

Aus der
Abteilung Vaskuläre Signaltransduktion und Krebs
des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. Andreas Fischer

Der Einfluss der Serin-Protease High Temperature Requirement Protein
A1 auf glatte Gefäßmuskelzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Alexander Dietrich Prinz

aus
Jena
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Andreas Fischer

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
EINLEITUNG	5
1.1 Das Blutgefäßsystem.....	5
1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen	6
1.2.1 Phänotypen	10
1.3 High temperature requirement protein A1 (HTRA1)	14
1.3.1 HTRA1 und TGF- β	16
1.3.2 HTRA1 und Notch	17
1.3.3 HTRA1 und extrazelluläre Matrix.....	17
1.3.4 HTRA1 in Neoplasien.....	18
1.3.5 HTRA1 und Makuladegeneration	19
1.3.6 HTRA1 und Alzheimer.....	20
1.3.7 HTRA1 und Schwangerschaft	20
1.3.8 Phänotyp von <i>Htra1</i> ^{-/-} -Mäusen.....	21
1.4 Zerebrale Mikroangiopathien	21
1.4.1 CARASIL	24
1.4.2 CADASIL	27
1.5 Zielsetzung	31
2 MATERIAL UND METHODEN.....	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Chemikalien.....	33
2.1.2 Reagenzien	34
2.1.3 Puffer und Lösungen	35
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	37
2.1.5 Zellkulturmedien und -lösungen	38
2.1.6 Molekularbiologische Kits.....	38
2.1.7 Oligonukleotidprimer	38

2.1.8	siRNA und shRNA	39
2.1.9	Antikörper	40
2.1.10	Plasmide.....	40
2.1.11	Zellen und Bakterien	40
2.1.12	Geräte und Software	41
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Zellkultur.....	42
2.2.2	Molekularbiologische und Biochemische Methoden.....	47
2.2.3	<i>In vitro</i> Zellkulturexperimente	52
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	55
3	ERGEBNISSE	58
3.1	HTRA1 beeinflusst den Notch-Signalweg.....	59
3.2	HTRA1 beeinflusst den Phänotyp von vSMC	60
3.2.1	HTRA1 reguliert vSMC-Zellmigration	62
3.2.2	HTRA1 reguliert vSMC-Proliferation.....	66
3.2.3	HTRA1 reguliert die N-Cadherin Expression	67
3.3	HTRA1-Verlust mindert Kontraktilität.....	67
3.4	DOCA-Salz induzierte Hypertension.....	68
4	DISKUSSION	71
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	81
7	LEBENS LAUF	99
8	DANKSAGUNG	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

ADAM9	A disintegrin and metalloproteinase 9
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APO E4	Apolipoprotein E4
ARMS2	Age-related maculopathy susceptibility 2
ATP	Adenosintriphosphat

B

BMP	Bone morphogenic protein
BSA	Bovines Serum Albumin

C

C	Celsius
CADASIL	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy
CARASIL	Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid
CSVD	Cerebral small vessel disease
Ctrl	Kontrolle

D

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLL4	Delta-like ligand 4
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOCA	Desoxycorticosteron-Azetat
DTI	Diffusion tensor imaging
DTT	1,4-Dithiothreitol

DWI Diffusion-weighted imaging

E

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

engl. Englisch

EZM Extrazelluläre Matrix

F

FCS Fetal calf serum

FGF Fibroblast growth factor

G

g g-force, $g = 9.81 \text{ m/s}^2$

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GDF Growth differentiation factor

GFP Green fluorescent protein

GOM Granuläres osmiophiles Material

H

HEK 293 Human embryonic kidney 293

HES Hairy and enhancer-of-split

HEY Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif

HIF Hypoxia-inducible transcription factors

HRP Horseradish peroxidase

HTRA1 High temperature requirement protein A1

HUASMC Human umbilical artery smooth muscle cells

I

ICD Intracellular domain

IGFBP Insulin-like growth factor-binding protein

J

JAG1 Jagged1

K

kDa	Kilodalton
KLF	Krüppel-like-factor

L

L	Liter
LTBP	Latent TGF- β binding protein

M

M	Molar
MAD	Mittlerer arterieller Druck
min	Minuten
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie

N

NICD	Notch intracellular domain
------	----------------------------

P

PBS	Phosphat buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline mit 0,1% Tween 20
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR- β	Platelet-derived growth factor receptor- β
PDZ	Postsynaptic density of 95 kDa, Discs large und zonula occludens
PFA	Paraformaldehyde
pH	Potentia Hydrogenii

Q

qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
------	--

R

RBP-J κ	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay lysis buffer
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute

S

shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SD	Standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel
SM22 α	Smooth muscle 22 α
SMA	Smooth muscle actin
SMC	Smooth muscle cell
SMMHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SRF	Serum response factor

T

TGF- β	Transforming growth factor β
TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase-3
T β R	Transforming growth factor receptor

V

VEGF	Vascular endothelial growth factor
vSMC	Vascular smooth muscle cell

X

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
------	---

EINLEITUNG

1.1 Das Blutgefäßsystem

Das menschliche Blutgefäßsystem dient primär dem Transport. Nährstoffe und Sauerstoff werden durch das Blut zu den stoffwechselaktiven Zellen transportiert, während die dort entstehenden Stoffwechselprodukte zur weiteren Verwendung oder Ausscheidung abtransportiert werden. Zusätzlich erfüllt es aber durch den Transport verschiedenster Botenstoffe und Abwehrzellen auch Kommunikationsaufgaben und ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Durch die gezielte Umverteilung des Blutstroms regulieren Blutgefäße auch die Körpertemperatur und mittels Einsatz von Schwellkörpern mechanische Funktionen wie beispielsweise die Peniserektion und den Analverschluss.

Herz und Blutgefäßsystem bilden gemeinsam das erste im menschlichen Embryo angelegte Organsystem. Zu Beginn der dritten Woche der Embryonalentwicklung bilden mesodermale Angioblasten in verschiedenen Regionen des Embryos Zellhaufen, die sogenannten Blutinseln, in denen sich Hohlräume ausbilden. Wie genau die Hohlräume entstehen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Zwei Mechanismen werden diskutiert: zum einen durch intrazelluläre Bildung von Vakuolen, die sich schließlich verbinden und zum anderen die interzelluläre Lumenbildung durch De-Adhärenz benachbarter Endothelzellen (Kamei et al., 2006; Strilic et al., 2009). Durch die Verbindung solcher Räume entstehen die ersten rudimentären Gefäße, die nach Anschluss an das zunächst nur einkammerige Herz schließlich am Ende der dritten Woche der Embryonalentwicklung erstmals einen funktionsfähigen Blutkreislauf ermöglichen. Diese *de novo* Entstehung von Blutgefäßen wird als Vaskulogenese bezeichnet. Von dieser zu unterscheiden ist die Angiogenese, welche eine Bildung von neuen Blutgefäßen durch Aussprossung von bereits bestehenden Gefäßen beschreibt. Die Kombination beider Prozesse führt letztlich zur Ausbreitung des Blutgefäßsystems im sich entwickelnden Embryo. Wichtigster Wachstumsreiz ist dabei die Hypoxie von Gewebe, dessen Versorgung durch eine sich beim Wachstum vergrößernde Diffusionsstrecke zwischen Gefäßen und Zellen nicht mehr ausreichend ist. Die von diesem Gewebe exprimierten Transkriptionsfaktoren (HIF, hypoxia-inducible transcription factors) aktivieren eine Vielzahl angiogener Zielgene, von denen der vascular endothelial growth factor

(VEGF) den wichtigsten Wachstumsfaktor darstellt. Um dauerhaft bestehen und spezifische Funktionen erfüllen zu können, müssen die neu gebildeten Endothelzellschläuche einen Reifungsprozess durchlaufen. Dieser Prozess beinhaltet neben der organspezifischen Spezialisierung der Endothelzellen insbesondere die Rekrutierung von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMC) und den Aufbau einer spezifischen extrazellulären Matrix (EZM).

Nach Aufbau und Funktion werden reife Gefäße grob in Arterien, Venen und Kapillaren unterteilt. Als Arterien werden dabei alle Gefäße bezeichnet, in denen das Blut vom Herzen zu den Kapillargebieten transportiert wird. Die Kapillaren sind der eigentliche Ort des Austauschs zwischen dem Blut und dem Gewebe und stellen den häufigsten Gefäßtyp im menschlichen Körper dar. Alle Gefäße, die Blut aus den Kapillaren zum Herzen oder zu anderen Kapillargebieten abtransportieren, werden als Venen bezeichnet. Der jeweilige Aufbau der verschiedenen Gefäße folgt dabei der spezifischen Funktion. Während Kapillaren neben einer Endothelzellschicht nur aus einer Basalmembran mit unregelmäßig eingelagerten Perizyten bestehen, um die Diffusionsstrecke möglichst gering zu halten, haben die größeren Arterien und Venen einen dreischichtigen Aufbau: Tunica intima (Intima) mit der das Lumen auskleidenden Endothelzellschicht, Tunica media (Media) mit den glatten Gefäßmuskelzellen und Tunica adventitia (Adventitia) mit Fibroblasten und extrazellulärer Matrix. Venen besitzen dabei in der Regel deutlich weniger vSMC als Arterien. Die kleineren Arteriolen und Venolen besitzen ebenfalls Intima und Media, unterscheiden sich aber vor allem in der Ausprägung der Mediadicke. Während sich besonders bei postkapillären Venolen nur vereinzelte vSMC an die Intima anschließen, besitzen Arteriolen in der Regel eine geschlossene Schicht glatter Muskulatur (Carmeliet, 2003; Jain, 2003).

1.2 Glatte Gefäßmuskelzellen

Neben quergestreifter und Herzmuskulatur stellt glatte Muskulatur die dritte beim Menschen vorkommende Muskelart dar. Wie bei allen Muskelzellen besteht die Hauptaufgabe in der Erzeugung einer mechanischen Kraft durch Kontraktion. Dabei unterscheiden sich glatte Muskelzellen von den anderen beiden insbesondere in der Organisation des kontraktiven Apparates und dem Kontraktionsmechanismus. Glatte

Muskulatur findet sich vor allem in Hohlorganen, die ihr Lumen aktiv verändern können. Die typische glatte Muskelzelle ist spindelförmig mit einem zentral liegenden Zellkern und kann sowohl vereinzelt als auch in dichten Zellverbänden vorkommen. Jede Zelle ist von einer Basalmembran umgeben, über welche auch die Kraftübertragung zu benachbarten Zellen und umliegendem Gewebe vermittelt wird. Der kontraktile Apparat besteht aus α -Aktin- und Myosin-Isotypen, die aber nicht in Sarkomeren, sondern in schräg verlaufenden Bündeln angeordnet sind. Diese besondere Anordnung in Kombination mit einem ausgeprägten Zytoskelett aus Intermediärfilamenten und nicht-muskulärem Aktin ermöglichen glatter Muskulatur eine viel stärkere Verkürzung im Vergleich zur quergestreiften Muskulatur, die aber auch deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt. Auch die Aktivierungsmechanismen für eine Kontraktion unterscheiden sich stark von quergestreifter Muskulatur. Wie auch bei der Herzmuskulatur findet die Erregung unwillkürlich statt. Der aktivierende Stimulus kann je nach Gewebe aber sehr unterschiedlich sein: So kommen eine neurogene Aktivierung über das vegetative Nervensystem, eine myogene Aktivierung über Schrittmacherzellen und eine Aktivierung über Hormone oder lokale Gewebefaktoren in Frage. Auch verschiedene physikalische Reize können Einfluss auf den Muskeltonus nehmen. Häufig regulieren mehrere Mechanismen gleichzeitig die Kontraktion (Kao and Carsten, 1997; Lüllmann-Rauch and Asan, 2015).

Alle Mechanismen münden letztlich in einer Beeinflussung der ATPase-Aktivität der regulatorischen Myosinleichtkette (myosin light chain, MLC) als zentrale und unmittelbare Schaltstelle der Kontraktion. Hierbei führt eine Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins II durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (myosin light chain kinase, MLCK) zu einer Aktivitätssteigerung der MLC und damit Kontraktionsförderung. Eine Dephosphorylierung durch die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (myosin light chain phosphatase, MLCP) führt zu einer Inaktivierung und damit Beendigung der Kontraktion. Wie im quergestreiften Muskel auch, ist ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration der Hauptreiz für eine Kontraktion. Nach Bindung der Ca^{2+} -Ionen an das zytosolische Protein Calmodulin aktiviert der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex die MLCK. Ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt hingegen ein Überwiegen der Phosphatasefunktion und damit eine Verminderung der Kontraktilität. Der Einstrom von Ca^{2+} wird dabei über spannungs- und rezeptorgesteuerte Kanäle in der Zellmembran und der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums gesteuert. Die Kontraktionsstärke ist dabei nicht

ausschließlich von der Ca^{2+} -Konzentration oder deren absoluten Veränderung abhängig. Der gleiche Ca^{2+} -Anstieg bewirkt nach einem rezeptorvermittelten Signal eine stärkere Kontraktion, als nach einer Membrandepolarisation. Dieses Phänomen wird mit einer Beeinflussung der Ca^{2+} -Empfindlichkeit des kontraktiven Apparates erklärt. Hierunter versteht man eine von rezeptorvermittelten Signalkaskaden ausgehende Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen den beiden Schlüsselenzymen MLCK und MLCP, insbesondere durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von MLCP. So führt eine Aktivierung von β_2 -Rezeptoren beispielsweise über den second messenger cAMP zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, welche wiederum MLCP phosphoryliert und damit aktiviert. Die aktive MLCP kann nun die Myosinleichtkette dephosphorylieren und wirkt somit muskelrelaxierend. Auch Angiotensin und Stickstoffmonoxid nehmen über die MLCP Einfluss auf die Ca^{2+} -Empfindlichkeit (Brozovich et al., 2016; Frisantiene et al., 2018b; Touyz et al., 2018).

Glatte Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMC) bilden den zellulären Hauptbestandteil der Gefäßwand. Gemeinsam mit der von ihnen produzierten extrazellulären Matrix (EZM) dienen sie der Stabilisierung der Gefäßstruktur und dem Widerstand gegen die ständige mechanische Belastung. Über ihre Kontraktionsfähigkeit regulieren vSMC die Weite der Blutgefäße und damit Blutdruck und -verteilung. Beachtenswert ist der uneinheitliche Ursprung der vSMC. In der Embryogenese konnten bisher acht verschiedene Vorläuferzellpopulationen unterschiedlichen Ursprungs identifiziert werden, unter anderem aus Neuralleiste, Somiten, Proepikard, Mesothel und sekundärem Herzfeld (Majesky et al., 2011). Auch eine postembryonale Entstehung von vSMC wird diskutiert. Vorläuferzellen konnten in der Adventitia und mit den Perizyten an der Grenze zwischen Intima und Media gefunden werden. Die genaue Bedeutung und Funktion dieser Populationen ist Gegenstand aktueller Forschung (Corselli et al., 2010).

Die heterogenen Vorläuferzellen führen zu unterschiedlichen Eigenschaften der jeweils abgeleiteten adulten vSMC (Gadson et al., 1997; Thiesen et al., 1996). Dies wurde auch als mögliche Ursache der sehr unterschiedlichen Auftretenswahrscheinlichkeit bestimmter Gefäßerkrankungen in Abhängigkeit von der Gefäßlokalisierung diskutiert. So entstehen insbesondere Aortendissektionen häufig

im Grenzbereich zwischen Abschnitten mit vSMC unterschiedlichen Ursprungs. Am Aufbau der Aorta sind vSMC aus dem lateralen Plattenmesoderm, dem Neuroektoderm und dem paraxialen Mesoderm beteiligt. Cheung et al. konnten zeigen, dass es zwischen vSMC diesen Ursprungs zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Metalloproteasen und deren Inhibitoren nach Stimulation mit Interleukin (IL)-1 β kommt. Dies könne zu regional unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Gefäßwand führen und damit das ortsspezifische Auftreten von Aortendissektionen erklären (Cheung et al., 2012).

Unabhängig vom Ursprung besitzen alle vSMC gemeinsame gruppenspezifische Eigenschaften. Charakteristisch für die Morphologie einer reifen glatten Gefäßmuskelzelle sind ein heterochromer Nukleus, Myofilamente und schwach ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat. Zur Identifizierung von vSMC auf molekularer Ebene werden vorwiegend Proteine des kontraktiven Apparates und des Zytoskeletts nachgewiesen. Das am häufigsten in vSMC vorkommende Protein ist Glattmuskel- α -Aktin (smooth muscle actin, SMA). Da es allerdings unter anderem auch in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird, ist es nicht spezifisch für vSMC. Das aktinbindende Glattmuskelprotein 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α) zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie SMA und gilt als weiterer unspezifischer Differenzierungsmarker. Seine genaue Funktion ist unklar, es konnte aber eine Assoziation zu verschiedenen physiologischen und pathologischen Regulationsmechanismen nachgewiesen werden (Liu et al., 2018). Als spezifische Differenzierungsmarker gelten das Protein der schweren Myosinkette (smooth muscle myosin heavy chain, SMMHC) und smoothelin. Während bei SMMHC die Funktion als essentieller Bestandteil des kontraktiven Apparates und die SMC-spezifische Expression gut untersucht sind (Miano et al., 1994), fehlt für smoothelin bei bekanntem SMC-spezifischen Expressionsmuster nach wie vor ein genaues Verständnis der biologischen Funktion. Da Knockout-Mäuse ohne Expression von smoothelin einen veränderten SMC-Phänotyp mit Beeinträchtigung der Kontraktilität präsentieren, ist eine essentielle Funktion in der physiologischen SMC-Funktion aber sehr wahrscheinlich (Niessen et al., 2005; Rensen et al., 2008).

Insbesondere in der Gefäßentwicklung besteht eine Hauptaufgabe der vSMC in der Produktion von Proteinen der EZM. Hierzu gehören unter anderem Elastin, Kollagene und Proteoglykane. In ausgereiften Gefäßen wird diese Funktion auf ein Minimum

reduziert, kann aber bei Anpassung an bestimmte mechanische Reize oder nach Verletzungen wieder gesteigert werden (Wagenseil and Mecham, 2009).

1.2.1 Phänotypen

Differenzierte vSMC in einer gesunden Gefäßwand besitzen das charakteristische zuvor beschriebene Aussehen und exprimieren die für ihre kontraktile Aufgaben notwendigen Proteine. Der Phänotyp dieser vSMC wird als kontraktile bezeichnet. Als Reaktion auf bestimmte Signale, wie Wachstumsfaktoren, mechanische Kräfte, Entzündungsmediatoren, mechanische Verletzungen, neuronale Signale oder bestimmte Kontakte mit Zellen und EZM in der Umgebung sind vSMC in der Lage, zu dedifferenzieren und einen Phänotyp anzunehmen, der als synthetisch bezeichnet wird (Owens et al., 2004). Bei diesem als Phänotyp-Modulation oder Phänotypen-Switch bezeichneten Vorgang wird die Expression von Proteinen des Zytoskeletts und des kontraktile Apparates reduziert, wohingegen Proteine, die zum Umbau der EZM oder zur Zellzyklusprogression benötigt werden, verstärkt exprimiert werden. Eine Übersicht über einige wichtige Markerproteine gibt Tabelle 1. In der Praxis dienen zur Differenzierung der verschiedenen Phänotypen insbesondere SMA, SMMHC, SM22 α , Smoothelin und Calponin.

Tabelle 1: Wichtige Markerproteine der Phänotyp-Modulation nach Allahverdian (Allahverdian et al., 2018)

Proteine	Abkürzung	Expression	
		kontraktile	synthetisch
α -smooth muscle actin	SMA	+++	+
Smooth muscle myosin heavy chain	SMMHC	+	-
Transgelin / smooth muscle 22 α	SM22 α	+	-
Desmin		+	-
Smoothelin		+	-
Calponin		+	-
Collagen VIII		-	+
Matrix Metalloproteinase-2, -9	MMP-2, -9	-	+
Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator	u-PA	-	+
Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator	t-PA	-	+

In Verbindung mit den Veränderungen auf molekularer Ebene kommt es auch zu strukturellen und funktionellen Veränderungen. Mit Annahme des synthetischen Phänotyps verändern die Zellen ihre spindelförmige Morphologie und nehmen eine epitheloide/ rhomboide Form an. Die zur Proteinsynthese benötigten Zellorganellen wie endoplasmatische Retikulum und Golgi-Apparat sind in den synthetischen vSMC deutlich ausgeprägter als in den kontraktile. Im Vergleich zu den quieszenten kontraktile vSMC zeigen die synthetischen Muskelzellen eine erhöhte Proliferationsrate und Migrationsaktivität (Hao et al., 2003).

Zu beachten ist, dass es sich beim kontraktile und synthetischen Phänotyp nicht um zwei vollständig voneinander zu trennende Zustände der vSMC handelt. Vielmehr gehen beide kontinuierlich ineinander über und es existieren zahlreiche Formen, die sich auf dem Kontinuum zwischen diesen beiden Polen einordnen (Rensen et al., 2007).

Die Regulation dieser Veränderungen ist komplex und erfolgt wie in allen biologischen Prozessen auf verschiedenen Ebenen, inklusive Transkription, epigenetische Modifikation, Signalgenerierung und Signaltransduktion (Überblick bei (Frismantiene et al., 2018b)).

Für zwei der an der Regulation beteiligten Signalwege ist eine Interaktion mit HTRA1 bekannt, TGF- β und Notch. Ihre Bedeutung in der Phänotypen-Modulation soll daher im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.2.1.1 Regulation durch TGF- β

Zur Superfamilie der TGF- β -Proteine gehören mehr als 30 verschiedene Zytokine, die nach ihrer Aktivierung an sogenannte Typ I und Typ II Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, woraufhin diese sich zusammenlagern und das Signal durch Phosphorylierung der intrazellulären rezeptorregulierten Smad-Proteine (R-Smad) weiterleiten. Diese bilden mit Co-Smad einen aktivierten Smad-Komplex, welcher in den Nukleus wandert, wo er unter Beteiligung weiterer Cofaktoren an verschiedenen regulatorischen Promoterregionen der DNS andocken oder mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren kann (Shi and Massagué, 2003). So induziert TGF- β die kontraktile Differenzierung der vSMC direkt durch die Kontrolle von Promotoren einiger SMC-spezifischer Markergene wie *MYH11*, *ACTA2*, *TAGLN*, und *CNN1* (Hautmann et al., 1997) und indirekt über Interaktion mit und Induktion von

einigen Transkriptionsfaktoren wie Serum response factor (SRF), Krüppel-like-factor-4 und 5 (KLF4/5) und Myokardin (Adam et al., 2000; Guo and Chen, 2012; Hirschi et al., 2002; Qiu et al., 2003; Qiu et al., 2005).

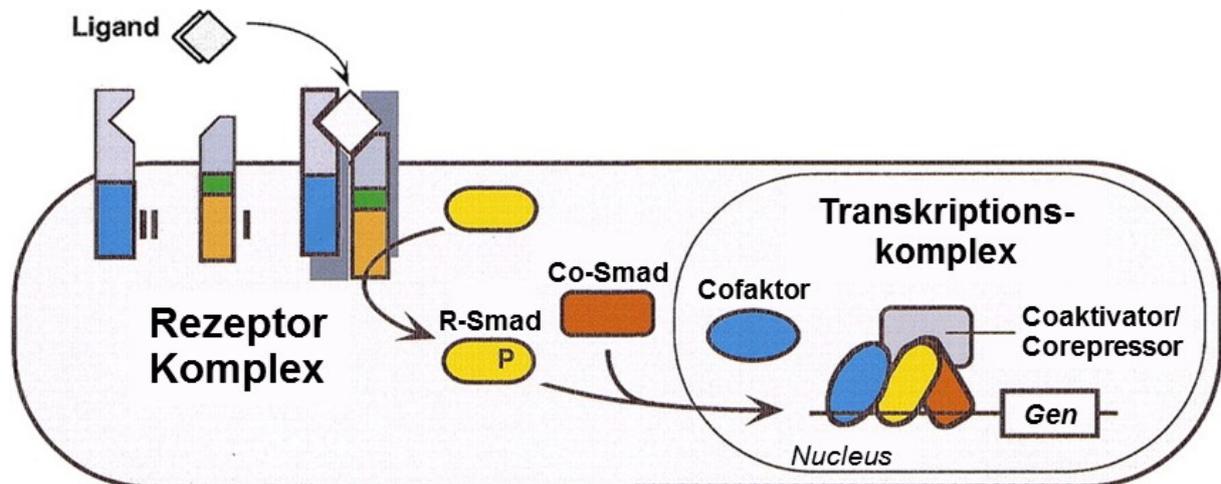


Abb. 1: Schema des TGF-β-Signalwegs

Bindung des Liganden führt zur Komplexierung der Typ I und Typ II Rezeptoren und zur Phosphorylierung intrazellulärer rezeptorregulierter Smad-Proteine (R-Smad). Diese bilden mit Co-Smad und weiteren Cofaktoren im Nucleus einen Transkriptionskomplex (adaptiert nach Massagué (Massagué and Chen, 2000)).

1.2.1.2 Regulation durch den Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein hochkonservierter Signalweg, bei dem es zur Signalübertragung zwischen benachbarten Zellen kommt. Sowohl die vier bei Säugetieren bekannten Notch-Rezeptoren (Notch1, 2, 3 und 4) als auch die fünf Liganden (Jagged-1, Jagged-2, Delta-like 1, 3 und 4) sind Transmembranproteine. Bindet ein Ligand an einen Notch-Rezeptor auf der Oberfläche einer Nachbarzelle, kommt es zur Aktivierung mehrerer Prozessierungsvorgänge des Ligand/Rezeptor-Komplexes, wobei schließlich durch die γ -Sekretase die intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) freigesetzt wird. Diese gelangt in den Nucleus und interagiert hier mit dem Transkriptionsfaktor RBP-Jk. Hierdurch werden weitere Aktivatoren rekrutiert, die mit RBP-Jk assoziierten Korepressoren verdrängt und schließlich zelltypspezifisch die Expression bestimmter Zielgene initiiert. Zu den am besten untersuchten Zielgenen gehören die Proteine HES1-7 (Hairy and enhancer-of-split) und die Proteine HEY1, 2 und HEYL (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif) (Fischer and Gessler, 2007). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Transkriptionsrepressoren, welche beispielsweise die Expression gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren unterdrücken.

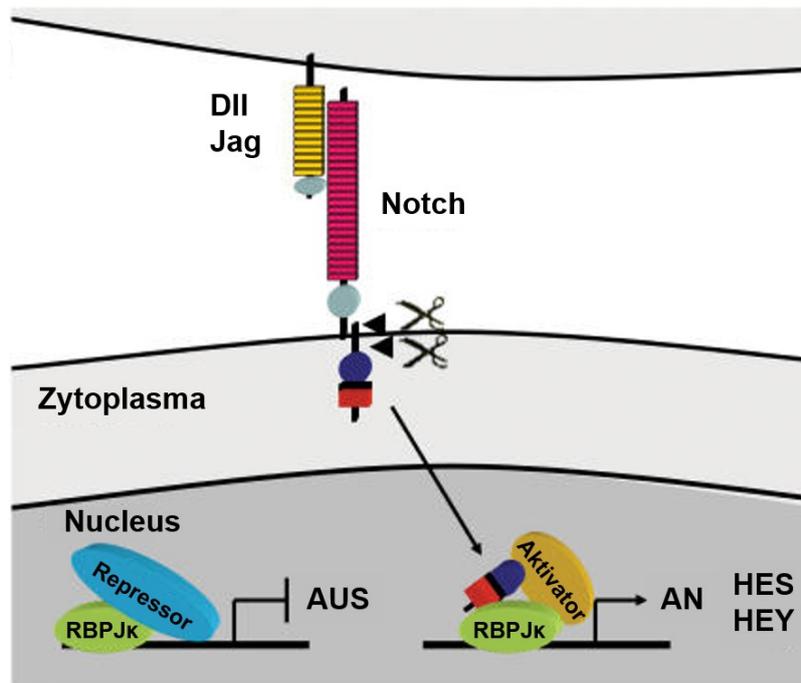


Abb. 2: Schema des Notch-Signalwegs

Nach Ligand-Rezeptorbindung wird die NICD freigesetzt und in den Nucleus verlagert. Dort interagiert sie mit RBP-Jk und führt nach Rekrutierung weiterer Aktivatoren und Verdrängung von Repressoren zur Initiierung der Transkription bestimmter Zielgene (adaptiert nach Fischer (Fischer and Gessler, 2007), dargestellt mit Erlaubnis der Oxford University Press).

Der Notch-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Homöostase der Gefäßwand. In vSMC kann die Aktivierung des Signalwegs sowohl durch Notch-Liganden auf benachbarten Endothelzellen als auch auf anderen vSMC erfolgen und fördert in der embryonalen Entwicklung die Differenzierung und Ausreifung der Gefäßwand (Fouillade et al., 2012). In adulten vSMC sind, mit gewebespezifischen Unterschieden, die Rezeptoren Notch1, Notch2 und Notch3 und der Ligand Jag1 exprimiert (Villa et al., 2001). Insbesondere die Aktivierung von Notch3 durch endotheliales aber auch muskuläres Jagged1 (JAG1) ist in arteriellen Gefäßen notwendig für die Differenzierung und Kontraktilität der vSMC und damit auch für eine intakte Vasokonstriktion und Organperfusion (Boulos et al., 2011; Domenga et al., 2004; Henshall et al., 2014; Li et al., 2009a; Liu et al., 2009). Nach Verletzungen der Gefäßwand kommt es sowohl in Endothelzellen als auch in vSMC zu komplexen, zeitlichen und räumlichen Veränderungen der Expression von Notchliganden und –rezeptoren (Lindner et al., 2001). Unklar ist, ob Notch die Dedifferenzierung der vSMC und damit verbundene Entstehung der Neointima fördert oder inhibiert. In verschiedenen Studien wird eine Inhibition durch reduzierte Notch-Aktivität nach Deletion des Rezeptors Notch1 oder des Transkriptionsfaktors HEY2 und nach Transfektion mit einem löslichen JAG1 gezeigt (Caolo et al., 2011; Li et al., 2009b;

Sakata et al., 2004). Es existieren aber auch Studien, in denen eine Deletion des endothelialen JAG1 über eine verminderte Notch-Aktivität zu einer vermehrten Neointimaformation führte (Wu et al., 2011).

Für die Rezeptoren Notch2 und Notch3 konnten in vSMC ebenfalls unterschiedliche Effekte nach jeweils isolierter Aktivierung gezeigt werden. Zwar sind beide in der Lage, die Expression kontraktile Markerproteine zu fördern, doch nur für Notch3 konnte zusätzlich eine proliferationsfördernde Wirkung nachgewiesen werden, während die isolierte Aktivierung von Notch2 anti-proliferativ wirkte (Baeten and Lilly, 2015).

Die duale Rolle des Notch-Signalweges lässt sich auch anhand einiger direkter Zielgene erkennen. Notch reguliert zum einen direkt einige Gene kontraktile Markerproteine wie α -Aktin (Nosedá et al., 2006) und die als differenzierungsfördernd bekannten MicroRNAs miR-143/145, aber auch die Expression des proliferationsfördernden PDGFR- β (Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β) (Boucher et al., 2011; Jin et al., 2008). Störungen des Signalweges sind an der Entstehung verschiedener Erkrankungen beteiligt, u.a. akute T-Zell-Leukämie, CADASIL, Fallot-Tetralogie, Alagille-Syndrom und verschiedenen Neoplasien (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2012).

1.3 High temperature requirement protein A1 (HTRA1)

Bei den HTRA1-Proteinen handelt es sich um evolutionär hochkonservierte Proteasen, die in zahlreichen Spezies von Bakterien über Pflanzen bis hin zu Säugetieren nachgewiesen werden konnten (Clausen et al., 2011; Page and Di Cera, 2008). Die erste Beschreibung eines Proteins aus der HTRA-Familie fand in *E. coli* statt. Bakterien mit einer Nullmutation im entsprechenden Genabschnitt waren zum einen nicht in der Lage, bestimmte Proteine im Periplasma zu degradieren (Strauch and Beckwith, 1988) und zum anderen unfähig, sich bei erhöhten Temperaturen zu vermehren (Lipinska et al., 1988). Dementsprechend erhielt das beschriebene Protein den Namen DegP (von engl. degradation) bzw. HtrA für High temperature requirement protein A. Auch wenn schnell klar war, dass es sich bei den beiden Neuentdeckungen um das gleiche Protein handelte (Strauch et al., 1989), fanden beide Namen weiterhin teils synonyme Verwendung, wobei DegP meist auf

die prokaryotischen Vertreter der Proteasefamilie bezogen wird (Clausen et al., 2002).

Der erste Nachweis im Menschen gelang 1996 durch Isolation von HTRA1 aus Fibroblasten (Zumbrunn and Trueb, 1996). Seitdem sind die weiteren humanen HTRA-Proteasen HTRA2, HTRA3 und HTRA4 beschrieben worden. Nach der strukturbasierten Einteilung der MEROPS-Datenbank gehören die HtrA-Proteasen zur Subfamilie S1C aus dem Clan PA (Rawlings et al., 2008). Es handelt sich also um Serinproteasen mit der katalytischen Triade His-Asp-Ser im katalytischen Zentrum, die als Endoprotease fungieren. Das definierende Merkmal dieser Gruppe ist die Kombination aus einer proteolytischen und mindestens einer C-terminalen PDZ-Domäne (benannt nach den Proteinen, in denen diese Domäne zuerst gefunden wurde: postsynaptic density of 95 kDa, Discs large und zonula occludens 1) (Pallen and Wren, 1997). Bei HTRA1 findet sich neben der Proteasedomäne und einer PDZ-Domäne N-terminal ein Signal-Peptid, gefolgt von einer IGFBP7-Domäne, die einen Protease-Inhibitor vom Kazal-Typ beinhalten (Abb. 1). Diese sorgt bei den prokaryotischen HTRA-Proteinen für eine Blockierung der Protease bei niedrigen Temperaturen und ermöglicht damit das Umschalten von der Funktion als Protease zum Chaperon (Spiess et al., 1999). In Säugetierzellen konnte kein inhibitorischer Effekt auf die Proteasedomäne nachgewiesen werden (Eigenbrot et al., 2012), sodass von einer Beschränkung der Funktion als Chaperon auf die prokaryotischen Vertreter ausgegangen wird (Shiga et al., 2011). HTRA1 Monomere lagern sich zu Trimeren zusammen, die sich in Anwesenheit von Substraten zu deutlich größeren Multimeren zusammenlagern können, wodurch auch die Proteaseaktivität steigt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in anderen Mitgliedern der HTRA-Familie scheint die PDZ-Domäne in HTRA1 nicht für eine Aktivierung der Proteaseaktivität notwendig zu sein (Truebestein et al., 2011). Auch die Anlagerung von Co-Faktoren scheint die Oligomerisierung und damit die Proteaseaktivität beeinflussen zu können (Jo et al., 2014).



Abb. 3: Domänen von HTRA1

Die relativen Positionen der Domänen wurden von NCBI entnommen. HTRA1 besteht aus einer N-terminalen insulin-like growth factor-binding protein-Domäne (IGFBP, orange), einer Kazal-like inhibitor-Domäne (KI, grün), einer trypsin-like peptidase-Domäne (PROTEASE, blau) und einer C-terminalen PDZ-Domäne.

HTRA1 wird in zahlreichen Geweben exprimiert, besonders stark in Epidermis, Gallengang, exokrinem Pankreas, proximalen Nierentubuli, proliferativem Endometrium, Salpinx, Ovar, Plazenta, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, sowie einigen Teilen des Gehirns, darunter Corpus callosum, Nucleus caudatus und Putamen (Luca et al., 2003; Nie et al., 2003). Es wird primär sezerniert, kommt aber auch intrazellulär und intranukleär vor (Clawson et al., 2008).

Welche physiologischen Funktionen HTRA1 in humanen Zellen erfüllt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass es über eine Manipulation verschiedener Signalwege die Differenzierung, Reifung und Vermehrung von Zellen beeinflusst. So kann es über die Degradierung des tuberöse Sklerose Komplex 2 Proteins den mTOR-Signalweg aktivieren (Campioni et al., 2010) und über die Prozessierung von IGFBP5, was zur Freisetzung von IGF führt, proliferationsverstärkend wirken (Hou et al., 2005). In der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3 wurde HTRA1 als Mikrotubuli-assoziiertes Protein beschrieben, das die Zellmigration inhibiert (Chien et al., 2009b). Aktuelle Ergebnisse identifizierten HTRA1 außerdem als einen Modulator der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und zu Adipozyten (Tiaden et al., 2016; Tiaden et al., 2012).

Im Folgenden soll die Bedeutung der HTRA1-Protease anhand ihrer Rolle in der Pathophysiologie einiger Erkrankungen, sowie ihrer Interaktion mit dem Notch- und dem TGF- β -Signalweg hervorgehoben werden.

1.3.1 HTRA1 und TGF- β

Kontroverse Diskussionen gibt es über die Wirkung von HTRA1 auf den TGF- β -Signalweg. Verschiedene Autoren berichten über eine inhibitorische Wirkung von HTRA1 auf diesen Signalweg. So soll HTRA1 verschiedene Mitglieder der TGF- β -Familie wie bone morphogenic protein 4 (BMP4), growth differentiation factor 5 (GDF5), activin und TGF- β s binden und über eine Abschwächung des TGF- β -Signalweges zu einer gestörten Augenentwicklung im Hühnerembryo (Oka et al., 2004), sowie zur physiologischen Entwicklung und Reifung von neuronalem Gewebe beitragen (Launay et al., 2008). Auch über das Schneiden von proTGF- β 1 und die Regulierung des growth differentiation factor 6 soll HTRA1 den TGF- β -Signalweg inhibierend regulieren (Shiga et al., 2011; Zhang et al., 2012). Neben der Interaktion

mit verschiedenen Signalmolekülen konnten auch die Rezeptoren T β RII und T β RIII als Substrat von HTRA1 nachgewiesen werden. Ihre Inaktivierung durch HTRA1 führte im Experiment zur Inhibierung der Knochenbildung (Graham et al., 2013). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte unser Labor kürzlich zeigen, dass sowohl in vSMC nach HTRA1-Silencing als auch in Arterien von HTRA1^{-/-}-Mäusen erhöhte Spiegel von phosphoryliertem SMAD2/3-Proteinen als Zeichen einer vermehrten TGF- β -Aktivität vorliegen (Klose et al., in Revision). Demgegenüber steht der Nachweis, dass HTRA1 in Fibroblasten durch Schneiden von LTBP-1 (latent TGF- β binding protein 1) TGF- β freisetzen und den Signalwege somit auch aktivieren kann (Beaufort et al., 2014). Auf die Interaktion von HTRA1 mit dem TGF- β -Signalweg führten Lorenzi et al. auch die in Patienten mit Frailty-Syndrom (engl. Frailty = Gebrechlichkeit) erhöhten Level von Plasma-HTRA1 zurück. Dabei soll HTRA1 die immunmodulierende Wirkung von TGF- β aufheben und somit zu einer verstärkten Anfälligkeit für entzündliche Prozesse beitragen (Lorenzi et al., 2016).

1.3.2 HTRA1 und Notch

Unser Labor konnte kürzlich in vaskulären Endothelzellen zeigen, dass der NOTCH-Ligand Jagged1 (JAG1) ein Substrat der Protease HTRA1 ist. HTRA1 konnte dabei über seine PDZ-Domäne an das PDZ-Bindemotiv von JAG1 binden und dessen intrazelluläre Domäne schneiden. Dies hatte die intrazelluläre Degradierung von JAG1 und eine verstärkte Aktivierung des NOTCH-Signalwegs durch DLL4 und NOTCH1 zur Folge (Klose et al., 2018).

In Pankreaskarzinomzellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass HTRA1 die Expression des Rezeptors NOTCH1 beeinflusst (Cheng et al., 2018). Auch in dem durch *NOTCH3*-Mutation verursachten CADASIL-Syndrom scheint es zu Dysregulationen von HTRA1 zu kommen. In den CADASIL-typischen extrazellulären Ablagerungen, dem granulären osmiophilen Material, konnten auch Anreicherungen von proteolytisch nicht aktivem HTRA1 gefunden werden (Zellner et al., 2018).

1.3.3 HTRA1 und extrazelluläre Matrix

Ein Großteil der bekannten Substrate der HTRA1 Protease befindet sich in der extrazellulären Matrix (EZM). Hierzu zählen neben dem erwähnten LTBP-1 unter anderem α 2-Makroglobulin, ADAM9 (a disintegrin and metalloproteinase 9),

Aggrecan, Amyloid-Precursor-Proteinfragment β -Amyloid, Biglycan, Clusterin, Decorin, Fibromodulin, Fibronectin, IBSP (integrin-binding sialoprotein), Kollagen Typ 2, Matrix Gla protein, Nidogen 1, Nidogen 2 und Vitronectin (An et al., 2010; Grau et al., 2005; Grau et al., 2006; Hadfield et al., 2008; Oka et al., 2004; Tiaden et al., 2012; Tsuchiya et al., 2005b; Vierkotten et al., 2011). Da Funktionsstörungen der EZM in zahlreichen Erkrankungen eine tragende Rolle spielen, wurde in den letzten Jahren zunehmend auch die Bedeutung von HTRA1 für die entsprechenden Erkrankungen untersucht. Dabei konnte für mehrere Erkrankungen des Bewegungsapparates eine Beteiligung von HTRA1 festgestellt werden. Bei Patienten mit Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis, Bandscheibendegeneration, Duchenne Muskeldystrophie, sowie mit Gingivitis und Parodontitis wurden in erkranktem Gewebe erhöhte Konzentrationen von HTRA1 und geschnittenen Substraten von HTRA1 gefunden, allerdings ist die exakte Bedeutung für die jeweiligen Pathomechanismen nach wie vor ungeklärt (Lorenzi et al., 2014; Tiaden and Richards, 2013). Die zunehmenden, teils widersprüchlichen, Belege für die Rolle von HTRA1 in der Differenzierung und Regulation von Knochengewebe lassen auch eine Spekulation über eine Beteiligung von HTRA1 an der Entstehung von Osteoporose zu (Hadfield et al., 2008; Li and Zhang, 2015; Tiaden et al., 2012; Tiaden and Richards, 2013; Wu et al., 2014).

1.3.4 HTRA1 in Neoplasien

HTRA1 wurde in verschiedenen Publikationen eine Rolle als Tumorsupressor zugeschrieben. Für diese These spricht, dass seine Expression in diversen Tumorarten vermindert ist und in einigen Fällen negativ mit dem Tumorgrading und der Prognose der Erkrankung korreliert. Die Ursachen für die Herunterregulation von *HTRA1* sind nicht endgültig geklärt, es konnten aber Allelverlust und epigenetisches Silencing beobachtet werden (Chien et al., 2009a; Schmidt et al., 2016). Außerdem konnte eine Überexpression von *HTRA1* die Proliferation von Melanomzellen in vitro sowie das Wachstum von Melanommetastasen in vivo vermindern (Baldi et al., 2002) und inhibierte in Ovarialkarzinomzellen deren Migration (Chien et al., 2009b). Zusätzlich führte eine verminderte *HTRA1*-Expression zu einer abgeschwächten Wirkung der Chemotherapeutika Cisplatin und Paclitaxel auf Tumorzellen. Eine Überexpression hingegen erhöhte die Zytotoxizität der Medikamente. Dementsprechend zeigten Patienten mit Magen- und Ovarialkarzinom, die eine

stärkere Expression von *HTRA1* aufwiesen, eine bessere Ansprechrate als diejenigen mit niedriger *HTRA1*-Expression (Chien et al., 2006). Als möglicher Mechanismus hinter dieser *HTRA1*-regulierten Resistenz wurde von He et al. die Degradierung von XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), einem Protein aus der Familie der Apoptose-Inhibitoren, durch *HTRA1* postuliert (He et al., 2012). Diese verminderte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und eine beschriebene Korrelation zwischen *HTRA1*-Level und Gesamtüberleben in einigen malignen Neoplasien lassen *HTRA1* als potentiellen prognostischen Biomarker erscheinen. Diese Hypothese bedarf aber ebenso wie seine Rolle als Tumorsuppressor und möglicher diagnostischer Biomarker einer Überprüfung durch weitere Studien (Altobelli et al., 2015).

1.3.5 HTRA1 und Makuladegeneration

Polymorphismen in der Chromosomenregion 10q26 wurden in verschiedenen Studien mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer altersbedingten Makuladegeneration (AMD) assoziiert. In dieser Region befindet sich neben dem Gen von *HTRA1* auch *ARMS2* (age-related maculopathy susceptibility 2). Welches der beiden Gene aber kausal mit der Pathogenese der AMD assoziiert ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Friedrich et al., 2011; Grassmann et al., 2017; Kanda et al., 2010; Yang et al., 2006). Während die neueste Studie von Grassmann et al. gegen eine ursächliche Beteiligung von *HTRA1* und für *ARMS2* bei der AMD-Entstehung spricht, wurden seit der erstmaligen Beschreibung der Assoziation auch verschiedene Studien publiziert, die eine Rolle von *HTRA1* in der Pathogenese der AMD zu unterstützen scheinen. So wurde in den Augen von AMD-Patienten eine verstärkte *HTRA1*-Expression gefunden (Tosi et al., 2017; Yang et al., 2006) und eine Überexpression von *Htra1* in Mäusen führte zu krankheitstypischen strukturellen Veränderungen besonders der Bruch-Membran (Jones et al., 2011; Vierkotten et al., 2011). Für einzelne AMD-assoziierte Polymorphismen konnten auch veränderte Struktureigenschaften des *HTRA1*-Proteins gefunden werden, die wiederum zu einer veränderten Interaktion mit dem TGF- β -Signalweg führten (Friedrich et al., 2015). Für eine bessere Bewertung der Bedeutung von *HTRA1* in der Pathogenese der AMD sind weitere Studien notwendig.

1.3.6 HTRA1 und Alzheimer

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Desintegration und anschließenden Proteolyse von Tau-Fibrillen und zur Degradation von extrazellulärem β -Amyloid wird eine Rolle von HTRA1 bei Morbus Alzheimer diskutiert (Grau et al., 2005; Poepsel et al., 2015; Shorter, 2017; Tennstaedt et al., 2012). Für diese These sprechen unter anderem eine vermehrte Expression von *HTRA1* in einem Alzheimer Mausmodell (Searcy et al., 2014), sowie die Beobachtung einer inversen Korrelation zwischen dem HTRA1-Level und der Menge von pathologischem tau-Protein in Patientenproben (Tennstaedt et al., 2012). Darüber hinaus konnte das Apolipoprotein E4 (ApoE4) kürzlich als Substrat von HTRA1 identifiziert werden. Das *APOE4*-Allel gilt als größter genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer Altersdemenz. Die genaue Funktion von ApoE4 in der Alzheimerentstehung ist unklar, allerdings scheint seine Degradierung in verschiedene Fragmente hierbei eine entscheidende Bedeutung zu besitzen (Chu et al., 2016; Rohn, 2013).

1.3.7 HTRA1 und Schwangerschaft

Die Plazenta wurde mehrfach als besonders reich an HTRA1 beschrieben. Dabei gibt es einen kontinuierlichen Anstieg der HTRA1-Konzentration vom ersten bis zum dritten Schwangerschaftstrimester. Bei Schwangeren mit early-onset Präeklampsie konnten sowohl in der Plazenta als auch im Serum der Mutter besonders hohe HTRA1-Level gefunden werden, sodass HTRA1 hier als diagnostischer Marker vorgeschlagen wurde (Marzioni et al., 2012; Teoh et al., 2015). Welche Rolle die Protease bei der Entstehung der Präeklampsie hat, ist nicht bekannt. Eine gestörte Vaskulogenese und Differenzierung von Trophoplasten in *Htra1*-Knockout-Mäusen weist aber auf eine tragende Rolle in der physiologischen Entwicklung der Plazenta hin und macht eine Beteiligung an der Pathogenese der Präeklampsie wahrscheinlich (Hasan et al., 2015).

Die Rolle von HTRA1 in der Mikroangiopathie CARASIL wird gesondert in Kapitel 1.4.1 besprochen.

1.3.8 Phänotyp von *Htra1*^{-/-}-Mäusen

Eine umfassende Beschreibung des Phänotyps von *Htra1*-knockout (*Htra1*^{-/-}) Mäusen lag zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht vor. Erste *Htra1*-knockout Mäuse wurden 2005 von Tsuchiya et al. zur Untersuchung der Rolle von HTRA1 in der Entstehung von Knorpel- und Gelenkschäden generiert (Tsuchiya et al., 2005b). Eine Beschreibung der Mäuse abseits vom HTRA1-Expressionsmuster in Knorpel- und Knochengewebe erfolgte allerdings nicht.

Zhang et al. beobachteten eine gestörte Gefäßentwicklung der Retina in *Htra1*-knockout Mäusen, sowie erhöhte Spiegel von phosphorylierten SMAD-Proteinen in deren Hirngewebe (Zhang et al., 2012). In einer ersten ausführlicheren Beschreibung der Knockout-Mäuse fand Scharrer dagegen einen verminderten Spiegel von phosphorylierten SMAD-Proteinen in verschiedenen Hirnbereichen (Scharrer, 2015). Die von ihr beschriebenen Mäuse waren lebens- und fortpflanzungsfähig, mit einer im Vergleich zum Wildtyp normalen Lebenserwartung und ohne offensichtliche Beeinträchtigungen. Die Untersuchung von charakteristischen Zeichen des HTRA1-assoziierten CARASIL-Syndroms (siehe Kapitel 1.4.1) ergab allerdings eine diffuse Demyelinisierung der weißen Hirnsubstanz, eine Reduktion von α -SMA in Hirngefäßen und reduzierte Expression von Kollagen Typ IV in Gehirnen von *Htra1*^{-/-}-Mäusen. Eine Beeinträchtigung der Plazentaentwicklung konnte bei der Untersuchung der Rolle von HTRA1 in der Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie in *Htra1*-knockout Mäusen beobachtet werden (Hasan et al., 2015).

1.4 Zerebrale Mikroangiopathien

Als zerebrale Mikroangiopathien (engl. cerebral small vessel disease, CSVD) werden alle funktionellen oder strukturellen Pathologien kleiner Arterien, Arteriolen, Kapillaren und kleiner Venen im Hirn zusammengefasst (Pantoni, 2010). Zusammengenommen stellen die zerebralen Mikroangiopathien die neurologische Störung mit der höchsten Prävalenz dar (Thompson and Hakim, 2009). Die Gefäßveränderungen führen über verschiedene Defekte des Hirnparenchyms wie lakunäre Infarkte, Läsionen der weißen Substanz und Blutungen zu diversen neurologischen Beeinträchtigungen der Patienten und spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Entstehung von Schlaganfällen und vaskulären Demenzen. In der Bildgebung stellen sich die Veränderungen typischerweise als Läsionen der

weißen Substanz (engl. white matter lesions) in Form von hypointensen Arealen in der Computertomographie und hyperintensen Arealen in der T2-gewichteten Magnetresonanztomographie dar (Wardlaw et al., 2013).

Die Entstehungsmechanismen der CSVD sind bislang nur wenig verstanden. Während erworbene Mikroangiopathien den größten Anteil der Erkrankungen ausmachen, sind auch verschiedene hereditäre Formen bekannt und die Liste der Gene, die mit CSVD assoziiert sind, wächst zunehmend (Haffner et al., 2016). Eine besondere Rolle spielen die monogenetischen CSVD. Da sie den erworbenen CSVD in vielen Aspekten ähneln, werden sie gern als Modell zur Untersuchung grundlegender Pathomechanismen der CSVD herangezogen. Die wichtigsten Vertreter der monogenen CSVD sind in Tabelle dargestellt. Besondere Bedeutung für die vorliegende Arbeit haben das durch Mutation in *HTRA1* verursachte CARASIL (Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, siehe Kapitel 1.4.1), sowie das klinisch sehr ähnliche CADASIL (Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy).

Trotz unterschiedlicher ursächlicher Mutation führen beide Erkrankungen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der kleinen Hirnarterien mit Degeneration der vSMC und Veränderungen der EZM mit darauffolgenden Infarkten und neurologischer Symptomatik. Wesentliche Unterschiede sind die nur bei CADASIL vorliegenden extrazellulären Ablagerungen von granulärem osmiophilen Material (GOM), die zum Teil aus der akkumulierten Extrazellulärdomäne des mutierten NOTCH3 bestehen, und die nicht-neurologischen Symptome Alopezie und Kreuzschmerzen in CARASIL-Patienten (Chabriat et al., 2009; Tikka et al., 2014).

Tabelle 2: monogene zerebrale Mikroangiopathien, (adaptiert nach Søndergaard (Søndergaard et al., 2017))

	Gen	Wesentliche Merkmale
CADASIL	<i>NOTCH3</i> (Autosomal dominant)	lakunäre Infarkte, Migräne mit Aura, Enzephalopathie, kognitive Störungen und Demenz, motorische Störungen, Ablagerung von GOM
CARASIL	<i>HTRA1</i> (Autosomal rezessiv)	subkortikale und lakunäre Infarkte, früh auftretende Demenz, Gangstörungen, kognitive und motorische Störungen, Kreuzschmerzen, Alopezie
RVCL	<i>TREX1</i> (Autosomal dominant)	Ischämische Schlaganfälle, Pseudotumore, migräneartige Kopfschmerzen, psychiatrische Störungen, Dysarthrie, Hemiparese, Apraxie, Proteinurie, Hämaturie, vaskuläre Retinopathie, Raynaud-Syndrom
Morbus Fabry	α - <i>GAL</i> (X-chromosomal)	TIA, ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle, Neuropathie im Kindesalter, Belastungsintoleranz, Hypohidrose, Angiokeratome, Sehstörungen, GI-Symptome, Niereninsuffizienz, hypertrophe Kardiomyopathie
HCHWA Niederländischer Typ	<i>APP</i> (Autosomal dominant)	Intrazerebrale Hämorrhagien, progressive Demenz
HCHWA Isländischer Typ	<i>CST3</i> (Autosomal dominant)	rezidivierende, häufig tödlich verlaufende intrazerebrale Hämorrhagien
COL4A1 und 2	<i>COL4A1, COL4A2</i> , (Autosomal dominant)	Nephropathien, Aneurysmen, Muskelkrämpfe, subkortikale ischämische und hämorrhagische Infarkte, infantile Hemiparese, Migräne; Sonderform PADMAL: Gangstörung, Dysarthrie, Ataxie, Demenz, Hämaturie, zystische Nierenerkrankung, intrakranielle Aneurysmen, Muskelkrämpfe
FOXC1	<i>FOXC1</i> (Autosomal dominant)	Subkortikale Infarkte, zerebelläre Malformationen, Hörstörungen Axenfeld-Rieger-Syndrom: Missbildungen des vorderen Augenabschnitts, Glaukom, Gesichtsdysmorphismus, Zahnanomalien

Tabelle 2: monogene zerebrale Mikroangiopathien

CADASIL: cerebral autosomal dominant arteriopathy with sub-cortical infarcts and leukoencephalopathy; CARASIL: cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; GOM: granular osmiophilic material; HCHWA: hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis; PADMAL: pontine autosomal dominant microangiopathy and leukoencephalopathy; RVCL: retinalvasculopathy with cerebral leukodystrophy; TIA: transient ischemic attacks

1.4.1 CARASIL

Die zerebrale autosomal rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (engl. **C**erebral **a**utosomal **r**ecessive **a**rteriopathy with **s**ubcortical **i**nfarcts and **l**eukoencephalopathy) ist eine monogenetische Gefäßerkrankung, bei der es zu einer zerebralen Mikroangiopathie mit Entstehung von subkortikalen Infarkten und daraus folgenden zunehmenden neurologischen Beeinträchtigungen, sowie zu Alopezie und Spondylose kommt. Die ersten Symptome entwickeln Betroffene dabei meist im frühen Erwachsenenalter. Die vermutlich ersten Aufzeichnungen über einen CARASIL-Patienten stammen aus den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Nemoto und Maeda berichten hier erstmals über drei Patienten mit Morbus Binswanger-ähnlichen Befunden (Maeda et al., 1965; Nemoto, 1966). Die ausführlichen klinischen und pathologischen Befunde von 2 der 3 Patienten veröffentlichten sie 1976 unter Verwendung des Begriffes „familiäre ungewöhnliche Enzephalopathie vom Binswanger-Typ ohne Hypertension“ (Maeda et al., 1976). Ähnlich wie beim heute als vaskuläre Demenz bezeichneten Morbus Binswanger zeigten diese Patienten neurologische Symptome wie Demenz, Pseudobulbärparese, pyramidale und extrapyramidale Symptome, zusätzlich aber auch Lumbago und Alopezie. Besonders ungewöhnlich war das Fehlen der für eine vaskuläre Demenz ursächlichen Hypertonie und das frühe Auftreten der Symptome bereits im dritten Lebensjahrzehnt. Fukutake et al. publizierten 1985 die Fälle von drei Brüdern mit sehr ähnlichen Symptomen sowie in der Computertomographie sichtbare Schäden der weißen Hirnsubstanz und schlugen daraufhin die Einführung eines neuen Syndroms mit der Bezeichnung „familiäre juvenile Enzephalopathie (Binswanger-Typ) mit Alopezie und Lumbago“ (Fukutake et al., 1985) vor. Das Akronym CARASIL wurde schließlich von Bowler und Hachinski 1994 aufgrund der Ähnlichkeit zum bereits bekannten und dominant vererbten CADASIL (engl. **C**erebral **a**utosomal **d**ominant **a**rteriopathy with **s**ubcortical **i**nfarcts and **l**eukoencephalopathy) vorgeschlagen (Bowler and Hachinski, 1994). Im Gegensatz zu CADASIL war die für CARASIL ursächliche Mutation zu dieser Zeit noch unbekannt und konnte erst 2009 im Gen *HTRA1* gefunden werden (Hara et al., 2009). Die meisten der bisher beschriebenen Fälle kommen aus Japan und China, in den letzten Jahren wurden jedoch auch einige Fälle außerhalb Asiens bekannt (Bayrakli et al., 2014; Bianchi et al., 2014; Mendioroz et al., 2010; Menezes Cordeiro et al., 2015). Insgesamt ist seit 1976 von etwa 50 Patienten mit CARASIL berichtet worden.

1.4.1.1 Klinische Präsentation

Die Symptome der bis 2011 hauptsächlich aufgrund von klinischen, neuroradiologischen und pathologischen Befunden diagnostizierten CARASIL-Patienten wurden von Fukutake et al. zusammengefasst (Fukutake, 2011). Die häufigste Manifestation ist demnach das Auftreten von lakunären Infarkten oder einer schrittweisen Verschlechterung der Hirnfunktionen, gefolgt von zunehmenden kognitiven Defiziten mit Entwicklung einer Demenz. Eine oft bereits in der Adoleszenz einsetzende Alopezie ist das häufigste Initialsymptom, etwa 80 % der Patienten klagen zudem über Schmerzen im unteren Rücken. Keiner der Patienten wies eine Hypertonie auf und auch andere Laborparameter lagen, soweit sie untersucht wurden, im Referenzbereich.

Eine von Nozaki et al. 2014 veröffentlichte Publikation, welche die Symptome der genetisch bestätigten CARASIL-Patienten zusammenfasst und auswertet kam weitgehend zu ähnlichen Ergebnissen (Nozaki et al., 2014). Danach stellen sich die Patienten typischerweise im jungen Erwachsenenalter mit Demenz, Gangstörungen, Alopezie und Schmerzen im unteren Rückenbereich vor. Das Durchschnittsalter beim Auftreten der Demenz lag bei 35,1 Jahren, das bei Auftreten der Gangstörungen bei 30,7 Jahren. Die Schmerzen im unteren Rücken begannen im Mittel im Alter von 24,9 Jahren und ein diffuser Haarausfall setzte im Durchschnitt im Alter von 16,7 Jahren ein. Dabei gab es keine Berichte von Körper- oder Schamhaarverlusten. Beim Großteil der Patienten konnte zum Untersuchungszeitpunkt eine Pseudobulbärparalyse, ein positives Babinski-Zeichen (jeweils in 9 von 13 Patienten) und eine Hyperreflexie (in 12 von 13) festgestellt werden. Außerdem wurden regelmäßig Störungen des Affektes, Harninkontinenz und ein horizontaler Nystagmus festgestellt. Im Verlauf der Erkrankung kam es zu einer zunehmenden Verschlechterung der motorischen und kognitiven Defizite und 7 der 13 Patienten benötigten im Verlauf ihres vierten Lebensjahrzehntes einen Rollstuhl. Im Kontrast zu Fukutakes Befunden waren nur drei der Patienten von einem apoplektischen Insult betroffen, von hämorrhagischen Infarkten wurde nicht berichtet. Hervorzuheben ist, dass auch hier bei keinem der Patienten eine Hypertension, ein Diabetes mellitus oder eine Dyslipidämie, die typischen Risikofaktoren für das Entstehen einer Gefäßerkrankung, vorlag.

1.4.1.2 Neuroradiologie

Die CARASIL-typischen Defekte zeigen sich in der Computertomographie als bihemisphärische, diffuse, homogene und hypodense Veränderungen der weißen Substanz. Diese Läsionen stellen sich in der Magnetresonanztomographie (MRT) in der T2-Wichtung hyperintens dar und befinden sich vorwiegend im frontalen Bereich der weißen Substanz, sowie im anterioren Temporallappen aber auch im Cerebellum, Hirnstamm, Capsula interna und Capsula externa. Lakunäre Infarkte können in den Basalganglien, im Thalamus und in tieferen Schichten der weißen Substanz gefunden werden. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einer diffusen Hirnatrophie und zu Mikroblutungen in Kortex, Thalamus und Kleinhirn. Neben diesen unspezifischen Veränderungen gilt das Vorliegen einer hyperintensiven Läsion, die sich bogenförmig von der Pons zum Pedunculus cerebellaris medius erstreckt und als „arc sign“ bezeichnet wird, als charakteristisch für das fortgeschrittene Krankheitsstadium. In der MRT der Wirbelsäule zeigen sich sowohl zervikal als auch lumbal degenerative Veränderungen der Bandscheiben und der Wirbelkörper (Nozaki et al., 2014; Nozaki et al., 2015).

1.4.1.3 Pathologie

Die pathologischen Veränderungen betreffen bei CARASIL hauptsächlich die Perforansäste der die tieferen Hirnstrukturen versorgenden Hirnarterien. Autopsiebefunde zeigen in diesen Gefäßen typischerweise einen Verlust von glatten Gefäßmuskelzellen, myointimale Verdickungen und eine aufgefächerte, mehrschichtige Lamina elastica interna. Die Lamina adventitia zeigt sich ausgedünnt. Arteriosklerotische Veränderungen kommen in den Hirnarterien nur sporadisch vor und sind meist von mildem Ausmaß. In der weißen Substanz kann regelmäßig eine Abblassung des Myelins und eine Gliose, sowie multiple perivaskuläre Erweichungen festgestellt werden. In der grauen Substanz findet sich mitunter ein neuronaler Zellverlust (Fukutake, 2011; Ito et al., 2016; Nozaki et al., 2014).

1.4.1.4 Pathophysiologie

Die genauen Mechanismen der Krankheitsentstehung sind nicht bekannt und Gegenstand aktueller Forschung. Da die ursächliche Mutation im *HTRA1*-Gen liegt,

steht die hier codierte Serinprotease im Zentrum aller pathogenetischen Überlegungen. Die Mehrheit der bisher identifizierten Mutationen befindet sich innerhalb der oder in enger Assoziation zur Proteasedomäne von *HTRA1*, sodass eine Reduktion oder ein Verlust der Proteaseaktivität von *HTRA1* als krankheitsursächlich angenommen wird (Nozaki et al., 2014). Für einige der beschriebenen Mutationen konnte solch eine verminderte Proteaseaktivität bereits nachgewiesen werden (Hara et al., 2009; Nishimoto et al., 2011). Die Vielzahl der bekannten und teils noch unbekanntem Interaktionen und die unvollständig aufgeklärte physiologische Rolle von *HTRA1* erschweren die Suche nach den pathophysiologischen Folgen eines Defekts der Protease (siehe Kapitel 1.3). Nach aktuellem Forschungsstand spielt eine Beeinflussung des TGF- β -Signalwegs eine zentrale Rolle in der CARASIL-Entstehung. Über eine Interaktion mit verschiedenen Mitgliedern dieses Signalweges kann *HTRA1* hier sowohl inhibierend als auch stimulierend wirken. Ob aber durch den Verlust der Aktivität von *HTRA1* eine Inhibition oder eine Disinhibition dieses Signalweges zur Entstehung von CARASIL führt, wird diskutiert (Beaufort et al., 2014; Liu et al., 2015). Eine erhöhte Konzentration von TGF- β -Proteinen bzw. ihre erhöhte Expression in Proben von CARASIL-Patienten scheinen aber die These der Disinhibition und damit Verstärkung des TGF- β -Signalwegs zu unterstützen (Cai et al., 2015; Hara et al., 2009). Für eine mögliche Beteiligung spricht auch, dass TGF- β zur Pathogenese zahlreicher anderer vaskulärer Erkrankungen beiträgt (Goumans and ten Dijke, 2018). Auch bei den pathologischen Veränderungen des Skeletts könnte TGF- β ursächlich sein, da es eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten spielt (Tang and Alliston, 2013).

1.4.2 CADASIL

Die zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (engl. **C**erebral **a**utosomal **d**ominant **a**rteriopathy with **s**ubcortical **i**nfarcts and **l**eukoencephalopathy) ist eine hereditäre Erkrankung der kleinen Hirnarterien, die bei Patienten zu charakteristischen neurologischen Defiziten im mittleren Erwachsenenalter führt. Die erste Beschreibung erfolgte vermutlich bereits 1955 durch van Bogaert als Form des Morbus Binswanger (Van Bogaert, 1955). In den folgenden Jahren wurden unter verschiedenen Bezeichnungen ähnliche Fälle einer erblichen zerebralen Gefäßerkrankung veröffentlicht (Colmant,

1980; Davous and Fallet-Bianco, 1991; Mas et al., 1992; Salvi et al., 1992; Sonninen and Savontaus, 1987; Sourander and Walinder, 1977; Stevens et al., 1977), bis schließlich 1993 die ursächliche Mutation im *NOTCH3*-Gen entdeckt und die Bezeichnung CADASIL etabliert wurde (Tournier-Lasserre et al., 1993). Nach heutigem Forschungsstand kommt CADASIL in allen ethnischen Gruppen vor und ist die häufigste hereditäre Ursache von Schlaganfällen und vaskulären Demenzen mit einer regional stark schwankenden Prävalenz von 1,32 / 100 000 Einwohnern in Nordost-England (Narayan et al., 2012) über 4 / 100 000 in Finnland (Mykkänen et al., 2004) bis hin zu Berichten von 14 / 100 000 auf der Insel Gran Canaria (Tikka et al., 2014).

1.4.2.1 Klinische Präsentation

Die klinische Symptomatik unterscheidet sich mitunter stark zwischen den betroffenen Familien und auch innerhalb dieser. Trotz allem können aber gewisse Symptome als charakteristisch für das Syndrom bezeichnet werden. Das zuerst auftretende Symptom ist häufig eine Migräne mit Aura. Diese liegt in 20 – 40 % der CADASIL-Patienten vor und tritt im Durchschnitt erstmals im Alter von 30 Jahren auf. Der meist visuellen oder sensorischen Aura von 20 – 30 min Länge folgt dabei ein für wenige Stunden anhaltender Kopfschmerz (Chabriat et al., 1995a; Vahedi et al., 2004). Regelmäßig kommt es aber auch zu schweren Migräneattacken mit unter anderem Hemiplegie, Meningismus oder sogar komatösen Zuständen (Feuerhake et al., 2002; Schon et al., 2003). Migräneattacken ohne Aura treten bei CADASIL-Patienten nicht häufiger auf als in der Normalbevölkerung.

70 – 85 % der Patienten erleiden ischämische Schlaganfälle oder transitorische ischämische Attacken (TIA). Damit stellen diese die häufigste CADASIL-Manifestation dar (BOUSSER and TOURNIER-LASSERVE, 2001; Chabriat et al., 1995b; Dichgans et al., 1998). Das Durchschnittsalter beim ersten ischämischen Ereignis lag bei 49 Jahren. Die Mehrheit der Patienten erleidet im Krankheitsverlauf mindestens zwei Schlaganfälle, die sich in aller Regel als subkortikale lakunäre Infarkte darstellen und häufig zu Gangstörungen, Kontinenzstörungen und Pseudobulbärparalysen führen (Opherck et al., 2004).

Affektive Störungen treten in 20 % der Patienten auf. In aller Regel handelt es sich dabei um depressive Episoden, gelegentlich auch im Wechsel mit manischen Phasen (Desmond et al., 1999; Kumar and Mahr, 1997). Unabhängig von einer

Depression konnte in 40 % der CADASIL-Patienten außerdem eine Apathie beobachtet werden (Reyes et al., 2009).

Die zweithäufigste klinische Präsentation stellen kognitive Beeinträchtigungen dar. Zu Beginn sind dies insbesondere exekutive Dysfunktionen, die sich besonders durch eine Veränderung der Verarbeitungsgeschwindigkeit sowie durch Beeinträchtigungen von Konzentrationsfähigkeit und Gedächtnis zeigen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es in der Regel zu einer Ausweitung der Beeinträchtigungen auf alle kognitiven Domänen und zur Ausbildung einer Demenz, wobei im Unterschied zur Alzheimer-Demenz die Bereiche des semantischen Gedächtnisses und die Wiedererkennung häufiger vergleichsweise unbeeinträchtigt bleiben (Buffon et al., 2006; Nils Peters et al., 2005; Taillia et al., 1998).

Andere klinische Symptome sind selten, wobei das Fehlen von extrazerebralen Krankheitsmanifestationen als weiteres charakteristisches Merkmal von CADASIL betrachtet werden kann.

1.4.2.2 Neuroradiologie

Zum Nachweis struktureller Veränderungen infolge zerebraler Mikroangiopathien dient standardmäßig die MRT. Typisch aber nicht spezifisch für CADASIL-Patienten sind dabei subkortikale hyperintense Signale, lakunäre Läsionen und Mikrohämorrhagien, sowie Hirnatrophie in der T2-Wichtung und der FLAIR-Sequenz (Fluid-Attenuated Inversion Recovery). Insbesondere Schäden in der temporopolen Region und der Capsula externa scheinen mit CADASIL assoziiert zu sein (Auer et al., 2001; Bersano et al., 2018; Salamon, 2014). Die Läsionen lassen sich in aller Regel bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisen und liegen bei allen Mutationsträgern spätestens im Alter von 35 Jahren vor (Bousser and Tournier-Lasserre, 1994; Chabriat et al., 1998; Tournier-Lasserre et al., 1993). Auch die Diffusionsbildgebung (DWI, diffusion-weighted imaging) und vor allem ihre Weiterentwicklung, die Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI, diffusion tensor imaging) spielen in der CADASIL-Diagnostik eine zunehmende Rolle (Baykara et al., 2016; Mascalchi et al., 2017). Die DTI ermöglicht es unter anderem, Schäden der weißen Substanz zu quantifizieren. Das Volumen der Läsionen und die Hirnatrophie sind dabei von allen Befunden der Bildgebung am stärksten mit dem klinischen Defizit assoziiert (Croall et al., 2017; Duering et al., 2011; Jang and Seo, 2015; Viswanathan et al., 2010).

1.4.2.3 Pathologie

Makroskopisch zeigen sich typische Zeichen einer zerebralen Mikroangiopathie wie eine Rarefizierung der weißen Substanz, lakunäre Infarkte in der weißen Substanz und den Basalganglien und eine Hirnatrophie. Mikroskopisch zeigt sich eine Arteriopathie der kleinen penetrierenden Hirnarterien mit Verdickung und Fibrosierung der Gefäßwand, Veränderungen der Media mit Untergang von vSMC und Ablagerung von extrazellulärer granulärer osmiophiler Granula (GOM) innerhalb der Media bis in die Adventitia (Baudrimont et al., 1993; Craggs et al., 2014; Kalimo et al., 2002; Okeda et al., 2002). Auch wenn ein wesentlicher Bestandteil der krankheitsspezifischen GOM akkumulierte NOTCH3-Extrazellulärdomänen zu sein scheinen, ist die genaue Zusammensetzung weiterhin unbekannt (Ishiko et al., 2006; Joutel et al., 2000). Da sie auch in Arterien außerhalb des Hirns nachweisbar sind, kann der Nachweis von GOM aus Hautbiopsien auch in der Diagnostik angewendet werden (Ruchoux et al., 1994).

1.4.2.4 Pathophysiologie

Die Pathogenese von CADASIL ist trotz zahlreicher Studien weiterhin schlecht verstanden. Obwohl die ursächlichen Mutationen ausschließlich das *NOTCH3*-Gen betreffen, scheint ein Verlust der Rezeptorfunktion von NOTCH3 und damit eine Unterbrechung des Notch-Signalwegs nicht, oder zumindest nicht ausschließlich für die Krankheitsentstehung verantwortlich zu sein (Chabriat et al., 2009). Da allen bekannten Mutationen eine Akkumulation von, NOTCH3-EZD-Aggregate beinhaltendem, GOM folgt, spielen diese Ablagerung eine entscheidende Rolle in den aktuellen Erklärungsmodellen. Zur Erklärung mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen mit Fehlfaltungen von Proteinen wird angenommen, dass die fehlgefalteten Proteine nicht nur untereinander aggregieren, sondern auch Interaktionspartner binden und so zu Dysfunktionen dieser Proteine und Zytotoxizität führen (Yang and Hu, 2016). Diese Sequestrierung anderer extrazellulärer Proteine konnte auch in GOM von CADASIL-Patienten nachgewiesen werden (Joutel et al., 2016; Monet-Leprêtre et al., 2013). Unter den zahlreichen Faktoren, die mit NOTCH3-EZD in GOM kolokalisiert sind, konnte bislang nur für zwei ein Zusammenhang mit Gefäßdysfunktionen gefunden werden. Zum einen konnte für den Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 3 (TIMP3, tissue inhibitor of

metalloproteinase-3) eine Bedeutung als Regulator der zerebralen Hämodynamik nachgewiesen werden (Capone et al., 2016a; Capone et al., 2016b). Zum anderen konnte kürzlich auch für HTRA1 eine Anreicherung in GOM mit folgendem Funktionsverlust gezeigt werden, was Spekulationen zu einem möglicherweise ähnlichen Pathomechanismus hinter sowohl CADASIL als auch CARASIL zulässt (Zellner et al., 2018).

1.5 Zielsetzung

Die Rolle der Serin-Protease HTRA1 unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Das Expressionsmuster sowie die Assoziation zu Gefäßerkrankungen wie AMD und CARASIL deuten auf wichtige Aufgaben der Protease in der Aufrechterhaltung der normalen Gefäßfunktion hin. Welche Wirkung HTRA1 auf die verschiedenen zellulären Bestandteile der Gefäßwand hat, ist allerdings unbekannt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Interaktion von HTRA1 und JAG1 in Gefäßendothelzellen nachweisen, die zur Degradation des Notch-Liganden und damit Beeinflussung des Notch-Signalwegs führt. Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Gefäßentwicklung und -homöostase und Mutationen des Rezeptors NOTCH3 sind die Ursache für das phänotypisch CARASIL sehr ähnliche Syndrom CADASIL. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu Defekten kleiner Hirnarterien mit Verlust von glatten Gefäßmuskelzellen. Aus diesem Grund stellen wir die Hypothese auf, dass HTRA1 in vSMC durch Regulation von JAG1 für die Feinabstimmung der NOTCH3-Aktivität notwendig ist und hierüber Einfluss auf die Funktionen glatter Gefäßmuskelzellen nimmt.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb zunächst das Verhalten von vSMC mit unterschiedlicher Expression von *HTRA1* in verschiedenen Zellkulturversuchen untersucht werden. Zusätzlich soll durch Expressionsanalysen evaluiert werden, ob auch in vSMC eine Beeinflussung des Notch-Signalwegs durch die verschiedenen *HTRA1*-Expressionsniveaus nachgewiesen werden kann und welche anderen Marker ggf. beeinflusst werden.

Die Überprüfung der Funktionalität von HTRA1-defizienten vSMC *in-vivo* soll in einem Mausexperiment erfolgen. Hierbei wird in den Versuchstieren eine Hypertonie induziert und Unterschiede in der Blutdruckregulation zwischen *Htra1*^{-/-}-Mäusen und *Htra1*^{+/+}-Mäusen untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	Serva, Heidelberg
Agarose	$((C_{12}H_{18}O_9)_n)$	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz		Carl Roth
Blasticidin-S-Hydrochlorid		Carl Roth
Borsäure	H_3BO_3	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Carl Roth
D (+)-Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma Aldrich
DAPI		Carl Roth
Desoxycorticosteron-Azetat (DOCA)		Innovative Research of America
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich
EGTA		Sigma Aldrich
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Carl Roth
Ethanol 96%	C_2H_5OH	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Merck
Glycerol	$C_3H_8O_3$	Carl Roth
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Carl Roth
Hoechst (Kernfärbung)		Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	$(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$	Sigma Aldrich
Isopropanol	C_3H_8O	Merck
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck
Kalziumchlorid	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich
Kanamycin		Carl Roth
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Sigma-Aldrich
Manganchlorid	$MnCl_2$	Sigma-Aldrich
Methanol	CH_3OH	Sigma Aldrich

Methylcellulose		Sigma-Aldrich
MTT	$C_{18}H_{16}BrN_5S$	Sigma Aldrich
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	$NaCl$	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	$C_{4}H_{39}NaO_4$	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Serva
Natriumhydroxid	$NaOH$	Carl Roth
Natriumorthovanadat	Na_3VO_4	Sigma Aldrich
Nonidet-P40		Amres _{co}
Penicillin/Streptomycin		Life Technologies
Polyethylenimin (PEI)	$(C_2H_5N)_n$	Polysciences
Ponceau S-solution (0.1 %)	$C_{22}H_{16}N_4Na_4O_{13}S_4$	AppliChem
Puromycin		PAA Laboratories
Salzsäure 37%	HCl	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Carl Roth
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Sigma-Aldrich
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Sigma-Aldrich
Trypanblau	$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$	Sigma-Aldrich
Tween-20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	Sigma-Aldrich

2.1.2 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories
AceGlow Chemilumineszenzsubstrat	Peqlab Biotechnology
Cell Tracker Red CMTPIX	Life Technologies
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Eurofins MWG operon
DNA Marker: DNA Ladder Mix	Fermentas
ECL Western-Blot Detektionsreagenz	Pierce
Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Biochrom
FITC-konjugiertes Lektin (L9381)	Sigma Aldrich
Fluorescent Mounting Medium (Eindeckmedium)	DAKO
Gelatine, Typ-B	Sigma-Aldrich
Luria Bertani Agar: LB Agar	Sigma-Aldrich
Luria Bertani Medium: LB Broth	Sigma-Aldrich

Magermilchpulver	Gerbu Biotechnik
Matrigel Matrix (growth factor reduced)	BD Biosciences
Oligofectamin	Life Technologies
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Power SYBR Green PCR Mix	Life Technologies
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese-Gel 30	Carl-Roth
Taq-Polymerase und -Puffer	Peglab Biotechnology
Trypsin-EDTA 0.05 %	Life Technologies
Ziegenserum (10%, ready-to-use)	Zymed Corporation

2.1.3 Puffer und Lösungen

Blotpuffer (10x)

250 mM Tris
1,4 M Glycin

Elektrophoresepuffer (10x)

(in 1l H₂O gelöst)
144 g Glycin
30 g Tris
10 g SDS

ELISA-Lysepuffer

200 mM NaCl
75 mM Tris
15 mM NaF
1,5 mM Na₃VO₄
7,5 mM EDTA
7,5 mM EGTA
1,5 % Triton X-100
0,75 % Igepal CA-630
Protease Inhibitor Cocktail

Ladepuffer (6x)

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
50 % (w/v) D (+)-Saccharose
0,1 M (w/v) EDTA

Laemmli-Probenpuffer (5x)

250 mM Tris/HCL pH 6,8
0,5 M DTT
50 % Glycerin
10 % SDS
0,5 % Bromphenolblau

PBLEC-Puffer

(in PBS; wird auf pH 6,8 eingestellt)

1 % Triton X-100
0,1 mM CaCl₂
0,1 mM MgCl₂
0,1 mM MnCl₂

PBS (10x)

(wird auf pH 7,4 eingestellt)

1,4 M Natriumchlorid
27 mM Kaliumchlorid
81 mM Na₂HPO₄*2H₂O
17 mM KH₂PO₄

PBST (1x)

1x PBS
0,05 % Tween-20

Ponceau-S Färbelösung

0,5 % Ponceau-S Lösung
1 % Essigsäure

SB-Puffer (20x)

(wird auf pH 8,0 eingestellt)

400 mM NaOH
800 mM Borsäure

TAE-Puffer (10x)

(wird auf pH 7,8 eingestellt)

400 mM Tris
20 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

TBST

(wird auf pH 7,5 eingestellt)

10 mM Tris-HCl
75 mM NaCl
0,1 % Tween-20
1 mM EDTA

TE Puffer (1x)

(wird auf pH 8,0 eingestellt)

10 mM Tris

1 mM EDTA

Überschichtungslösung

(in DMEM mit Glutamax)

0,4 % Agarose

2,5 % FCS

1 % Penicillin/Streptomycin

MTT-Lösung

(in 1l ddH₂O)

5g Tetrazoliumbromid

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryo-Röhrchen	Sigma Aldrich
Dako Pen	Dako
Objekträger	Langenbrinck
Paraffinfilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte
PCR-Röhrchen	Brand
Petrischalen 100 mm	BD Bioscience
Petrischalen 100 mm	Greiner Bio-One
Petrischalen 150 mm	Greiner Bio-One
Petrischalen, rechteckig	Greiner Bio-One
Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	BD Bioscience
Pipettenspitzen, mit Filter: 10 µl, 100 µl, 1 ml	Biozym
Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml	Eppendorf
PVDF-Membran	Millipore Corporation
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Transwell®, 6,5 mm Insert, 8.0 µm Porengröße	Costar Corning
Whatman® 3MM Chromotographie Papier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Greiner Bio-One,
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Costar Corning
Zellkulturplatten	BD Bioscience
Zellschaber	BD Bioscience
Zentrifugationsröhrchen: 15 ml, 50 ml	BD Bioscience

2.1.5 Zellkulturmedien und -lösungen

Name	Hersteller
Complete Classic Medium 4Z0 500	Cell Systems
DMEM, low glucose, GLUTMAX	Thermo Fisher Scientific
Endothelial Cell Endopan3 Basal Medium (ECBM)	PAN-Biotech
Medium-199 (10x)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM Gibco®	Life Technologies
Phosphatpuffer (PBS) Gibco®	Life Technologies

2.1.6 Molekularbiologische Kits

Name	Hersteller
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen
High Capacity cDNA RT Kit	Life Technologies
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
QIAmp® DNA Mini Kit	Qiagen
Quick Blunting Kit	New England Biolabs
Quick Ligase Kit	New England Biolabs
RNeasy Mini Kit	Qiagen

2.1.7 Oligonukleotidprimer

Primer für Humangene

Name	Sequenz
hOAZ (fw)	5'-GAGCCGACCATGTCTTCATT-3'
hOAZ (rev)	5'-CTCCTCCTCTCCCGAAGACT-3'
hHES1-for	5'-TCAACACGACACCGGATAAA-3'
hHES1 (rev)	5'-CCGCGAGCTATCTTTCTTCA-3'
hHES5 (fw)	5'-GCATGGCCCCCAGCA-3'
hHES5 (rev)	5'-ACGAAGGCTTTGCTGTGCTT-3'
hHEYL (fw)	5'-GCAAGCCAGGAAGAAACACA-3'
hHEYL (rev)	5'-AGAATCCTGTCCCACCAGTG-3'
hHTRA1 (fw)	5'-TGGAAATCTCCTTTGCAATCC-3'
hHTRA1 (rev)	5'-ACGCTCCTGAGATCACGTCT-3'
h α -SMA (fw)	5'-CTGTTCCAGCCATCCTTCAT-3'
h α -SMA (rev)	5'-CCGTGATCTCCTTCTGCATT-3'

hSMTN (fw)	5'-CCTGGTGCACAACCTTCTTCC-3'
hSMTN (rev)	5'-AAGACACACTTGGGGTCAGG-3'
hCNN1 (fw)	5'-GGAGCTGAGAGAGTGGATCG-3'
hCNN1 (rev)	5'-GTGCCAATTTTGGGTTGACT-3'
hMYH11 (fw)	5'-GTGAACGCACTCAAGAGCAA-3'
hMYH11 (rev)	5'-TATTCCTGGCCTTGGTTCC-3'

Primer für Mausgene

Name	Sequenz
mGAPDH (fw)	5'- AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'
mGAPDH (rev)	5'- ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'
mHTRA1 (fw)	5'-CGTACCACGCTCCTGTCTTT-3'
mHTRA1 (rw)	5'-CACTACGCATTGCAGCCCCTC-3'
mHTRA1-KO (fw)	5'-AATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTT-3'
mHTRA1-KO (rev)	5'-TGTGCACGCCGTCGTAAGT-3'

2.1.8 siRNA und shRNA

Um die Expression von HTRA1 in kultivierten HUASMC zu vermindern, kamen sowohl small interfering RNAs (siRNAs) als auch short hairpin RNAs (shRNAs) zum Einsatz. Die siRNAs wurden dabei mittels Transfektion direkt in die Zellen übertragen. Die shRNA wurde hingegen mittels eines Lentivirus übertragen.

siRNA

Gen	Sequenz	Hersteller	Katalog-Nr.
hHTRA1	GAAGUUAUUGGUAUCCGAtt	Ambion	s11279
	GCCCGUUAGUAAACCUGGAtt	Ambion	s11280
	AUAUCGAAUUGUUUCGCAAtt	Ambion	s11281

shRNA

Gen	Bezeichnung	Sequenz FOR
HTRA1	shHTRA1S8	CCGGCCCAACAGTTTGCGCCATAAACTCGAGTTTATGG CGCAAACCTGTTGGGTTTTTG

2.1.9 Antikörper

Name	Spezies	Herkunft
anti-HTRA1	Maus	R&D Systems, MAB2916
anti-GAPDH	Maus	Abcam, ab8245
Anti-Actin, α -Smooth Muscle - Cy3	Maus	Sigma-Aldrich, C6198
anti-SM22 α	Kaninchen	Abcam, ab137453
Anti -Smooth Muscle Myosin	Maus	eBioscience, 14-6400
anti-rabbit Ig, HRP	Ziege	DAKO
anti-mouse Ig, HRP	Ratte	DAKO
Anti-mouse Ig, Alexa Flour 488	Ziege	Invitrogen

2.1.10 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
plkoLV	Lentiviraler Vektor plko1.puro ohne Insert; dient als Leervektorkontrolle; Resistenz Ampicillin/Puromycin	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Hahn, ZKF, Bochum
plko shHTRA1 S8	Lentivirales Plasmid, das für eine shRNA gegen HTRA1 kodiert; Resistenz Ampicillin/Puromycin	Linda Trübestein, AG Ehrmann, Universität Duisburg-Essen
pmd2.G	Kodiert für das lentivirale Glykoprotein VSVG	Addgene
pspax2	Kodiert verschiedene lentivirale Strukturproteine und Enzyme (gag, pol und env)	Addgene

2.1.11 Zellen und Bakterien

Zelltyp	Herkunft
Human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC)	Laborbestand
Human embryonic kidney A (HEK 293A)	Invitrogen
Human embryonic kidney T (HEK 293T)	Laborbestand
Escherichia coli (E. coli) Stab13	Life Technologies

2.1.12 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Brutschrank Hera cell 250	Thermo Scientific
Brutschrank	Memmert
Cell Observer Mikroskop	Zeiss
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad
Feinwaage	Kern & Sohn
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr
Gefrierschrank, -80°C	Eppendorf
Geldokumentation	Intas Science Imaging
Gelelektrophorese Equipment	StarLab
Hamilton Spritze	Hamilton
Heizblock	Carl Roth
Kolben 1 L, 0,5 L, 0,1 L, 0,05 L	Schott
Konfokalmikroskop LSM700	Carl Zeiss
Kühlschrank, 4°C	Liebherr
Laborwaage PC 2200	Mettler Toledo
Magnetrührer	Janke and Kunkel
Mikroskop ECLIPSE TS100	Nikon
Mikroskop IX50	Olympus
Milli-Q Wasseraufbereitungssystem	Millipore
Minizentrifuge	Biozym
Mithras LB940	Berthold Technologies
Nanodrop1000	Thermo Scientific
Netzteil Electrophoresis power supply EV231	Consort
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
NIBD System	Panlab
PCR Cycler	Bio-Rad
pH-Meter	Metrohm
Photometer	Eppendorf
Protein-Elektrophorese Mini-PROTEAN	Bio-Rad
Quarzküvette	Biometra
Real-time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems
Schüttler Silent rocker	Cti
Sterilbänke Safe 2020	Thermo Fisher Scientific

Thermomixer HLC	Biotech
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Thermo Scientific
Vortex Mixer	Scientific Industries
Wasserbad SW20	Julabo
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich

Software	Entwickler
Cell [^] P Software	Olympus
EndNote [®] X8	Thomson Reuters
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
ImageLab 3.0	BioRad
Microsoft Office 2013-2016	Microsoft Corp.
StepOnePlus v2.3	Applied Biosystems
Zen 2012 (black edition)	Carl Zeiss

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung von HUASMC

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden aus maximal 24 Stunden alten anonymisierten Nabelschnüren aus der Frauenklinik der Universitätsklinik Heidelberg gewonnen (HUASMC, human umbilical artery smooth muscle cells). Die arteriellen Gefäße der Nabelschnur wurden freipräpariert und in Ringe von 0,2 – 0,4 cm Dicke geschnitten. Diese wurden in eine Zellkulturplatte überführt und nach kurzem Antrocknen mit DMEM low glucose mit 15% FCS und Penicillin-Streptomycin-Mix bedeckt. Nach 1 – 2-wöchiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Ringe entfernt und die inzwischen aus den Ringen migrierten HUASMC weiter kultiviert bis eine Konfluenz des Kulturgefäßes erreicht wurde. Im Anschluss wurden die Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben der Kryokonservierung zugeführt.

2.2.1.2 Kultivierung von HUASMC, HEK293A und HEK 293T

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. HUASMC wurden bis zur vierten Passage verwendet und in DMEM (1g/L Glukose) mit 15 % FCS kultiviert. HEK293A und HEK 293T-Zellen wurden in DMEM (4,5 g/L Glukose) mit 10 % FCS kultiviert. Zu jedem Medium wurden 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

Für die Zellpassage und die Vorbereitung von Experimenten wurde bei den HUASMC und den HEK293A-Zellen zunächst das Medium abgesaugt und einmalig mit PBS gewaschen. Danach wurde Trypsin zugefügt und die Zellen bis zur Ablösung bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Der Trypsinierungsprozess wurde anschließend bei HUASMC durch das beschriebene Zellkulturmedium, bei HEK293A durch 10 % FCS in PBS abgestoppt und die entstandene Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit dem jeweiligen Medium resuspendiert.

Mittels einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellkonzentration bestimmt. Hierfür wurde zunächst zur Markierung von avitalen Zellen der Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Im Anschluss wurden die durchschnittliche Anzahl vitaler Zellen pro Zählfeld ermittelt. Da die Zellsuspension durch das Trypanblau verdünnt wurde und ein Zählfeld ein Volumen von je 0,1 µl fasst, musste das Ergebnis im Anschluss mit $2 \cdot 10^4$ multipliziert werden, um die Zellzahl pro Milliliter zu errechnen.

2.2.1.3 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung von HUASMC bei -180 °C in Flüssigstickstoff wurden diese wie oben beschrieben zunächst gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit Kulturmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und nach Überführung in Kryoröhrchen in Isopropanolbehältern auf -80 °C abgekühlt. Am Folgetag wurden die Röhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch zügige Erwärmung bei 37 °C im Wasserbad. Nach Hinzufügen von Kulturmedium zur Pufferung der toxischen Wirkung des DMSO wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert, um die Zellen ihrer geplanten Verwendung zuzuführen.

2.2.1.4 Herstellung und Transduktion von Adenoviren

Die Herstellung des Adenovirus erfolgte im Vorfeld durch den Laborkollegen Adam und wurde bereits anderswo beschrieben (Klose et al., 2018). Zur Vermehrung des Virus wurden mit der im Laborbestand vorliegenden Viruslösung HEK293A-Zellen transduziert. Diese bildeten in der Folge nach etwa 2 Tagen Plaueformationen. Das Medium und die verbleibenden Zellen wurden gesammelt und dreimalig eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Adenoviruspartikel und wurde bei -80°C eingefroren. Um den Titer der Lösung zu bestimmen, wurden 10⁶ HEK293A-Zellen pro 6-well-Kulturschale ausgesät und mit Verdünnungsstufen zwischen 10⁻⁹ bis 10⁻⁴ der Viruslösung transduziert. Nach 48 Stunden wurde das alte Medium entfernt und neues Medium mit 0,4 % Agarose zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Zellen mit 5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) angefärbt und die Plaques ausgezählt, um den Titer zu bestimmen.

Für die Transduktion von HUASMC wurden 20 x 10⁴ Zellen pro 6-well-Kulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und Viruslösung entsprechend einer MOI von 50 zum Medium hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS neues Medium hinzugefügt. 48 Stunden nach Transduktion wurde mit den funktionellen Assays begonnen oder die Zellen für qPCR und Western-Blot geerntet.

2.2.1.5 Herstellung und Transduktion von Lentiviren

Zur dauerhaften Reduktion der Biosynthese von HTRA1 in den Versuchszellen wurde mit Hilfe des ViraPower Lentiviral Expression Systems (Invitrogen) ein shRNA exprimierender Lentivirus geschaffen. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit 3 verschiedenen Plasmiden transfiziert. Das pLKO shHTRA1 S8 Plasmid enthielt die sequenzspezifische shRNA gegen HTRA1 sowie ein Ampicillin/Puromycin Resistenzgen. Das pmd2.G Plasmid kodierte für das Glykoprotein VSVG (vesicular stomatitis virus G), das für die Virusaufnahme von Bedeutung ist. Das pspax2 Plasmid hingegen trug Gene, die verschiedene Strukturproteine und Enzyme des Virus kodierten (gag, pol und env). Als Transfektionsreagenz wurde Polyethylenimin verwendet. 12 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. 36 Stunden nach Transfektion wurde der Überstand gesammelt und frisches Medium zu

den Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneut das Medium abpipettiert und mit dem bei 4 °C gelagerten Medium vom Vortag gemischt, die verbliebenen Zellen wurden entsorgt. Das gewonnene Medium wurde bei einer Porengröße von 0,45µm sterilfiltriert und bei 4 °C und 27500 rpm für 2,5 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Ultrazentrifugationsröhrchen zum Trocknen für 20 min invers auf Papiertücher aufgestellt. Anschließend wurden die Pellets in je 70 µl PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden 150 000 HUASMC in 6-well-Kulturschalen ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Viruslösung zwischen 10^{-2} und 10^{-6} transduziert. Eine Schale wurde als Kontrolle nicht transduziert. Nach 48 Stunden wurde das Medium durch ein Puromycin enthaltendes Selektionsmedium ersetzt. Dieses wurde alle 3 Tage erneuert. Nach 10 Tagen waren sämtliche Zellen der Kontrolle abgestorben, während sich in den anderen Schalen Kolonien gebildet hatten. Diese wurden mittels einer Kristallviolett-Lösung (5 mg/ml in 2% Ethanol) angefärbt und für die Titerbestimmung ausgezählt.

Für die Transduktion von HUASMC wurden 20×10^4 Zellen pro 6-well-Kulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und Viruslösung entsprechend einer MOI von 10 zum Medium hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt. 48 Stunden nach Transduktion wurde mit den funktionellen Assays begonnen oder die Zellen für qPCR und Western-Blot geerntet.

2.2.1.6 Transfektion mit small interfering RNA

Die Verminderung der Genexpression von HTRA1 wurde auch durch den Einsatz von *small interfering RNA (siRNA)* erreicht. Für die Transfektion der HUASMC wurden 120000 Zellen in 6-well-Kulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde ein siRNA-Mix, bestehend aus 10µl siRNA und 175µl Opti-MEM, und ein Transfektions-Mix aus 12 µl Oligofectamin und 3µl Opti-MEM pro Schale vorbereitet. Die beiden Lösungen wurden nach 10 min bei Raumtemperatur zusammengeführt und abermals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und mit 800µl Opti-MEM bedeckt, bevor die Transfektionslösung hinzugefügt wurde. Vier Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch frisches DMEM mit 15 % FCS ersetzt. Bei Verwendung der Zellen für Migrations-, Proliferations- und Sprouting-Spheroid-Assays wurden diese 24 Stunden

nach Transfektion angesetzt. Alle übrigen Anwendungen erfolgten 48 Stunden nach Transfektion.

2.2.1.7 Immunfluoreszenzfärbung

Die Färbung von HUASMC erfolgte auf mit Gelatine bedeckten Deckgläsern. Hierfür wurden die Deckgläser zunächst in 24-well-Kulturschalen überführt und mit Ethanol desinfiziert, bevor sie nach zweimaligem Waschen mit PBS mit je 500 µl einer 0,2%-igen Gelatine-Lösung bedeckt wurden. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden die Deckgläser erneut zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen darauf ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen nach Waschung mit PBS mit 4 % PFA für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und 0,1 % Triton in PBS für 3 min appliziert. Nach einer weiteren PBS-Waschung erfolgte das Blocken der Zellen durch 3 % BSA in PBS für eine Stunde. Für die einfache Anfärbung von F-Actin mittels Phalloidin wurden die Deckgläser nun mit Alexa Fluor 568-konjugiertem Phalloidin (Invitrogen) 1:200 für 2 Stunden unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zellen wurden hiernach dreimalig für je 5 min mit PBS gewaschen, dann für 10 min mit DAPI 1:5000 inkubiert und nochmals dreimalig für je 5 min mit PBS gewaschen. Nach Fixierung der Deckgläser auf Objektträgern mittels Eideckmedium konnten diese vor Licht geschützt gelagert und mikroskopiert werden. Bei Färbung mit Antikörpern gegen α -SMA (Sigma, C6198), Myosin (eBioscience, 14-6400) und Sm22a (Abcam, ab137453) wurden diese analog dem obigen Vorgehen anstelle des Phalloidins aufgetragen und die Deckgläser anschließend bei 4 °C über Nacht inkubiert. Hierbei wurden die Informationen der entsprechenden Datenblätter berücksichtigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die Zellen mit dem jeweils passenden Sekundär-Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläser wie oben beschrieben gewaschen, mit DAPI inkubiert und nach erneuter Waschung auf Objektträgern fixiert.

2.2.2 Molekularbiologische und Biochemische Methoden

2.2.2.1 Hitzeschock-Transformation und Plasmidisolierung

Voraussetzung für die Herstellung des shHTRA1 exprimierenden Lentivirus war die Amplifikation des pLKO Expressionsplasmides in dem kompetenten Bakterienstamm E.coli Stbl3. Das Einbringen des Plasmids in die Bakterien erfolgte dabei durch eine Hitzeschock-Transformation. Zunächst wurden die E. coli langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 50 ng Plasmid in 50 µl der Bakterienlösung gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock durch eine Inkubation im 42 °C warmen Wasserbad für 60 Sekunden. Nachdem die Reaktionsgefäße für 2 min auf Eis abgekühlt waren, wurden 500 µl LB-Medium hinzugefügt und die Lösung für 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 min. 500 µl Überstand wurden verworfen, die transformierten Bakterien mit 500 µl LB-Medium resuspendiert und auf mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versetzten Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden einige der entstandenen Bakterienkolonien in Reaktionsgefäße mit je 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und erneut über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmide mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems (Promega) nach Herstellerangaben.

2.2.2.2 RNA-Isolierung

Aus kultivierten HUASMC wurde unter Zuhilfenahme des InnuPrep RNA Mini kit (Analytic Jena) nach den Herstellerangaben RNA isoliert. Dabei wurden die Zellen zunächst zweimalig mit PBS gewaschen bevor sie mit einem vom Hersteller bereitgestellten Puffer lysiert wurden. Durch Anwendung eines Silico-Filters wurde zunächst die genomische DNA aus dem Lysat gefiltert. Danach wurde 70 % Ethanol im Verhältnis 1:1 zugesetzt und die Lösung erneut durch eine Membran gefiltert, in der diesmal die RNA gebunden wurde. Nach mehreren Schritten der Aufreinigung wurde die RNA schließlich in 30 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und die RNA-Konzentration mittels Spektrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific), wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben, bestimmt.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte mit dem Nanodrop1000 (Thermo Scientific). 1,5 µl einer zu untersuchenden Probe wurden dabei auf den Detektor aufgetragen und dann die Absorption von monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnete das Gerät dann die gesuchte Konzentration. Um zusätzlich eine Aussage über den Grad der Proteinkontamination der Probe zu erhalten, wurde auch die Absorption von monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das 260 nm / 280 nm Absorptionsverhältnis korreliert mit dem Reinheitsgrad der Probe. Ein guter Reinheitsgrad liegt für DNA-Proben bei einem Verhältnis von $\geq 1,8$, für RNA-Proben bei $\geq 2,0$.

2.2.2.4 cDNA Synthese

Um isolierte RNA durch eine Real-Time-PCR analysieren zu können, musste sie zunächst durch reverse Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Life Technologies). Hierbei wurde bis zu 2 µg RNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP-Mix (100 mM)	0.8 µl
10x Random Primer	2 µl
20x Reverse Transkriptase	1 µl
RNA	2000 ng
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µl

Die Amplifikation im Thermocycler fand nach folgendem Schema statt:

- 10 min bei 25 °C (Inkubation)
- 120 min at 37 °C (Elongation)
- 5 min at 85 °C (Inaktivierung der reversen Transkriptase)

Die cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die *quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)* wurde verwendet, um Expressionsunterschiede bestimmter Gene auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dafür wurde zunächst wie oben beschrieben RNA aus kultivierten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das Prinzip der qPCR basiert auf einer Bindung des interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffs SYBR Green an doppelsträngige DNA. Das Fluoreszenzsignal korreliert somit mit der Menge der amplifizierten cDNA. Unter Annahme einer verlustfreien vorherigen Übertragung von mRNA in cDNA lassen sich damit Rückschlüsse auf relative Unterschiede der Genexpression in der untersuchten Probe ziehen. Der Reaktionsansatz wurde unter Verwendung des SYBR Green PCR Mix (Life Technologies) nach Herstellerangaben folgendermaßen in einer 96-well-Platte vorbereitet:

cDNA in ddH ₂ O (20 ng/μl)	1 μl
Primer vorwärts (10 pM)	1 μl
Primer rückwärts (10pM)	1 μl
SYBR Green Master Mix	12,5 μl
ddH ₂ O	9,5 μl

Die Reaktion fand in einem StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies) nach folgendem Schema statt:

Initiierung (95 °C):	10 Minuten	
Denaturierung (95 °C):	30 Sekunden	} 40x
Annealing (60 °C):	30 Sekunden	
Elongation (72 °C):	30 Sekunden	
Finale Elongation (72 °C):	6 Minuten	

Um eine Amplifikation von unspezifischer DNA auszuschließen, wurde im Anschluss an die finale Elongation eine Schmelzkurvenanalyse mit einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 0,3 °C/min von 60 °C bis 95 °C durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels des C_t-Werts (cycle threshold), der automatisch von der LinReg-Software bestimmt wurde. Der C_t-Wert beschreibt dabei die Anzahl von Zyklen, die benötigt wurden, um einen definierten Fluoreszenzwert erstmals zu übersteigen. Anhand der C_t-Werte konnten dann durch die $\Delta\Delta C_t$ -Methode die

Expressionsunterschiede berechnet werden. Als Referenz dienten hierbei die stabil exprimierten Haushaltsgene (engl. housekeeping gene) GAPDH und OAZ1.

2.2.2.6 DNA-Isolation aus Mausgewebe

Um DNA für die Genotypisierung von Versuchsmäusen zu gewinnen, wurden kurze Stücke vom Schwanz der Tiere entfernt und in 100 µl alkalischem Lysepuffer auf dem Schüttler für 45 min bei 95 °C lysiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte eine Neutralisation der Lösung mit 100µl Tris-HCL (400mM). Bis zur weiteren Verwendung für die Genotypisierungs-PCR wurde die Probe bei 4 °C gelagert.

2.2.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung der *Htra1*^{-/-}-Mäuse erfolgte mittels PCR. Hierfür wurden für jedes Tier je ein Reaktionsansatz zum Nachweis des Wildtyp-Allels und einer für das mutierte Allel vorbereitet. Unter Verwendung von GoTaq (Promega) wurden folgende Ansätze pipettiert:

DNA	2 µl
Primer vorwärts	1 µl
Primer rückwärts	1 µl
Puffer	10 µl
dNTP-Mix	1 µl
MgCl ₂	2 µl
DMSO	5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Nach Platzierung der Proben in einem Thermocycler wurde folgendes Programm angewendet:

Initiierung (95 °C):	5 Minuten	
Denaturierung (95 °C):	30 Sekunden	} 40x
Annealing (60 °C):	30 Sekunden	
Elongation (72 °C):	60 Sekunden	
Finale Elongation (72 °C):	5 Minuten	

Die Produkte der Amplifikation wurden in einer Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt, um die erfolgreiche PCR zu bestätigen und anhand der Banden den Genotyp der untersuchten Mäuse ablesen zu können.

2.2.2.8 Agarose Gelelektrophorese

Die in der Genotypisierungs-PCR entstandenen Produkte wurden für eine Auftrennung nach Größe einer Gelelektrophorese unterzogen. 1 % Agarose in SB-Puffer wurde für ca. 2 min in einer Mikrowelle erhitzt um die Agarose zu lösen. Nach Abkühlung auf unter 60 °C wurde Ethidiumbromid entsprechend einer Endkonzentration von 0,05 µg/µl hinzugefügt. Das Gel wurde gegossen und nach Polymerisation in der Elektrophoresekammer mit Puffer bedeckt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Ladetaschen übertragen. Zusätzlich wurde ein DNA Marker aufgetragen, der eine spätere Zuordnung der Banden zu einer bestimmten Größe ermöglichte. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Spannung von 200-250 V durchgeführt und anschließend die Banden unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm dargestellt.

2.2.2.9 Herstellung von Proteinlysaten

Kultivierte HUASMC wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe eines Proteinlysepuffers für 10 min auf Eis inkubiert. Der Lysepuffer setzte sich aus RIPA-Puffer mit 1 % Phosphataseinhibitor, 0,4 % Proteaseinhibitor und 0,1 % DTT zusammen. Das Lysat wurde mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und bei 4 °C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.10 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe und ist damit gemeinsam mit dem sich in der Regel anschließenden Western-Blot der Goldstandard für den quantitativen und qualitativen Proteinnachweis. Mittels Bradford-Assay wurde zunächst die Konzentration der Proteinlysate bestimmt. Hierfür wurden je 4 µl Proteinlysate mit 700 µl BradfordUltra (Expedition) für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm

gemessen. Gleiche Mengen der Proteinproben wurden mit Laemmlipuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in die Ladetaschen des 5 % SDS-Polyacrylamid-Sammalgels übertragen, an welches sich das 10 % Trenngel anschloss. Die Elektrophorese wurde bis zum Eintritt der Proteine in das Trenngel mit 80 V, danach mit 100 V betrieben.

2.2.2.11 Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Trenngel im Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort mittels spezifischer Antikörper angefärbt. Hierzu wurde das Gel auf die Membran überführt und die Kombination zu beiden Zeiten mit Whatman-Papier und Schwämmen umgeben. Beim Aufbau dieses Sandwiches wurde darauf geachtet, dass alle Komponenten beständig mit Transfer-Puffer feucht gehalten wurden und dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bildeten. Eine Blotting-Apparatur wurde mit einem 20 % Methanol beinhaltenden Transfer-Puffer befüllt und das Konstrukt eingesetzt. Die Übertragung fand über Nacht bei 50 V und 4°C statt. Im Anschluss wurde die Membran für 30 min mit 5 % BSA in TBST geblockt und mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurden die Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper auf die Membranen gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen und anschließender Zugabe von Aceglow Chemilumineszenzsubstrat mit Hilfe eines ChemiDoc-Systems (Biorad). Die Auswertung der Bilder fand mit der ImageLab-Software (Biorad) statt.

2.2.3 *In vitro* Zellkulturexperimente

2.2.3.1 Wundheilungsassay

Der Einfluss von HTRA1 auf die Zellmigration wurde anhand eines Wundheilungsassays überprüft. HUASMC wurden wie oben beschrieben transduziert oder transfiziert. Die Zellen wurden trypsinisiert und nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm gezählt und entsprechend einer Endkonzentration von 10^5 Zellen/ml mit Kulturmedium verdünnt. Zweikammerige Kultur-Einsätze aus Silikon (Ibidi) wurden in

24-well-Kulturplatten platziert und pro Kammer 100 µl der Zellsuspension übertragen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Einsätze entfernt und 500 µl DMEM mit 15 % FCS pro well hinzugefügt. Durch den Steg zwischen den Kammern hinterließ der Einsatz einen zellfreien Spalt. Dieser wurde unmittelbar nach Entfernung des Einsatzes und nach 24 Stunden Inkubation mit einem Olympus IX50 Mikroskop fotografiert. Durch die in die zellfreie Zone einwachsenden HUASMC verringerte sich die Spaltbreite, so dass über eine Abstandsmessung der Spaltränder die Geschwindigkeit der Zellmigration berechnet werden konnte.

2.2.3.2 Proliferations-Assay

Die Bestimmung der Proliferationsrate der HUASMC erfolgte durch Erheben der Zellzahl pro Areal zu verschiedenen Zeitpunkten. Hierfür wurden die Zellkerne der Versuchszellen temporär mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Hoechst 33342 bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und hat nach Anregung mit UV-Licht ein Emissionsmaximum bei etwa 465 nm. HUASMC wurden wie oben beschrieben transduziert oder transfiziert. Pro 6-well-Kulturschale wurden 10⁵ Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. OptiMEM reduced Medium wurde Hoechst 33342 entsprechend einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml zugefügt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 30 min mit dem vorbereiteten Medium unter Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert. Pro well wurden 3 Areale markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX50) fotografiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit DMEM mit 15 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut nach obigem Verfahren angefärbt und die gleichen Areale fotografiert. Die Anzahl der Zellen pro Areal wurde mit der Software ImageJ ausgezählt und die Veränderung der Zellzahl pro 24 Stunden ermittelt.

2.2.3.3 Spheroid-basiertes Invasions-Assay

Das Spheroid-basierte Invasions-Assay wurde ursprünglich zur Untersuchung der Differenzierung und Beeinflussung von Endothelzellen entwickelt (Korff and Augustin, 1998). Für die hier untersuchte Fragestellung der dreidimensionalen Invasion von Gefäßmuskelzellen in ihre Umgebung wurden ausschließlich HUASMC

verwendet, ansonsten aber das bekannte Protokoll übernommen. Zur Durchführung des Experiments mussten zunächst folgende Lösungen hergestellt werden:

Kollagen Typ I Lösung

Das Kollagen vom Typ I wurde aus Rattenschwänzen isoliert. Gefrorene Rattenschwänze wurden zunächst für 20 min in 70 % Ethanol sterilisiert. Haut und Wirbelkörper wurden entfernt und die Sehnen freigelegt. Diese wurden in 70% Ethanol gewaschen und für eine Stunde getrocknet. Zur Extraktion des Kollagens wurden die Sehnen anschließend für 48 Stunden in 0,1%iger Essigsäure inkubiert. Die Lösung wurde für 90 min bei 17000 rpm zentrifugiert und der das Kollagen enthaltende Überstand bei -80 °C eingelagert. Vor der experimentellen Verwendung wurde die Lösung mit 0,1%iger Essigsäure auf eine Konzentration von 3 mg/ml weiter verdünnt.

Methocel-Lösung

6 g Methylzellulose wurden nach Autoklavierung in 250 ml basalem Endopan Medium bei 60 °C gelöst. Nach 20 min Rühren wurden weitere 250 ml basales Endopan Medium hinzugefügt und die Lösung über Nacht unter Rühren bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Methocel-Lösung für 4 Stunden bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und bei 4 °C eingelagert.

Zur Herstellung der Spheroide wurden pro Konstrukt 160000 Zellen in 10 ml Kulturmedium mit 20 % Methocel gegeben und die Lösung gut gemischt. Mit einer 12-Kanal-Pipette wurde die gesamte Lösung in Tropfen mit einem Volumen von 25 µl auf nicht-adhäsive quadratische Petrischalen pipettiert. Die Platten wurden vorsichtig gewendet, um hängende Tropfen entstehen zu lassen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnten sich nun in jedem Tropfen die darin enthaltenen HUASMC zusammenlagern und kompakte Zellhaufen, sogenannte Spheroide, bilden. Am nächsten Tag wurden diese mit PBS von den Petrischalen gewaschen und die gewonnene Lösung für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und mit Methocel mit 20 % FCS resuspendiert. Auf Eis wurden 4 ml einer Kollagenlösung vorsichtig mit 500 µl 10x Medium 199 vermischt. Da die Kollagenlösung zuvor für eine optimale Konzentration mit 0,1%iger Essigsäure verdünnt wurde, musste sie nun mit 0,2 M NaOH auf einen pH-Wert von etwa 7,4 neutralisiert werden. Das

Erreichen des korrekten pH-Wertes konnte gut durch einen Farbumschlag der Lösung von gelb zu orange beobachtet werden. Das neutralisierte Kollagen wurde zu dem Spheroid-Methocel-Gemisch gegeben und zügig aber vorsichtig gemischt und anschließend in Portionen von einem Milliliter pro well in 24-well-Kulturplatten aufgeteilt. Die Kulturplatte wurde für 30 min bei 37° C inkubiert und inzwischen die Stimulationlösungen vorbereitet. Hier wurden pro well 100 µl einer Kontrolllösung aus Basalmedium, sowie eine Testlösung mit FGF und eine weitere mit PDGF in Basalmedium verwendet. Die Menge der Stimulantien wurden dabei so gewählt, dass deren Konzentration im Versuchsansatz nach dem Hinzufügen zu den Spheroide 25 ng/ml betrug. Nach Zugabe der Stimulationlösungen wurden die Kulturplatten mit den Spheroide für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die Versuchsansätze anschließend mit 1 ml 10 % PFA in PBS pro well gestoppt. Die 24-well-Kulturplatten wurden bei 4 °C gelagert bis mit Hilfe eines Olympus IX50 Mikroskops Aufnahmen der Spheroide gemacht und die Invasion der HUASMC in das die Spheroide umgebende Gewebe mit der Cell[^]P Software ausgewertet wurden.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Htra1^{-/-}-Mäuse mit einem C57/Bl6 Hintergrund wurden bereits beschrieben (Tsuchiya et al., 2005a). Die Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und jegliche Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit geltenden Gesetzen und Regelungen durchgeführt. Alle Tierversuche wurden von den lokalen Behörden genehmigt.

2.2.4.1 Perfusion isolierter Mausarterien

Die Versuchstiere wurden geopfert, Mesenterialarterien zweiter oder dritter Ordnung isoliert und in die mit Tyrode-Puffer gefüllte Kammer des Myographen (Culture Myograph, DMT, Kopenhagen, Dänemark) eingebracht. Die Arterien wurden unter einem longitudinalen Druckgradienten von 20 mmHg mit Tyrode-Puffer perfundiert (70-110 mmHg am Einfluss und 50-90 mmHg am Ausfluss), sodass ein Fluss von ~0,07 ml/min resultierte. Arterien, die keine myogene Reaktion zeigten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die druckinduzierten Veränderungen des

Gefäßdurchmessers wurden mithilfe der VediView Software (DMT, Kopenhagen, Dänemark) ausgemessen.

2.2.4.2 DOCA-Salz induzierte Hypertension

Desoxycorticosteron (DOC) ist ein Steroidhormon und ein physiologisches Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Aldosteron. Wie dieses führt es über eine Aktivierung von Mineralkortikoidrezeptoren zur vermehrten renalen Absorption von Na^+ und damit sekundär zur Wasserrückresorption. Als Desoxycorticosteron-Azetat (DOCA) wurde das Hormon erstmals 1943 von Selye et al. zur Induktion einer Hypertonie in Ratten beschrieben (Selye et al., 1943). Dabei musste der Effekt von DOCA durch eine zusätzliche Verabreichung von Trinkwasser mit 1 % NaCl verstärkt werden, da eine alleinige Gabe von DOCA nicht für die Entstehung einer Hypertonie genügte. Die genaue Pathogenese dieses Hypertonie-Modells ist nach wie vor nicht abschließend geklärt. Neben der durch erhöhte Salz- und Wasseraufnahme entstehenden Hypervolämie spielen vor allem Veränderungen der Sympathikus-Aktivität und verschiedener humoraler Faktoren eine wichtige Rolle (Schenk and McNeill, 1992; Yemane et al., 2010). Trotz der bestehenden Unklarheiten findet das DOCA-Salz-Modell breite Anwendung und stellt inzwischen auch in der Maus ein etabliertes Hypertonie-Modell dar. In der vorliegenden Arbeit wurde es zur Untersuchung der Blutdruckregulation in *Htra1*^{-/-}-Mäusen verwendet. Der Ablauf des Experiments erfolgte weitgehend nach bereits beschriebenen Standardprotokollen (Korff et al., 2012; Licht et al., 2010). Zur Implantation der DOCA-Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL) wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Mischung narkotisiert und eine ausreichende Narkosetiefe durch regelmäßige Untersuchung des Zwischenzehenreflexes sichergestellt. Nach Inzision im Bereich der rechten Flanke wurde subkutan ein Pellet mit 50 mg DOCA implantiert. Mäuse aus der Kontrollgruppe wurden scheinoperiert ohne Implantation eines Pellets. Alle Tiere bekamen ab dem Tag der Operation ausschließlich Trinkwasser mit 1 % NaCl. Die Messung von Puls und Blutdruck fand nicht-invasiv mit einem NIBP System von Panlab durch eine spezielle Mäuseschwanz-Manschette plethysmographisch statt. Die erste Messung für die Basalwerte wurde 3 Tage vor der Operation durchgeführt. Es folgten 3 weitere Messungen im Abstand von je einer Woche beginnend am 7. postoperativen Tag. Nach der letzten Messung wurden die Mäuse geopfert. Zur Auswertung wurde aus

den gemessenen systolischen und diastolischen Werten der mittlere arterielle Druck berechnet. Hierfür wurde die Formel $MAD = \text{diastolischer Druck} + 1/3 * (\text{systolischer Druck} - \text{diastolischer Druck})$ verwendet. Verglichen wurden die 4 Gruppen *Htra1*^{-/-}-Kontrolle, *Htra1*^{-/-}-DOCA, *Htra1*^{+/+}-Kontrolle und *Htra1*^{+/+}-DOCA.

3 ERGEBNISSE

Die Untersuchung des Einflusses von HTRA1 auf vSMC setzte zunächst die Kultivierung von vSMC mit anschließender Überexpression bzw. Silencing des HTRA1-Gens voraus. Hierfür wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Nabelschnüren (*human umbilical arteria smooth muscle cells* = HUASMC) entnommen und unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM low glucose Medium mit 1000 mg/L D-Glukose und Zusatz von 15 % FCS inkubiert. Eine transiente, aber hocheffiziente Überexpression von HTRA1 wurde mittels Transduktion der HUASMC mit einem, das humane *HTRA1*-Gen exprimierenden Adenovirus erreicht. Die erfolgreiche Überexpression (etwa 70-fach) konnte auf RNA-Ebene mittels qPCR nachgewiesen werden (Abb. 4 A).

Zur transienten Unterbindung der Produktion von HTRA1 kam zunächst eine small interfering RNA (siRNA) zum Einsatz. Bei hierunter mangelnder Reduktion der HTRA1-mRNA Expression wurde als Alternative ein Lentivirus entwickelt. Dieser führte über die Expression einer HTRA1-spezifischen small hairpin RNA (shRNA) zu einer dauerhaften Reduktion der HTRA1-Expression. Die HTRA1 Expression konnte so auf mRNA-Ebene um im Mittel 92 % gesenkt werden (Abb. 4 B). Die erfolgreiche Überexpression und Reduktion von HTRA1 konnte per Westernblot auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 5).

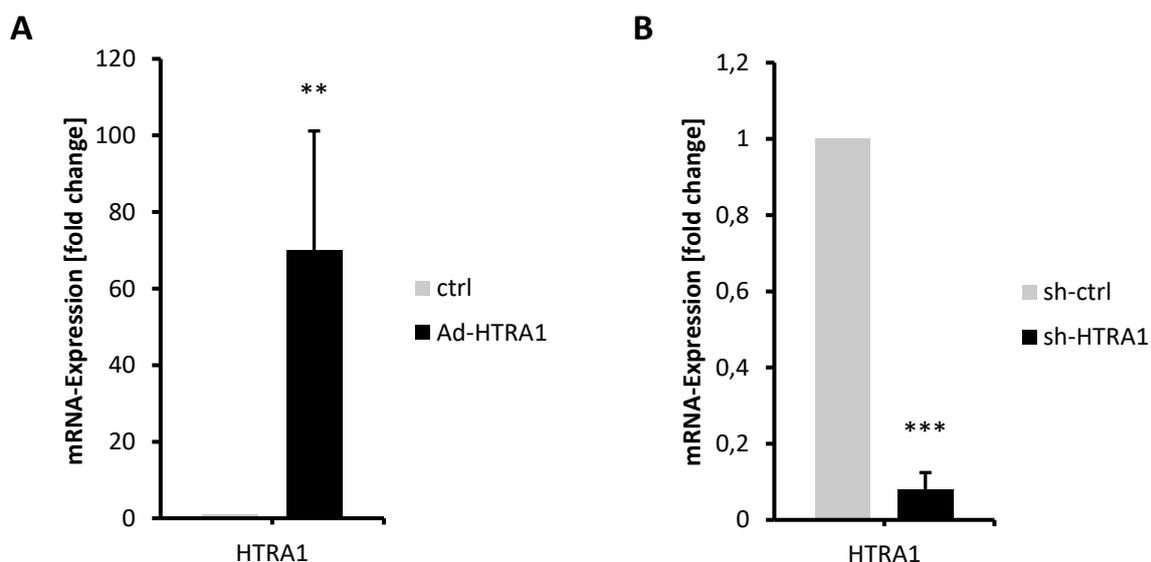


Abb. 4: HTRA1 Expression nach Überexpression und Silencing

(A) HUASMC wurden mit Adenovirus transduziert zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1 (Ad-HTRA1). Die Expressionsstärke von HTRA1 wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels qPCR analysiert. n=4 (B) HUASMC wurden mit Lentiviren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) exprimieren. Die Expressionsstärke von HTRA1 wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels qPCR analysiert. n=6; **= p<0,01; ***, p<0,001; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

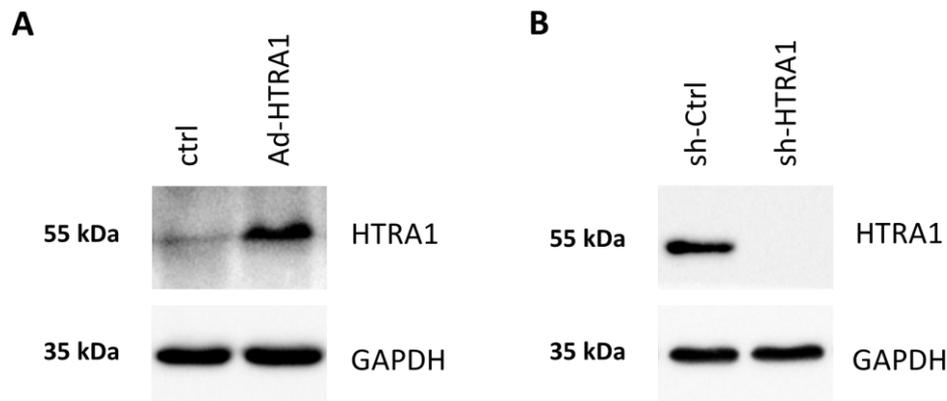


Abb. 5: Western-Blot-Analyse der HTRA1 Expression

(A) HUASMC wurden mit Adenovirus transduziert zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1 (Ad-HTRA1). Die Expressionsstärke von HTRA1 wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels Western-Blot analysiert. **(B)** HUASMC wurden mit Lentiviren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) exprimieren. Die Expressionsstärke von HTRA1 wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels Western-Blot analysiert.

3.1 HTRA1 beeinflusst den Notch-Signalweg

Die klinische Ähnlichkeit des durch NOTCH3-Mutationen verursachten CADASIL mit dem durch HTRA1-Mutationen entstehenden CARASIL, zusammen mit der Erkenntnis, dass HTRA1 den Notch-Liganden JAG1 schneiden kann, lassen eine Beeinflussung des Notch-Signalwegs durch HTRA1 vermuten. Zur Überprüfung dieser These wurde zunächst die Expression bestimmter Zielgene des Notch-Signalweges nach Überexpression oder Silencing von HTRA1 in HUASMC mittels qPCR untersucht. In HUASMC mit verminderter HTRA1-Biosynthese konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von *HES1* auf das 1,8-fache und *HEYL* auf das 8,4-fache, sowie eine verminderte Expression von *HEY2* auf die Hälfte im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 6 A). Auch nach Überexpression von *HTRA1* in HUASMC konnte eine veränderte Expression einiger Notch-Zielgene festgestellt werden. Die Expression von *HEY2* zeigte sich hier um 35 % erhöht, während die Expression von *HEYL* um 28 % vermindert war (Abb. 6 B).

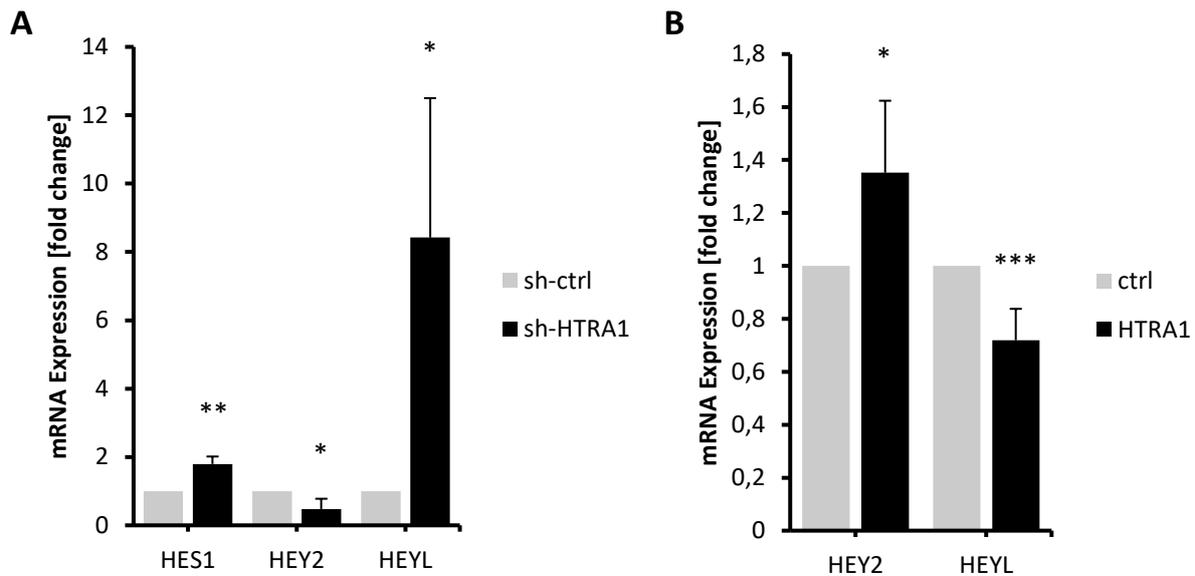


Abb. 6: HTRA1 reguliert NOTCH-Zielgene

(A) HUASMC wurden mit Lentiviren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) exprimieren oder (B) mit Adenoviren zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1 (HTRA1). Die Expressionsstärke von HES1, HEY2 und HEYL wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels qPCR analysiert. n=4 (a); n=6 (b) *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.2 HTRA1 beeinflusst den Phänotyp von vSMC

Es ist bekannt, dass der Notch-Signalweg sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch in verschiedenen adulten Krankheitsbildern eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von glatten Muskelzellen einnimmt (Morrow et al., 2008). Dieser Umstand und die optische Auffälligkeit der HUASMC mit verminderter HTRA1-Biosynthese im Vergleich zu den Kontrollzellen legten den Verdacht nahe, dass auch HTRA1 über den Notch-Signalweg Einfluss auf den Phänotyp der Muskelzellen ausübt. Ein wesentliches Merkmal des kontraktiven Phänotyps, welches durch den Notch-Signalweg reguliert wird, ist der kontraktile Apparat der vSMC. Verschiedene Studien zeigen, dass die NOTCH3-ICD die Expression von kontraktiven Proteinen aktiviert, wohingegen die Notch-Zielgene der HEY- und HES-Familie die Expression dieser Proteine inhibieren. Um Veränderungen des Phänotyps nachzuweisen, wurde mittels qPCR die Expression einiger Markerproteine des kontraktiven Phänotyps nach Überexpression oder Silencing von *HTRA1* untersucht. Passend zur verstärkten Expression von *HES1* und *HEYL* in HUASMC mit vermindertem HTRA1 zeigte sich in diesen Zellen eine Verminderung der kontraktiven Markerproteine α -Aktin (α -smooth muscle actin, α SMA) um 60 % und Transgelin (smooth muscle protein 22 α , SM22 α) um 48 % im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 7 A). Signifikante

Veränderungen der Markerproteine Calponin (CNN1) und der schweren Myosinkette (myosin heavy chain, MYH11) konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Bestätigung der Ergebnisse auf Proteinebene mittels Western-Blott erfolgte durch Laborkollegen und ist in Abb. 7 B dargestellt.

In den HUASMC mit vermehrter *HTRA1*-Expression konnten keine signifikanten Veränderungen der Markerproteine beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

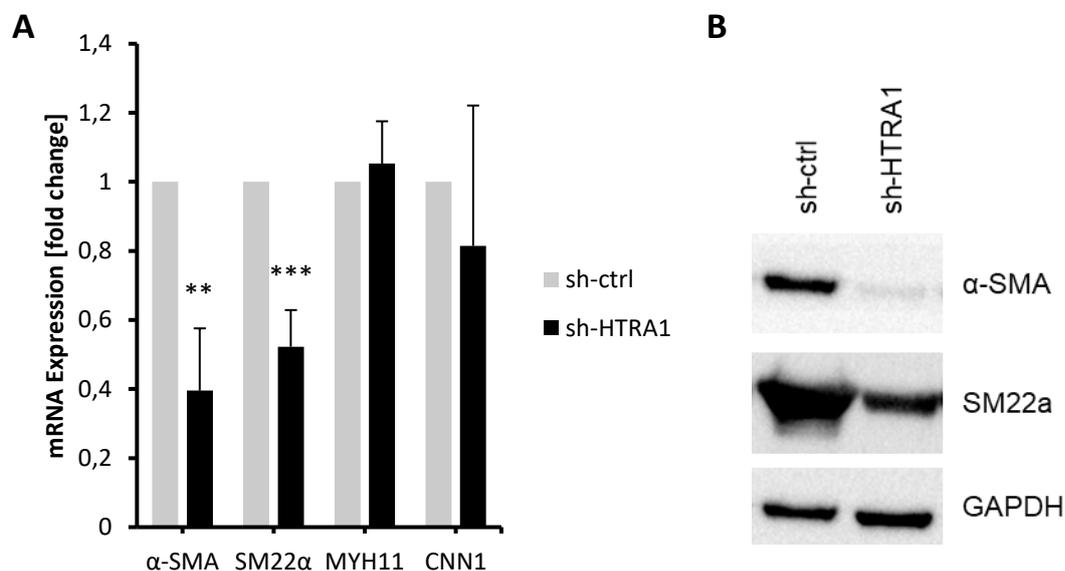


Abb. 7: HTRA1 Silencing reduziert Expression kontraktile Markerproteine

HUASMC wurden mit Lentiviren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) exprimieren. **(A)** Die Expressionsstärke von α SMA, SM22, MYH11 und CNN1 wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels qPCR analysiert. $n \geq 4$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; zweiseitiger, ungepaarter t-Test. **(B)** Westernblot kontraktile Proteine. $n=3$; Durchführung: Iris Moll.

Zur Visualisierung der festgestellten Expressionsunterschiede auf Proteinebene wurden die manipulierten Zellen einer Konfokalmikroskopie zugeführt. Da Aktin das am häufigsten in vSMC vorkommende Protein ist, lassen sich Unterschiede in der Expression konfokalmikroskopisch gut darstellen. Nach Anfärbung des Aktins durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin zeigten HUASMC nach *HTRA1*-knockdown ein deutlich geringeres Fluoreszenzsignal als die Kontrollzellen (Abb. 8).

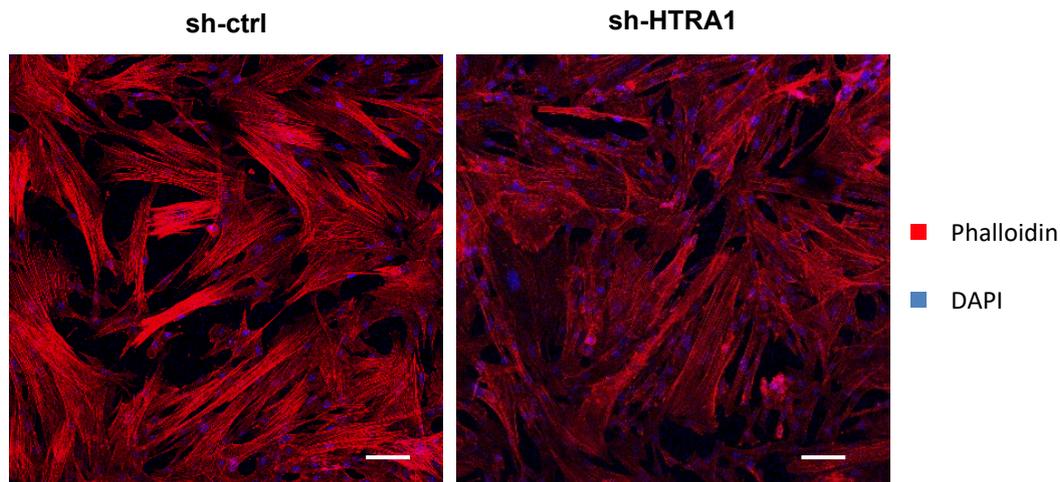


Abb. 8: Reduzierte Aktinfärbung nach HTRA1-Silencing

HUASMC wurden 48 Stunden nach Transduktion mit entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) mit PFA fixiert und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin angefärbt. Die Immunofluoreszenzfärbungen wurden mit dem Konfokalmikroskop LSM700 analysiert. Skalierungsbalken: 100 μm .

3.2.1 HTRA1 reguliert vSMC-Zellmigration

In adulten menschlichen Gefäßen zeigen differenzierte, kontraktile vSMC nur eine sehr geringe Proliferations- und Migrationsrate. Beim Wechsel zum synthetischen Phänotyp können sie ihre Proliferations- und Migrationskompetenz jedoch deutlich steigern. Da die Ergebnisse der Genexpressionen einen Einfluss von HTRA1 auf die Regulation des Phänotyps andeuteten, sollten in einem nächsten Schritt diese Funktionsparameter untersucht werden. Die Migration der Versuchszellen wurde zunächst in einem Wundheilungsassay untersucht.

Hier zeigte sich bei HUASMC mit Überexpression von *HTRA1* eine signifikant verminderte Migrationsrate. Innerhalb von 24 Stunden reduzierten die Zellen mit forcierter *HTRA1*-Expression die Lückenbreite um 12,7 % im Vergleich zu 22,1 % bei den Kontrollzellen. HUASMC nach lentiviralem *HTRA1*-Silencing migrierten hingegen stärker als ihre Kontrollzellen. Nach 24 Stunden reduzierten sie die Breite der zellfreien Lücke um im Mittel 38,5 % gegenüber 25,8 % in der Kontrolle (Abb. 9).

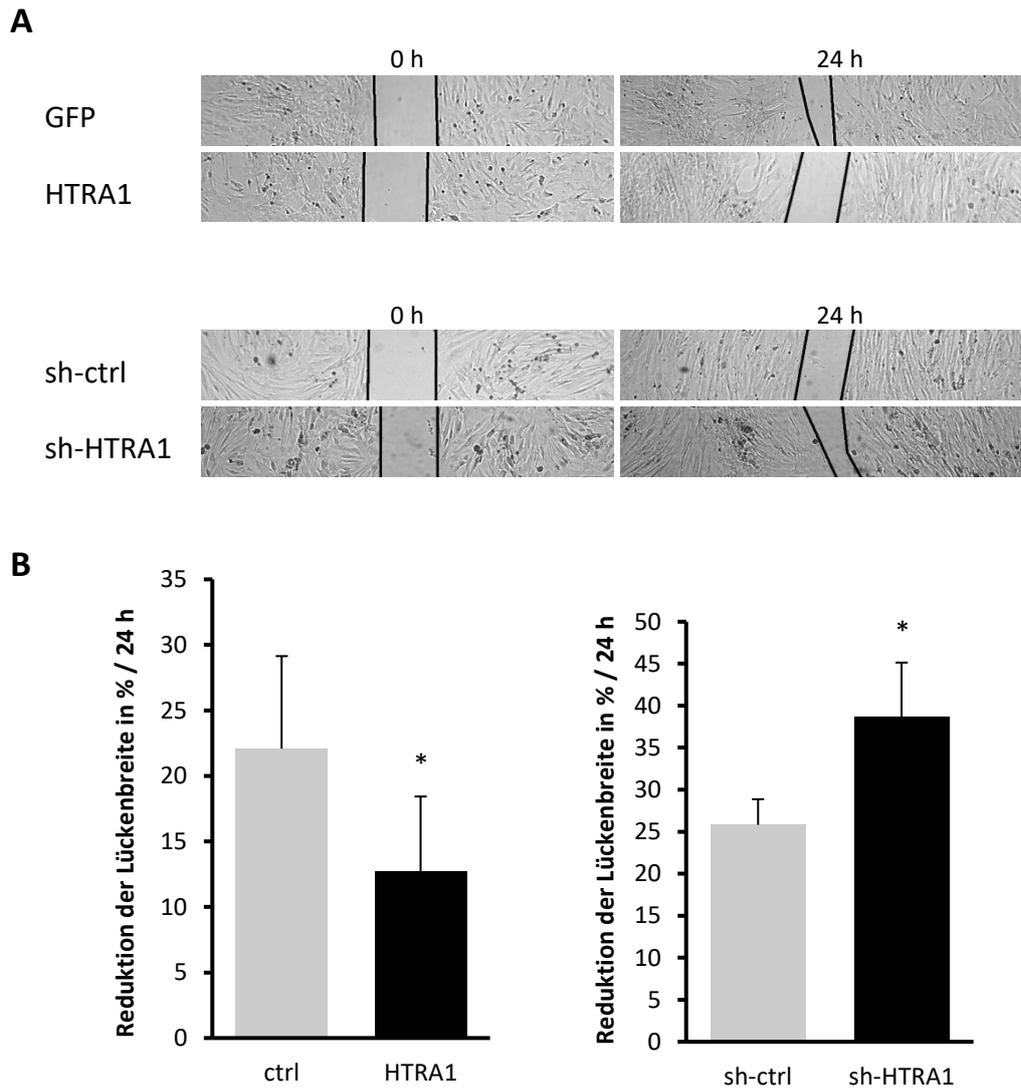


Abb. 9: HTRA1 inhibiert HUASMC Zellmigration

(A) HUASMC wurden mit Adenovirus zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1 transduziert, oder lentiviral mit Kontroll-sh-RNA (sh-ctrl) oder HTRA1-sh-RNA (sh-HTRA1) transduziert und in einen Einsatz in 24-Well-Platten überführt. Der durch die Entfernung des Einsatzes entstandene zellfreie Streifen wurde nach 0 und 24 h fotografiert. (B) Aus der gemessenen Breite der Lücke wurde anschließend deren Reduktion über 24 h berechnet. n=4 unabhängige Assays mit jeweils 6 wells. Resultate dargestellt als Mittelwerte + SD, * $p < 0,05$; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

Die Ergebnisse unterstützen die These eines Wechsels vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp bei *HTRA1*-Verlust in vSMC. Zur Bestätigung wurde ein sphäroid-basiertes Invasionsassay durchgeführt. Hierbei wurden die HUASMC 24 Stunden nach Transduktion mit Adenovirus (*HTRA1*- oder *GFP*-Überexpression) oder Lentivirus (knockdown von *HTRA1* oder Kontrolle) als hängende Tropfen gelagert und die hierbei entstehenden Sphäroide weitere 24 Stunden später in eine Kollagenmatrix unter entweder Basalbedingungen, Stimulation mit 25 ng/ml FGF oder 25 ng/ml PDGF eingebettet. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide mittels PFA fixiert und die Zellaussprossungen der Sphäroide in die Matrix ausgemessen. Überexpression von *HTRA1* führte analog zum Wundheilungsassay zu einem geringeren Aussprossen der Sphäroide im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10). Unter Basalbedingungen führte die forcierte *HTRA1*-Expression zu einer Abnahme der kumulativen Sprosslänge auf 72 % der Kontrollzellen. Auch nach PDGF-Stimulation betrug die kumulative Sprosslänge der Versuchszellen nur 96 % der Länge von Kontrollzellen unter basalen Konditionen. Unter FGF-Stimulation erreichte die kumulative Sprosslänge überexprimierter Zellen 99 % der Kontrollzellen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Sphäroide der mit Lentivirus transduzierten Zellen zeigten sich unter Anwendung des Standardprotokolls wiederholt instabil und konnten daher nicht ausgewertet werden.

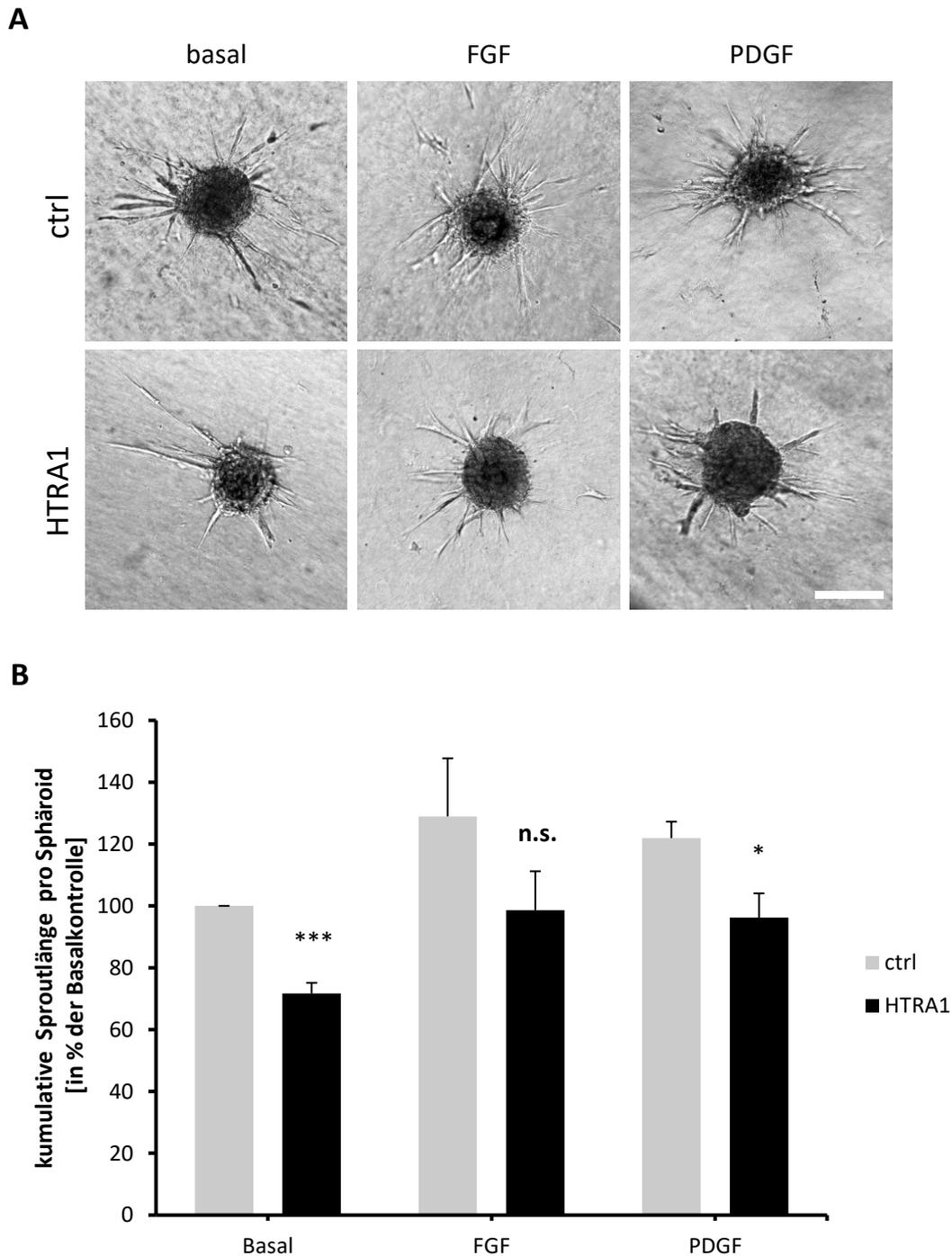


Abb. 10: Überexpression von HTRA1 führt zu vermindertem Aussprossen aus dem Zellverband
(A) In Kollagen eingebettete HUASMC Sphäroide 72 h nach adenoviraler Transduktion zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1 (HTRA1). Die Sphäroide wurden entweder mit Basalmedium oder mit 25 ng/ml FGF oder PDGF stimuliert. Skalierungsbalken: 100 μ m. **(B)** Quantifizierung der Länge aller Aussprossungen jedes Sphäroids. Pro Kondition wurden 10 Sphäroide analysiert. n=3, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, n.s.= nicht signifikant; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.2.2 HTRA1 reguliert vSMC-Proliferation

Die Fähigkeit als ausdifferenzierte, quieszente Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten zu können, stellt eine Besonderheit glatter Gefäßmuskelzellen dar. Dieser Wiedereintritt gilt auch als wesentlicher Aspekt eines Wechsels vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp und geht mit einer erhöhten Proliferationsrate im Vergleich zum kontraktilen Phänotyp einher. Die Migrationsrate wurde durch Auszählung der mit Hoechst angefärbten Zellkerne im Abstand von 24 Stunden ermittelt. Die HUASMC mit *HTRA1*-knockdown zeigten im Versuch eine im Mittel auf 224 % der der Kontrolle erhöhte Proliferationsrate. HUASMC mit forcierter *HTRA1*-Expression nach adenoviraler Transduktion zeigten dagegen im Vergleich zur Kontrolle eine um 12 % reduzierte Proliferationsrate (Abb. 11).

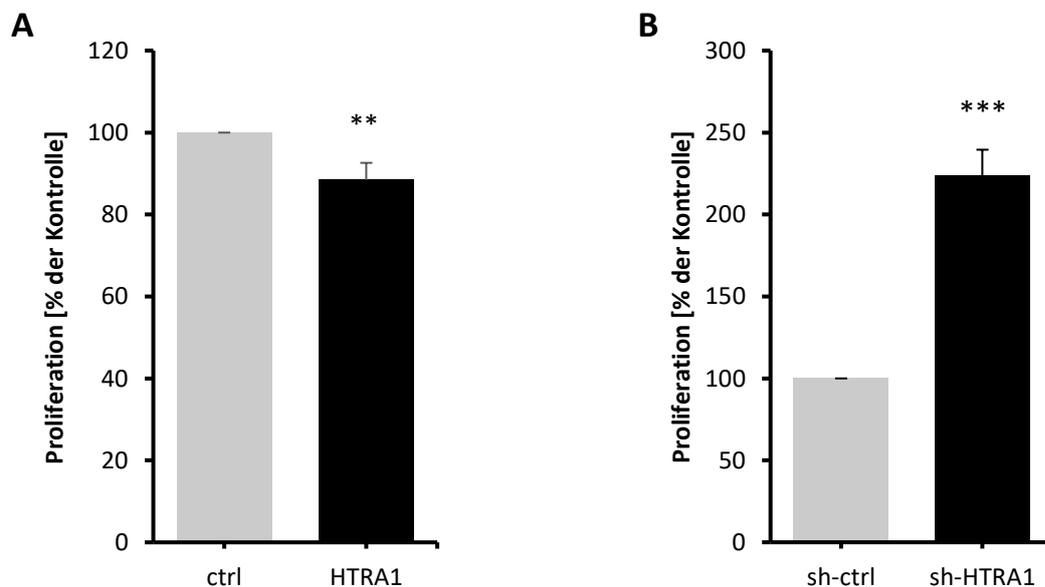


Abb. 11: HTRA1 inhibiert die Proliferation von HUASMC

(A) HUASMC wurden mit Adenovirus zur Überexpression von entweder GFP (ctrl) oder HTRA1, oder (B) lentiviral mit Kontroll-sh-RNA (sh-ctrl) oder HTRA1-sh-RNA (sh-HTRA1) transduziert. Die manipulierten Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und die Zellzahl innerhalb markierter Bereiche nach Färbung mit Hoechst im Abstand von 24 Stunden ermittelt. Aus der Veränderung der Zellzahl über 24 Stunden wurde die Proliferation berechnet. Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n \geq 3$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.2.3 HTRA1 reguliert die N-Cadherin Expression

Neben morphologischen Unterschieden fielen in der Verarbeitung der HUASMC mit reduzierter *HTRA1*-Expression eine veränderte Anordnung der Zellverbände und ein im Vergleich einfacheres Lösen des Zellverbands bei Behandlung mit Trypsin / EDTA-Lösung auf. Zur Untersuchung von Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte wurde mittels qPCR die Expression von N-Cadherin, einem wichtigen Zelladhäsionsmolekül in vSMC untersucht (Frismantiene et al., 2018a; George and Beeching, 2006). Hierbei wurde in HUASMC nach lentiviralem Silencing von HTRA1 eine signifikante Reduktion der Expression um etwa 42 % im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abb. 12).

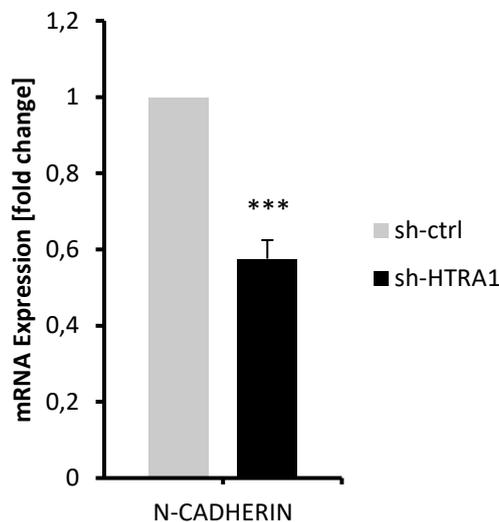


Abb. 12: HTRA1 reguliert N-CADHERIN-Expression

HUASMC wurden mit Lentiviren transduziert, die entweder Kontroll-shRNA (sh-ctrl) oder shRNA gegen HTRA1 (sh-HTRA1) exprimieren. Die Expressionsstärke von N-CADHERIN wurde 48 Stunden nach Transduktion mittels qPCR analysiert. n=3; ***=p<0,001; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.3 HTRA1-Verlust mindert Kontraktilität

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich einen Einfluss von HTRA1 auf die Funktionen glatter Gefäßmuskelzellen. Um zu untersuchen, ob auch die Kontraktionsfähigkeit verändert ist, wurden zunächst isolierte Mesenterialarterien aus *Htra1*^{-/-}-Mäusen myographisch untersucht. Hier konnte eine Beeinträchtigung der arteriellen Kontraktilität im Vergleich zu Gefäßen von Kontrolltieren beobachtet werden. Bei intraluminalen Drücken von 80 – 100 mmHg zeigte sich in den Arterien von *Htra1*^{-/-}-Mäusen eine signifikant geringere autoregulatorische Verminderung des Gefäßdurchmessers als in den Kontrollarterien (Abb. 13).

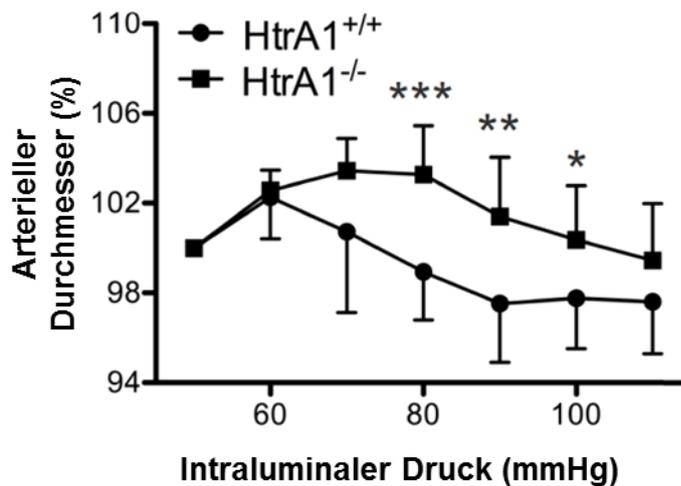


Abb. 13: Druckabhängige Veränderung des Gefäßdurchmessers mesenterialer Mausearterien
Isolierte Mesenterialarterien von *HtrA1*^{+/+}- und *HtrA1*^{-/-}-Mäusen wurden verschiedenen intraluminalen Drücken ausgesetzt und die relative Veränderung des arteriellen Durchmessers bestimmt. Die Untersuchung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Korff, Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Heidelberg.

3.4 DOCA-Salz induzierte Hypertension

In *Htra1*^{-/-}-Mäusen sind bisher unter physiologischen Bedingungen keine vaskulären Funktionseinschränkungen beschrieben. Die reduzierte Kontraktionsfähigkeit isolierter Mausearterien lässt aber eine veränderte Regulation des Blutdrucks in *Htra1*^{-/-}-Mäusen vermuten. Um diese Hypothese in-vivo zu überprüfen, wurde daher mittels Implantation von Pellets mit dem Wirkstoff Desoxycorticosteron-Azetat (DOCA) eine Hypertonie in *Htra1*^{-/-}- und *Htra1*^{+/+}-Mäusen induziert und Unterschiede in der Regulation des Blutdrucks untersucht.

Hierzu wurden mittels PCR-Genotypisierung eine Gruppe mit 9 *Htra1*^{-/-}-Mäusen mit einem C57/Bl6-Hintergrund und eine Kontrollgruppe mit 10 *Htra1*^{+/+}-Wurfgeschwistern definiert. Aus jeder Gruppe wurden 5 Mäuse einer DOCA-pellet-Implantation, die übrigen Mäuse einer Scheinoperation unterzogen, sodass 4 Versuchsgruppen entstanden: *Htra1*^{+/+}-Kontrollgruppe, *Htra1*^{+/+}-DOCA-Interventionsgruppe, *Htra1*^{-/-}-Kontrollgruppe und *Htra1*^{-/-}-DOCA-Interventionsgruppe. Bereits in der Messung des basalen Blutdrucks vor dem operativen Eingriff zeigten sich Unterschiede im Blutdruck zwischen den *Htra1*^{-/-}- und *Htra1*^{+/+}-Mäusen. Insbesondere der systolische Blutdruck war in den *Htra1*^{-/-}-Tieren erhöht. So betrug der initiale Blutdruck der *Htra1*^{+/+}-Mäuse im Mittel 74,5 / 54,5 mmHg gegenüber 83,5 / 59,3 mmHg in den *Htra1*^{-/-}-Mäusen (Abb. 14).

Über den Versuchszeitraum von ca. 3 Wochen stieg in allen 4 Gruppen der Blutdruck im Vergleich zum Basalwert signifikant an. Bei den *Htra1*^{+/+}-Versuchstieren kam es wie erwartet in der DOCA-Interventionsgruppe zu einem stärkeren Anstieg des Blutdrucks als in der Kontrollgruppe. Der mittlere arterielle Druck (MAD) stieg in der Kontrollgruppe um 38 % (von 60,4 mmHg auf 83,3 mmHg), gegenüber einer Steigerung um 60 % (von 62,4 mmHg auf 99,9 mmHg) in der DOCA-Interventionsgruppe. Im Gegensatz dazu zeigte sich zwischen der Kontrollgruppe und der DOCA-Interventionsgruppe in den *Htra1*^{-/-}-Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede. In der *Htra1*^{-/-}-Kontrollgruppe kam es zu einem Anstieg des MAD um 35 % (von 64,6 mmHg auf 87 mmHg), in der *Htra1*^{-/-}-DOCA-Interventionsgruppe stieg der MAD lediglich um 29 % (von 68,6 mmHg auf 88,5 mmHg). Im Vergleich mit der *Htra1*^{-/-}-DOCA-Interventionsgruppe zeigte sich in der *Htra1*^{+/+}-DOCA-Interventionsgruppe über den Versuchszeitraum ein stärkerer Anstieg und ein höherer Endwert des Blutdrucks (Abb. 15, Abb. 16). Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Korff vom Institut für kardiovaskuläre Physiologie in Heidelberg durchgeführt.

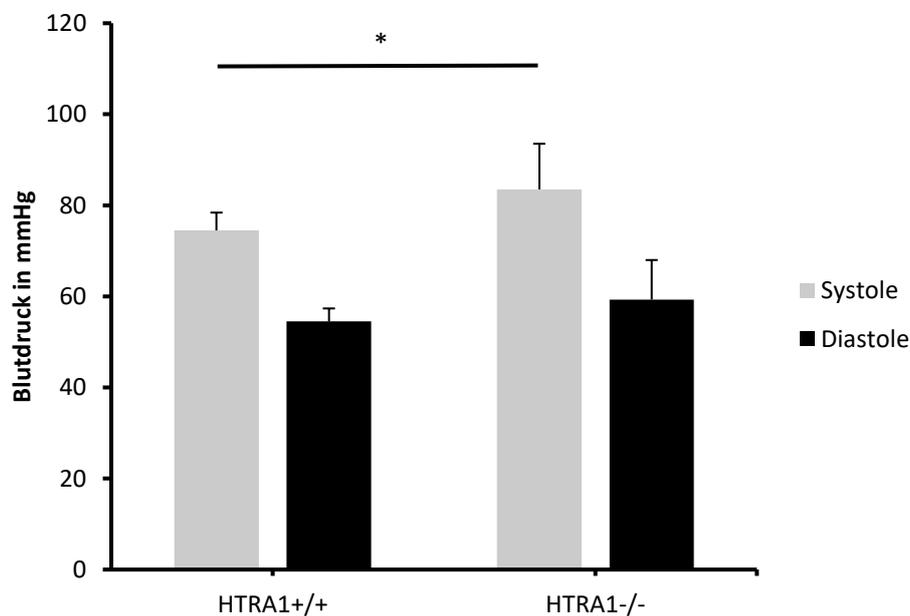


Abb. 14: Vergleich der basalen Blutdruckwerte

3 Tage vor der operativen DOCA-pellet-Implantation erfolgte die nichtinvasive Blutdruckmessung zur Bestimmung der Basiswerte von systolischem (Systole) und diastolischem (Diastole) Blutdruck. n≥9 je Gruppe; *= $p < 0,05$; Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung.

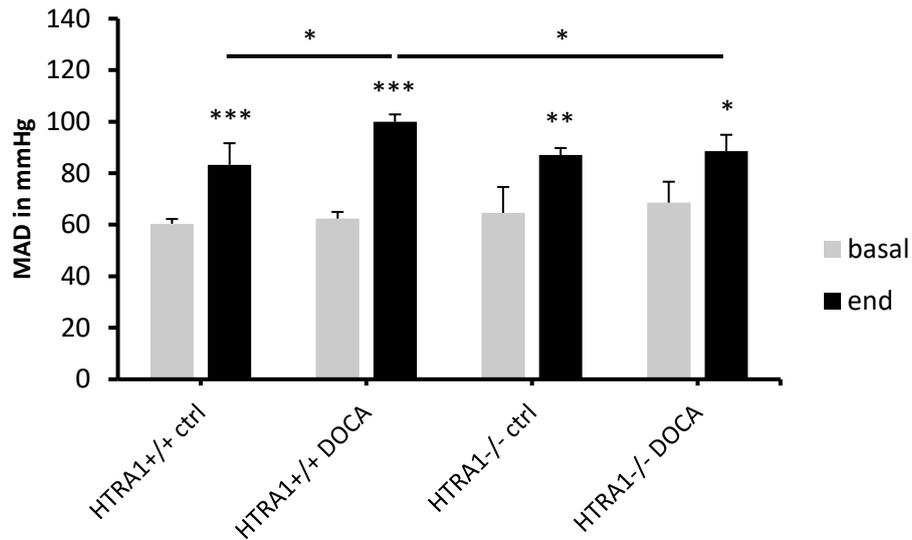


Abb. 15: Verminderer Anstieg des Blutdrucks in HTRA1^{-/-}-DOCA-Interventionsgruppe

Mittlerer arterieller Druck (MAD) der präoperativen (basal) und 3. postoperativen (end) Messung. Der MAD wurde mittels der Formel $MAD = \text{diastolischer Druck} + 1/3 * (\text{systolischer Druck} - \text{diastolischer Druck})$ berechnet. $n \geq 4$ Mäuse; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung.

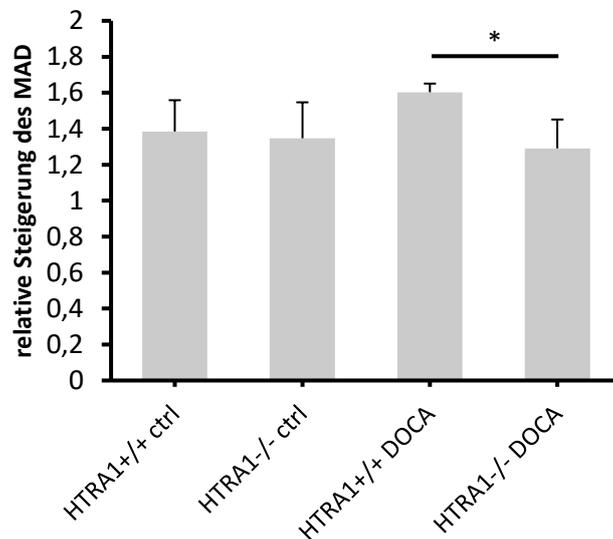


Abb. 16: Relative Veränderung des MAD

Quotient aus dem mittleren arteriellen Druck (MAD) der 3. postoperativen und der präoperativen Blutdruckmessung. Der MAD wurde mittels der Formel $MAD = \text{diastolischer Druck} + 1/3 * (\text{systolischer Druck} - \text{diastolischer Druck})$ berechnet. $n \geq 4$ Mäuse; *= $p < 0,05$; Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4 DISKUSSION

Gefäßkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen und führen zu einer enormen Krankheitsbelastung betroffener Patienten und der Gesellschaft (Wang et al., 2016). Die Entstehungsmechanismen sind komplex und umfassen neben zahlreichen Umwelteinflüssen auch genetische Faktoren. Während dem Großteil der Erkrankungen eine multifaktorielle Genese mit Beteiligung verschiedener Genvarianten und Umweltfaktoren zugrunde liegt, gibt es einen sehr kleinen Teil der Patienten, deren pathologische Veränderungen sich durch eine monogenetische Ursache erklären lässt. Diese seltenen Unterformen bieten die Möglichkeit, durch ihre Untersuchung die Pathomechanismen von Gefäßkrankungen besser zu verstehen und letztendlich auch ein Krankheitsmodell für die komplexeren Erkrankungen zu entwickeln. Eine solche Erkrankung stellt auch die zerebrale Mikroangiopathie CARASIL mit ihrer ursächlichen Mutation im *HTRA1*-Gen dar. Da *HTRA1*-Mutationen zu den häufigsten bekannten Mutationen in zerebralen Mikroangiopathien gehören und zusätzlich mit weiteren Gefäßkrankungen assoziiert sind, scheint die Aufklärung der physiologischen und pathologischen Proteinfunktion von HTRA1 vielversprechend zur Erlangung eines tieferen Verständnisses des Pathomechanismus zerebraler Mikroangiopathien und von Gefäßkrankungen im Allgemeinen.

Diese Arbeit zeigt, dass die Serin-Protease HTRA1 für eine kontraktile Differenzierung von vSMC notwendig ist und ihr Verlust zur Triggerung von Merkmalen eines synthetischen Phänotyps führt. Eine gleichzeitige Beeinflussung des Notch-Signalwegs, einem zentralen Regulator glatter Gefäßmuskelfunktionen, legt nahe, dass die beobachteten Veränderungen zumindest zum Teil über diesen Signalweg vermittelt werden.

Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Homöostase von Blutgefäßen. Störungen des Signalwegs sind an der Pathogenese diverser Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Gefäßfunktion beteiligt, darunter das Alagille-Syndrom, CADASIL, pulmonal-arterielle Hypertonie und Atherosklerose (Boucher et al., 2012). Unserer Arbeitsgruppe gelang kürzlich der Nachweis einer Interaktion zwischen dem Notch-Liganden JAG1 und der Protease HTRA1 in Endothelzellen. Der Kontakt führte hier zur Zerschneidung und zügigen

Degradierung von JAG1 und daraus folgender Beeinflussung des Notch-Signalwegs (Klose et al., 2018). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse können auch in vSMC einen Einfluss von HTRA1 auf den Notch-Signalweg zeigen. Die Untersuchung von vSMC nach entweder adenoviraler Überexpression von *HTRA1* oder *HTRA1*-Silencing durch lentiviral eingebrachte anti-HTRA1-shRNA zeigte signifikant veränderte Expressionsniveaus einiger Notch-Zielgene in der qPCR. Eine Überexpression führte in der qPCR zu einer signifikant erhöhten Expression von *HEY2* und einer verminderten Expression von *HEYL*. Entgegengesetzt verhielten sich die Ergebnisse nach einer lentiviraler Verminderung von HTRA1. Hier zeigte sich eine erniedrigte *HEY2*-, sowie eine erhöhte *HEYL*- und *HES1*-Expression. Die genannten Zielgene kodieren Transkriptionsfaktoren, für die verschiedene Funktionen in vSMC diskutiert werden. In Ko-Kulturen mit Endothelzellen und vSMC korrelierte eine erhöhte *HEYL*-Expression mit einer JAG1-NOTCH3-induzierten kontraktile Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen (Liu et al., 2009). HEY-Proteine konnten an anderer Stelle allerdings auch als potente Inhibitoren dieser Differenzierung identifiziert werden (Tang et al., 2010; Tang et al., 2008). Die komplexe Regulation der Familie der HES- und HEY-Proteine durch Bindung untereinander und mit zahlreichen anderen Proteinen sowie die Interaktion mit anderen Signalwegen wie TGF- β , JAK/STAT und Ras machen ihre genaue Funktion allerdings stark kontextabhängig (Fischer and Gessler, 2007). Als Erklärung der unterschiedlichen Effekte wird die Beobachtung einer Dosisabhängigkeit des Notch-Signalwegs herangezogen (Louvi and Artavanis-Tsakonas, 2012). Danach führt die Aktivierung des Signalwegs zunächst zur Differenzierung der vSMC bis schließlich das Expressionsniveau der *HES*- und *HEY*-Gene einen Grenzwert überschreitet und die dedifferenzierende Wirkung überwiegt (Morrow et al., 2008; Tang et al., 2010).

Die Beeinflussung des für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen bedeutungsvollen Notch-Signalwegs durch HTRA1 führte gemeinsam mit den pathologischen Veränderungen dieser Zellen in Patienten mit dem HTRA1-Defizienz-Syndrom CARASIL zu der Hypothese einer Modulation des vSMC-Phänotyps durch HTRA1. Zur Überprüfung dieser These wurden zunächst in vSMC mit unterschiedlicher HTRA1-Expression die Expressionsniveaus spezifischer Markerproteine des kontraktile Phänotyps untersucht. Dabei wurde in den vSMC mit *HTRA1*-Silencing eine verminderte Expression von α -SMA und *SM22 α* festgestellt.

Diese konnte von unserer Arbeitsgruppe im Western Blot auch auf Proteinebene bestätigt werden (Klose et al., in Revision). Des Weiteren konnte auch konfokalmikroskopisch eine gleichmäßig verminderte Anfärbung von Aktin in allen Zellbereichen der HTRA1-deprivierten vSMC gezeigt werden. Für die Expression der schweren Myosinkette (*MYH11*) und für Calponin (*CNN*) konnten keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Im Unterschied zu *MYH11* sind weder α -SMA noch SM22 α spezifisch für glatte Muskelzellen. Dennoch gehören beide zu einer Gruppe verlässlicher Marker der kontraktilen Differenzierung und insbesondere ihr simultaner Verlust kann als klarer Hinweis auf eine Dedifferenzierung der vSMC und die Adaptation eines synthetischen Phänotyps nach *HTRA1*-Verlust betrachtet werden. Die unveränderte Expression von *MYH11* und *CNN* widerspricht einem Verlust des kontraktilen Phänotyps nicht, da bekannt ist, dass zahlreiche Abstufungen und damit verschiedene Expressionsmuster auf dem Kontinuum zwischen kontraktilen und synthetischen Phänotyp möglich sind (Owens et al., 2004). Um Aussagen über den Phänotyp treffen zu können, sind neben der Untersuchung des Expressionsniveaus spezifischer Markerproteine aber auch die Beurteilung weiterer, vor allem funktioneller Zellparameter notwendig.

Ein entscheidendes Merkmal synthetischer vSMC sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen, ist die Fähigkeit zur vermehrten Proliferation und Migration. Der Einfluss von *HTRA1* auf diese Parameter ist insofern von besonderer Relevanz und wurde durch verschiedene Zellkulturversuche untersucht. In einem Wundheilungsassay migrierten vSMC nach Überexpression von *HTRA1* langsamer in einen zellfreien Bereich ein als die Vergleichszellen. Nach *HTRA1*-Silencing zeigte sich hingegen eine vermehrte Migration. In einem zusätzlichen, sphäroidbasierten Invasionsassay konnte das Ergebnis für die Überexpression bestätigt werden, während die notwendigen Zellsphäroide mit vSMC nach *HTRA1*-Silencing keine ausreichende Stabilität für eine Auswertung zeigten. Auch die Proliferation der vSMC zeigte sich nach *HTRA1*-Verlust deutlich gesteigert, wohingegen sie nach Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert war.

Gemeinsam unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese von der Adaptation eines synthetischen Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen nach *HTRA1*-Verlust und deuten auf die Notwendigkeit eines funktionsfähigen *HTRA1*-Proteins für die Aufrechterhaltung des kontraktilen vSMC-Phänotyps hin.

Ähnliche Resultate für vSMC aus *Htra1*^{-/-}-Mäusen präsentierten kürzlich auch Ikawati et al. (Ikawati et al., 2018). Die isolierten vSMC zeigten hier im Vergleich zu Wildtypzellen eine erhöhte Proliferation und Migration, sowie verminderte Markerproteine des kontraktiven Phänotyps. Die Gefäße der Versuchstiere zeigten außerdem pathologische Veränderungen, wie sie auch in Arterien von CARASIL-Patienten anzutreffen sind, sodass die Autoren schlussfolgern, dass die Modulation des vSMC-Phänotyps einen entscheidenden Pathomechanismus der HTRA1-Defizienz darstellt. Ähnliche Wirkungen auf Migration und Proliferation konnten für die HTRA1-Protease bereits in anderen Zelltypen, vornehmlich Tumorzellen, nachgewiesen werden (Baldi et al., 2002; Campioni et al., 2010; Cheng et al., 2018; Chien et al., 2009b; Zhao et al., 2015). HTRA1 wird hier auch als Tumorsuppressor bezeichnet, da seine verminderte Expression in einigen Tumoren mit erhöhten Proliferations- und Migrationsraten einhergeht, während eine experimentelle Überexpression in diesen Zellen zur Hemmung von Migration und Proliferation führt. Dieser Effekt wurde in Tumorzellen teilweise durch die Fähigkeit von HTRA1 zur direkten Regulation des Mikrotubuliapparats begründet (Chien et al., 2009b). Auch die HTRA1-Funktion als Inhibitor des proliferationsfördernden Wnt-Signalwegs wurde kürzlich als Erklärung der beobachteten Tumorsuppressorwirkung postuliert (Globus et al., 2017).

Verschiedene Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Zelladhäsion der vSMC nach Silencing von *HTRA1* vermindert ist. Zum einen gelang es den derart manipulierten vSMC im sphäroidbasierten Migrationsassay nicht, für eine Auswertung ausreichend stabile Zellsphäroide zu bilden. Zum anderen wurde bei der Verarbeitung der Zellen ein gegenüber den Kontrollzellen verändertes Verhalten festgestellt. Nach Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung lösten sich die Zellen mit verminderter *HTRA1*-Expression deutlich schneller voneinander und vom Boden der Kulturschalen. Da N-CADHERIN ein wesentliches Adhäsionsmolekül in vSMC darstellt und in einigen Studien einen Einfluss auf deren Proliferation und Migration zeigte (Sun et al., 2014; Uglow et al., 2003), wurde die Expression in den manipulierten Zellen untersucht. Die festgestellte Reduktion der *N-CADHERIN*-Expression nach *HTRA1*-Silencing objektiviert den subjektiven Eindruck einer Einschränkung der Zelladhäsion. Auch andere Studien stellten bereits eine Assoziation zwischen gesteigerter Migration und N-CADHERIN-Reduktion her (Blindt

et al., 2004; Jagadeesha et al., 2012). Es liegen allerdings auch Studien vor, die Steigerungen der vSMC-Migration mit vermehrter *N-CADHERIN*-Expression in Verbindung bringen (Dwivedi et al., 2008; Jones et al., 2002). Ähnlich widersprüchlich sind auch die Ergebnisse zur Bedeutung von N-CADHERIN für die vSMC-Proliferation mit Hinweisen für eine positive (Dwivedi et al., 2009; Uglow et al., 2003), als auch negative Regulation (Mui et al., 2015). Dabei postulierten Mui et al. eine Abhängigkeit der pro- oder antiproliferativen Wirkung des N-CADHERINS von der spezifischen Zusammensetzung der EZM und der Involvierung bestimmter Integrine.

In vSMC kann sowohl die Aktivierung des Notch-Signalwegs als auch von TGF- β die Expression von *N-CADHERIN* steigern (Nuessle Johannes et al., 2011; Wang et al., 2007). Eine Manipulation dieser Signalwege durch HTRA1 könnte also auch in der vorliegenden Arbeit zur Herunterregulierung der *N-CADHERIN* Expression geführt haben. Auch eine Regulation von N-CADHERIN auf Proteinebene in vSMC wäre denkbar. In isolierten vSMC aus *Htra1*^{-/-}-Mäusen wurde eine deutlich erhöhte Aktivität der Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) nachgewiesen (Ikawati et al., 2018). Diese Protease konnte in einer weiteren Studie über eine extrazelluläre Degradation von N-CADHERIN zu einer verstärkten Proliferation von vSMC führen (Dwivedi et al., 2009). Veränderungen von N-CADHERIN auf Proteinebene wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht. Diese und weitere Untersuchungen der Cadherinfunktion mittels beispielsweise einem Adhäsionsassay wären weitere Voraussetzung, um die Bedeutung der vorliegenden Beobachtung besser einordnen zu können.

Die vordergründige Aufgabe adulter kontraktile glatter Gefäßmuskelzellen ist die Regulation des Blutflusses und damit verbunden die Verteilung des Blutvolumens in den Organen. Verlieren vSMC ihren kontraktile Phänotyp, büßen sie auch ihre Kontraktilität ein und sind damit nicht mehr in der Lage eine adäquate Regulation des Blutflusses zu gewährleisten. Die beobachtete Reduktion kontraktile Proteine in vSMC nach *HTRA1*-Silencing ließ für diese Zellen auch eine verminderte Kontraktilität vermuten. Tatsächlich konnte in einer myographischen Untersuchung isolierter Arterien aus *Htra1*^{-/-}-Mäusen eine verminderte Kontraktilität gezeigt werden. Ergänzende Untersuchungen unseres Labors bestätigten dies auch in Kontraktilitätsassays mit kultivierten HUASMC (Klose et al., in Revision). In *Htra1*^{-/-}-

Mäusen wurde bislang keine Funktionseinschränkungen der Gefäße beschrieben. Um vorhandene Defizite zu demaskieren und die Regulation des Blutdrucks *in-vivo* zu überprüfen, wurde daher mittels DOCA-pellets eine Hypertonie in den Tieren induziert. In diesem Versuch zeigte sich in den *Htra1*^{-/-}-Mäusen ein geringerer Blutdruckanstieg nach DOCA-Implantation als in den ebenso behandelten *Htra1*^{+/+}-Mäusen. Auch gegenüber der *Htra1*^{-/-}-Kontrollgruppe, die zwar eine salzhaltige Trinklösung aber keine DOCA-pellet-Implantation bekam, kam es zu keinem signifikant höherem Blutdruckanstieg. In der Messung der basalen Blutdruckwerte vor Intervention wiesen die *Htra1*^{-/-}-Mäusen allerdings einen höheren systolischen Blutdruck als die *Htra1*^{+/+}-Kontrolltiere auf.

Die Regulation des Blutdrucks erfolgt über zahlreiche Mechanismen. Zentrale Stellgröße ist dabei in der Regel der Gefäßtonus, von welchem der periphere Gefäßwiderstand abhängt. Für die Entstehung der meisten Hypertonieformen spielt daher ein erhöhter Gefäßtonus eine entscheidende Rolle (Coffman, 2011). Auch die durch DOCA-Salz induzierte Hypertonie wird wesentlich durch eine verstärkte Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße verursacht (Wirth et al., 2007; Yemane et al., 2010). Da die oben aufgeführten Ergebnisse eine verminderte Kontraktionsfähigkeit von vSMC mit *HTRA1*-Defizit zeigen, lässt sich durch diese auch der geringere Blutdruckanstieg in den *Htra1*^{-/-}-Mäusen mit DOCA-Pellet erklären. Ein Mangel von *HTRA1* führt in den vSMC also über eine Modulation zum synthetischen Phänotyp zu einer verminderten Kontraktilität und verhindert hierdurch die Erhöhung des Gefäßtonus im DOCA-Salz induzierten Hypertoniemodell.

Für die beobachteten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren bei der basalen Blutdruckmessung könnten Veränderungen der Gefäßwand verantwortlich sein. Zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstands können neben einer verstärkten Kontraktion auch strukturelle Veränderungen der Arterienwand führen. Insbesondere eine Versteifung der Gefäßwand durch Verlust von Elastin ist mit der Entstehung hypertoner Zustände assoziiert (Wagenseil and Mecham, 2012). Arterielle Hypertonien sind zwar in CARASIL-Patienten beschrieben worden, stellen aber kein charakteristisches Merkmal dieser Erkrankung dar. Ein veränderter Aufbau von Arterienwänden mit vermehrter Degradation elastischer Fasern konnte allerdings in zahlreichen Proben von CARASIL-Patienten gefunden werden. In *Htra1*^{-/-}-Mäusen wurden kürzlich insbesondere in der Aorta ebenfalls Veränderungen der Gefäßwand mit einer vermehrten Elastindegradation festgestellt (Ikawati et al., 2018). Eine damit

verbundene Versteifung der Gefäßwand könnte die in dieser Arbeit beobachteten höheren basalen Blutdruckwerte in *Htra1*^{-/-}-Mäusen erklären. Weitere Untersuchungen zur Zusammensetzung der Gefäße und deren Steifigkeit sind aber für eine bessere Beurteilung notwendig.

Insgesamt ist die Aussagekraft dieser Versuchsreihe durch verschiedene Faktoren limitiert. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe war gering und verminderte sich innerhalb des Versuchszeitraumes weiter, sodass zur abschließenden Messung nur 16 Tiere zur Verfügung standen. Die manuelle Messung des Blutdrucks mittels Schwanzmanschette stellte einen weiteren Unsicherheitsfaktor dar, da, trotz aller Sorgfalt und Gewöhnung der Tiere an das Prozedere, die Toleranz der Versuchstiere für das Verfahren stark schwankte. Hier empfiehlt sich zukünftig eine invasive Blutdruckmessung mittels Telemetrie, um Fehler im Messverfahren zu minimieren.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit einen Einfluss der Serinprotease HTRA1 auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen. Die Verminderung der Expression von *HTRA1* führt *in-vitro* zur Annahme eines synthetischen Phänotyps mit Reduktion der Expression von Markerproteinen, sowie einer gesteigerten Proliferations- und Migrationsrate. HTRA1 scheint daher für die Aufrechterhaltung des kontraktiven Phänotyps notwendig zu sein. Diese These wird durch eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der vSMC *in-vivo* bestätigt, die zu einem verminderten Blutdruckanstieg im DOCA-Salz-induzierten Hypertoniemodell führte. Veränderte Expressionen bestimmter Notch-Zielgene legen eine Bedeutung des Notch-Signalwegs für diese Beobachtungen nahe. Die Resultate dieser Arbeit müssen allerdings in Zusammenschau mit anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe interpretiert werden, die kürzlich veröffentlicht wurden (Klose et al., in Revision). Hier konnte gezeigt werden, dass HTRA1 in vSMC neben Notch auch den TGFβ-Signalweg reguliert. Obwohl die alleinige Aktivierung beider Signalwege eine kontraktile Differenzierung förderte, führte ihre gleichzeitige Aktivierung durch HTRA1-Verlust zu einer starken Expression gemeinsamer *HES*- und *HEY*-Zielgene und hierüber zur Dedifferenzierung der vSMC.

Während ein Einfluss von HTRA1 auf den TGFβ-Signalweg bereits als möglicher Pathomechanismus von CARASIL diskutiert wurde, ist die Interaktion mit dem Notch-Signalweg eine hier erstmals beschriebene Beobachtung und stellt eine Verbindung zum CADASIL-Syndrom mit seiner ursächlichen *NOTCH3*-Mutation her. Ein

ähnlicher Pathomechanismus von CARASIL und CADASIL wurde aufgrund der ähnlichen klinischen Präsentation bereits vermutet, zumal auch kürzliche Entdeckungen wie die Anreicherungen von funktionsuntüchtigem HTRA1 in den CADASIL-spezifischen extrazellulären Ablagerungen auf eine mögliche Verbindung hinweisen (Zellner et al., 2018).

Aktuelle Studien zeigen, dass auch heterozygote *HTRA1*-Mutationen Ursache einer zerebralen Mikroangiopathie sein können und dass die Prävalenz solcher Mutationen deutlich höher ist, als die des sehr seltenen CARASIL-Syndroms (Lee et al., 2018). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit eines umfassenden Verständnisses der von HTRA1 regulierten Vorgänge sowohl in physiologischem als auch pathologischem Kontext. Neben weiteren Studien unter anderem zu den zahlreichen Interaktionen von HTRA1 mit Bestandteilen der EZM und deren Einfluss auf die Gefäßfunktion sollte auch die neue Verbindung zum Notch-Signalweg weiter erforscht werden. Da der Ligand JAG1 den primären Interaktionspartner darstellt, sollten zukünftige Arbeiten die Auswirkungen einer veränderten Expression dieses Liganden auf vSMC und die Pathogenese zerebraler Mikroangiopathien untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Strukturelle und funktionelle Beeinträchtigungen von Blutgefäßen sind an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen beteiligt. Glatte Gefäßmuskelzellen stellen den häufigsten Zelltyp in Gefäßwänden dar und sind essentieller Bestandteil zahlreicher pathomechanistischer Überlegungen. Hierbei spielt die außergewöhnliche Plastizität dieser Zellen eine entscheidende Rolle. Diese erlaubt es ihnen, auf bestimmte Reize mit einer Änderung ihres Phänotyps zu antworten und dabei ihre Kontraktilität zugunsten einer erhöhten Migrations- und Proliferationsfähigkeit sowie einer vermehrten Syntheseleistung zu vermindern.

Die Protease HTRA1 wird sowohl in Endothel- als auch in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und größtenteils nach extrazellulär sezerniert. Ihre physiologischen Aufgaben sind weithin unbekannt, Mutationen im *HTRA1*-Gen stellen allerdings die Ursache der zerebralen Mikroangiopathie CARASIL dar. Bislang unbekannte Mechanismen führen hierbei zu einer insbesondere zerebral veränderten Gefäßarchitektur mit Verlust von glatten Gefäßmuskelzellen und daraus resultierenden, vorwiegend neurologischen, Beeinträchtigungen. Unser Labor konnte kürzlich eine Interaktion zwischen HTRA1 und dem Notch-Liganden Jagged1 mit darauffolgender Degradation des Liganden nachweisen. Der Notch-Signalweg ist ein bekannter Regulator der Phänotyp-Modulation glatter Gefäßmuskelzellen, spielte aber in bisherigen Modellen der CARASIL-Pathogenese keine Rolle.

Diese Arbeit zeigt, dass HTRA1 in glatten Gefäßmuskelzellen für eine kontraktile Differenzierung notwendig ist und ein Mangel der Protease zur Phänotyp-Modulation mit Etablierung eines synthetischen Phänotyps führt. Eine HTRA1-Überexpression reduzierte die Migrations- und Proliferationsrate, während ein Verlust eine Steigerung dieser Parameter sowie eine verminderte Kontraktilität der Muskelzellen zur Folge hatte. HTRA1-Knockoutmäuse wiesen dementsprechend eine beeinträchtigte arterielle Vasokonstriktion und einen verminderten Blutdruckanstieg nach Hypertonie-Induktion mittels DOCA-Salz auf. Expressionsanalysen zeigten eine Abhängigkeit der Expression einiger Notch-Zielgene vom Expressionslevel der HTRA1-Protease. Gemeinsam mit weiteren Ergebnissen unseres Labors führte dies zu der Schlussfolgerung, dass die Phänotyp-Modulation nach HTRA1-Verlust auf eine Jagged1-medierte simultane Überaktivierung des TGF β - und Notch-Signalwegs

zurückzuführen ist. Zusammenfassend verdeutlichen die beschriebenen Ergebnisse, dass HTRA1 eine wesentliche Rolle in der Homöostase glatter Gefäßmuskelzellen spielt. Zudem zeigt die in Muskelzellen erstmals beschriebene Interaktion zwischen HTRA1 und dem Notch-Signalweg mögliche pathogenetische Parallelen der zerebralen Mikroangiopathien CARASIL und CADASIL auf.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adam, P.J., Regan, C.P., Hautmann, M.B., and Owens, G.K. (2000). Positive- and Negative-acting Krüppel-like Transcription Factors Bind a Transforming Growth Factor β Control Element Required for Expression of the Smooth Muscle Cell Differentiation Marker SM22 α in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37798-37806.

Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G.A., and Bochaton-Piallat, M.L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 114, 540-550.

Altobelli, E., Marzioni, D., Lattanzi, A., and Angeletti, P.M. (2015). HtrA1: Its future potential as a novel biomarker for cancer. *Oncology Reports* 34, 555-566.

An, E., Sen, S., Park, S.K., Gordish-Dressman, H., and Hathout, Y. (2010). Identification of Novel Substrates for the Serine Protease HTRA1 in the Human RPE Secretome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, 3379-3386.

Auer, D.P., Pütz, B., Gössl, C., Elbel, G.-K., Gasser, T., and Dichgans, M. (2001). Differential Lesion Patterns in CADASIL and Sporadic Subcortical Arteriosclerotic Encephalopathy: MR Imaging Study with Statistical Parametric Group Comparison. *Radiology* 218, 443-451.

Baeten, J.T., and Lilly, B. (2015). Differential Regulation of NOTCH2 and NOTCH3 Contribute to Their Unique Functions in Vascular Smooth Muscle Cells. *The Journal of biological chemistry* 290, 16226-16237.

Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., *et al.* (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21, 6684-6688.

Baudrimont, M., Dubas, F., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.G. (1993). Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study. *Stroke* 24, 122-125.

Baykara, E., Gesierich, B., Adam, R., Tuladhar, A.M., Biesbroek, J.M., Koek, H.L., Ropele, S., Jouvent, E., Chabriat, H., Ertl-Wagner, B., *et al.* (2016). A Novel Imaging Marker for Small Vessel Disease Based on Skeletonization of White Matter Tracts and Diffusion Histograms. *Annals of Neurology* 80, 581-592.

Bayrakli, F., Balaban, H., Gurelik, M., Hizmetli, S., and Topaktas, S. (2014). Mutation in the HTRA1 gene in a patient with degenerated spine as a component of CARASIL syndrome. *Turkish neurosurgery* 24, 67-69.

Beaufort, N., Scharrer, E., Kremmer, E., Lux, V., Ehrmann, M., Huber, R., Houlden, H., Werring, D., Haffner, C., and Dichgans, M. (2014). Cerebral small vessel disease-related protease HtrA1 processes latent TGF- β binding protein 1 and facilitates TGF- β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 16496-16501.

Bersano, A., Bedini, G., Markus, H.S., Vitali, P., Colli-Tibaldi, E., Taroni, F., Gellera, C., Baratta, S., Mosca, L., Carrera, P., *et al.* (2018). The role of clinical and neuroimaging features in the diagnosis of CADASIL. *Journal of Neurology* 265, 2934-2943.

Bianchi, S., Di Palma, C., Gallus, G.N., Taglia, I., Poggiani, A., Rosini, F., Rufa, A., Muresanu, D.F., Cerase, A., Dotti, M.T., *et al.* (2014). Two novel HTRA1 mutations in a European CARASIL patient. *Neurology* 82, 898-900.

Blindt, R., Bosserhoff, A.-K., Dammers, J., Krott, N., Demircan, L., Hoffmann, R., Hanrath, P., Weber, C., and Vogt, F. (2004). Downregulation of N-cadherin in the neointima stimulates migration of smooth muscle cells by RhoA deactivation. *Cardiovascular Research* 62, 212-222.

Boucher, J., Gridley, T., and Liaw, L. (2012). Molecular Pathways of Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Frontiers in Physiology* 3.

Boucher, J.M., Peterson, S.M., Urs, S., Zhang, C., and Liaw, L. (2011). The miR-143/145 Cluster Is a Novel Transcriptional Target of Jagged-1/Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 286, 28312-28321.

Boulos, N., Helle, F., Dussaule, J.-C., Placier, S., Milliez, P., Djurdjaj, S., Guerrot, D., Joutel, A., Ronco, P., and Boffa, J.-J. (2011). Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension, HYPERTENSIONAHA*. 111.170746.

BOUSSER, M.-G., and TOURNIER-LASSERVE, E. (2001). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: from stroke to vessel wall physiology. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 70, 285-287.

Bousser, M.G., and Tournier-Lasserre, E. (1994). Summary of the proceedings of the First International Workshop on CADASIL. Paris, May 19-21, 1993. *Stroke* 25, 704-707.

Bowler, J.V., and Hachinski, V. (1994). Progress in the genetics of cerebrovascular disease: inherited subcortical arteriopathies. *Stroke* 25, 1696-1698.

Brozovich, F.V., Nicholson, C.J., Degen, C.V., Gao, Y.Z., Aggarwal, M., and Morgan, K.G. (2016). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacological Reviews* 68, 476-532.

Buffon, F., Porcher, R., Hernandez, K., Kurtz, A., Pointeau, S., Vahedi, K., Bousser, M.-G., and Chabriat, H. (2006). Cognitive profile in CADASIL. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 77, 175-180.

Cai, B., Zeng, J., Lin, Y., Lin, Y., Lin, W., Lin, W., Li, Z., and Wang, N. (2015). A frameshift mutation in HTRA1 expands CARASIL syndrome and peripheral small arterial disease to the Chinese population. *Neurological Sciences* 36, 1387-1391.

Campioni, M., Severino, A., Manente, L., Tuduca, I.L., Toldo, S., Caraglia, M., Crispi, S., Ehrmann, M., He, X., Maguire, J., *et al.* (2010). The Serine Protease Htra1

Specifically Interacts and Degrades the Tuberous Sclerosis Complex 2 Protein. *Molecular Cancer Research* 8, 1248-1260.

Caolo, V., Schulten, H.M., Zhuang, Z.W., Murakami, M., Wagenaar, A., Verbruggen, S., Molin, D.G.M., and Post, M.J. (2011). Soluble Jagged-1 Inhibits Neointima Formation by Attenuating Notch-Herp2 Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 1059-1065.

Capone, C., Cognat, E., Ghezali, L., Baron-Menguy, C., Aubin, D., Mesnard, L., Stöhr, H., Domenga-Denier, V., Nelson, M.T., and Joutel, A. (2016a). Reducing Timp3 or vitronectin ameliorates disease manifestations in CADASIL mice. *Annals of neurology* 79, 387-403.

Capone, C., Dabertrand, F., Baron-Menguy, C., Chalaris, A., Ghezali, L., Domenga-Denier, V., Schmidt, S., Huneau, C., Rose-John, S., Nelson, M.T., *et al.* (2016b). Mechanistic insights into a TIMP3-sensitive pathway constitutively engaged in the regulation of cerebral hemodynamics. *eLife* 5, e17536.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9, 653.

Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.-G. (2009). CADASIL. *The Lancet Neurology* 8, 643-653.

Chabriat, H., Levy, C., Taillia, H., Iba-Zizen, M.-T., Vahedi, K., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.-G. (1998). Patterns of MRI lesions in CADASIL. *Neurology* 51, 452-457.

Chabriat, H., Tournier-Lasserre, E., Vahedi, K., Leys, D., Joutel, A., Nibbio, A., Escaillas, J.P., Iba-Zizen, M.T., Bracard, S., Tehindrazanarivelo, A., *et al.* (1995a). Autosomal dominant migraine with MRI white-matter abnormalities mapping to the CADASIL locus. *Neurology* 45, 1086-1091.

Chabriat, H., Vahedi, K., Bousser, M.G., Iba-Zizen, M.T., Joutel, A., Nibbio, A., Nagy, T.G., Tournier Lasserre, E., Krebs, M.O., Julien, J., *et al.* (1995b). Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. *The Lancet* 346, 934-939.

Cheng, H., Zhu, H., Cao, M., Lu, C., Bao, S., and Pan, Y. (2018). HtrA1 suppresses the growth of pancreatic cancer cells by modulating Notch-1 expression. *Braz J Med Biol Res* 52, e7718.

Cheung, C., Bernardo, A.S., Trotter, M.W., Pedersen, R.A., and Sinha, S. (2012). Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin-dependent disease susceptibility. *Nat Biotechnol* 30, 165-173.

Chien, J., Aletti, G., Baldi, A., Catalano, V., Mureto, P., Keeney, G.L., Kalli, K.R., Staub, J., Ehrmann, M., Cliby, W.A., *et al.* (2006). Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. *J Clin Invest* 116, 1994-2004.

Chien, J., Campioni, M., Shridhar, V., and Baldi, A. (2009a). HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 451-468.

- Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A., and Shridhar, V. (2009b). Serine Protease HtrA1 Associates with Microtubules and Inhibits Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology* 29, 4177-4187.
- Chu, Q., Diedrich, J.K., Vaughan, J.M., Donaldson, C.J., Nunn, M.F., Lee, K.-F., and Saghatelian, A. (2016). HtrA1 Proteolysis of ApoE In Vitro Is Allele Selective. *Journal of the American Chemical Society* 138, 9473-9478.
- Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., and Ehrmann, M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 152-162.
- Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M. (2002). The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate. *Molecular Cell* 10, 443-455.
- Clawson, G.A., Bui, V., Xin, P., Wang, N., and Pan, W. (2008). Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* 105, 81-88.
- Coffman, T.M. (2011). Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature Medicine* 17, 1402.
- Colmant, H. (1980). Familiäre zerebrale Gefäßerkrankung. *Zbl Allgemein Pathologie Bd* 124, 163.
- Corselli, M., Chen, C.W., Crisan, M., Lazzari, L., and Peault, B. (2010). Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1104-1109.
- Craggs, L.J., Yamamoto, Y., Deramecourt, V., and Kalaria, R.N. (2014). Microvascular pathology and morphometrics of sporadic and hereditary small vessel diseases of the brain. *Brain Pathology* 24, 495-509.
- Croall, I.D., Lohner, V., Moynihan, B., Khan, U., Hassan, A., O'Brien, J.T., Morris, R.G., Tozer, D.J., Cambridge, V.C., Harkness, K., *et al.* (2017). Using DTI to assess white matter microstructure in Cerebral Small Vessel Disease (SVD) in multi-centre studies. *Clinical Science*.
- Davous, P., and Fallet-Bianco, C. (1991). Familial subcortical dementia with arteriopathic leukoencephalopathy. A clinico-pathological case. *Revue neurologique* 147, 376-384.
- Desmond, D.W., Moroney, J.T., Lynch, T., Chan, S., Chin, S.S., and Mohr, J.P. (1999). The Natural History of CADASIL. *Stroke* 30, 1230-1233.
- Dichgans, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T., and Gasser, T. (1998). The phenotypic spectrum of CADASIL: Clinical findings in 102 cases. *Annals of Neurology* 44, 731-739.
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., and Li, Z. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & development* 18, 2730-2735.

- Duering, M., Zieren, N., Hervé, D., Jouvent, E., Reyes, S., Peters, N., Pachai, C., Opherk, C., Chabriat, H., and Dichgans, M. (2011). Strategic role of frontal white matter tracts in vascular cognitive impairment: a voxel-based lesion-symptom mapping study in CADASIL. *Brain* *134*, 2366-2375.
- Dwivedi, A., Sala-Newby, G.B., and George, S.J. (2008). Regulation of cell–matrix contacts and β -catenin signaling in VSMC by integrin-linked kinase: implications for intimal thickening. *Basic Research in Cardiology* *103*, 244-256.
- Dwivedi, A., Slater, S.C., and George, S.J. (2009). MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby β -catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Research* *81*, 178-186.
- Eigenbrot, C., Ultsch, M., Lipari, Michael T., Moran, P., Lin, S.J., Ganesan, R., Quan, C., Tom, J., Sandoval, W., van Lookeren Campagne, M., *et al.* (2012). Structural and Functional Analysis of HtrA1 and Its Subdomains. *Structure* *20*, 1040-1050.
- Feuerhake, F., Volk, B., Ostertag, C., Jungling, F., Kassubek, J., Orszagh, M., and Dichgans, M. (2002). Reversible coma with raised intracranial pressure: an unusual clinical manifestation of CADASIL. *Acta neuropathologica* *103*, 188-192.
- Fischer, A., and Gessler, M. (2007). Delta–Notch—and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research* *35*, 4583-4596.
- Fouillade, C., Monet-Lepretre, M., Baron-Menguy, C., and Joutel, A. (2012). Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease. *Cardiovasc Res* *95*, 138-146.
- Friedrich, U., Datta, S., Schubert, T., Plössl, K., Schneider, M., Grassmann, F., Fuchshofer, R., Tiefenbach, K.-J., Längst, G., and Weber, B.H.F. (2015). Synonymous variants in HTRA1 implicated in AMD susceptibility impair its capacity to regulate TGF- β signaling. *Human Molecular Genetics* *24*, 6361-6373.
- Friedrich, U., Myers, C.A., Fritsche, L.G., Milenkovich, A., Wolf, A., Corbo, J.C., and Weber, B.H. (2011). Risk- and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic effects due to protein deficiency. *Hum Mol Genet* *20*, 1387-1399.
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., and Resink, T.J. (2018a). Cadherins in vascular smooth muscle cell (patho)biology: Quid nos scimus? *Cellular Signalling* *45*, 23-42.
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., and Resink, T.J. (2018b). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling* *52*, 48-64.
- Fukutake, T. (2011). Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL): From Discovery to Gene Identification. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* *20*, 85-93.

Fukutake, T., Hattori, T., Kita, K., and Hirayama, K. (1985). [Familial juvenile encephalopathy (Binswanger type) with alopecia and lumbago--a syndrome]. *Rinsho Shinkeigaku* 25, 949-955.

Gadson, P.F., Jr., Dalton, M.L., Patterson, E., Svoboda, D.D., Hutchinson, L., Schram, D., and Rosenquist, T.H. (1997). Differential response of mesoderm- and neural crest-derived smooth muscle to TGF-beta1: regulation of c-myc and alpha1 (I) procollagen genes. *Exp Cell Res* 230, 169-180.

George, S.J., and Beeching, C.A. (2006). Cadherin:catenin complex: A novel regulator of vascular smooth muscle cell behaviour. *Atherosclerosis* 188, 1-11.

Globus, O., Evron, T., Caspi, M., Siman-Tov, R., and Rosin-Arbesfeld, R. (2017). High-Temperature Requirement A1 (Htra1) - A Novel Regulator of Canonical Wnt Signaling. *Scientific reports* 7, 17995-17995.

Goumans, M.-J., and ten Dijke, P. (2018). TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.

Graham, J.R., Chamberland, A., Lin, Q., Li, X.J., Dai, D., Zeng, W., Ryan, M.S., Rivera-Bermúdez, M.A., Flannery, C.R., and Yang, Z. (2013). Serine Protease HTRA1 Antagonizes Transforming Growth Factor- β Signaling by Cleaving Its Receptors and Loss of HTRA1 In Vivo Enhances Bone Formation. *PLoS ONE* 8, e74094.

Grassmann, F., Heid, I.M., and Weber, B.H.F. (2017). Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration. *Genetics* 205, 919-924.

Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T., *et al.* (2005). Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 6021-6026.

Grau, S., Richards, P.J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A.S., Junker, U., Jones, S.A., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2006). The Role of Human HtrA1 in Arthritic Disease. *Journal of Biological Chemistry* 281, 6124-6129.

Guo, X., and Chen, S.Y. (2012). Transforming growth factor-beta and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem* 3, 41-52.

Hadfield, K.D., Rock, C.F., Inkson, C.A., Dallas, S.L., Sudre, L., Wallis, G.A., Boot-Handford, R.P., and Canfield, A.E. (2008). Htra1 Inhibits Mineral Deposition by Osteoblasts: REQUIREMENT FOR THE PROTEASE AND PDZ DOMAINS. *Journal of Biological Chemistry* 283, 5928-5938.

Haffner, C., Malik, R., and Dichgans, M. (2016). Genetic factors in cerebral small vessel disease and their impact on stroke and dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36, 158-171.

Hao, H., Gabbiani, G., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2003). Arterial Smooth Muscle Cell Heterogeneity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, 1510-1520.

Hara , K., Shiga , A., Fukutake , T., Nozaki , H., Miyashita , A., Yokoseki , A., Kawata , H., Koyama , A., Arima , K., Takahashi , T., *et al.* (2009). Association of HTRA1 Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease. *New England Journal of Medicine* *360*, 1729-1739.

Hasan, M.Z., Ikawati, M., Tocharus, J., Kawaichi, M., and Oka, C. (2015). Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice. *Developmental Biology* *397*, 89-102.

Hautmann, M.B., Madsen, C.S., and Owens, G.K. (1997). A Transforming Growth Factor β (TGF β) Control Element Drives TGF β -induced Stimulation of Smooth Muscle α -Actin Gene Expression in Concert with Two CArG Elements. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 10948-10956.

He, X., Khurana, A., Maguire, J.L., Chien, J., and Shridhar, V. (2012). HtrA1 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced cytotoxicity by targeting XIAP for degradation. *Int J Cancer* *130*, 1029-1035.

Henshall, T.L., Keller, A., He, L., Johansson, B.R., Wallgard, E., Raschperger, E., Mäe, M.A., Jin, S., Betsholtz, C., and Lendahl, U. (2014). Notch3 is necessary for blood vessel integrity in the central nervous system. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, ATVBAHA*. 114.304849.

Hirschi, K.K., Lai, L., Belaguli, N.S., Dean, D.A., Schwartz, R.J., and Zimmer, W.E. (2002). Transforming Growth Factor- β Induction of Smooth Muscle Cell Phenotype Requires Transcriptional and Post-transcriptional Control of Serum Response Factor. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 6287-6295.

Hou, J., Clemmons, D.R., and Smeekens, S. (2005). Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5. *Journal of Cellular Biochemistry* *94*, 470-484.

Ikawati, M., Kawaichi, M., and Oka, C. (2018). Loss of HtrA1 serine protease induces synthetic modulation of aortic vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE* *13*, e0196628.

Ishiko, A., Shimizu, A., Nagata, E., Takahashi, K., Tabira, T., and Suzuki, N. (2006). Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta neuropathologica* *112*, 333-339.

Ito, S., Takao, M., Fukutake, T., Hatsuta, H., Funabe, S., Ito, N., Shimoe, Y., Niki, T., Nakano, I., Fukayama, M., *et al.* (2016). Histopathologic Analysis of Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL): A Report of a New Genetically Confirmed Case and Comparison to 2 Previous Cases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* *75*, 1020-1030.

Jagadeesha, D.K., Takapoo, M., Banfi, B., Bhalla, R.C., and Miller, J.F.J. (2012). Nox1 transactivation of epidermal growth factor receptor promotes N-cadherin shedding and smooth muscle cell migration. *Cardiovascular Research* *93*, 406-413.

Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* *9*, 685.

- Jang, S.H., and Seo, Y.S. (2015). Injuries of neural tracts in a patient with CADASIL: a diffusion tensor imaging study. *BMC Neurology* 15, 176.
- Jin, S., Hansson, E.M., Tikka, S., Lanner, F., Sahlgren, C., Farnebo, F., Baumann, M., Kalimo, H., and Lendahl, U. (2008). Notch Signaling Regulates Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Beta Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 102, 1483-1491.
- Jo, H., Patterson, V., Stoessel, S., Kuan, C.-Y., and Hoh, J. (2014). Protoporphyrins Enhance Oligomerization and Enzymatic Activity of HtrA1 Serine Protease. *PLoS ONE* 9, e115362.
- Jones, A., Kumar, S., Zhang, N., Tong, Z., Yang, J.-H., Watt, C., Anderson, J., Amrita, Fillerup, H., McCloskey, M., *et al.* (2011). Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14578-14583.
- Jones, M., Sabatini, P.J.B., Lee, F.S.H., Bendeck, M.P., and Langille, B.L. (2002). N-Cadherin Upregulation and Function in Response of Smooth Muscle Cells to Arterial Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 1972-1977.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserre, E. (2000). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *The Journal of clinical investigation* 105, 597-605.
- Joutel, A., Haddad, I., Ratelade, J., and Nelson, M.T. (2016). Perturbations of the cerebrovascular matrisome: A convergent mechanism in small vessel disease of the brain? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 36, 143-157.
- Kalimo, H., Ruchoux, M.M., Viitanen, M., and Kalara, R.N. (2002). CADASIL: a common form of hereditary arteriopathy causing brain infarcts and dementia. *Brain Pathology* 12, 371-384.
- Kamei, M., Saunders, W.B., Bayless, K.J., Dye, L., Davis, G.E., and Weinstein, B.M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 442, 453-456.
- Kanda, A., Stambolian, D., Chen, W., Curcio, C.A., Abecasis, G.R., and Swaroop, A. (2010). Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis* 16, 1317-1323.
- Kao, C., and Carsten, M.E. (1997). Cellular aspects of smooth muscle function (Cambridge University Press).
- Klose, R., Adam, M.G., Weis, E.M., Moll, I., Wustehube-Lausch, J., Tetzlaff, F., Oka, C., Ehrmann, M., and Fischer, A. (2018). Inactivation of the serine protease HTRA1 inhibits tumor growth by deregulating angiogenesis. *Oncogene* 37, 4260-4272.
- Korff, T., and Augustin, H.G. (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143, 1341-1352.

- Korff, T., Ernst, E., Nobiling, R., Feldner, A., Reiss, Y., Plate, K.H., Fiedler, U., Augustin, H.G., and Hecker, M. (2012). Angiopoietin-1 mediates inhibition of hypertension-induced release of angiopoietin-2 from endothelial cells. *Cardiovasc Res* 94, 510-518.
- Kumar, S.L., and Mahr, G. (1997). CADASIL presenting as bipolar disorder. *Psychosomatics* 38, 397-398.
- Launay, S., Maubert, E., Lebeurrier, N., Tennstaedt, A., Campioni, M., Docagne, F., Gabriel, C., Dauphinot, L., Potier, M.C., Ehrmann, M., *et al.* (2008). HtrA1-dependent proteolysis of TGF- β controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ* 15, 1408-1416.
- Lee, Y.-C., Chung, C.-P., Chao, N.-C., Fuh, J.-L., Chang, F.-C., Soong, B.-W., and Liao, Y.-C. (2018). Characterization of Heterozygous HTRA1 Mutations in Taiwanese Patients With Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* 49, 1593-1601.
- Li, R., and Zhang, Q. (2015). HtrA1 may regulate the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by TGF- β 1. *Journal of Molecular Histology* 46, 137-144.
- Li, X., Zhang, X., Leathers, R., Makino, A., Huang, C., Parsa, P., Macias, J., Yuan, J.X., Jamieson, S.W., and Thistlethwaite, P.A. (2009a). Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nature medicine* 15, 1289.
- Li, Y., Takeshita, K., Liu, P.-Y., Satoh, M., Oyama, N., Mukai, Y., Chin, M.T., Krebs, L., Kotlikoff, M.I., Radtke, F., *et al.* (2009b). Smooth Muscle Notch1 Mediates Neointimal Formation After Vascular Injury. *Circulation* 119, 2686-2692.
- Licht, A.H., Nubel, T., Feldner, A., Jurisch-Yaksi, N., Marcello, M., Demicheva, E., Hu, J.H., Hartenstein, B., Augustin, H.G., Hecker, M., *et al.* (2010). Junb regulates arterial contraction capacity, cellular contractility, and motility via its target Myl9 in mice. *J Clin Invest* 120, 2307-2318.
- Lindner, V., Booth, C., Prudovsky, I., Small, D., Maciag, T., and Liaw, L. (2001). Members of the Jagged/Notch Gene Families Are Expressed in Injured Arteries and Regulate Cell Phenotype via Alterations in Cell Matrix and Cell-Cell Interaction. *The American Journal of Pathology* 159, 875-883.
- Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Research* 16, 10053-10067.
- Liu, H., Kennard, S., and Lilly, B. (2009). NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circulation research* 104, 466-475.
- Liu, J., Dong, F., and Hoh, J. (2015). Loss of HtrA1-induced attenuation of TGF- β signaling in fibroblasts might not be the main mechanism of CARASIL pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E1693-E1693.

- Liu, Y., Wei, E., Zhao, J., Kong, D., and Li, B. (2018). Downregulation of SM22alpha protein by hypermethylation of its promoter in colorectal cancer. *Oncol Lett* 15, 7675-7680.
- Lorenzi, M., Lorenzi, T., Marzetti, E., Landi, F., Vetrano, D.L., Settanni, S., Antocicco, M., Bonassi, S., Valdiglesias, V., Bernabei, R., *et al.* (2016). Association of frailty with the serine protease HtrA1 in older adults. *Experimental Gerontology* 81, 8-12.
- Lorenzi, T., Nițulescu, E.A., Zizzi, A., Lorenzi, M., Paolinelli, F., Aspriello, S.D., Baniță, M., Crăițoiu, Ș., Goteri, G., Barbatelli, G., *et al.* (2014). The Novel Role of HtrA1 in Gingivitis, Chronic and Aggressive Periodontitis. *PLoS ONE* 9, e96978.
- Louvi, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Notch and disease: A growing field. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 473-480.
- Luca, A.D., Falco, M.D., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M.G., and Baldi, A. (2003). Distribution of the Serine Protease HtrA1 in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51, 1279-1284.
- Lüllmann-Rauch, R., and Asan, E. (2015). Taschenlehrbuch Histologie, 5., vollständig überarbeitete Auflage (Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag).
- Maeda, S., Nakayama, H., Isaka, K., Aihara, Y., and Nemoto, S. (1976). Familial Unusual Encephalopathy of Binswanger's Type without Hypertension. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 30, 165-177.
- Maeda, S., Nemoto, K., Suwa, N., Yamagata, J., and Nagashima, Y. (1965). [Clinico-Pathological Conference on a Case of Encephalomalacia (a Question of Binswanger's Disease)]. *Saishin Igaku* 20, 933-940.
- Majesky, M.W., Dong, X.R., Regan, J.N., and Hognlund, V.J. (2011). Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res* 108, 365-377.
- Marzioni, D., Lorenzi, T., Altobelli, E., Giannubilo, S.R., Paolinelli, F., Tersigni, C., Crescimanno, C., Monsurrò, V., Tranquilli, A.L., Di Simone, N., *et al.* (2012). Alterations of maternal plasma HTRA1 level in preeclampsia complicated by IUGR. *Placenta* 33, 1036-1038.
- Mas, J.L., Dilouya, A., and de Recondo, J. (1992). A familial disorder with subcortical ischemic strokes, dementia, and leukoencephalopathy. *Neurology* 42, 1015-1015.
- Mascalchi, M., Pantoni, L., Giannelli, M., Valenti, R., Bianchi, A., Pracucci, G., Orsolini, S., Ciulli, S., Tessa, C., Poggesi, A., *et al.* (2017). Diffusion Tensor Imaging to Map Brain Microstructural Changes in CADASIL. *Journal of Neuroimaging* 27, 85-91.
- Massagué, J., and Chen, Y.-G. (2000). Controlling TGF- β signaling. *Genes & Development* 14, 627-644.
- Mendioroz, M., Fernández-Cadenas, I., del Río-Espinola, A., Rovira, A., Solé, E., Fernández-Figueras, M.T., García-Patos, V., Sastre-Garriga, J., Domingues-Montanari, S., Álvarez-Sabín, J., *et al.* (2010). A missense HTRA1 mutation expands CARASIL syndrome to the Caucasian population. *Neurology* 75, 2033-2035.

Menezes Cordeiro, I., Nzwalo, H., Sá, F., Ferreira, R.B., Alonso, I., Afonso, L., and Basílio, C. (2015). Shifting the CARASIL Paradigm. Report of a Non-Asian Family and Literature Review *46*, 1110-1112.

Miano, J.M., Cserjesi, P., Ligon, K.L., Periasamy, M., and Olson, E.N. (1994). Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ Res* *75*, 803-812.

Monet-Leprêtre, M., Haddad, I., Baron-Menguy, C., Fouillot-Panchal, M., Riani, M., Domenga-Denier, V., Dussaule, C., Cognat, E., Vinh, J., and Joutel, A. (2013). Abnormal recruitment of extracellular matrix proteins by excess Notch3ECD: a new pathomechanism in CADASIL. *Brain* *136*, 1830-1845.

Morrow, D., Guha, S., Sweeney, C., Birney, Y., Walshe, T., O'Brien, C., Walls, D., Redmond, E.M., and Cahill, P.A. (2008). Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res* *103*, 1370-1382.

Mui, Keeley L., Bae, Yong H., Gao, L., Liu, S.-L., Xu, T., Radice, Glenn L., Chen, Christopher S., and Assoian, Richard K. (2015). N-Cadherin Induction by ECM Stiffness and FAK Overrides the Spreading Requirement for Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Reports* *10*, 1477-1486.

Mykkänen, K., Savontaus, M.-L., Juvonen, V., Sistonen, P., Tuisku, S., Tuominen, S., Penttinen, M., Lundkvist, J., Viitanen, M., Kalimo, H., *et al.* (2004). Detection of the founder effect in Finnish CADASIL families. *European Journal Of Human Genetics* *12*, 813.

Narayan, S.K., Gorman, G., Kalaria, R.N., Ford, G.A., and Chinnery, P.F. (2012). The minimum prevalence of CADASIL in northeast England. *Neurology* *78*, 1025-1027.

Nemoto, S. (1966). Einige Beiträge zur Encephalitis subcorticalis chronica progressiva (Binswanger). Festschrift zum Zurücktritt von Professor Toshimi Ishibashi, 51-67.

Nie, G.-Y., Hampton, A., Li, Y., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A. (2003). Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochemical Journal* *371*, 39-48.

Niessen, P., Rensen, S., van Deursen, J., De Man, J., De Laet, A., Vanderwinden, J.M., Wedel, T., Baker, D., Doevendans, P., Hofker, M., *et al.* (2005). Smoothelin-a is essential for functional intestinal smooth muscle contractility in mice. *Gastroenterology* *129*, 1592-1601.

Nils Peters, Christian Opherk, Adrian Danek, Clive Ballard, Jürgen Herzog, and Martin Dichgans (2005). The Pattern of Cognitive Performance in CADASIL: A Monogenic Condition Leading to Subcortical Ischemic Vascular Dementia. *American Journal of Psychiatry* *162*, 2078-2085.

Nishimoto, Y., Shibata, M., Nihonmatsu, M., Nozaki, H., Shiga, A., Shirata, A., Yamane, K., Kosakai, A., Takahashi, K., Nishizawa, M., *et al.* (2011). A novel mutation in the HTRA1 gene causes CARASIL without alopecia. *Neurology* *76*, 1353-1355.

Nosedá, M., Fu, Y., Niessen, K., Wong, F., Chang, L., McLean, G., and Karsan, A. (2006). Smooth Muscle α -Actin Is a Direct Target of Notch/CSL. *Circulation Research* 98, 1468-1470.

Nozaki, H., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2014). Features of Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. *Stroke* 45, 3447-3453.

Nozaki, H., Sekine, Y., Fukutake, T., Nishimoto, Y., Shimoe, Y., Shirata, A., Yanagawa, S., Hirayama, M., Tamura, M., Nishizawa, M., *et al.* (2015). Characteristic features and progression of abnormalities on MRI for CARASIL. *Neurology* 85, 459-463.

Nuessle Johannes, M., Giehl, K., Herzog, R., Stracke, S., and Menke, A. (2011). TGF β 1 suppresses vascular smooth muscle cell motility by expression of N-cadherin. In *Biological Chemistry*, pp. 461.

Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., *et al.* (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf β family proteins. *Development* 131, 1041-1053.

Okeda, R., Arima, K., and Kawai, M. (2002). Arterial Changes in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) in Relation to Pathogenesis of Diffuse Myelin Loss of Cerebral White Matter. *Stroke* 33, 2565-2569.

Opherk, C., Peters, N., Herzog, J., Luedtke, R., and Dichgans, M. (2004). Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain* 127, 2533-2539.

Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84, 767-801.

Page, M.J., and Di Cera, E. (2008). Evolution of Peptidase Diversity. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 30010-30014.

Pallen, M.J., and Wren, B.W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Molecular Microbiology* 26, 209-221.

Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology* 9, 689-701.

Poepsel, S., Sprengel, A., Sacca, B., Kaschani, F., Kaiser, M., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2015). Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1. *Nat Chem Biol* 11, 862-869.

Qiu, P., Feng, X.-H., and Li, L. (2003). Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF- β 1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35, 1407-1420.

- Qiu, P., Ritchie, R.P., Fu, Z., Cao, D., Cumming, J., Miano, J.M., Wang, D.-Z., Li, H.J., and Li, L. (2005). Myocardin Enhances Smad3-Mediated Transforming Growth Factor- β 1 Signaling in a CArG Box-Independent Manner. *Circulation Research* 97, 983-991.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., and Barrett, A.J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 36, D320-D325.
- Rensen, S.S., Doevendans, P.A., and van Eys, G.J. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 15, 100-108.
- Rensen, S.S., Niessen, P.M., van Deursen, J.M., Janssen, B.J., Heijman, E., Hermeling, E., Meens, M., Lie, N., Gijbels, M.J., Strijkers, G.J., *et al.* (2008). Smoothelin-B deficiency results in reduced arterial contractility, hypertension, and cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 118, 828-836.
- Reyes, S., Viswanathan, A., Godin, O., Dufouil, C., Benisty, S., Hernandez, K., Kurtz, A., Jouvent, E., O'Sullivan, M., Czernecki, V., *et al.* (2009). Apathy. A major symptom in CADASIL 72, 905-910.
- Rohn, T.T. (2013). Proteolytic Cleavage of Apolipoprotein E4 as the Keystone for the Heightened Risk Associated with Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 14908-14922.
- Ruchoux, M.-M., Chabriat, H., Bousser, M.-g., Baudrimont, M., and Tournier-Lasserre, E. (1994). Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke* 25, 2291-2292.
- Sakata, Y., Xiang, F., Chen, Z., Kiriya, Y., Kamei, C.N., Simon, D.I., and Chin, M.T. (2004). Transcription Factor CHF1/Hey2 Regulates Neointimal Formation In Vivo and Vascular Smooth Muscle Proliferation and Migration In Vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 2069-2074.
- Salamon, N. (2014). Neuroimaging of cerebral small vessel disease. *Brain Pathol* 24, 519-524.
- Salvi, F., Michelucci, R., Plasmati, R., Parmeggiani, L., Zonari, P., Mascalchi, M., and Tassinari, C. (1992). Slowly progressive familial dementia with recurrent strokes and white matter hypodensities on CT scan. *The Italian Journal of Neurological Sciences* 13, 135-140.
- Scharrer, E. (2015). Consequences of Htra1 deficiency on TGF-Beta signaling. *Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg.*
- Schenk, J., and McNeill, J.H. (1992). The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods* 27, 161-170.
- Schmidt, N., Irle, I., Ripkens, K., Lux, V., Nelles, J., Johannes, C., Parry, L., Greenow, K., Amir, S., Campioni, M., *et al.* (2016). Epigenetic silencing of serine protease HTRA1 drives polyploidy. *BMC Cancer* 16, 399.

Schon, F., Martin, R., Prevett, M., Clough, C., Enevoldson, T., and Markus, H. (2003). "CADASIL coma": an underdiagnosed acute encephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 249-252.

Searcy, J.L., Le Bihan, T., Salvadores, N., McCulloch, J., and Horsburgh, K. (2014). Impact of Age on the Cerebrovascular Proteomes of Wild-Type and Tg-SwDI Mice. *PLOS ONE* 9, e89970.

Selye, H., Hall, C.E., and Rowley, E.M. (1943). Malignant Hypertension Produced by Treatment with Desoxycorticosterone Acetate and Sodium Chloride. *Can Med Assoc J* 49, 88-92.

Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685-700.

Shiga, A., Nozaki, H., Yokoseki, A., Nihonmatsu, M., Kawata, H., Kato, T., Koyama, A., Arima, K., Ikeda, M., Katada, S., *et al.* (2011). Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1. *Human Molecular Genetics* 20, 1800-1810.

Shorter, J. (2017). Designer protein disaggregases to counter neurodegenerative disease. *Current Opinion in Genetics & Development* 44, 1-8.

Søndergaard, C.B., Nielsen, J.E., Hansen, C.K., and Christensen, H. (2017). Hereditary cerebral small vessel disease and stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 155, 45-57.

Sonninen, V., and Savontaus, M.L. (1987). Hereditary Multi-Infarct Dementia. *European Neurology* 27, 209-215.

Sourander, P., and Walinder, J. (1977). Hereditary multi-infarct dementia. *Acta Neuropathologica* 39, 247-254.

Spieß, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell* 97, 339-347.

Stevens, D., Hewlett, R.H., and Brownell, B. (1977). CHRONIC FAMILIAL VASCULAR ENCEPHALOPATHY. *The Lancet* 309, 1364-1365.

Strauch, K.L., and Beckwith, J. (1988). An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 1576-1580.

Strauch, K.L., Johnson, K., and Beckwith, J. (1989). Characterization of degP, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Journal of Bacteriology* 171, 2689-2696.

Strilic, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M.R., McNagny, K.M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., and Lammert, E. (2009). The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell* 17, 505-515.

Sun, Z., Parrish, A.R., Hill, M.A., and Meininger, G.A. (2014). N-cadherin, A Vascular Smooth Muscle Cell–Cell Adhesion Molecule: Function and Signaling for Vasomotor Control. *Microcirculation* 21, 208-218.

Taillia, H., Chabriat, H., Kurtz, A., Verin, M., Levy, C., Vahedi, K., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.G. (1998). Cognitive Alterations in Non-Demented CADASIL Patients. *Cerebrovascular Diseases* 8, 97-101.

Tang, S.Y., and Alliston, T. (2013). Regulation of postnatal bone homeostasis by TGFbeta. *Bonekey Rep* 2, 255.

Tang, Y., Urs, S., Boucher, J., Bernaiche, T., Venkatesh, D., Spicer, D.B., Vary, C.P.H., and Liaw, L. (2010). Notch and Transforming Growth Factor- β (TGF β) Signaling Pathways Cooperatively Regulate Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17556-17563.

Tang, Y., Urs, S., and Liaw, L. (2008). Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site. *Circulation research* 102, 661-668.

Tennstaedt, A., Pöpsel, S., Truebestein, L., Hauske, P., Brockmann, A., Schmidt, N., Irle, I., Sacca, B., Niemeyer, C.M., Brandt, R., *et al.* (2012). Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) Degrades Tau Protein Aggregates. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 20931-20941.

Teoh, S.S.Y., Zhao, M., Wang, Y., Chen, Q., and Nie, G. (2015). Serum Htra1 is differentially regulated between early-onset and late-onset preeclampsia. *Placenta* 36, 990-995.

Thiesen, S.L., Dalton, M., Gadson, P.F., Patterson, E., and Rosenquist, T.H. (1996). Embryonic lineage of vascular smooth muscle cells determines responses to collagen matrices and integrin receptor expression. *Exp Cell Res* 227, 135-145.

Thompson, C.S., and Hakim, A.M. (2009). Living Beyond Our Physiological Means. *Stroke* 40, e322-e330.

Tiaden, A.N., Bahrenberg, G., Mirsaidi, A., Glanz, S., Blüher, M., and Richards, P.J. (2016). Novel Function of Serine Protease HTRA1 in Inhibiting Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via MAP Kinase-Mediated MMP Upregulation. *STEM CELLS* 34, 1601-1614.

Tiaden, A.N., Breiden, M., Mirsaidi, A., Weber, F.A., Bahrenberg, G., Glanz, S., Cinelli, P., Ehrmann, M., and Richards, P.J. (2012). Human Serine Protease HTRA1 Positively Regulates Osteogenesis of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mineralization of Differentiating Bone-forming Cells Through the Modulation of Extracellular Matrix Protein. *STEM CELLS* 30, 2271-2282.

Tiaden, A.N., and Richards, P.J. (2013). The Emerging Roles of HTRA1 in Musculoskeletal Disease. *The American Journal of Pathology* 182, 1482-1488.

Tikka, S., Baumann, M., Siitonen, M., Pasanen, P., Pöyhönen, M., Myllykangas, L., Viitanen, M., Fukutake, T., Cognat, E., Joutel, A., *et al.* (2014). CADASIL and CARASIL. *Brain Pathology* 24, 525-544.

Tosi, G.M., Caldi, E., Neri, G., Nuti, E., Marigliani, D., Baiocchi, S., Traversi, C., Cevenini, G., Tarantello, A., Fusco, F., *et al.* (2017). HTRA1 and TGF-beta 1 Concentrations in the Aqueous Humor of Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58, 162-167.

Tournier-Lasserre, E., Joutel, A., Melki, J., Weissenbach, J., Lathrop, G.M., Chabriat, H., Mas, J.-L., Cabanis, E.-A., Baudrimont, M., Maciazek, J., *et al.* (1993). Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature Genetics* 3, 256.

Touyz, R.M., Alves-Lopes, R., Rios, F.J., Camargo, L.L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., and Montezano, A.C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res* 114, 529-539.

Truebestein, L., Tennstaedt, A., Mönig, T., Krojer, T., Canellas, F., Kaiser, M., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2011). Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nat Struct Mol Biol* 18, 386-388.

Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M., and Oka, C. (2005a). Expression of mouse Htra1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 37, 323-336.

Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M., and Oka, C. (2005b). Expression of mouse Htra1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* 37, 323-336.

Ugnow, E.B., Slater, S., Sala-Newby, G.B., Aguilera-Garcia, C.M., Angelini, G.D., Newby, A.C., and George, S.J. (2003). Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 92, 1314-1321.

Vahedi, K., Chabriat, H., Levy, C., Joutel, A., Tournier-Lasserre, E., and Bousser, M.-G. (2004). Migraine with aura and brain magnetic resonance imaging abnormalities in patients with CADASIL. *Archives of neurology* 61, 1237-1240.

Van Bogaert, L. (1955). Encéphalopathie sous-corticale progressive (Binswanger) à évolution rapide chez deux soeurs. *Med Hellen* 24, 961-972.

Vierkotten, S., Muether, P.S., and Fauser, S. (2011). Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components. *PLoS ONE* 6, e22959.

Villa, N., Walker, L., Lindsell, C.E., Gasson, J., Iruela-Arispe, M.L., and Weinmaster, G. (2001). Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of Development* 108, 161-164.

Viswanathan, A., Godin, O., Jouvent, E., O'Sullivan, M., Gschwendtner, A., Peters, N., Duering, M., Guichard, J.-P., Holtmannspötter, M., and Dufouil, C. (2010). Impact

of MRI markers in subcortical vascular dementia: a multi-modal analysis in CADASIL. *Neurobiology of aging* **31**, 1629-1636.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2009). Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews* **89**, 957-989.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2012). Elastin in Large Artery Stiffness and Hypertension. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **5**, 264-273.

Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Bhutta, Z.A., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coates, M.M., *et al.* (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **388**, 1459-1544.

Wang, T., Holt, C.M., Xu, C., Ridley, C., P O Jones, R., Baron, M., and Trump, D. (2007). Notch3 activation modulates cell growth behaviour and cross-talk to Wnt/TCF signalling pathway. *Cellular Signalling* **19**, 2458-2467.

Wardlaw, J.M., Smith, E.E., Biessels, G.J., Cordonnier, C., Fazekas, F., Frayne, R., Lindley, R.I., O'Brien, J.T., Barkhof, F., Benavente, O.R., *et al.* (2013). Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* **12**, 822-838.

Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Örsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., *et al.* (2007). G12-G13–LARG–mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature Medicine* **14**, 64.

Wu, X., Chim, S.M., Kuek, V., Lim, B.S., Chow, S.T., Zhao, J., Yang, S., Rosen, V., Tickner, J., and Xu, J. (2014). Htra1 is upregulated during RANKL-induced osteoclastogenesis, and negatively regulates osteoblast differentiation and BMP2-induced Smad1/5/8, ERK and p38 phosphorylation. *FEBS Letters* **588**, 143-150.

Wu, X., Zou, Y., Zhou, Q., Huang, L., Gong, H., Sun, A., Tateno, K., Katsube, K.-i., Radtke, F., Ge, J., *et al.* (2011). Role of Jagged1 in Arterial Lesions After Vascular Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 2000-2006.

Yang, H., and Hu, H.-Y. (2016). Sequestration of cellular interacting partners by protein aggregates: implication in a loss-of-function pathology. *The FEBS Journal* **283**, 3705-3717.

Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., *et al.* (2006). A Variant of the *HTRA1* Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration. *Science* **314**, 992-993.

Yemane, H., Busauskas, M., Burris, S.K., and Knuepfer, M.M. (2010). Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)–salt hypertension in rats. *Experimental Physiology* **95**, 51-55.

Zellner, A., Scharrer, E., Arzberger, T., Oka, C., Domenga-Denier, V., Joutel, A., Lichtenthaler, S.F., Müller, S.A., Dichgans, M., and Haffner, C. (2018). CADASIL

brain vessels show a HTRA1 loss-of-function profile. *Acta Neuropathologica* 136, 111-125.

Zhang, L., Lim, S.L., Du, H., Zhang, M., Kozak, I., Hannum, G., Wang, X., Ouyang, H., Hughes, G., Zhao, L., *et al.* (2012). High Temperature Requirement Factor A1 (HTRA1) Gene Regulates Angiogenesis through Transforming Growth Factor- β Family Member Growth Differentiation Factor 6. *Journal of Biological Chemistry* 287, 1520-1526.

Zhao, Z., Li, H., Wang, C., Xu, W., Sun, J., and Zhao, W. (2015). Serine protease HtrA1 as an inhibitor on proliferation invasion and migration of gastric cancer. *Medical Oncology* 32, 112.

Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Letters* 398, 187-192.

Adam, P.J., Regan, C.P., Hautmann, M.B., and Owens, G.K. (2000). Positive- and Negative-acting Krüppel-like Transcription Factors Bind a Transforming Growth Factor β Control Element Required for Expression of the Smooth Muscle Cell Differentiation Marker SM22 α in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 37798-37806.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Prinz, Alexander Dietrich
Geburtsdatum: 25.07.1988
Geburtsort: Jena

AUSBILDUNG

08/1995 – 07/1999 **Staatliche Grundschule Großschwabhausen**

08/1999 – 07/2003 **Lyonel-Feininger-Gymnasium, Mellingen**

08/1999 – 06/2007 **Landesschule Pforta, Schulpforte**
Abitur (1,9)

08/2007 – 07/2009 **DRK Bildungszentrum, Jena**
Ausbildung zum staatl geprüften Rettungsassistenten

10/2009 – 09/2010 **Friedrich-Schiller-Universität, Jena**
Studium Geschichte, Biowissenschaften

10/2010 – 09/2018 **Karl-Ruprechts-Universität, Heidelberg**
Studium Humanmedizin

09/2012 **1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung M1**
Note: sehr gut

10/2017 **2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung M2**
Note: sehr gut

05/2018 **3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung M3**
Note: gut

10/2018 – 03/2019 **Karl-Ruprechts-Universität, Heidelberg**
Studium Humanmedizin, Promotionsstudium

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Fischer, welcher mir die Bearbeitung eines spannenden Themas in der Grundlagenforschung ermöglichte und von dem ich mich stets gut betreut fühlte.

Auch meine Laborkollegen tragen eine beträchtliche Verantwortung dafür, dass ich die Zeit meiner Promotion als eine positive in Erinnerung behalten werde. Für die gute Anleitung und Beratung sowie die vielen Hilfestellungen möchte ich hier besonders unsere Postdocs Anja und Gordian hervorheben. Aber auch Fabian, Markus, Elle, Jen, Julian, Ralph und Steffi möchte ich für die Unterstützung und die gute Stimmung sowohl im als auch außerhalb des Labors danken. Ein besonders herzliches Dankeschön geht an die liebe Iris, die mir im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Dem integrierten Graduiertenkolleg des SFB Transregio 23 „Vascular Cell Biology“ der Universität Heidelberg danke ich für die Fortbildungsmöglichkeiten und das Stipendium.

Daneben gilt mein Dank auch zahlreichen persönlichen Begleitern, von denen einige nicht ungenannt bleiben dürfen:

Insbesondere danke ich Jana, auf deren Verständnis und liebevolle Unterstützung ich jederzeit zählen konnte und die auch diese Arbeit Korrektur las.

Ruben möchte ich sowohl für das Korrekturlesen der Arbeit, als auch für die wunderbare Gesellschaft innerhalb und außerhalb der Bibliothek danken.

An die Zeit in der Schimperstraße 3 werde ich sicher noch sehr lange in stiller Freude zurückdenken. Vielen Dank Leo, Jana, Valerie, George und Henry für die wertvollen Erinnerungen.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern danke ich sowohl für die Ermöglichung des Studiums und der Promotion als auch für die geduldige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.