, dass im Rahmen der Probengewinnung und -verarbeitung ganze Abschnitte von Geweben herangezogen wurden, um die benötigten Mengen zur qRT-PCR zu erhalten. Entsprechend ist davon auszugehen, dass nicht allein der histopathologisch veränderte Teil der Gewebeproben der qRT-PCR zugeführt wurden. Fehlendes Erreichen des Signifikanzniveaus könnte auf diese Tatsache zurückzuführen sein. Dies fällt insbesondere bei den verwendeten Proben der D374Y-PCSK9-Minipigs für *Lgals3* auf. Hier zeigen sich sowohl Ausreißer im Sinne einer vermehrten Expression, als auch Werte, die dem Wildtypen nahezu gleichen.

Durch Verwendung spezifischerer Methoden wie beispielsweise Single-Cell-RNA-Sequencing, könnte die Genexpression einzelner Zelltypen gezielt untersucht werden. Dadurch könnten noch genauere Einblicke in die pathophysiologischen Unterschiede z.B. der VSMC gewonnen werden.

Koronararterien

In den koronararteriellen Proben zeigte sich nur bei den LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs mit einer signifikant erhöhten Expression von *Lgal3* ein verändertes genetisches Expressionsmuster. Bei den anderen Genen und insgesamt bei den D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipigs konnte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden.

LGALS3

LGALS3 kodiert für Galectin-3. Galectin-3 findet sich in vielen menschlichen Geweben, wie beispielsweise in Immunzellen, endothelialen und epithelialen Zellen. Es findet sich sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern und an der Zelloberfläche, wodurch es in einer Vielzahl von Prozessen beteiligt ist. Hierzu zählen Regulation von Inflammation, mRNA-Splicing, Zelldifferenzierung und immunologische Vorgänge. Der Einfluss auf verschiedenste Erkrankungen wie und Krebsarten ist Teil aktueller Forschung. (Dong et al., 2018) Galectin-3 ist zudem interessant, da es in verschiedensten Erkrankungen als Serum-Biomarker erforscht wird und dabei kaum Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht zeigt. (Schindler et al., 2016) In früheren Untersuchungen konnten im Serum von Patienten mit angiographisch gesicherter KHK erhöhte Werte für Galectin-3 nachgewiesen werden. (Aksan et al., 2016) Vergleicht man Patienten mit stabiler KHK und instabiler KHK so fanden sich im Serum von Patienten mit instabiler KHK erhöhte Galectin-3 Werte (Falcone et al., 2011). In atherosklerotischen fortgeschrittenen Läsionen konnte im Menschen eine erhöhte Expression von Galectin-3 festgestellt werden (Nachtigal et al., 1998; Papaspyridonos et al., 2008). Galectin-3 kann Atherosklerose durch Förderung von Inflammation, Chemotaxis, Lipid-Endozytose, Remodeling der EZM, Kalzifizierung und oxidativen Stress verstärken (Aksan et al., 2016; Gao et al., 2020; Menini et al., 2013). Auch in atherosklerotischen Tiermodellen wurden Plaques auf Galectin-3 untersucht. In verschiedenen Modellen der Maus konnte vermehrt Galectin-3 in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. Bei genetischer Deletion

von *Lgals3* oder pharmakologischer Hemmung von Galectin-3 zeigten sich dabei seltener atherosklerotische Läsionen. (Blanda et al., 2020; MacKinnon et al., 2013) Auch in hypercholesterinämischen Kaninchen wurden in Proben der Aorten eine erhöhte Expression von *Lgals3* nachgewiesen (Arar et al., 1998). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit verdeutlichen damit, dass das Großtiermodell LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs auch im Bereich der genetischen Expression von *Lgals3* menschenähnliche Veränderungen zeigt und sich dementsprechend zur weiteren Erforschung der Rolle von Galectin-3 in der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen eignet. Dies ist insbesondere durch teilweise widersprüchliche Ergebnisse bezüglich fraglicher atheroprotektiver Eigenschaften von Galectin-3 im Mausmodell geboten (Di Gregoli et al., 2020; Iacobini et al., 2009). Auch vor diesem Hintergrund wäre eine genauere Untersuchung bspw. durch Single-Cell-RNA-Sequenzierung hilfreich.

COL3A1

Die EZM von Gefäßwänden besteht zu großen Teilen aus Kollagen. Kollagen Typ 3 macht dabei ca. 30% des vaskulären Kollagens aus. (Manon-Jensen et al., 2016) Dem Remodeling der EZM wird in der Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle zugeschrieben. (Kong et al., 2013) Die Untersuchung von COL3A1 ist zudem durch bekannte Interaktionen mit Thrombozyten interessant. (Kuivaniemi & Tromp, 2019) In beiden hier verwendeten Großtiermodellen zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression von *Col3a1* in den Gefäßen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass fibröse Plaques zu einem Großteil aus Kollagen Typ 1 und 3 bestehen (Shekhonin et al., 1987). Im Rahmen der Progression atherosklerotischer Läsionen konnte eine relative Abnahme von Kollagen Typ 3 beobachtet werden (Murata et al., 1986). Zudem fanden sich in vulnerablen Plaques vermehrt fragmentierte Kollagenfasern (Reimann et al., 2017). In einer anderen Studie wurden rupturierte mit nicht-rupturierten Plaques der Carotiden verglichen. Hierbei fanden die Forscher heraus, dass in den rupturierten Plaques unter anderem COL3A1 signifikant vermindert exprimiert wurde (H. Wang et al.,

2019). Kong *et al.* fanden heraus, dass in Patienten, welche einen Myokardinfarkt erlitten hatten, in der angrenzenden Aorta COL3A1 vermindert exprimiert wurde. In Patienten, die eine stabile KHK hatten, war die Expression ohne signifikante Unterschiede (Kong *et al.*, 2013). Die hier verwendeten Modelle entwickelten zwar fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen, jedoch kam es zu keinen Rupturen. Die Ergebnisse decken sich also mit anderen Studien, wonach erst im Verlauf der Erkrankung mit signifikanten Veränderungen der Expression von COL3A1 zu rechnen ist.

miRNA29b

Weder im D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipig, noch in LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster für miRNA29b. In vorherigen Studien, beispielsweise an hypercholesterinämischen ApoE^{-/-} Mäusen, konnte bei HFHC-Diät eine erhöhte Expression von miRNA29b in der Aorta beobachtet werden (Zhu *et al.*, 2014). In frühen atherosklerotischen Plaques aus menschlichen Koronararterien konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von miRNA29b festgestellt werden. Jedoch wurden dafür nur Proben aus drei Patienten herangezogen. (R. Wang *et al.*, 2015) OxLDL, welches im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose entsteht, führte *in vitro* zu einer Hochregulierung der miRNA29b (Chen *et al.*, 2012). Die regulatorischen Funktionen der miRNA29b auf die Plaquestabilität wurden ebenfalls untersucht und nachgewiesen (Laffont & Rayner, 2017). Die fehlende vermehrte Expression in dieser Doktorarbeit fällt demnach aus der Reihe und entspricht nicht den Erwartungen. Gründe dafür könnten einerseits die geringe Probenzahl sein, andererseits auch die Tatsache, dass in der Untersuchung komplette Gefäßabschnitte untersucht wurden und nicht explizit atherosklerotische Plaques. In weiteren Untersuchungen an diesen Modellen sollte bezüglich der Expression von miRNA29b das Augenmerk stärker auf Proben direkt aus Läsionen liegen, um ggf. die in Mausmodellen und Mensch bekannten Veränderungen zu beobachten.

ACTA2:

Das Gen ACTA2 kodiert für alpha-smooth-muscle-actin (alpha-smA) und ist Bestandteil glatter Muskelzellen und Myofibroblasten (S.-M. Yuan, 2015). VSMC machen den Hauptteil der Intima media eines Blutgefäßes aus. (Shi et al., 2020) In den hier untersuchten Proben konnte keine signifikant veränderte Expression von *Acta2* festgestellt werden. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im Rahmen des phänotypischen Wandels der VSMC in der Pathogenese der Atherosklerose ein Verlust von kontraktilen Elementen und Markern glatter Muskelzellen, wie alpha-smA, der VSMC stattfindet (Bennett et al., 2016; Lacey et al., 2019; Shankman et al., 2015; Tabas et al., 2015). Dabei scheint die Expression von alpha-smA abhängig vom Krankheitsstadium und der Lokalisation in der Gefäßwand zu sein. In menschlichen Proben aus der Aorta ascendens von Patienten mit koronarem Bypass konnten erhöhte Werte für alpha-smA festgestellt werden, trotz makroskopisch fehlender Veränderungen (Forte et al., 2018). So wurde eine verstärkte Bildung von alpha-smA im Bereich der fibrösen Kappe beobachtet (Allahverdian et al., 2018). In fortgeschrittenen Läsionen der ApoE^{-/-} Maus hingegen exprimierten intimale VSMC nahezu kein alpha-smA mehr (Tabas et al., 2015). Histopathologisch zeigte sich in den hier durchgeführten Untersuchungen eine sich zu bilden beginnende fibröse Kappe. Dass die Expression von *Acta2* keine signifikanten Änderungen aufweist, könnte dadurch erklärt werden, dass nicht spezifische Regionen der Gefäßwand einzeln betrachtet wurden, sondern die Gefäßwand als Ganzes. So könnten verstärkte Expression im Bereich der fibrösen Kappe und verminderte Expression durch den phänotypischen Wandel sich gegenseitig aufheben. Eine gezieltere Untersuchung der einzelnen Gefäßwandschicht und Plaqueschichten könnte genaueren Aufschluss geben.

Myokard

Im Myokard fand sich nur im LDLR^{-/-} Yucatan-Minipig bei der Untersuchung von *Col3a1* ein signifikant vermindertes Expressionsmuster. Alle anderen untersuchten Gene zeigten sowohl im LDLR^{-/-}, als auch im D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipig keine signifikanten Unterschiede.

LGALS3

LGALS3 bzw. das darin kodierte Galectin-3 steht in Assoziation zu mehreren fibrotischen Erkrankungen wie Leber- und Nierenfibrose (Yu et al., 2013). In gesundem Myokard wird LGALS3 kaum exprimiert. Kommt es jedoch zu Gewebsverletzung, so wird es in der initialen Phase der Reparatur hochreguliert. Eine dauerhafte Überexprimierung scheint mit Fibrose assoziiert zu sein. (Suthahar et al., 2018) Galectin-3 induziert Inflammation, die Proliferation kardialer Fibroblasten, die Bildung von Kollagen und kardiale Dysfunktion in Modellen für Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie (Y.-H. Liu et al., 2009; Sharma et al., 2004). In Myokard von Patienten, welche aufgrund einer Aortenklappenstenose einen Aortenklappenersatz erhielten, fanden Zhou *et al.* erhöhte Expressionsmuster für Galectin-3 und hatten eine positive Korrelation zum Ausmaß der myokardialen Hypertrophie und kardialen Fibrose in diesen Patienten (Zhou et al., 2016). Im Modell des kardialen Remodellings im Rahmen arterieller Hypertonie konnten Yao *et al.* ebenfalls eine positive Korrelation mit frühem kardialen Remodelling feststellen (Yao et al., 2016).

Weder im Myokard von LDLR^{-/-}, noch im Myokard von D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipigs konnten erhöhte Werte für *Lgals3* festgestellt werden. Dies stützt die Hypothese, dass mehrere Faktoren und u.a. eine Gewebsverletzung notwendig sind, um kardiale Fibrose zu bedingen. Alleinige Hypercholesterinämie und vermehrtes Vorhandensein von Makrophagen im Myokard scheinen in unseren Großtiermodellen keinen ausreichenden Stimulus für eine Überexpression von *Lgals3* und entsprechend für Fibrose zu sein.

COL3A1

Kollagen Typ 3 ist zusammen mit Typ 1 der hauptsächlich vorkommende Kollagentyp der myokardialen EZM (Souza, 2002). Die Expression von COL3A1 in myokardialem Gewebe war in bisherigen Studien insbesondere im Rahmen der Forschung zum kardialen Remodeling nach Infarkt oder kardialer Fibrose untersucht worden. Hierbei zeigten sich beispielsweise unterschiedliche Expressionsmuster im Rahmen der dilatativen, der valvulären und ischämischen Kardiomyopathie, mit der höchsten Expression in der dilatativen, gefolgt von der ischämischen Kardiomyopathie. (Herpel et al., 2006) Auch in der restriktiven Kardiomyopathie fanden sich erhöhte Werte für COL3A1 (Kuivaniemi & Tromp, 2019). Umso bemerkenswerter ist die signifikant verminderte Expression im Myokard der LDLR-/- Yucatan-Minipigs. Diese steht konträr zu den bekannten und erwarteten Ergebnissen, auch wenn histologisch keine kardiale Fibrose nachweisbar war. Eine verminderte Expression war im späten Verlauf des kardialen Remodeling zugunsten von Kollagen Typ 1 bereits beobachtet worden (Uchinaka et al., 2018). Dass eine Hypercholesterinämie, verbunden mit einem vermehrten Auftreten von Makrophagen im Myokard, zu einer Veränderung der Zusammensetzung der EZM führt, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Aufgrund der geringen verwendeten Probenzahl sollten diese Ergebnisse auch am gleichen Modell mit einer größeren Zahl an Proben verifiziert werden.

miRNA29b

Weder im D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipig noch in LDLR-/- Yucatan-Minipigs zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster für miRNA29b. In vitro zeigten sich nach hypoxischer Schädigung verminderte Werte für miRNA29b in Kardiomyozyten (Cai & Li, 2019). Sowohl in vitro, als auch in vivo, konnte im Mausmodell die Beteiligung der miRNA29b am post-myokardinfarkt Remodeling durch kardiale Fibroblasten festgestellt werden. Allgemein scheinen die kardialen Fibroblasten Hauptort der Expression der miRNA 29b zu sein. (van Rooij et al., 2008) Verminderte Werte für miRNA29b sind bei einer Vielzahl fibrotischer Erkrankungen zu beobachten (Lars Maegdefessel et al., 2014). Im Gegensatz zu

den genannten Beispielen konnte im Myokard der hier verwendeten Modelle keine verstärkte Fibrose, Infarzierung oder Hypoxie nachgewiesen werden. Eine fehlende Veränderung der miRNA29b überrascht demnach nicht und deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen. Eine alleinige Hypercholesterinämie ohne kardiales Ereignis scheint nicht ausreichend zu sein, um eine kardiale Fibrose zu initiieren oder Änderungen in der Expression von miRNA29b zu verursachen.

ACTA2

Für die Expression von *Acta2* konnte in keiner der hier untersuchten Gewebeproben eine veränderte Expression festgestellt werden. In gesundem Myokard befindet sich eine Vielzahl an ruhenden Fibroblasten-ähnlichen Zellen. Im Fall einer Verletzung des Myokards, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt, kommt es durch Ausschüttung und Freisetzung inflammatorischer Stoffe zur Aktivierung dieser Zellen. Allgemein benötigt ein Teil der Fibroblasten in heilendem Gewebe die Fähigkeit zur Kontraktion. Dies wird unter anderem durch die vermehrte Bildung von alpha-smA bewerkstelligt. (Shinde et al., 2017) Aktivierte Myofibroblasten sind nach Humeres *et al.* die Hauptproduzenten für Matrix-Proteine und Matrix-Makromoleküle. In fibrotischen Herzen finden sich viele alpha-smA exprimierende Myofibroblasten. (Humeres & Frangogiannis, 2019). Direkt nach der Schädigung des Myokards werden sie aktiviert und exprimieren teils große Mengen an alpha-smA. Fehlt die Verletzung, so exprimieren die ruhenden Fibroblasten kein alpha-smA. (Humeres & Frangogiannis, 2019; Shinde et al., 2017). Weder Alter, noch Diabetes mellitus konnten die ruhenden Fibroblasten aktivieren (Humeres & Frangogiannis, 2019). Die Ergebnisse aus den hier durchgeführten Experimenten decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen, dass eine Verletzung des Myokards notwendig ist, um eine Aktivierung der ruhenden Fibroblasten und entsprechend erhöhte Expression von *Acta2* zu bewirken. Auch eine alleinige Hypercholesterinämie ist kein ausreichender Stimulus dafür. Unterstützt werden die Ergebnisse der genetischen Untersuchung vom fehlenden histopathologischen Nachweis myokardialer Fibrose.

Herzklappen

In den untersuchten Herzklappen zeigten sich im LDLR^{-/-} Yucatan-Minipig signifikante Änderungen für COL3A1, welches vermindert exprimiert wurde, und *Lgals3*, welches vermehrt exprimiert wurde. Alle anderen untersuchten Gene zeigten sowohl im LDLR^{-/-}, als auch im D374Y-PCSK9 Yucatan-Minipig keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle.

LGALS3:

Durch den Wandel der vermuteten Pathogenese in kalzifizierten Aortenklappenstenosen hin zu einem initial der Atherosklerose ähnlichen Geschehen und der Rolle von LGALS3 bzw. Galectin-3 in atherosklerotischen Läsionen wurden auch an menschlichen Herzklappen die Expression von Galectin-3 untersucht.

Im Gegensatz zu Serumuntersuchungen bei Patienten mit KHK (s.o.) konnte bei Patienten mit Aortenklappenstenosen anhand der Serumwerte für Galectin-3 keine Aussage bezüglich Schwere oder Funktion der Aortenklappenstenose festgestellt werden (Arangalage et al., 2016). Dennoch wurde in Proben von Patienten mit höhergradiger kalzifizierter Aortenklappenstenose in den Klappen eine vermehrte Expression von Galectin-3 festgestellt. Es war maßgeblich am Kalzifizierungsprozess der Aortenklappen beteiligt. Galectin-3 stimulierte in vitro interstitielle Bindegewebszellen der Herzklappen, die daraufhin vermehrt Marker für Inflammation, Fibrose und Kalzifikation zeigten. (Sádaba et al., 2016) Sun *et al.* erforschten in atherosklerotische Läsionen, dass Galectin-3 über eine Hochregulierung von Sortilin zu Makrokalzifizierungen in den Plaques bewirkte (Z. Sun et al., 2019). Auch in dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Modell mit LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs wurde diese erhöhte Expression festgestellt. Die Rolle von Galectin-3 an der Entstehung und Progression von kalzifizierten Aortenklappenstenosen könnte in diesem Modell weiter beleuchtet werden.

COL3A1-Expression

Die EZM gesunder Aortenklappen des Menschen besteht zu ca. 70% aus Kollagen Typ 1 und zu ca. 25% aus Kollagen Typ 3. Der Gesamtanteil von Kollagen am Gesamt-Protein macht dabei rund 90% aus. In erkrankten, stenosierten Klappen wurden jedoch nur Werte von ca. 40% in weichem Gewebe und nur 10% in kalzifizierten Arealen gemessen. (Eriksen et al., 2006) Miura *et al.* konnten in stenosierten Aortenklappen einen drastischen Rückgang des vorhandenen Kollagen Typ 1 feststellen (Miura & Katoh, 2016). In mehreren Studien wurde jedoch eine erhöhte genetische Expression von COL1A1 festgestellt, sodass insgesamt von einem erhöhten Umsatz der Kollagene und von einem Remodelling der EZM in stenosierten Aortenklappen auszugehen ist. (Bossé et al., 2009; Eriksen et al., 2006; Hutson et al., 2016; Sádaba et al., 2016) Hutson *et al.* fanden jedoch keine erhöhte Expression von COL1A1 (Hutson et al., 2016). Zur Expression von COL3A1 in stenosierten Herzklappen zeigten bisherige Studien keine einheitlichen Ergebnisse. Während Bossé *et al.* eine unveränderte Expression von COL3A1 feststellten, fanden Eriksen *et al.* in 13 von 30 untersuchten kalzifizierten stenosierten Herzklappen eine leicht erhöhte Expression und in 17 von 30 eine fehlende Expression (Bossé et al., 2009; Eriksen et al., 2006). Sádaba *et al.* fanden hingegen eine signifikant erhöhte Expression von COL3A1 in kalzifizierten Aortenklappen (Sádaba et al., 2016). Die Herzklappen der in dieser Doktorarbeit untersuchten LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs zeigten, wie oben beschrieben, eine signifikant verminderte Expression an COL3A1. Die Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen aus Studien am Menschen. Zu beachten ist jedoch, dass in bisherigen Studien meist bereits fortgeschritten erkrankte Herzklappen untersucht wurden, in dieser Studie die Herzklappen nur im Anfangsstadium einer möglichen stenosierenden Herzklappenerkrankung verwendet wurden. Die in dieser Doktorarbeit verwendeten D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipigs zeigten keine veränderte Expression von Col3a1. Die Veränderung der EZM ist ein Kennzeichen der kalzifizierten Aortenklappenstenose. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten auf ein differentes Remodelling der EZM zu Beginn der Erkrankung hinweisen.

Um die Rolle und Expression verschiedener Kollagene in der Krankheitsentstehung und Progression zu bestimmen, bedarf es weiterer Forschung.

miRNA29b

Weder im D374Y-PCSK9-Yucatan-Minipig noch in LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster für miRNA29b. Der Einfluss von miRNA29b auf die Produktion verschiedener Gene der EZM wurde bereits in vielen Studien untersucht. So reguliert miRNA29b u.a. die Expression von COL1A1, COL1A2, COL3A1, Elastin, Fibronectin-1 und Fibrillin-1 (Ulrich et al., 2016; van Rooij et al., 2008). Durch miRNA29b-Agonisten konnte beispielsweise die Bildung von Elastin in Fibroblasten und VSMC vermindert werden (Suárez & Fernández-Hernando, 2012). Eine Beteiligung der miRNA29b am Remodelling der EZM im Rahmen der Pathogenese stenosierender Klappenerkrankungen wurde, nach meinem Kenntnisstand, noch nicht untersucht. Histopathologisch zeigten sich in den hier verwendeten Schweinemodellen frühe pathologische Veränderungen der Herzklappen. Auch auf Genexpressionsebene konnte bei LDLR^{-/-} Yucatan-Minipigs eine Änderung der Kollagenexpression festgestellt werden. Diese Änderung geht jedoch ohne signifikante Änderung der miRNA29b-Expression einher. Dadurch lässt sich mutmaßen, dass zumindest in den frühen Phasen der Entstehung stenosierender Klappenerkrankungen, das extrazelluläre Remodelling außerhalb der Kontrolle der miRNA29b steht. Beachten sollte man jedoch, dass dies keine Aussagen bezüglich später kalzifizierter Aortenklappenstenosen zulässt. Die Untersuchung fortgeschrittener Klappenstenosen auf miRNA29b, welche auch als Masterregulator der Fibrose bezeichnet wird (O'Reilly, 2016), sollte Teil der zukünftigen Forschung sein.

ACTA2

Für die Expression von ACTA2 konnte, wie auch in den Koronarien und dem Myokard, in keiner der hier untersuchten Gewebeproben eine veränderte Expression festgestellt werden. Dies überrascht, da histologisch im LDLR-/Yucatan-minipig ein vermehrtes Vorkommen smA-positiver Zellen beobachtet werden konnte. Erneut muss auf die Limitation dieser Arbeit hinsichtlich der Probengewinnung und Verarbeitung als mögliche Ursache hingewiesen werden. In etwa der Hälfte der valvulären interstitiellen Zellen (VIC) aus menschlichen kalzifizierten Aortenklappenstenosen finden sich eine Expression von alpha-smA (X. Liu et al., 2021). In stenosierten Klappen differenzieren sich VIC und Fibroblasten zu Myofibroblasten, was durch eine vermehrte Bildung von alpha-smA gezeigt werden konnte. Sie produzieren EZM und führen dadurch zu einer Verdickung und Fibrose der Klappe. (Goody et al., 2020; Helske et al., 2007) Lu *et al.* vermuteten, dass der Ursprung der Osteoblasten-artigen Zellen in den Myofibroblasten liegen könnte, nachdem sie in explantierten porcinen kalzifizierten Herzklappenprothesen eine verstärkte Bildung von alpha-smA beobachteten (Lu et al., 2018). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden jedoch keine kalzifizierten Klappen untersucht, sondern lediglich frühe Klappenveränderungen. Dabei decken sich die Ergebnisse mit den Ergebnissen von Porras *et al.* In deren Studie fand sich, trotz histologisch verdickter Herzklappen im Rapacz-Schweinmodell, keine veränderte Expression von alpha-smA. Zu den initialen Veränderungen in der Pathogenese stenosierender Klappenerkrankungen gehören demnach hauptsächlich inflammatorische Prozesse mit kollagenem Remodelling. Eine Untersuchung der valvulären Expression von *Acta2* im Schweinmodell sollte zusätzlich zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung erfolgen, um die Expressionsmuster im Krankheitsprogress zu bestimmen.

7. Zusammenfassung

Atherosklerotisch bedingte Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit, sind in unserer Gesellschaft weit verbreitet. Die Forschung in dem Menschen ähnlichen Organismen in diesem Gebiet erscheint unerlässlich. Bisherige Tiermodelle, insbesondere Kleintiermodelle wie Maus oder Kaninchen sind in ihrer Übertragbarkeit jedoch teilweise stark eingeschränkt. Durch große phylogenetische Ähnlichkeiten und der Möglichkeit gezielter Interventionen wurden in den letzten Jahren Großtiermodelle am Schwein etabliert. In dieser Arbeit wurden die Modelle von LDLR ^{-/-} Yucatan-minipigs und D374Y-PCSK9 Yucatan-minipigs sowohl mittels immunhistochemischer Färbungen als auch bezüglich ihrer Expression spezieller Gene mittels qRT-PCR mit dem Fokus auf Koronararterien, Herzklappen und Myokard gezielt erweitert untersucht. Immunhistochemisch wurden bezüglich Myokard und Herzklappen lediglich Proben der LDLR ^{-/-} Schweine untersucht. Ziel war dabei die Feststellung pathophysiologischer Ähnlichkeiten der Atherosklerose zum Menschen, sowie die Befundung möglicher weitere Pathologien, die durch die entstandene Hypercholesterinämie getriggert wurden. Bei der Genexpression wurde u.a. Augenmerk auf die miRNA29b, als mögliches Target zukünftiger Therapien, gelegt. Diese wurde in mehreren vorangegangenen Arbeiten mit kardialer Fibrose und atherosklerotischen Plaques im Menschen in Verbindung gebracht.

Histopathologisch zeigten in beiden Modellen die Koronararterien fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen, jedoch ohne beim Menschen typischen Kalzifizierungen oder Komplikationen wie Plaquerupturen. Genetisch zeigten sich im Bereich der Expression von Galectin-3 eine, dem Menschen ähnliche, signifikante Erhöhung im LDLR ^{-/-} Schwein. Die miRNA29b verblieb ohne auffälliges Expressionsmuster in beiden Modellen.

Im Myokard der LDLR ^{-/-} Schweine fand sich histopathologisch eine auffällige Verteilung und Mehrzahl von Makrophagen. Genetisch zeigte sich eine verminderte Expression von Kollagen Typ 3. Die Ergebnisse stehen konträr zu

den Erwartungen einer möglichen kardialen Fibrose. Der Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie, kardialer Makrophagen und kardialer Fibrose bedürfen weiterer gezielter Untersuchungen. Im untersuchten Myokard fand sich kein verändertes Expressionsmuster für miRNA29b.

Im Bereich der Herzklappen fanden sich im LDLR^{-/-} Schwein Ansammlungen von Makrophagen und smA-exprimierenden Zellen im Bereich der dem Blutfluss ausgesetzten Seite der Klappe. Genetisch fand sich eine erhöhte Expression von Galectin-3, sowie verminderte Expression von Kollagen Typ 3. Diese Ergebnisse ähneln stark Ergebnissen anderer Untersuchungen an menschlichen kalzifizierten Aortenklappenstenosen. Eine Grundlagenforschung der kalzifizierten Aortenklappenstenose als möglicherweise atherosklerotisch bedingte Erkrankung ist geboten und in ihrer initialen Phase der Genese am LDLR^{-/-} Yucatan-minipig möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass insbesondere das LDLR^{-/-} Yucatan-minipig als ein valides Modell zur Forschung am Formenkreis der atherosklerotisch bedingten Erkrankungen dienen kann. Die dargestellten Ergebnisse sollten jedoch nur als Beginn einer detaillierteren Untersuchung gesehen werden. Neben der fortgeschrittenen Forschung an der koronaren Herzkrankheit ist dabei insbesondere der Bedarf einer Grundlagenforschung der stenosierenden Herzklappenerkrankungen hervorzuheben.

8. Literaturverzeichnis

- Abonnenc, M., Nabeebaccus, A. A., Mayr, U., Barallobre-Barreiro, J., Dong, X., Cuello, F., Sur, S., Drozdov, I., Langley, S. R., Lu, R., Stathopoulou, K., Didangelos, A., Yin, X., Zimmermann, W.-H., Shah, A. M., Zampetaki, A. & Mayr, M. (2013). Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circulation research*, 113(10), 1138–1147. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302400>
- Agarwala, A., Billheimer, J. & Rader, D. J. (2013). Mighty minipig in fight against cardiovascular disease. *Science translational medicine*, 5(166), 166fs1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005369>
- Akram, O. N., Bernier, A., Petrides, F., Wong, G. & Lambert, G. (2010). Beyond LDL cholesterol, a new role for PCSK9. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(7), 1279–1281. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209007>
- Aksan, G., Gedikli, Ö., Keskin, K., Nar, G., İnci, S., Yıldız, S. S., Kaplan, Ö., Soylu, K., Kılıçkesmez, K. O. & Şahin, M. (2016). Is galectin-3 a biomarker, a player-or both-in the presence of coronary atherosclerosis? *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 64(3), 764–770. <https://doi.org/10.1136/jim-2015-000041>
- Alexander, M. R., Murgai, M., Moehle, C. W. & Owens, G. K. (2012). Interleukin-1 β modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF- κ B-dependent mechanisms. *Physiological genomics*, 44(7), 417–429. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00160.2011>
- Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A. & Bochaton-Piallat, M.-L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 114(4), 540–550. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy022>
- Al-Mashhadi, R. H [Rozh H.], Sørensen, C. B [Charlotte B.], Kragh, P. M., Christoffersen, C., Mortensen, M. B., Tolbod, L. P., Thim, T., Du, Y [Yutao], Li, J [Juan], Liu, Y [Ying], Moldt, B., Schmidt, M., Vajta, G., Larsen, T., Purup, S., Bolund, L., Nielsen, L. B., Callesen, H., Falk, E., . . . Bentzon, J. F [Jacob F.] (2013). Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Science translational medicine*, 5(166), 166ra1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004853>
- Amuzie, C., Swart, J. R., Rogers, C. S., Vihtelic, T., Denham, S. & Mais, D. E. (2016). A Translational Model for Diet-related Atherosclerosis: Effect of Statins on Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in a Minipig.

- Toxicologic pathology*, 44(3), 442–449.
<https://doi.org/10.1177/0192623315622304>
- Arangalage, D., Nguyen, V., Robert, T., Melissopoulou, M., Mathieu, T., Estellat, C., Codogno, I., Huart, V., Duval, X., Cimadevilla, C., Vahanian, A., Dehoux, M. & Messika-Zeitoun, D. (2016). Determinants and prognostic value of Galectin-3 in patients with aortic valve stenosis. *Heart (British Cardiac Society)*, 102(11), 862–868.
<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-308873>
- Arar, C., Gaudin, J.-C., Capron, L. & Legrand, A. (1998). Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Letters*, 430(3), 307–311.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00683-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00683-8)
- Arbustini, E., Grasso, M., Diegoli, M., Pucci, A., Bramerio, M., Ardissino, D., Angoli, L., Servi, S. de, Bramucci, E., Mussini, A., Minzioni, G., Vigano, M. & Specchia, G. (1991). Coronary atherosclerotic plaques with and without thrombus in ischemic heart syndromes: A morphologic, immunohistochemical, and biochemical study. *The American Journal of Cardiology*, 68(7), B36-B50. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90383-V](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90383-V)
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281–297.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Barter, P. J., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J. & Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 160–167.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.0000054658.91146.64>
- Bennett, M. R., Sinha, S [Sanjay] & Owens, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 692–702.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306361>
- Bentzon, J. F [Jacob F.], Weile, C., Sondergaard, C. S., Hindkjaer, J., Kassem, M. & Falk, E. (2006). Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(12), 2696–2702.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000247243.48542.9d>
- Bentzon, J. F [Jacob Fog] & Falk, E. (2010). Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Current opinion in lipidology*, 21(5), 434–440. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833ded6a>
- Bentzon, J. F [Jacob Fog], Otsuka, F., Virmani, R [Renu] & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research*, 114(12), 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>

- Blanda, V., Bracale, U. M., Di Taranto, M. D. & Fortunato, G. (2020). Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239232>
- BOHNSACK, M. T., CZAPLINSKI, K. & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Bonaventura, A., Montecucco, F., Dallegri, F., Carbone, F., Lüscher, T. F., Camici, G. G. & Liberale, L. (2019). Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 115(8), 1266–1285. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz084>
- Boon, R. A., Seeger, T., Heydt, S., Fischer, A., Hergenreider, E., Horrevoets, A. J. G., Vinciguerra, M., Rosenthal, N., Sciacca, S., Pilato, M., van Heijningen, P., Essers, J., Brandes, R. P., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2011). MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circulation research*, 109(10), 1115–1119. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255737>
- Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bossé, Y., Miqdad, A., Fournier, D., Pépin, A., Pibarot, P. & Mathieu, P. (2009). Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 2(5), 489–498. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.820795>
- Boudoulas, K. D., Wolfe, B., Ravi, Y., Lilly, S., Nagaraja, H. N. & Sai-Sudhakar, C. B. (2015). The aortic stenosis complex: aortic valve, atherosclerosis, aortopathy. *Journal of cardiology*, 65(5), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2014.12.021>
- Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A. & Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *The Journal of clinical investigation*, 97(7), 1715–1722. <https://doi.org/10.1172/JCI118598>
- Braun, A., Trigatti, B. L., Post, M. J., Sato, K., Simons, M., Edelberg, J. M., Rosenberg, R. D., Schrenzel, M. & Krieger, M. (2002). Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation research*, 90(3), 270–276. <https://doi.org/10.1161/hh0302.104462>

- Burke, A. C., Telford, D. E., Sutherland, B. G., Edwards, J. Y., Sawyez, C. G., Barrett, P. H. R., Newton, R. S., Pickering, J. G. & Huff, M. W. (2018). Bempedoic Acid Lowers Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Attenuates Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient (LDLR+/- and LDLR-/-) Yucatan Miniature Pigs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38(5), 1178–1190. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310676>
- Cai, Y. & Li, Y [Yunpeng] (2019). Upregulation of miR-29b-3p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting TRAF5. *Cellular & molecular biology letters*, 24, 27. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0151-3>
- Cannataro, R. & Cione, E. (2023). miRNA as Drug: Antagomir and Beyond. *Current pharmaceutical design*, 29(6), 462–465. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230220123150>
- Chen, K.-C., Liao, Y.-C., Hsieh, I.-C., Wang, Y.-S., Hu, C.-Y. & Juo, S.-H. H. (2012). OxLDL causes both epigenetic modification and signaling regulation on the microRNA-29b gene: novel mechanisms for cardiovascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(3), 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.12.005>
- Chen, K.-C., Wang, Y.-S., Hu, C.-Y., Chang, W.-C., Liao, Y.-C., Dai, C.-Y. & Juo, S.-H. H. (2011). OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(5), 1718–1728. <https://doi.org/10.1096/fj.10-174904>
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V. & Orekhov, A. N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(1), 17–28. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12689>
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95(11), 1153–1165. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8>
- Churov, A., Summerhill, V., Grechko, A., Orekhova, V. & Orekhov, A. (2019). MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225547>
- Collins, T. & Cybulsky, M. I. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *The Journal of clinical investigation*, 107(3), 255–264. <https://doi.org/10.1172/JCI10373>
- Costa, M. C., Leitão, A. L. & Enguita, F. J. (2012). Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of

- structural biology. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10268–10295. <https://doi.org/10.3390/ijms130810268>
- Cunningham, K. S. & Gotlieb, A. I. (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(1), 9–23. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700215>
- Cushing, L., Kuang, P. P., Qian, J., Shao, F., Wu, J., Little, F., Thannickal, V. J., Cardoso, W. V. & Lü, J. (2011). miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(2), 287–294. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0323OC>
- Davies, M. J. (1997). The composition of coronary-artery plaques. *The New England journal of medicine*, 336(18), 1312–1314. <https://doi.org/10.1056/NEJM199705013361809>
- Davis, B. T., Wang, X.-J., Rohret, J. A., Struzynski, J. T., Merricks, E. P., Bellinger, D. A., Rohret, F. A., Nichols, T. C. & Rogers, C. S. (2014). Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs. *PloS one*, 9(4), e93457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093457>
- Deng, Z., He, Y [Yongjing], Yang, X., Shi, H., Shi, A., Lu, L. & Li He (2017). MicroRNA-29: A Crucial Player in Fibrotic Disease. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 21(3), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0253-9>
- Di Gregoli, K., Jenkins, N., Salter, R., White, S., Newby, A. C. & Johnson, J. L. (2014). MicroRNA-24 regulates macrophage behavior and retards atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(9), 1990–2000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304088>
- Di Gregoli, K., Somerville, M., Bianco, R., Thomas, A. C., Frankow, A., Newby, A. C., George, S. J., Jackson, C. L. & Johnson, J. L. (2020). Galectin-3 Identifies a Subset of Macrophages With a Potential Beneficial Role in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 40(6), 1491–1509. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314252>
- Diederichs, S., Jung, S., Rothenberg, S. M., Smolen, G. A., Mlody, B. G. & Haber, D. A. (2008). Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27), 9284–9289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800803105>
- Dong, R., Zhang, M., Hu, Q., Zheng, S., Soh, A., Zheng, Y [Yijie] & Yuan, H. (2018). Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *International journal of molecular medicine*, 41(2), 599–614. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3311>

- Du, Y [Yaoyao], Gao, C., Liu, Z [Ziyi], Li Wang, Liu, B., He, F., Zhang, T., Wang, Y [Yue], Wang, X [Xiujie], Xu, M., Luo, G.-Z., Zhu, Y., Xu, Q., Wang, X [Xian] & Kong, W. (2012). Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(11), 2580–2588.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300206>
- Dubland, J. A. & Francis, G. A. (2016). So Much Cholesterol: the unrecognized importance of smooth muscle cells in atherosclerotic foam cell formation. *Current opinion in lipidology*, 27(2), 155–161.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000279>
- Eken, S. M., Jin, H [Hong], Chernogubova, E., Li, Y [Yuhuang], Simon, N., Sun, C., Korzunowicz, G., Busch, A., Bäcklund, A., Österholm, C., Razuvaev, A., Renné, T., Eckstein, H. H., Pelisek, J., Eriksson, P., González Díez, M., Perisic Matic, L., Schellinger, I. N., Raaz, U., . . . Maegdefessel, L [Lars] (2017). MicroRNA-210 Enhances Fibrous Cap Stability in Advanced Atherosclerotic Lesions. *Circulation research*, 120(4), 633–644. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309318>
- Emeni Veseli, B., Perrotta, P., Meyer, G. R. A. de, Roth, L., van der Donckt, C., Martinet, W. & Meyer, G. R. Y. de (2017). Animal models of atherosclerosis. *European journal of pharmacology*, 816, 3–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>
- Eriksen, H. A., Satta, J., Risteli, J., Veijola, M., Väre, P. & Soini, Y. (2006). Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*, 91–98.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.034>
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B. A., Freier, S., Bennett, C. F., Bhanot, S. & Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism*, 3(2), 87–98.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>
- Falcone, C., Lucibello, S., Mazzucchelli, I., Bozzini, S., D'Angelo, A., Schirinzi, S., Totaro, R., Falcone, R., Bondesan, M. & Pelissero, G. (2011). Galectin-3 plasma levels and coronary artery disease: a new possible biomarker of acute coronary syndrome. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 24(4), 905–913.
<https://doi.org/10.1177/039463201102400409>
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8 Suppl), C7-12.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>

- Fan, X., Wang, E., Wang, X [Xianyun], Cong, X. & Chen, X. (2014). MicroRNA-21 is a unique signature associated with coronary plaque instability in humans by regulating matrix metalloproteinase-9 via reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Experimental and molecular pathology*, 96(2), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.02.009>
- Fasolo, F., Di Gregoli, K., Maegdefessel, L [Lars] & Johnson, J. L. (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 115(12), 1732–1756. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz203>
- Feil, S., Fehrenbacher, B., Lukowski, R., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Schaller, M. & Feil, R. (2014). Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circulation research*, 115(7), 662–667. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304634>
- Fiedler, J. & Thum, T. (2013). MicroRNAs in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(2), 201–205. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300137>
- Forte, A., Bancone, C., Cipollaro, M., Feo, M. de & Della Corte, A. (2018). Ascending aortas from heart donors and CABG patients are not equivalent as control in aortopathy studies. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, 52(5), 281–286. <https://doi.org/10.1080/14017431.2018.1494303>
- Fuster, J. J., Castillo, A. I., Zaragoza, C., Ibáñez, B. & Andrés, V. (2012). Animal models of atherosclerosis. *Progress in molecular biology and translational science*, 105, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00001-9>
- Gallant-Behm, C. L., Piper, J., Lynch, J. M., Seto, A. G., Hong, S. J., Mustoe, T. A., Maari, C., Pestano, L. A., Dalby, C. M., Jackson, A. L., Rubin, P. & Marshall, W. S. (2019). A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *The Journal of investigative dermatology*, 139(5), 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.007>
- Gao, Z., Liu, Z [Zhongni], Wang, R [Rui], Zheng, Y [Yinghong], Li, H. & Yang, L. (2020). Galectin-3 Is a Potential Mediator for Atherosclerosis. *Journal of Immunology Research*, 2020, 5284728. <https://doi.org/10.1155/2020/5284728>
- Gerrity, R. G., Natarajan, R., Nadler, J. L. & Kimsey, T. (2001). Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes*, 50(7), 1654–1665. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.7.1654>
- Getz, G. S. & Reardon, C. A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S156-61. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800058-JLR200>

- Getz, G. S. & Reardon, C. A. (2012). Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(5), 1104–1115. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.237693>
- Getz, G. S. & Reardon, C. A. (2015). Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1339, 1–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2929-0_1
- Gimbrone, M. A. & García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 620–636. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
- Giunzioni, I., Tavori, H., Covarrubias, R., Major, A. S., Ding, L., Zhang, Y [Youmin], DeVay, R. M., Hong, L., Fan, D., Predazzi, I. M., Rashid, S., Linton, M. F. & Fazio, S. (2016). Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion. *The Journal of pathology*, 238(1), 52–62. <https://doi.org/10.1002/path.4630>
- Goody, P. R., Hosen, M. R., Christmann, D., Niepmann, S. T., Zietzer, A., Adam, M., Bönner, F., Zimmer, S., Nickenig, G. & Jansen, F. (2020). Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 40(4), 885–900. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313067>
- Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E. & Busch, M. A. (2013). Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 650–655. <https://doi.org/10.1007/s00103-013-1666-9>
- GOTTLIEB, H. & LALICH, J. J. (1954). The occurrence of arteriosclerosis in the aorta of swine. *The American Journal of Pathology*, 30(4), 851–855.
- Hajibabaie, F., Kouhpayeh, S., Mirian, M., Rahimmanesh, I., Boshtam, M., Sadeghian, L., Gheibi, A., Khanahmad, H. & Shariati, L. (2020). MicroRNAs as the actors in the atherosclerosis scenario. *Journal of physiology and biochemistry*, 76(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00710-7>
- Hamamdžić, D. & Wilensky, R. L. (2013). Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Journal of diabetes research*, 2013, 761415. <https://doi.org/10.1155/2013/761415>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H [Kyu-Hyun], Kim, Y.-K., Jin, H [Hua] & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.

- Genes & development*, 18(24), 3016–3027.
<https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H [Kyu-Hyeon], Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B.-T. & Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), 887–901.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>
- Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H [Kyu-Hyeon], Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R. & Kim, V. N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.053>
- Hasler-Rapacz, J., Ellegren, H., Fridolfsson, A. K., Kirkpatrick, B., Kirk, S., Andersson, L. & Rapacz, J. (1998). Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *American journal of medical genetics*, 76(5), 379–386.
- He, Y [Yong], Huang, C., Lin, X. & Li, J [Jun] (2013). MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie*, 95(7), 1355–1359. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.03.010>
- Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K. A. & Kovanen, P. T. (2007). Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Current opinion in lipidology*, 18(5), 483–491.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282a66099>
- Herpel, E., Pritsch, M., Koch, A., Dengler, T. J., Schirmacher, P. & Schnabel, P. A. (2006). Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology*, 48(6), 736–747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02398.x>
- Herrero-Fernandez, B., Gomez-Bris, R., Somovilla-Crespo, B. & Gonzalez-Granado, J. M. (2019). Immunobiology of Atherosclerosis: A Complex Net of Interactions. *International journal of molecular sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215293>
- Ho, P. T. B., Clark, I. M. & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
- Honda, S., Miyamoto, T., Watanabe, T., Narumi, T., Kadowaki, S., Honda, Y., Otaki, Y., Hasegawa, H., Netsu, S., Funayama, A., Ishino, M., Nishiyama, S., Takahashi, H., Arimoto, T., Shishido, T., Miyashita, T. & Kubota, I. (2014). A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(2), 270–278. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302610>

- Horton, J. D., Cohen, J. C. & Hobbs, H. H. (2009). PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S172-7. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800091-JLR200>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Hryhorowicz, S., Nowak-Terpiłowska, A., Ryzek, N. & Zeyland, J. (2020). Application of Genetically Engineered Pigs in Biomedical Research. *Genes*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/genes11060670>
- Hu, W., Polinsky, P., Sadoun, E., Rosenfeld, M. E [Michael E.] & Schwartz, S. M [Stephen M.] (2005). Atherosclerotic lesions in the common coronary arteries of ApoE knockout mice. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 14(3), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.02.004>
- Huang, Y.-Q., Li, J [Jie], Chen, J.-Y., Zhou, Y.-L., Cai, A.-P., Huang, C. & Feng, Y.-Q. (2017). The Association of Circulating MiR-29b and Interleukin-6 with Subclinical Atherosclerosis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 44(4), 1537–1544. <https://doi.org/10.1159/000485649>
- Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. (2019). Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC. Basic to translational science*, 4(3), 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.02.006>
- Huntzinger, E., Kuzuoglu-Öztürk, D., Braun, J. E., Eulalio, A., Wohlbold, L. & Izaurralde, E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic acids research*, 41(2), 978–994. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1078>
- Hutson, H. N., Marohl, T., Anderson, M., Eliceiri, K., Campagnola, P. & Masters, K. S. (2016). Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture. *PloS one*, e0163858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163858>
- Iacobini, C., Menini, S., Ricci, C., Scipioni, A., Sansoni, V., Cordone, S., Taurino, M., Serino, M., Marano, G., Federici, M., Pricci, F. & Pugliese, G. (2009). Accelerated lipid-induced atherogenesis in galectin-3-deficient mice: role of lipoxidation via receptor-mediated mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 831–836. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186791>
- Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E. & Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation*, 92(2), 883–893. <https://doi.org/10.1172/JCI116663>

- James R. Turk & M. Harold Laughlin. Physical Activity and Atherosclerosis: Which Animal Model?
- Jawień, J., Nastalek, P. & Korb, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 55(3), 503–517.
- Kapourchali, F. R., Surendiran, G., Li Chen, Uitz, E., Bahadori, B. & Moghadasian, M. H [Mohammed H.] (2014). Animal models of atherosclerosis. *World journal of clinical cases*, 2(5), 126–132. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i5.126>
- Kliver, J., Gibcus, J. H., Heting, C., Adema, A., Richter, M. K. S., Halsema, N., Slezak-Prochazka, I., Ding, Y., Kroesen, B.-J. & van den Berg, A. (2012). Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PloS one*, 7(1), e29275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029275>
- Knowles, J. W. & Maeda, N. (2000). Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(11), 2336–2345. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.11.2336>
- Kong, C. H., Lin, X. Y., Woo, C. C., Wong, H. C., Lee, C. N., Richards, A. M. & Sorokin, V. A. (2013). Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 11–15. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivs421>
- Kuivaniemi, H. & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene*, 707, 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>
- Lacey, M., Baribault, C., Ehrlich, K. C. & Ehrlich, M. (2019). Atherosclerosis-associated differentially methylated regions can reflect the disease phenotype and are often at enhancers. *Atherosclerosis*, 280, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.11.031>
- Laffont, B. & Rayner, K. J. (2017). MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis. *The Canadian journal of cardiology*, 33(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.001>
- Lafuse, W. P., Wozniak, D. J. & Rajaram, M. V. S. (2020). Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cells10010051>
- Landmesser, U., Hornig, B. & Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, 109(21 Suppl 1), II27-33. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f>
- Lee, J [Jiyun], Lim, S., Song, B.-W., Cha, M.-J., Ham, O., Lee, S.-Y., Lee, C., Park, J.-H., Bae, Y., Seo, H.-H., Seung, M., Choi, E. & Hwang, K.-C. (2015). MicroRNA-29b inhibits migration and proliferation of vascular

- smooth muscle cells in neointimal formation. *Journal of cellular biochemistry*, 116(4), 598–608. <https://doi.org/10.1002/jcb.25011>
- Lee, Y. T., Laxton, V., Lin, H. Y., Chan, Y. W. F., Fitzgerald-Smith, S., To, T. L. O., Yan, B. P., Liu, T. & Tse, G. (2017). Animal models of atherosclerosis. *Biomedical reports*, 6(3), 259–266. <https://doi.org/10.3892/br.2017.843>
- Lee, Y. T., Lin, H. Y., Chan, Y. W. F., Li, K. H. C., To, O. T. L., Yan, B. P., Liu, T., Li, G., Wong, W. T., Keung, W. & Tse, G. (2017). Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in health and disease*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0402-5>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J [Junho], Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H [Kyu-Hyun], Lee, S., Baek, S. H. & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Leeper, N. J. & Maegdefessel, L [Lars] (2018). Non-coding RNAs: key regulators of smooth muscle cell fate in vascular disease. *Cardiovascular research*, 114(4), 611–621. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx249>
- Leong, X.-F., Ng, C.-Y. & Jaarin, K. (2015). Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *BioMed research international*, 2015, 528757. <https://doi.org/10.1155/2015/528757>
- Li, Y.-B., Zhang, Q.-H., Chen, Z., He, Z.-J. & Yi, G.-H. (2015). Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/Ca(2+)/PKC- β signal in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(1-2), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.079>
- Li, Y [Yuhuang] & Maegdefessel, L [Lars] (2016). My heart will go on-beneficial effects of anti-MiR-30 after myocardial infarction. *Annals of translational medicine*, 4(7), 144. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.03.12>
- Libby, P. (2013). Collagenases and cracks in the plaque. *The Journal of clinical investigation*, 123(8), 3201–3203. <https://doi.org/10.1172/JCI67526>
- Liu, X [Xu], Yu, Z., Daitoku, K., Fukuda, I., Motomura, S., Matsumiya, T., Imaizumi, T., Furukawa, K.-I. & Seya, K. (2021). Human aortic valve interstitial cells obtained from patients with aortic valve stenosis are vascular endothelial growth factor receptor 2 positive and contribute to ectopic calcification. *Journal of pharmacological sciences*, 145(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.12.002>

- Liu, Y [Yunhao], Collins, C., Kiosses, W. B., Murray, A. M., Joshi, M., Shepherd, T. R., Fuentes, E. J. & Tzima, E. (2013). A novel pathway spatiotemporally activates Rac1 and redox signaling in response to fluid shear stress. *The Journal of cell biology*, 201(6), 863–873.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201207115>
- Liu, Y.-H., D'Ambrosio, M., Liao, T., Peng, H., Rhaleb, N.-E., Sharma, U., André, S., Gabius, H.-J. & Carretero, O. A. (2009). N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(2), H404-12. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00747.2008>
- London, B. (2001). Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 12(9), 1089–1091.
<https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2001.01089.x>
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, N., Steer, B. M., Ingram, A. J., Gupta, M., Al-Omran, M., Teoh, H., Marsden, P. A. & Verma, S. (2012). MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation*, 126(11 Suppl 1), S81-90.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084186>
- Lu, F., Wu, H., Bai, Y., Gong, D., Xia, C., Li, Q. & Xu, Z. (2018). Evidence of Osteogenic Regulation in Calcific Porcine Aortic Valves. *The heart surgery forum*, 21(5), E375-E381. <https://doi.org/10.1532/hcf.2033>
- Lunney, J. K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *International journal of biological sciences*, 3(3), 179–184.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.3.179>
- Lv, Y.-C., Tang, Y.-Y., Peng, J., Zhao, G.-J., Yang, J., Yao, F., Ouyang, X.-P., He, P.-P., Xie, W., Tan, Y.-L., Zhang, M., Liu, D [Dan], Tang, D.-P., Cayabyab, F. S., Zheng, X.-L., Zhang, D.-W., Tian, G.-P. & Tang, C.-K. (2014). MicroRNA-19b promotes macrophage cholesterol accumulation and aortic atherosclerosis by targeting ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis*, 236(1), 215–226.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.07.005>
- Ma, F., Xu, S., Liu, X [Xingguang], Zhang, Q., Xu, X [Xiongfei], Liu, M., Hua, M., Li, N., Yao, H. & Cao, X. (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nature immunology*, 12(9), 861–869.
<https://doi.org/10.1038/ni.2073>
- MacKinnon, A. C., Liu, X [Xiaojun], Hadoke, P. W., Miller, M. R., Newby, D. E. & Sethi, T. (2013). Inhibition of galectin-3 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Glycobiology*, 23(6), 654–663.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwt006>

- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V. & Doudna, J. A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 512–517. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710869105>
- Maegdefessel, L [L.] (2014). The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *Journal of internal medicine*, 276(6), 633–644. <https://doi.org/10.1111/joim.12298>
- Maegdefessel, L [Lars], Azuma, J., Toh, R., Merk, D. R., Deng, A., Chin, J. T., Raaz, U., Schoelmerich, A. M., Raiesdana, A., Leeper, N. J., McConnell, M. V., Dalman, R. L., Spin, J. M. & Tsao, P. S. (2012). Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *The Journal of clinical investigation*, 122(2), 497–506. <https://doi.org/10.1172/JCI61598>
- Maegdefessel, L [Lars], Azuma, J. & Tsao, P. S. (2014). MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development. *Trends in cardiovascular medicine*, 24(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2013.05.002>
- Maegdefessel, L [Lars], Rayner, K. J. & Leeper, N. J. (2015). MicroRNA regulation of vascular smooth muscle function and phenotype: early career committee contribution. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(1), 2–6. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304877>
- Manon-Jensen, T., Kjeld, N. G. & Karsdal, M. A. (2016). Collagen-mediated hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 14(3), 438–448. <https://doi.org/10.1111/jth.13249>
- Maruyama, K. & Imanaka-Yoshida, K. (2022). The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *International journal of molecular sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052617>
- Matsuyama, H. & Suzuki, H. I. (2019). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R. E., Michel, B. A., Distler, J. H. W., Gay, S. & Distler, O. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*, 62(6), 1733–1743. <https://doi.org/10.1002/art.27443>
- Menini, S., Iacobini, C., Ricci, C., Blasetti Fantauzzi, C., Salvi, L., Pesce, C. M., Relucanti, M., Familiari, G., Taurino, M. & Pugliese, G. (2013). The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 100(3), 472–480. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt206>
- Mestas, J. & Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology*

- (*Baltimore, Md.* : 1950), 172(5), 2731–2738.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Millon, A., Canet-Soulas, E., Boussel, L., Fayad, Z. & Douek, P. (2014). Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. *Vascular*, 22(3), 221–237.
<https://doi.org/10.1177/1708538113478758>
- Miura, K. & Katoh, H. (2016). Structural and Histochemical Alterations in the Aortic Valves of Elderly Patients: A Comparative Study of Aortic Stenosis, Aortic Regurgitation, and Normal Valves. *BioMed research international*, 2016, 6125204. <https://doi.org/10.1155/2016/6125204>
- Moghadasian, M. H [M. H.], Frohlich, J. J. & McManus, B. M. (2001). Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 81(9), 1173–1183. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780331>
- Mott, J. L., Kurita, S., Cazanave, S. C., Bronk, S. F., Werneburg, N. W. & Fernandez-Zapico, M. E. (2010). Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *Journal of cellular biochemistry*, 110(5), 1155–1164.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22630>
- Mousavi, S. A., Berge, K. E. & Leren, T. P. (2009). The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis. *Journal of internal medicine*, 266(6), 507–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02167.x>
- Murata, K., Motayama, T. & Kotake, C. (1986). Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*, 60(3), 251–262. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(86\)90172-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(86)90172-3)
- Mushenkova, N. V., Summerhill, V. I., Silaeva, Y. Y [Yulia Yu], Deykin, A. V [Alexey V.] & Orekhov, A. N. (2019). Modelling of atherosclerosis in genetically modified animals. *American Journal of Translational Research*, 11(8), 4614–4633.
- Nachtigal, M., Al-Assaad, Z., Mayer, E. P., Kim, K. & Monsigny, M. (1998). Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *The American Journal of Pathology*, 152(5), 1199–1208.
- Nakashima, Y., Plump, A. S [A. S.], Raines, E. W., Breslow, J. L [J. L.] & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology*, 14(1), 133–140.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.14.1.133>
- Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Noels, H., Akhtar, S., Zhou, Z., Koenen, R. R., Heyll, K., Gremse, F., Kiessling, F., Grommes, J., Weber, C. & Schober, A. (2012). MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by

- repressing Bcl6 in macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 122(11), 4190–4202. <https://doi.org/10.1172/JCI61716>
- Neeb, Z. P., Edwards, J. M., Alloosh, M., Long, X [Xin], Mokolke, E. A. & Sturek, M. (20). Metabolic Syndrome and Coronary Artery Disease in Ossabaw Compared with Yucatan Swine. *Comparative Medicine*, 60(4), 300–315.
- Ngo, D. T., Stafford, I., Sverdlov, A. L., Qi, W., Wuttke, R. D., Zhang, Y [Yuan], Kelly, D. J., Weedon, H., Smith, M. D., Kennedy, J. A. & Horowitz, J. D. (2011). Ramipril retards development of aortic valve stenosis in a rabbit model: mechanistic considerations. *British journal of pharmacology*, 162(3), 722–732. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01084.x>
- Niepmann, S. T., Steffen, E., Zietzer, A., Adam, M., Nordsiek, J., Gyamfi-Poku, I., Piayda, K., Sinning, J.-M., Baldus, S., Kelm, M., Nickenig, G., Zimmer, S. & Quast, C. (2019). Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 108(8), 847–856. <https://doi.org/10.1007/s00392-019-01413-1>
- Nofer, J.-R. & van Eck, M. (2011). HDL scavenger receptor class B type I and platelet function. *Current opinion in lipidology*, 22(4), 277–282. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32834701de>
- Nsaibia, M. J., Boulanger, M.-C., Bouchareb, R., Mkannez, G., Le Quang, K., Hadji, F., Argaud, D., Dahou, A., Bossé, Y., Koschinsky, M. L., Pibarot, P., Arsenault, B. J., Marette, A. & Mathieu, P. (2017). OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF-κB pathway. *Cardiovascular research*, 113(11), 1351–1363. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx089>
- O'Brien, K. D [K. D.], Reichenbach, D. D., Marcovina, S. M., Kuusisto, J., Alpers, C. E. & Otto, C. M [C. M.] (1996). Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(4), 523–532. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.4.523>
- Oishi, Y. & Manabe, I. (2016). Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 2, 16018. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.18>
- O'Reilly, S. (2016). MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis research & therapy*, 18, 11. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0929-x>
- Papaspyridonos, M., McNeill, E., Bono, J. P. de, Smith, A., Burnand, K. G., Channon, K. M. & Greaves, D. R. (2008). Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arteriosclerosis, thrombosis,*

- and vascular biology, 28(3), 433–440.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159160>
- Pedrigi, R. M., Poulsen, C. B [Christian Bo], Mehta, V. V., Ramsing Holm, N., Pareek, N., Post, A. L., Kilic, I. D [Ismail Dogu], Banya, W. A. S., Dall'Ara, G., Mattesini, A., Bjørklund, M. M., Andersen, N. P., Grøndal, A. K., Petretto, E., Foin, N., Davies, J. E., Di Mario, C., Fog Bentzon, J., Erik Bøtker, H., . . . Silva, R. de (2015). Inducing Persistent Flow Disturbances Accelerates Atherogenesis and Promotes Thin Cap Fibroatheroma Development in D374Y-PCSK9 Hypercholesterolemic Minipigs. *Circulation*, 132(11), 1003–1012.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016270>
- Perron, M. P. & Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 2537–2547. <https://doi.org/10.2741/2865>
- Piao, X., Zhang, X., Wu, L. & Belasco, J. G. (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Molecular and cellular biology*, 30(6), 1486–1494.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01481-09>
- Plump, A. S [Andrew S.], Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M. & Breslow, J. L [Jan L.] (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343–353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-g)
- Porras, A. M., Shanmuganayagam, D., Meudt, J. J., Krueger, C. G., Hacker, T. A., Rahko, P. S., Reed, J. D. & Masters, K. S. (2015). Development of Aortic Valve Disease in Familial Hypercholesterolemic Swine: Implications for Elucidating Disease Etiology. *Journal of the American Heart Association*, 4(10), e002254.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002254>
- Poulsen, C. B [Christian B.], Pedrigi, R. M., Pareek, N., Kilic, I. D [Ismail D.], Holm, N. R., Bentzon, J. F [Jacob F.], Bøtker, H. E., Falk, E., Krams, R. & Silva, R. de (2018). Plaque burden influences accurate classification of fibrous cap atheroma by in vivo optical coherence tomography in a porcine model of advanced coronary atherosclerosis. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*, 14(10), 1129–1135. <https://doi.org/10.4244/EIJ-D-17-01028>
- Poznyak, A. V., Silaeva, Y. Y [Y. Y.], Orekhov, A. N [A. N.] & Deykin, A. V [A. V.] (2020). Animal models of human atherosclerosis: current progress. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 53(6), e9557.
<https://doi.org/10.1590/1414-431x20209557>

- Prescott, M. F., Hasler-Rapacz, J., Linden-Reed, J. von & Rapacz, J. (1995). Familial hypercholesterolemia associated with coronary atherosclerosis in swine bearing different alleles for apolipoprotein B. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 748, 283-92; discussion 292-3. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb17326.x>
- Prescott, M. F., McBride, C. H., Hasler-Rapacz, J., Linden, J. von & Rapacz, J. (1991). Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *The American Journal of Pathology*, 139(1), 139–147.
- Priyadharsini, R. P. (2015). Animal models to evaluate anti-atherosclerotic drugs. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(4), 329–340. <https://doi.org/10.1111/fcp.12130>
- Rajamannan, N. M., Evans, F. J., Aikawa, E., Grande-Allen, K. J., Demer, L. L., Heistad, D. D., Simmons, C. A., Masters, K. S., Mathieu, P., O'Brien, K. D [Kevin D.], Schoen, F. J., Towler, D. A., Yoganathan, A. P. & Otto, C. M [Catherine M.] (2011). Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*, 124(16), 1783–1791. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767>
- Rayner, K. J., Sheedy, F. J., Esau, C. C., Hussain, F. N., Temel, R. E., Parathath, S., van Gils, J. M., Rayner, A. J., Chang, A. N., Suarez, Y., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E. A. & Moore, K. J [Kathryn J.] (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2921–2931. <https://doi.org/10.1172/JCI57275>
- Redgrave, J. N. E., Lovett, J. K., Gallagher, P. J. & Rothwell, P. M. (2006). Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation*, 113(19), 2320–2328. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.589044>
- Reimann, C., Brangsch, J., Colletini, F., Walter, T., Hamm, B., Botnar, R. M. & Makowski, M. R. (2017). Molecular imaging of the extracellular matrix in the context of atherosclerosis. *Advanced drug delivery reviews*, 113, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.09.005>
- Roderburg, C., Urban, G.-W., Bettermann, K., Vucur, M., Zimmermann, H., Schmidt, S., Janssen, J., Koppe, C., Knolle, P., Castoldi, M., Tacke, F., Trautwein, C. & Luedde, T. (2011). Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(1), 209–218. <https://doi.org/10.1002/hep.23922>

- Roy, S., Khanna, S., Hussain, S.-R. A., Biswas, S., Azad, A., Rink, C., Gnyawali, S., Shilo, S., Nuovo, G. J. & Sen, C. K. (2009). MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovascular research*, 82(1), 21–29. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp015>
- Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>
- Sádaba, J. R., Martínez-Martínez, E., Arrieta, V., Álvarez, V., Fernández-Celis, A., Ibarrola, J., Melero, A., Rossignol, P., Cachofeiro, V. & López-Andrés, N. (2016). Role for Galectin-3 in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Journal of the American Heart Association*, 5(11). <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004360>
- Saigusa, R., Winkels, H. & Ley, K. (2020). T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*, 17(7), 387–401. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0352-5>
- Salmon, M., Gomez, D., Greene, E., Shankman, L. & Owens, G. K. (2012). Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22 α promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circulation research*, 111(6), 685–696. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269811>
- Sanchis-Gomar, F., Perez-Quilis, C., Leischik, R. & Lucia, A. (2016). Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Annals of translational medicine*, 4(13), 256. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.06.33>
- Sathyamurthy, I. & Alex, S. (2015). Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian heart journal*, 67(5), 503–506. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2015.07.033>
- Schäfer, S. & Zernecke, A. (2020). CD8⁺ T Cells in Atherosclerosis. *Cells*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cells10010037>
- Schindler, E. I., Szymanski, J. J., Hock, K. G., Geltman, E. M. & Scott, M. G. (2016). Short- and Long-term Biologic Variability of Galectin-3 and Other Cardiac Biomarkers in Patients with Stable Heart Failure and Healthy Adults. *Clinical chemistry*, 62(2), 360–366. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.246553>
- Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., Swiatlowska, P., Newman, A. A. C., Greene, E. S., Straub, A. C., Isakson, B., Randolph, G. J. & Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine*, 21(6), 628–637. <https://doi.org/10.1038/nm.3866>

- Sharma, U. C., Pokharel, S., van Brakel, T. J., van Berlo, J. H., Cleutjens, J. P. M., Schroen, B., André, S., Crijns, H. J. G. M., Gabius, H.-J., Maessen, J. & Pinto, Y. M. (2004). Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*, 110(19), 3121–3128. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147181.65298.4D>
- Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Idelson, G. L., Koteliensky, V. E. & Rukosuev, V. S. (1987). Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis*, 67(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90259-0](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90259-0)
- Shen, Y., Shen, Z., Miao, L., Xin, X., Lin, S., Zhu, Y [Yichun], Guo, W. & Zhu, Y. Z. (2015). miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine- γ -lyase expression. *Antioxidants & redox signaling*, 22(3), 224–240. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5909>
- Shi, J., Yang, Y [Yi], Cheng, A., Xu, G. & He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 319(3), H613-H631. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00220.2020>
- Shim, J [J.], Al-Mashhadi, R. H [R. H.], Sørensen, C. B [C. B.] & Bentzon, J. F [J. F.] (2016). Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. *The Journal of pathology*, 238(2), 257–266. <https://doi.org/10.1002/path.4646>
- Shim, J [Jeong], Poulsen, C. B [Christian Bo], Hagensen, M. K., Larsen, T., Heegaard, P. M. H., Christoffersen, C., Bolund, L., Schmidt, M., Liu, Y [Ying], Li, J [Juan], Li, R., Callesen, H., Bentzon, J. F [Jacob F.] & Sørensen, C. B [Charlotte B.] (2017). Apolipoprotein E Deficiency Increases Remnant Lipoproteins and Accelerates Progressive Atherosclerosis, But Not Xanthoma Formation, in Gene-Modified Minipigs. *JACC. Basic to translational science*, 2(5), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.06.004>
- Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. (2017). The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(1), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.006>
- Sider, K. L., Blaser, M. C. & Simmons, C. A. (2011). Animal models of calcific aortic valve disease. *International Journal of Inflammation*, 2011, 364310. <https://doi.org/10.4061/2011/364310>
- Silva, H. V. de, Más-Oliva, J., Taylor, J. M. & Mahley, R. W. (1994). Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins,

- apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. *Journal of lipid research*, 35(7), 1297–1310.
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A. & Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nature reviews. Cardiology*, 17(6), 327–340. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0326-7>
- Simonson, B. & Das, S. (2015). MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(6), 467–474. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150324123208>
- Skold, B. H., Getty, R. & Ramsey, F. K. (1966). Spontaneous atherosclerosis in the arterial system of aging swine. *American journal of veterinary research*, 27(116), 257–273.
- Smith, J. D., James, D., Dansky, H. M., Wittkowski, K. M., Moore, K. J [Karen J.] & Breslow, J. L [Jan L.] (2003). In silico quantitative trait locus map for atherosclerosis susceptibility in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(1), 117–122. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000047461.18902.80>
- Soh, J., Iqbal, J., Queiroz, J., Fernandez-Hernando, C. & Hussain, M. M. (2013). MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nature medicine*, 19(7), 892–900. <https://doi.org/10.1038/nm.3200>
- Souza, R. R. de (2002). Aging of myocardial collagen. *Biogerontology*, 3(6), 325–335. <https://doi.org/10.1023/a:1021312027486>
- Sary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E [M. E.], Schwartz, C. J., Wagner, W. D. & Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(9), 1512–1531. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.9.1512>
- Sary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E [M. E.], Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. & Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462–2478. <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.5.2462>
- Stavast, C. J. & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
- Steinberg, D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S376-81. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200>

- Sturek, M., Alloosh, M. & Sellke, F. W. (2020). Swine Disease Models for Optimal Vascular Engineering. *Annual review of biomedical engineering*, 22, 25–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-082919-053009>
- Suárez, Y. & Fernández-Hernando, C. (2012). New insights into microRNA-29 regulation: a new key player in cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(3), 584–586. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.01.009>
- Suárez, Y., Wang, C [Chen], Manes, T. D. & Pober, J. S. (2010). Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(1), 21–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902369>
- Sun, X., Icli, B., Wara, A. K., Belkin, N., He, S., Kobzik, L., Hunninghake, G. M., Vera, M. P., Blackwell, T. S., Baron, R. M. & Feinberg, M. W. (2012). MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 122(6), 1973–1990. <https://doi.org/10.1172/JCI61495>
- Sun, Z., Wang, Z., Li, L., Yan, J., Shao, C., Bao, Z., Jing, L., Pang, Q., Geng, Y. & Zhang, L. (2019). RAGE/galectin-3 yields intraplaque calcification transformation via sortilin. *Acta diabetologica*, 56(4), 457–472. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1273-1>
- Suo, J., Ferrara, D. E., Sorescu, D., Guldborg, R. E., Taylor, W. R. & Giddens, D. P. (2007). Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(2), 346–351. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253492.45717.46>
- Suthahar, N., Meijers, W. C., Silljé, H. H., Ho, J. E., Liu, F.-T. & Boer, R. A. de (2018). Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics*, 8(3), 593–609. <https://doi.org/10.7150/thno.22196>
- Suzuki, H. I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K. & Miyazono, K. (2015). Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nature structural & molecular biology*, 22(7), 512–521. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3050>
- Tabas, I., García-Cardena, G. & Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *The Journal of cell biology*, 209(1), 13–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412052>
- Tabas, I., Williams, K. J. & Borén, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116(16), 1832–1844. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890>

- Thaden, J. J., Nkomo, V. T. & Enriquez-Sarano, M. (2014). The global burden of aortic stenosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 56(6), 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.02.006>
- Thim, T. (2010). Human-like atherosclerosis in minipigs: a new model for detection and treatment of vulnerable plaques. *Danish medical bulletin*, 57(7), B4161.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T. R., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., . . . Engelhardt, S. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456(7224), 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature07511>
- Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P. & Rayner, M. (2015). Cardiovascular disease in Europe--epidemiological update 2015. *European heart journal*, 36(40), 2696–2705. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv428>
- Tran, N. T., Aslibekyan, S., Tiwari, H. K., Zhi, D., Sung, Y. J., Hunt, S. C., Rao, D. C., Broeckel, U., Judd, S. E., Muntner, P., Kent, S. T., Arnett, D. K. & Irvin, M. R. (2015). PCSK9 variation and association with blood pressure in African Americans: preliminary findings from the HyperGEN and REGARDS studies. *Frontiers in genetics*, 6, 136. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00136>
- Uchinaka, A., Yoshida, M., Tanaka, K., Hamada, Y., Mori, S., Maeno, Y., Miyagawa, S., Sawa, Y., Nagata, K., Yamamoto, H. & Kawaguchi, N. (2018). Overexpression of collagen type III in injured myocardium prevents cardiac systolic dysfunction by changing the balance of collagen distribution. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 217-226.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.01.097>
- Ulrich, V., Rotllan, N., Araldi, E., Luciano, A., Skroblin, P., Abonnenc, M., Perrotta, P., Yin, X., Bauer, A., Leslie, K. L., Zhang, P., Aryal, B., Montgomery, R. L., Thum, T., Martin, K., Suarez, Y., Mayr, M., Fernandez-Hernando, C. & Sessa, W. C. (2016). Chronic miR-29 antagonism promotes favorable plaque remodeling in atherosclerotic mice. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 643–653. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506031>
- van Houten, M., Yang, Y [Y.], Hauser, A., Glover, D. K., Gan, L.-M., Yeager, M. & Salerno, M. (2019). Adenosine stress CMR perfusion imaging of the temporal evolution of perfusion defects in a porcine model of progressive obstructive coronary artery occlusion. *NMR in biomedicine*, 32(11), e4136. <https://doi.org/10.1002/nbm.4136>

- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., DiMaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. & Olson, E. N. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 13027–13032.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>
- Vengrenyuk, Y., Nishi, H., Long, X [Xiaochun], Ouimet, M., Savji, N., Martinez, F. O., Cassella, C. P., Moore, K. J [Kathryn J.], Ramsey, S. A., Miano, J. M. & Fisher, E. A. (2015). Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(3), 535–546.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304029>
- Vergnes, L., Phan, J., Strauss, M., Tafuri, S. & Reue, K. (2003). Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 278(44), 42774–42784.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M306022200>
- Virmani, R [R.], Kolodgie, F. D [F. D.], Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M [S. M.] (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(5), 1262–1275.
<https://doi.org/10.1161/01.atv.20.5.1262>
- Wagschal, A., Najafi-Shoushtari, S. H., Wang, L., Goedeke, L., Sinha, S [Sumita], deLemos, A. S., Black, J. C., Ramírez, C. M., Li, Y [Yingxia], Tewhey, R., Hatoum, I., Shah, N., Lu, Y., Kristo, F., Psychogios, N., Vrbancac, V., Lu, Y.-C., Hla, T., Cabo, R. de, . . . Näär, A. M. (2015). Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nature medicine*, 21(11), 1290–1297.
<https://doi.org/10.1038/nm.3980>
- Wang, B., Komers, R., Carew, R., Winbanks, C. E., Xu, B., Herman-Edelstein, M., Koh, P., Thomas, M., Jandeleit-Dahm, K., Gregorevic, P., Cooper, M. E. & Kantharidis, P. (2012). Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(2), 252–265.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2011010055>
- Wang, D., Xu, X [Xiaoqing], Zhao, M. & Wang, X [Xian] (2020). Accelerated miniature swine models of advanced atherosclerosis: A review based on morphology. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 49, 107241.
<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2020.107241>

- Wang, H [Hao], Liu, D [Dongyuan] & Zhang, H [Hongbing] (2019). Investigation of the Underlying Genes and Mechanism of Macrophage-Enriched Ruptured Atherosclerotic Plaques Using Bioinformatics Method. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 26(7), 636–658. <https://doi.org/10.5551/jat.45963>
- Wang, R [Rong], Dong, L.-D., Meng, X.-B., Shi, Q. & Sun, W.-Y. (2015). Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(2), 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.010>
- Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q [Qian] & Papayannopoulos, V. (2015). Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6245), 316–320. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8064>
- Watashi, K., Yeung, M. L., Starost, M. F., Hosmane, R. S. & Jeang, K.-T. (2010). Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(32), 24707–24716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062976>
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234. <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
- Xu, Q. (2004). Mouse Models of Arteriosclerosis. *The American Journal of Pathology*, 165(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63270-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63270-1)
- Yang, W., Chendrimada, T. P., Wang, Q [Qingde], Higuchi, M., Seeburg, P. H., Shiekhattar, R. & Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature structural & molecular biology*, 13(1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nsmb1041>
- Yao, Y., Shen, D., Chen, R., Ying, C., Wang, C [Chenghua], Guo, J. & Zhang, G. (2016). Galectin-3 Predicts Left Ventricular Remodeling of Hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, 18(6), 506–511. <https://doi.org/10.1111/jch.12757>
- Ye, X., Huang, N., Liu, Y [Ying], Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q. & Zhang, H [Hong] (2011). Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nature structural & molecular biology*, 18(6), 650–657. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2032>
- Yesilaltay, A., Daniels, K., Pal, R., Krieger, M. & Kocher, O. (2009). Loss of PDZK1 causes coronary artery occlusion and myocardial infarction in Paigen diet-fed apolipoprotein E deficient mice. *PloS one*, 4(12), e8103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008103>

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yu, L., Ruifrok, W. P. T., Meissner, M., Bos, E. M., van Goor, H., Sanjabi, B., van der Harst, P., Pitt, B., Goldstein, I. J., Koerts, J. A., van Veldhuisen, D. J., Bank, R. A., van Gilst, W. H., Silljé, H. H. W. & Boer, R. A. de (2013). Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circulation. Heart failure*, 6(1), 107–117. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.971168>
- Yuan, F., Guo, L., Park, K.-H., Woollard, J. R., Taek-Geun, K., Jiang, K., Melkamu, T., Zang, B., Smith, S. L., Fahrenkrug, S. C., Kolodgie, F. D [Frank D.], Lerman, A., Virmani, R [Renu], Lerman, L. O. & Carlson, D. F. (2018). Ossabaw Pigs With a PCSK9 Gain-of-Function Mutation Develop Accelerated Coronary Atherosclerotic Lesions: A Novel Model for Preclinical Studies. *Journal of the American Heart Association*, 7(6). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006207>
- Yuan, S.-M. (2015). α -Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Brazilian journal of cardiovascular surgery*, 30(6), 644–649. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20150081>
- Zhang, F., Guo, X., Xia, Y. & Mao, L. (2021). An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(1), 6. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04079-z>
- Zhang, Y [Yang], Huang, X.-R., Wei, L.-H., Chung, A. C., Yu, C.-M. & Lan, H.-Y. (2014). miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(5), 974–985. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.25>
- Zhou, K., Zhou, Y., Zhao, Y., Tan, C., Yuan, Z., Li, J [Jianming], Liao, X., Gu, L. & Zhou, X. (2016). The Relationship between Galectin-3 and Different Patterns of Ventricular Geometry Remodelling in Aortic Valve Stenosis. *Heart, lung & circulation*, 25(4), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.08.021>
- Zhu, H.-Q., li, Q., Dong, L.-Y., Zhou, Q., Wang, H [Hua] & Wang, Y [Yuan] (2014). MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression. *International journal of cardiology*, 176(3), 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.07.095>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: gestörter Blutfluss als Auslöser endothelialer Dysfunktion (Cunningham und Gotlieb 2005)	11
Abbildung 2: Stadieneinteilung der Atherosklerose nach Stary (Stary et al. 1995).....	17
Abbildung 3: Klassifikation atherosklerotischer Gefäßveränderung nach Virmani (Virmani et al. 2000)	19
Abbildung 4 Biogenese der miRNA (Matsuyama und Suzuki 2019).....	23
Abbildung 5: durch Applikation eines Inhibitors der miRNA29 (LNA-miR-29) zeigten Ulrich <i>et al.</i> die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques im Modell der ApoE-/- Maus (Ulrich et al. 2016).....	32
Abbildung 6 Schweinemodelle als fehlendes Bindeglied zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung (Shim et al. 2016)	37
Abbildung 7: Vergleich der Lipoproteinverteilung und Ausbildung von Plaques im ApoE-/- und ApoE+/+ Yucatan-Minipig (Shim et al. 2017)	41
Abbildung 8: Darstellung eines koronararteriellen Plaques in HE-Färbung eines 11 Monate alten LDLR-/- Yucatan-minipig (Davis et al. 2014).....	43
Abbildung 9: Entnommenes Herz eines LDLR-/- Yucatan minipigs. Die Pinzette hält eine Tasche der Aortenklappe.	46
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben der Koronargefäße von LDLR-/- Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Gain-of-function Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).	56
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben des Myokards von LDLR-/- Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).	57
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR von Proben der Herzklappen von LDLR-/- Schweinen (LDLR KO) und D374Y-PCSK9 Schweinen (PCSK9) im Vergleich zu Wildtyp-Schweinen (WT).....	58
Abbildung 13: Yucatan Minipig Wildtyp-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG.....	61
Abbildung 14: Wildtyp-Koronarie EvG-Färbung.....	62
Abbildung 15: LDLR-/- Yucatan Minipig-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. CD31 mutmaßlich durch Fixierung verlorenes Endothel im untersuchten Gefäß.	64
Abbildung 16: LDLR-/- Koronarie EvG	65

Abbildung 17: D374Y-PCSK9-Yucatan Minipig-Koronarien mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG.....	67
Abbildung 18: D374Y-PCSK9 Yucatan Minipig-Koronarie EvG; Membrana elastica interna mit Pfeil markiert	68
Abbildung 19: Yucatan Minipig Wildtyp-Herzklappen mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in CD3 markiert.....	70
Abbildung 20: Yucatan Minipig Wildtyp-Herzklappe EvG; Übergang Spongiosa/Fibrosa markiert	71
Abbildung 21: Wildtyp Herzklappe peripher smA	71
Abbildung 22: Wildtyp Herzklappe peripher Iba.....	72
Abbildung 23: LDLR -/- Yucatan Minipig Herzklappen mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, MPO, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in CD3 markiert.....	74
Abbildung 24: LDLR-/- Yucatan Minipig-Herzklappe EvG.....	75
Abbildung 25: LDLR-/- Yucatan Minipig-Herzklappe smA peripher.....	75
Abbildung 26: LDLR -/- Yucatan Minipig-Herzklappe Iba peripher.....	76
Abbildung 27: Yucatan Minipig Wildtyp-Myokard mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in Iba und CD3 markiert.....	78
Abbildung 28: LDLR-/- Yucatan Minipig-Myokard mit Färbung gemäß den Beschriftungen für smA, Iba, ki67, CD3 und CD31. In Übersichtsdarstellung Färbungen in HE und EvG. Positive Zellen in Iba und CD3 markiert.....	80
Abbildung 29: LDLR-/- Yucatan Minipig-Myokard Iba; man erkennt diffus im Myokard verstreut Makrophagen. Nebenbefundlich zeigt sich oben rechts im Bild ein intravaskulärer Plaque	81
Abbildung 30: LDLR-/- Yucatan Minipig-Myokard Iba in höherer Vergrößerung; man erkennt die verstreuten positiven Zellen im Myokard (Vgl Abb. 27 Iba und Abb. 28).....	81
Abbildung 31: Prozentuale Verteilung der Lipoprotein-Fraktion im Vergleich (Xiangdong et al. 2011).....	84

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stadieneinteilung der Atherosklerose nach Stary (Stary et al. 1995)	16
Tabelle 2 verwendete Lösungsmittel	48
Tabelle 3: verwendete primäre Antikörper in der immunhistochemischen Färbung, mit entsprechenden Verdünnungen.....	53
Tabelle 4: Zielstrukturen der immunhistochemischen Färbungen	53
Tabelle 5: verwendete TaqMan-Assays für die entsprechenden Gene.....	55

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Lars Mägdefessel bedanken. Nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern insbesondere für den netten Umgang, die andauernde Unterstützung und die schnelle Erreichbarkeit, auch in Zeiten der Covid-19-Pandemie.

Danken möchte ich auch ganz besonders Fr. Dr. Hanna Winter und Fr. Renate Hegenloh. Beide haben mich, neben ihrer eigentlichen Arbeit, bei der Durchführung meiner Experimente und dem Schreiben der Dissertation mit Rat und Tat unterstützt. Ohne beide wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die mentale Unterstützung, Forderung und auch die ein oder andere Stichelei im gesamten Verlauf bin ich meinen Eltern und Geschwistern, meinen damaligen Mitbewohnern Linus Springer und Benjamin Nolle, sowie meiner Freundin Michaela Salcher zu Dank verpflichtet. Das alles gab mir das benötigte Durchhaltevermögen!