

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

**Die Rolle von CCL2 aus Gefäßwandzellen in der Atherosklerose**

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

vorgelegt von  
Kami Alexander Pekayvaz

aus  
Böblingen

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Steffen Massberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Oliver Söhnlein  
Prof. Dr. Jürgen Bernhagen  
PD Dr. Patrick Scheiermann  
Prof. Dr. Nikolaus Plesnila

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Konstantin Stark

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2020

## **Eidesstattliche Versicherung**

Pekayvaz, Kami

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

**„Die Rolle von CCL2 aus Gefäßwandzellen in der Atherosklerose“**

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

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

Kami Pekayvaz, München, 16.12.2020



**Meiner Familie und meinen Freunden**



---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Klinische Relevanz der Atherosklerose.....	7
1.1.1 Epidemiologie der Atherosklerose und ihrer Komplikationen.....	7
1.1.2 Risikofaktoren der Atherogenese.....	8
1.1.3 Ansätze zur Therapie und Prävention der Atherosklerose.....	11
1.2 Mechanismen der Atherogenese .....	16
1.2.1 Ursachen für die endotheliale Dysfunktion .....	16
1.2.2 Folgen der endothelialen Dysfunktion .....	17
1.2.3 Die Rolle von CCL2 in der Atherogenese.....	21
1.3 Die Rolle glatter Muskelzellen in der Atherogenese .....	25
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.1 Versuchstiere .....	35
3.1.1 Erwerb und Haltung der entsprechenden Mauslinien .....	35
3.2 Zucht und Genotypisierung der Versuchstiere.....	37
3.2.1 Zucht.....	37
3.2.2 Gewebegewinnung zur Genotypisierung und DNA-Isolation .....	38
3.2.3 Amplifikation des transgenen Lokus .....	38
3.2.4 Gelelektrophorese .....	45
3.3 <i>Ex vivo</i> Versuchsdurchführung.....	45
3.3.1 Narkose .....	45
3.3.2 Blutentnahme und Euthanasie .....	45
3.3.3 Organentnahme .....	46
3.3.4 Bestimmung der absoluten Leukozytenzahlen im Blut.....	46
3.3.5 Durchflusszytometrie des Bluts, der Milz und des Knochenmarks .....	46
3.3.6 Verarbeitung der Aorta zur Einzelzellsuspension.....	48
3.3.7 FACS-Sortierung der Aorta.....	49
3.3.8 RNA-Isolation, cDNA Synthese und RT-PCR .....	49
3.3.9 Immunfluoreszenzfärbungen .....	50
3.3.10 Oil Red-Färbung.....	54
3.3.11 En face Sudan III Färbung der Aorta .....	54
3.3.12 ELISA auf Cholesterin, CCL2 und MIF .....	54

3.3.13	Ermittlung des Körpergewichts der Mäuse .....	55
3.3.14	Statistik .....	55
3.4	In vivo 2-Photonen Mikroskopie der Arteria Carotis Communis .....	56
3.4.1	Präparation der Arteria Carotis Communis.....	56
3.4.2	2-Photonen Mikroskopie der Gefäßwand .....	56
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
4.1	NG2 <sup>+</sup> Zellen exprimieren ACTA2 und PDGFR $\beta$ und dedifferenzieren im Verlauf der Atherogenese .....	58
4.2	NG2 <sup>+</sup> Zellen regulieren im Verlauf der Atherogenese das Chemokin CCL2 hoch, die MIF Expression bleibt konstant .....	60
4.3	NG2 <sup>+</sup> Zellen interagieren in verschiedenen Stadien der Atherogenese mit Zellen des angeborenen Immunsystems .....	62
4.4	NG2 <sup>+</sup> Zellen interagieren in atherosklerotischen Plaques mit CX3CR1 <sup>+</sup> und LysM <sup>+</sup> myeloiden Leukozyten in vivo .....	64
4.5	Lokalisationsabhängiger atheroprotektiver Effekt von CCL2 aus NG2 <sup>+</sup> wandständigen Zellen .....	68
4.6	CCL2 Expression in NG2 <sup>+</sup> Zellen führt zu keinen systemischen atheroprotektiven Veränderungen .....	73
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	78
5.1.1	Versuchstiere.....	78
5.1.2	Konfokal-, 2-Photonen- und Epifluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung der Zellen in der Atherosklerose .....	79
5.1.3	Durchflusszytometrie als Hochdurchsatzmethode zum Ausschluss systemischer Unterschiede in Leukozytenpopulationen.....	79
5.1.4	FACS-Sortierung zur Isolation NG2 <sup>+</sup> Zellen mit anschließender RT-PCR .....	80
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	80
5.2.1	NG2 als Marker für SMCs in der Makrozirkulation .....	80
5.2.2	Die inflammatorische Kapazität NG2 <sup>+</sup> wandständiger Zellen in der Atherosklerose .....	81
5.2.3	NG2 <sup>+</sup> wandständige Zellen nutzen CCL2, um die Atheroprogression im Bereich des Aortenbogens zu unterbinden .....	83



---

5.2.4	CCL2 aus NG2 <sup>+</sup> Zellen bedingt keine atheroprotektiven systemischen Veränderungen.....	85
5.3	Ausblick.....	86
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>11.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>12.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>

## 1. Einleitung

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, die zu den häufigsten Mortalitäts- und Morbiditätsursachen weltweit gehört. Die Ruptur atherosklerotischer Plaques ist eine gefürchtete Komplikation, die durch einen akuten Gefäßverschluss mit konsekutiver arterieller Thrombose zu nachgeschalteten Organinfarkten führt. Zu den relevantesten Organinfarkten gehören der Herzinfarkt, der Schlaganfall und die Extremitäteninfarkte [1-5].

Die Grundlagenforschung des letzten Jahrhunderts hat weitreichende Erkenntnisse in die Pathogenese der Erkrankung geliefert. Das gegenwärtige Verständnis basiert auf verschiedenen mechanistischen Komponenten, die im Prozess der Atherogenese parallel ablaufen und sich gegenseitig verstärken. Zu den zentralen Komponenten gehört die Endotheldysfunktion [6, 7], die Lipidakkumulation [7-9], die Proliferation glatter Muskelzellen [7, 10] und die entzündliche Komponente der Atherogenese mit Makrophagen- bzw. Lymphozytenakkumulation und Schaumzellbildung [11-15]. Klinisch ermittelte Risikofaktoren, bzw. primär- und sekundärpräventive Behandlungsoptionen der Atherosklerose beeinflussen diese Mechanismen. Obwohl viele Risikofaktoren bzw. Therapieoptionen an einzelnen Pfeilern der Atherogenese ansetzen, sind die Komponenten der Erkrankung miteinander verflochten, sodass die Krankheitsgenese in ihrer Gesamtheit gedämpft bzw. beschleunigt wird.

Meilensteine der kardiovaskulären Grundlagenforschung, translationalen Forschung und klinischen Validierung haben die Möglichkeiten der Primär- und Sekundärprävention atherosklerotisch bedingter Komplikationen drastisch gebessert. Dazu gehören unter anderem Statine, PCSK9 Inhibitoren, ACE Hemmer,  $\beta$ -Blocker und die anti-thrombozytäre Therapie. Die einzelnen Ansätze (hierbei wird die lipidsenkende Therapie als ein Ansatz gezählt) senken das Risiko eines wiederholten kardiovaskulären Ereignisses um etwa 25% [16]. Es wurden mittels multipler pro- und retrospektiver Studien Risikofaktoren definiert, an denen sich die Präventionsmaßnahmen heutzutage orientieren. Die bekannteste darunter ist die prospektive Framingham-Studie, in der relevante kardiovaskuläre Risikofaktoren ermittelt wurden. Die dort beschriebenen Risikofaktoren: Cholesterin, Blutdruck und Blutzucker, gehören weiterhin zu den relevantesten, behandelbaren Risikofaktoren in der Atheroskleroseprävention [17]. Mittlerweile listet die WHO (World Health Association) Rauchen, Alkoholabusus, Diabetes Mellitus, Bewegungsarmut, ungesunde Ernährung (salz-, kalorien- und fettreich), Adipositas, Bluthochdruck und Dyslipidämie aber auch psychische Faktoren wie Stress und Depressionen

als Risikofaktoren. Nicht veränder- bzw. behandelbare Faktoren wie Alter, Geschlecht, familiäre Disposition und soziale Faktoren spielen ebenfalls eine Rolle [16].

Trotz weitreichender Erkenntnisse und Präventions- bzw. Therapieoptionen der Atherosklerose zählt sie mit ihren Komplikationen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen und mittlerweile auch in den meisten Schwellenländern [16]. Weiterhin führen atherosklerotisch bedingte Herz-Kreislauf Erkrankungen zu bedeutenden volkswirtschaftlichen Kosten und Ausfällen [18]. Für diese Diskrepanz ist laut der WHO die fehlende flächenhafte Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren und somit die fehlende Durchsetzung von Primär- bzw. Sekundärprävention der Atherosklerose verantwortlich. Eine adäquate Prävention könnte das Fortschreiten der Atherosklerose effektiv unterbinden und die gesundheitsökonomischen Kosten trotz der Mehrkosten bei Präventionsmaßnahmen minimieren [16].

Dennoch bleibt auch bei Einhaltung leitliniengerechter Präventionsmaßnahmen ein relevantes Restrisiko für atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Ereignisse [16, 19]. Aktuelle Standardtherapien beinhalten zwar die Lipid-, Blutdruck- und Blutzuckersenkung; eine direkte Beeinflussung der entzündlichen Komponente findet jedoch noch keine Erwähnung in internationalen oder europäischen Leitlinien [4, 16, 20]. Das fehlende direkte Eingreifen in die entzündliche Komponente der Atherosklerose, könnte dieses verbleibende Restrisiko trotz adäquater Prävention erklären.

In den 90er Jahren wurden proinflammatorische Zytokine und Chemokine mit der Atherogenese in Verbindung gebracht und anhand der CCL2-CCR2 Achse im Mausmodell in ihrer Kausalität für die Krankheitsgenese bestätigt [21].

Bis vor Kurzem war die Entzündungshypothese der Atherosklerose eine Theorie, die in multiplen Biomarker-Assoziationsstudien, histopathologischen Untersuchungen und nicht zuletzt zahlreichen Tiermodellen untersucht, aber in der menschlichen Atherosklerose nie ursächlich bestätigt wurde. In der CANTOS Studie beweisen Ridker und Kollegen erstmalig die kausale Rolle der entzündlichen Komponente und die therapeutische Relevanz der anti-inflammatorischen Therapie in der menschlichen Atherosklerose. Insgesamt schloss die CANTOS Studie 10.061 Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt und einem hsCRP (high-sensitive C-reactive protein) von mehr als 2 mg/l ein. Die Studie zeigte eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Rezidivereignisse bei der Gabe von 150 mg des anti-Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Antikörpers Canakinumab alle 3 Monate [19]. Allerdings wurde erst in einer sekundären Subgruppenanalyse ein signifikanter Unterschied in der Gesamtmortalität und kardiovaskulären Mortalität ermittelt. Die Rate an schweren, fatalen Infektionen und Sepsen nahm jedoch

signifikant zu [19, 22]. Die Kosten von Canakinumab belaufen sich auf 16 000 \$ pro Infusion [23]. Eine flächendeckende Standardtherapie über mehrere Jahre oder Jahrzehnte mit Canakinumab zur Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse wäre auch für Industrienationen eine gewaltige finanzielle Belastung. Außerdem sollte die Sinnhaftigkeit einer flächendeckenden Standardtherapie mit Canakinumab bei fehlendem Unterschied in der Gesamtmortalität und signifikanter Zunahme fataler Infektionen in der ursprünglichen CANTOS Studie hinterfragt werden.

Die kürzlich veröffentlichte CIRT Studie unterstrich die Notwendigkeit der zielgerichteten anti-inflammatorischen Therapie. Hier wurde, im Gegensatz zur spezifischen IL1- $\beta$  Antagonisierung mit Canakinumab, das Immunsystem unspezifisch mit dem Immunsuppressivum Methotrexat niedrigdosiert unterdrückt. Die Methotrexat-Gruppe zeigte im Vergleich zur Placebo-Gruppe weder eine Reduktion von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 bzw. CRP, noch eine Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse. Die regelmäßige Methotrexatgabe war mit erhöhten Leberwerten, verringerten Leukozytenzahlen bzw. Hämatokritwerten und vermehrten Fällen von nicht-basalzell Karzinomen der Haut assoziiert [24].

Die CANTOS und die CIRT Studien sind trotz ihrer fraglichen Konsequenz für flächendeckende Leitlinien Meilensteine in der Atheroskleroseforschung. Sie zeigen, dass die Therapie der Atherosklerose, angelehnt an die Therapie von malignen Erkrankungen, personalisiert in Form von zielgerichteten Therapien erfolgen muss. In der CIRT Studie konnte im Rahmen einer unspezifischen sekundärpräventiven Immunsuppression kardiovaskulärer Risikopatienten weder ein Unterschied in Surrogatparametern noch in kardiovaskulären Endpunkten gezeigt werden [24].

In der CANTOS Studie wurde das Patientenkollektiv strenger ausgewählt und detaillierter analysiert: Zunächst wurden Patienten mit einem erhöhten Infektionsrisiko ausgeschlossen. Eingeschlossen wurden Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt hatten. Außerdem wurden nur Patienten mit einem „inflammatorischen Phänotyp“, definiert durch ein hsCRP von  $>2\text{mg/l}$ , eingeschlossen. Von diesen profitierten in einer Subgruppenanalyse diejenigen in Form einer signifikanten Reduktion der Gesamtmortalität, die 3 Monate nach der ersten Canakinumab Dosis einen Abfall des hsCRPs auf  $<2\text{mg/l}$  zeigten. Zusammengefasst stellt die Gruppe, der in ihrer Gesamtmortalität von Canakinumab profitierenden Patienten, nur einen kleinen Teil der Gesamtkohorte an Patienten mit atherosklerotisch bedingten Erkrankungen dar. Diese profitiert dann jedoch mit einer signifikanten Reduktion der Gesamtmortalität um 31% [22].

Um zukünftig atherosklerotische Krankheitsbilder effektiver behandeln zu können, wird es notwendig sein im Rahmen von zielgerichteten Therapien, Mechanismen der Atherogenese noch gezielter zu unterbinden, ohne funktionierende Mechanismen des Immunsystems zu stören. Gleichzeitig wird man Patientenuntergruppen identifizieren müssen, die unterschiedlich stark von gezielten, personalisierten Therapiekonzepten profitieren.

## 1.1 Klinische Relevanz der Atherosklerose

### 1.1.1 Epidemiologie der Atherosklerose und ihrer Komplikationen

Größere klinischen Studien behandeln die Atherosklerose nicht als isolierte Erkrankung. Die meisten Studien beschäftigen sich mit der Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen im Allgemeinen und inkludieren dabei verschiedene Arten der Minderperfusion von Organen, bedingt durch Gefäßstenosen sowie arterielle Thrombosen. Die Ätiologie der Gefäßstenosen bzw. der häufig daraus resultierenden arteriellen Thrombosen wird nicht näher definiert. Da Atherosklerose die häufigste Ursache von Organinfarkten wie des Myokardinfarkts [25] bzw. für symptomatische Minderperfusionsen wie Angina Pectoris und Abdominalis [26] darstellt, wird nachfolgend die Epidemiologie kardiovaskulärer Ereignisse und symptomatischer Gefäßstenosen stellvertretend für die Prävalenz der Atherosklerose beschrieben.

Die häufigsten Lokalisationen atherosklerotischer Läsionen umfassen die Koronar-, die Extremitäten-, die Zerebral-, die Mesenterial- und Renalarterien [27]. Atherosklerose tritt häufig generalisiert auf. Die periphere arterielle Verschlusskrankheit ist beispielsweise häufig von einer koronaren Herzkrankheit und einer zerebrovaskulären Erkrankung begleitet. Interessanterweise kann hierbei der Schweregrad einzelner, symptomatischer atherosklerotischer Gefäßverengungen als Marker für das kardiovaskuläre Risiko auch entfernter Organe verwendet werden, die nicht von der stenosierten Endarterie versorgt werden. Beispielsweise ist ein Knöchel-Arm Index von  $\leq 0.90$  mit einer mehr als Verdopplung der 10-Jahres Rate an koronaren Ereignissen bzw. der kardiovaskulären- und Gesamtmortalität assoziiert [28].

Die Häufigkeit der atherosklerotischen Gefäßkrankheit hängt vom Alter und Geschlecht der Patienten ab. Beispielsweise lag in einer Meta-Analyse die Gesamtprävalenz von Carotisstenosen, die als eine Gefäßverengung von  $\geq 50\%$  definiert wurden, bei 4,2% [28, 29]. Bei Männern unter 70 Jahren lag sie bei 4,8%, wobei sie bei Männern über 70 Jahren auf 12,5% anstieg. Frauen unter 70 hatten mit einer Häufigkeit von 2,2% Carotisstenosen, über 70 lag die Häufigkeit bei 6,9% [28, 29].

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die global häufigste Todesursache. Nach Schätzungen der WHO verstarben 2016 weltweit 17,9 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Somit waren 31% aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen, davon 85% Herzinfarkte und Schlaganfälle. Kardiovaskuläre Erkrankungen scheinen jedoch nicht nur in Industrienationen eine relevante Todesursache zu sein. Mehr als dreiviertel aller Herz-Kreislauftoten stammen aus Ländern mit einem niedrigen bzw. mittleren Einkommen [30]. Kardiovaskuläre Erkrankungen begründen nicht nur den größten Teil der Mortalität weltweit, sondern sind auch für einen relevanten Teil der Morbidität ursächlich. 151 Millionen DALYs (Disability adjusted life years) waren 2008 durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedingt. Im genannten Jahr waren das etwa 10% der gesamten DALYs [31].

Nach dem World Economic Forum und der Harvard School of Public Health beliefen sich die Kosten durch kardiovaskuläre Erkrankungen im Jahr 2010 auf 863 Milliarden Dollar und werden im Jahr 2030 voraussichtlich mehr als 1 Billion Dollar erreichen [31]. Nicht nur die Kosten der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sind hierbei von volkswirtschaftlicher Bedeutung. Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind relevante Ursachen für einen morbiditätsbedingten Produktivitätsverlust und eine dadurch verringerte Einzahlung in Krankenversicherungssysteme [31]. Von größter Bedeutung ist jedoch, dass die meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen vermeidbar wären [30].

### 1.1.2 Risikofaktoren der Atherogenese

Den größten Durchbruch in der Identifizierung kardiovaskulärer Risikofaktoren brachte die Framingham Studie. In der Stadt Framingham, Massachusetts wurden über einen Zeitraum von 30 Jahren Patienten zwischen 30 und 60 Jahren systematisch untersucht. Es wurden Gruppen mit unterschiedlichen Expositionen beispielsweise zu Zigarettenrauch oder Alkohol ausgewählt und alle 2 Jahre untersucht [17]. Die sorgfältig gestaltete Kohortenstudie ermöglicht weiterhin valide Aussagen über unabhängige Risikofaktoren in der Atherogenese. Bis heute zählen die in der Studie ermittelten Risikofaktoren zu den relevantesten.

Die von der Studie ermittelten Risikofaktoren umfassen Zigarettenrauch, Plasmacholesterin, Fibrinogenkonzentration, Homocysteinkonzentration, Lipoprotein (a), Apolipoprotein E, Bluthochdruck, körperliche Inaktivität, psychosoziale Faktoren und familiäre Disposition [32-44] und finden sich in verschiedenen nationalen und internationalen Leitlinien und Empfehlungen wieder [45].

Dabei haben die genannten Risikofaktoren unterschiedlich starke Einflüsse auf die Auftretenswahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Ereignisse. Da einzelne Risikofaktoren stark miteinander interagieren und sich potenzieren, ist die kardiovaskuläre Gesamtwahrscheinlichkeit keine einfache Summe aller erfüllten Risikofaktoren [46]. Dennoch wurden die Risikofaktoren einzeln in ihrer Relevanz für die Lebenserwartung bzw. für das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse getestet:

#### 1.1.2.1 Nikotinkonsum

Die British Doctor's Study zeigte, dass Raucher, die bis zum 60. Lebensjahr 20 Zigaretten am Tag geraucht hatten, im Durchschnitt 15 Lebensjahre verloren [47].

#### 1.1.2.2 Bewegung

Der Zusammenhang zwischen Leistungsfähigkeit und kardiovaskulärer Mortalität wurde 2002 von Myers und Kollegen analysiert. Sport unter jungen Männern scheint ein relevanter Schutzfaktor vor kardiovaskulären Ereignissen zu sein und linear mit dem kardiovaskulären Risiko zu korrelieren [45].

#### 1.1.2.3 Ernährung und Adipositas

2013 zeigte eine spanische Studie mittels eines prospektiven Studiendesigns, dass mediterrane Ernährung als Primärprophylaxe die Rate kardiovaskulärer Ereignisse, unabhängig vom Fettgehalt, senkt. Sowohl eine nuss- als auch eine olivenölsreiche Ernährung zeigten im Vergleich zur fettarmen Ernährung eine signifikant stärkere kardiovaskuläre Risikoreduktion [48].

Übergewicht und Adipositas werden von den meisten nationalen und internationalen Leitlinien als Risikofaktor gezählt [4, 16, 46, 49]. Dass Adipositas im Rahmen eines metabolischen Syndroms mit den kardiovaskulären Risikofaktoren Hypertonie und Dyslipidämie einhergehen kann, gilt als gesichert [50]. Ob Adipositas auch einen unabhängigen Risikofaktor darstellt, bleibt umstritten. Während die Framingham Studiengruppe sie zu den unabhängigen Risikofaktoren zählt [51], gibt es weitere Studien, die eine adipöse aber metabolisch gesunde Patientengruppe beschreiben, die möglicherweise kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hat [52].

#### 1.1.2.4 Dyslipidämie

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts lag mit Anitschkows Kaninchenversuchen der Verdacht nahe, dass Cholesterin eine Rolle in der Atherogenese spielt. Das Plasmacholesterin gehört mittlerweile zu den relevantesten Risikofaktoren, die bereits sehr früh in der humanen

Atherogenese identifiziert wurden. Hierbei spielt nicht nur das Gesamtcholesterin, sondern auch das Verhältnis zwischen LDL und HDL Cholesterin eine Rolle. Die Framingham Studiengruppe hat erstmalig prospektiv den Zusammenhang in ihrer Kohortenstudie ermittelt und nicht nur eine starke Korrelation zwischen hohem LDL Cholesterin und kardiovaskulären Ereignissen, sondern eine ähnlich starke Korrelation zwischen niedrigem HDL Cholesterin und kardiovaskulären Ereignissen beschrieben [53, 54]. Entgegen weiterhin verbreiteter Dogmen, ist die moderate Aufnahme cholesterinreicher Nahrungsmittel wie beispielsweise Eiern wahrscheinlich nicht mit einem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen vergesellschaftet [55].

#### 1.1.2.5 Arterielle Hypertonie

Der Blutdruck als stiller Risikofaktor ist die häufigste Mortalitäts- und Morbiditätsursache weltweit [56]. Nach einer Meta-Analyse von mehr als 61 prospektiven Studien mit mehr als 1 Million Erwachsenen ohne vorherige Herz- Kreislauferkrankung korreliert der Blutdruck stark und direkt mit der kardiovaskulären- und der Gesamtmortalität [57].

#### 1.1.2.6 Diabetes Mellitus

Der Diabetes Mellitus wurde ebenfalls von der Framingham Studiengruppe als Risikofaktor identifiziert. Die häufigste tödliche Komplikation des Diabetes war die atherosklerotische Gefäßerkrankung. Die KHK (Koronare Herzkrankheit) zählte zur häufigsten Manifestation der Atherosklerose und zur häufigsten tödlichen Komplikation der Atherosklerose bei Diabetespatienten. Männer mit Diabetes hatten im Vergleich zu Männern ohne Diabetes ein relatives Risiko von 2,31 ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden. Bei Frauen lag das relative Risiko bei 2,47. Diabetes gehört somit zu den relevantesten Risikofaktoren in der Atherogenese. Die Framingham Studiengruppe hat außerdem gezeigt, dass Patienten mit Diabetes nicht nur ein unabhängig erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben, sondern darüber hinaus eine Assoziation zu weiteren wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktoren aufweisen. Dazu gehören die Adipositas, die arterielle Hypertonie, die Hypertriglyzeridämie und niedrige HDL Werte [58].

#### 1.1.2.7 Familienanamnese

Nicht zuletzt ist auch die Familienanamnese von großer Bedeutung. Etwa 50 000 Patienten aus der Studiengruppe „Cooper Center Longitudinal Study“ wurden prospektiv untersucht und in die beiden Gruppen positive und negative Familienanamnese unterteilt. Die positive Familienanamnese wurde nochmals in frühpositiv (unter 50 Jahren zum Zeitpunkt des Ereignisses) und spätpositiv (über 50 Jahren zum Zeitpunkt des Ereignisses) unterteilt. Die



Gruppe der Patienten mit frühpositiver Familienanamnese hatte eine signifikant erhöhte Lebenszeitprävalenz für Gefäßerkrankungen am Herzen aber auch weiterer Gefäße über die Koronararterien hinaus [59]. Eine Zwillingsstudie aus Schweden zeigte 1994, dass der Risikofaktor „positive Familienanamnese“ bzgl. kardiovaskulärer Ereignisse besonders in jungem Alter eine Rolle spielt. In höherem Alter nimmt der Einfluss der positiven Familienanamnese auf das kardiovaskuläre Risiko ab [60].

#### 1.1.2.8 Risikostratifizierung mittels SCORE

Weltweit werden verschiedene Scores, bestehend aus den einzelnen Risikofaktoren, zur Berechnung des 10-Jahres Risikos kardiovaskulärer Ereignisse verwendet. Die European Society of Cardiology nutzt SCORE, der auf repräsentativen europäischen Datenerhebungen basiert, zur Risikostratifizierung [46]. SCORE verwendet die klassischen Risikofaktoren Geschlecht, Gesamtcholesterin, systolischer Blutdruck und Rauchverhalten. Damit schätzt SCORE die 10-Jahreswahrscheinlichkeit tödlicher kardiovaskulärer Ereignisse. Der Nachteil von SCORE ist, dass der Score für Patienten mit bereits erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil, wie z.B. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz oder Diabetespatienten nicht valide und folglich nicht empfohlen ist [49].

Die wichtigste Funktion des stellvertretend genannten Scoring Systems ist die Identifikation von Individuen, die ohne bisherige klinische Symptomatik in die Hochrisikogruppe kardiovaskulärer Ereignisse fallen. Diese Gruppe profitiert am stärksten von umfassenden kardiovaskulären Präventionsmaßnahmen. Patienten, die aufgrund von einzelnen, bereits bekannten Erkrankungen in die Hochrisikogruppe fallen, sind für SCORE ungeeignet. Sie sollten bereits eine umfassende Prävention erhalten [49].

#### 1.1.3 Ansätze zur Therapie und Prävention der Atherosklerose

Die Erfassung relevanter Risikofaktoren der Atherosklerose sowie deren medikamentöse Behandlung ermöglicht heutzutage eine effektive Prävention atherosklerotischer Komplikationen. Seit den 1980er Jahren hat sich die Rate von Patienten mit KHK mehr als halbiert [61].

Evidenzbasierte Empfehlungen zur Atheroskleroseprävention sind in verschiedenen nationalen und internationalen Leitlinien mit leichten Unterschieden (beispielsweise zu Grenzwerten bestimmter Risikofaktoren) beschrieben. Gemeinsames Ziel der Leitlinien ist die Erkennung und

frühzeitige Behandlung von Risikopatienten. Die ESC (European Society of Cardiology) [4, 49], die AHA (American Heart Association) bzw. das American College of Cardiology (ACC) [62-65] [66] [67] und die WHO (World Health Association) [16] empfehlen medikamentöse und nicht-medikamentöse Strategien zur Risikoreduktion. Neben Verhaltensänderungen wie regelmäßiger körperlicher Aktivität, Nikotinkarenz, ausgewogener Ernährung und Gewichtsabnahme werden die medikamentösen Therapien von Dyslipidämien, Diabetes Mellitus und Hypertonie genannt und mit Plättchenaggregationshemmern als Basistherapie bei klinisch bereits manifester Atherosklerose kombiniert.

#### 1.1.3.1 Cholesterin-Senkung

Ein Cochrane Review von 2013 fasste 18 randomisiert kontrollierte Studien mit insgesamt mehr als 56 000 Patienten zusammen und kam zu dem Schluss, dass Statine in der Primärprävention ohne relevante Nebenwirkungen die Gesamtmortalität, die Rate an kardiovaskulären Events und Interventionen signifikant senken [70].

Die ESC empfiehlt eine risikoadaptierte Senkung des LDL-Cholesterins auf Werte unter 70mg/dl bei Patienten mit besonders hohem Risiko, unter 100 mg/dl bei Patienten mit hohem Risiko und eine Senkung auf Werte unter 115 mg/dl für alle anderen Patienten (bei einem Evidenzgrad C). Patienten mit bereits bestehender kardiovaskulärer Erkrankung, Diabetespatienten oder Patienten mit chronischer Nierenerkrankung fallen hierbei in die Hochrisikogruppe [49]. Die deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) übernahm in einer Stellungnahme diese Empfehlungen als Pocket-Leitlinien [68]. In Übereinstimmung mit den europäischen Leitlinien empfiehlt die AHA und das ACC Patienten mit manifester Herz-Kreislauf-Erkrankung eine intensive Statintherapie in Maximaldosierung. Die Autoren der amerikanischen Leitlinien halten den Evidenzgrad für eine Senkung des LDL-Cholesterins auf besonders niedrige Werte bei Niedrigrisikopatienten (wie beispielsweise in den europäischen Leitlinien mit einem Evidenzgrad C empfohlen) für nicht ausreichend, hier wird ein Grenzwert von 190 mg/dl festgelegt [66]. Die genannten Leitlinien empfehlen als erste Wahl Statine. Die Studienlage für zusätzliche vorteilhafte Effekte durch die Ergänzung von Statinen mit PCSK-9 (Protein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9) Hemmern nimmt jedoch ebenfalls zu [69, 70].

#### 1.1.3.2 Diabetes-Einstellung

Bei Patienten mit Typ I oder Typ II Diabetes sind sich die Leitlinien darin einig, dass eine intensivierete multifaktorielle Prävention kardiovaskulärer Risikofaktoren notwendig ist. Im Unterschied zu Nicht-Diabetikern ist die Schwelle zur medikamentösen Therapie der Risikofaktoren niedriger und die zu erreichenden Zielwerte sind strenger. [49]. Insbesondere ist

die Senkung der Blutglukose von großer Relevanz. Die UK Prospective Diabetes Study (UKPD Studie) brachte 1993 die erste hochwertige Evidenz für den Vorteil einer intensivierten Therapie der Blutglukose mit Metformin für diabetesassoziierte Komplikationen [71]. Überraschenderweise zeigten unter anderem die ADVANCE, die ACCORD und die VADT Studie eine Zunahme der kardiovaskulären bzw. Gesamtmortalität bei besonders strenger antidiabetischer Therapie [72] [73] [74]. 2015 zeigten Zinman und Kollegen, dass Empagliflozin in Typ II Diabetespatienten das kardiovaskuläre Outcome und die Gesamtmortalität senkt [75]. Die Blutdrucksenkung sollte nach einer Meta-Analyse mit studienübergreifend mehr als 100 000 Teilnehmern mit Typ II Diabetes auf systolische Werte unter 140 mm-Hg erfolgen [76]. In diesem Kontext zeigte die LIFE Studie 2002, dass ACE Hemmer (in dem Fall Losartan) die kardiovaskuläre sowie die Gesamtmortalität besonders effektiv senken und einen bei Diabetikern vorteilhaften nephroprotektiven Effekt haben [77]. Eine aggressivere Blutdruckkontrolle auf unter 130 mm-Hg, auch bei normotensiven Diabetespatienten, ist außerdem bzgl. kardiovaskulärer Ereignisse vorteilhaft [78].

Die ESC empfiehlt in Zusammenschau der aktuellen Studienlage eine intensive Senkung des Blutzuckers bei jungen, gesunden Patienten, ohne bereits bestehender kardiovaskulärer Erkrankung. Bei älteren, multimorbiden Patienten mit bereits bestehender kardiovaskulärer Erkrankung sollten die Grenzwerte weniger streng verfolgt werden. SGLT2 Inhibitoren sollten frühzeitig eingesetzt werden. Eine Blutdrucksenkung sollte bei allen Diabetespatienten mit arterieller Hypertonie erfolgen, bei ausgewählten Patienten (bspw. bei Mikroalbuminurie) sogar auf Werte unter 130 mm-Hg systolisch. Eine Therapie mit Plättchenaggregationshemmern bei Diabetikern ohne manifeste Herz-Kreislaufkrankungen wird nicht empfohlen [46].

### 1.1.3.3 Antihypertensive Therapie

Die HOT Studie zeigte 1998 den Vorteil einer Senkung des diastolischen Blutdrucks bei Patienten mit Herzkreislaufkrankungen auf durchschnittlich 82,6 mm-Hg [79]. Die ALLHAT Studie, ebenfalls eine der bedeutendsten Studien zur Blutdruckbehandlung, schloss zwischen 1994 und 2002 etwa 30 000 Hypertoniepatienten ein und behandelte diese mit Chlorthalidon (Thiaziddiuretikum), Amlodipin (Calciumkanalblocker) oder Lisinopril (ACE-Hemmer). Ein weiterer Studienarm mit Doxazosin (Alpha-Rezeptor Antagonist) wurde aufgrund erhöhter Schlaganfall- und Herzinsuffizienzraten vorzeitig beendet. Das Thiaziddiuretikum war dabei das effektivste Antihypertensivum in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen [80].

Die europäischen und amerikanischen Leitlinien unterscheiden sich bzgl. der zu erreichenden Zielwerte voneinander. Die europäischen Leitlinien sprechen bei einem Blutdruck von bis zu

systolisch 139 mm-Hg und diastolisch 89 mm-Hg von einem „hochnormalen“ Blutdruck. Erst ab Werten von systolisch > 140 mm-Hg und diastolisch > 90 mm-Hg spricht die ESC von einem Grad I Hypertonus [46]. Die amerikanischen Leitlinien sprechen bereits ab Blutdruckwerten von systolisch > 120 mm-Hg bzw. diastolisch > 80 mm-Hg von einem erhöhtem Blutdruck. Der Grad I Hypertonus ist als ein systolischer Blutdruck von > 130 mm-Hg, bzw. diastolisch > 85 mm-Hg definiert. Die Evidenz dieser intensivierten Blutdrucksenkung liegt unter anderem in der SPRINT Studie von 2016, die eine signifikante Abnahme fataler und nicht-fataler kardiovaskulärer Ereignisse und der Gesamtmortalität in der intensivierten Behandlungsgruppe (Zielwert unter 120 mm-Hg) zeigte [81]. Nach diesen Grenzwerten liegt die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bei 93% bei Afroamerikanern und bei 86% bei Kaukasiern [67]. Eine Cochrane Meta-Analyse von 2018 untersuchte die Evidenz für besonders niedrige Grenzwerte in der antihypertensiven Therapie, wie sie beispielsweise in den amerikanischen Leitlinien empfohlen werden. Danach sei die aktuelle Evidenz für Blutdruckzielwerte von < 135/85 mm-Hg nicht ausreichend [82].

#### 1.1.3.4 Antithrombozytäre Therapie

Die Evidenz zur Prophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten ohne bereits manifeste atherosklerotische Herz-Kreislaufkrankung spricht gegen eine Primärprophylaxe mit Plättchenaggregationshemmern [83]. Auch 2018 auf dem Kongress der ESC wurden die Ergebnisse der parallel publizierten ASCEND und ARRIVE Studie vorgestellt, die den Effekt von ASS in der Primärprophylaxe von Diabetespatienten bzw. von ASS in der Primärprophylaxe von Hochrisikopatienten untersucht haben und keine Effekte auf die Gesamtmortalität nachweisen konnten [84, 85]. Bei Patienten mit bereits manifester atherosklerotischer Herz-Kreislaufkrankung ist eine ASS Gabe jedoch förderlich. Dies trifft vor allem auf den Myokardinfarkt aber auch auf den ischämischen Schlaganfall zu [83]. Zusammenfassend empfiehlt die ESC nach stattgehabtem Myokardinfarkt eine duale Plättchenaggregationshemmung mit einem P2Y<sub>12</sub> Hemmer in Kombination mit ASS für 12 Monate. Anschließend soll eine Dauertherapie mit ASS oder Clopidogrel erfolgen [46]. Laut der PLATO Studie würde sich nach einem stattgehabten Myokardinfarkt die Gabe von Ticagrelor gegenüber Clopidogrel als P2Y<sub>12</sub>-Hemmer lohnen [86]. Nach Intervention bei stabiler Herz-Kreislaufkrankung empfiehlt die ESC jedoch keine Gabe von Ticagrelor oder Prasugrel. Stattdessen soll die Einnahme von Clopidogrel erfolgen [87]. Außerdem wird entsprechend der erwähnten Studien ASCEND [82] und ARRIVE [83] und der Metaanalyse der Antithrombotic Trialists [83] ASS von der ESC nicht in der Primärprophylaxe empfohlen [46].

### 1.1.3.5 Invasive Therapie der Atherosklerose

Trotz der genannten Maßnahmen zur Prävention von Komplikationen der Atherosklerose, fordern Herz-Kreislaufereignisse weiterhin die höchste Anzahl an Toten in den Industrienationen [30]. Die alleinige Prävention der Atherosklerose reicht scheinbar nicht aus, die Behandlung der Komplikationen hat ebenfalls einen hohen Stellenwert und wird deshalb umfangreich erforscht. Die Angina Pectoris und der Myokardinfarkt sind die klinisch wichtigsten Morbiditäts und Mortalitätsursachen und zählen zu den relevantesten Komplikationen der Atherosklerose [30].

Die Therapie der klinisch manifesten Koronaren Herzkrankheit erfolgt grundsätzlich durch eine Revaskularisation der poststenotischen Gefäßabschnitte zur Wiederherstellung der Blutversorgung des minderversorgten Myokards. Die Revaskularisation kann entweder durch eine Perkutane Koronarintervention (PCI) oder durch einen Koronararterien-Bypass (CABG) erfolgen [87].

Die Datenlage zur PCI im Hinblick auf eine Verbesserung der Lebenserwartung sind uneinheitlich. Ältere Studien zeigten keinen oder nur einen geringen Effekt der PCI auf die Lebenserwartung [88-90]. Eine Meta-Analyse aus Studien mit neueren Drug Eluting Stents (DES) ergab jedoch einen signifikanten Vorteil von PCIs mit DES Implantationen auf die Lebenserwartung [91]. Auch die FAME-2 Studie zeigte einen Vorteil von FFR (fractional flow reserve) geführte PCIs auf die Lebenserwartung. Hierbei wurde nur bei Patienten mit reduzierter FFR PCI gesteuert interveniert [87, 92]. Die CABG erzielte nach einer Meta-Analyse in Studien eindeutige Überlebensvorteile [91]. Eine Meta-Analyse aus dem American Heart Journal zur Therapie der Hauptstamm-Stenose der linken Herzkranzarterie zeigte insgesamt keinen Unterschied im Überleben zwischen beiden Strategien. Die PCI bei Patienten mit niedrigem SYNTAX Score (zur Beurteilung des Schweregrads bzw. der Komplexität der KHK) schien jedoch der CABG überlegen, wobei Patienten mit einem hohen SYNTAX Score eher von der CABG profitierten [93].

Die aktuellen Leitlinien der ESC empfehlen bei der stabilen KHK eine Therapieentscheidung anhand der Patientenkonstitution und nach anatomischen Aspekten. Bei ST-Hebungsinfarkten wird mit einzelnen Ausnahmen immer eine Notfall-PCI mit Stenting der ursächlichen Stenose empfohlen. Bei der Entscheidung für eine PCI sollten unabhängig von der klinischen Präsentation, Läsion oder voraussichtlicher bzw. gegenwärtiger Antikoagulation Drug Eluting Stents verwendet werden [87].

## 1.2 Mechanismen der Atherogenese

Die Atheroskleroseforschung der letzten Jahrzehnte und Jahrhunderte brachte verschiedene Konzepte der Atherogenese hervor. Viele dieser Konzepte finden weiterhin Berücksichtigung im allgemeinen Verständnis und ermöglichen in ihrer Gesamtheit ein vollständiges Abbild der Erkrankung.

Zu den historisch relevantesten Erkenntnissen der Atherogenese gehört Virchows Beschreibung der Intimaverdickung und subendothelialen Zellvermehrung sowie die Betonung des entzündlichen Charakters der Erkrankung [11-13, 94]. Von weiterhin großer Relevanz ist die Cholesterin-Hypothese von Anitschkow und Chalutow, die eine cholesterinreiche Diät von Kaninchen mit fettigen Läsionen in der Arterienwand, ähnlich denen beim Menschen, korrelierten [9]. Aschoff beschrieb die Atherosklerose als Teil eines degenerativen Alterungsprozesses in Kombination mit einer Plasmalipidablagerung in der Intima [94, 95]. Die Identifizierung des LDL-Rezeptors in Makrophagen und die Relevanz der LDL Oxidation für die Atherogenese im Labor von Joseph Goldstein lieferte ein mechanistisches Korrelat zur Lipid-Theorie der Atherosklerose [96]. Die „Response-to-injury“ Hypothese von Russel Ross integriert bis dato wichtige Bestandteile der Atheroskleroseforschung. Sie identifiziert einen chronischen Endothelschaden beispielsweise durch erhöhtes Plasma LDL-Cholesterin oder durch die arterielle Hypertonie als Ursache für eine erhöhte Permeabilität und Adhäsivität der Gefäßwand für Immunzellen. Diese Veränderungen in Endothelzellen leiten nach Ross den Beginn der entzündlich degenerativen Atherogenese mit weiterer Immunzellinfiltration, Cholesterinablagerung, Schaumzellbildung, Proliferation glatter Muskelzellen und Apoptose bzw. Nekrose der Zellen ein [97]. Das heutige Verständnis der Atherogenese orientiert sich weitgehend am Zusammenspiel der oben genannten metabolischen, mechanischen und entzündlichen Faktoren [1-3].

### 1.2.1 Ursachen für die endotheliale Dysfunktion

Eine der wichtigsten Ursachen für die endotheliale Dysfunktion und die Entstehung eines entzündlich, adhäsiven endothelialen Phänotyps, der die Einwanderung von Immunzellen erleichtert, ist oxidiertes LDL-Cholesterin [97-101]. Endothelzellen besitzen das Repertoire, um LDL und VLDL Partikel wahrzunehmen. Sie gehören gemeinsam mit Makrophagen zu den wenigen Zellen, die gleichzeitig den LDL-, beta-VLDL und Scavenger-Rezeptoren exprimieren [102]. Modifiziertes LDL-Cholesterin stimuliert direkte Monozyten-Endothelinteraktionen, wobei

Endothelzellen auch chemotaktisch auf Monozyten wirken können. Dies lässt sich auf eine erhöhte Produktion von CCL2 zurückführen. Die CCL2 Ausschüttung von Endothelzellen ist dabei abhängig von einer LDL bzw. VLDL Stimulation [103, 104]. Mit modifizierten LDL Partikeln inkubierte Endothelzellen scheinen außerdem P-Selektin als Zelladhäsionsmolekül hochzuregulieren. P-Selektin scheint dementsprechend in pathologischen Präparaten von atherosklerotisch veränderten Bereichen des menschlichen Gefäßbetts im Vergleich zu gesunden Arealen, höher exprimiert zu sein [105]. Auch die Expression von ICAM-1, einem Integrin, wird durch oxidiertes LDL in Endothelzellen induziert [106]. Unter anderem scheinen Endothelzellen selbst für die schädliche Oxidation von LDL Partikeln durch die Ausschüttung freier Radikale verantwortlich zu sein [107].

Auch die schädliche Wirkung der arteriellen Hypertonie scheint teilweise auf vermehrten oxidativen Stress zurückzuführen zu sein [100, 108-110]. Der oxidative Stress schädigt das Endothel und inhibiert vor allem die NO Produktion als eines der wichtigsten vasodilatativ wirksamen Agenzien [111-113]. Ein weiterer Risikofaktor von höchster atherogener Relevanz, der Zigarettenkonsum, scheint seinen Schaden ebenfalls durch oxidativen Stress auf Endothelzellen zu setzen [114].

Lange Zeit war unklar, weshalb systemische Risikofaktoren vor allem an Stellen mit besonders turbulentem Blutfluss zu atherosklerotischen Läsionen führen. Die Mediatoren der Mechanotransduktion zwischen einem turbulenten Blutfluss und der Entstehung von atherosklerotischen Plaques wurden 2005 von Tzima und Kollegen beschrieben: Endothelzellen scheinen bei einem turbulenten Blutfluss mittels PECAM-1, VEGFR2 und VE-Cadherin den proinflammatorischen und proatherogenen NF- $\kappa$ B Signalweg zu aktivieren [115].

### 1.2.2 Folgen der endothelialen Dysfunktion

Die oben genannten Faktoren führen durch chronische Aktivierung zu einer erhöhten Zugänglichkeit des Endothels für Leukozyteninteraktionen und transendotheliale Migration und schaffen somit die Grundlage für die entzündliche Komponente der Atherogenese [97-101] [100, 108-110] [114]. Die Mediatoren dieser erhöhten Leukozytenrekrutierung und Adhäsion sind multiple Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle. Je nach Leukozytenpopulation, Lokalisation der atherosklerotischen Plaques und des Stadiums der Atherogenese unterscheiden sich die beteiligten Mediatoren für Endothel-Leukozyteninteraktionen. Die

Leukozytenrekrutierung folgt einer strengen Kaskade, die in den letzten Jahrzehnten sehr detailliert beschrieben wurde. Das heutige Verständnis dieser Sequenz lässt sich staffeln in:

1. „Capture / Tethering / Rolling“
2. „Firm adhesion“
3. „Lateral transmigration and diapedesis“ [3].

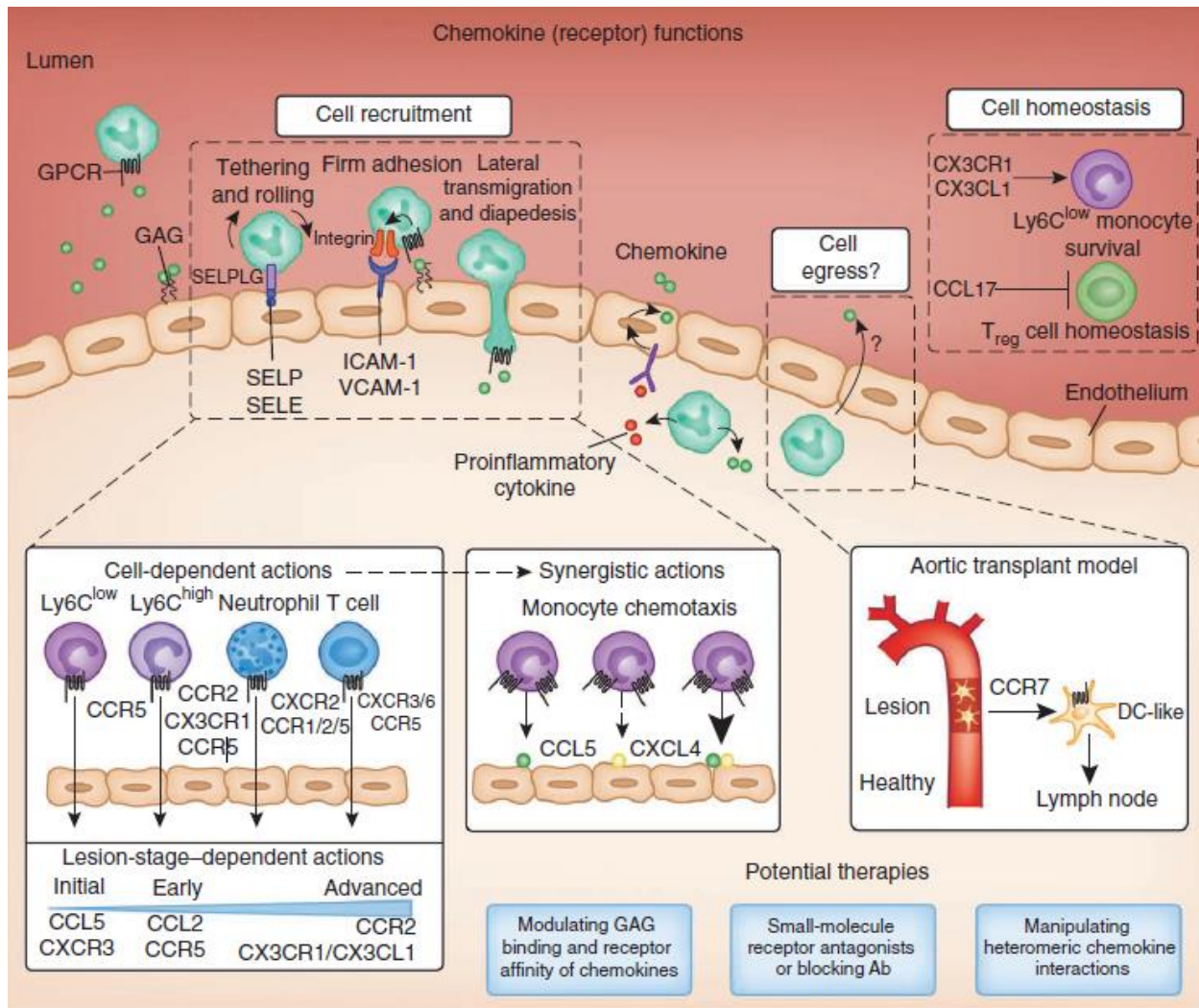
Selektine gehören zu den wesentlichen Mediatoren für den initialen Kontakt, das Tethering und Rolling von Leukozyten auf Endothelzellen und leiten somit die Adhäsionskaskade ein. Selektine binden dabei präferentiell an Glykokonjugate, vor allem an Glykoproteine. P-Selektin ist dabei in intrazellulären Vesikeln von Endothelzellen und Blutplättchen gespeichert und wird bei Bedarf auf die Plasmamembran mobilisiert [116, 117]. L-Selektin ist auf den meisten Leukozyten zu finden, ist vor allem in Lymphozyten relevant und wirkt in der Atherosklerose eher protektiv [118]. P- und E-Selektin sind vor allem auf chronisch inflammatorisch aktiviertem Endothel exprimiert, dabei interagieren beide mit dem Glykoprotein Liganden PSGL-1, welches von den meisten Leukozyten exprimiert wird und das Capture, bzw. Tethering und Rolling der Leukozyten ermöglicht [119].

Integrine sind relevant für den Arrest bzw. die feste Adhäsion von Leukozyten auf dem Endothel [1, 3]. Einerseits haben Integrine zusätzlich zur adhäsiven Komponente das Potenzial des „inside-outside signalling“, also einer Konformationsänderung der äußeren Domäne, beispielsweise nach Aktivierung der Zellen. Andererseits haben sie auch das Potenzial des „outside-inside signalling“, also die Induktion einer intrazellulären Signalkaskade nach Bindung der äußeren Domäne an einen Liganden [120]. Zu den relevantesten Integrinen für die Atherogenese gehört das endothelial exprimierte VCAM-1 und sein monozytärer und lymphozytärer Ligand VLA-4, bzw. das endotheliale ICAM-1 und sein panleukozytärer Ligand LFA-1 [106, 119, 121-124]. Die transendotheliale Migration von Leukozyten wird von Junctional Adhesion Molecules (JAMs) reguliert, welche schlussendlich eine Ansammlung von leukozytären Populationen im subendothelialen Raum ermöglichen [125-127].

Die Kaskade der Leukozytenrekrutierung wird von Chemokinen komplex reguliert. Lösliche Chemokine ermöglichen die Rekrutierung von Leukozyten an das Endothel. Membrangebundene Chemokine induzieren G-Protein vermittelt eine Integrinexpression auf Leukozyten und somit eine feste Adhäsion bzw. Transmigration [3]. CCL2, CX3CL1 und CCL5 bzw. deren Rezeptoren gehören zu den relevantesten klassischen Chemokinen in der Atherogenese [128-131]. Eine Hemmung von CCL2, CX3CR1 und CCR5 führt zu einer fast



vollständigen Inhibition der Atherogenese. Weiterhin führt die kombinierte Hemmung dieser Chemokine zu einer stärker ausgeprägten Atherosklerose-Reduktion als die Hemmung einzelner Chemokine. Eine Redundanz der Chemokine in der Krankheitsentstehung ist somit unwahrscheinlich [130]. Ein genetischer Knock-Out von CCL2 oder CX3CL1 führt einerseits zu einer verringerten endothelialen Rekrutierung von Monozyten [128, 132] andererseits aber auch zu verringerten Monozytenzahlen im Blut und im Knochenmark [130]. Die meisten Chemokine haben also sowohl auf systemischer, hämatogener Ebene als auch auf lokaler, endothelialer Ebene proatherogene Effekte. Eine Studie mit adoptivem Zelltransfer identifizierte CCR1 und CCR5 als relevante Rezeptoren für die Rekrutierung von Monozyten. CCR2 und CX3CR1 zeigen in dieser Studie keine Relevanz in der Rekrutierung von Monozyten. Auf Knochenmarksebene identifizierten die Autoren vor allem CXCL1/CXCR2 als Chemokin/Chemokinrezeptor Achse für die Mobilisierung von Monozyten [133]. Wenige Ausnahmen von Chemokinen und Chemokinrezeptoren wie CXCR4 und der entsprechende Ligand CXCL12 (SDF-1) scheinen auch protektive Effekte in der Atherosklerose zu haben [134, 135]. Atypische Chemokine wie MIF scheinen ebenfalls eine große Relevanz in der Rekrutierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zu atherosklerotischen Plaques zu haben. Eine verringerte Adhäsivität dieser Zellen an das Endothel *in vitro* und eine verringerte Atheroprogression *in vivo* durch MIF Inhibition konnte nachgewiesen werden [136, 137]. Nicht nur Monozyten, sondern auch neutrophile Granulozyten scheinen vor allem bei der Initiierung der Atherosklerose eine wichtige Rolle zu spielen. Im Gegensatz zur physiologischen Rekrutierung über Venen und Venolen sind in der Atherogenese nicht nur CXCR2 und CCR2 in der Extravasation neutrophiler Granulozyten beteiligt. Für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu atherosklerotischen Plaques sind vor allem CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR2 von Bedeutung [138]. Die Inhibition von CCR1 oder CCR5 ermöglicht somit eine potentielle Translation zu einer maßgeschneiderten Inhibition der Neutrophilen-Extravasation hauptsächlich in pathologischen Prozessen, ohne ein Eingreifen in die physiologische Immunantwort [138].



**Abbildung 1: Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Atherogenese**

Leukozyten werden über ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher löslicher Chemokine an das Endothel rekrutiert. Im Anschluss interagieren sie über eine Kaskade verschiedener Adhäsionsmoleküle und membrangebundener Chemokine mit dem vaskulären Endothel. Nach der festen Adhärenz an das Endothel gelangen sie über die transendotheliale Migration in den subendothelialen Raum. An der Leukozytenrekrutierung ist ein Repertoire an Chemokinrezeptoren beteiligt, das zellspezifisch in unterschiedlicher Zusammensetzung angelegt ist und in verschiedenen Stadien der Atherosklerose unterschiedlich starke Einflüsse auf die Plaque-Progression hat. Außerdem spielen Chemokinrezeptoren durch Vermittlung von Überlebenssignalen eine Rolle in der Homöostase der Immunzellen während der Atherogenese. Mittels Manipulation der Rezeptoraffinität von Chemokinen, der Nutzung von Rezeptorantagonisten und mittels maßgeschneiderter Hemmung atherosklerosespezifischer Chemokin-Interaktionen könnte eine Translation dieser Entzündungshypothese in die Klinik möglich sein. Eine Plaque-Regression durch entsprechende Chemokinsignale muss zukünftig durch die Verwendung von Aortentransplantationsmodellen weiter untersucht werden. Aus Weber et al., Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options, Nat Med. 2011 Nov 7;17(11):1410-22. [3].

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Medicine, Copyright © 2011.

Eines der klinisch relevantesten Zytokine ist IL1- $\beta$ , welches lange Zeit als stark proatherogen bekannt war [139]. IL1- $\beta$  wird vor allem von Monozyten und Makrophagen in der Entzündung gebildet [140]. Unter anderem durch eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 scheint IL1- $\beta$  auch zu einer vermehrten Rekrutierung von Monozyten zu führen [141]. Basierend auf diesen und weiteren grundlagenwissenschaftlichen Studien zu IL1- $\beta$  wurde 2017 die CANTOS Studie veröffentlicht, die erstmalig die Entzündungshypothese kausal in der menschlichen Atherosklerose durch die Hemmung von IL1- $\beta$  bewies. Trotzdem war die Hemmung von IL1- $\beta$  von einer signifikanten Zunahme fataler Infektionen begleitet, die möglicherweise den positiven Effekt der Therapie auf die Gesamtmortalität kompromittierte [19]. Im Gegensatz dazu zeigten Gomez und Kollegen kürzlich, dass IL1- $\beta$  im späten Stadium der Atherogenese im Mausmodell auch protektive Wirkungen haben kann [142]. Ein genetischer Knock-Out des IL1-Rezeptors in glatten Muskelzellen und eine Behandlung mit einem IL1- $\beta$  inhibierenden Antikörper hatten eine Abnahme der Plaque-Stabilität und somit ein erhöhtes Risiko für Plaque Ruptur zur Folge [142].

### 1.2.3 Die Rolle von CCL2 in der Atherogenese

CCL2 war das erste CC Chemokin, das entdeckt und mit der Atherogenese in Verbindung gebracht wurde [21, 143]. Seitdem wurde CCL2 in unzähligen Studien mit der Atheroprogression korreliert und gilt heute als eines der stärksten proatherogenen Chemokine. Das aktuelle Dogma lautet: Je mehr CCL2, desto mehr Atherosklerose in murinen Krankheitsmodellen [144, 145]. Auch in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass CCL2 beispielsweise mit dem Schlaganfall-Risiko korreliert [146]. In ersten Ansätzen wurde die CCL2-CCR2 Achse als therapeutisches Ziel genutzt [147].

Chemokine gehören zu der Gruppe der Zytokine und zeichnen sich dadurch aus, dass sie an G-Protein gekoppelte Chemokin-Rezeptoren binden und die Chemotaxis von Leukozyten stimulieren [148]. Die Gruppe der Chemokine lässt sich abhängig von der Konfiguration der N-Terminal gelegenen Cystein – Aminosäuren in 4 weitere Untergruppen unterteilen: CC, CXC, CX3C und (X)C. Entsprechend der Namensgebung liegen die Cysteine der CC Untergruppe direkt aneinander, in der CXC Untergruppe sind sie durch eine weitere Aminosäure getrennt, in der CX3C Gruppe liegen zwischen den Cysteinen 3 weitere Aminosäuren und in der (X)C Gruppe bestehen die Chemokine aus nur 2 Cysteinen [149]. CCL2 war das erste Chemokin der CC Gruppe, das durch die Fähigkeit Monozyten chemotaktisch zu führen, beschrieben wurde

[150]. CCL2 ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren und wird vom CCL2 Gen kodiert, das aus 3 Exons und 2 Introns besteht [148].

Die wichtigsten Quellen für CCL2 in der Gefäßwand sind Endothelzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen (SMCs) [151, 152].

Verschiedene histologische Korrelationsstudien und *in vitro* Studien mit humanen vaskulären SMCs zeigten, dass SMCs CCL2 auf verschiedene inflammatorische Stimuli hochregulieren können [153] [154]. Auch in humanen atherosklerotischen Plaques exprimieren SMCs relevante Mengen an CCL2 [155].

Endothelzellen schütten nach Stimulation mit oxidiertem LDL CCL2 aus, welches zur Rekrutierung von Monozyten beiträgt [156] [132]. Auch die Exposition gegenüber Angiotensin ist ein potenter Stimulus für die CCL2 Sekretion von Endothelzellen [157]. Ein konditionelles Knock-Out Modell hat zell-spezifische Unterschiede in der CCL2 Sekretion auf die Atherogenese nachgewiesen. Nestin<sup>+</sup> Zellen scheinen CCL2 zu nutzen, um Monozyten im Knochenmark zu halten, gleichzeitig aber lokal in der Gefäßwand Monozyten zu atherosklerotischen Plaques zu rekrutieren. Eine Nestin-spezifische Deletion von CCL2 erhöht dementsprechend die Monozytenzahlen im Blut, senkt aber die Rekrutierung dieser Zellen zu atherosklerotischen Plaques, wodurch wiederum die Plauegröße schrumpft [132]. Interessanterweise zeigt ein endothelspezifischer Knock-Out von CCL2 keine signifikanten Unterschiede in der Atheroprogression. Eine nähere Analyse der Nestin<sup>+</sup> Zellen in der Gefäßwand zeigt, dass Nestin<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der Atherogenese aus der Tunica Adventitia in die Intima wandern und teilweise anatomisch als auch phänotypisch zu Zellen differenzieren, die Ähnlichkeiten zu Endothelzellen besitzen [132].

Weitere Zellen, die hohe Mengen an CCL2 produzieren können, sind Makrophagen. Vor allem M1 polarisierte, proinflammatorische Makrophagen exprimieren *in vitro* CCL2 [158]. HDL kann passend zu seiner anti-atherogenen Wirkung die Expression des proinflammatorischen Chemokins CCL2 in Makrophagen hemmen [5]. In humanen atherosklerotischen Plaques ist CCL2 dementsprechend vor allem in makrophagenreichen Bereichen exprimiert [143]. Da der subendotheliale Raum der gesunden Gefäßwand hauptsächlich aus SMCs besteht und SMCs bereits in frühen Stadien der Atherogenese Schaumzellen bilden [159-161], ist es wahrscheinlich, dass in frühen Stadien der Atherogenese SMCs eine Hauptquelle für CCL2 im subendothelialen Raum darstellen.

In etablierten atherosklerotischen Plaques exprimieren organisierte Thromben die höchsten Mengen an CCL2 mRNA, gefolgt von Makrophagen, der fibrösen Kappe und dem Lipidkern, während in gesunden Gefäßwänden kaum CCL2 nachweisbar ist [155].

Proatherogenes CCL2 wird außerdem auch von nicht-vaskulären Zellen sezerniert: Im Knochenmark mobilisiert es Monozyten und unterhält somit die schädliche Monozytose, die während der Atherogenese auftritt [130].

CCL2 ist somit das zentrale Chemokin in der Instrumentierung der Monozyteneinwanderung und der Schaumzellakkumulation in der Gefäßintima [21, 130, 143-145, 154, 160, 162-189]. Bei der Einwanderung von Monozyten in entzündetes Gewebe ist CCL2 vor allem in der Induktion einer festen Adhärenz von Monozyten bedeutsam [190, 191]. CCL2 - auch unter dem Namen MCP-1, macrophage chemotactic protein 1, bekannt - ist nicht nur an der Mobilisierung und Rekrutierung von Monozyten beteiligt, sondern ist auch im Gewebe, nach der Extravasation, stark chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen und auf neutrophile Granulozyten wirksam [192, 193].

CCL2 wird einerseits von unterschiedlichen Zellen der Gefäßwand exprimiert, wirkt andererseits aber auch auf eine Vielzahl von Zellen im Gefäßsystem. Die wichtigsten Rezeptoren über die CCL2 wirkt sind CCR2 und CCR4, wobei CCR4 vor allem die Wirkung von CCL2 auf T-Zellen mediiert [194]. Die CCR2 Expression ist besonders hoch auf Monozyten und Makrophagen. SMCs exprimieren interessanterweise auch geringe Konzentrationen von CCR2 [195].

Die Wirkung von CCL2 auf Monozyten und Makrophagen *in vivo* ist in der Vergangenheit hauptsächlich in Bezug auf die Funktion in der Chemotaxis untersucht worden [144]. Die Wirkung von CCL2 auf die Programmierung bzw. die Polarisierung von Makrophagen ist bisher *in vitro* erfolgt. Auch *in vitro* ist die bisherige Datenlage zur Wirkung von CCL2 auf die Makrophagenpolarisation jedoch uneindeutig. In einer Studie mit humanen GM-CSF und M-CSF stimulierten monozytären Makrophagen und murinen CCR2<sup>-/-</sup> Knochenmarkmakrophagen zeigten Makrophagen mit inhibierter CCL2-CCR2 Achse eine vermehrte M1 Polarisierung. Mit CCL2 inkubierte Makrophagen zeigten eine vermehrte Produktion des immunomodulatorisch wirksamen Zytokins IL10 nach LPS Stimulation. Murine Makrophagen aus CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten eine vermehrte Produktion der proinflammatorischen Chemokine TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit LPS [180]. Eine weiteren Studie mit murinen Knochenmarkmakrophagen zeigte jedoch das Gegenteil. Hier exprimierten Makrophagen, die mit CCL2 vorbehandelt waren nach Inkubation mit LPS und IFN $\gamma$  vermehrt proinflammatorische Makrophagenmarker wie Nos2 und TNF- $\alpha$  [196].

Interessanterweise exprimieren auch humane SMCs CCR2 mRNA [10]. CCL2 stimuliert nicht nur die Chemotaxis von Monozyten, sondern fördert auch die Migration und die Invasion von SMCs in synthetische Basalmembranen [168]. Im Rahmen der Atherogenese könnte eine vermehrte Migration bzw. Invasion von SMCs zur Plaquestabilisation beitragen, wobei *in vivo* Versuche zur Untersuchung der spezifischen Rolle von CCL2 auf SMCs fehlen.

Eine Vielzahl therapeutischer Patente wurden in der Vergangenheit im Hinblick auf die Schlüsselrolle der CCL2-CCR2 Achse in chronisch entzündlichen Erkrankungen angemeldet [148]. Trotzdem spielt CCL2 auch in der physiologischen Immunantwort eine Schlüsselrolle [197, 198]. Eine Hemmung der CCL2-CCR2 Achse lässt somit auch eine kompromittierte Immunabwehr erwarten.

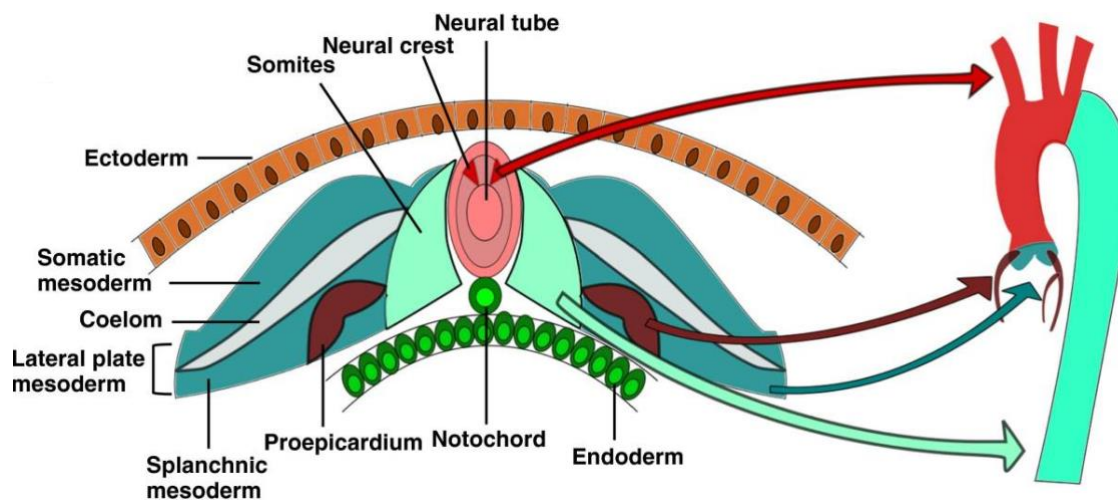
Interessanterweise zeigt die CCL2 Expression rhythmische Unterschiede im Gefäßsystem. Die CCL2 Expression der Mikrozirkulation weicht im chronobiologischen Rhythmus von der in der Makrozirkulation ab [199]. Vor Kurzem verabreichten deshalb Winter und Kollegen einen CCR2 Antagonisten nur zu den Zeiten, in denen die CCL2 Expression und auch die Rekrutierung myeloider Leukozyten besonders in der Makrozirkulation dominierte. Dadurch konnten die Autoren der Studie die frühe Atheroprogression signifikant reduzieren, ohne die Rekrutierung myeloider Leukozyten in der Mikrozirkulation bzw. die physiologische Immunantwort auf eine LPS-induzierte Lungenentzündung zu stören [199].

Zusammenfassend ist CCL2 ein Schlüsselchemokin in der Atheroprogression, welches bis heute umfassend in Bezug auf die Monozytenmobilisation- aus dem Knochenmark und Monozytenrekrutierung durch das Endothel zu atherosklerotischen Plaques beschrieben wurde.

Welche Rolle es *in vivo* im subendothelialen Raum spielt, bleibt unklar. Ob die *in vitro* gezeigte Ausschüttung von CCL2 aus glatten Muskelzellen auch *in vivo* eine Rolle in der Atherogenese spielt, bleibt fraglich.

### 1.3 Die Rolle glatter Muskelzellen in der Atherogenese

Glatte Muskelzellen (SMCs) in verschiedenen atherosklerose-prädisponierten Regionen des Gefäßbaumes stammen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen. SMCs auf Höhe der Aortenklappe bzw. der proximalen Aorta stammen aus Islet-1<sup>+</sup> Vorläufern aus dem sekundären Herzfeld [10, 200], koronare SMCs stammen aus dem Epikard, bzw. Proepikard [201], die Aorta Descendens aus somitischen Vorläuferzellen [202, 203], die Aorta Ascendens und ihre Abgänge aus der Neuralleiste [204, 205].



#### Abbildung 2: Die embryologische Herkunft vaskulärer glatter Muskelzellen großer muriner Gefäße

SMCs aus der Aorta Ascendens und dem Aortenbogen stammen aus der Neuralleiste, wobei die Aorta Descendens aus somitischen Vorläuferzellen stammt. Die Aortenwurzel entsteht aus dem sekundären Herzfeld, wobei koronare SMCs aus dem Proepikard stammen.

Aus Sinha et al., Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application, *Cell Mol Life Sci*, 2014 Jun 18; 71(12): 2271–2288. [206]. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Cellular and Molecular Life Sciences, Copyright © Springer Basel 2014.

Die Herkunft von SMCs ist von Bedeutung, da verschiedene Regionen im Gefäßbaum unterschiedlich stark zur Atherogenese neigen [205]. Eine erhöhte Scherspannung in Gefäßregionen mit turbulentem Blutfluss scheint eine Begründung für die Diskrepanz in der Atherogenese unterschiedlicher Lokalisationen zu sein [205]. Transplantationsversuche mit Tieren, bei denen Gefäßabschnitte mit geringer Neigung zur Atherogenese in Gefäßabschnitte mit hoher Atheroskleroseeignung transplantiert wurden, zeigten dass die Herkunft des Gefäßes unabhängig vom Blutfluss eine große Rolle in der Krankheitsentstehung spielt [207, 208].

Wandständige Zellen verschiedener Gefäßregionen scheinen somit unterschiedlich stark auf atherogene Stimuli zu reagieren.

Die wahrscheinlich relevanteste Rolle von SMCs in atherosklerotischen Plaques ist die Plaquestabilisierung und somit die Verhinderung einer Plaqueruptur mit folgenden Organinfarkten. SMCs bilden die fibröse Kappe im Plaque, welche dem nekrotischen Kern bzw. den Schaumzellen aufgelagert ist und diese vom Endothel abtrennt [2]. Kürzlich publizierte Daten machen deutlich, dass die fibröse Kappe atherosklerotischer Plaques äußerst plastisch ist und sich auch in späten Stadien noch kurzfristig verändern kann. Unter anderem können neutrophile Granulozyten über Histon-H4 Ausschüttung und NET-Bildung einen lytischen Zelltod von SMCs bewirken und somit die fibröse Kappe ausdünnen [192]. Eine pharmakologische Inhibition von IL1- $\beta$  in späten Stadien der Atherosklerose kann außerdem innerhalb von wenigen Wochen eine Destabilisierung der fibrösen Kappe bewirken und somit das Risiko für eine Plaqueruptur erhöhen [142].

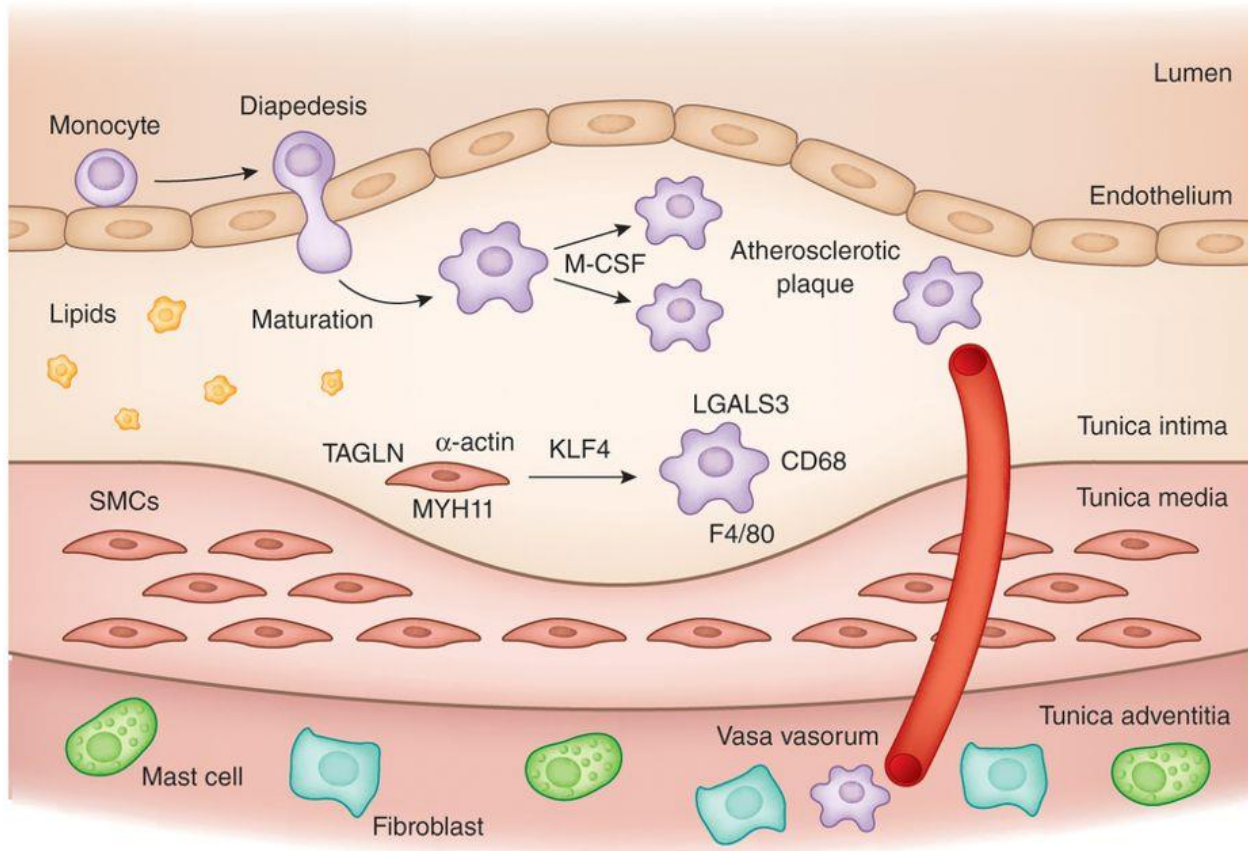
Abgesehen von einer ebenfalls beschriebenen proatherogenen, übermäßigen Proliferation wurden SMCs lange Zeit als hauptsächlich atheroprotektiv angesehen, da sie über die Bildung einer fibrösen Kappe zur Plaquestabilisierung beitragen [10]. Andererseits vermutete man ebenfalls, dass SMCs sehr plastisch sind und zumindest *in vitro* zu makrophagen-ähnlichen Zellen transdifferenzieren können [209]. Shankman et al. zeigten 2015 erstmals *in vivo*, dass eine Transdifferenzierung von SMCs zu makrophagen-ähnlichen Zellen regelhaft in der Atherogenese stattfindet. Außerdem verdeutlichten sie in einem „Fate-Mapping“ Ansatz, dass mehr als 80% der aus ursprünglich voll-differenzierten SMCs entstandenen Zellen nicht durch klassische glattmuskuläre Marker wie ACTA2 identifiziert werden können. 30% der aus SMCs entstandenen Zellen exprimierten Makrophagenmarker. 12% exprimierten den MSC-Marker SCA-1. Etwa die Hälfte aller Zellen exprimierten weder Makrophagen-, noch mesenchymale Stammzell- (MSC-) oder SMC-Marker. Diese Transdifferenzierung in Makrophagen schien vor allem durch den Pluripotenzfaktor KLF4 instrumentiert zu werden und wiederum die Atherogenese zu begünstigen [210, 211]. In einer weiteren Publikation der Arbeitsgruppe zeigten Cherepanova und Kollegen, dass die Expression des Pluripotenzfaktors OCT4 entgegen der Erwartung atheroprotektiv ist. OCT4 und KLF4 scheinen also die Plastizität von SMCs in unterschiedlicher Richtung zu beeinflussen, eine Generalisierung der Auswirkung der SMC Plastizität auf die Atherogenese ist somit offensichtlich nicht möglich [212].

Diese phänotypische Plastizität scheint nicht nur in murinen Atherosklerosemodellen vorzukommen, sondern auch bei der humanen Atherogenese. Bei Patienten mit stattgehabter



„cross-gender“ Herztransplantation waren bei Männern, die Herzen von weiblichen Spendern erhalten hatten, Y-Chromosom CD68<sup>+</sup> Makrophagen in den Koronararterien nachweisbar. Diese makrophagen-ähnlichen Zellen müssen folglich aus gewebsresidenten Zellen entstanden sein. Ein im Owens Labor etabliertes Verfahren durch epigenetische Veränderungen des Myh11 Locus auch nach stattgehabter Transdifferenzierung SMCs zu detektieren, zeigt, dass diese stationären Y-Chromosom<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> Makrophagen zum Großteil aus SMCs entstanden sind [211] [213]. Myokardin ist ein Faktor, der in der Gefäßwand ausschließlich von SMCs exprimiert wird. Heterozygote Myokardin Knock-Out Mäuse auf ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund entwickeln mehr Atherosklerose und zeigen SMCs mit einem verstärkten inflammatorischen Phänotyp *in vivo*. Myokardin-Induktion führt *in vitro* zu einer verminderten Lipidaufnahme und Makrophageninteraktion. Myokardin scheint somit ein weiterer Mediator für die atheroprotektive Aufrechterhaltung eines ausdifferenzierten, kontraktilen SMC-Phänotyps zu sein [214]. Ein kürzlich publizierter „Fate Mapping“ Ansatz zeigt, dass Plaque SMCs nicht-hämatopoetischen Ursprungs zu einem großen Teil von einzelnen SMC Vorläuferzellen aus der Tunica Media abstammen. Diese proliferieren nach ihrer Infiltration in den atherosklerotischen Plaque, bilden zunächst die fibröse Kappe und beginnen im Verlauf auch in den nekrotischen Kern des Plaques einzuwandern. Die proatherogene Wirkung von SMCs scheint dabei von Integrin  $\beta 3$  abhängigen Stoffwechselwegen abzuhängen [215].

Formen der Transdifferenzierung finden nicht nur von SMCs zu Makrophagen statt, sondern auch von hämatopoetischen Zellen zu SMCs. Thrombin z.B. induziert *in vitro* die Expression von  $\alpha$ -SMA in Makrophagen [216]. Die histologische Aufarbeitung von Koronararterien „cross-gender“ knochenmarktransplantierte Patienten zeigt, dass ca. 10% der  $\alpha$ -SMA exprimierenden Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind [217].



### Abbildung 3: Phänotypische Modulation von SMCs in der Atherogenese

SMCs aus der Tunica Media können im Rahmen der Atherogenese in den Plaque migrieren und dort KLF4 abhängig zu makrophagen-ähnlichen Zellen transdifferenzieren. Hierbei verlieren sie die Expression klassischer SMC Marker [211]. Eine weitere Population von Makrophagen entsteht aus Blutmonocyten. Aus Rosenfeld et al., Converting smooth muscle cells to macrophage-like cells with KLF4 in atherosclerotic plaques, *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):549-51. doi: 10.1038/nm.3875. [218]. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Medicine, Copyright © 2015.

Mittels Hochdurchsatzmethoden zur Transkriptomanalyse auf Einzelzellebene (Single-cell RNA Sequencing) haben Wirka und Kollegen vor Kurzem gezeigt, dass die scheinbare Transdifferenzierung von SMCs in Makrophagen in der Atherogenese möglicherweise täuscht. Zellen, die aus Myh11<sup>+</sup> Vorläufern entstammen, wurden in der Studie näher untersucht [219]. Ein Großteil dieser Zellen zeigte entsprechend der Analysen von Shankman und Kollegen einen Phänotyp, der sich eindeutig von dem der SMCs unterschied. Allerdings hatten viele dieser Zellen große Ähnlichkeiten zu Fibroblasten, sodass die Autoren diese Population aus SMCs als ‚Fibromyozyten‘ bezeichneten [219]. Diese Transdifferenzierung von SMCs in ‚Fibromyozyten‘ war abhängig von TCF21 – einem Transkriptionsfaktor, der bei Menschen mit dem KHK Risiko korreliert [220]. Das Transkriptom der Zellen zeigte jedoch, abgesehen von LGALS3, keine

weiteren klassischen Makrophagenmarker. Auch auf Protein-Ebene exprimierten diese Zellen ebenfalls keine Marker, die die Identifikation von Makrophagen zulassen würden [219]. Die von Myh11<sup>+</sup> Vorläufern abstammenden Zellen konnten graduell in ein Spektrum zwischen SMCs und ‚Fibrozyten‘ eingeordnet werden. Eine Transdifferenzierung in unterschiedliche eigenständige Zellpopulationen, wie zuvor von Shankman und Kollegen histologisch beschrieben, war nicht nachweisbar [219].

SMCs sind jedoch nicht nur nach einer möglichen Transdifferenzierung an der Atheroprogression beteiligt. *In vitro* Studien und histologische Korrelationen belegen, dass SMCs auch selbst immunologische Aufgaben übernehmen können. SMCs stellen die häufigste Zellpopulation der Gefäßwand dar und sind in der humanen Atherogenese vor der Akkumulation von Makrophagen und anderen Leukozytenpopulationen gegenüber oxidiertem LDL Cholesterin exponiert [160]. Komplementär zur chronischen Aktivierung und Dysfunktion von Endothelzellen, welche durch oxLDL eine erhöhte Adhäsivität gegenüber Immunzellen erlangen, exprimieren humane SMCs ebenfalls Scavenger-Receptor-A und CD36 als Rezeptoren für die Aufnahme von Lipiden [221, 222]. Eine Exposition von SMCs mit Lipiden führt zu einer Aktivierung von SMCs, zu einer Ausschüttung von CCL2, IL-6 und Cx3CL1 und zu einer Adhäsion von Makrophagen *in vitro* [153, 223]. SMCs aus menschlichen Plaques exprimieren das atypische Chemokin MIF, welches die Atheroprogression in murinen Mausmodellen fördert [137, 224]. Ähnlich wie Endothelzellen exprimieren SMCs ebenfalls die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, welche eine direkte Interaktion von SMCs mit Makrophagen und anderen Leukozyten ermöglichen [166, 225]. Die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen in wandständigen Zellen scheint der Immunzellenanreicherung zuvorzukommen und auf Areale der Atherogenese beschränkt zu sein [226-228]. Außerdem führt die Aufnahme von Lipiden auch in SMCs zu einer Ausbildung von Schaumzellen [159].

Die Rolle wandständiger Zellen in der Immunantwort wurde lange Zeit übersehen. 2013 zeigten Stark und Kollegen, dass wandständige Zellen in der Mikrozirkulation (Perizyten) eine relevante Rolle in der akuten Inflammation spielen. Nach Stimulation von Perizyten mit DAMPs regulieren Perizyten ICAM-1 als Adhäsionsmolekül und MIF als atypisches Chemokin hoch. *In vivo* locken sie myeloide Leukozyten an, interagieren mit ihnen und instruieren sie mit Mustererkennungsprogrammen bzw. erhöhen ihre Effizienz der Zielfindung [229].

Zellspezifische Knock Out Linien für eine *in vivo* Überprüfung der Rolle wandständiger Zellen in Atherosklerose wurden erst vor Kurzem generiert. Eine SMC spezifische Deletion von CXCR4 beispielsweise führt in Mäusen durch Aufrechterhaltung einer intakten Gefäßintegrität zu einer

Akzeleration der Atherogenese. Andererseits führt eine endotheliale Ausschaltung von CXCR4 zu keiner Änderung der Atherogenese [135]. Humane CXCR4 Risiko-Varianten sind außerdem assoziiert mit einer verringerten Expression von CXCR4 [135]. Interessanterweise zeigen Analysen von atherosklerotischen Arteria Carotis Plaques aus Thrombendarteriektomien, dass symptomatische Plaques eine verringerte Expression von CXCR4 aufweisen als asymptomatischen Plaques [135]. Mäuse mit unterdrückter CXCR4 Expression im Knochenmark neigen dementsprechend zu mehr Atherosklerose [230]. Zusammenfassend verstärkt die hämatogene als auch die lokale Hemmung des Chemokinrezeptors CXCR4 die Atherogenese. CXCR4 wirkt somit als Chemokinrezeptor atheroprotektiv.

Weiterhin führt eine SMC spezifische Inhibition des Interleukin Rezeptors Typ 1 in späten Stadien der Atherosklerose zu einer verringerten Stabilität atherosklerotischer Plaques bei gleichzeitiger Abnahme der Plaquegröße. Auch die Behandlung mit einem Antikörper gegen IL1- $\beta$  führt zu einer Abnahme der Größe der fibrösen Kappe [142]. Offensichtlich scheint IL1- $\beta$  auch protektive Effekte auf die Atherogenese zu haben. Diese protektive Rolle scheint vor allem in späten Stadien der Atherogenese relevant zu sein. Nicht nur SMC spezifische, sondern auch systemische IL1R1 Knock-Out Mäuse haben in einer weiteren Veröffentlichung aus dem Owens Labor instabilere Plaques als die entsprechenden Kontrollmäuse mit funktionierenden IL1-Signalwegen [231].

Der Einfluss dieser unterschiedlichen, subendothelial gelegenen zellulären Populationen auf die Atherogenese ist jedoch weiterhin nicht ausreichend erforscht. Nach der Transmigration, durch das wissenschaftlich umfassend beleuchtete Endothel, gelangen angeborene Immunzellen in ein vollkommen neues immunologisches Umfeld, das hauptsächlich aus SMCs besteht und erst durch wenige *in vivo* Studien näher analysiert wurde. Nach der Rekrutierung von Leukozyten durch das Endothel sind die zelluläre Funktion und der Aktivierungszustand von Leukozyten von großer Bedeutung für Plaquegröße und -stabilität [232]. Beispielsweise ist die Efferozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen von essenzieller Bedeutung für die Abräumung von Zell-Debris und somit die Reduktion der Größe des nekrotischen Kerns atherosklerotischer Plaques. Die Ausschaltung von CD47 (einem antiphagozytischem Molekül) führt dementsprechend zur Reduktion der Plaquegröße [233].

Erste Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten aus humanen atherosklerotischen Plaques zeigen überraschenderweise, dass Makrophagen aus symptomatischen Plaques aktiver sind und vermehrt IL1- $\beta$  produzieren, als Makrophagen in asymptomatischen Plaques [234]. In dieser Studie wurden erstmals Immunzellen in humanen atherosklerotischen Plaques mittels

Hochdurchsatz Transkriptom- und Proteom-Analysen auf Einzelzellebene analysiert und somit ein immunologischer Atlas stabiler und instabiler menschlicher atherosklerotischer Plaques erstellt. Dieser Zellatlas verdeutlicht erneut die Relevanz der Makrophagenfunktion neben der absoluten Makrophagenzahl in atherosklerotischen Plaques [234]. Da SMCs im gesunden Gefäß und in frühen Stadien der Atherogenese eine besonders häufige Zellpopulation der subendothelialen Nische darstellen [235], könnten sie für die Funktion von Leukozyten nach ihrer transendothelialen Migration in atherosklerotische Plaques von großer Bedeutung sein. In diesem Kontext ist CCL2 das am höchsten exprimierte CC Chemokin in SMCs aus humanen Plaques und könnte dementsprechend eine entscheidende Rolle im Zusammenspiel zwischen SMCs und Leukozyten im subendothelialen Raum spielen [236].

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Atherosklerose ist eine seit Jahrhunderten erforschte Volkskrankheit. Jährlich fließen international hohe Geldsummen in die umfassende Erforschung der Erkrankung. Trotzdem gehört die Atherosklerose weiterhin zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen [2]. Auch CANTOS konnte durch die Gabe von Canakinumab trotz eines vorteilhaften Effekts auf die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse keinen Effekt auf die Gesamtmortalität zeigen [19]. Eine längerfristige Einnahme von Methotrexat erzielte in der CIRT Studie weder einen Vorteil in der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse noch in der Gesamtmortalität [24]. Eine systemische, ungerichtete antiinflammatorische Therapie scheint somit zu keinem Durchbruch zu führen.

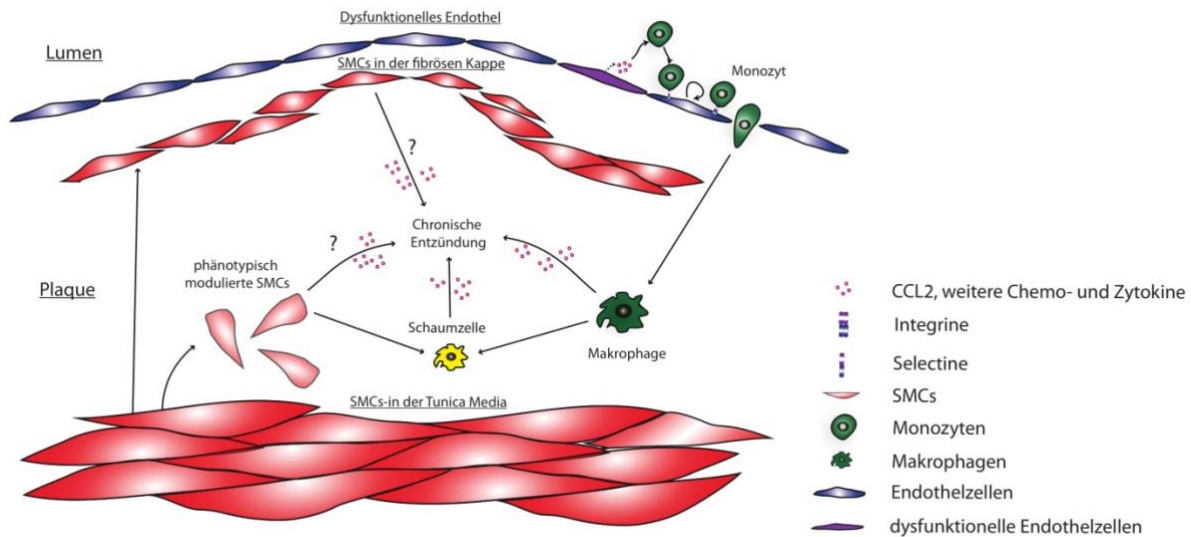
In der Erforschung der inflammatorischen Komponenten der Erkrankung standen bisher hauptsächlich die Interaktionen zwischen Endothelzellen und myeloiden Leukozyten im Fokus [3]. Nach der transendothelialen Migration gelangen myeloide Leukozyten jedoch in eine vollkommen neue Umgebung, die hauptsächlich aus SMCs besteht. *In vitro* Studien und histologische Korrelationsstudien lassen eine immunologische Relevanz von SMCs in der Atherogenese vermuten [153, 154, 223]. SMCs gehören außerdem zu den Zellen, die Lipide aufnehmen und zu Schaumzellen werden können [159]. In menschlichen Plaques sind sie bereits vor der Einwanderung erster Immunzellen gegenüber Lipiden exponiert und speichern diese [160, 161]. Obwohl SMCs mit hoher Wahrscheinlichkeit inflammatorische Kapazitäten besitzen, existieren bisher keine kausalen *in vivo* Studien, welche den Beitrag von SMCs zum inflammatorischen Mikromilieu und zur Atheroprogression beweisen und näher untersuchen.

Andererseits zeigen erste Studien, dass SMCs bestimmte Zytokine und Chemokine wahrnehmen können und diese benötigen, um den Plaque zu stabilisieren [135, 142]. Konditionelle CXCR4 Knock-Out Mäuse zeigen beispielsweise sowohl Endothel-spezifisch als auch SMC-spezifisch eine Zunahme der Atherosklerose [135]. Auch Interleukin-1 Rezeptor Knock-Out Tiere zeigen in einer späten Phase der Atherogenese instabilere Plaques im Vergleich zu Kontrolltieren mit einem intakten Interleukin-Rezeptor [231]. SMC spezifische Knock-Out Tiere zeigen ebenfalls, wie auch die entsprechenden komplett-Knock-Out Tiere, eine Abnahme der Plaque Stabilität in späten Stadien der Atherosklerose [142].

SMC-spezifische Knock-Out Linien von Entzündungsmediatoren wurden bisher nicht näher analysiert. Die Frage, ob SMCs selbst in der Atherogenese in relevantem Ausmaß zum entzündlichen Milieu beitragen, bleibt unklar.

Das Erste mit der Atherogenese in Verbindung gebrachte, stark proatherogene Chemokin in der humanen und murinen Atherogenese ist CCL2 [130, 132, 160, 165, 171, 185, 186, 189, 237-239]. Darüber hinaus ist CCL2 eines der Chemokine, welches *in vivo* und *in vitro* besonders stark von entzündlich veränderten SMCs hochreguliert wird [153, 154, 166, 172, 223, 236].

Stark et al. gelang es 2013 eine wesentliche Relevanz von NG2<sup>+</sup> (CSPG4<sup>+</sup>) Perizyten in der akuten Entzündung *in vivo* darzulegen. Nach ihrer Transmigration durch das Endothel interagierten myeloide Leukozyten umfangreich mit NG2<sup>+</sup> Perizyten und wiesen durch diese Interaktionen eine stark erhöhte Migrations- bzw. Zielfindungseffizienz auf [229]. NG2 ist ein Proteoglykan, das im Gefäßbaum von wandständigen, kontraktilen Zellen der Makro- (SMCs) und Mikrozirkulation (Perizyten) exprimiert wird [229, 240-245]. Mikrovaskuläre wandständige Zellen scheinen eine relevante Rolle in akut entzündlichen Prozessen zu spielen. Ob myeloide Leukozyten in chronisch entzündlichen Erkrankungen größerer Gefäße ebenfalls mit wandständigen Zellen unterhalb des Endothels interagieren, bleibt aufgrund der schweren Zugänglichkeit großer Gefäße für die *in vivo* Mikroskopie unklar.



#### Abbildung 4: Zusammenfassung des aktuellen Wissensstands zum Beitrag von Endothelzellen, Makrophagen und SMCs zur chronischen Entzündung in der Atherogenese

Inflammatorisch aktivierte, dysfunktionelle Endothelzellen exprimieren Zelladhäsionsmoleküle und sezernieren Zytokine und Chemokine, welche die Leukozytenadhäsionskaskade induzieren und zur Rekrutierung von Monozyten und weiteren Immunzellen zum subendothelialen Raum führen [3]. Im Verlauf der Atheroprogression kommt es zur Ansammlung von Makrophagen und Schaumzellen, welche im subendothelialen Kompartiment einen wichtigen Beitrag zum entzündlichen Milieu leisten, unter anderem durch die Sekretion von CCL2 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [3, 143]. Ein Teil der SMCs dedifferenziert im Verlauf der Atherogenese und verliert klassische SMC Marker [10]. Ein weiterer Teil bildet die fibröse Kappe des atherosklerotischen Plaques [10]. Ob die Sekretion von Entzündungsmediatoren aus SMCs signifikant zur chronischen Entzündung und zur Krankheitsprogression der Atherosklerose beiträgt, ist bis heute unklar. *In vitro* Studien zeigen, dass SMCs beispielsweise nach Stimulation mit Lipiden Entzündungsmediatoren wie CCL2 exprimieren können [153, 223].

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist deshalb die Visualisierung und kausale Analyse des Einflusses der subendothelialen Entzündung aus Gefäßwandzellen auf die Atherogenese. Erstmals wird die Expression eines klassischen, systemisch stark proatherogen wirksamen Chemokins -CCL2- spezifisch in Gefäßwandzellen gehemmt und dadurch der Beitrag von SMCs auf das inflammatorische Mikromilieu und auf die Atheroprogression untersucht. Es werden vor allem zwei Fragen adressiert:

1. Interagieren SMCs in der Atherogenese mit Zellen des angeborenen Immunsystems?
2. Wie beeinflusst ein SMC-spezifischer Chemokin Knock-Out am Beispiel von CCL2 die lokale und systemische Immunreaktion und die Plaquebildung *in vivo*?



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung der Atherosklerose wurde das in den 90er Jahren etablierte murine ApoE<sup>-/-</sup> Modell der Atherogenese verwendet [246]. Dieses gehört zu den am häufigsten genutzten tierischen Modellen und imitiert die humane Atherosklerose trotz einiger Limitationen. Tiere mit ApoE Knock-Out entwickeln unter normaler Ernährung bereits hohe LDL Cholesterinwerte und atherosklerotische Läsionen. Eine beschleunigte Atherogenese entwickeln die Mäuse bei zusätzlicher Anfütterung mit besonders cholesterinhaltiger „westlicher Diät“ [247].

Zur beschleunigten Induktion von Atherosklerose wurden die Tiere ab einem Alter von 4 Wochen von den Muttertieren abgesetzt und mit besonders cholesterinhaltiger „westlicher Diät“ (WD) angefüttert (Sniff EF D12079). Es wurden sowohl Männchen als auch Weibchen für die Versuche verwendet. Die Versuche wurden von der Regierung Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18.5.2006, letzte Änderung am 29.3.2017 durch Artikel 141) genehmigt (Gz.: 55.2-1-54-2532-113-2013).

##### 3.1.1 Erwerb und Haltung der entsprechenden Mauslinien

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in SPF (specific pathogen free) -Tierhaltungen, die Experimente wurden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin durchgeführt.

Die Mäuse wurde in IVC-System THKB-M2V-M Polysulfonkafigen (Typ M II) mit einer Größe von 530 cm<sup>2</sup> gehalten. Dabei wurden die Käfige ausschließlich unter den Umsetzstationen geöffnet. Die Mäuse, welche nicht auf Experimentaldiät waren, erhielten Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V1536) und Wasser ad libitum. Zuchttiere erhielten hochkalorisches Zuchtfutter. Jegliches importiertes Material wurde zur Einschleusung in den Tierstall autoklaviert. Außerdem wurde durch eine Material- und Personalschleuse bzw. durch Überdruckbelüftung eine Keimbarriere geschaffen. Um den Keimstatus überprüfen zu können, wurden Sentinel Mäuse genutzt. Die Raumtemperatur betrug 21°C, die Luftfeuchtigkeit ca. 55% und das Licht wurde im 12h Rhythmus automatisiert an- und ausgeschaltet. Die Tiere wurden mit einer Gruppengröße von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten, sodass jede Maus mindestens 100 cm<sup>2</sup> Platz hatte. Im Hinblick auf das Enrichment in der Tierhaltung und Zucht standen den Tieren Maushaus

(Ebeco), frischer Einstreu (Abedd 1602236), Nest- und Höhlenbaumaterial (Abedd NBGE012) sowie Nestlets (NES3600 Nestlets) zur Verfügung.

ApoE<sup>-/-</sup>, Cspg4-DsRed (ab hier als Ng2-DsRed bezeichnet), Cspg4-Cre (ab hier als *Ng2-Cre* bezeichnet), Ccl2-mcherry<sup>fl/fl</sup>, Cx3cr1-GFP und LysM-eGFP Mäuse wurden von Charles River bzw. Jackson Laboratories bestellt. Diese stammen ursprünglich aus den beschriebenen Originalpublikationen und sind alle über mindestens 7 Generationen auf einen C57BL/6 Hintergrundstamm zurückgekreuzt [248-252]. Das Fluoreszenzprotein mCherry der Ccl2-mcherry<sup>fl/fl</sup> Linie war ohne Signalverstärkung in der Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie nicht nachweisbar, weshalb die Linie ab hier als Ccl2<sup>fl/fl</sup> bezeichnet wird.

Zur weiteren Charakterisierung von Cspg4<sup>+</sup> wandständigen Zellen in der Atherogenese haben wir durch Kreuzung der erwähnten Linien folgende Mauslinien generiert:

#### 3.1.1.1 NG2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Fluorochrom-Reporterlinie

Der NG2 (bzw. Cspg4) Promotor ist aktiv in gewebsresidenten wandständigen Zellen der Mikro- (Perizyten) und Makrozirkulation (SMCs), aber auch in extravaskulären Zellen, z.B. des Nervensystems [229, 242, 243, 245, 253-257]. Die Kreuzung mit ApoE<sup>-/-</sup> Knock-Out Tieren erlaubt die Charakterisierung von NG2<sup>+</sup> Zellen in der Atherosklerose.

#### 3.1.1.2 NG2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Fluorochrom-Reporterlinie

Die Kreuzung der NG2-DsRed, ApoE<sup>-/-</sup> und Cx3cr1-GFP Knock-In Tieren ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung von wandständigen Zellen und CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen in der Atherosklerose. Dies ermöglicht die Visualisierung des Zusammenspiels zwischen Makrophagen und NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen.

#### 3.1.1.3 NG2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> Fluorochrom-Reporterlinie

Die Kreuzung der NG2-DsRed, ApoE<sup>-/-</sup> und LysM-eGFP Knock-In Tieren ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung von wandständigen Zellen und LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten in der Atherosklerose. Dies ermöglicht vor allem die *in vivo* Visualisierung des Zusammenspiels zwischen Makrophagen und NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen.

### 3.1.1.4 Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Zellspezifische Ccl2 Knock-Out Linie zur Charakterisierung der Relevanz der CCL2 Sekretion wandständiger Zellen in der Atherogenese

Experimentalgruppe: Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>

Kontrollgruppe: Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>

Zur Erstellung kompartimentspezifischer Knock-Out Linien wurde das Cre/loxP System genutzt. Dieses ermöglicht die Deletion eines loxP flankierten Gens mit einer CRE-Rekombinase. Die loxP Sequenzen werden in intronische Bereiche des Zielgens gebracht, um die Expression des Gens nicht in allen Zellen auch ohne Cre Expression zu beeinflussen. Die Kontrolle der jeweiligen Promotorregion unter der die CRE-Rekombinase exprimiert wird, ist entscheidend dafür, dass in bestimmten Zellen ein gefloxtes Gen deletiert wird und in anderen nicht. Dadurch erhält man zell- bzw. kompartimentspezifische Knock-Out Tiere. Hierbei wurde eine konstitutive CRE-Rekombinase verwendet, die Tamoxifen unabhängig arbeitet und dadurch immer aktiv ist [258-261]. Das mcherry Fluoreszenzprotein ist ohne Amplifikation des Signals nicht sichtbar, weshalb die Linie hier als Ccl2<sup>fl/fl</sup> bezeichnet wird. Die Linie erlaubt die Untersuchung der Relevanz der CCL2 Sekretion wandständiger Zellen in der Atherogenese.

## 3.2 Zucht und Genotypisierung der Versuchstiere

### 3.2.1 Zucht

Zur Identifikation der richtigen Genotypen in den genannten Linien wurde eine Polymerase-Kettenreaktion genutzt.

Zur Generierung von Ng2-DsRed; Cx3cr1<sup>GFP/wt</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> (ab hier als Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> bezeichnet) Tieren bzw. von Ng2-DsRed; LysM<sup>eGFP/wt</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> (ab hier als Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> bezeichnet) Tieren wurden Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> mit entweder Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> oder mit LysM<sup>eGFP/eGFP</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren verpaart. Entsprechend der Mendelschen Regeln sind die Nachkommen dieser Verpaarung heterozygot für GFP bzw. eGFP auf dem Cx3cr1 bzw. LysM Locus und weiterhin homozygote Knock-Out auf dem ApoE Locus. Das Ng2-DsRed ist ein Transgen, bei dem in der entsprechenden Linie nicht charakterisiert ist, an welcher Stelle im Genom es genau eingeknockt wurde. Deshalb ist es mittels PCR nicht möglich homozygote von heterozygoten NG2-DsRed Tieren zu unterscheiden, es muss also bei allen Nachkommen der Ng2 Locus genotypisiert werden.

Zur Generierung von Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Versuchstieren und Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern als Kontrolltiere wurden jeweils Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> mit Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren verpaart, um zur einen Hälfte Cre<sup>+</sup> und zur anderen Hälfte Cre<sup>-</sup> Nachkommen zu erhalten. Die Unterscheidung von Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> erfolgte ebenfalls mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese.

### 3.2.2 Gewebegewinnung zur Genotypisierung und DNA-Isolation

Zur Gewebegewinnung wurde den Mäusen mit einer Ohrstanze ein ca. 2 mm großes Stück Ohrgewebe entfernt. Hierdurch erfolgte gleichzeitig eine unverwechselbare Markierung der Mäuse für die spätere Identifikation. Die DNA Isolation erfolgte mittels Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit entsprechend der Herstellerangaben.

### 3.2.3 Amplifikation des transgenen Lokus

Um die transgenen bzw. mittels homologer Rekombination eingebrachten Gensequenzen im Anschluss mittels Gelelektrophorese analysieren zu können, werden die entsprechenden Sequenzen mittels PCR zunächst amplifiziert. Hierfür werden Primer hinzugegeben, welche an die Regionen im Genom binden, die das entsprechende Transgen bzw. den Knock-In beinhalten. Außerdem werden die vier Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) hinzugegeben, welche eine DNA Amplifikation erst ermöglichen [262]. Die Reagenzien, Annealing Temperaturen, Primer und Zyklenzahlen sind entsprechend der einzelnen Loci nachfolgend zusammengefasst:

3.2.3.1 Ccl2mcherry<sup>flox</sup>

Tabelle 1: Primer Ccl2mcherryflox Lokus

	Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	15121	AAC CAC CTC AAG CAC TTC TG Wild type Forward	20
1	15122	GCT TTG CAG TTT CCC TCA AG Wild type Reverse	20
2	9703	AGG ACG GCG AGT TCA TCT AC Mutant Forward	20
2	9704	TGG TGT AGT CCT CGT TGT GG Mutant Reverse	20

Tabelle 2: Reagenzien Ccl2mcherryflox Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H <sub>2</sub> O, PCR grade		7.5 µl
KAPA2G Fast Hot Start Mix ( <i>enthält 1,5mM MgCl<sub>2</sub></i> )	2×	12.5 µl
Primer 1	10µM	1.25 µl
Primer 2	10µM	1.25 µl
MgCl <sub>2</sub> , 25mM ( <i>Taq DNA Polymerase Kit, Qiagen</i> )	25mM	0.5 µl
genomische DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 3: Zyklen und Annealing Temperaturen Ccl2mcherryflox Lokus

95°C für 3min

95° C für 15 sec	}	10 Zyklen -1.5°C/ Zyklus
65°C für 15 sec		
72°C für 10 sec		

95°C für 15 sec	}	28 Zyklen
50°C für 15 sec		
72°C für 10 sec		

72°C für 7 min  
4°C Lagerung

## 3.2.3.2 NG2-DsRed

Tabelle 4: Primer NG2-DsRed Lokus

	Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	DsRed2_343	GAC GGC TGC TTC ATC TAC AAG Transgen forward	21
2	DsRed2_596	AGC TTG GCG TCC ACG TAG TAG Transgen reverse	21

Tabelle 5: Reagenzien NG2-DsRed Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H <sub>2</sub> O, PCR grade		18.7 µl
PCR Buffer	10×	2.5 µl
Primer 1	10µM	0.5 µl
Primer 2	10µM	0.5 µl
dNTP's	10mM	0.5 µl
Taq (Qiagen Taq Polymerase Cat. No. 201205)	5U/ul	0.3 ul
genomische DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 6: Zyklen und Annealing Temperaturen NG2-DsRed Lokus

**95°C für 3min**

**95° C für 30 sec**  
**60°C für 30 sec**  
**72°C für 30 sec**

} **35 Zyklen**

**72°C für 7 min**  
**4°C Lagerung**

## 3.2.3.3 Ng2-Cre

Tabelle 7: Primer Ng2-Cre Lokus

Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	Cspg4 Promotor = 30177 AAA TCT AAG CGC GGG TCT G transgen forward	19
2	Cre_Rev = oIMR1709 GCA AAC GGA CAG AAG CAT TT transgen reverse	20

Tabelle 8: Reagenzien Ng2-Cre Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H2O, PCR grade		18.8 µl
PCR Buffer	10×	2.5 µl
Primer 1	10µM	0.5 µl
Primer 2	10µM	0.5 µl
dNTP's	10mM	0.5 µl
Taq (Qiagen Taq Polymerase Cat. No. 201205)	5U/ul	0.2 ul
genomische DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 9: Zyklen und Annealing Temperaturen Ng2-Cre Lokus

**94°C für 3min**

**94° C für 30 sec**  
**59°C für 30 sec**  
**72°C für 40 sec**

} 38 Zyklen

**72°C für 7 min**  
**4°C Lagerung**

## 3.2.3.4 Cx3Cr1-GFP

Tabelle 10: Primer Cx3cr1-GFP Lokus

	Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	14276	5'-GTCTTCACGTTTCGGTCTGGT-3'	20
2	14277	5'-CCCAGACACTCGTTGTCCTT-3'	20
3	14278	5'-CTCCCCCTGAACCTGAAAC-3'	19

Tabelle 11: Reagenzien Cx3cr1-GFP Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H <sub>2</sub> O, PCR grade		6.25 µl
KAPA2G Fast Hot Start Mix ( <i>enthält 1,5mM MgCl<sub>2</sub></i> )	2×	12.5 µl
Primer 1	10µM	1.25 µl
Primer 2	10µM	1.25 µl
Primer 3	10µM	1.25 µl
MgCl <sub>2</sub> , 25mM ( <i>Taq DNA Polymerase Kit, Qiagen</i> )	25mM	0.5 µl
genomische DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 12: Zyklen und Annealing Temperaturen Cx3cr1-GFP Lokus

95°C für 3min

95° C für 15 sec  
65°C für 30 sec  
72°C für 10 sec } 38 Zyklen

72°C für 7 min

4°C Lagerung



## 3.2.3.5 LysM-eGFP

Tabelle 13: Primer LysM-eGFP Lokus

Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	MLYSUP   AAGCTGTTGGGAAAGGAGGG	20
2	EGFPDWN   GTCGCCGATGGGGGTGTTCT	20
3	MLP1   TCGGCCAGGCTGACTCCATA	20

Tabelle 14: Reagenzien LyM-eGFP Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H2O		17.7 µl
PCR Buffer	10 ×	2.5 µl
dNTP's	10mM	0.5 µl
Primer 1	10µM	1.0 µl
Primer 2	10µM	0.5 µl
Primer 3	10µM	0.5 µl
Taq (Qiagen Taq Polymerase (Cat.No.201205))	5U/µl	0.3 µl
DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 15: Zyklen und Annealing Temperaturen LysM-eGFP Lokus

**95°C für 3min**

**95° C für 15 sec**  
**65°C für 15 sec**  
**72°C für 10 sec**

} **38 Zyklen**

**72°C für 7 min**

**4°C Lagerung**

3.2.3.6 ApoE<sup>-/-</sup>Tabelle 16: Primer ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

Primer Name	Sequenz	Länge (bp)
1	oIMR0180   GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG Common Forward	20
2	oIMR0181   TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C Wildtype Reverse	21
3	oIMR0182   GCC GCC CCG ACT GCA TCT Mutant Reverse	18

Tabelle 17: Reagenzien ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

Reagenz	Stock Konz.	Volumen Reagenz
H2O		18.2 µl
PCR Buffer	10 ×	2.5 µl
dNTP`s	10mM	0.5 µl
Primer 1	10µM	0.5 µl
Primer 2	10µM	0.5 µl
Primer 3	10µM	0.5 µl
Taq	5U/µl	0.3 µl
DNA		2.0 µl
	Gesamt	25.0 µl

Tabelle 18: Zyklen und Annealing Temperaturen ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

94°C für 5 min

94° C für 20 sec  
65°C für 40 sec  
72°C für 1 Min

} 38 Zyklen

72°C für 7 min

4°C Lagerung

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Es wurden Agarosegele verwendet, eine Peqlab Gelkammer und eine Gel Doc 2000 von Bio-Rad zur Dokumentation der Gelelektrophoresen.

## 3.3 *Ex vivo* Versuchsdurchführung

### 3.3.1 Narkose

Für die Vollnarkose der Mäuse wurde ein Gewicht von durchschnittlich 25 g angenommen und eine sogenannte MMF-Narkose genutzt. Hierfür wurden Fentanyl (Opiat), Midazolam (Benzodiazepin) und Medetomidin ( $\alpha_2$  - Adrenorezeptor-Antagonist) verwendet (90  $\mu$ l Midazolam, Midazolam-hameln®, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln; 15  $\mu$ l Medetomidin, Dorbene®, Pfizer GmbH, Berlin und 90  $\mu$ l Fentanyl, Fentanyl HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen). Diese wurden intraperitoneal injiziert. Im Verlauf der Narkose wurde alle 10 Minuten der „Toe Pinch“ Reflex überprüft und bei Vorhandensein eine Dosis Narkose nachinjiziert.

### 3.3.2 Blutentnahme und Euthanasie

Die Blutentnahme erfolgte terminal in tiefer MMF-Narkose. Hierzu wurde zunächst mit einer Schere die Haut auf dem Brustkorb entfernt. Anschließend wurde eine 26 G-Kanüle (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) mit einer angesteckten 2 ml (BD Discardit™ I, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) Spritze in den 2. Zwischenrippenraum im 90° Winkel unter Aspiration eingeführt bis zu einer Tiefe in der Blut aspiriert wurde. Insgesamt wurde so ca. 1 ml aspiriert. Der Konus der Spritze wurde zuvor mit einem PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich®, Steinheim D8537-500ml) / Heparin (Heparin-Natrium-250 000-ratiopharm®) Gemisch (9:1) benetzt.

Zur Euthanasie wurde nach der Blutentnahme der Thorax der Tiere unter tiefer Narkose mit einer Schere eröffnet. Nach Entfernung des rechten Vorhofs zur Ermöglichung eines Ablaufs wurde der linke Ventrikel mit 10ml PBS / Heparin (9:1) perfundiert.

### 3.3.3 Organentnahme

Es wurden das Herz, die gesamte Aorta, die Arteria Brachiocephalica, die Milz, der Femur und die Tibia entnommen. Um die Aorta intakt zu entnehmen, wurde sie ausschließlich an der Adventitia gefasst.

### 3.3.4 Bestimmung der absoluten Leukozytenzahlen im Blut

Um die Gesamtleukozytenzahlen zu ermitteln, wurden 70 µl Vollblut verwendet. Hierfür wurde ein IDEXX ProCyte DX cell counter Gerät verwendet.

### 3.3.5 Durchflusszytometrie des Bluts, der Milz und des Knochenmarks

Zur näheren Analyse der Leukozytenpopulationen wurden das Blut, das Knochenmark und die Milz näher charakterisiert. Hierfür wurden ein Femur und eine Tibia mit PBS perfundiert und durch ein Sieb mit der Porengröße 40 µm (Corning® 40µm Cell Strainer) gefiltert. Die Milzen wurden halbiert, durch ein 40 µm Sieb gedrückt und so in eine Einzelzellsuspension gebracht. Die Einzelzellsuspensionen aus Knochenmark und Milz wurden zunächst bei 370 g für 7 Minuten mit einer Zentrifuge 5810/5810 R (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss abpipettiert. Die Zellpellets von Milz und Knochenmark bzw. 200 µl Vollblut wurden zur Lyse der Erythrozyten (Erylyse) mit 3 ml hypotonem Ammonium-Chlorid-Kalium Lysepuffer (aus 10x konzentrierter Stock-Lösung zu 1x Lösung verdünnt: 45 ml Reinstwasser mit 5 ml Stock Lösung) behandelt. Nach 5 Minuten wurde die Erylyse mit weiteren 7 ml PBS gestoppt. Anschließend erfolgte erneut ein Waschschrift bei dem bei 370 g für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut abpipettiert wurde. Das Blut wurde mit einem weiteren Erylyseschritt behandelt.

Tabelle 19: Herstellung Ammonium-Chlorid-Kalium Lysepuffer Stock Lösung (10x konzentriert)

Reagens	Katalognummer	Konzentration	Volumen / Menge
Ammonium Chloride (NH <sub>4</sub> Cl) 1,5 mol/l	#09718-250G Sigma		20 g
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Appllichem #A2375,0500		2,5 g
Ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA)	Sigma 03690	0,5 mol/l	5 ml
Reinstwasser			250 ml

Die Zellpellets wurden mit 1 µl Fc-Rezeptorblocker (CD16/32, FcR III/II, 93, eBioscience) auf 49 µl PBS mit 0,5% BSA (Albumin Fraction V ≥98 %, powdered, CARL ROTH®) resuspendiert und für 10 Minuten in einer 96-Well Platte (Falcon® 96-well Clear Flat Bottom Not Treated Cell Culture Microplate) inkubiert. Dies erfolgte, um Fc-Rezeptoren beispielsweise auf Makrophagen zu blockieren und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden 50 µl eines Antikörper-Mix auf die einzelnen Proben pipettiert. Der Antikörpermix bestand aus 45 µl PBS mit 0,5% BSA und jeweils 1 µl Antikörper: CD115 (AFS98, BioLegend,), CD3e (145-2C11, BD Pharmingen,), Ly6G (1A8, BioLegend), CD45.2 (104, BD Pharmingen), CD45R (Life Technologies, RA3-6B2). Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten, anschließend erfolgte ein Waschschrift bei 370 g für 7 Minuten. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellpellets in 500 µl PBS mit 0,5% BSA resuspendiert. Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei +4°C (Zentrifugation) durchgeführt. Zur Kompensation der unterschiedlichen Fluorochrome wurden Beads verwendet. Hierbei wurden entsprechend der Herkunft der genannten Antikörper sowohl BD™ CompBeads Anti-Maus Ig, κ, als auch Anti-Rat/Hamster Ig, κ verwendet. Als Negativkontrolle wurden BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control verwendet. Es wurde jeweils ein Tropfen der entsprechenden Positivkontrolle (Anti-Rat/Hamster bei Anti-CD115, -CD3e, -Ly6G und -CD45R bzw. Anti-Mouse bei Anti-CD45.2) und ein Tropfen der Negativkontrolle mit 200 µl PBS mit 0,5% BSA vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 2000 g für 15 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und die Pellets in 200 µl PBS mit 0,5% BSA resuspendiert.

Die Durchflusszytometrie inklusive der Kompensation erfolgte im direkten Anschluss mit einem BD LSR Fortessa cell analyser, die Datenauswertung der bereits kompensierten Daten mit FlowJo V10.

### 3.3.6 Verarbeitung der Aorta zur Einzelzellsuspension

Die Aorten wurden im Ganzen in den Enzym-Mix 1 gebracht, in dem sie für 10 Minuten bei 37°C und 400 rpm auf einem Schüttelinkubator (Eppendorf ThermoMixer® C) inkubiert wurden.

Tabelle 20: Enzym-Mix 1 Aortenverdau

Reagens	Katalognummer	Konzentration	Volumen
Collagenase XI	Sigma-Aldrich C7657	12000 U/ml	250 µl
DNase I	Sigma-Aldrich D4527	2478 U/ml	60 µl
Collagenase I	Sigma-Aldrich C0130	1250 U/ml	900 µl
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich H3506	5000 U/ ml	30 µl
PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Merck L1815	1x	260 µl
<i>Gesamt</i>			<i>1.5 ml</i>

Im Anschluss wurden die Aorten in calcium- und magnesiumfreiem PBS auf Eis gelegt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Es wurde die Tunica Adventitia vom Rest der Aorta (Tunica Media und Tunica Intima) abgezogen. Die Aorta ohne Tunica Adventitia wurde im Anschluss in Enzym-Mix 2 für 40 Minuten im Schüttelinkubator bei 37°C und 400 rpm inkubiert.

Tabelle 21: Enzym-Mix 2 Aortenverdau

Reagens	Katalognummer	Konzentration	Volumen
Collagenase II	Worthington Biochemical LS004174	6200 U/ml	190 µl
Elastase	Worthington Biochemical LS002292	85 U/ml	60 µl

PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Merck L1815	1x	1750 µl
<i>Gesamt</i>			<i>2.0 ml</i>

Im Anschluss wurden die Aorten zusammen mit dem Enzymmix durch ein 70 µm Sieb gedrückt. Hierbei wurde das Sieb gleichzeitig mit 5 ml eiskaltem PBS ohne Magnesium und Calcium gespült, um möglichst viele Zellen aus dem Sieb zu lösen und die Enzymreaktion zu stoppen. Um die Zellen zu isolieren erfolgte im Anschluss ein Zentrifugationsschritt bei +4°C, 370g für 7 Minuten. Zur weiteren Analyse und Sortierung der Zellen mittels FACS wurde der Überstand anschließend abpipettiert, das Zellpellet wurde in 500 µl PBS mit 0,5% BSA gelöst. Zur Analyse der Chemokinexpressionsprofile der gesamten Tunica Media und Intima mittels RT-PCR wurden die Zellpellets ohne vorheriges FACS-Sortierung in 350 µl Qiagen RLT Lyse-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol (entsprechend 143mM) (Sigma M6250) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 3.3.7 FACS-Sortierung der Aorta

Vor der Analyse wurden 0,5 µl SYTOX™ Dead Cell Stain Blue (S34862, Invitrogen) zu der genannten Zellsuspension hinzugefügt, um tote Zellen nicht in die Analyse bzw. ins Cell Sorting aufzunehmen. Die Zell-Analyse und das Cell Sorting wurden mit einem Beckman Coulter Astrios Cell Sorter entsprechend der unten angegebenen Strategie durchgeführt. Die FACS-Sortierung der NG2<sup>+</sup> Zellen erfolgte in 200 µl Qiagen RLT Lyse-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol. Das Zell-Lysat wurde zur Lagerung bei -80°C gefroren. Die Auswertung und Darstellung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit FlowJo V10.

### 3.3.8 RNA-Isolation, cDNA Synthese und RT-PCR

RNA von FACS-sortierten NG2<sup>+</sup> wandständigen Zell-Lysat bzw. vom Zell-Lysat der gesamten aortalen Tunica Intima und Media wurde je nach erhaltener Zellmenge mittels RNeasy Mikro (74004) bzw. Mini Kits (74106) von Qiagen isoliert. Die Extraktionsschritte erfolgten entsprechend der Hersteller-Angaben. Die Reinheit und die RNA Konzentration der isolierten RNA wurden mit einem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) (OD260/OD280) durchgeführt. Die RNA Proben wurden bei -80° gelagert.

Zur cDNA Synthese wurde das High Capacity cDNA synthesis kit (Applied Biosystems) entsprechend der Hersteller-Angaben mit dem Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) verwendet.

Für die quantitative RT-PCR wurden 2 µl cDNA, 6 µl Nuklease-freies Wasser, 10 µl 2x SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix mit den entsprechenden Primern in eine 96-well Platte pipettiert. Die PCR bzw. die quantitative Analyse erfolgte mit einem MyiQ real time cyler (Biorad) Gerät. Hierfür wurde folgendes Programm verwendet:

Tabelle 22: Zyklen und Annealing Temperaturen RT-PCR

**95°C für 3 min**

<b>95° C für 15 sec</b>	} 45 Zyklen
<b>65°C für 15 sec</b>	
<b>72°C für 15 sec</b>	

**4°C Lagerung**

Um die Spezifität der Primer sicherzustellen und die PCR Produkte zu analysieren, wurde am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.  $C_T$  Werte wurden mittels vergleichender  $C_T$  Methode ermittelt. Die Gen-Expressionslevel wurden auf  $\beta$ -Actin,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, 18S RNA oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase normalisiert.

### 3.3.9 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenz ist eine klassische Methodik zur Visualisierung spezifischer Strukturen in intaktem Gewebe. Mittels primärer Antikörper aus unterschiedlichen Spezies werden entsprechende murine Proteine markiert. Nach einem Waschschrift ermöglicht die Hinzugabe sekundärer Antikörper, die mit Fluorochromen konjugiert sind, die Markierung und somit indirekt die Visualisierung der Zielproteine. Mittels Epifluoreszenz- oder Konfokal-Mikroskopie kann man die Fluorochrome mit spezifischen Exzitationswellenlängen anregen. Die Fluorochrome emittieren Licht in definierten Wellenlängenbereichen, die sich mit den genannten Mikroskopiemethoden visualisieren lassen [263].

Alle Organe wurden zur Fixierung vor der Kryokonservierung für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd eingelegt. Im Anschluss wurden sie kurz mit PBS abgewaschen, über Nacht in 30% Sukrose (s9378, Sigma-Aldrich) eingelegt und bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurden sie in



OCT cryo tissue embedding compound (Sakura) eingelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur Lagerung eingefroren.  $10\ \mu\text{m}$  Kryoschnitte wurden mit einem CryoStar NX70 Kryostat; ThermoFisher Scientific Kryotom angefertigt. An der Aortenklappe wurden mindestens 3 Schnitte pro Maus analysiert. Die Brachiocephal-Arterie wurde an 3 verschiedenen Lokalisationen (proximal, intermediär und distal vom Abgang aus dem Aortenbogen) analysiert. Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem gleichen Protokoll (mit entsprechend abgeänderten primären und sekundären Antikörpern) durchgeführt:

Tabelle 23: Immunfluoreszenz Protokolle

Inkubationszeit	Reagens	Durchführung
15 Min	4% methylenfreies Paraformaldehyd	200 µl / Objektträger
3 x 5 Min	PBS-Tween (100 ml 10x PBS Konzentrat (gibco phosphate buffered saline 70011-036), 900 ml Millipore dest. Wasser und 1ml Tween 20 (Sigma P1379))	Waschschritt: Einbringen der Präparate in eine PBS-Tween gefüllte Küvette, Positionierung auf Schwenkinkubator, dreimaliger Wechsel der PBS-Tween Flüssigkeit im Abstand von 5 Minuten
Zwischenschritt	Dako Pen, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark	Umrahmung der Objektträger mittels Dako Pen Fettstift, um Flüssigkeiten auf dem Präparat zu halten
1h	<b>Stock-Lösung:</b> 50 ml PBS (Sigma-Aldrich®, Steinheim D8537-500ml) + 0,5 g Bovines Serumalbumin (Roth 8076.4) + 0,25 g Saponin (Roth 4185.1) (5 Minuten mit Rührfisch gemischt, anschließend gefiltert) <b>Block-Lösung:</b> 4,5 ml Stock-Lösung + 0,5 ml Goat-Serum	Blockschritt: Zur Unterdrückung unspezifischer Antikörperbindung werden 200 µl / Objektträger Goat-Serum Mix auf die Präparate pipettiert
Über Nacht 4°C	Primärer Antikörper / Block-Lösung: Primärer Antikörper in entsprechender Konzentration* in Block-Lösung	Abklopfen der Blocklösung, Pipettieren von 200 µl / Objektträger primärer Antikörper / Block-Lösung auf die Präparate
3 x 5 Min	PBS-Tween (100 ml 10x PBS Konzentrat, 900 ml Millipore dest. Wasser und 1ml Tween 20)	Waschschritt: Einbringen der Präparate in eine PBS-Tween gefüllte Küvette, Positionierung auf Schwenkinkubator, dreimaliger Wechsel der PBS-Tween Flüssigkeit
1h	Sekundärer Antikörper / Stock-Lösung: sekundärer Antikörper in entsprechender Konzentration* in Stock-Lösung (ohne Goat Serum) + Hoechst (InVitrogen Hoechst 33342, H3570) (Konzentration 1:1000)	Abklopfen der Blocklösung, Pipettieren von 200 µl / Objektträger sekundärer Antikörper / Stock-Lösung auf die Präparate
3 x 5 Min	PBS-Tween (100 ml 10x PBS Konzentrat, 900 ml Millipore dest. Wasser und 1ml Tween 20)	Waschschritt: Einbringen der Präparate in eine PBS-Tween gefüllte Küvette, Positionierung auf Schwenkinkubator, dreimaliger Wechsel der PBS-Tween Flüssigkeit
Endschritt	Dako Fluorescence Mounting Medium (GM304)	"Mounten" und Bestückung der Präparate mit Deckglas
Lagerung	Lagerung	Lagerung bei +4°C

\* Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 24 angegeben

Tabelle 24: Zusammenfassung der Antikörper

Primärer Antikörper *	Bestellnummer	Verdünnung (vergleichende Fragestellungen nur aus denselben Antikörper-Lieferungen)	Sek. Antikörper	Bestellnummer	Konz.
Ratte (IgG2a) gegen Maus LGALS3 (Klon M3/38)	CL8942AP, Cedarlane	1:200	Cy5-Ziege gegen Ratte IgG	Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) (#112-175-143, Jackson ImmunoResearch)	1:200
Maus (IgG2a) gegen Maus ACTA2-FITC konjugiert (Klon 1A4)	F3777, Sigma	1:400	-	-	-
Kaninchen (IgG) gegen Maus PDGFR $\beta$ (Klon Y92)	ab32570, abcam	1:100	Cy5-Ziege gegen Kaninchen IgG	Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-175-144, Jackson ImmunoResearch)	1:200
Kaninchen (IgG) gegen Mensch/ Maus Myeloperoxidase	A0398, DAKO	1:300	Cy5-Ziege gegen Kaninchen IgG	Cy5-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (#111-175-144, Jackson ImmunoResearch)	1:200

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axio imager microscope mit AxioCam ab fotografiert und mit FIJI mittels Colour Thresholding ausgewertet. Konfokale Bilder wurden mit einem Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 880 mit Airyscan Modul angefertigt. Konfokal erhaltene Z-Stack Bilder wurden mittels Bitplane Imaris Software (Version 8.4.1) zu 3D Bildern rekonstruiert.

### 3.3.10 Oil Red-Färbung

Zur Quantifizierung der Lipidfläche in atherosklerotischen Plaques auf Klappenebene wurden die Schnitte zunächst 5 Minuten mit PBS inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger 10x in 60% 2-Propanol getunkt. Nach 15 minütiger Inkubation in Oil Red (Sigma O1391 Oil-red-O solution) wurde das überschüssige Oil Red mittels erneutem zehnmaligen Eintauchen in 2-Propanol abgewaschen. Nach einem 5-minütigem weiteren Waschschrift mit Leitungswasser erfolgte eine Gegenfärbung mit 1:1 Mayer's Hämalau Lösung (T865.2, Roth) für 30 Sekunden. Nach einem letzten Waschschrift mit Leitungswasser wurden die Präparate in Dako Fluorescence Mounting Medium (GM304) eingebettet und mit einem Deckglas bestückt. Die Schnitte wurden mit einem Leica DM6B Mikroskop ab fotografiert, die Auswertung erfolgte mit FIJI mittels Colour Thresholding.

### 3.3.11 En face Sudan III Färbung der Aorta

Der Aortenbogen mit Aorta Ascendens und Descendens wurden über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (MicroCos GmbH, Deutschland) belassen. Am nächsten Tag wurden die Aorten zunächst für 2 Minuten in Reinstwasser gewaschen, anschließend für 3 Minuten in 75% Ethanol (64-17-5) gelegt und im Anschluss für 30 Minuten in Sudan III (Sudan III, C.I. 26100 Merck) Lösung inkubiert. Ein weiterer Waschschrift erfolgte für 2 Minuten in Reinstwasser.

Um die Plaque Größe adäquat beurteilen zu können wurde im Anschluss das Fettgewebe der Tunica Adventitia mittels Pinzetten unter einem Zeiss Stereomikroskop (ZEISS Stemi 2000) entfernt. Nach Entfernung des Fettgewebes wurden die Aorten mit Reinstwasser auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckglas versehen. Die Aorten wurden mit einer Canon Powershot G5 Kamera mit einer 1,6x Vergrößerung am Stereomikroskop ab fotografiert. Die Bilder wurden verblindet mit Zeiss AxioVision ausgewertet. Hierbei wurde die Sudan<sup>+</sup> Fläche durch die gesamte aortale Fläche auf dem Bild geteilt, um die relative Plaque Fläche zu bestimmen.

### 3.3.12 ELISA auf Cholesterin, CCL2 und MIF

CCL2, MIF und Cholesterin-ELISAs wurden mit heparinisierendem Blut-Plasma durchgeführt. Zur Gewinnung von Blut-Plasma wurde das frisch abgenommene, heparinisierte Vollblut (wie bereits unter Blutentnahme und Euthanasie beschrieben) bei 2000 g für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -80°C weggefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben

entsprechend der Herstellerangaben zum CCL2 (IBL international, BE45241), MIF (BioLegend, #444107) und Cholesterin (abcam, ab65390) ELISA durchgeführt. Die OD wurde entsprechend der vom Hersteller angegebenen Wellenlängen gemessen. Im Anschluss erfolgte die fotometrische Quantifizierung der Analyte entsprechend der vom Hersteller angegebenen Filterwellenlängen.

### 3.3.13 Ermittlung des Körpergewichts der Mäuse

Das Körpergewicht der Mäuse wurde mittels einer Maus cs200 Waage vor Euthanasie ermittelt, um systemische Effekte der Transgene auf das Gewicht auszuschließen.

### 3.3.14 Statistik

Die statistische Analyse und die Erstellung der Graphen wurden mittels Graph Pad Prism 5 bzw. mittels SigmaPlot durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung durchgeführt. Bei normalverteilten Daten wurde der zweiseitige t-Test mit unverbundenen Stichproben, bei nicht-parametrischen Daten der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz durchgeführt. Zur Ermittlung der Plaque-Größe in der Arteria Brachiocephalicae wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung verwendet.

Die Erstellung der Abbildungen aus den Graphen erfolgte mittels Adobe Illustrator CS5.

### **3.4 In vivo 2-Photonen Mikroskopie der Arteria Carotis Communis**

#### **3.4.1 Präparation der Arteria Carotis Communis**

Für die Operation wurden die Tiere zunächst mittels der unter 3.3.1 beschriebenen Narkose anästhesiert. Die tiefe der Narkose wurde regelmäßig mittels Zwischenzehenreflex überprüft. Während der Operation wurde die Narkose alle 35 Minuten intraperitoneal nachinjiziert.

Die Tiere wurden in tiefer Narkose auf einer entsprechend angefertigten Vorrichtung mittels Klebeband (Transpore TM, 3M Health Care, Neuss) an den Extremitäten fixiert. Mittels Enthaarungscreme (Katalognummer 8218535 Vet RB Healthcare) wurden die Tiere enthaart. Die Tiere wurden unter ein Stereomikroskop gelegt (ZEISS Stemi 2000) und mit einer Kaltlichtquelle beleuchtet (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Carl-Zeiss AG, Jena). Anschließend wurde nach Testung des Zwischenzehenreflexes ein medianer Halsschnitt durchgeführt und die Arteria Carotis Communis unter dem Musculus Sternocleidomastoideus freipräpariert. Zur Verbesserung der Sicht wurden die Speicheldrüsen (Glandulae Submandibularis und Sublingualis) mittels Fäden (Prolene, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) zur Seite gezogen und mittels Klebeband fixiert. Anschließend wurde übermäßiges Fett- oder Bindegewebe um die Arteria Carotis Communis vorsichtig entfernt, um eine bessere Penetration des Lasers in das Gefäß zu ermöglichen und die intravasalen Strukturen ausreichend darstellen zu können. Ein spezifisch für diese Anwendung angefertigtes Glasfenster wurde mittels einer Drahtkonstruktion an die Arteria Carotis Communis gelegt, um eine stabile mikroskopische Analyse der Gefäßwand zu ermöglichen, ohne den Blutfluss zu unterdrücken. Um die Atembewegungen zu standardisieren wurde die Maus außerdem intubiert. Hierzu wurde die Trachea eingeschnitten und mittels einer Beatmungskanüle sondiert, die mit einem Beatmungsgerät verbunden war (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik). Die Kanüle wurde mittels 2 separaten Fäden (Prolene, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) in der Trachea fixiert. Im Anschluss wurde die Maus kontrolliert beatmet.

#### **3.4.2 2-Photonen Mikroskopie der Gefäßwand**

Das verwendete 2-Photonenmikroskop war ein LaVision Trioscope 2 Mikroskop mit einem Chameleon Coherent Ultra 2 laser. Um intravitale Aufnahmen der Arteria Carotis Communis zu generieren, wurde auf das Glasfenster Sonosid Ultrasound Gel gegeben. Die Arteria Carotis Communis wurde unter dem 2-Photonenmikroskop zunächst mit Fluoreszenzdarstellung im GFP Kanal als stark autofluoreszierende und pulsierende Struktur identifiziert. Atherosklerotische

Plaques wurden im Vorhinein unter dem Zeiss Stereomikroskop als weißlich durchscheinende Strukturen im Gefäß identifiziert. Anschließend wurden Time-Laps Z-Stack Aufnahmen angefertigt, welche im Nachhinein mittels Bitplane Imaris Software (Version 8.4.1) zu 3 Dimensionalen Videos rekonstruiert wurden. Die nähere Analyse des Zell-Migrationsverhaltens erfolgte mittels Bitplane Imaris Software. Zell-Zell Interaktionen wurden hierbei definiert als eindeutige, dynamische Zell-Kontakte. Der Meandering Index wurde als Maß für die Geradlinigkeit der Migration einer Zelle genutzt. Er wird folgendermaßen berechnet: Vektoriell zurückgelegte Distanz während des Abschnitts / Insgesamt zurückgelegte Strecke während des Abschnitts. Ein Wert von 1 wäre eine absolut gerade Migration, ohne Ablenkungen. Ein Wert von 0 wäre eine Migration im Kreis.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 NG2<sup>+</sup> Zellen exprimieren ACTA2 und PDGFR $\beta$ und dedifferenzieren im Verlauf der Atherogenese

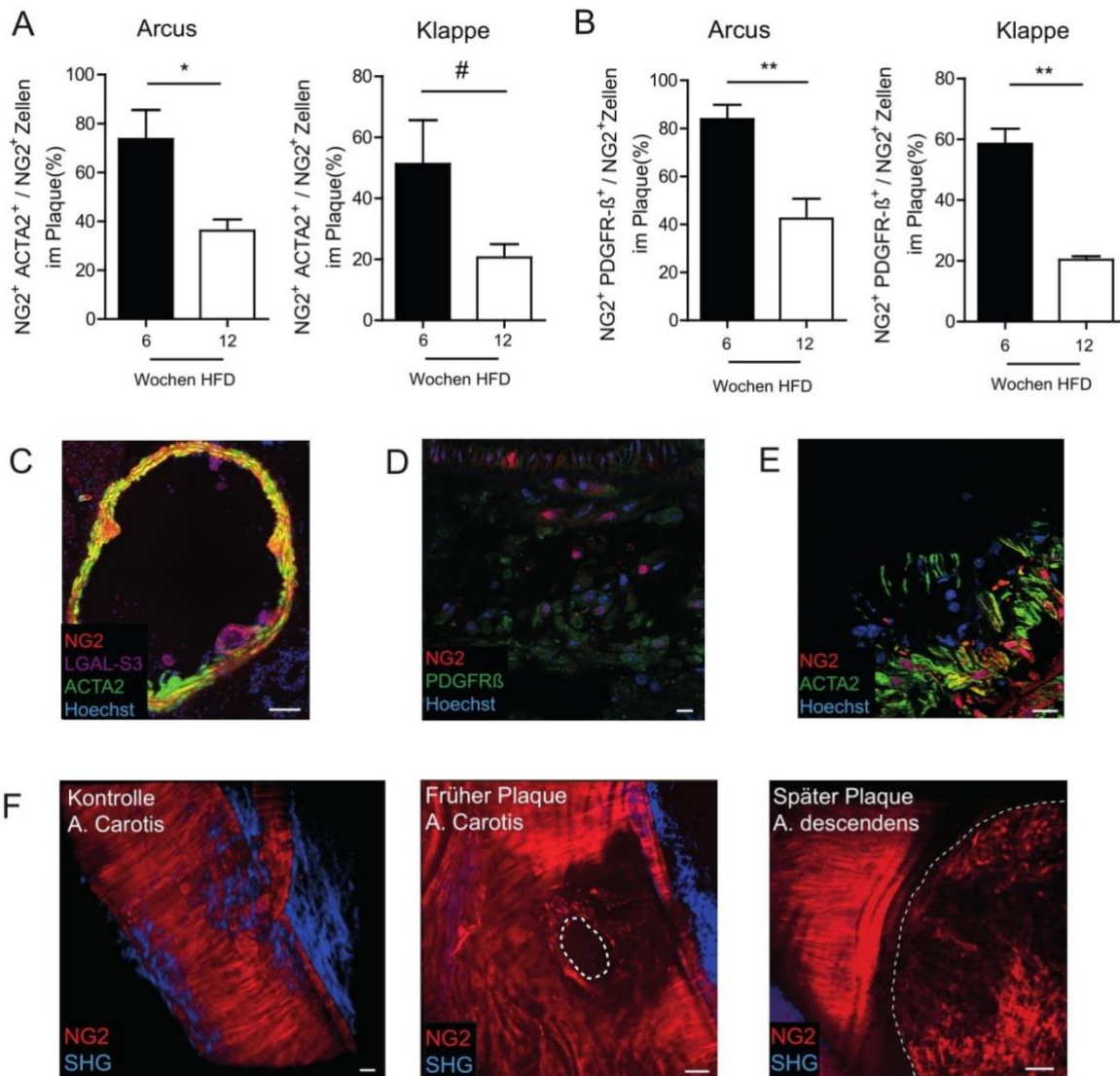
Die Arbeitsgruppe hat in früheren Publikationen Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen und myeloiden Leukozyten in der Mikrozirkulation identifizieren können. In dieser Arbeit zur Atherosklerose in der Makrozirkulation wurde NG2 zur Markierung wandständiger Zellen in größeren Gefäßen zunächst charakterisiert und zur Markierung von SMCs verwendet.

Um die Veränderungen NG2<sup>+</sup> Zellen in der Atherogenese analysieren zu können, wurde zunächst die Markerexpression von NG2<sup>+</sup> Zellen in verschiedenen Stadien der Plaque Progression und unterschiedlichen Lokalisationen im Gefäßsystem von Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. NG2<sup>+</sup> Zellen im frühen Plaque (nach 6 Wochen High Fat Diet (HFD)) exprimierten im Arcus Aortae zu ca. 74% ACTA2 und auf Klappenebene zu ca. 51%. Nach 12 Wochen HFD kam es zu einer signifikanten Abnahme der ACTA2 Expression der NG2<sup>+</sup> Zellen auf Arcus-Ebene auf ca. 36% und zu einer nicht signifikanten Abnahme auf 21% in Plaques der Aortenklappe (Abbildung 5A). Zu ähnlichen Veränderungen kam es in der PDGFR $\beta$  Expression der NG2<sup>+</sup> Zellen im Verlauf der Atherogenese. In frühen atherosklerotischen Plaques exprimierten ca. 84% der NG2<sup>+</sup> Zellen PDGFR $\beta$  auf Arcus-Ebene und 59% auf Klappenebene. Es kam auch hier zu einer signifikanten Abnahme der PDGFR $\beta$  Expression von NG2<sup>+</sup> Zellen nach 12 Wochen HFD (in fortgeschritteneren Plaques) sowohl auf Klappen- als auch auf Arcus-Ebene. Auf Arcus-Ebene fiel die Anzahl NG2<sup>+</sup> PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> doppelpositiver Zellen relativ zu den NG2<sup>+</sup> Einzelpositiven auf 42%, auf Klappenebene auf 20% ab (Abbildung 5B). In gesunden Bereichen des Gefäßes sind NG2<sup>+</sup> Zellen in der Gefäßwand lokalisiert und exprimieren weitestgehend ACTA2 als klassischen SMC Marker (Abbildung 5C). Dies entspricht früheren Publikationen zu NG2 als SMC Marker [243-245].

Die Expression von ACTA2 scheint somit im atherosklerotischen Plaque abzunehmen, wobei es in frühen atherosklerotischen Plaques zu einer breiten Expression von PDGFR $\beta$  in NG2<sup>+</sup> Zellen kommt (Abbildung 5C, D, E).

3-Dimensional rekonstruierte 2-Photonenbilder der gesamten Aorta zeigten eine breite Markierung der Zellen in der gesunden Media, aber auch in atherosklerotischen Plaques. In frühen als auch in späten Plaques schienen NG2<sup>+</sup> SMCs eine fibröse Kappe um den Plaque herum auszubilden (Abbildung 5 F).





### Abbildung 5: Charakterisierung NG2<sup>+</sup> wandständiger Zellen in der Atherogenese

(A) Quantifizierung der NG2<sup>+</sup> ACTA2<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen relativ zur Gesamtzahl aller NG2<sup>+</sup> Zellen im Plaque nach 6 Wochen (früher Zeitpunkt der Atherogenese) und nach 12 Wochen (fortgeschrittener Zeitpunkt der Atherogenese) HFD in zwei verschiedenen Lokalisationen des arteriellen Systems (Aortenklappe und Arcus Aortae). (B) Quantifizierung der NG2<sup>+</sup> PDGFRβ<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen relativ zur Gesamtzahl aller NG2<sup>+</sup> Zellen im Plaque nach 6 Wochen (früher Zeitpunkt der Atherogenese) und nach 12 Wochen (fortgeschrittener Zeitpunkt der Atherogenese) HFD in zwei verschiedenen Lokalisationen des arteriellen Systems (C) Repräsentative Epifluoreszenz Aufnahme eines Querschnitts des Arcus Aortae einer Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 6 Wochen HFD gefärbt auf ACTA2 (grün), LGALS3 (violett) und Hoechst (blau), das endogene Ng2-DsRed Signal ist in rot dargestellt (Maßstab 100 µm). (D) Repräsentative konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques im Arcus Aortae einer Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 6 Wochen HFD gefärbt auf PDGFRβ (grün) und Hoechst (blau), das endogene Ng2-DsRed Signal ist in rot dargestellt (Maßstab 10 µm). (E) Repräsentative konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques im Arcus Aortae einer Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 6

Wochen HFD gefärbt auf ACTA2 (grün) und Hoechst (blau), das endogene Ng2-DsRed Signal ist in rot dargestellt (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ). (F) *Ex vivo* 2-Photonenmikroskopische Aufnahmen von arteriellen Gefäßen ohne Atherosklerose, mit markiertem frühem atherosklerotischem Plaque und spätem atherosklerotischem Plaque von Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen ohne HFD (Kontrolle Arteria Carotis) und nach 14 Wochen HFD (früher Plaque Arteria Carotis und später Plaque Aorta Descendens) (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ). Die Darstellungen (A) und (B) entsprechen repräsentativ n=4 biologischen Replikaten. Die Daten in den Graphen (A) und (B) sind normalverteilt, es wurde der t-Test angewandt. # markiert einen p-Wert von 0,088. \* markiert einen p-Wert von <0,05. \*\* markiert einen p-Wert von <0,01. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

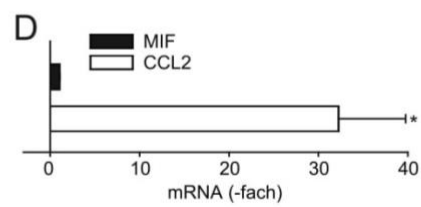
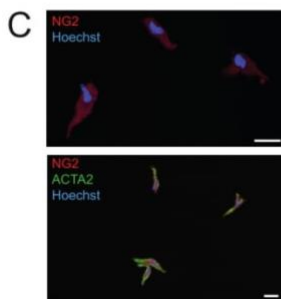
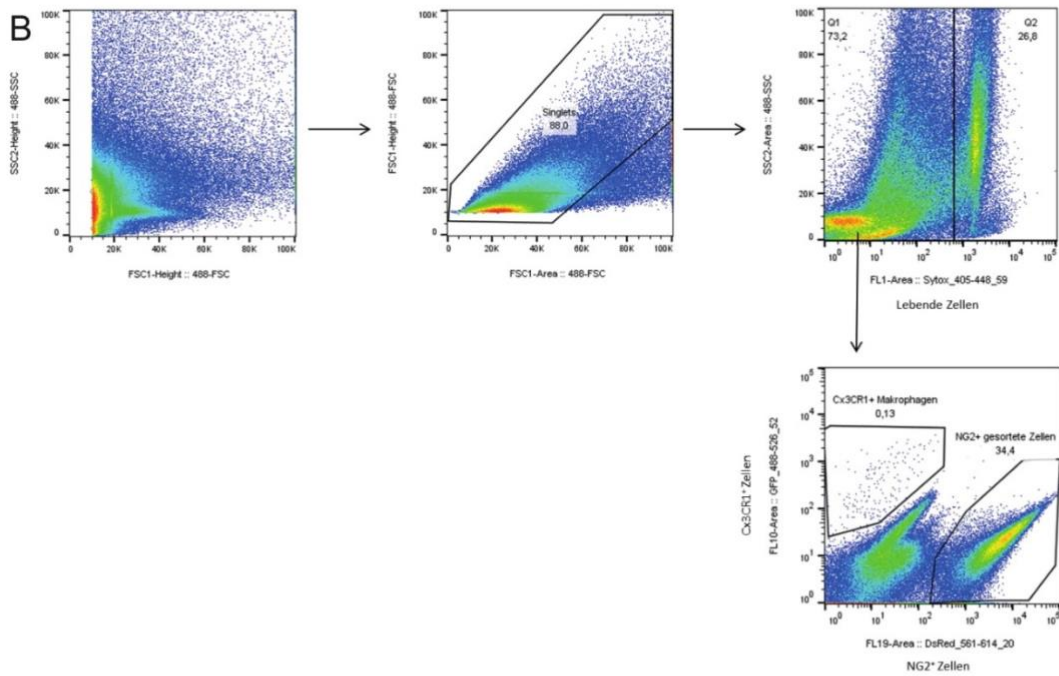
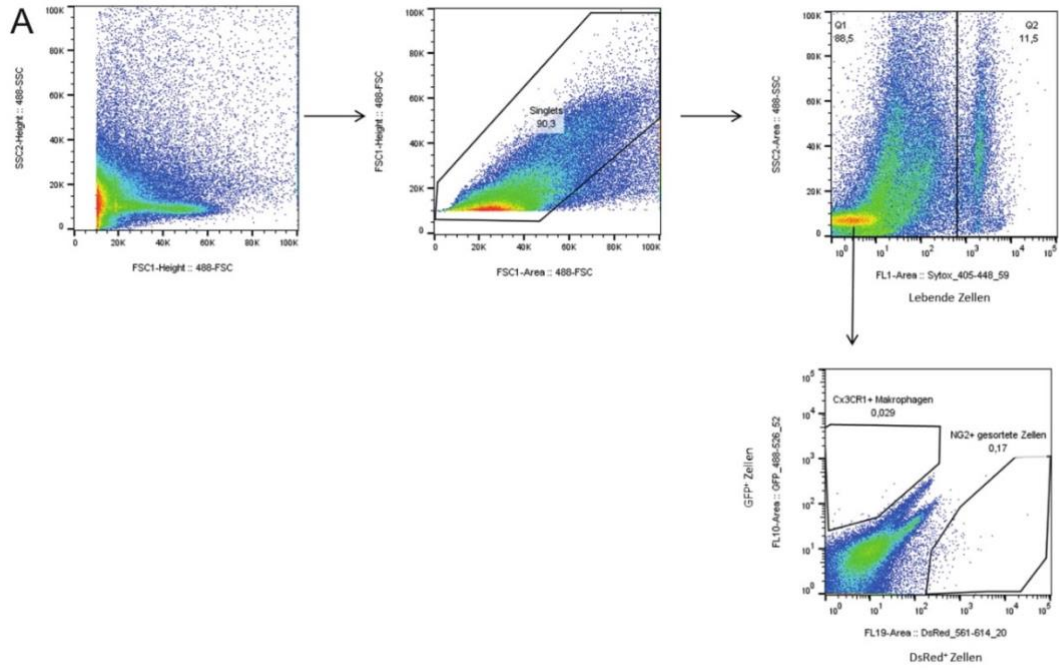
#### 4.2 NG2<sup>+</sup> Zellen regulieren im Verlauf der Atherogenese das Chemokin CCL2 hoch, die MIF Expression bleibt konstant

Um die immunologische Rolle NG2<sup>+</sup> Zellen in der Makrozirkulation während der Atherogenese näher analysieren zu können, wurden in dieser Arbeit NG2<sup>+</sup> Zellen aus Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit und ohne HFD mittels FACS-Sortierung isoliert und mittels RT-PCR näher auf die beiden in der Atherogenese besonders wichtigen Chemokine CCL2 und MIF hin untersucht.

Zur Etablierung der Methodik wurde zunächst eine ApoE<sup>-/-</sup> Maus als Negativkontrolle (Abbildung 6A) und im Anschluss eine Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Maus (Abbildung 6B) nach 6 Wochen HFD mittels FACS näher analysiert und die Gating-Strategie festgelegt. Die NG2<sup>+</sup> Zellen wurden mit der abgebildeten Gating-Strategie FACS-sortiert (Abbildung 6B). Hierbei wurde zunächst der Zellschrott mittels eines FSC Threshold von 30K ausgeschlossen. Im zweiten Schritt wurden Zell-Klumpen ausgeschlossen. Es wurde auf die lebenden Zellen gegatet (tote Zellen waren mittels Sytox Blue markiert) und abschließend wurden die NG2<sup>+</sup> und CX3CR1<sup>+</sup> Populationen dargestellt. Die Anzahl NG2<sup>+</sup>; CX3CR1<sup>+</sup> doppelpositiver Zellen in der Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Maus war hierbei äußerst gering (Abbildung 6B).

Für die Analyse der CCL2 bzw. MIF Expression von NG2<sup>+</sup> Zellen wurden Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tiere verwendet, die zum einen Teil zur Atherosklerose-Induktion für 14 Wochen HFD erhielten und zum anderen Teil auf normalem Futter belassen wurden. Die Aorten wurden entsprechend der angegebenen Gating-Strategie mittels FACS-Sortierung isoliert und im Anschluss zur weiteren Analyse mittels RT-PCR mit RLT-Puffer lysiert. Zur Qualitätskontrolle wurden die Zellen nach der FACS-Sortierung mittels Immunfluoreszenz gefärbt und durch konfokale Mikroskopie analysiert (Abbildung 6C und D). Die Zellen waren hierbei visuell intakt und nicht apoptotisch oder nekrotisch. Außerdem exprimierten die allermeisten Zellen entsprechend der sortierten Population ACTA2 und NG2.

Die anschließend durchgeführte RT-PCR der NG2<sup>+</sup> Zellen zeigte eine signifikante Zunahme der CCL2 Expression in NG2<sup>+</sup> Zellen aus Aorten von Mäusen nach 14 Wochen HFD im Vergleich zu Tieren ohne beschleunigte Atherosklerose-Induktion.



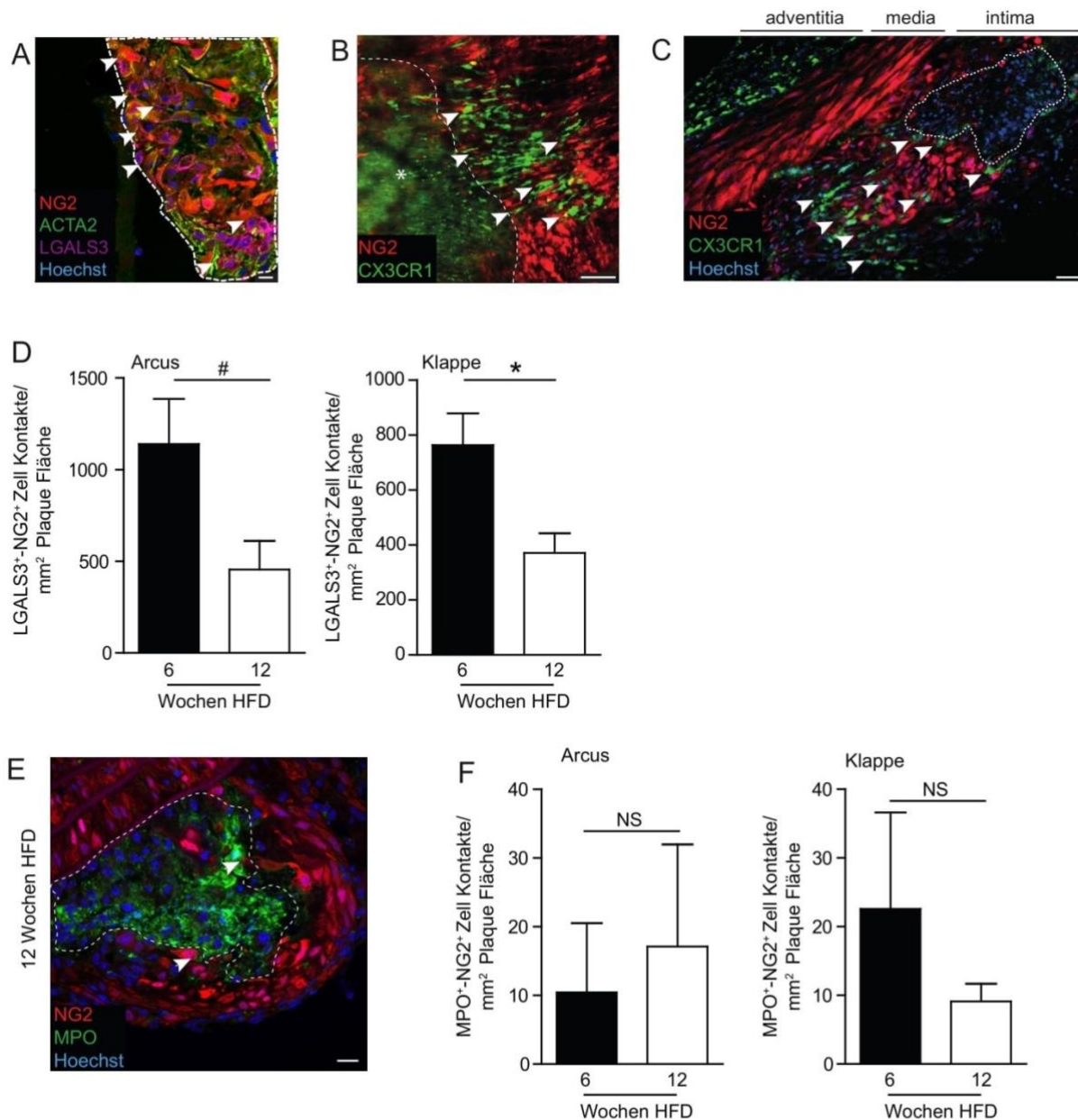
**Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie der atherosklerotischen Maus Aorten**

(A) ApoE<sup>-/-</sup> Aorta ohne Fluorochrom-Transgen als Kontrolltier zur Ermittlung einer passenden Gating-Strategie: 1. Gating auf alle Zellen ab einem FSC Threshold von 30K, 2. Singlets, 3. lebende Zellen, 4. erwartete DsRed<sup>+</sup> bzw. GFP<sup>+</sup> Zellen. (B) Beispielhafte Gating-Strategie einer Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Aorta. (C) Oben Konfokalmikroskopische Aufnahmen der mittels FACS-Sortierung isolierten NG2<sup>+</sup> Zellen (rot) und Hoechst (blau) zur Qualitätskontrolle (3-Dimensionale Rekonstruktion mittels Imaris) (Maßstab 20µm). Unten ACTA2 Färbung (grün) und Hoechst (blau) der isolierten Zellen (3-Dimensionale Rekonstruktion mittels Imaris) (Maßstab 20µm). (D) Veränderung der MIF bzw. CCL2 Expression von NG2<sup>+</sup> Zellen in Maus-Aorten nach 14 Wochen HFD Fütterung der Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit normalem Futter (n=3-4). Die Daten in dem Graphen (D) sind nicht normalverteilt, es wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. \* markiert einen p-Wert von <0,05. Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

**4.3 NG2<sup>+</sup> Zellen interagieren in verschiedenen Stadien der Atherogenese mit Zellen des angeborenen Immunsystems**

Zur Analyse des Zusammenspiels zwischen NG2<sup>+</sup> Zellen und Makrophagen bzw. neutrophilen Granulozyten wurde die Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> und die Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Linie verwendet. Immunfluoreszenzaufnahmen atherosklerotischer Plaques aus Aortenbögen von Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren zeigten eine Vielzahl an Kontakten zwischen NG2<sup>+</sup> bzw. ACTA2<sup>+</sup> Zellen mit LGALS3<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 7A). Weitere konfokale Aufnahmen von atherosklerotischen Plaques aus Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Aortenbögen bzw. Aortenklappen zeigten ebenfalls zahlreiche Zell-Zell Kontakte zwischen NG2<sup>+</sup> und CX3CR1<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 7B und C). Eine Quantifizierung der Zell-Zell Kontakte zwischen NG2<sup>+</sup> und LGALS3<sup>+</sup> Zellen auf Arcusebene ergab eine nicht-signifikante Abnahme der Kontakte nach 12 Wochen HFD (fortgeschrittene atherosklerotische Plaques) im Vergleich zu Tieren mit nur 6 Wochen HFD (frühe atherosklerotische Plaques) (Abbildung 7D). Auf Klappenebene zeigte sich eine signifikante Abnahme dieser Kontakte, was sich auf eine ausgeprägte Organisation reifer Plaques mit nicht-zellulären Bestandteilen zurückführen lässt (Abbildung 7D). Im reiferen Plaque ließen sich Zell-Zell Kontakte vor allem in den Schulterregionen und der fibrösen Kappe des Plaques nachweisen (Abbildung 7B und C).

Nicht nur LGALS3<sup>+</sup> bzw. CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen bildeten Kontakte mit NG2<sup>+</sup> Zellen, auch MPO<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten traten in engen Kontakt mit NG2<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 7E). Eine Quantifizierung dieser Kontakte ergab jedoch weder auf Ebene des Aortenbogens noch auf Ebene der Aortenklappe einen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Zell-Zell Kontakten zwischen NG2<sup>+</sup> und MPO<sup>+</sup> Zellen im Vergleich früher atherosklerotischer Plaques mit späteren atherosklerotischen Plaques (Abbildung 7F).



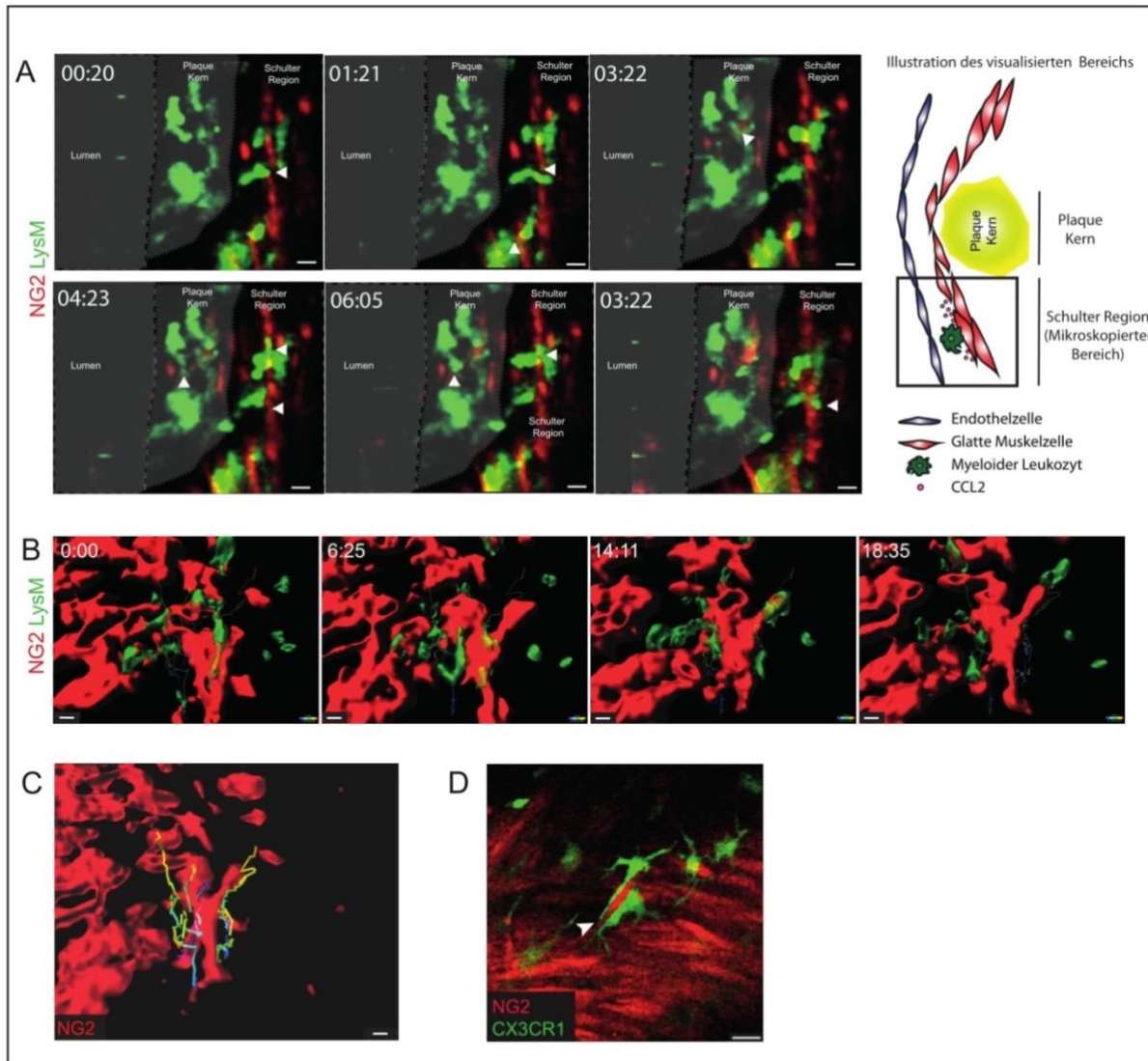
### Abbildung 7: Zell-Zell Kontakte zwischen NG2<sup>+</sup> Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems

(A) Beispielhafte konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques aus dem Aortenbogen einer Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 6 Wochen HFD, gefärbt auf ACTA2 (grüne), LGALS3 (violett) und Hoechst (blau), das endogene Ng2-DsRed Signal ist rot; Pfeile deuten auf Zell-Zell Kontakte zwischen LGALS3<sup>+</sup> und NG2<sup>+</sup> Zellen, gestrichelte Linie markiert den Plaque (Maßstab 10µm). (B) Beispielhafte konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques in einem whole-mount Aortenbogen einer Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 12 Wochen HFD, Stern und gestrichelte Linie markieren den nekrotischen Kern des Plaques, Pfeile zeigen auf SMC-Makrophagen Kontakte in der Schulterregion des Plaques, NG2 ist in rot, CX3CR1 in grün dargestellt (Maßstab 50 µm). (C) Repräsentative konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques der Aortenklappe einer Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup>

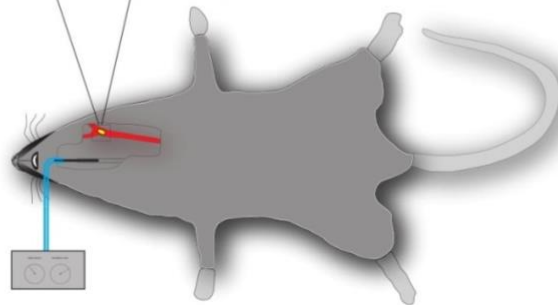
Maus, Pfeile deuten auf SMC-Makrophagen Kontakte in der Schulterregion, gestrichelte Linie markiert den Kern des Plaques, NG2 ist in rot, CX3CR1 ist in grün und Hoechst ist in blau dargestellt (Maßstab 40  $\mu\text{m}$ ). (D) Quantifizierung der Anzahl an Zell-Kontakten zwischen NG2<sup>+</sup> und LGALS3<sup>+</sup> Zellen in Plaques innerhalb des Arcus und der Aortenklappe nach 6 Wochen und nach 12 Wochen HFD. (E) Beispielhafte konfokale Aufnahme eines atherosklerotischen Plaques des Aortenbogens einer Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Maus nach 6 Wochen HFD, gefärbt auf MPO (grün) und Hoechst (blau), das endogene Ng2-DsRed Signal ist in rot dargestellt. Pfeile deuten auf Zell-Zell Kontakte zwischen MPO<sup>+</sup> und NG2<sup>+</sup> Zellen, gestrichelte Linie markiert den Kern des Plaques (Maßstab 15  $\mu\text{m}$ ). (F) Quantifizierung der Anzahl an Zell-Kontakten zwischen NG2<sup>+</sup> und MPO<sup>+</sup> Zellen in Plaques innerhalb des Arcus und der Aortenklappe nach 6 Wochen und nach 12 Wochen HFD. Die quantitativen Analysen entsprechen n=4 biologischen Replikaten pro Gruppe. Die Daten in den Graphen (D) und (F) sind Normalverteilt, es wurde der t-Test angewandt. \* markiert einen p-Wert von <0,05. # markiert einen p-Wert von 0,057. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

#### 4.4 NG2<sup>+</sup> Zellen interagieren in atherosklerotischen Plaques mit CX3CR1<sup>+</sup> und LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten *in vivo*

Nach 14 Wochen HFD wurden in Ng2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> und Ng2-DsRed; CX3CR1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mittels intravitale 2-Photonenmikroskopie atherosklerotischer Plaques der Arteria Carotis enge Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> SMCs und LysM<sup>+</sup> bzw. CX3CR1<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten visualisiert (Abbildung 8). Obwohl Atherosklerose eine chronisch entzündliche Erkrankung ist, waren sogar in 20-minütigen intravitalemikroskopischen Aufnahmen von atherosklerotischen Plaques lebhaft Interaktionen zwischen LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten und NG2<sup>+</sup> SMCs nachweisbar (Abbildung 8A). Qualitative Darstellungen der Migrationswege LysM<sup>+</sup> myeloider Leukozyten zeigen, dass myeloide Leukozyten entlang NG2<sup>+</sup> SMCs migrieren und diese teilweise als Leitstrukturen nutzen (Abbildung 8B, C). Zusätzlich zu LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten bildeten auch CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen in atherosklerotischen Plaques *in vivo* enge Kontakte zu NG2<sup>+</sup> SMCs aus (Abbildung 8D).



Intravitale 2-P Mikroskopie der  
Arteria Carotis Communis



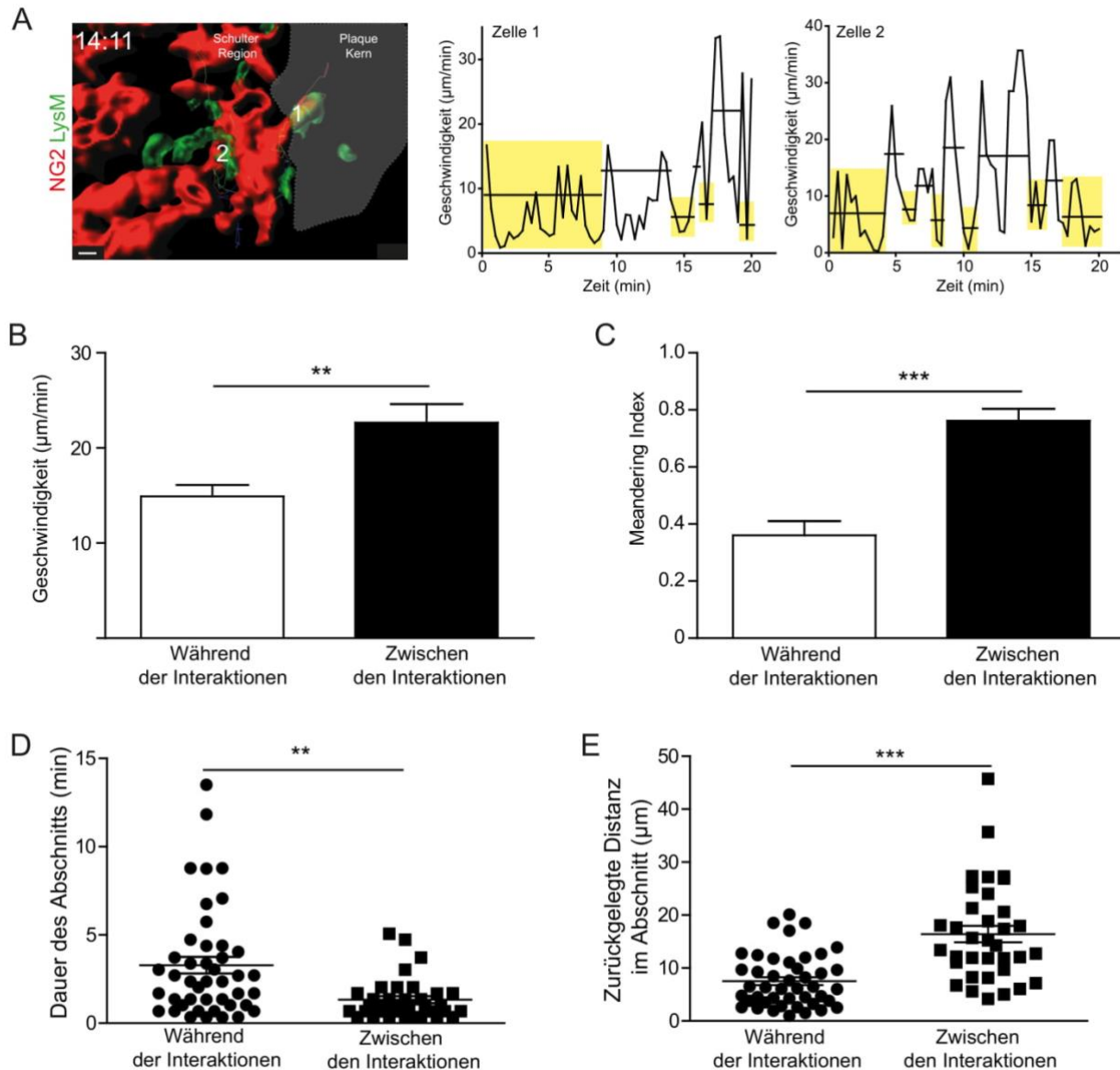
### Abbildung 8: NG2<sup>+</sup> SMCs interagieren *in vivo* in atherosklerotischen Plaques der Arteria Carotis mit myeloiden Leukozyten

(A) Links: *In vivo* Darstellung von engen Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> SMCs (rot) und LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten (grün) in intravitalem 2-Photonenmikroskopischen Aufnahmen atherosklerotischer Plaques der Arteria Carotis in Ng2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD, Pfeile deuten auf

Interaktionen; Lumen, Plaque Kern und Schulterregion sind markiert (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ , Zeitangabe in Minuten). Rechts: Illustration des visualisierten Bereichs des atherosklerotischen Plaques (B) *In vivo* Darstellung von engen Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> SMCs (rot) und LysM<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten (grün) in 3-dimensional rekonstruierten und gerenderten intravitalem 2-photonenmikroskopischen Aufnahmen atherosklerotischer Plaques der Arteria Carotis in Ng2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD, Migrationswege der Zellen sind mittels Migrationsbalken markiert; (Maßstab 10  $\mu\text{m}$ , Zeitangabe in Minuten). (C) Darstellung der Migrationswege in einem 3-dimensional rekonstruierten und gerenderten 2-photonenmikroskopischen Video, NG2<sup>+</sup> SMCs sind in rot (Maßstab 10  $\mu\text{m}$ ). (D) Intravitalmikroskopische 2-Photonen Aufnahme enger Zell-Zell Kontakte zwischen einer NG2<sup>+</sup> SMC (rot) und zwei CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen (grün) in einem atherosklerotischen Plaque der Arteria Carotis Communis in einer Ng2-DsRed; Cx3cr1-GFP; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD, Pfeil deutet auf Zell-Zell Kontakt (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ ).

Eine nähere Analyse des Zellverhaltens in den visualisierten atherosklerotischen Plaques aus Ng2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen wurden durchgeführt, um die Interaktionen der myeloiden Leukozyten mit NG2<sup>+</sup> Gefäßwandzellen besser verstehen zu können. Die Analyse der Migrationswege zeigt, dass LysM<sup>+</sup> myeloide Leukozyten während ihrer Interaktion mit SMCs langsamer migrierten als in Abschnitten, in denen sie nicht mit NG2<sup>+</sup> SMCs interagieren (Abbildung 9A, B). Interessanterweise wiesen LysM<sup>+</sup> Zellen während ihrer Interaktionen mit NG2<sup>+</sup> SMCs ein Migrationsverhalten auf, das gemessen am Meandering Index (als Maß für die Geradlinigkeit der Migrationsprofile von Zellen) ungerichteter war, als zu Zeitpunkten, in denen sie nicht interagierten (Abbildung 9C). Insgesamt waren die Abschnitte, in denen LysM<sup>+</sup> myeloide Leukozyten in Interaktionen mit NG2<sup>+</sup> SMCs verwickelt waren, zeitlich länger als Abschnitte, in denen LysM<sup>+</sup> Zellen frei migrierten (Abbildung 9D). Außerdem legten LysM<sup>+</sup> Zellen in Abschnitten, in denen sie nicht interagierten, längere Distanzen zurück, als in Abschnitten, in denen sie mit NG2<sup>+</sup> SMCs interagierten (Abbildung 9E).





### Abbildung 9: Die Migration $\text{LysM}^+$ myeloider Leukozyten in der Gefäßwand wird durch die Interaktion mit $\text{NG2}^+$ SMCs gehemmt

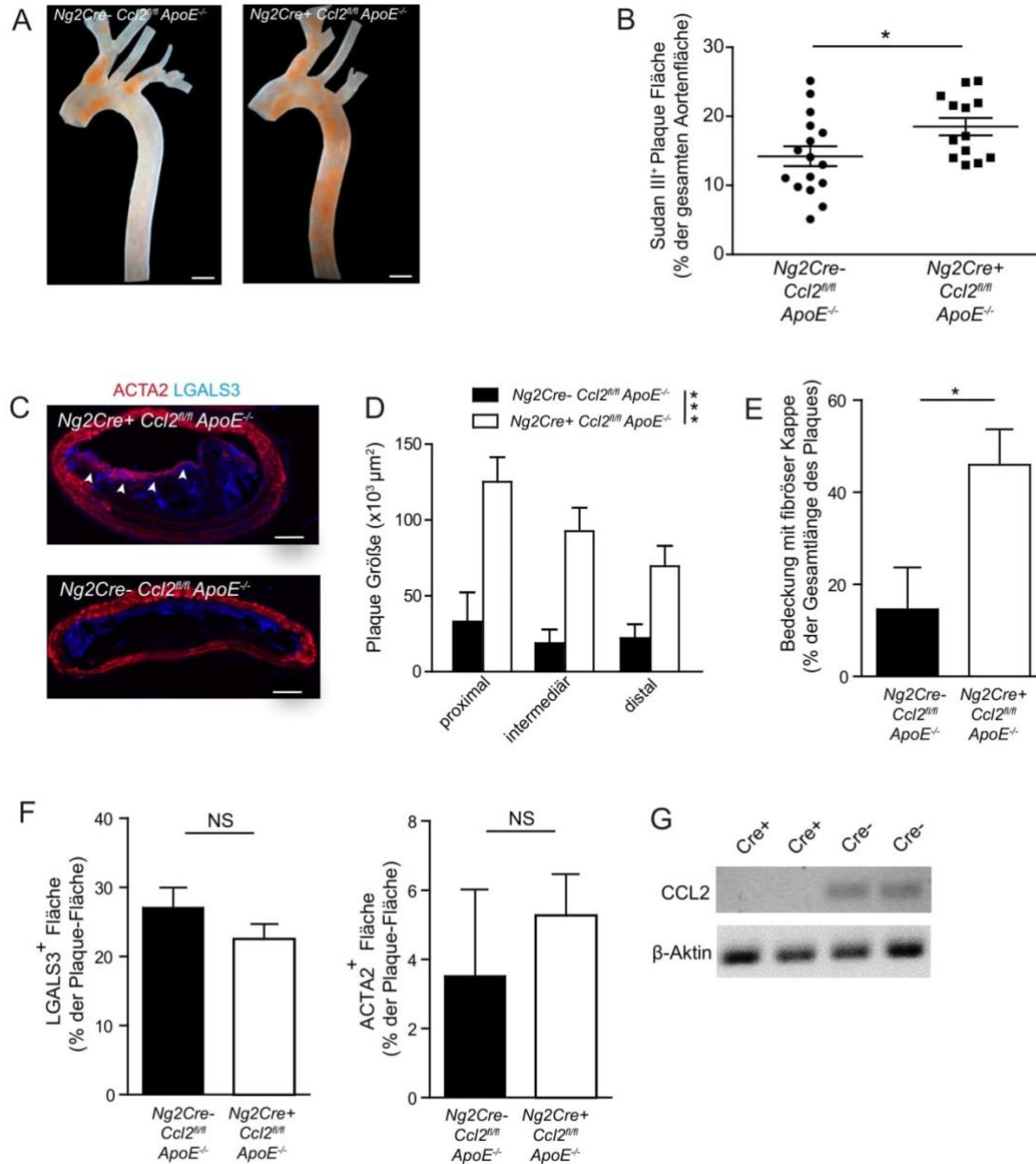
(A) Rechts: *In vivo* Darstellung von engen Interaktionen zwischen  $\text{NG2}^+$  SMCs (rot) und  $\text{LysM}^+$  myeloiden Leukozyten (grün) in 3-dimensional rekonstruierten und gerenderten intravitralen 2-photonenmikroskopischen Aufnahmen atherosklerotischer Plaques der Arteria Carotis in  $\text{Ng2-DsRed}$ ;  $\text{LysM-eGFP}$ ;  $\text{ApoE}^{-/-}$  Mäusen nach 14 Wochen HFD, Migrationswege der Zellen sind mittels Migrationsbalken markiert; Plaque Kern, Schulterregion und zwei Zellen sind exemplarisch markiert (Maßstab  $10 \mu\text{m}$ , Zeitangabe in Minuten). Links: Geschwindigkeits-Profile der Zellen 1 und 2 über die Zeit: Gelbe Boxen markieren Bereiche während einer Interaktion der  $\text{LysM}^+$  Zellen mit  $\text{NG2}^+$  SMCs, horizontale Linien markieren die durchschnittliche Geschwindigkeit während des jeweiligen Abschnitts. (B) – (E) Analyse der Migrationswege individueller  $\text{LysM}^+$  Zellen in der Arteria Carotis von  $\text{Ng2-DsRed}$ ;  $\text{LysM-eGFP}$ ;  $\text{ApoE}^{-/-}$  Mäusen nach 14 Wochen HFD. (B) Geschwindigkeit  $\text{LysM}^+$  Zellen während der Interaktionen mit  $\text{NG2}^+$  SMCs und zwischen den Interaktionen (freie Migration ohne Interaktion). (C)

Meandering Index (Maß für die Geradlinigkeit der Migration) der LysM<sup>+</sup> Zellen während der Interaktionen mit NG2<sup>+</sup> SMCs und zwischen den Interaktionen (freie Migration ohne Interaktion). (D) Vergleich der zeitlichen Dauer des Abschnitts „während den Interaktionen“ und „zwischen den Interaktionen“. (E) Vergleich der zurückgelegten Distanz während des Abschnitts „während den Interaktionen“ und „zwischen den Interaktionen“. Die quantitativen Analysen entsprechen n= 35-44 Zellen aus 2 biologischen Replikaten. Die Daten aus den Graphen (B) – (E) sind nicht Normalverteilt, es wurde der Mann-Whitney Test angewandt. \*\* markiert einen p-Wert von <0,01. \*\*\* markiert einen p-Wert von <0,001. Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

#### **4.5 Lokalisationsabhängiger atheroprotektiver Effekt von CCL2 aus NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen**

Da CCL2 im Rahmen der Atherosklerose durch NG2<sup>+</sup> SMCs vermehrt gebildet wird und potenziell die Interaktion mit myeloiden Leukozyten in der Gefäßwand beeinflusst, wurde CCL2 spezifisch in NG2<sup>+</sup> Zellen ausgeknockt. Zur Analyse der Relevanz der CCL2 Produktion NG2<sup>+</sup> Zellen in der Atherogenese wurden in dieser Arbeit Ng2-Cre<sup>+</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> und Ng2-Cre<sup>-</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tiere untersucht. Zur näheren Untersuchung wurde CCL2 ausgewählt, da es in den FACS-sortierten NG2<sup>+</sup> Zellen mittels RT-PCR eine signifikante Hochregulation während der Atherogenese aufzeigte (Abbildung 6D). Bei diesen Mäusen wird in NG2<sup>+</sup> Zellen das CCL2 Gen exzidiert. Somit können NG2<sup>+</sup> Zellen kein CCL2 produzieren, im Vergleich mit Cre<sup>-</sup> Tieren kann damit die Relevanz der CCL2 Sekretion NG2<sup>+</sup> Zellen in der Atherogenese untersucht werden. Nach 14 Wochen HFD Anfütterung wurden die Aorten der Tiere entnommen und die Atherosklerose-Last der Aorten mittels Sudan III Färbung ermittelt. Überraschenderweise zeigten Cre<sup>+</sup> Tiere eine signifikante Zunahme der Atherosklerose-Last in der Aorta (Abbildung 10A und B). Um die Atherosklerose luminal besser quantifizieren zu können und um die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques untersuchen zu können, wurden die Arteriae Brachiocephalicae an drei verschiedenen Lokalisationen unterschiedlichen Abstands vom Aortenbogen mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine starke und hochsignifikante Zunahme der atherosklerotischen Krankheitslast in Cre<sup>+</sup> Tieren im Vergleich zu Cre<sup>-</sup> Wurfgeschwistern (Abbildung 10C und D). Um die Plaquestabilität beurteilen zu können wurde die Kontinuität der fibrösen Kappe der Plaques bestimmt. Hier zeigte sich in Cre<sup>+</sup> Tieren eine signifikante Zunahme der Bedeckung der Plaques mit ACTA2<sup>+</sup> fibröser Kappe (Abbildung 10E). Um den Unterschied in der Plaquestärke besser verstehen zu können wurde weiterhin der Gehalt an Makrophagen in den Plaques bestimmt. Hierfür wurde die LGALS3<sup>+</sup> Fläche in den Plaques relativ zur Plaquestärke untersucht (Abbildung 10F). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der relativen Makrophagenfläche in den Plaques. Die relative ACTA2<sup>+</sup> Fläche zeigte ebenfalls keine Veränderung (Abbildung 8F). Um die Effizienz

des CCL2 Knock-Outs in NG2<sup>+</sup> Zellen beurteilen zu können, wurden Einzelzellsuspensionen der atherosklerotischen Aorten (nach Entfernung der Adventitia) lysiert und mittels RT-PCR und Gelelektrophorese auf CCL2 Transkripte hin untersucht. Im Vergleich zu Aorten von Cre<sup>-</sup> Tieren war in Cre<sup>+</sup> Tieren kein CCL2 nachweisbar (Abbildung 10G).

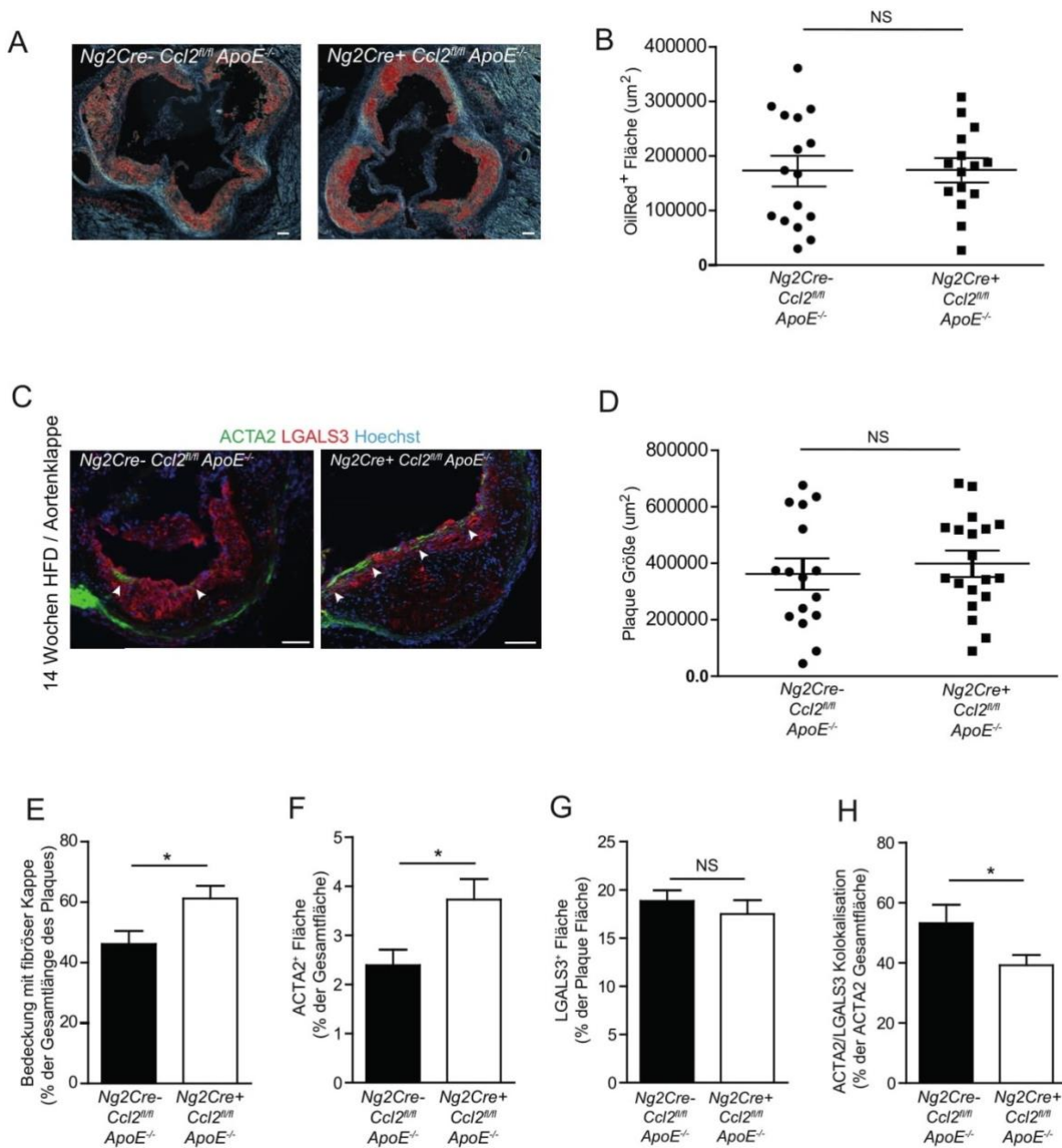


### Abbildung 10: CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen reduziert die Plauegröße und Plauebedeckung mit fibröser Kappe im Bereich des Aortenbogens

(A) Beispielhafte Darstellung einer En Face Sudan III Färbung einer *Ng2-Cre<sup>-</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>* und einer *Ng2-Cre<sup>+</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>* Aorta (ab hier als *Ng2-Cre<sup>-</sup>* oder *Ng2-Cre<sup>+</sup>* bezeichnet) nach 14 Wochen HFD (Maßstab 1mm). (B) Quantifizierung der relativen Plauefläche gegenüber der Gesamtfläche der Aorta in *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Mäusen nach 14 Wochen HFD (die quantitative Analyse entspricht n=13-16 Tieren pro Gruppe). (C) Beispielhafte Darstellung einer LGALS3 (blau) und ACTA2 (rot) Färbung der Arteriae Brachiocephalicae einer *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und einer *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Aorta nach 14 Wochen HFD (die inkludierten Pfeile zeigen auf die fibröse Kappe) (Maßstab 100  $\mu\text{m}$ ). (D) Quantifizierung der absoluten Plauegröße in 3 verschiedenen Abständen vom Abgang aus dem Aortenbogen in *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Mäusen nach 14 Wochen HFD (n=9 Tiere pro Gruppe). (E) Quantifizierung der Bedeckung des

atherosklerotischen Plaques mit einer fibrösen Kappe, angegeben als % der Bedeckung relativ zur Gesamtlänge des Plaques, in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD (n=9 Tiere pro Gruppe). (F) Quantifizierung der LGALS3<sup>+</sup> Fläche im Plaque und der ACTA2<sup>+</sup> Fläche im Plaque, angegeben als % an der Gesamtfläche des Plaques, in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD (n=9 Tiere pro Gruppe). (G) Beispielhafte Darstellung einer RT-PCR und Gelelektrophorese auf CCL2 (oben) und  $\beta$ -Actin (unten) in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD. Die Daten in den Graphen (B), (E) und (F) sind Normalverteilt, es wurde der t-Test angewandt. Für Graph (F) wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung über alle 3 Lokalisationen verwendet. \* markiert einen p-Wert von <0,05. \*\*\* markiert einen p-Wert von <0,001. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

Da SMCs an unterschiedlichen Lokalisationen des Gefäßbaums aus verschiedenen embryonalen Ursprüngen entstehen und sich in der Atherogenese unterschiedlich verhalten können, wurde in dieser Arbeit eine weitere Prädilektionsstelle für atherosklerotische Plaqueentstehung -die Aortenklappe-, näher untersucht. Um auch hier die atherosklerotische Plaquelast näher analysieren zu können, wurden Kryoschnitte der Aortenklappen mittels Oil Red gefärbt (Abbildung 11A). Es zeigte sich in der Oil Red<sup>+</sup> Fläche kein signifikanter Unterschied zwischen Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> Tieren (Abbildung 11B). Auch die Gesamtfläche der atherosklerotischen Plaques zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 11C, D). Auf Ebene der Aortenklappe wurden die Plaques ebenfalls bzgl. ihrer Komposition näher analysiert (Abbildung 11C, E-H). Es wurde die Kontinuität der fibrösen Kappe des Plaques bestimmt. Hierbei zeigte sich erneut eine signifikante Zunahme der Kontinuität der fibrösen Kappe in den Cre<sup>+</sup> Tieren im Vergleich zu den Cre<sup>-</sup> Wurfgeschwistern (Abbildung 11E). Auch die relative ACTA2<sup>+</sup> Fläche im Vergleich zur Gesamtfläche nahm in den Cre<sup>+</sup> Tieren im Vergleich zu den Cre<sup>-</sup> Kontrollen zu (Abbildung 11F). Der relative Gehalt an LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen zeigte auch auf Ebene der Aortenklappe keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 11G). Um die chemotaktische Aktivität der SMCs auf die Makrophagen zwischen Tieren mit intakter CCL2 Produktion in NG2<sup>+</sup> Zellen und Tieren mit gestörter CCL2 Produktion in NG2<sup>+</sup> Zellen darstellen zu können wurden die Zell-Zell Kontakte zwischen LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und ACTA2<sup>+</sup> SMCs analysiert. Hierfür wurde die überlappende Fläche zwischen ACTA2<sup>+</sup> und LGALS3<sup>+</sup> Zellen ermittelt und zur ACTA2<sup>+</sup> Gesamtfläche in Bezug gesetzt. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der überlappenden Fläche zwischen ACTA2<sup>+</sup> SMCs und LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen relativ zur ACTA2<sup>+</sup> Fläche in den Cre<sup>+</sup> Tieren im Vergleich zu Cre<sup>-</sup> Wurfgeschwistern (Abbildung 11H). Die relative Kontaktfläche zwischen LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und ACTA2<sup>+</sup> SMCs nahm also in den NG2 spezifischen CCL2 Knock-Out Tieren im Vergleich zu den Cre<sup>-</sup> Wurfgeschwistern ab.



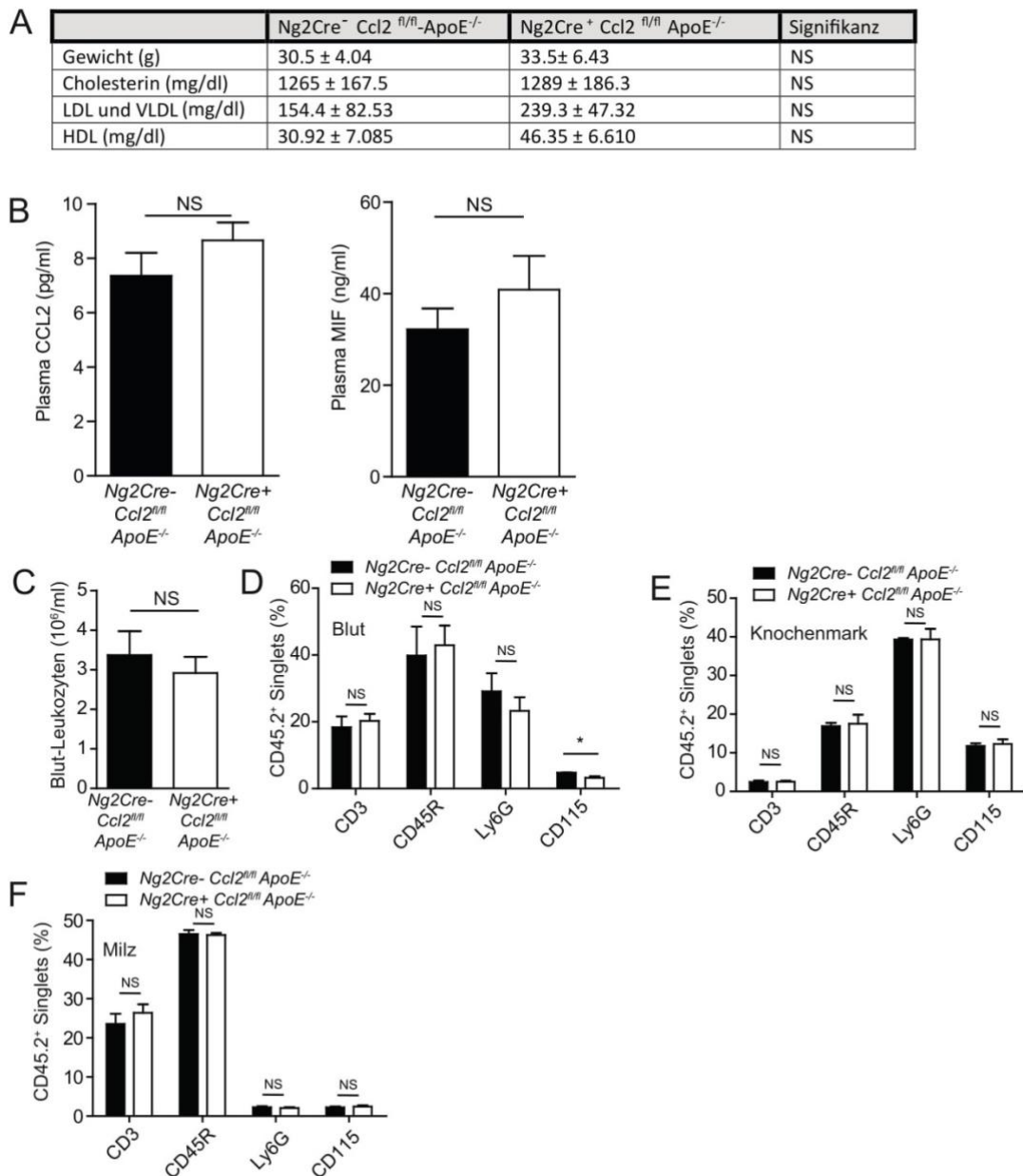
### Abbildung 11: CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen reduziert die Plaquebedeckung mit fibröser Kappe, jedoch nicht die Plaquegröße auf Aortenklappenebene

(A) Beispielhafte Darstellung einer Oil Red Färbung (orange) auf Ebene der Aortenklappe einer *Ng2-Cre<sup>-</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>* und einer *Ng2-Cre<sup>+</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>* (ab hier als *Ng2-Cre<sup>-</sup>* oder *Ng2-Cre<sup>+</sup>* bezeichnet) Aorta nach 14 Wochen HFD (Maßstab 100 µm). (B) Quantifizierung der absoluten Plaquefläche in Oil Red gefärbten Aortenklappen aus *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Mäusen nach 14 Wochen HFD (die quantitative Analyse entspricht n=15-16 Tieren pro Gruppe). (C) Beispielhafte Darstellung einer LGALS3 (rot), ACTA2 (grün) und Hoechst (blau) Färbung in Aortenklappen einer *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und einer *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Aorta nach 14 Wochen HFD (Maßstab 100µm). (D) Quantifizierung der absoluten Plaquegröße in *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Mäusen nach 14 Wochen HFD (n=16 – 19 Tiere pro Gruppe). (E) Quantifizierung der Bedeckung des atherosklerotischen Plaques mit einer fibrösen Kappe, angegeben als % der Bedeckung relativ zur Gesamtlänge des Plaques, in *Ng2-Cre<sup>-</sup>* und *Ng2-Cre<sup>+</sup>* Mäusen nach 14 Wochen HFD (n=15 - 19 Tiere pro Gruppe). (F) Quantifizierung der ACTA2<sup>+</sup> Fläche im Plaque, angegeben als % an der Gesamtfläche des

Plaques, in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD (n= 15 - 17 Tiere pro Gruppe). (G) Quantifizierung der LGALS3<sup>+</sup> Fläche im Plaque, angegeben als % an der Gesamtfläche des Plaques, in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD (n= 15 - 17 Tiere pro Gruppe). (H) Quantifizierung der ACTA2<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> doppelpositiven Fläche im Plaque, angegeben als % an der ACTA2<sup>+</sup> Fläche des Plaques, in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach 14 Wochen HFD (n= 15 - 19 Tiere pro Gruppe). Die Daten in den Graphen (B), (D), (E), (F), (G) und (H) sind Normalverteilt, es wurde der t-Test angewandt. \* markiert einen p-Wert von <0,05. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler.

#### **4.6 CCL2 Expression in NG2<sup>+</sup> Zellen führt zu keinen systemischen atheroprotektiven Veränderungen**

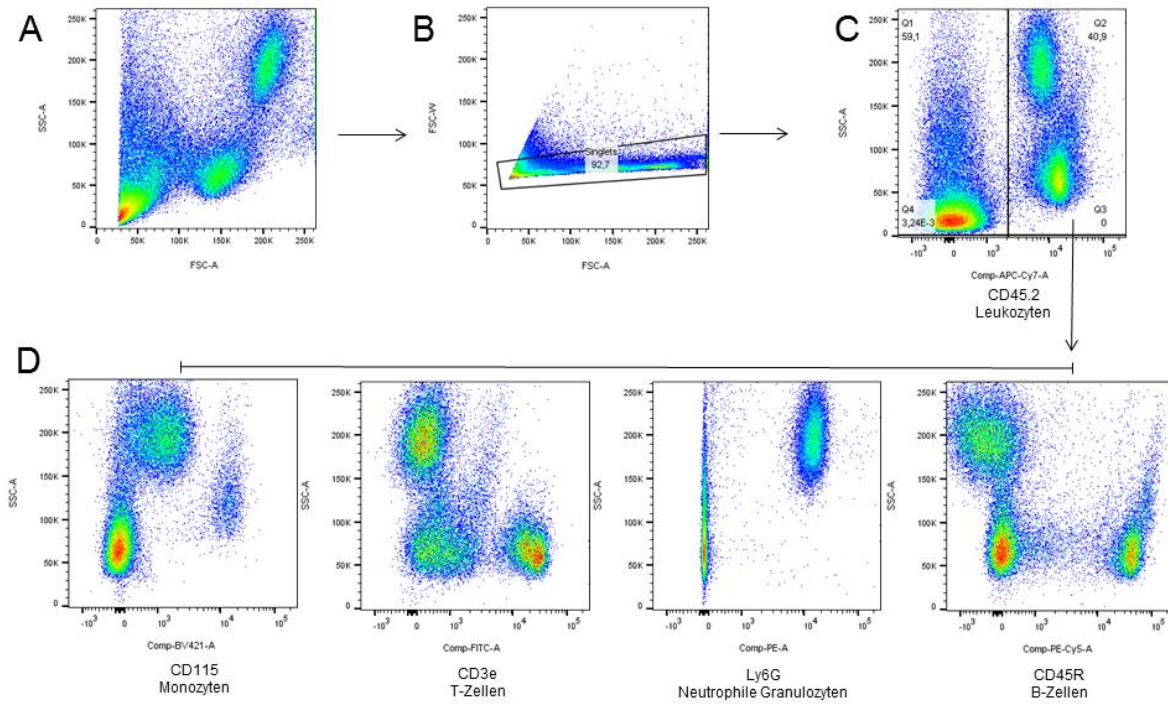
Da NG2 neben SMCs auch von Perizyten in der Mikrozirkulation und extravaskulären Zellpopulationen exprimiert wird, wurde in dieser Arbeit mittels verschiedener methodischer Ansätze ein systemischer Einfluss des CCL2 Knock-Outs in NG2<sup>+</sup> Zellen auf die Atherogenese ausgeschlossen. Hierzu wurden zunächst nach 14 Wochen HFD metabolische Unterschiede im VLDL und LDL bzw. im HDL Cholesterin analysiert. Außerdem wurde das Gewicht der Mäuse zum Zeitpunkt der Organgewinnung ermittelt (Abbildung 12A). Weder in den Blut-Lipiden noch im Gewicht der Tiere waren Unterschiede feststellbar. Um systemische Unterschiede in Chemokinkonzentrationen ermitteln zu können, wurde das Plasma der Tiere auf CCL2 und MIF hin untersucht. Es wurden die Chemokine zur näheren Untersuchung ausgewählt, die auch in den FACS-sortierten NG2<sup>+</sup> Zellen mittels RT-PCR näher untersucht wurden (Abbildung 6D). Weder das CCL2 noch das MIF zeigten nach 14 Wochen HFD zwischen den Cre<sup>+</sup> und Cre<sup>-</sup> Tieren signifikante Unterschiede (Abbildung 12B). Des Weiteren wurden die absoluten Leukozyten-Zahlen, aber auch die Leukozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch ermittelt. Da das Knochenmark und die Milz in der Leukopoese bzw. im Leukozyten-Trafficking eine große Rolle spielen, wurden diese Organe ebenfalls mittels Durchflusszytometrie auf die wichtigsten Leukozytenpopulationen hin untersucht. Hierbei wurden T-Zellen mittels des Pan-T Zell Marker CD3, B-Zellen mittels CD45R, neutrophile Granulozyten mittels Ly6G und Monozyten mittels CD115 näher untersucht. Die Gesamtzahl der Leukozyten im Blut zeigte nach 14 Wochen HFD keine signifikanten Unterschiede zwischen Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> Mäusen (Abbildung 12C). Unter den Leukozytensubpopulationen zeigte sich eine signifikante Abnahme der CD115<sup>+</sup> Monozoyten in den Cre<sup>+</sup> Tieren, ansonsten zeigten die Leukozytensubpopulationen keine signifikanten Unterschiede im Blut (Abbildung 12D). Die Leukozytensubpopulationen im Knochenmark und in der Milz zeigten ebenfalls nach 14 Wochen HFD keine signifikanten Unterschiede zwischen Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> Mäusen (Abbildung 12E und F). Die Gating-Strategien der durchflusszytometrischen Auswertungen sind in Abbildung 13 beispielhaft dargestellt.



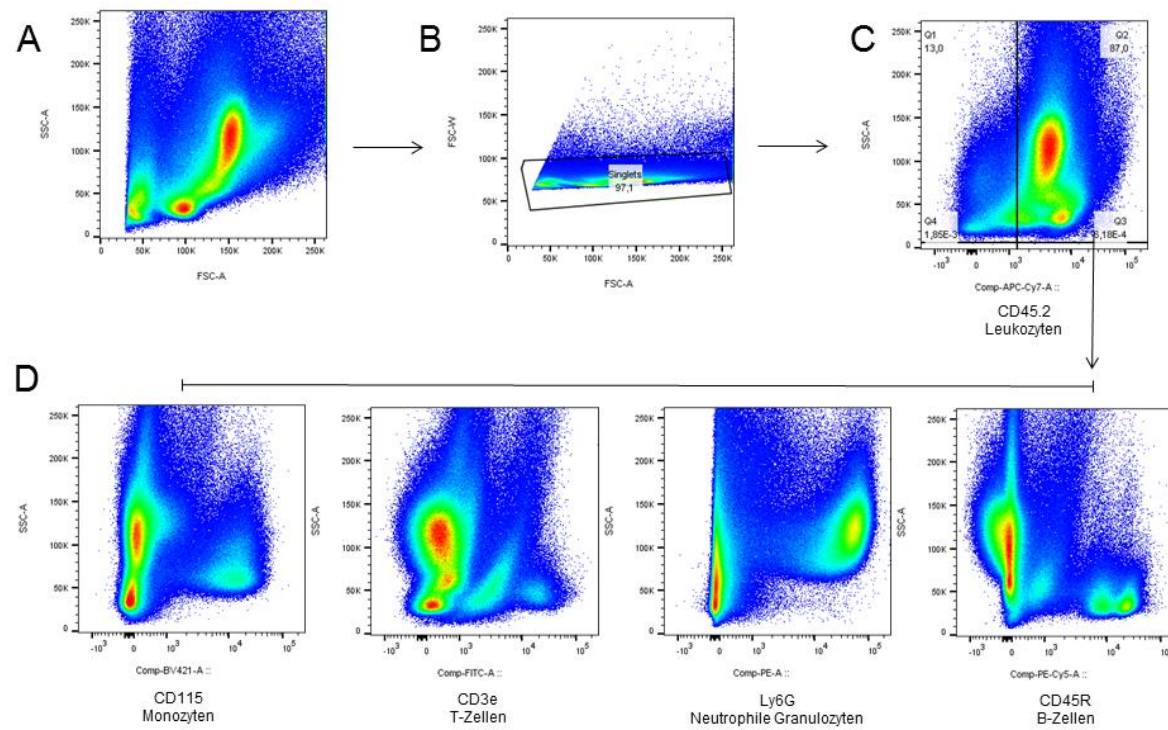
**Abbildung 12: Systemische Veränderungen in Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren**  
 (A) Körpergewicht, Plasma Cholesterin, LDL und VLDL bzw. HDL Werte von Ng2Cre<sup>-</sup>;Ccl2<sup>fl/fl</sup>;ApoE<sup>-/-</sup> und Ng2Cre<sup>+</sup>;Ccl2<sup>fl/fl</sup>;ApoE<sup>-/-</sup> Tieren (ab hier als Ng2-Cre<sup>-</sup> oder Ng2-Cre<sup>+</sup> bezeichnet) nach 14 Wochen HFD (n= 5-6 pro Gruppe). (B) Plasma Konzentrationen von CCL2 und MIF in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2-Cre<sup>+</sup> Tieren nach 14 Wochen HFD (n= 10-13 pro Gruppe). (C) Leukozytenzahlen von CCL2 und MIF in Ng2-Cre<sup>-</sup> und Ng2Cre<sup>+</sup> Tieren nach 14 Wochen HFD (n= 11-14 pro Gruppe). (D) Quantifizierung des Anteils CD3<sup>+</sup> T-Zellen, CD45R<sup>+</sup> B-Zellen, Ly6G<sup>+</sup> neutrophiler Granulozyten und CD115<sup>+</sup> Monozyten an allen CD45<sup>+</sup> Singlets im Blut (D), Knochenmark (E) und in der Milz (F) (n=4 pro Gruppe und Organ). \* markiert einen p-Wert von <0,05. NS steht für nicht signifikant.



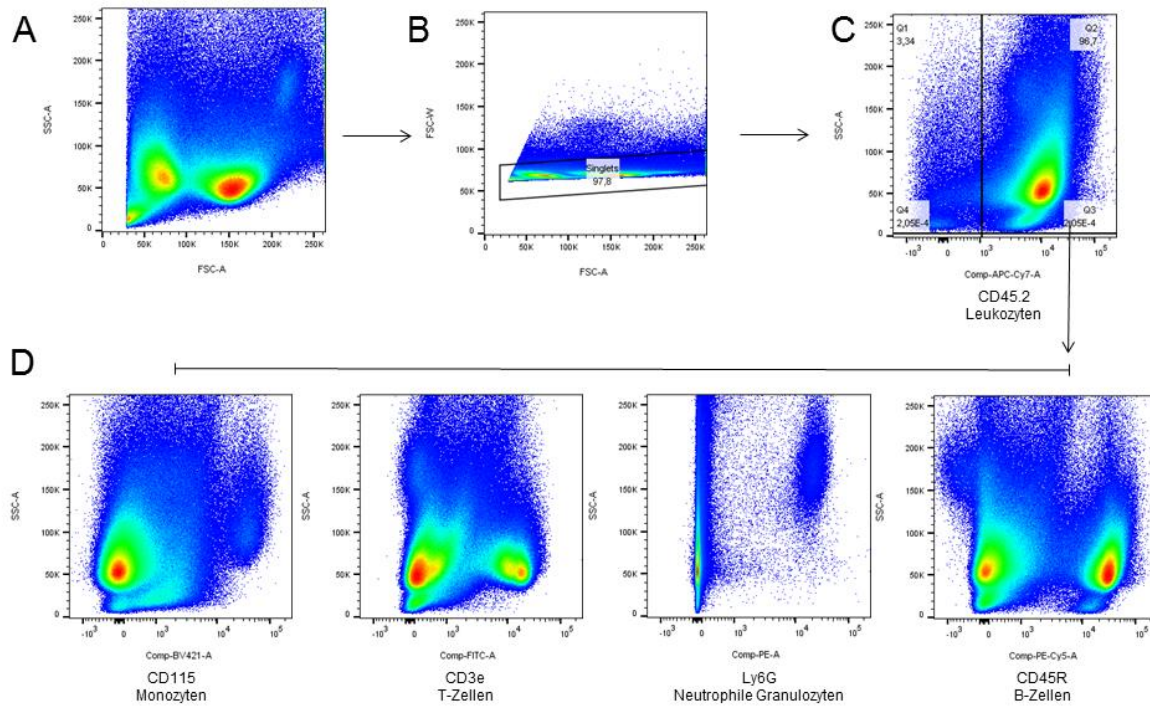
Blut



Knochenmark



## Milz



**Abbildung 13: Beispielhafte Gating-Strategie der kompensierten durchflusszytometrischen Daten aus Blut, Knochenmark und Milz**

(A) Alle Zellen ab einem FSC-A Threshold von 30K. (B) Singlets. (C) CD45.2<sup>+</sup> Zellen (alle Leukozyten). (D) CD115<sup>+</sup> Monozyten, CD3<sup>+</sup> T-Zellen, Ly6G<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten, CD45R<sup>+</sup> B-Zellen

## 5. Diskussion

Die Atherosklerose ist eine chronische, teilweise entzündliche Gefäßerkrankung, die weltweit eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität darstellt [1-4]. Bis heute wurde die Wirkung von Chemokinen *in vivo* vor allem in Bezug auf das Endothel und die Induktion der Leukozytenadhäsionskaskade im Rahmen einer Leukozytenrekrutierung beleuchtet [3]. Zudem wurden bislang größtenteils komplette Knock-Outs der Chemokine verwendet. Direkte *in vivo* Studien zur Rolle von Chemokinen aus SMCs bei der chronischen Entzündung wurden bis heute nicht durchgeführt. 2017 ist die Hypothese der entzündlichen Komponente der Atherosklerose in der CANTOS Studie erstmals am Menschen bewiesen und therapeutisch genutzt worden [19]. Die protektive Wirkung des Interleukin-1 $\beta$  Antagonisten Canakinumab war jedoch geringer als erwartet. Zudem konnte in der primären CANTOS Studie kein Effekt auf die Gesamtmortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Gleichzeitig nahm die Anzahl fataler Infektionen signifikant zu. Eine systemische Hemmung von proinflammatorischen Mediatoren scheint also weniger effektiv zu sein, als erwartet.

Die Frage, ob Chemokine in der subendothelialen Nische dieselbe schädliche Wirkung haben wie systemisch, bleibt unklar. Ein genaueres Verständnis der Wirkung von Zytokinen und Chemokinen in der Atherogenese ist relevant, um maßgeschneiderte antiinflammatorische Interventionen zu ermöglichen, welche die Atheroprogression hemmen, ohne große Effekte auf die physiologische Entzündung zu haben.

Daher wurde in dieser Arbeit die Wirkung SMC induzierter Entzündung auf die Atherogenese untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Mauslinie verwendet, welche die Visualisierung von Zellen ermöglicht, die zum Zeitpunkt der Untersuchung in SMCs differenziert sind: Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tiere. NG2<sup>+</sup> Zellen wurden zu diesem Zweck zunächst charakterisiert und die Eignung der Linie für die Untersuchung von SMCs validiert. Im weiteren Verlauf wurde das Zusammenspiel zwischen NG2<sup>+</sup> SMCs und LysM<sup>+</sup> bzw. CX3CR1<sup>+</sup> myeloiden Leukozyten im Rahmen der Atherogenese sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* charakterisiert. Zum näheren Verständnis der Mediatoren des Zusammenspiels wurden NG2<sup>+</sup> Zellen aus atherosklerotischen und nicht-atherosklerotischen Maus Aorten mittels FACS-Sortierung isoliert und auf zwei der relevantesten Chemokine in der Atherogenese - MIF und CCL2 - untersucht. Das signifikant hochregulierte Chemokin CCL2 wurde im nächsten Schritt in einer konditionalen Knock-Out Linie näher untersucht. Hierfür wurde ein Cre/loxP-System verwendet und auf einen ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund gezüchtet. In dieser Linie wurde sowohl die Krankheitslast der Atherosklerose, als auch die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques analysiert. Zum Ausschluss

systemischer Unterschiede in diesen Linien, welche wiederum die Unterschiede in der Krankheitslast ebenfalls erklären könnten, wurden sowohl metabolische Parameter als auch Entzündungsparameter im Blut und in wichtigen immunologischen Organen ermittelt.

## 5.1 Diskussion der Methoden

### 5.1.1 Versuchstiere

Die Maus bietet eine sowohl zeit- und kosteneffektive, als auch dem Menschen sehr ähnliche Möglichkeit zur Untersuchung der Krankheitsgenese der Atherosklerose. Durch die kurze Generationszeit und die relativ einfache Herstellung von transgenen Mäusen, hat man die Möglichkeit vergleichsweise schnell mehrfach-transgene Linien zu generieren. Die geringen Haltungskosten für Mäuse ermöglichen die Untersuchung großer Gruppen [264]. Einerseits wurden die meisten Untersuchungen zur Atherogenese in der Grundlagenforschung bisher an der Maus durchgeführt, andererseits entwickeln Mäuse spontan keine atherosklerotischen Läsionen. Die LDL-Cholesterin Konzentrationen sind vergleichsweise gering und die Konzentrationen von HDL-Cholesterin im Blut sind besonders hoch. Deshalb sind genetische Knock-Outs von ApoE, oder des LDL-Rezeptors notwendig, um hohe LDL-Cholesterinwerte zu erreichen, die die Ausbildung spontaner atherosklerotischer Läsionen ermöglichen. Die Anfütterung mit triglyzerid- und cholesterinreichem Futter (HFD) erlaubt eine zusätzliche Beschleunigung der Atherogenese [264].

Die Nutzung verschiedener Fluorochrom-transgener Linien ermöglicht die *in vivo* und *ex vivo* Untersuchung des Zusammenspiels zwischen NG2<sup>+</sup> SMCs mit myeloiden Leukozyten in der Atherosklerose.

Das Cre-loxP Modell erlaubt die Erstellung konditioneller Knock-Outs. Hiermit kann man Moleküle ausschließlich in bestimmten Zellpopulationen ausschalten. Komplette Knock-Out Linien (beispielsweise von CCL2) ermöglichen nur die Untersuchung der Summe aller Effekte von CCL2 auf den Organismus. Mittels Cre-loxP Modellen kann man die einzelnen Effekte von Entzündungsmediatoren aus verschiedenen Zellen spezifisch unterscheiden [258-261].

### 5.1.2 Konfokal-, 2-Photonen- und Epifluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung der Zellen in der Atherosklerose

Zur Erstellung von Bildern mit besonders hoher Auflösung wurden konfokalmikroskopische Bilder angefertigt. Der Vorteil der konfokalen Mikroskopie besteht darin, dass durch einen Laser nur einzelne Punkte auf dem Präparat angeregt werden und, dass nur der Teil des emittierten Licht durch ein „Pinhole“ gelangt, der den scharf abgebildeten Teil des angeregten Punktes auf dem Präparat abbildet. Dies ermöglicht eine besonders hohe räumliche Auflösung des Präparats in nur einer Ebene. Im Gegensatz dazu bietet die Epifluoreszenzmikroskopie ein überlagertes Abbild vieler Ebenen auf dem Präparat. Hier werden nicht mittels eines Lasers einzelne Punkte angeregt, sondern das gesamte Präparat mit Licht einer spezifischen Wellenlänge exzitert und das vom Präparat emittierte Licht eingefangen. Dies ermöglicht einerseits schnelle Aufnahmen mit geringem zeitlichen Aufwand. Andererseits wird aber lediglich eine Überlagerung mehrerer Schnittebenen mit einer geringeren räumlichen Auflösung abgebildet [265]. Die 2-Photonenmikroskopie hat den einzigartigen Vorteil einer tiefen Gewebepenetranz. Mittels 2-Photonenmikroskopie kann intaktes Gewebe visualisiert werden, ohne es chirurgisch zu eröffnen. Des Weiteren ermöglicht sie im Gegensatz zur Epifluoreszenzmikroskopie die Darstellung von Schnittbildern. Bei der 2-Photonenmikroskopie wird die tiefe Gewebepenetranz von niedrigfrequenten Photonen genutzt, die im Zielbereich gleichzeitig eintreffen und somit höherfrequente Exzitationen induzieren und eine überlagerungsfreie Auflösung tiefer Gewebeschichten ermöglichen [266]. Die 2-Photonenmikroskopie ist somit ideal geeignet, um überlagerungsfrei in atherosklerotische Plaques der Arteria Carotis hineinzusehen, ohne die Arterie dabei eröffnen zu müssen.

### 5.1.3 Durchflusszytometrie als Hochdurchsatzmethode zum Ausschluss systemischer Unterschiede in Leukozytenpopulationen

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine schnelle antikörperbasierte Untersuchung der Oberflächenmarker auf Einzelzellebene. Die umfassende Untersuchung der Leukozytensubpopulationen von Milz, Knochenmark und Blut ist besonders effizient mittels Durchflusszytometrie durchführbar. Hiermit kann man eine hohe Zellzahl in kurzer Zeit auf verschiedene Oberflächenmarker hin untersuchen [267].

#### 5.1.4 FACS-Sortierung zur Isolation NG2<sup>+</sup> Zellen mit anschließender RT-PCR

Um NG2<sup>+</sup> SMCs aus Aorten mit oder ohne Atherosklerose isolieren zu können wurde FACS-Sortierung angewendet. Dies ermöglicht eine einzelzellbasierte Identifikation und Isolation von Zellpopulationen [268]. Um im Anschluss eine RT-PCR Analyse auf die Chemokine MIF und CCL2 in NG2<sup>+</sup> Zellen durchführen zu können, ist diese Methodik ideal geeignet. Sie erlaubt erstens die Identifikation von NG2<sup>+</sup> Zellen und zweitens den Ausschluss toter Zellen. Die anschließende RT-PCR erlaubt eine im Vergleich zur Immunfluoreszenzmikroskopie besonders sensitive Quantifizierung spezifischer intrazellulärer RNA und somit Rückschlüsse auf die Expression der zu untersuchenden Chemokine [269].

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 NG2 als Marker für SMCs in der Makrozirkulation

Stark und Kollegen zeigten in der Vergangenheit, dass LysM<sup>+</sup> und CX3CR1<sup>+</sup> myeloide Zellen mit NG2<sup>+</sup> Perizyten in der Mikrozirkulation interagieren. NG2<sup>+</sup> Perizyten locken hierbei myeloide Leukozyten an, instruieren sie mit Mustererkennungsprogrammen und führen zu einer effizienteren Zielfindung [229]. NG2 wird in kontraktile wandständigen Zellen des Gefäßbaums auch in der Makrozirkulation exprimiert [229, 240-245]. Um die Eignung von NG2 als Marker in der Makrozirkulation auch während der Atherogenese zu validieren, wurden Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tiere gezüchtet. Entsprechend der vorpublizierten Literatur, waren fast alle Zellen der Tunica Media DsRed<sup>+</sup>. Außerdem exprimierten fast alle NG2<sup>+</sup> Zellen in der Gefäßwand ACTA2, als klassischen SMC Marker. Während der Atherogenese exprimierten NG2<sup>+</sup> Zellen auch in frühen atherosklerotischen Plaques zwei verschiedener Lokalisationen des arteriellen Gefäßbaums zum Großteil ACTA2 und PDGFR $\beta$ . PDGFR $\beta$  ist ein Marker, der vor allem von Myofibroblasten bzw. myofibroblast-ähnlichen Zellen exprimiert wird [211]. Vor Kurzem zeigte ein Fate-Mapping Ansatz, dass SMCs in der humanen als auch in der murinen Atherosklerose vor allem in Fibroblasten-ähnliche Zellen („Fibromyozyten“) transdifferenzieren [219]. NG2 markiert also auch phänotypisch modulierte SMCs im Rahmen der Atherogenese. Im Verlauf der Plaqueprogression verloren NG2<sup>+</sup> Zellen diese Marker zu einem Teil wieder. Dies entspricht der aktuellen Literatur bzgl. SMC Trans- und Dedifferenzierung [10, 62, 209, 211, 212]. Zusammenfassend ist NG2 ein adäquater Marker zur Untersuchung von gesunden aber auch bis zu einem gewissen Grad phänotypisch modulierten Gefäßwandzellen in der Atherosklerose. Fate-Mapping Ansätze, beispielsweise wie aus dem Owens Labor [211] mit einem Tamoxifen-

induzierbaren Myh11-CreERT2 Modell erlauben intravitalmikroskopisch keine Differenzierung zwischen SMCs, die im Rahmen der Atherogenese vollständig entdifferenziert sind und Zellen, die weiterhin phänotypische Ähnlichkeiten zu SMCs haben. Es werden hierbei alle Zellen, die aus SMCs entstanden sind im weiteren Verlauf auch markiert, unabhängig vom Phänotyp der Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung [211]. Das Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Modell hingegen erlaubt die Darstellung des gegenwärtigen NG2 Signals in klassischen aber auch phänotypisch modulierten SMCs zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie. Es erlaubt somit eine Identifikation von Zellen, die zum Versuchszeitpunkt einen SMC Phänotyp haben.

### 5.2.2 Die inflammatorische Kapazität NG2<sup>+</sup> wandständiger Zellen in der Atherosklerose

CCL2 wurde sowohl in der murinen als auch in der humanen Atherogenese seit Jahrzehnten als eines der wichtigsten bisher zweifellos proatherogenen Chemokine beschrieben [130, 163, 183-185, 187]. MIF ist ein atypisches Chemokin, welches ebenfalls mit der Atherogenese assoziiert wurde [137, 224, 270-275]. Frühere Studien zeigten, dass sowohl CCL2 als auch MIF von SMCs exprimiert werden und somit auch *in vivo* möglicherweise eine Rolle spielen könnten [154, 166, 276] [137, 224].

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass NG2<sup>+</sup> SMCs das Chemokin CCL2 im Verlauf der Atherogenese im Vergleich zu Mäusen ohne beschleunigte Atherogenese signifikant hochregulieren. Beim Chemokin MIF konnten hingegen bei bereits konstitutiv starker Expression keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

CCL2 ist ein chemotaktisch und funktionell vor allem auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten wirksames Molekül [166]. Die *in vitro* Exposition humaner SMCs gegenüber Lipiden führt zu einer Ausschüttung von CCL2, IL-6 und Cx3CL1 [153, 223]. Außerdem regulieren SMCs Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 in der Atherogenese, vor allem in Arealen der Plaquebildung, hoch [226-228]. Eine erhöhte Expression von CCL2 durch SMCs in der Atherogenese, macht eine CCL2 vermittelte Interaktion zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten somit wahrscheinlich.

Nach Transmigration durch das Endothel sind myeloide Leukozyten in einer neuen Umgebung, die hauptsächlich von SMCs bestimmt wird. Um der Frage nachzugehen, ob und wann myeloide Leukozyten mit NG2<sup>+</sup> SMCs in Kontakt treten, wurden atherosklerotische Plaques von Ng2-DsRed; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass NG2<sup>+</sup> SMCs enge Zellkontakte sowohl mit CX3CR1<sup>+</sup> und LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen, als auch

mit MPO<sup>+</sup> myeloiden Zellen ausbilden. Die Kontakte scheinen vor allem in frühen Plaques besonders häufig zu sein und im Verlauf der Atherogenese in ihrer Zahl abzunehmen. Zahlreiche und besonders enge Zell-Zell Kontakte zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten *ex vivo* machen eine Beteiligung von SMCs an der immunologischen Komponente der Atherogenese wahrscheinlich. Ob diese Kontakte auch intravital stattfinden und wie die Zellen miteinander interagieren, kann jedoch nur mittels Intravitalmikroskopie ausreichend beschrieben werden.

Das Zusammenspiel zwischen Endothelzellen und angeborenen Immunzellen in der Atherogenese wurde in der Vergangenheit *in vitro* und *in vivo* umfassend untersucht [3, 274]. Da Atherosklerose eine Erkrankung der großen arteriellen Gefäße darstellt, ist es besonders schwierig atherosklerotische Plaques intravitalmikroskopisch zu analysieren. Mittels Epifluoreszenzmikroskopie konnten in der Vergangenheit Leukozyten-Endothel-Interaktionen analysiert werden, da hier Überlagerungseffekte durch den Plaque selbst nur eine geringe Rolle spielen [277, 278]. Artefakte durch die starke Pulsation und Überlagerungsartefakte in epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erschweren jedoch Schnittbildaufnahmen vom Inneren atherosklerotischer Plaques erheblich. Aus diesem Grund sind intravitalmikroskopische Aufnahmen von Interaktionen zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten in der Atherosklerose bis heute nicht erfolgt. Um das Verhalten der Zell-Interaktionen zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten intravital darstellen zu können, wurde ein 2-photonenmikroskopisches Modell der Visualisierung der stabilisierten Arteria Carotis Communis verwendet. Dieses Modell ermöglicht eine überlagerungsfreie Darstellung des atherosklerotischen Plaques mit minimalen Pulsationsartefakten. Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, schnelle und kurzlebige Interaktionen zwischen Zellen sind in diesem Kontext also folglich nicht zu erwarten.

Überraschenderweise waren in NG2-DsRed; LysM-eGFP; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren mit atherosklerotischen Plaques in der Arteria Carotis eine Vielzahl lebhafter Interaktionen zwischen LysM<sup>+</sup> myeloiden Zellen und NG2<sup>+</sup> SMCs nachweisbar. Die myeloiden Leukozyten verweilten während der Interaktionen entweder an den SMCs oder migrierten während der Interaktionen entlang NG2<sup>+</sup> SMCs in der Gefäßwand. CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen schienen eher statische, aber sehr enge Zellkontakte mit NG2<sup>+</sup> SMCs aufzubauen. Das intravitalmikroskopisch dargestellte Verhalten von myeloiden Leukozyten in der Atherogenese offenbart eine besonders plastische Plaquekomposition. Zell-Zell Interaktionen zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten veränderten sich bei den Analysen minütlich. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen der



Interaktionen lassen außerdem eine chemotaktische Wirkung von NG2<sup>+</sup> SMCs auf myeloide Leukozyten vermuten.

### 5.2.3 NG2<sup>+</sup> wandständige Zellen nutzen CCL2, um die Atheroprogression im Bereich des Aortenbogens zu unterbinden

CCL2 ist historisch das erste identifizierte C-C Chemokin [193]. Es ist eines der ältesten mit Atherosklerose und einer Vielzahl weiterer Erkrankungen in Verbindung gebrachten Chemokine [193]. Sowohl in murinen Atherosklerosemodellen, als auch in humanen genomweiten Assoziationsstudien wurde CCL2 in zahlreichen Untersuchungen als stark proinflammatorisch und proatherogen wirksames Chemokin identifiziert [130, 132, 155, 160, 165, 171, 185, 186, 189, 237-239]. Bei der Untersuchung von CCL2 wurden vor allem komplette Knock-Out Tiere verwendet und die proatherogenen Effekte des Chemokins über ein verändertes Leukozytentracking im Knochenmark und eine veränderte Leukozytenrekrutierung über das Endothel erklärt [3, 130, 163]. Konditionelle, SMC spezifische Chemokin Knock-Out Linien zur Untersuchung des Beitrags von SMCs zur Inflammation in atherosklerotischen Plaques sind bis heute nicht verwendet worden. Deshalb wurden für diese Arbeit Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tiere generiert und zur Beschleunigung der Atherogenese mit HFD angefüttert. Die atherosklerotische Krankheitslast in den Tieren wurde quantifiziert und die atherosklerotischen Plaques auf ihre Zusammensetzung hin untersucht.

Interessanterweise nahm die atherosklerotische Krankheitslast in Tieren mit Ng2-spezifischem Ccl2 Knock-Out in der Arteria Brachiocephalica und in der Aorta signifikant zu. Die Krankheitslast auf Höhe der Aortenklappe zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Kontinuität der, den Plaque bedeckenden, fibrösen Kappe nahm als Marker der Plaquestabilität signifikant zu. Ein solcher Unterschied in der fibrösen Kappe ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass größere und somit organsiertere atherosklerotische Plaques klassischerweise auch besser ausgebildete fibröse Kappen aufweisen [279]. Unterschiede in der relativen Fläche LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen oder ACTA2<sup>+</sup> SMCs waren zwischen Cre<sup>+</sup> und Cre<sup>-</sup> Tieren keine nachweisbar.

Die Zunahme der atherosklerotischen Krankheitslast in Cre<sup>+</sup> Tieren spricht für eine überraschend protektive Wirkung von CCL2 aus NG2<sup>+</sup> SMCs in der Atherogenese. Diese Ergebnisse weisen somit erstmals auf eine kompartimentspezifische protektive Wirkung eines allgemein als stark proinflammatorisch und in chronisch entzündlichen Erkrankungen schädlich eingestuften Chemokins hin [193].

*In vitro* Studien suggerieren einen möglichen Effekt von CCL2 auf die Polarisation von Makrophagen. Makrophagen, die mit CCL2 inkubiert wurden, scheinen vermehrt einen antiinflammatorischen M2 Makrophagenphänotyp auf dem M1-M2 Spektrum anzunehmen [180]. Eine weitere *in vitro* Studie von Cai und Kollegen zeigte, dass eine Koinkubation von Makrophagen mit SMCs zu einem verbesserten Überleben der Makrophagen und ein veränderten Genexpressionsprofil führt. Unter anderem zeigen die Autoren der Studie, dass SMC/Makrophageninteraktionen über CCL2 zu einer erhöhten CD36 Expression von Makrophagen beitragen [166]. CD36 ist unter anderem ein Marker für den immunmodulatorischen M2 Makrophagenphänotyp und als Scavenger Rezeptor maßgeblich an der Abräumung apoptotischer Zellen beteiligt -Efferozytose-, welche atheroprotektiv ist [233, 280, 281]. CCL2 könnte also im subendothelialen Kompartiment, nach der Rekrutierung von myeloiden Leukozyten über das Endothel, eine Rolle in der funktionellen Polarisierung von Makrophagen spielen und somit entgegengesetzte Effekte zum systemischen Einfluss von CCL2 auf die Atherogenese haben.

Da SMCs in unterschiedlichen Lokalisationen auch unterschiedliche embryonale Ursprünge aufweisen, lässt sich der überraschend protektive Effekt von CCL2 aus SMCs auf Höhe der Arteria Brachiocephalica und der Aorta nicht unbedingt auf die Ebene der Aortenklappe übertragen [10, 200, 201]. Daher wurde in dieser Arbeit ebenfalls der Einfluss auf die Atherosklerose auf Aortenklappenebene untersucht. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Krankheitslast: Weder in der absoluten Plauegröße, noch in der absoluten Oil Red<sup>+</sup> Fläche. Die Gesamtfläche der LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, was dafür spricht, dass CCL2 aus NG2<sup>+</sup> SMCs offensichtlich weder eine Rekrutierung von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen fördert, noch das Überleben dieser Zellen beeinflusst. Eine signifikante Zunahme der Kontinuität der fibrösen Kappe war ebenfalls nachweisbar. Die ACTA2<sup>+</sup> Gesamtfläche nahm dementsprechend signifikant zu. Weiterhin nahm die relative Fläche der LGALS3<sup>+</sup> ACTA2<sup>+</sup> kolocalisierenden Zellen im Vergleich zur ACTA2<sup>+</sup> Gesamtfläche ab, was für eine Ablösung der LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen von ACTA2<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der entfallenen chemotaktischen Wirkung von CCL2 in den konditionellen Knock-Out Tieren sprechen könnte. Zusammenfassend scheint der protektive Effekt von CCL2 aus NG2<sup>+</sup> SMCs lokalisationsabhängig zu sein.

#### 5.2.4 CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen bedingt keine atheroprotektiven systemischen Veränderungen

NG2 wird nicht nur von SMCs, sondern auch von Perizyten und nicht-gefäßständigen Zellen exprimiert [249, 255, 257]. Um systemische Effekte auszuschließen, welche die atheroprotektive Wirkung von CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen erklären könnten, wurden in dieser Arbeit sowohl metabolische als auch immunologische Unterschiede zwischen Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> Tieren analysiert. Es zeigten sich weder Unterschiede im Plasma-Cholesterin, noch in den Gewichten der Mäuse. Immunologisch zeigten sich weder Unterschiede in der Blutleukozytenzahl, noch in den meisten Leukozytensubpopulationen im Blut, in der Milz und im Knochenmark. Es zeigte sich ausschließlich eine signifikante Abnahme der CD115<sup>+</sup> Monozyten im Blut der Cre<sup>+</sup> Tiere, was jedoch die Zunahme der atherosklerotischen Plauegröße in diesen Tieren nicht erklärt. Mit einer beschleunigten Atherogenese wird vor allem die Monozytose assoziiert [282]. Die atheroprotektive Wirkung von CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen ist somit höchstwahrscheinlich auf lokale Effekte von NG2<sup>+</sup> gefäßständigen SMCs auf die Plauebildung zurückzuführen.

### 5.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten eine mögliche Kompartiment spezifische protektive Rolle weiterer proinflammatorischer Moleküle aufzeigen. Die Daten deuten darauf hin, dass Chemokine im subendothelialen Kompartiment einen eher protektiven Einfluss auf die Funktion myeloider Leukozyten haben könnten. Obwohl eine Vielzahl von Studien mit kompletten Knock-Out Mäusen schädliche Effekte von CCL2 nachgewiesen hatten, zeigt diese Arbeit, dass CCL2 aus bestimmten Zellen auch unerwartet gegenteilige Effekte auf die chronisch entzündliche Erkrankung Atherosklerose haben kann.

Obwohl in dieser Arbeit verschiedene Analysen zum Ausschluss systemischer Effekte des NG2-spezifischen Knock-Outs von CCL2 vorgenommen wurden, ist es sinnvoll weitere SMC spezifische Cre-transgene Mauslinien mit der loxP flankierten *Ccl2* – Linie zu kreuzen und auf die Atherogenese hin zu untersuchen, um die Robustheit des protektiven Effektes von CCL2 aus Gefäßwandzellen zu sichern. Außerdem muss diese lokal protektive Wirkung von CCL2 umfassend mechanistisch aufgearbeitet werden, um protektive Formen chronischer Entzündung besser verstehen und in zukünftigen antiinflammatorischen Ansätzen umgehen zu können. Die Übertragbarkeit auf den Menschen muss, wie bei allen murinen Studien, mit Vorsicht gesehen werden. Entsprechende histopathologische Korrelationsstudien mit Chemokinen in stabilen und instabilen humanen atherosklerotischen Plaques sind notwendig, um Extrapolationen zu ermöglichen. In Zusammenschau mit den nur moderaten Effekten der CANTOS Studie ist es sinnvoll, zukünftig die Rolle proinflammatorischer Moleküle in den verschiedenen Kompartimenten zunächst differentiell zu analysieren. Wenn sich die Kompartiment spezifische protektive Rolle von weiteren Chemokinen bestätigen sollte, wäre außerdem die Frage, wie man eine spezifische Umgehung protektiver Kompartimente in humanen antiinflammatorischen Therapieansätzen ermöglichen kann.

## 6. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine Volkskrankheit, deren entzündliche Komponente schon von Rudolf Virchow im 19. Jahrhundert analysiert wurde [11-13, 95]. Zytokine und Chemokine wurden als wichtige Mediatoren entzündlicher Prozesse, unter anderem in der Atherosklerose identifiziert [3]. Eine Vielzahl von Studien, darunter genomweite Assoziationsstudien, Mausstudien und vor Kurzem auch eine breit angelegte therapeutische Interventionsstudie, wiesen in der Vergangenheit die inflammatorische Hypothese der Atherosklerose nach [3, 145, 247, 274, 283]. Trotzdem waren die Effekte einer IL1- $\beta$  Inhibition in Menschen mit kardiovaskulären Erkrankungen weniger eindeutig als erwartet [23]. Eine signifikante Zunahme schwerer Infektionen beeinträchtigte die signifikante Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse in einer der anti-IL1- $\beta$  Behandlungsgruppen [19]. Bis heute haben eine Vielzahl von *in vivo* Studien mittels systemischer Knock-Out Mäuse die Rolle Chemokin vermittelter Entzündung in der Atherosklerose untersucht. Hierbei wurden die schädlichen Effekte hauptsächlich über Veränderungen in der Leukozytenmobilisation und Leukozytenrekrutierung über das Knochenmark und das Endothel erklärt [3, 274]. Vor Kurzem zeigten erste *in vivo* Studien, dass SMCs in der subendothelialen Nische Zytokine und Chemokine *in vivo* wahrnehmen können. Hierdurch kommt es zu phänotypischen und räumlich-zeitlichen Veränderungen der SMC Verteilung im Plaque. Ein systemischer Knock-Out des IL1-Rezeptors, eine systemische anti-IL1- $\beta$  Antikörper Applikation und ein SMC spezifischer Knock-Out des IL1-Rezeptors zeigten ähnliche Plaque stabilisierende Wirkungen von IL1- $\beta$  in der späten Atherosklerose auf [142, 231].

Ob SMCs selbst *in vivo* zur chemokinvermittelten Entzündung beitragen und wie die subendothelial ablaufende Entzündung im Rahmen der Atheroprogression beeinflusst wird, bleibt unklar. Außerdem konnte bis heute, aufgrund der schweren intravitalem Erreichbarkeit des Plaqueinneren durch moderne intravitalemikroskopische Techniken, eine Visualisierung von SMC-Leukozyteninteraktionen in atherosklerotischer Entzündung nicht durchgeführt werden. Diese Arbeit gibt Hinweise für überraschend dynamische Zell-Interaktionen zwischen SMCs und myeloiden Leukozyten in atherosklerotischen Plaques *in vivo*. Außerdem wird hier gezeigt, dass CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen überraschende stark atheroprotektive Effekte auf die Atheroprogression hat. Der proatherogene Effekt von CCL2 sowohl in der frühen als auch in der späten Atherosklerose wurde in der Vergangenheit wiederholt nachgewiesen [21, 130, 148, 163].

Der NG2<sup>+</sup> spezifischer Knock-Out von CCL2 beschleunigt jedoch in dieser Arbeit die atherosklerotische Krankheitsentstehung in der Arteria Brachiocephalica und der Aorta, nicht

aber an der Aortenklappe. Die Analyse der Plauekcomposition zeigt eine signifikante Zunahme der Bedeckung des Plaques mit einer ACTA2<sup>+</sup> fibrösen Kappe in der Arteria Brachiocephalica und der Aortenklappe in Tieren mit mangelnder CCL2 Produktion in NG2<sup>+</sup> Zellen als Zeichen einer vermehrten Plauestabilität. Allerdings könnten diese Unterschiede darauf zurückgeführt werden, dass fortgeschrittenere Plaques regelmäßig auch besser entwickelte fibröse Kappen aufweisen [279]. Der relative LGALS3<sup>+</sup> Makrophagengehalt der Plaques zeigte keinen signifikanten Unterschied in den analysierten Lokalisationen. CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen scheint die Monozytenrekrutierung und das Makrophagenüberleben also nicht zu beeinflussen. Zusammengefasst zeigen diese Daten eine protektive Rolle von CCL2 aus Gefäßwandzellen in der subendothelialen Nische in der Atherogenese auf.

In zukünftigen Studien sollte die Rolle von Chemokinen Kompartiment spezifisch analysiert werden, um die Effekte auf Leukozytenmobilisierung, Leukozytenrekrutierung und Leukozytenprogrammierung nach Überquerung der endothelialen Barriere voneinander unterscheiden zu können. Eine generalisierte Hemmung von Chemokinen in der Atherosklerose könnte auch protektive Formen chronischer Entzündung unterdrücken und dadurch die vorteilhaften Effekte einer antiinflammatorischen Therapie kompromittieren.

## 7. Summary

Atherosclerosis is a widespread disease, whose inflammatory component has already been described by Rudolf Virchow in the 19<sup>th</sup> century [11-13, 95]. Since then cytokines and chemokines have evolved as important mediators of inflammation, also in the context of atherosclerosis [3]. A multitude of studies involving human genome wide association studies, mouse studies and lately also large therapeutic interventional studies have proven the inflammatory hypothesis in atherosclerosis [3, 145, 247, 274, 283]. However, the effects of inhibiting IL1- $\beta$  in humans with cardiovascular disease were not as beneficial as expected [23]. A significant increase in severe infections compromised the significant decrease in cardiovascular events in one of the anti IL1- $\beta$  antibody treatment groups [19]. To date, numerous *in vivo* studies have analyzed the effects of chemokine driven inflammation in full knock-out mice, explaining the detrimental effects through changes in leukocyte mobilization and leukocyte recruitment in the bone marrow and at the endothelium [3, 274]. Recently, first *in vivo* studies showed that cytokines and chemokines can be sensed by smooth muscle cells in the subendothelial niche, leading to phenotypic and spatiotemporal changes of SMCs in atherosclerosis. A systemic deletion of the IL1-receptor, systemic anti IL-1 $\beta$  antibody treatment and a smooth muscle cell specific deletion of the IL1-receptor revealed similar plaque stabilizing effects of IL1- $\beta$  in late stage atherosclerosis, revealing a stage dependent protective effect of canonical cytokines [142, 231].

However, whether smooth muscle cells contribute themselves to chemokine driven inflammation *in vivo* and how inflammation within the subendothelial compartment shapes atheroprogession, remains unclear. Furthermore, due to elaborate accessibility of the plaque's inner life for modern intravital imaging techniques, visualization of SMC – leukocyte interactions in atherosclerotic inflammation have never been performed *in vivo* before. This work provides evidence for surprisingly dynamic interactions between SMCs and myeloid leukocytes within atherosclerotic plaques *in vivo*. Furthermore and most intriguingly, it is shown here that a conditional, cell-specific knock-out of the chemokine CCL2 in NG2<sup>+</sup> cells seems to provide strongly atheroprotective cues. CCL2 has been repeatedly shown to be proatherogenic in early as well as late stage atherosclerosis [21, 130, 148, 163].

NG2<sup>+</sup> specific deletion of CCL2 accelerates atherosclerotic disease progression in the brachiocephalic artery and the aorta but not at the aortic valve. Analysis of the plaque composition reveals a significant increase of the plaques' fibrous cap coverage with ACTA2<sup>+</sup> cells in the brachiocephalic artery and the aortic valve of mice that lack CCL2 expression in NG2<sup>+</sup> cells. However, these changes might be attributed to the fact that fibrous caps are

regularly better developed in mature atherosclerotic plaques [279]. The relative LGALS3<sup>+</sup> macrophage content in atherosclerotic plaques did not change in either of the locations, suggesting that monocyte recruitment and macrophage survival is not influenced by NG2<sup>+</sup> SMC derived CCL2. Hence, these data suggest a protective role of CCL2 in the subendothelial niche in atherosclerosis.

In future studies, the role of chemokines should be investigated in a compartment specific manner to discriminate between the role of chemokines in leukocyte mobilization, leukocyte recruitment and leukocyte programming after having passed the endothelial barrier. A systemic chemokine inhibition in atherosclerosis might also suppress protective forms of chronic inflammation and hence compromise the favorable effects of anti-inflammatory therapy.



## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg möchte ich herzlichst dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner überaus versierten Arbeitsgruppe anzufertigen. Bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg möchte ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die geteilte Expertise bedanken, die besonders wertvoll für die Entstehung dieser Arbeit war.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Konstantin Stark, der mit seiner strukturierten Herangehensweise, seiner äußerst angenehmen und motivierenden Art als Mitbetreuer jederzeit eine große Hilfe war.

Außerdem möchte ich Michael Lorenz und Anna Titova danken, die mir täglich bei Fragen mit exzellentem Rat begegnet sind. Für die hervorragende Tierpflege und die hochwertige technische Assistenz bei der Genotypisierung möchte ich mich bei Nicole Blount, Beate Jantz und Sebastian Helmer bedanken. Bei Raffaele Coletti möchte ich mich für die Einarbeitung in die 2-Photonenmikroskopie bedanken.

Meinen Eltern, Hilda Pekayvaz und Berc Pekayvaz, danke ich von ganzem Herzen für die lebenslange tolle und stetige Unterstützung, ohne die das Medizinstudium als auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Meiner Tante Ani Setyan und meinem Onkel Kirkor Sahakoğlu danke ich ebenfalls von Herzen für ihren Rückhalt und ihre breite Teilhabe.

Besonders möchte ich meiner Freundin, Marianne Kürsten, für ihre unerschöpfliche Geduld und Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit danken.

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Atherogenese
- Abbildung 2: Die embryologische Herkunft vaskulärer glatter Muskelzellen großer muriner Gefäße
- Abbildung 3: Phänotypische Modulierung von SMCs in der Atherogenese
- Abbildung 4: Zusammenfassung des aktuellen Wissensstands zum Beitrag von Endothelzellen, Makrophagen und SMCs zur chronischen Entzündung in der Atherogenese
- Abbildung 5: Charakterisierung NG2<sup>+</sup> wandständiger Zellen in der Atherogenese
- Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie der atherosklerotischen Maus Aorten
- Abbildung 7: Zell-Zell Kontakte zwischen NG2<sup>+</sup> Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems
- Abbildung 8: NG2<sup>+</sup> SMCs interagieren in vivo in atherosklerotischen Plaques der Arteria Carotis mit myeloiden Leukozyten
- Abbildung 9: Die Migration LysM<sup>+</sup> myeloider Leukozyten in der Gefäßwand wird durch die Interaktion mit NG2<sup>+</sup> SMCs gehemmt
- Abbildung 10: CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen reduziert die Plaquesgröße und Plaquesbedeckung mit fibröser Kappe im Bereich des Aortenbogens
- Abbildung 11: CCL2 aus NG2<sup>+</sup> Zellen reduziert die Plaquesbedeckung mit fibröser Kappe, jedoch nicht die Plaquesgröße auf Aortenklappenebene
- Abbildung 12: Systemische Veränderungen in Ng2-Cre; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren
- Abbildung 13: Beispielhafte Gating-Strategie der kompensierten durchflusszytometrische Blut, Knochenmark und Milz

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer Ccl2mcherryflox Lokus

Tabelle 2: Reagenzien Ccl2mcherryflox Lokus

Tabelle 3: Zyklen und Annealing Temperaturen CCL2mcherryflox Lokus

Tabelle 4: Primer Ng2-DsRed Lokus

Tabelle 5: Reagenzien Ng2-DsRed Lokus

Tabelle 6: Zyklen und Annealing Temperaturen Ng2-DsRed Lokus

Tabelle 7: Primer Ng2-Cre Lokus

Tabelle 8: Reagenzien Ng2-Cre Lokus

Tabelle 9: Zyklen und Annealing Temperaturen Ng2-Cre Lokus

Tabelle 10: Primer Cx3cr1-GFP Lokus

Tabelle 11: Reagenzien Cx3cr1-GFP Lokus

Tabelle 12: Zyklen und Annealing Temperaturen Cx3cr1-GFP Lokus

Tabelle 13: Primer LysM-eGFP Lokus

Tabelle 14: Reagenzien LyM-eGFP Lokus

Tabelle 15: Zyklen und Annealing Temperaturen LysM-eGFP Lokus

Tabelle 16: Primer ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

Tabelle 17: Reagenzien ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

Tabelle 18: Zyklen und Annealing Temperaturen ApoE<sup>-/-</sup> Lokus

Tabelle 19: Herstellung Ammonium-Chlorid-Kalium Lysepuffer Stock Lösung (10x konzentriert)

Tabelle 20: Enzym-Mix 1 Aortenverdau

Tabelle 21: Enzym-Mix 2 Aortenverdau

Tabelle 22: Zyklen und Annealing Temperaturen RT-PCR

Tabelle 23: Immunfluoreszenz Protokolle

Tabelle 24: Zusammenfassung der Antikörper

## 11. Abkürzungsverzeichnis

ACC	American college of cardiology
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTA-2	Actin alpha 2
ADVANCE	Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron-MR Controlled Evaluation
AHA	American heart association
ApoE	Apolipoprotein E
Arriba	Aufgabe gemeinsam definieren, Risiko subjektiv, Risiko objektiv, Information über Präventionsmöglichkeiten, Bewertung der Präventionsmöglichkeiten und Absprache über weiteres Vorgehen
ASS	Acetylsalicylsäure
ASSIGN	Assessing Cardiovascular Risk Using SIGN Guidelines
BCA	Brachiocephalarterie
CABG	Coronary artery bypass graft
CANTOS	Canakinumab. Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2
CCL5	C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 5
CCR1	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 1
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CSPG4	Chondroitin sulfat proteoglycan 4
CURE	Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events
CX3CL1	C-X3-C Motiv Chemokin Ligand 1
CX3CR1	C-X3-C Motiv Chemokin Rezeptor 1

---

CXCL1	CXC-Motiv-Chemokin 1
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 2
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DES	Drug Eluting Stent
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DI	Deziliter
ERT2	Estrogen receptor 2
ESC	European society of cardiology
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FFR	Fractional flow reserve
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HFD	High fat diet
hsCRP	High-sensitive C-reactive protein
IL1- $\beta$	Interleukin 1- $\beta$
IL1R1	Interleukin 1 Rezeptor Typ 1
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF-4	Kruppel-like factor 4
l	Liter
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mg	Milligram
MIF	Macrophage migration inhibitory factor

---

MMF	Midazolam, Medetomidin, Fentanyl
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NG2	Neuro-glial antigen 2
NO	Stickstoffmonoxid
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PCR	Polymerase chain reaction
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PLATO	Platelet Inhibition and Patient Outcomes
PROCAM	Prospective Cardiovascular Munster Study
rpm	Revolutions per minute
SCA-1	Stem cells antigen-1
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SMC	Smooth muscle cell
SYNTAX	SYnergy between PCI with TAXUS and Cardiac Surgery
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRITON	TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition
UKPDS	UK Prospective Diabetes Study
VADT	Veterans Affairs Diabetes Trial
WHO	World Health Organisation

## 12. Literaturverzeichnis

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
2. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
3. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
4. European Stroke, O., et al., *ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2011. **32**(22): p. 2851-906.
5. Lee, M.K., et al., *High-density lipoprotein inhibits human M1 macrophage polarization through redistribution of caveolin-1*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(4): p. 741-51.
6. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 230-9; discussion 239-40.
7. Ross, R. and J.A. Glomset, *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science, 1973. **180**(4093): p. 1332-9.
8. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Boren, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-44.
9. Anitschkow, N.C., S., *Ueber experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung fur die Entstehung einiger pathologischer Prozesse*. Zentralbl Allg Pathol 1913. **24**:1-9.
10. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 692-702.
11. Virchow, R., *Phlogose und Thrombose im Gefässsystem. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt am Main, Meidinger Sohn & Company, 1856. **458-636**.
12. Virchow, R., *Vortrag über den atheromatösen Process der Arterien*. . Wiener medizinische Wochenschrift, 1856. **51**: **810-812**.
13. Virchow, R., *Die Lehre von der chronischen Endoarteriitis*. Virchows Archiv, 1879. **77**: **380-383**.
14. Marchand, F., *Über Arteriosklerose. Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin*. 21. Kongress, Leipzig, 1904. **23-59**.
15. Leary, T., *Atherosclerosis, the important form of arteriosclerosis, a metabolic disease*. JAMA, 1935. **105**(7):**475-481**.
16. Mendis, S.P., Pekka; Norrving, Bo, *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Published by the World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization . 2011.
17. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999-1008.
18. Vlayen, J., et al., *Atherosclerotic cardiovascular diseases in Belgium: a cost-of-illness analysis*. Cardiovasc Drugs Ther, 2008. **22**(6): p. 487-94.



19. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
20. Authors/Task Force, M., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. Atherosclerosis, 2016. **252**: p. 207-274.
21. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
22. Ridker, P.M., et al., *Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial*. Lancet, 2018. **391**(10118): p. 319-328.
23. Weber, C. and P. von Hundelshausen, *CANTOS Trial Validates the Inflammatory Pathogenesis of Atherosclerosis: Setting the Stage for a New Chapter in Therapeutic Targeting*. Circ Res, 2017. **121**(10): p. 1119-1121.
24. Ridker, P.M., et al., *Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events*. N Engl J Med, 2018.
25. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
26. Osler, W., *Angina Pectoris and Arteriosclerosis*. JAMA, 2015. **314**(18): p. 1981.
27. Aboyans, V., et al., *2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS)*. Eur Heart J, 2018. **39**(9): p. 763-816.
28. Bartelink, M.-L., *Epidemiology and risk factors*, in *ESC CardioMed*. 2018, Oxford University Press.
29. de Weerd, M., et al., *Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis according to age and sex: systematic review and metaregression analysis*. Stroke, 2009. **40**(4): p. 1105-13.
30. World-Health-Organisation, *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2017: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
31. Bloom, D.E., Ca ero, E.T., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowa , M., Pandya, A., Prettnner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A.Z., & Weinstein, C., *The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases*. 2011: Geneva: World Economic Forum.
32. Castelli, W.P., et al., *The filter cigarette and coronary heart disease: the Framingham study*. Lancet, 1981. **2**(8238): p. 109-13.
33. Dawber, T.R. and W.B. Kannel, *The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease*. Circulation, 1966. **34**(4): p. 553-5.
34. Dawber, T.R., et al., *Eggs, serum cholesterol, and coronary heart disease*. Am J Clin Nutr, 1982. **36**(4): p. 617-25.

35. Friedman, G.D., et al., *An evaluation of follow-up methods in the Framingham Heart Study*. Am J Public Health Nations Health, 1967. **57**(6): p. 1015-24.
36. Gordon, T., et al., *Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study*. Ann Intern Med, 1977. **87**(4): p. 393-7.
37. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. Am J Med, 1977. **62**(5): p. 707-14.
38. Gordon, T., et al., *Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study*. Arch Intern Med, 1981. **141**(9): p. 1128-31.
39. Kahn, H.A. and T.R. Dawber, *The development of coronary heart disease in relation to sequential biennial measures of cholesterol in the Framingham study*. J Chronic Dis, 1966. **19**(5): p. 611-20.
40. Kahn, H.A., et al., *The Framingham Eye Study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham Heart Study*. Am J Epidemiol, 1977. **106**(1): p. 33-41.
41. Kannel, W.B., et al., *Risk Factors in Coronary Heart Disease. An Evaluation of Several Serum Lipids as Predictors of Coronary Heart Disease; the Framingham Study*. Ann Intern Med, 1964. **61**: p. 888-99.
42. Kannel, W.B., et al., *Comparison of Serum Lipids in the Prediction of Coronary Heart Disease. Framingham Study Indicates That Cholesterol Level and Blood Pressure Are Major Factors in Coronary Heart Disease; Effect of Obesity and Cigarette Smoking Also Noted*. R I Med J, 1965. **48**: p. 243-50.
43. Kannel, W.B., et al., *Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study*. Circulation, 1967. **35**(4): p. 734-44.
44. [www.framingham.com](http://www.framingham.com), *A Timeline of Milestones from The Framingham Heart Study*. 2018: [www.framingham.com](http://www.framingham.com). p. <http://www.framingham.com/heart/timeline.htm>.
45. Myers, J., et al., *Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 793-801.
46. Piepoli, M.F., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. Eur Heart J, 2016. **37**(29): p. 2315-2381.
47. Doll, R., et al., *Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors*. BMJ, 2004. **328**(7455): p. 1519.
48. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. **368**(14): p. 1279-90.
49. Perk, J., et al., *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)*. Eur Heart J, 2012. **33**(13): p. 1635-701.
50. Aguilar, M., et al., *Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012*. JAMA, 2015. **313**(19): p. 1973-4.

51. Hubert, H.B., et al., *Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 1983. **67**(5): p. 968-77.
52. Stefan, N., et al., *Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2013. **1**(2): p. 152-62.
53. Castelli, W.P., *Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study*. *Can J Cardiol*, 1988. **4 Suppl A**: p. 5a-10a.
54. Barzilai, N., et al., *Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity*. *JAMA*, 2003. **290**(15): p. 2030-40.
55. Djousse, L. and J.M. Gaziano, *Egg consumption in relation to cardiovascular disease and mortality: the Physicians' Health Study*. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(4): p. 964-9.
56. He, F.J.M., Graham A., *Blood pressure is the most important cause of death and disability in the world* *European Heart Journal Supplements*, 2007. **Volume 9**: p. Pages B23–B28.
57. Lewington, S., et al., *Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies*. *Lancet*, 2002. **360**(9349): p. 1903-13.
58. Kannel, W.B., et al., *Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience*. *Am Heart J*, 1990. **120**(3): p. 672-6.
59. Bachmann, J.M., et al., *Association between family history and coronary heart disease death across long-term follow-up in men: the Cooper Center Longitudinal Study*. *Circulation*, 2012. **125**(25): p. 3092-8.
60. Marenberg, M.E., et al., *Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(15): p. 1041-6.
61. Moran, A.E., et al., *Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study*. *Circulation*, 2014. **129**(14): p. 1483-92.
62. Nguyen, A.T., et al., *Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction?* *Circ Res*, 2013. **112**(1): p. 17-22.
63. *Reprint: 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults*. *J Am Pharm Assoc (2003)*, 2013: p. e1.
64. *Reprint: 2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults*. *J Am Pharm Assoc (2003)*, 2013: p. e3.
65. *Reprint: 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk*. *J Am Pharm Assoc (2003)*, 2013: p. e4.
66. Grundy, S.M., et al., 2018  
*AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2018.
67. Whelton, P.K., et al., 2017  
*ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **71**(19): p. e127-e248.
68. Kardiologie, D.G.f., *Diagnostik und Therapie der Dyslipidämien*. Leitlinien DGK, 2012

69. Robinson, J.G., et al., *Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events*. N Engl J Med, 2015. **372**(16): p. 1489-99.
70. Sabatine, M.S., et al., *Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events*. N Engl J Med, 2015. **372**(16): p. 1500-9.
71. Diabetes, C., et al., *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
72. Duckworth, W., et al., *Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2009. **360**(2): p. 129-39.
73. Group, A.C., et al., *Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. **358**(24): p. 2560-72.
74. Group, A.S., et al., *Long-term effects of intensive glucose lowering on cardiovascular outcomes*. N Engl J Med, 2011. **364**(9): p. 818-28.
75. Zinman, B., et al., *Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. **373**(22): p. 2117-28.
76. Emdin, C.A., et al., *Blood pressure lowering in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2015. **313**(6): p. 603-15.
77. Lindholm, L.H., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol*. Lancet, 2002. **359**(9311): p. 1004-10.
78. Schrier, R.W., et al., *Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 1086-97.
79. Hansson, L., et al., *Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial*. HOT Study Group. Lancet, 1998. **351**(9118): p. 1755-62.
80. Officers, A., A.C.R.G.T.A. Coordinators for the, and T. Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack, *Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT)*. JAMA, 2002. **288**(23): p. 2981-97.
81. Group, S.R., et al., *A Randomized Trial of Intensive versus Standard Blood-Pressure Control*. N Engl J Med, 2015. **373**(22): p. 2103-16.
82. Saiz, L.C., et al., *Blood pressure targets for the treatment of people with hypertension and cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **7**: p. CD010315.
83. Antithrombotic Trialists, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1849-60.
84. Group, A.S.C., et al., *Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus*. N Engl J Med, 2018. **379**(16): p. 1529-1539.
85. Gaziano, J.M., et al., *Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2018. **392**(10152): p. 1036-1046.
86. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1045-57.

87. Neumann, F.J., et al., *2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization*. Eur Heart J, 2018.
88. Katritsis, D.G. and J.P. Ioannidis, *Percutaneous coronary intervention versus conservative therapy in nonacute coronary artery disease: a meta-analysis*. Circulation, 2005. **111**(22): p. 2906-12.
89. Bucher, H.C., et al., *Percutaneous transluminal coronary angioplasty versus medical treatment for non-acute coronary heart disease: meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ, 2000. **321**(7253): p. 73-7.
90. Stergiopoulos, K. and D.L. Brown, *Initial coronary stent implantation with medical therapy vs medical therapy alone for stable coronary artery disease: meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2012. **172**(4): p. 312-9.
91. Windecker, S., et al., *Revascularisation versus medical treatment in patients with stable coronary artery disease: network meta-analysis*. BMJ, 2014. **348**: p. g3859.
92. Fearon, W.F., et al., *Clinical Outcomes and Cost-Effectiveness of Fractional Flow Reserve-Guided Percutaneous Coronary Intervention in Patients With Stable Coronary Artery Disease: Three-Year Follow-Up of the FAME 2 Trial (Fractional Flow Reserve Versus Angiography for Multivessel Evaluation)*. Circulation, 2018. **137**(5): p. 480-487.
93. Palmerini, T., et al., *Clinical outcomes with percutaneous coronary revascularization vs coronary artery bypass grafting surgery in patients with unprotected left main coronary artery disease: A meta-analysis of 6 randomized trials and 4,686 patients*. Am Heart J, 2017. **190**: p. 54-63.
94. Syverson, D., *Dissertation: Theorien zur Pathogenese der Arteriosklerose*. Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, 2013.
95. Aschoff, L., *Virchows Lehre von den Degeneration (passiven Vorgängen) und ihre Weiterentwicklung*. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie. 1921. **235**: p. 152-185.
96. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 223-61.
97. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
98. Navab, M., et al., *The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(7): p. 831-42.
99. Morel, D.W., J.R. Hessler, and G.M. Chisolm, *Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid*. J Lipid Res, 1983. **24**(8): p. 1070-6.
100. Griendling, K.K. and R.W. Alexander, *Oxidative stress and cardiovascular disease*. Circulation, 1997. **96**(10): p. 3264-5.
101. Tauber, J.P., J. Cheng, and D. Gospodarowicz, *Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells*. J Clin Invest, 1980. **66**(4): p. 696-708.
102. Baker, D.P., et al., *LDL, scavenger, and beta-VLDL receptors on aortic endothelial cells*. Arteriosclerosis, 1984. **4**(3): p. 248-55.
103. Berliner, J.A., et al., *Monocyte chemotactic factor produced by large vessel endothelial cells in vitro*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(3): p. 254-8.

104. Berliner, J.A., et al., *Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions*. J Clin Invest, 1990. **85**(4): p. 1260-6.
105. Vora, D.K., et al., *Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 810-8.
106. Kume, N., M.I. Cybulsky, and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1138-44.
107. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm, *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation*. Arteriosclerosis, 1984. **4**(4): p. 357-64.
108. Suzuki, H., et al., *In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography*. Hypertension, 1995. **25**(5): p. 1083-9.
109. Lacy, F., D.T. O'Connor, and G.W. Schmid-Schonbein, *Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension*. J Hypertens, 1998. **16**(3): p. 291-303.
110. Grunfeld, S., et al., *Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats*. Hypertension, 1995. **26**(6 Pt 1): p. 854-7.
111. Vanhoutte, P.M. and C.M. Boulanger, *Endothelium-dependent responses in hypertension*. Hypertens Res, 1995. **18**(2): p. 87-98.
112. Cosentino, F. and Z.S. Katusic, *Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries*. Circulation, 1995. **91**(1): p. 139-44.
113. Bouloumie, A., et al., *Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production*. Hypertension, 1997. **30**(4): p. 934-41.
114. Michael Pittilo, R., *Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(4): p. 219-30.
115. Tzima, E., et al., *A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 426-31.
116. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 581-6.
117. McEver, R.P., *P-selectin and PSGL-1: exploiting connections between inflammation and venous thrombosis*. Thromb Haemost, 2002. **87**(3): p. 364-5.
118. Rozenberg, I., et al., *Deletion of L-selectin increases atherosclerosis development in ApoE<sup>-/-</sup> mice*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21675.
119. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
120. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
121. Smalley, D.M., et al., *Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(4): p. 585-90.
122. Nageh, M.F., et al., *Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(8): p. 1517-20.

123. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
124. Davies, M.J., et al., *The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis*. J Pathol, 1993. **171**(3): p. 223-9.
125. Ostermann, G., et al., *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 151-8.
126. Williams, L.A., et al., *Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM)*. Mol Immunol, 1999. **36**(17): p. 1175-88.
127. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.
128. Teupser, D., et al., *Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17795-800.
129. Koenen, R.R., et al., *Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice*. Nat Med, 2009. **15**(1): p. 97-103.
130. Combadiere, C., et al., *Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. Circulation, 2008. **117**(13): p. 1649-57.
131. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 185-94.
132. Del Toro, R., et al., *Nestin(+) cells direct inflammatory cell migration in atherosclerosis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12706.
133. Soehnlein, O., et al., *Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(3): p. 471-81.
134. Zerneck, A., et al., *Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection*. Sci Signal, 2009. **2**(100): p. ra81.
135. Doring, Y., et al., *Vascular CXCR4 Limits Atherosclerosis by Maintaining Arterial Integrity: Evidence From Mouse and Human Studies*. Circulation, 2017. **136**(4): p. 388-403.
136. van der Vorst, E.P., Y. Doring, and C. Weber, *Chemokines and their receptors in Atherosclerosis*. J Mol Med (Berl), 2015. **93**(9): p. 963-71.
137. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
138. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
139. Chi, H., et al., *Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1678-85.
140. Piccioli, P. and A. Rubartelli, *The secretion of IL-1beta and options for release*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 425-9.
141. Kirii, H., et al., *Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 656-60.
142. Gomez, D., et al., *Interleukin-1beta has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1418-1429.

143. Yla-Herttuala, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5252-6.
144. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
145. Coll, B., C. Alonso-Villaverde, and J. Joven, *Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker?* Clin Chim Acta, 2007. **383**(1-2): p. 21-9.
146. Georgakis, M.K., et al., *Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Risk of Stroke: Meta-Analysis of Population-Based Studies Involving 17 180 Individuals*. Circ Res, 2019. **125**(8): p. 773-782.
147. Kalinowska, A. and J. Losy, *Investigational C-C chemokine receptor 2 antagonists for the treatment of autoimmune diseases*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(9): p. 1267-79.
148. Lin, J., V. Kakkar, and X. Lu, *Impact of MCP-1 in atherosclerosis*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(28): p. 4580-8.
149. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
150. Valente, A.J., et al., *Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture*. Biochemistry, 1988. **27**(11): p. 4162-8.
151. Yoshimura, T., et al., *Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1956-62.
152. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
153. Klouche, M., et al., *Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1799-805.
154. Song, Y., et al., *Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(1): p. 103-9.
155. Nelken, N., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. The Journal of clinical investigation, 1991. **88**(4): p. 1121-1127.
156. Dwivedi, A., E.E. Anggard, and M.J. Carrier, *Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFkappaB*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(1): p. 239-44.
157. Mateo, T., et al., *Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5577-86.
158. Labonte, A.C., A.C. Tosello-Tramont, and Y.S. Hahn, *The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases*. Mol Cells, 2014. **37**(4): p. 275-85.
159. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13531-6.



160. Nakashima, Y., et al., *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(5): p. 1159-65.
161. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
162. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. *Mol Cell*, 1998. **2**(2): p. 275-81.
163. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(6): p. 773-8.
164. Huo, Y., et al., *The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1307-14.
165. Kowalski, J., et al., *Levels of sICAM-1, sVCAM-1 and MCP-1 in patients with hyperlipoproteinemia IIa and -IIb*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2001. **39**(2): p. 48-52.
166. Cai, Q., L. Lanting, and R. Natarajan, *Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(12): p. 2263-70.
167. Hardy, L.A., et al., *Examination of MCP-1 (CCL2) partitioning and presentation during transendothelial leukocyte migration*. *Lab Invest*, 2004. **84**(1): p. 81-90.
168. Spinetti, G., et al., *Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1397-402.
169. Tous, M., et al., *Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(4): p. 1078-84.
170. Rull, A., et al., *Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism*. *Exp Mol Pathol*, 2007. **83**(3): p. 361-6.
171. Jemaa, R., et al., *Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients*. *Clin Chim Acta*, 2008. **390**(1-2): p. 122-5.
172. Dragomir, E., et al., *High glucose conditions induce upregulation of fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 in human smooth muscle cells*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(6): p. 1155-65.
173. Roca, H., et al., *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
174. Rodriguez-Sanabria, F., et al., *Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role*. *J Mol Histol*, 2010. **41**(6): p. 379-86.
175. Rull, A., et al., *Expression of cytokine genes in the aorta is altered by the deficiency in MCP-1: effect of a high-fat, high-cholesterol diet*. *Cytokine*, 2010. **50**(2): p. 121-8.

176. Rull, A., et al., *The role of combined assessment of defense against oxidative stress and inflammation in the evaluation of peripheral arterial disease*. *Curr Mol Med*, 2011. **11**(6): p. 453-64.
177. van Gils, J.M., et al., *The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(2): p. 136-43.
178. Sans, T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and paraoxonase-1 and 3 levels in patients with sepsis treated in an intensive care unit: a preliminary report*. *Clin Chem Lab Med*, 2012. **50**(8): p. 1409-15.
179. Aragones, G., et al., *Human Duffy blood group alloantigen system influences the measurement of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in serum but not in plasma*. *Clin Lab*, 2012. **58**(1-2): p. 185-8.
180. Sierra-Filardi, E., et al., *CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile*. *The Journal of Immunology*, 2014. **192**(8): p. 3858-3867.
181. Rull, A., et al., *Understanding the role of circulating chemokine (C-C motif) ligand 2 in patients with chronic ischemia threatening the lower extremities*. *Vasc Med*, 2014. **19**(6): p. 442-51.
182. Sierra-Filardi, E., et al., *CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile*. *J Immunol*, 2014. **192**(8): p. 3858-67.
183. Kuang, Y.Y., et al., *[Expression of monocyte chemotactic protein-1 and its receptor in sudden coronary death]*. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2014. **30**(6): p. 413-5, 418.
184. O'Connor, T., L. Borsig, and M. Heikenwalder, *CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015. **15**(2): p. 105-18.
185. Sun, R.L., et al., *CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2) Suppresses High Density Lipoprotein (HDL) Internalization and Cholesterol Efflux via CC-Chemokine Receptor 2 (CCR2) Induction and p42/44 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activation in Human Endothelial Cells*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(37): p. 19532-44.
186. Franca, C.N., et al., *Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. **131**(12): p. 1215-1224.
187. Bianconi, V., et al., *The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1*. *Curr Opin Hematol*, 2018. **25**(1): p. 44-51.
188. Jordan, S., et al., *Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool*. *Cell*, 2019. **178**(5): p. 1102-1114 e17.
189. Georgakis, M.K., et al., *Genetically Determined Levels of Circulating Cytokines and Risk of Stroke*. *Circulation*, 2019. **139**(2): p. 256-268.
190. Maus, U., et al., *Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(6): p. H2584-91.
191. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
192. Silvestre-Roig, C., et al., *Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death*. *Nature*, 2019. **569**(7755): p. 236-240.

193. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. Journal of interferon & cytokine research, 2009. **29**(6): p. 313-326.
194. Lim, S.Y., et al., *Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis*. Oncotarget, 2016. **7**(19): p. 28697-710.
195. Hayes, I.M., et al., *Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 397-403.
196. Carson, W.F.t., et al., *Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6*. Cell Immunol, 2017. **314**: p. 63-72.
197. Kim, Y.G., et al., *The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 769-80.
198. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
199. Winter, C., et al., *Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis*. Cell Metab, 2018. **28**(1): p. 175-182 e5.
200. Moretti, A., et al., *Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1151-65.
201. Dettman, R.W., et al., *Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart*. Dev Biol, 1998. **193**(2): p. 169-81.
202. Pouget, C., et al., *Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk*. Development, 2006. **133**(6): p. 1013-22.
203. Ambler, C.A., et al., *Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts*. Dev Biol, 2001. **234**(2): p. 352-64.
204. Etchevers, H.C., et al., *The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain*. Development, 2001. **128**(7): p. 1059-68.
205. Majesky, M.W., *Developmental basis of vascular smooth muscle diversity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1248-58.
206. Sinha, S., D. Iyer, and A. Granata, *Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(12): p. 2271-88.
207. Haimovici, H. and N. Maier, *Autogenous vein grafts in experimental canine atherosclerosis. Their fate in the abdominal aorta and peripheral arteries*. Arch Surg, 1974. **109**(1): p. 95-102.
208. Haimovici, H. and N. Maier, *Experimental canine atherosclerosis in autogenous abdominal aortic grafts implanted into the jugular vein*. Atherosclerosis, 1971. **13**(3): p. 375-84.
209. Gomez, D. and G.K. Owens, *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 156-64.

210. Shankman, L.S., et al., *Corrigendum: KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis*. Nat Med, 2016. **22**(2): p. 217.
211. Shankman, L.S., et al., *KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis*. Nat Med, 2015. **21**(6): p. 628-37.
212. Cherepanova, O.A., et al., *Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 657-65.
213. Gomez, D., et al., *Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections*. Nat Methods, 2013. **10**(2): p. 171-7.
214. Ackers-Johnson, M., et al., *Myocardin regulates vascular smooth muscle cell inflammatory activation and disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(4): p. 817-28.
215. Misra, A., et al., *Integrin beta3 regulates clonality and fate of smooth muscle-derived atherosclerotic plaque cells*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2073.
216. Martin, K., et al., *Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin*. Circ Res, 2009. **105**(3): p. 214-8.
217. Caplice, N.M., et al., *Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4754-9.
218. Rosenfeld, M.E., *Converting smooth muscle cells to macrophage-like cells with KLF4 in atherosclerotic plaques*. Nat Med, 2015. **21**(6): p. 549-51.
219. Wirka, R.C., et al., *Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis*. Nat Med, 2019. **25**(8): p. 1280-1289.
220. Schunkert, H., et al., *Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 333-8.
221. Mietus-Snyder, M., M.S. Gowri, and R.E. Pitas, *Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17661-70.
222. Zingg, J.M., et al., *Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 412-7.
223. Barlic, J., Y. Zhang, and P.M. Murphy, *Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 19167-76.
224. Burger-Kentischer, A., et al., *Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(13): p. 1561-6.
225. Braun, M., et al., *Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2568-75.
226. Braun, M., et al., *Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(12): p. 2571-9.

227. Endres, M., et al., *Focal expression of intercellular adhesion molecule-1 in the human carotid bifurcation*. Stroke, 1997. **28**(1): p. 77-82.
228. O'Brien, K.D., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 945-51.
229. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2013. **14**(1): p. 41-51.
230. Bot, I., et al., *CXCR4 blockade induces atherosclerosis by affecting neutrophil function*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**: p. 44-52.
231. Alexander, M.R., et al., *Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 70-9.
232. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. Science, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
233. Kojima, Y., et al., *CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis*. Nature, 2016. **536**(7614): p. 86-90.
234. Fernandez, D.M., et al., *Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques*. Nat Med, 2019.
235. Schurgers, L.J., et al., *Initiation and Propagation of Vascular Calcification Is Regulated by a Concert of Platelet- and Smooth Muscle Cell-Derived Extracellular Vesicles*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 36.
236. Goikuria, H., K. Vandebroek, and I. Alloza, *Inflammation in human carotid atheroma plaques*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **39**: p. 62-70.
237. Zheng, Y., et al., *Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists*. Nature, 2016. **540**(7633): p. 458-461.
238. Nasibullin, T.R., et al., *[Association of polymorphic markers of chemokine genes, their receptors, and CD14 gene with coronary atherosclerosis]*. Genetika, 2016. **52**(8): p. 966-74.
239. Khachatryan, V., et al., *Search for decays of stopped long-lived particles produced in proton-proton collisions at [Formula: see text]*. Eur Phys J C Part Fields, 2015. **75**(4): p. 151.
240. Terada, N., et al., *Immunohistochemical study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan expression in the small and large intestines*. Histochem Cell Biol, 2006. **126**(4): p. 483-90.
241. Rajantie, I., et al., *Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2084-6.
242. Ozerdem, U., E. Monosov, and W.B. Stallcup, *NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature*. Microvasc Res, 2002. **63**(1): p. 129-34.
243. Ozerdem, U., et al., *NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis*. Dev Dyn, 2001. **222**(2): p. 218-27.
244. Grako, K.A. and W.B. Stallcup, *Participation of the NG2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor*. Exp Cell Res, 1995. **221**(1): p. 231-40.

245. She, Z.G., et al., *NG2 Proteoglycan Ablation Reduces Foam Cell Formation and Atherogenesis via Decreased Low-Density Lipoprotein Retention by Synthetic Smooth Muscle Cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(1): p. 49-59.
246. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. *Cell*, 1992. **71**(2): p. 343-53.
247. von Scheidt, M., et al., *Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2017. **25**(2): p. 248-261.
248. Piedrahita, J.A., et al., *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4471-5.
249. Zhu, X., D.E. Bergles, and A. Nishiyama, *NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes*. *Development*, 2008. **135**(1): p. 145-57.
250. Faust, N., et al., *Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages*. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 719-26.
251. Jung, S., et al., *Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
252. Shi, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 590-601.
253. Ozerdem, U. and W.B. Stallcup, *Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation*. *Angiogenesis*, 2003. **6**(3): p. 241-9.
254. Belachew, S., et al., *Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(1): p. 169-86.
255. Ozerdem, U. and W.B. Stallcup, *Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan*. *Angiogenesis*, 2004. **7**(3): p. 269-76.
256. Karram, K., N. Chatterjee, and J. Trotter, *NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction*. *J Anat*, 2005. **207**(6): p. 735-44.
257. Trotter, J., K. Karram, and A. Nishiyama, *NG2 cells: Properties, progeny and origin*. *Brain Res Rev*, 2010. **63**(1-2): p. 72-82.
258. Sternberg, N., et al., *Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation*. *J Mol Biol*, 1986. **187**(2): p. 197-212.
259. Abremski, K., et al., *Bacteriophage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Site-specific DNA topoisomerase activity of the Cre recombination protein*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(1): p. 391-6.
260. Missirlis, P.I., D.E. Smailus, and R.A. Holt, *A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination*. *BMC Genomics*, 2006. **7**: p. 73.

261. Robert Lukowski, S.W., Pascal Weinmeister, Susanne Feil und Robert Feil, *Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus*. BIOSpektrum, 2005. **3/05 · 11. Jahrgang**: p. 287 - 290.
262. Kleppe, K., et al., *Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases*. J Mol Biol, 1971. **56(2)**: p. 341-61.
263. Beutner, E.H., *Immunofluorescent Staining: The Fluorescent Antibody Method*. Bacteriol Rev, 1961. **25(1)**: p. 49-76.
264. Lee, Y.T., et al., *Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances*. Lipids Health Dis, 2017. **16(1)**: p. 12.
265. Pawley, J., *Handbook of biological confocal microscopy*. 2010: Springer Science & Business Media.
266. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nature methods, 2005. **2(12)**: p. 932.
267. Shapiro, H.M., *Practical flow cytometry*. 2005: John Wiley & Sons.
268. Bonner, W., et al., *Fluorescence activated cell sorting*. Review of Scientific Instruments, 1972. **43(3)**: p. 404-409.
269. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nature protocols, 2006. **1(3)**: p. 1559.
270. Schmeisser, A., et al., *The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability*. Atherosclerosis, 2005. **178(1)**: p. 83-94.
271. Weber, C., et al., *Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105(42)**: p. 16278-83.
272. Schober, A., J. Bernhagen, and C. Weber, *Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis*. J Mol Med (Berl), 2008. **86(7)**: p. 761-70.
273. Zerneck, A., J. Bernhagen, and C. Weber, *Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease*. Circulation, 2008. **117(12)**: p. 1594-602.
274. Zerneck, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber, *Chemokines in atherosclerosis: an update*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28(11)**: p. 1897-908.
275. Noels, H., J. Bernhagen, and C. Weber, *Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2009. **19(3)**: p. 76-86.
276. Ikeda, U., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines*. Atherosclerosis, 1993. **104(1-2)**: p. 61-8.
277. Mestas, J. and K. Ley, *Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis*. Trends in cardiovascular medicine, 2008. **18(6)**: p. 228-232.
278. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27(11)**: p. 2292-2301.
279. Velican, C. and D. Velican, *Progression of coronary atherosclerosis from adolescents to mature adults*. Atherosclerosis, 1983. **47(2)**: p. 131-144.
280. Chen, H., et al., *Increased alternative macrophage-2 (M2) polarization with Trib1 gene over expression in myeloma patients with progressive disease and Jak2 inhibitors reduce M2 polarization*. 2015, Am Soc Hematology.

281. Ferracini, M., et al., *Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 950273.
282. Chistiakov, D.A., et al., *The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis*. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2018. **22**(3): p. 1366-1382.
283. Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher, *Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(10): p. 709-21.