

Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose im Mausmodell

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Yanina Ostendorf geb. Podsvyadek

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2019

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

Referentin: Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2019

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie und Peter Ostendorf gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Atherosklerose	1
1.2 Gefäßendothel in der Pathogenese der Atherosklerose	3
1.3 Atherosklerose und Inflammation	3
1.3.1 Adhäsionsmoleküle	4
1.3.2 Monozyten und Makrophagen	5
1.3.3 Neutrophile Granulozyten	6
1.3.4 B- und T-Lymphozyten	8
1.4 Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung	9
1.4.1 Therapieoptionen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung	10
1.4.2 Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung und begleitende Erkrankungen	11
1.4.3 Atherosklerose- und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell	13
1.5 Vorarbeiten	14
1.6 Ziel dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Arbeitsmittel	17
2.1.1 Substanzen und Lösungen	17
2.1.2 Material	19
2.1.3 Geräte	19
2.1.4 Auswertungsprogramme	20
2.1.5 Hersteller	20
2.2 Tierversuche	21
2.2.1 Atherosklerosemodell	21
2.2.2 Murines Modell der chemisch-induzierten chronischen Kolitis	22
2.2.3 <i>In vivo</i> Depletion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten	23
2.2.4 Organpräparation	24
2.3 Histologie	25

2.3.1	Aufbereitung und Fixierung der Gewebe	25
2.3.2	Anfertigung und Vorbereitung der Präparate	25
2.3.3	H&E-Färbung	26
2.3.4	Öl-Rot-O-Färbung	26
2.4	Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen	27
2.4.1	Durchflusszytometrische Identifizierung der zirkulierenden Immunzellen ..	29
2.4.2	Durchflusszytometrische Identifizierung der Immunzellpopulationen in der Aorten-Wand	30
2.4.3	Durchflusszytometrische Identifizierung der Immun-, Vorläufer- und Stammzellen im Knochenmark	30
2.5	Zell-/ Gewebekultur Versuche	31
2.5.1	Isolation der Knochenmarksneutrophilen.....	31
2.5.2	<i>Ex vivo</i> Kultivierung des Kolons.....	31
2.6	Biochemische Methoden	32
2.6.1	Multiplex-Messung der sekretierten Zytokine im Blutplasma und im Medium der Organkultur	32
2.6.2	Cholesterin Bestimmung im Blutplasma	32
2.6.3	Bestimmung der G-CSF Konzentration im Blutplasma	32
2.7	Molekularbiologische Techniken.....	33
2.7.1	RNA-Extraktion.....	33
2.7.2	Reverse Transkription	33
2.7.3	Quantitative Polymerase-Ketten (<i>Chain</i>)-Reaktion (qPCR).....	34
2.8	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Dextrannatriumsulfat -induzierte Kolitis in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen.....	36
3.1.1	Gewichtsverlauf.....	36
3.1.2	Inflammation des Kolons	37
3.1.3	Morphologie des Darms	38
3.2	Atherosklerose im Kolitismodell.....	38
3.2.1	Plaque-Entwicklung.....	39
3.3	Einfluss der Kolitis auf die systemische und aortale Inflammation nach fünf DSS-Zyklen	40
3.3.1	Plasma-Cholesterinkonzentration.....	40
3.3.2	Zirkulierende Zytokine	41
3.3.3	Zirkulierende Immunzellen	42
3.3.4	Aortale Immunzellen.....	43

3.4	Veränderung der Immunzellen im Verlauf einer chronischen Kolitis	45
3.4.1	Zirkulierende Immunzellen	45
3.4.2	Aortale Immunzellen.....	47
3.5	Veränderung der Inflammation im Alter von 13 Wochen.....	49
3.5.1	Zirkulierende Zytokine	49
3.5.2	G-CSF Konzentration im Verlauf einer chronischen Kolitis	50
3.5.3	Immunzellzusammensetzung in der Zirkulation	51
3.5.4	Komposition der aortalen Immunzellen.....	53
3.6	Inflammation des Darms im Verlauf der chemisch induzierten Kolitis	54
3.6.1	mRNA-Expression von neutrophilen Granulozyten-spezifischen Markern und Entzündungsmediatoren / Zytokinen.....	54
3.6.2	<i>Ex vivo</i> Sekretion von Zytokinen.....	56
3.7	Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt von 13 Wochen.....	56
3.7.1	Reife Immunzellen des Knochenmarks	57
3.7.2	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks.....	58
3.8	Zellen des Knochenmarks zum Zeitpunkt von 10 Wochen	60
3.8.1	Reife Immunzellen und myeloide Vorläuferzellen des Knochenmarks	60
3.8.2	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks.....	61
3.9	Einfluss der chronischen Inflammation auf die mRNA-Expression von Adhäsions- und Migrationsmarkern	63
3.9.1	mRNA-Expression der Migrations- und Adhäsionsmarker in Knochenmarksneutrophilen.....	63
3.9.2	Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Zytokine in der Aorta	64
3.10	Ly6G-Depletion im Verlauf einer chronischen Kolitis	65
3.10.1	Vergleich der Entzündung des Kolons nach Applikation des Isotyp- oder Anti-Ly6G Antikörpers.....	66
3.10.2	Verifizierung der effizienten Antikörper-Besetzung des Ly6G Epitops	67
3.10.3	Atherosklerose nach Depletion der neutrophilen Granulozyten	69
4	Diskussion	70
4.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung im murinen Modell der akzelerierten Atherosklerose	70
4.2	Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung der atherosklerotischen Plaques	72
4.3	Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Komposition der Immunzellen und die Konzentration der Zytokine nach fünf Zyklen DSS-Behandlung.....	74
4.4	Komposition der Immunzellen und die Konzentration der Zytokine in der akuten Phase der Inflammation	75

4.5	Neutrophile Granulozyten als Bindeglied zwischen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und der Atherosklerose?	80
4.6	Limitierung und Ausblick.....	86
5	Zusammenfassung.....	89
6	Summary.....	91
	Literaturverzeichnis	92
	Appendix.....	107
	Veröffentlichungen.....	110
	Danksagung.....	111
	Eidesstattliche Erklärung	112

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der Atherogenese und –progression.	2
Abb. 2 Veränderte Plaque-Zusammensetzung in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit chronischer Inflammation.	15
Abb. 3 Schematische Darstellung zur Induktion einer chronischen Kolitis.	22
Abb. 4 Versuchsaufbau der Ly6G Depletion <i>in vivo</i>	24
Abb. 5 DSS-behandelte <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäuse weisen eine reduzierte Gewichtszunahme auf.	37
Abb. 6 Erhöhte mRNA-Expression von <i>Tnfa</i> des Kolons in DSS-behandelten <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen nach fünf DSS-Zyklen.	37
Abb. 7 Verlust der Kryptenarchitektur des Kolons in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen im CED Modell.	38
Abb. 8 Erhöhte Plaque-Belastung in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen nach DSS-Behandlung im Alter von 21 Wochen.	39
Abb. 9 Reduziertes Plasma-Cholesterin in CED Mäusen im Alter von 21 Wochen.	40
Abb. 10 Leicht erhöhte systemische Inflammation nach Induktion einer chronischen Entzündung in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen.	42
Abb. 11 Die Zusammensetzung der zirkulierenden Immunzellen von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit CED ist im Alter von 21 Wochen unverändert.	43
Abb. 12 Keine Veränderungen der aortalen Immunzellen nach Induktion einer chronischen Entzündung in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen nach fünf DSS-Zyklen.	44
Abb. 13 Oszillierender Anstieg der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen während einer intestinalen Inflammation.	46
Abb. 14 Oszillierende neutrophilen Granulozyten-Akkumulation in der Aortenwand von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen während einer intestinalen Inflammation.	48
Abb. 15 Proinflammatorisches Zytokinprofil in DSS-behandelten <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen.	50
Abb. 16 Gesteigerte G-CSF Konzentration im Plasma nach DSS-Gabe im Verlauf einer chronisch-induzierten Kolitis.	51
Abb. 17 Starke systemische Inflammation bereits nach dem dritten DSS-Zyklus in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit Kolitis.	52
Abb. 18 Gesteigerte Inflammationsreaktion in der Aorta nach Induktion einer chronischen Kolitis im dritten DSS-Zyklus.	53
Abb. 19 Gesteigerte mRNA-Expression von Inflammationsmarkern im Kolon von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen nach DSS-Behandlung.	55
Abb. 20 Erhöhte G-CSF Sekretion aus kultivierten Darmabschnitten von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit einer intestinalen Inflammation.	56
Abb. 21 Erhöhte Zellzahl im Knochenmark in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen im dritten DSS-Zyklus.	58

Abb. 22 Verstärkte Hämatopoese und Myelopoese in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit intestinaler Inflammation.	59
Abb. 23 Reduktion reifer Neutrophiler im Knochenmark nach beginnender intestinaler Inflammation.	61
Abb. 24 Beginnende Veränderung der Hämatopoese im zweiten Zyklus der induzierten chronischen Darmentzündung.	62
Abb. 25 Verstärkte mRNA-Expression von Migrations- und Adhäsionsproteinen in Knochenmarksneutrophilen von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit CED.	64
Abb. 26 Erhöhte mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Zytokinen in der Aorta von <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen mit induzierter Kolitis.	65
Abb. 27 Auch nach der Depletion der Neutrophilen weisen DSS-behandelte <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäuse eine reduzierte Gewichtszunahme auf.	66
Abb. 28 Kein Unterschied in der Entzündung des Kolons nach Isotyp- oder Anti-Ly6G Antikörperbehandlung in <i>ApoE</i> ^{-/-} Mäusen nach 5 DSS Zyklen.	67
Abb. 29 Reduktion der Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten im Verlauf der chronischen Kolitis nach Applikation eines Anti-Ly6G Antikörpers.	68
Abb. 30 Reduktion der Plaque-Belastung in der Aorta nach Depletion der neutrophilen Granulozyten während der chronischen intestinalen Inflammation.	69
Abb. 31 Schematische Darstellung des möglichen Einflusses der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose.	85
Abb. 32 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der aortalen Immunzellen.	107
Abb. 33 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Ly6G ⁺ Zellen.	108
Abb. 34 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten.	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Lösungen und Puffer	17
Tabelle 2 Material.....	19
Tabelle 3 Geräte	19
Tabelle 4 Programme.....	20
Tabelle 5 Herstellerverzeichnis.....	20
Tabelle 6 Eingesetzte Antikörper-Kombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse der Immunzellen.....	27
Tabelle 7 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Identifizierung zirkulierender Immunzellpopulationen	29
Tabelle 8 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Differenzierung aortaler Zellpopulationen.....	30
Tabelle 9 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Differenzierung der Zellpopulationen im Knochenmark	31
Tabelle 10 Zum mRNA-Expressionsnachweis eingesetzte Oligonukleotide	34

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoE	Apolipoprotein E
BCA	<i>brachiocephalic artery</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CCR	<i>CC-motiv-chemokine-receptor</i>
CCL	<i>CC-motiv-chemokine-ligand</i>
CXCR	<i>CXC-motiv-chemokine-receptor</i>
CXCL	<i>CXC-motiv-chemokine-ligand</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis Ulcerosa
Csf3	<i>colony-stimulating factor 3</i>
Csf3r	<i>colony-stimulating factor 3 receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Selektin	Endothel-Selektin
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Glg1	<i>golgi glycoprotein 1</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLr	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LOX-1	<i>lectin-like oxLDL receptor-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MC	Morbus Crohn
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein</i>
MPO	Myeloperoxidase
MI	Myokardinfarkt
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NO	<i>nitrit oxide</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
oxLDL	<i>oxidised low density lipoprotein</i>
ÖRO	Öl-Rot-O
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
P-Selektin	Thrombozyten-Selektin
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RA	rheumatoider Arthritis
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDF-1 α	<i>stromal cell-derived factor</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
SEB	<i>staphylococcal enterotoxin B</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNBS	<i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TSST-1	<i>toxic shock syndrome toxin-1</i>
vLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

1 Einleitung

Die World Health Organisation (WHO) hat im Jahr 2016 kardiovaskuläre Erkrankungen als häufigste Todesursache weltweit deklariert. In diesem Jahr wurden allein 17,9 Millionen Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen verzeichnet, welche in der Gesamtheit 31 % aller globalen Todesfälle ausmachen. 85 % dieser Sterbefälle liegen ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall zu Grunde. Der Begriff der kardiovaskulären Erkrankungen umfasst eine Reihe von Gefäßerkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder die koronare Herzkrankheit (KHK) [1]. Atherosklerose stellt eine bedeutsame Ursache dieser arteriellen Gefäßerkrankungen dar [2].

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine arterielle Gefäßkrankheit, der häufig eine Störung im Cholesterinstoffwechsel in Kombination mit einer fehlgeleiteten Immunantwort zugrunde liegen. Diese Erkrankung entwickelt sich über Jahrzehnte und verläuft zunächst meist asymptomatisch [3]. Bei fortschreitender Progression der Erkrankung führt die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu Gefäßverengungen und verursacht damit eine Störung und Reduktion des Blutflusses. Ist die Erkrankung weit fortgeschritten, kann es zur Plaque-Ruptur oder zur oberflächlichen Plaque-Erosion kommen, die in atherothrombotischen Ereignissen resultieren und in einer Stenose münden können [4, 5]. Die hierdurch hervorgerufene Ischämie ist Ursache für die klinische Manifestation, je nach anatomischer Lokalisation, beispielsweise in Form eines Schlaganfalls oder eines Myokardinfarktes [6, 7].

Die Entstehung der Plaques basiert auf zahlreichen aufeinander folgenden Ereignissen. Nach Schädigung der Endothelschicht kommt es vermehrt zur Akkumulation von Lipiden wie des Lipoproteins niederer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) in der Gefäßwand. Das LDL wird oxidiert und von Makrophagen aber auch glatten Muskelzellen phagozytiert. Die unkontrollierte Aufnahme der oxidierten Lipoproteine induziert die morphologische Veränderung dieser Zellen zu Schaumzellen [8-10]. Aufgrund der eingeschränkten Migrationsfähigkeit der Schaumzellen verbleiben diese in der Intima und tragen zur Formation der Neointima bei [11]. Erreichen die Schaumzellen ihre maximale Aufnahmekapazität, werden sie apoptotisch und bilden gemeinsam mit weiteren apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen, Cholesterinkristallen und Komponenten der Extrazellulären Matrix den Kern des atherosklerotischen Plaques aus. Dieser Vorgang führt zur Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen

Faktoren, die weitere Immunzellen rekrutieren, sowie die Migration der glatten Muskelzellen zum Entzündungsgeschehen induzieren und damit die Auflösung der Inflammation verhindern. Die Entzündung nimmt einen chronischen Verlauf an und begünstigt die Expansion der Läsion und damit die Ausbildung der Neointima [3]. Die Migration der Immunzellen in die Neointima erfolgt jedoch nicht allein vom Endothel ausgehend. In der späteren Atherogenese konnte auch eine Migration der Immunzellen von der Adventitia aus nachgewiesen werden (Abb. 1) [9, 12].

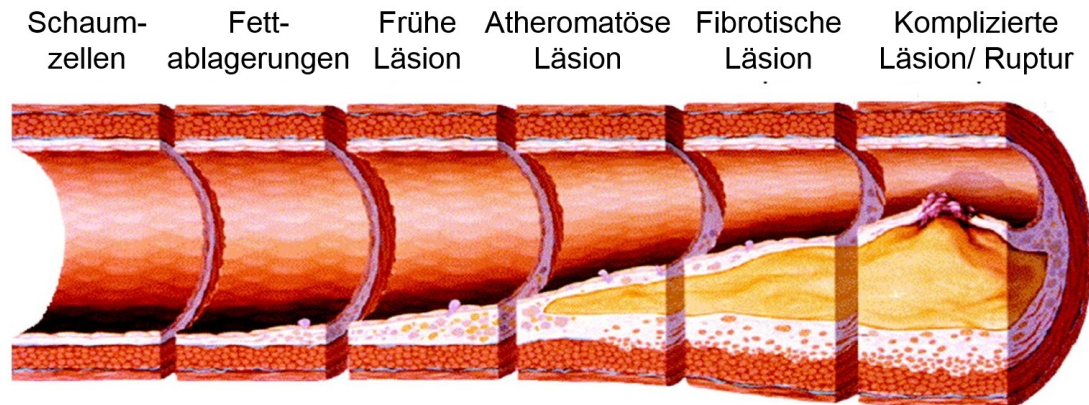


Abb. 1 Schematische Darstellung der Atherogenese und -progression.

Die schematische Darstellung zeigt stark vereinfacht die einzelnen Entwicklungsstufen der atherosklerotischen Läsionen, beginnend mit der Lipidakkumulation in der Gefäßwand und der Rekrutierung von Immunzellen, die eine chronische Inflammation initiieren und weitere Immunzellen rekrutieren. Dieser Prozess führt zur Expansion der Läsion und kann in einer Ruptur oder einer Atherothrombose resultieren. Abbildung verändert nach Wolfgang König *et al.* [13].

Unter physiologischen Bedingungen beschränkt sich der Aufbau der koronaren Arterien auf drei wesentliche Schichten: Adventitia, Media und Intima. Die Adventitia ist die äußerste Schicht. Es handelt sich um eine fibroblastenreiche Bindegewebsschicht, die Blutgefäße umgibt und bei der Gefäßentwicklung und -reparatur, aber auch im Zusammenhang der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt [14]. Die Adventitia wird durch die *Lamina elastica externa* von der Media getrennt. Hauptbestandteil der Media sind diagonal angeordnete glatte Muskelzellen, welche die Stabilität des Gefäßes aufrechterhalten und den Gefäßtonus kontrollieren [15]. Die *Lamina elastica interna* trennt die Media von der Intima, die zum Gefäßlumen gerichtet ist [16]. Die Intima besteht aus einer Schicht Endothelzellen, welche sowohl die Funktion der glatten Muskelzellen beeinflusst, als auch die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Verletzung koordiniert [17]. Somit findet eine Kommunikation zwischen den Gewebsschichten statt, um die Gefäßfunktion aufrecht zu erhalten.

1.2 Gefäßendothel in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Schädigung des Gefäßendothels stellt das initiale Ereignis der Atherogenese dar [18]. Zumeist tritt sie an Gefäßverzweigungen auf oder an Lokalisationen, an denen es zu Strömungsturbulenzen des Blutes kommen kann.

Wichtige Risikofaktoren und zugrundeliegende Ursachen der Atherosklerose sind Bluthochdruck, Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Übergewicht und genetische Prädisposition [19].

Die wichtigste Aufgabe der Endothelschicht ist die Aufrechterhaltung der Gefäß-Homöostase. Hierzu gehören die Erhaltung der Balance zwischen Vasokonstriktion und -dilatation, die Inhibition oder Stimulation der Proliferation der glatten Muskelzellen sowie deren Migration und die Kontrolle der Immunreaktion [20]. Für diese Funktionen werden zahlreiche Faktoren wie Wachstumsfaktoren oder Stickstoffmonoxide (*nitric oxide*, NO) von den Endothelzellen produziert. NO ist der potenteste Vasodilatator, welcher aber auch die Oxidation von LDL inhibieren kann. Eine Störung in der NO-Produktion kann sowohl durch Stress als auch durch Chemokine wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder dem Interleukin-1 (IL-1) induziert werden und führt zu einer endothelialen Dysfunktion [21-23]. Die genannten Faktoren begünstigen eine weitere Aktivierung der Endothelzellen, wodurch verschiedene Signalkaskaden induziert und so die Atherogenese initiiert werden. Die erhöhte Permeabilität der Endothelschicht führt zu leichterem Zugänglichkeit von Proteoglykanen aus dem subendothelialen Raum, wodurch die Ablagerung von LDL in der Gefäßwand begünstigt wird [24]. Das akkumulierte LDL wird durch Lipoxygenasen, Myeloperoxidasen und reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) oxidativen Prozessen unterzogen, die zur Bildung von oxidiertem LDL (oxLDL) führen. Neben der veränderten Permeabilität exprimieren die aktivierten Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) oder auch das Thrombozyten-Selektin (P-Selektin) und das Endothel-Selektin (E-Selektin), welche insbesondere bei inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Zirkulierende Leukozyten haften an diese Adhäsionsmoleküle und migrieren in die Intima. Die infiltrierten Monozyten differenzieren dann zu Makrophagen und phagozytieren mittels *Scavenger*-Rezeptoren das oxLDL.

1.3 Atherosklerose und Inflammation

Die Atherogenese ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem nicht nur eine Störung im Lipidstoffwechsel vorliegt, sondern auch das Immunsystem einen entscheidenden

Einfluss hat. Die Rekrutierung der Immunzellen aus der Zirkulation in die Gefäßwand stellt in diesem Zusammenhang einen der ersten Schritte in der Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen dar. Die Adhäsion und Migration der rekrutierten Immunzellen erfolgt anhand von Adhäsionsmolekülen, die nach Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren sowohl vom Endothel als auch von den Immunzellen exprimiert werden. Auch die Progression der Atherosklerose wird von den Immunzellen beeinflusst und unterstützt [6, 25, 26].

1.3.1 Adhäsionsmoleküle

Die exprimierten Adhäsionsmoleküle initiieren die Kommunikation zwischen den zirkulierenden Immunzellen und dem aktiven Endothel und sind so entscheidend für den Inflammationsprozess. Die beteiligten Adhäsionsmoleküle gehören den drei Familien der Selektine, Integrine und Immunglobuline an. Die Selektine umfassen drei Familienmitglieder. L-Selektin wird hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert und im Falle der Aktivierung der Immunzellen herunterreguliert [27]. P- und E-Selektin werden insbesondere auf Endothelzellen exprimiert, wobei die Expression nach Aktivierung stark hochreguliert wird [28, 29]. Die Interaktion der Selektine erfolgt mit Sialyl-Lewis X Tetrasacchariden oder anderen Glykanstrukturen [30]. Die am weitesten untersuchten Liganden sind P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), der auf Granulozyten und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, und E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) sowie *Cluster of Differentiation (CD)44*, die beide von allen Leukozyten exprimiert werden [31]. Selektine weisen dabei eine Selektivität gegenüber den jeweiligen Liganden auf: E-Selektin bindet sowohl CD44 als auch ESL-1 und PSGL1 [32, 33], wohingegen P-Selektin nur eine Interaktion mit PSGL-1 eingehen kann [34].

Die Familie der Immunglobuline besteht aus zahlreichen Familienmitgliedern. Auf aktiviertem Endothel sind ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 zu finden. ICAM-2 wird als einziges auch an inaktiviertem Endothel exprimiert [35, 36]. Mitglieder der Immunglobuline interagieren untereinander und ebenso mit Mitgliedern der Selektine und Integrine [37, 38].

Die Familie der Integrine besteht aus 18α - und 8β -Untereinheiten, die sich zu Heterodimeren zusammenschließen. Die Integrine, welche die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten vermitteln, bestehen aus den α_2 - und β_2 -Untereinheiten und bilden Homodimere aus, z.B. CD11b. Die Expression der Mitglieder dieser Familie erfolgt vor allem an Leukozyten, aber nicht an Endothelzellen. Sie interagieren mit Mitgliedern der Immunglobuline [39, 40].

Die Rekrutierung der Immunzellen zum Ort des Inflammationsgeschehens verläuft in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt der initiale Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel, gefolgt vom Rollen der Immunzellen über das Endothel. Beide Vorgänge werden durch P- und E-Selektine und ihre Liganden vermittelt. Beim Rollen werden die Leukozyten aktiviert, was den Verlust der L-Selektine und die Aktivierung der Integrine bewirkt. Die aktivierten Leukozyten adhären Integrin-vermittelt an den Endothelzellen und transmigrieren durch die Endothelschicht [41].

1.3.2 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten und Makrophagen bilden die Hauptkomponente des angeborenen Immunsystems aus. Erreichen die Monozyten den subendothelialen Raum, proliferieren sie und durchlaufen einige morphologische und strukturelle Veränderungen. Sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung zu Makrophagen wird unter anderem durch *monocyte chemotactic protein* (MCP-1), einem Zytokin, veranlasst [42]. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass eine Defizienz des Zytokins MCP-1 oder dessen Rezeptors *CC-motiv-chemokine-receptor 2* (CCR2) die Plaque-Größe verringert. Die Differenzierung zu Makrophagen ist hierbei ein entscheidender Vorgang für die Entwicklung und die Progression der atherosklerotischen Plaques [43].

Nach der Transformation der Monozyten zu Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen zeigen diese eine eingeschränkte migratorische Fähigkeit, wodurch das Verbleiben der Makrophagen am Inflammationsgeschehen begründet ist. Es wird vermutet, dass so die Rückbildung der Entzündung eingeschränkt wird [44]. Neben der eingeschränkten Migrationsfähigkeit weisen Makrophagen eine erhöhte lysosomale Aktivität und erhöhte phagozytotische Eigenschaften auf [45]. Die Phagozytose von Cholesterin und Cholesterin-Derivaten durch Makrophagen induziert die Schädigung ihres lysosomalen Systems, was in Folge zur Aktivierung des Inflammasoms führt. Dabei handelt es sich um einen Proteinkomplex, der eine Entzündungsreaktion in Gang setzt. Die Expression von weiteren proinflammatorischen Faktoren wie *CC-motiv-chemokine-ligand 5* (CCL5), IL-1 β , TNF- α und IL-6 sowie matrixdegradierenden Proteasen wird induziert [46, 47].

Das im subendothelialen Raum angereicherte oxLDL wird von den Makrophagen durch verschiedene Rezeptoren wie dem *Scavenger receptor A1* (SR-A1), CD36, und *lectin-like oxLDL receptor-1* (LOX-1) erkannt [48]. Unter physiologischen Bedingungen sind Makrophagen ein wichtiger Regulator des Lipoproteinmetabolismus, der auf einem Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abgabe des Cholesterins beruht [49]. Unter pathologischen Bedingungen sind die *Scavenger*-Rezeptoren hochreguliert und die

Aufnahme des oxLDL dadurch verstärkt. Zeitgleich ist jedoch der Efflux des Cholesterins inhibiert, wodurch es sich in den Makrophagen anreichert [50]. Dieses Ungleichgewicht führt zur weiteren Differenzierung der Makrophagen zu Schaumzellen. Die Speicherung der Lipide durch die Makrophagen bzw. Schaumzellen ist ein Schlüsselement der Lipidakkumulation in atherosklerotischen Plaques und trägt zur Bildung und Expansion der Neointima bei. Ist die Aufnahmekapazität der Schaumzellen erreicht, werden sie apoptotisch und können zusätzlich eine sekundäre Nekrose durchlaufen. Dieser Prozess verstärkt die Inflammation, unterdrückt Signale, welche die Rückbildung der Entzündung induzieren, und trägt zur Bildung des nekrotischen Kerns der Läsionen bei [51].

Makrophagen stellen die größte Population innerhalb der atherosklerotischen Läsionen dar. Die expandierende Inflammation führt jedoch zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen, welche ihrerseits die Atheroprogression weiter begünstigen.

1.3.3 Neutrophile Granulozyten

Die erste Antwort des Immunsystems auf eine Infektion oder einen Gewebeschaden erfolgt durch die neutrophilen Granulozyten. Bei der Atherogenese sind die neutrophilen Granulozyten ebenfalls unter den ersten Zellen, die involviert sind und einen großen Einfluss auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose haben [52, 53]. Aufgrund der geringen Anzahl detektierter Zellen in atherosklerotischen Läsionen wurde den neutrophilen Granulozyten in der Vergangenheit keine große Bedeutung zugeschrieben. Die geringe Zellzahl, vor allem im Gewebe, beruht aber vermutlich auf der mangelnden Detektionsfähigkeit, welche der geringen Lebensdauer und der schnellen Phagozytose durch Makrophagen geschuldet ist. Zahlreiche Untersuchungen über die letzten Jahrzehnte konnten jedoch die immunregulatorische Wirkung dieser Immunzellen und ihre Auswirkung auf die Pathologie der Atherosklerose nachweisen [54, 55].

Die Besonderheit der neutrophilen Granulozyten stellen die Granula dar, welche am Inflammationsort freigesetzt werden. Es kann zwischen drei Granula, abhängig von ihrer Enzymausstattung, unterschieden werden. Bei der transendothelialen Migration werden zuerst die tertiären Granula sezerniert, welche das Enzym Gelatinase enthalten [56]. Durch die Exozytose dieser Vesikel gelangen auch Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, die sich in der Vesikelmembran befinden, an die Zelloberfläche. Diese begünstigen die schnelle Zelladhäsion der neutrophilen Granulozyten an das Endothel [57]. Die freigesetzte Gelatinase ermöglicht den neutrophilen Granulozyten die Überwindung der Basalmembran [58, 59]. Im subendothelialen Raum setzen die neutrophilen Granulozyten dann ihre primären und sekundären Granula frei. Dabei

werden toxische Faktoren wie Elastasen, Myeloperoxidasen (MPO), Cathepsine oder Defensine freigesetzt, die zur Anreicherung von ROS beitragen [60]. Neben der matrixmodulierenden Wirkung durch Faktoren wie Matrixmetalloproteinase 9 haben die neutrophilen Granulozyten auch eine immunregulatorische Wirkung [59]. Die aus den Granula freigesetzten Proteine beeinflussen Rekrutierung, Adhäsion und auch Aktivierung von zahlreichen Immunzellen wie den Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Vor allem chemotaktische Eigenschaften, unter anderem von Cathepsin-G und α -Defensin, konnten an humanen und murinen Monozyten nachgewiesen werden [61-63].

Neutrophile Granulozyten verfügen über eine sehr geringe transkriptionelle Kapazität, worauf ihre Kurzlebigkeit zurückgeführt werden kann. Die Apoptose der Zelle ist *per se* ein antiinflammatorischer Vorgang, bei dem Signale zur Auflösung der Inflammation durch Makrophagen induziert werden. Ist die Aufnahmekapazität der Makrophagen jedoch überlastet, werden die apoptotischen neutrophilen Granulozyten nekrotisch und verstärken die Entzündungsreaktion [64, 65]. Neutrophile Granulozyten können zudem einen einzigartigen Apoptose-Prozess durchlaufen, die so genannte *Neutrophil Extracellular Traps* (NET)ose. Dabei wird ein proinflammatorisches Netzwerk freigesetzt, welches neben der DNA der neutrophilen Granulozyten granuläre Proteine und Histone enthält [66]. Dieser Prozess konnte bereits sowohl in murinen als auch in humanen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden [53, 59, 67]. Der Entstehungsprozess der NETs muss nicht immer in der Lyse der neutrophilen Granulozyten resultieren. Bei der vitalen NETose erfolgt die Exozytose der DNA ohne Verletzung der Zellmembran und die Fähigkeit zur Phagozytose geht nicht verloren [68].

Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zum Inflammationsgeschehen erfolgt hauptsächlich durch das Zytokin CCL5 und seine Rezeptoren *CC-motiv-chemokine-receptor 5* (CCR5) und CCR1. Auch in diesem Fall wird die Adhäsion am Endothel und die Transmigration durch die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, E- und P-Selektin vermittelt [52, 69, 70].

Die Beteiligung der neutrophilen Granulozyten an der Pathogenese der Atherosklerose beginnt bereits vor dem ersten direkten Kontakt mit dem Endothel. Die neutrophilen Granulozyten selbst können zur endothelialen Dysfunktion beitragen [71]. Bereits in der Zirkulation können neutrophile Granulozyten durch Lipide aktiviert werden, was zur Freisetzung verschiedener Faktoren wie ROS oder granulärer Proteine führt. Diese interagieren mit dem Gefäßendothel und aktivieren es, sodass Adhäsionsmoleküle exprimiert werden [72, 73]. Bei Untersuchungen von Patienten mit Hyperlipidämie

konnte gezeigt werden, dass ihre neutrophilen Granulozyten zwar weniger MPO gespeichert hatten als neutrophile Granulozyten von Probanden ohne Hyperlipidämie, insgesamt jedoch eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten sowie eine höhere Konzentration an freiem MPO im Plasma aufwiesen. Dies spricht für die Freisetzung des MPO nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten [74].

Nicht nur in der frühen Phase der Atherogenese spielen neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle. In murinen Läsionen konnten neutrophile Granulozyten in frühen Plaques im subendothelialen Raum oder innerhalb der Intima lokalisiert werden. In den fortgeschrittenen Plaques waren sie vermehrt im Bereich der Plaque-Schulter oder innerhalb der Adventitia zu detektieren. Ergänzend dazu wurden neutrophile Granulozyten in Regionen mit starker Inflammation in späten, weit entwickelten atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen [52, 75]. Auch innerhalb des humanen Probenmaterials erfolgte ein histologischer Nachweis der neutrophilen Granulozyten. Es konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter Anzahl der neutrophilen Granulozyten und der Instabilität der Läsion hergestellt werden, gemessen an den Faktoren Größe des Lipidkerns und Kollagenanteil des Plaques [76]. Ebenfalls besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und der Größe der atherosklerotischen Läsionen im murinen Modell nach atherogener Fütterung [52]. Eine solche Korrelation konnte auch in humanen Studien nachgewiesen werden: Patienten mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wiesen auch eine erhöhte neutrophile Granulozyten-Zahl in der Zirkulation auf [55, 77]. Somit nehmen die neutrophilen Granulozyten einen großen Stellenwert in der Pathologie der Atherosklerose ein. Ihre wichtige Rolle wurde sowohl im Zusammenhang mit der Initiation als auch der Progression der atherosklerotischen Läsionen untersucht und nachgewiesen.

1.3.4 B- und T-Lymphozyten

B- und T-Lymphozyten migrieren mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen in die Intima des aktivierten Endothels. Nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen oder oxLDL produzieren die T-Lymphozyten proinflammatorische Mediatoren und verstärken so den chronischen Charakter der Entzündung. Zu den antigenpräsentierenden Zellen zählen unter anderem die dendritischen Zellen. Neben der Aktivierung und Suppression der T-Lymphozyten können sie auch die Proliferation dieser Zellen beeinflussen. Dazu verlassen die aktivierten dendritischen Zellen den atherosklerotischen Plaque und wandern in die sekundären lymphatischen Organe ein. Dort initiieren sie dann die Proliferation der T-Lymphozyten [78, 79].

Den Stellenwert der T-Lymphozyten für die Atherogenese konnten Untersuchungen am Tiermodell zeigen. Eine Defizienz der T-Lymphozyten reduzierte den Plaque-Anteil in *Apolipoprotein E*-defizienten Mäusen signifikant [80, 81]. Den größten Anteil der T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques stellen CD4⁺ T-Lymphozyten dar [82]. Diese können in Subpopulationen unterteilt werden. Die zwei am stärksten vertretenen Populationen sind die Th1- und Th2-Lymphozyten. Die Th1-Lymphozyten machen wiederum den größten Anteil der Subtypen innerhalb der Läsion aus. Die differenzierten Th1-Lymphozyten bilden unter anderem auch Interferon- γ (IFN- γ) und können so weitere Makrophagen aktivieren und dadurch die Progression der Atherosklerose fördern [83]. Die Th2-Lymphozyten stellen im Vergleich zu den Th1-Lymphozyten einen geringeren Anteil im Plaque dar. Die Rolle der Th2-Lymphozyten in diesem Zusammenhang ist noch nicht abschließend geklärt und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Eine gesicherte Funktion und entscheidende Rolle der Th2-Lymphozyten ist die Aktivierung der B-Lymphozyten [84]. Diese bilden die kleinste Population der Immunzellen innerhalb der atherosklerotischen Läsion und auch ihre Funktion in diesem Zusammenhang wird kontrovers diskutiert. Jedoch scheint im Zusammenhang des atherosklerotischen Prozesses insbesondere die Antikörper-Produktion eine wesentliche Funktion der B-Lymphozyten zu sein. Sowohl das von den B-Lymphozyten produzierte Immunglobulin (Ig)M als auch IgG wurden in allen Phasen der Atherogenese detektiert. OxLDL-spezifisches IgM scheint eine atheroprotektive Funktion zu haben. Es wird vermutet, dass durch die Bindung des oxLDLs an IgM die Aufnahme des oxLDLs durch die Makrophagen inhibiert wird [85]. OxLDL-spezifisches IgG steht jedoch im Zusammenhang mit sowohl atherogenen als auch atheroprotektiven Effekten [86].

1.4 Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung

Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) hat sich über die Jahre zu einer globalen Erkrankung entwickelt. Seit 1990 zeigt sich die höchste Inzidenz weltweit in Europa. Allein in Deutschland wurden 322 auftretende Erkrankungen pro 100.000 Einwohner gezählt. Weltweit hat sich die Inzidenz stabilisiert, jedoch steigt die Verbreitung in den westlichen Ländern weiter an [87]. Die Diagnose erfolgt meist zwischen dem zwanzigsten und vierzigsten Lebensjahr, allerdings entwickeln 20 % der Patienten bereits im Kindesalter erste Symptome [88, 89].

Unter dem Begriff der CED werden zwei chronische gastrointestinale Pathologien zusammengefasst: Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC). Es handelt sich um chronische Erkrankungen, die durch rezidivierende und intermittierende gastrointestinale Inflammation charakterisiert sind. CU und MC zeigen ähnliche klinische

Charakteristika, hierzu zählen abdominale Schmerzen, Diarrhoe oder Hämatochezie. Neben der intestinalen Manifestation dieser Erkrankungen kommt es auch zu extraintestinalen Symptomen wie Gewichtsverlust und Fieber, wodurch die Differenzierung der Pathologien von CU und MC erschwert wird [90-92]. Der Hauptunterschied der Erkrankungen besteht in der Ausbreitung der Inflammation im Gastrointestinaltrakt. Während die Entzündung bei der CU hauptsächlich auf das Kolon beschränkt ist, kann sich diese im Falle der MC-Krankheit über den gesamten Gastrointestinaltrakt, von Oesophagus bis zum Rektum, ausbreiten. Eine weitere Abgrenzung der beiden Pathologien basiert auf der betroffenen Gewebeschicht des Gastrointestinaltrakts. Bei CU ist zumeist nur die Mukosa und Submukosa von der Inflammation betroffen. Die Entzündung breitet sich kontinuierlich, meist im Rektum beginnend, über das gesamte Kolon aus, was oft zur Auflösung der für das Kolon typischen Kryptenarchitektur führt und Kryptenabszesse verursacht [93]. Im Gegensatz dazu verläuft die Inflammation bei MC in der Regel diskontinuierlich. Da es sich um eine transmurale Erkrankung handelt, sind alle Gewebeschichten des Darms betroffen, was in der Ausbildung von Fisteln und Fissuren münden kann [94, 95]. Die Progression der entzündlichen Darmerkrankung kann weitere schwerwiegende Komplikationen mit sich führen, bis hin zum Kolonkarzinom oder der Entwicklung assoziierter Erkrankungen [96, 97]. Der CED liegen zahlreiche Risikofaktoren, zum Beispiel Nikotinkonsum, das eigene Mikrobiom, Hygiene, aber auch eine genetische Prädisposition zugrunde [98-100]. Eine erbliche Komponente konnte nicht nachgewiesen werden, es kann jedoch eine familiäre Häufung der CED vorkommen [101]. Trotz der bekannten Risikofaktoren sind Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen bis heute nicht vollständig geklärt. Als ursächlich wird jedoch eine fehlregulierte Immunantwort erachtet.

1.4.1 Therapieoptionen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung

Eine Heilung der CED ist trotz der bisher gewonnenen Erkenntnisse bis heute nicht möglich. Mit den verfügbaren Therapien wird versucht eine Remission der Krankheit zu erreichen und so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Die Therapie richtet sich nach der Schwere des akuten Inflammationsschubes. Es wird zwischen mildem, moderatem und schwerem Verlauf unterschieden [102, 103].

In allen Fällen wird eine antiinflammatorische Therapie durchgeführt. Bei einem milden Verlauf wird zunächst mit Aminosalicylaten therapiert. Ihre antiphlogistische Wirkung beruht zum einen auf der Hemmung der Leukotrien-Produktion und zum anderen auf einer Hemmung der Rezeptoren der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 und TNF- α . Angewendet wird die Aminosalicylat-Therapie in erster Linie zur Behandlung der CU, wobei die Nebenwirkungen gravierend sein können und nur 20 % der Patienten eine

Remission erreichen. Dies entspricht somit nur einem um 12 % höheren Erfolg im Vergleich zur Placebo-Kontrolle [104]. Im Falle eines moderaten Verlaufs und / oder bei Versagen der Aminosalicylat-Therapie werden Kortikosteroide sowohl bei der CU- als auch bei der MC-Therapie eingesetzt. So soll durch die immunsuppressive Wirkung eine Remission erreicht werden. Jedoch kann dieses Ziel selbst bei dem am besten verträglichen Kortikosteroid Budesonid nur in 47 % aller Fälle erreicht werden. Selbst nach erreichter Remission kann durch die weitere Therapie mit Kortikoiden ein Rezidiv nur schwer verhindert werden [105]. Da das eigene Mikrobiom eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt, werden bei einem milden oder moderaten Verlauf auch Antibiotika wie Metronidazol oder Ciprofloxacin eingesetzt. Auch wenn durch Antibiotika eine Remission in der Crohn-Therapie erreicht werden konnte, können diese unter anderem aufgrund der Resistenzbildung nicht als Dauertherapie eingesetzt werden [106]. Bei Therapieversagen und schweren Verläufen werden Immunmodulatoren wie Azathioprine, 6-Mercaptopurine oder Ciclosporin eingesetzt. Im akuten Fall ist der Einsatz der Immunmodulatoren aber durch den verzögerten Wirkeintritt von bis zu sechs Monaten nicht möglich, sodass diese Therapie nur bei schwerem Verlauf eingesetzt wird. Bei Patienten, bei denen die Einzeltherapie mit Kortikosteroiden oder Ciclosporin versagten, konnte mit einer kombinierten Therapie eine Remission erreicht werden, jedoch kam es häufig zu Rezidiven nach Absetzen der Medikation [107]. In sehr schweren Fällen werden auch Antikörper der Klasse der TNF- α -Blocker (z.B. Infliximab) oder Leukozyten-Adhäsions-Inhibitoren (z.B. Vedolizupab) als Therapiemöglichkeit eingesetzt [108-111]. Verträglichkeit und Wirksamkeit der neueren Antikörper sind über die Jahre der Entwicklung verbessert worden, jedoch kann selbst mit diesen eine Remission in nur ca. 60 % der Fälle erreicht werden. Auch wurde beobachtet, dass sich bei einer Dauertherapie eine Resistenz gegen die Behandlung ausbildet, welche erneut zum Rezidiv führt. Eine adäquate Therapie der CED ist demnach weiterhin schwer einzustellen und muss auf jeden Patienten individuell abgestimmt erfolgen. Bei besonders schweren Verläufen kann eine Remission nur noch durch chirurgische Intervention erreicht werden [112].

1.4.2 Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung und begleitende Erkrankungen

Während die CED isoliert für den Patienten bereits eine starke Belastung darstellt, können im Verlauf der Krankheit auftretende zusätzliche Krankheitsbilder die Lebensqualität deutlich einschränken. Symptome und Symptomkomplexe, die im Rahmen der primären Erkrankung auftreten, aber keinen kausalen Bezug zu dieser aufweisen, werden als Komorbiditäten bezeichnet [113, 114]. Das Auftreten einer

Komorbidität im Verlauf der Haupterkrankung kann die klinische Manifestation der CED deutlich verstärken, sodass die Therapieeinstellung erschwert wird und eine Remission nicht mehr erreicht werden kann. Zusätzlich wird durch die komorbide Erkrankung die Wahl der Therapeutika weiter eingeschränkt, da mögliche Interaktionen und Kontraindikationen beachtet werden müssen. Das Zusammenspiel dieser Faktoren kann die Prognose ebenfalls deutlich verschlechtern [97, 115]. In ca. 50 % der Fälle entwickeln CED Patienten eine Komorbidität, die auch als extraintestinale Manifestation bezeichnet wird. Die Wahrscheinlichkeit ist abhängig von Dauer und Schwere der primären Erkrankung, aber auch davon, ob bereits eine sekundäre Erkrankung aufgetreten ist [116].

Heutige Erkenntnisse zeigen, dass die CED mit zahlreichen komorbiden Pathologien assoziiert ist. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine extraintestinale Manifestation der gastrointestinalen Erkrankung, vor allem der CU, die in diesem Zusammenhang bereits gut untersucht ist. CED Patienten, die eine PSC entwickelt haben, sind demnach einem erhöhten Risiko an einem Kolorektalkarzinom zu erkranken ausgesetzt [117, 118].

Eine chronische Entzündung kann kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen. Patienten mit einer entzündlichen Darmerkrankung wie CU oder MC zeigen ein gesteigertes Risiko für ein thrombotisches koronares Ereignis wie der ischämischen Herzkrankheit, wobei Frauen ein höheres Risiko im Vergleich zu Männern aufweisen [119, 120]. Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität im Zusammenhang mit der CED konnte zunächst nicht nachgewiesen werden. Erst unter Betrachtung des charakteristischen Verlaufs der Erkrankung mit rezidivierenden und intermittierenden gastrointestinalen Inflammationsphasen konnte in CED Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität in der aktiven Phase der Erkrankung nachgewiesen werden. In der Phase der Remission konnte, verglichen mit den Kontrollen, kein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität gezeigt werden [121].

Auch eine Korrelation der Atherosklerose mit anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis ist bereits belegt und gut untersucht [122, 123].

Den Zusammenhang zwischen Atherosklerose und entzündlichen Darmerkrankungen weiter zu untersuchen ist somit von großem Interesse für die Forschung und Wissenschaft. Erste Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen der koronaren Gefäße in CED Patienten. Als Indikator für ein Auftreten

dieser Pathologie wird die Intima-Media-Dicke der Karotiden verwendet. Diese ist in Patienten mit einer entzündlichen Darmerkrankung deutlich verdickt [124].

Es konnte somit ein Zusammenhang zwischen der entzündlichen Darmerkrankung und kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht abschließend geklärt.

Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Bluthochdruck, Diabetes Mellitus, Fettstoffwechselstörung und Übergewicht konnten in den meisten Studien als Bindeglied zwischen Atherosklerose und entzündlicher Darmerkrankung ausgeschlossen werden und liefern keine zufriedenstellende Erklärung für die Korrelation [116].

1.4.3 Atherosklerose- und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell

Zur Entwicklung einer adäquaten Therapie für betroffene Patienten müssen grundlegende Mechanismen der beiden Erkrankungen, CED und Atherosklerose, verstanden werden. Für die Untersuchung der Atherosklerose stehen zwei Mausmodelle zur Verfügung, die aufgrund einer genetischen Modifikation atherosklerotische Läsionen entwickeln können. Die *Apolipoprotein E (ApoE)*-defiziente ($^{-/-}$) Maus war das erste beschriebene Mausmodell zur Untersuchung der Atherosklerose im Tiermodell. Das ApoE-Protein ist ein Strukturprotein einiger Lipidproteine und spielt im Lipidabbau eine wichtige Rolle, da es einen der Liganden des LDL-Rezeptors (*low density lipoprotein receptor*, Ldlr) in der Leber darstellt. Die Abwesenheit dieses Proteins führt zu einer Lipid-Akkumulation im Blut, wodurch die Bildung von Plaques in der Gefäßwand begünstigt wird [125, 126]. Als weiteres genetisch verändertes Mausmodell wurde die *Ldlr*-defiziente Maus entwickelt, die ebenfalls aufgrund des gestörten Lipidabbaus eine erhöhte Lipid-Akkumulation im Blut aufweist [127, 128]. Der Vorteil der *ApoE* $^{-/-}$ Maus liegt in der spontanen, nicht futterinduzierten Atherogenese [129]. Auch entwickeln *ApoE* $^{-/-}$ Mäuse seltener eine Insulinresistenz und Übergewicht nach fettreicher Ernährung als *Ldlr* $^{-/-}$ Mäuse. Jedoch ist das Plasmalipid-Profil der *Ldlr* $^{-/-}$ Mäuse dem des Menschen ähnlicher verglichen mit der *ApoE* $^{-/-}$ Maus [130, 131]. Ein rein futterinduziertes Modell mit Wildtypmäusen stellte sich als ungeeignet heraus, da die Tiere zwar Fettablagerungen in den Gefäßwänden entwickelten, doch keine weitere Plaque-Entwicklung mit einer chronischen Inflammation nachgewiesen werden konnte [132].

Für die Untersuchung der Pathologie der CED gibt es ebenfalls mehrere Mausmodelle. Auch in diesem Fall wurde als murines CED Modell eine genetisch modifizierte Maus entwickelt. Dabei handelt es sich um eine *Interleukin 10 (Il10)*-defiziente Maus, die in Abwesenheit dieses antiinflammatorischen Zytokins spontan eine intestinale

Inflammation entwickelt [133]. Neben der genetischen Modifikation kann die Inflammation auch chemisch induziert werden. Die Trinitrobenzolsulfonsäure (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) wird intrarektal mit Ethanol verabreicht. Die genauen Mechanismen sind noch nicht genau bekannt, es wird vermutet, dass durch das Ethanol die intestinale-Barriere gestört wird und die Interaktion zwischen TNBS und den Proteinen des Darms ermöglicht wird. Somit wird eine Immunantwort induziert und eine Inflammation begünstigt [134]. Ein weiteres gängiges Modell der intestinalen Inflammation ist die Dextrannatriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS)-induzierte Kolitis. DSS wird über das Trinkwasser verabreicht, somit ist die Darreichungsform praktikabler gegenüber der TNBS-Kolitis. Auch in diesem Fall sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Kolitis-Induktion nicht ganz klar. Die Ursache wird in der toxischen Wirkung der negativen Ladung des DSS-Salzes auf das Darmepithel vermutet. Durch die Schädigung des Epithels kommt es zur Infiltration von Darmbakterien in die *Mucosa*. Dies führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren, welche die Immunzellrekrutierung induzieren, wodurch die Inflammation initiiert wird [135, 136].

1.5 Vorarbeiten

Erste Analysen zu der Fragestellung des Zusammenhangs von Atherosklerose und CED im Mausmodell wurde bereits im Rahmen der Dissertation von Helena Schäffer am Institut der Pharmakologie und Klinischen Pharmakologie durchgeführt. Hier wurde die Komposition der atherosklerotischen Plaques in *ApoE*-defizienten Mäusen untersucht. Über einen Zeitraum von 15 Wochen wurde in diesen Tieren eine chronische intestinale Inflammation induziert, bevor im Endalter von 21 Wochen die Analyse der Läsionen im Aorten-Ursprung durchgeführt wurde. Die Plaque-Zusammensetzung kann Aufschluss über Reife, Entwicklung, aber auch Stabilität von Plaques geben. Daher wurde zum einen die Lipid-Retention und zum anderen Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) in den Plaques des Aorten-Ursprungs untersucht.

Zur Bestimmung der Lipide in den Läsionen wurde eine Öl-Rot-O (ÖRO)-Färbung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Reduktion der Lipid-Akkumulation in den DSS-behandelten Tieren (Abb. 2 A).

Die Komponenten der EZM spielen ebenso eine wichtige Rolle in Bezug auf die Zusammensetzung der Plaques. Sie können sowohl die Stabilität dieser als auch die zellulären Vorgänge beeinflussen. Die immunhistochemische Analyse der Komponenten Kollagen und Hyaluronsäure zeigte keine Unterschiede in den Läsionen von DSS-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis des Proteoglykans Decorin ergab jedoch eine signifikant gesteigerte Akkumulation in den Läsionen des Aorten-Ursprungs von Mäusen mit einer Kolitis nach fünf Behandlungszyklen (Abb. 2). Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass Unterschiede in der Plaque-Zusammensetzung in den Kolitis Mäusen bestehen.

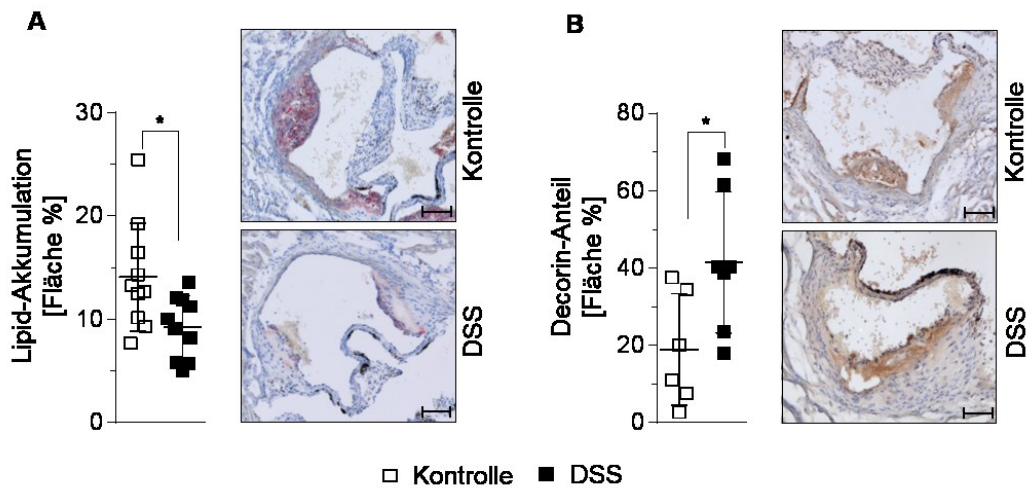


Abb. 2 Veränderte Plaque-Zusammensetzung in *ApoE*^{-/-} Mäusen mit chronischer Inflammation.

Histologische Färbungen des Aorten-Ursprungs von DSS-behandelten und –unbehandelten *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 21 Wochen. Die Quantifizierung der **A** Lipideinlagerung erfolgte mittels einer ÖRO-Färbung, n=10, und **B** die Decorin-Akkumulation wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung detektiert, n=6/7. Repräsentative Aufnahmen der gefärbten Aorten-Ursprünge sind gezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Färbung und Auswertung erfolgte durch Helena Schäffer im Rahmen ihrer Dissertation.

1.6 Ziel dieser Arbeit

In humanen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine entzündliche Darmerkrankung mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht. Auch erste bereits durchgeführte Arbeiten am Mausmodell zeigen, dass eine chemisch-induzierte chronische Entzündung des Darms einen Einfluss auf die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen hat. Obwohl kein signifikanter Unterschied in der Plaque-Größe im Aorten-Ursprung besteht, weisen *ApoE*^{-/-} Mäuse mit einer chronischen Inflammation eine veränderte Plaque-Komposition auf. Dies impliziert, dass die Atherogenese in Verbindung mit der chronischen Inflammation des Gastrointestinaltrakts anderen Mechanismen unterliegen könnte als die isoliert auftretende Atherosklerose ohne begleitende Kolitis.

Da bis heute noch keine Heilungsmöglichkeit der CED existiert und auch das Auftreten von komorbiden Erkrankungen wie der Atherosklerose die Therapie erschweren, ist die

Aufschlüsselung der zugrundeliegenden Mechanismen in diesem Zusammenhang unerlässlich.

In dieser Arbeit sollen daher der Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose in *ApoE*-defizienten Mäusen untersucht und die zugrundeliegenden Mechanismen aufgeschlüsselt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen und Lösungen

Alle nicht näher spezifizierten Substanzen wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Tabelle 1 Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer / Lösungen	Bestandteile	Hersteller
EDTA	100 mM EDTA 0,9 % NaCl pH 7	Merck Carl Roth
PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O pH 7,4	Carl Roth
DPBS-Gentamycin-Lösung	20 µg/ml Gentamycin in DPBS	SERVA Electrophoresis
Hämalaun-Lösung nach Mayer	4,4 g/l Hämatoxylin krist. 28 g/l Al ₂ (SO ₄) ₃ • 18 H ₂ O 1 g/l C ₆ H ₈ O ₇ 18H ₂ O	Gebrauchsfertig von Merck
1 % HCl	1 % HCl in Aqua dest.	Carl Roth
1 % Eosin-Lösung	1 % Eosin Y Dinatrium-Salz 0,05 % Essigsäure	
Öl-Rot-O-Färbelösung (ORO)	35 ml 0,5 % ÖRO (in Methanol) 10 ml 1M NaOH	
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	
PEB-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % BSA in PBS-Puffer	
4 % Formaldehyd-lösung		Roticlear®; Carl Roth
Roticlear®		Carl Roth

Roti®-Mount- Eindeckmedium		Carl Roth
Collagenase-Lösung	600 U/ml Kollagenase II 60 U/ml DNase I in HBSS	Worthington Biochemical Roche Diagnostics
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	1,26 mM CaCl ₂ 0,49 mM MgCl ₂ 0,41 mM MgSO ₄ 5,3 mM KCl 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 4,17 mM NaHCO ₃ 137,39 mM NaCl 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ 5,55 mM Glukose	
2 % DSS-Lösung	2 % DSS-Salz (36-50 kDa) in Aqua dest	MP Biomedicals
RPMI-Medium	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies
DPBS		Gibco® Life Technologies
Anti-Maus-Ly6G Antikörper	Clone 1A8	BioXcell, BP0075-1
Anti-Maus-Isotyp Antikörper-Kontrolle	Clone 2A3	BioXcell, BP0089-1
Anti-Maus-CD16/32- Antikörper	Clone 93	BioLegend
LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit		Life Technologies
Flow-Count™ Fluorospheres		Beckman Coulter
DPBS-Heparin-Lösung	20 U/ml Heparin in DPBS	Ratiopharm

2.1.2 Material

Tabelle 2 Material

Bezeichnung	Hersteller
EDTA-beschichtete Microvette®	Sarstedt
70 µm Nylonfilter	Greiner Bio-One
40 µm Nylonfilter	Greiner Bio-One
Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi Biotec
peqGOLD TriFast™ Reagenz	VWR International
Bio-Plex® 200 suspension array System	Bio-Rad
HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit	BioVision
Mouse G-CSF ELISA Kit (ab100684)	Abcam
700 µl des peqGOLD TriFast™ Reagenz	VWR International
M Tube	Miltenyi Biotec
RNA Clean & Concentrator™ Kit	Zymo Research
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen

2.1.3 Geräte

Tabelle 3 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Digitalkamera	Canon Power Shot G10;	Canon
Durchflussszytometer	Gallios™	Beckman Coulter
Gewebeentwässerungs- automaten	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek
Mikroskop, aufrecht	Axio Imager.M2	Carl Zeiss Mikroskopie
Mikroskopkamera	AxioCam MRc	Carl Zeiss Mikroskopie
Realtime-PCR System	StepOnePlus™	Life Technologies
Paraffin-Ausgießstation	EG1150	Leica Biosystems
Rotationsmikrotom	RM2255	Leica Biosystems
RNA-Spektrometer	Nanodrop-1000	Peqlab
Stereomikroskop	Stemi 2000C	Carl Zeiss Mikroskopie
Dissociator	gentleMACSTM Dissociator	Miltenyi Biotec

2.1.4 Auswertungsprogramme

Tabelle 4 Programme

Programm	Bezeichnung	Hersteller
Bildbearbeitung	ImageJ 1.37v	National Institute of Health
Durchflusszytometrie	Kaluza® Flow Analysis Software	Beckman Coulter
Statistik	GraphPad Prism Software Version 6.04	Graphpad Software

2.1.5 Hersteller

Tabelle 5 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Alfa Aesar	Haverhill, MA, USA
Applied Biosystems	Fostercity, CA, USA
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
BioVision	Milpitas, CA, USA
BioXcell	West-Lebanon, NH, USA
BioLegend	San Diego, California, USA
Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Canon	Tokio, Japan
Carl Zeiss Mikroskopie	Jena, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
eBioscience	San Diego, CA, USA
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Greiner Bio-One	Frankfurt, Deutschland
Leica Biosystems	Nussloch, Deutschland
Life Technologies	Eugene, OR, USA
Invitrogen	Waltham, MA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
Merck	Darmstadt, Deutschland
MP Biomedicals	Santa Ana, CA, USA
National Institute of Health (NIH)	Bethesda, MD, USA

Qiagen	Hilden, Deutschland
Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sakura Finetek	Alphen aan den Rijn, Niederlande
SERVA Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Taconic	Hudson, NY, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
VWR International	Darmstadt, Deutschland
Worthington Biochemical	Lakewood, NJ, USA
Zymo Research	Irvine, CA, USA

2.2 Tierversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A142 und Aktenzeichen 84-02.04.2015.A364).

Zucht und Haltung der für die experimentellen Untersuchungen benötigten Tiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In den Experimentalräumen war die Haltung unter standardisierten Bedingungen bei einem 12-stündigen Tag-/Nacht Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gewährleistet.

2.2.1 Atherosklerosemodell

Für die tierexperimentellen Analysen wurden 5-6 Wochen alte männliche *Apolipoprotein E defiziente* (*ApoE^{-/-}*) Mäuse (Taconic) verwendet. Die Dysfunktion im *Apolipoprotein E* Gen führt zu einer spontanen Entwicklung atherosklerotischer Plaques. Unter physiologischen Bedingungen vermittelt das Apolipoprotein E die Bindung des *very low-density lipoprotein* (vLDL) und der Chylomikrone an LDL-Rezeptoren in der Leber. Durch die Aufnahme der Lipide aus dem Blut in die Leber wird die systemische Akkumulation der Triglyceride und des Cholesterins reduziert. Folglich führt ein Defekt im *ApoE* Gen zu Hypercholesterinämie, welche die spontane Entwicklung der Atherosklerose begünstigt [125]. Der Nachweis der Atherogenese erfolgte über die Untersuchung des

Plaque-Besatzes in der Aorta und des Plaque-Volumens im *Truncus brachiocephalicus* (*brachiocephalic artery*, BCA).

2.2.2 Murines Modell der chemisch-induzierten chronischen Kolitis

Zur Induktion der chronischen Kolitis wurde das Dextrannatriumsulfat (*dextran sodium sulfate* - DSS)-induzierte Modell gewählt. Das 36-50 kDa große DSS-Salz wirkt aufgrund seiner negativen Ladung toxisch auf die Epithelschicht des Darms, wodurch die Darm-Barriere geschädigt wird. Die darmeigenen Bakterien dringen in die tieferen Schichten des Kolons ein und induzieren eine Immunantwort gefolgt von einer Entzündung (Einleitung 1.4.3)

Entsprechend dem klinischen Verlauf einer CED erfolgte die chemische Induktion der chronischen Kolitis über mehrere Zyklen (Abb. 3).

Jeder Zyklus bestand dabei aus einer sechstägigen DSS-Behandlung, die einer akuten Inflammationsphase entspricht, und einer anschließenden zweiwöchigen Erholungsphase, der Remissionsphase entsprechend. Das 2 %ige DSS wurde in autoklaviertem Wasser gelöst und den Tieren über das Trinkwasser verabreicht. Die Kontrollen erhielten autoklaviertes Wasser (Abb. 3) [137].

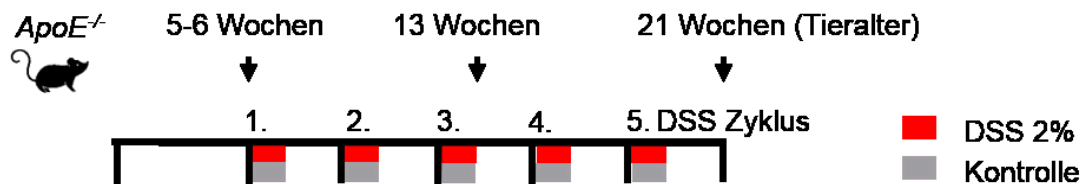


Abb. 3 Schematische Darstellung zur Induktion einer chronischen Kolitis.

Ab dem Alter von 5-6 Wochen bekommen *ApoE^{-/-}* Mäuse über fünf Zyklen eine DSS-Behandlung. Dabei besteht jeder Zyklus aus einer 6-tägigen DSS-Gabe (2 %) über das Trinkwasser und einer Erholungsphase von zwei Wochen. Die Kontrollen bekommen zeitgleich autoklaviertes Wasser. Die Probenentnahme erfolgte im Alter von 10, 13 und 21 Wochen.

Durch das fünfmalige Wiederholen des Zyklus wurde ein chronischer Verlauf imitiert. Bei Fütterung von normalem Haltungsfutter entwickelten die *ApoE^{-/-}* Mäuse nur langsam atherosklerotische Läsionen. Daher erfolgte die Grundcharakterisierung des Modells nach fünf DSS-Zyklen am Ende der letzten Erholungsphase. Zu diesem Endzeitpunkt waren die Tiere 21-22 Wochen alt.

Die Verifizierung der induzierten Kolitis erfolgte anhand von makroskopischen, mikroskopischen und biochemischen Kriterien. Es wurden ein Gewichtsverlauf der Mäuse erstellt, die Kryptenarchitektur und Kontinuität der Epithelschicht beurteilt und der Inflammationsmarker TNF- α im Kolongewebe analysiert [138].

Die Analyse der frühen Inflammation erfolgte im Alter von 13 Wochen, unmittelbar nach der dritten DSS-Gabe, sodass sich die *ApoE*^{-/-} Mäuse zu diesem Zeitpunkt in einer Phase der akuten Inflammation befanden (Abb. 3).

2.2.3 *In vivo* Depletion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten

Die Depletion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten erfolgte mittels eines *InVivoPlus* anti-mouse Ly6G Antikörpers. Der depletierende Antikörper wurde den *ApoE*^{-/-} Mäusen intraperitoneal (i.p.) nach einem festgelegten Schema zeitgleich mit der DSS-Behandlung über fünf Zyklen appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt parallel eine Isotyp-Antikörperkontrolle (Abb. 4 A). Die Konzentration und die Frequenz der Antikörper-Applikation wurden an die Stärke der Inflammation angepasst. Während der ersten DSS-Gabe wurden 50 µg, während der zweiten 100 µg und während der dritten, vierten und fünften DSS-Gabe 150 µg des Anti-Ly6G Antikörpers bzw. der Isotyp-Kontrolle verabreicht. Die Frequenz der Antikörper-Applikation wurde ebenfalls nach dem dritten DSS-Zyklus angepasst. Während der sechstägigen DSS-Behandlung erhielten die Tiere im Zyklus eins bis drei den Antikörper bzw. Isotyp Antikörper an Tag zwei, vier und sechs. Ab dem vierten DSS-Zyklus wurden die Antikörper an allen sechs Tagen, außer an Tag drei, appliziert (Abb. 4 B).

Jeweils vor und nach der DSS-Gabe wurde den Versuchstieren Blut aus der Schwanzspitze entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene mittels einer EDTA-beschichteten Microvette[®], dabei wurde die Schwanzvene durch eine einmalige Punktion verletzt. Im Alter von 21 Wochen, nach dem fünften DSS-Zyklus, wurde die Behandlung beendet und der Plaque-Besatz in der Aorta überprüft.

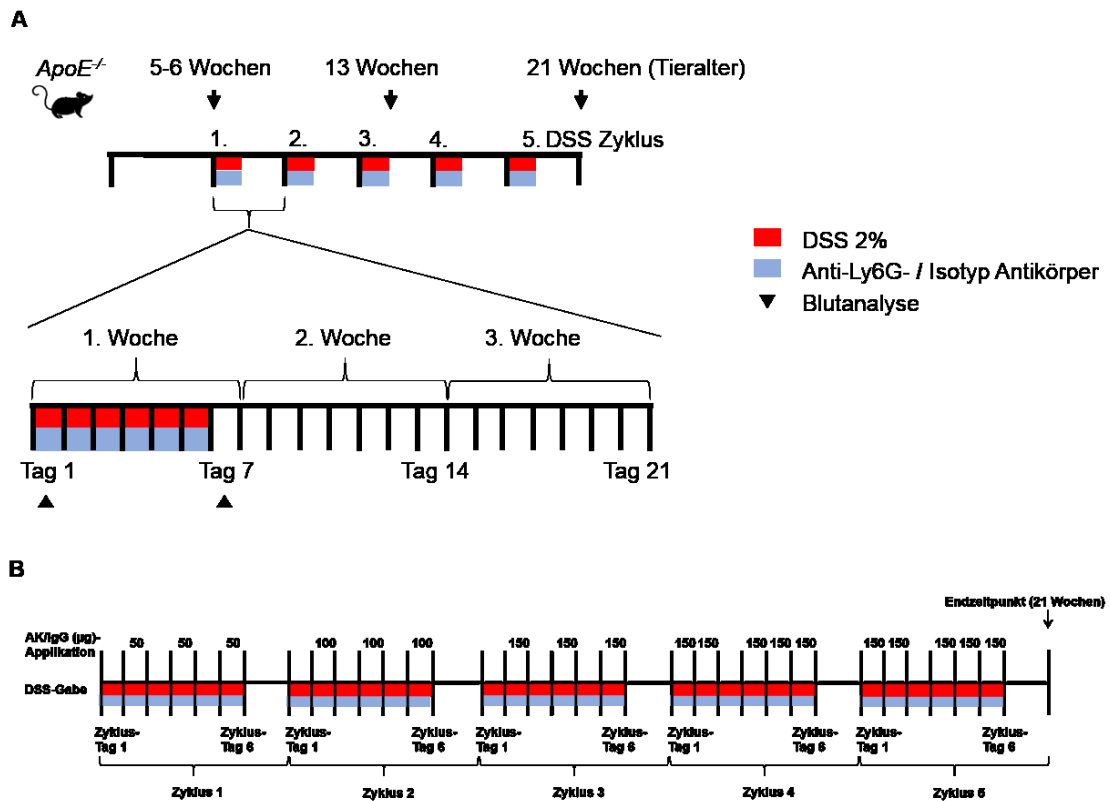


Abb. 4 Versuchsaufbau der Ly6G Depletion *in vivo*

A Im Alter von 5-6 Wochen werden die *ApoE*^{-/-} Mäuse einer DSS-Behandlung (s.o.) unterzogen. Während der Behandlung wird den Tieren zusätzlich ein Anti-Ly6G bzw. ein Isotyp Antikörper i.p. verabreicht. Vor und nach der DSS-Applikation wird Blut aus der Schwanzvene entnommen. Im Alter von 21 Wochen wird die Behandlung beendet und die zu untersuchenden Organe werden entnommen. **B** Die Dosis und Frequenz der Applikation des Antikörpers bzw. der Isotyp-Kontrolle variieren von Zyklus zu Zyklus. Im ersten Zyklus werden 50 µl, im zweiten 100 µl und im dritten, vierten und fünften 150 µl verabreicht. In den ersten drei Zyklen erfolgt die Applikation an Tag zwei, vier und sechs. In den letzten zwei Zyklen erfolgt die Applikation an Tag eins, zwei, vier, fünf und sechs.

2.2.4 Organpräparation

Nach dem fünften Zyklus, im Alter von 21 Wochen, oder nach der dritten DSS-Applikation, im Alter von 13 Wochen, wurde die Behandlung beendet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des rechten Ventrikels, wobei das Blut sofort mit 100 mM EDTA (Tabelle 1) antikoaguliert wurde. Um die Aorta und BCA möglichst blutfrei zu präparieren, wurden die Organe mit Heparin-versetztem (Endkonzentration 20 U/ml) DPBS-Puffer perfundiert. Nach Perfusion des Tieres wurde zuerst der Teil des Darms zwischen Rektum und Appendix entnommen. Als nächstes erfolgte die Entnahme der BCA von der Basis der Aorta bis einschließlich zur Bifurkation in die rechte Arteria subclavia und die rechte Arteria carotis. Anschließend folgte die Präparation der Aorta vom Aorten-Ursprung bis zur *Bifurcatio aortae*. Für die Gewinnung des Knochenmarks wurden zuletzt Tibia und

Femur entfernt. Die entnommenen Kompartimente wurden je nach Untersuchungsmethode unterschiedlich weiter prozessiert.

2.3 Histologie

2.3.1 Aufbereitung und Fixierung der Gewebe

Der entnommene Teil des Kolons wurde durch mehrfache Spülung mit DPBS-Gentamycin-Lösung (Endkonzentration: 20 µg/ml) von Faeces befreit und der Länge nach aufgeschnitten. Anschließend wurde der Darm von distal nach proximal aufgerollt. Um Zersetzungsprozesse während des Vorgangs zu verzögern, wurde auf Eis gearbeitet.

Zur Fixierung des Gewebes wurde sowohl der Darm als auch die Aorta und die BCA für 24 h in einer 4 %igen Formaldehydlösung bei 4 °C inkubiert. Nach der Fixierung wurden Aorta und BCA vom perivaskulären Fett befreit.

2.3.2 Anfertigung und Vorbereitung der Präparate

Für die morphologische Begutachtung des Darms und der BCA erfolgte die Anfertigung histologischer Schnitte. Dazu wurden die fixierten Organe zunächst in PBS überführt und in einem Gewebeentwässerungsautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und mit dem Intermedium Roticlear® auf das Paraffin vorbereitet. Das Gewebe konnte anschließend in Paraffinblöcke an einer Paraffin-Ausgießstation eingebettet werden. Die 5 µm dicken Paraffinschnitte wurden an einem Rotationsmikrotom angefertigt. Die fertigen Schnitte wurden anschließend für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 1 h bei 60 °C hitzefixiert.

Jeweils fünf Schnitte der BCA wurden mit einem Abstand von 75 µm auf einen Objektträger aufgenommen. Für die histologische Analyse des Darmgewebes wurden hingegen jeweils zwei konsekutive Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen.

Vor der Färbung der Paraffinschnitte erfolgte das Entparaffinieren, angefangen mit drei 15-minütigen Inkubationsschritten in Roticlear®, gefolgt von je einer 2-minütigen Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe bestehend aus 99,8 %igem (V/V), 96 %igem (V/V) und 70 %igem (V/V) Ethanol. Zuletzt wurden die Schnitte je zweimal für 5 min in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; Tabelle 1) gewaschen. Für die Färbung wurde jeweils ein Objektträger pro Maus verwendet.

2.3.3 H&E-Färbung

Um einzelne Zellstrukturen zu identifizieren, erfolgte eine Hämatoxylin- und Eosin (H&E)-Färbung der Darm- und BCA-Schnitte. Dazu wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren in destilliertem Wasser gewaschen und für 1 min mit einer Hämalaun-Lösung nach Mayer (Tabelle 1) gefärbt. Nach einer kurzen Inkubation in Leitungswasser und 1 % HCl (Tabelle 1) erfolgte das Bläuen unter fließendem Wasser für 10 min. Das Hämatoxylin lagert sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern an. Die daraus resultierende Färbung ist zunächst braun. Erst nach der Anhebung des pH-Wertes durch das Leitungswasser wird der Farbumschlag in das Blaue induziert. Somit erscheinen die basophilen Strukturen wie die Zellkerne blau. Die acidophilen Strukturen wie das Zellplasma wurden für 1 min mit einer Eosin-Lösung (Tabelle 1) pink angefärbt. Zum erneuten Entwässern der Schnitte erfolgte eine Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (s.o.) für 2 min und einer Inkubation mit Roticlear® für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte permanent mit Roti®-Mount Eindeckmedium eingedeckt.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 20-facher bzw. 10-facher Vergrößerung mittels eines *Zeiss Axio Imager.M2* Mikroskops mit einer *AxioCam MRc* Kamera aufgenommen. Zur Auswertung der Färbung wurde die Software *ImageJ 1.37* verwendet. Zur Quantifizierung des Plaque-Volumens in der BCA wurde der Anteil der Plaque-Fläche auf die Fläche des Querschnitts der Arterie bezogen und mit 75 µm multipliziert, um das Volumen zu erhalten.

2.3.4 Öl-Rot-O-Färbung

Zur Bestimmung der Plaque-Belastung wurde eine Öl-Rot-O (ÖRO)-Färbung durchgeführt. Einer der Bestandteile atherosklerotischer Plaques sind Triglyceride, die sich während der Atherogenese in die Neointima einlagern. Durch den lipophilen Azofarbstoff werden diese Lipiddepots rot angefärbt. Die fixierten und vom perivaskulären Fett befreiten Aorten wurden für 5 min in 78 % (V/V) Methanol gewaschen und anschließend für 90 min in der ÖRO-Färbelösung (Tabelle 1) inkubiert. Um die Rückstände der Färbelösung zu entfernen, wurden die bereits gefärbten Aorten erneut für 5 min in frischem 78 % (V/V) Methanol gewaschen und zuletzt in PBS-Puffer überführt. Zur Detektion der gefärbten Läsionen wurden unspezifisch gefärbte Farbpartikel von der *Tunica adventitia* entfernt und die Aorta der Länge nach aufgeschnitten. Die geöffnete Aorta wurde in der *en face* Darstellung mittels eines Stereomikroskops und einer Digitalkamera aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der angefärbten Läsionen mit der Software *ImageJ 1.37*. Hierzu wurde der Anteil der Plaque-Fläche auf die Fläche der Aorta bezogen. Für die Auswertung

wurde ein 1,7 cm langer Teil der Aorta analysiert. Dieser Teil umfasste die Aorta von der Spitze des Aortenbogens bis zu den Nierenabgängen.

2.4 Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen

Für die Identifizierung der Immunzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie wurden die einzelnen Gewebe aus der Maus entnommen und nach einem für jedes Gewebe spezifischen Protokoll aufgereinigt. Zur Identifizierung der unterschiedlichen Populationen wurden diese mittels spezifischer Antikörper gegen die entsprechenden Oberflächenmoleküle markiert. Die Durchführung der Färbung erfolgte für alle Kompartimente ähnlich. Zunächst wurden unspezifische Bindungen durch einen Anti-Maus-CD16/32 Antikörper für 10 min bei 4 °C gesättigt. Mit Ausnahme des Blutes wurden die Zellen zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen für 30 min bei 4 °C mit dem *LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* inkubiert.

Daraufhin folgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern für 15 min bei 4 °C. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurden *Flow-Count™ Fluorospheres* nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Messung der gefärbten Proben erfolgte am Gallios™ Durchflusszytometer. Zur Auswertung wurden sowohl Isotyp-Kontrollen als auch „*FMO*“ (*fluorescence minus one*)-Kontrollen verwendet. Für die Analyse wurde die *Kaluza® Flow Analysis Software* eingesetzt.

Tabelle 6 Eingesetzte Antikörper-Kombinationen zur durchflusszytometrischen Analyse der Immunzellen

Immunzellen (Kompartiment)	Antikörper	Klon	Hersteller
Lymphozyten (Blut-Herz)	CD4-FITC	RM4-5	Invitrogen
	CD45-PE	30-F11	BioLegend
	CD8a-AlexaFluor®647	53-6.7	BioLegend
	CD3-APC/Cy7	17A2	BioLegend
	CD19-PacificBlue™	6D5	BioLegend
Neutrophile/ Monozyten (Blut-Herz)	Ly6C-AlexaFluor®488	HKL1.4	BioLegend
	CD11b-PE	M1/70	BD Biosciences
	CD115-APC	AFS98	eBioscience
	Ly6G-PacificBlue™	1A8	BioLegend
Neutrophile/ Monozyten (Blut- Schwanzvene)	Ly6C-AlexaFluor®488	HKL1.4 M1/70	BioLegend
	CD11b-PE	N418	BD Biosciences
	CD11c-PE/Cy7	AFS98	BioLegend

	CD115-APC	30-F11	eBioscience
	CD45-AlexaFluor®700	1A8	BioLegend
	Ly6G-PacificBlue™		BioLegend
Granulozyten (Aorta)	Ly6C-AlexaFluor®488	HKL1.4	BioLegend
	CD45-PE	30-F11	BioLegend
	CD11b-PE/Dazzle™ 594	M1/70	BioLegend
	F4/80-AlexaFluor®647	BM8	BioLegend
	CD11c-APC/Cy7	N418	BioLegend
	Ly6G-PacificBlue™	1A8	BioLegend
	Live/Dead®-Aqua		molecular probes® life technologies™
Stammzellen (Knochenmark)	CD34-FITC	RAM34	eBioscience
	CD16/32-PE	93	BioLegend
	CD117(cKit)-PE/Cy7	2B8	BioLegend
	Sca-1-APC	D7 17A2/RB6-	BioLegend
	Lin-PacificBlue™	8C5/RA3- 6B2/Ter- 119/M1/70	BioLegend
	Live/Dead®-Aqua		molecular probes® life technologies™
Vorläuferzellen (Knochenmark)	Ly6C-AlexaFluor®488	HKL1.4	BioLegend
	CD117(cKIT)-PE	2B8	BioLegend
	CD16/32-AlexaFluor®647	93	BioLegend
	Ly6G-APC/Cy7	1A8	BioLegend
	CD11b-PacificBlue™	M1/70	BioLegend
	Live/Dead®-Aqua		molecular probes® life technologies™
Neutrophile/ Monozyten (Knochenmark)	Ly6C-AlexaFluor®488	HKL1.4	BioLegend
	CD11b-PE	M1/70	BD Biosciences
	CD115-APC	AFS98	eBioscience
	Ly6G-PacificBlue™	1A8	BioLegend
	Live/Dead®-Aqua		molecular probes® life technologies™

2.4.1 Durchflusszytometrische Identifizierung der zirkulierenden Immunzellen

Für die Analyse der zirkulierenden Immunzellen wurde das Blut entweder durch Punktion des rechten Ventrikels oder durch die Punktion der Schwanzvene gewonnen. Die Aufarbeitung der Blutprobe erfolgte abhängig von der zu untersuchenden Zellpopulation. In der Analyse wurden die Blutproben der zwei Punktionslokalisationen getrennt betrachtet und verglichen.

Tabelle 7 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Identifizierung zirkulierender Immunzellpopulationen

Immunzellen	Markerkombinationen
Lymphozyten	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD3 ⁺
Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺
Ly6C ^{high} Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{high}
Ly6C ^{low} Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{low}
Neutrophile	CD11b ⁺ CD115 ⁻ Ly6G ⁺
Neutrophile nach Ly6G Epitop	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁻ Ly6G ⁺
Neutrophile nach <i>side scatter</i> Lage	CD45 ⁺ CD11b ⁺ CD115 ⁻ SSC ^{high}

2.4.1.1 Lymphozyten

Zur Beseitigung der Erythrozyten wurde das Blut zunächst für 7 min bei 4 °C mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (Tabelle 1) behandelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 300 x g wurde das Zellpellet in PEB-Puffer (Tabelle 1) resuspendiert und wie oben beschrieben gefärbt.

2.4.1.2 Monozyten und neutrophile Granulozyten

Zur Abgrenzung der neutrophilen Granulozyten von den Monozyten wurde der Monozyten-Oberflächenmarker CD115 verwendet. Dazu erfolgte die Färbung vor der Aufbereitung wie bei Breslin et al. beschrieben [139]. Zur Stabilisierung der Probe wurde eine Fixierung mit 1 %igem Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Analysiert wurden Monozyten mit den Subpopulationen Ly6C^{high} Monozyten, Ly6C^{low} Monozyten sowie neutrophilen Granulozyten. Zur Verifizierung der Ly6G Depletion wurden die neutrophilen Granulozyten neben dem klassischen Nachweis über das Ly6G Epitop auch über ihre Lage im *side scatter* identifiziert (in Anlehnung an Jaeger BN et al.) [140].

2.4.2 Durchflusszytometrische Identifizierung der Immunzellpopulationen in der Aorten-Wand

Vor der Präparation der Aorta wurde das Gefäßsystem der Maus mit 20 ml PBS/Heparin-Lösung perfundiert. Vor der Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Aorta von umliegendem perivaskulärem Fettgewebe befreit. Nach einem 1 h Verdau in einer Kollagenase-Lösung bei 37 °C, wurde die Suspension 2-mal für 5 min auf einem Vortex Schüttler homogenisiert und durch einen 70 µm Nylonfilter gefiltert. Zur Regeneration der Zellen folgte eine 30-minütige Inkubation in RPMI-Medium bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen in PEB-Puffer (Tabelle 1) aufgenommen und gefärbt. Untersucht wurden Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten.

Tabelle 8 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Differenzierung aortaler Zellpopulationen

Immunzellen	Markerkombinationen
Lymphozyten	CD45+CD19+CD3+
Makrophagen	CD45+CD11b+Ly6G-F4/80+
Monozyten	CD45+CD11b+F4/80-Ly6G-Ly6C+
Dendritische Zellen	CD45+CD11b+F4/80-CD11c+
neutrophile Granulozyten	CD45+CD11b+F4/80-Ly6G+

2.4.3 Durchflusszytometrische Identifizierung der Immun-, Vorläufer- und Stammzellen im Knochenmark

Zur Isolation des Knochenmarks wurden Femur und Tibia freipräpariert und die Gelenkköpfe abgetrennt. Das gesamte Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze mit einer 26G-Kanüle mit DPBS-Puffer aus dem Knochen herausgespült. Die Suspension wurde mit Hilfe eines 40 µm Nylonfilters homogenisiert und anschließend einer Erythrozyten-Lyse wie zuvor beschrieben unterzogen. Da zur Identifikation der myeloiden Vorläuferzellen der CD16/32-Marker verwendet wurde, erfolgte an dieser Stelle keine Blockierung, sondern es wurde direkt mit der Färbung fortgefahren. Die Aufarbeitung der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten erfolgte wie im Blut, zusätzlich wurde vor der Antikörper-Färbung eine Lebend/Tod-Färbung wie oben beschrieben durchgeführt. Untersucht wurden die hämatopoetischen Stammzellen, myeloide Vorläuferzellen sowie Monozyten und reife neutrophile Granulozyten. Die Analyse erfolgte nach Ueda Y. *et al.* und Fiedler K. *et al.* [141, 142].

Tabelle 9 Markerkombinationen zur durchflusszytometrischen Differenzierung der Zellpopulationen im Knochenmark

Immunzellen	Markerkombinationen
Promyelozyten und Myelozyten	CD11b ^{int} Ly6G ^{int}
Reife neutrophile Granulozyten	CD11b ^{high} Ly6G ^{high}
Monozyten	CD11b ⁺ CD115 ⁺
Multipotente hämatopoetische Stammzellen (LSK)	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ cKit ⁺
Myeloide Vorläuferzellen (LK)	Lin ⁻ Sca-1 ⁻ cKit ⁺
Gemeinsame Myeloide Vorläuferzellen (CMP)	CD34 ^{int} CD16/32 ^{int}
Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (GMP)	CD34 ⁺ CD16/32 ⁺

2.5 Zell-/ Gewebekultur Versuche

2.5.1 Isolation der Knochenmarksneutrophilen

Zur Isolation der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark wurde das gesamte Knochenmark wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben mit DPBS-Puffer aus Femur und Tibia herausgespült. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde die Zellsuspension für 7 min mit einer Erythrozyten-Lyse-Lösung inkubiert. Dann erfolgte die Isolierung der neutrophilen Granulozyten durch eine negative Selektion mit einem *Neutrophil Isolation Kit*. Durchgeführt wurde die Isolation nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension pelletiert. Das Pellet wurde zur RNA Isolation in 1 ml *peqGOLD TriFast™* Reagenz resuspendiert und bei -20 °C bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

2.5.2 Ex vivo Kultivierung des Kolons

Für die Untersuchung des *granulocyte colony-stimulating factors* (G-CSF) Sekretion aus dem Kolon wurde ein Teilstück des Darms *ex vivo* kultiviert. Nach der Entnahme eines Kolonabschnittes zwischen Rektum und Appendix wurde der Darm drei Mal mit einer Gentamycin/PBS-Lösung gespült, um Faecesreste zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe gewogen, in ca. 0,5 cm große Stücke zerkleinert und in 3 ml RPMI-Medium für 24 h bei 37 °C kultiviert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren. Zur Messung der ins Medium sekretierten Zytokine wurde eine Multiplex-Messung durchgeführt. Die Konzentration der Zytokine wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf das Gewicht des jeweiligen Darmstückes normiert.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Multiplex-Messung der sekretierten Zytokine im Blutplasma und im Medium der Organkultur

Die Multiplex-Messung wurde verwendet, um einen Pool an gängigen Zytokinen wie IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, Interferon-gamma (IFN- γ), *CXC-motiv-chemokine-ligand* pt1 (CXCL1), MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α zur gleichen Zeit zu untersuchen. Die Zytokine wurden sowohl im Medium der Organkultur als auch im Blutplasma gemessen. Die Gewinnung des Organkultur-Mediums wurde oben beschrieben.

Zur Gewinnung des Blutplasmas wurde das mit EDTA antikoagulierte Blut nach der Entnahme für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Um die Reinheit zu erhöhen wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 5 min bei 4 °C angeschlossen. Die Proben wurden nach Herstellerangaben 1:4 verdünnt. Die Messung wurde von Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum mit Hilfe eines *Bio-Plex*[®] 200 *suspension array* System durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der *Bio-Plex Manager*[™] Software Version 6.0.

2.6.2 Cholesterin Bestimmung im Blutplasma

Für die Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde das EDTA-Plasma wie zuvor beschrieben gewonnen. Die Analyse erfolgte mit dem *HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit*. Durchgeführt wurden Messung und Auswertung wie vom Hersteller angegeben. Die Ergebnisse wurden in mg/dl Plasma dargestellt.

2.6.3 Bestimmung der G-CSF Konzentration im Blutplasma

Die G-CSF Konzentration wurde im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um die Konzentration im Verlauf der chronischen Kolitis zu untersuchen. Dazu wurde die Messung an Plasmaproben durchgeführt, die jeweils vor und nach den ersten drei DSS-Applikationen gewonnen wurden. Zur Analyse wurde das *Mouse G-CSF ELISA Kit* eingesetzt. Durchführung und Auswertung erfolgten nach Herstellerangaben. Dargestellt wurden die Messwerte in pg/ml Plasma.

2.7 Molekularbiologische Techniken

2.7.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Isolierung wurde die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode verwendet. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualität erfolgte anschließend mit Hilfe eines NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometers und –Fluorometers. Die Qualität wurde anhand der Ratio der Absorption bei 260 nm und 208 nm beurteilt, der Wert ~2 wurde hierbei als „rein“ betrachtet [143].

2.7.1.1 RNA-Extraktion aus der Aorta

Zur Extraktion der RNA aus der Aorta wurde die zuvor bei -80 °C gefrorene Aorta mit 700 µl des *peqGOLD TriFast™* Reagenz in ein *M Tube* überführt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit dem RNA-Programm 2 nach Herstellerangaben in einem *gentleMACS™ Dissociator*. Anschließend wurde das Homogenat mit Chloroform (Verhältnis 5:1) gemischt und kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C wurde die wässrige Phase im gleichen Volumen mit 99,8 %igem Ethanol (Verhältnis 1:1) versetzt. Zur weiteren Aufreinigung wurde das *RNA Clean & Concentrator™* Kit nach Herstellerangaben verwendet.

2.7.1.2 RNA-Extraktion aus Knochenmarksneutrophilen

Die zuvor aus dem Knochenmark isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in 1 ml *peqGOLD TriFast™* Reagenz resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Homogenat mit Chloroform (Verhältnis 5:1) versetzt, kräftig geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 15000 x g wurde die wässrige Phase abgenommen, mit Isopropanol gemischt und kräftig geschüttelt. Die Proben wurden bei 4 °C über Nacht im Dunkeln gefällt. Anschließend wurde die RNA für 45 min bei 4 °C und max. Umdrehung pelletiert und das Pellet mit 75 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (45 min, 4 °C und max. Umdrehung). Nachdem die RNA bei 37 °C für 5 min getrocknet wurde, erfolgte die Resuspension mit 50 µl RNase freiem Wasser bei 65 °C für 5 min.

2.7.2 Reverse Transkription

Nach Bestimmung der RNA-Konzentration und –Qualität wurde 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde nach Herstellerangaben mit dem *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* durchgeführt und anschließend bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.7.3 Quantitative Polymerase-Ketten (*Chain*)-Reaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung der mRNA wurde die SYBR Green Methode unter Verwendung des *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kits* (Life Technologies) eingesetzt. Dabei wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 5 µl *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* mit ROX-Referenzfarbstoff, 2,5 µl cDNA (2,083 ng/µl) und 2,5 µl Primerlösung (Endkonzentration 0,625 µM) angesetzt. Die Primerlösung enthielt sowohl den Vorwärts- als auch Rückwärts-Primer, die in RNase freiem Wasser gelöst wurden. Die Analyse erfolgte in Doppelbestimmung mit 18S als endogene Kontrolle am *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* mit anschließender Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätsbestimmung der eingesetzten Primer. Die Auswertung wurde mit der *StepOne™ Software Version 2.3* durchgeführt, wobei zur Berechnung der relativen mRNA-Expression der Zielgene die $\Delta\Delta C_q$ -Methode verwendet wurde [144].

Tabelle 10 Zum mRNA-Expressionsnachweis eingesetzte Oligonukleotide

Gen	Vorwärts-Primer (5'-3')	Rückwärts-Primer (5'-3')
<i>18S</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Csf3</i>	GCCCAGATCACCCAGAATCC	GCCTCTCGTCCTGACCATAG
<i>Csf3r</i>	CATTAACGACGGGGCTAGAA	AGGGGCTTAACAATACCACTCA
<i>Glg1</i>	AAACACACCTGGAGCAACAAC	TTCCACAACAAATGATTGCAG
<i>Psgl1</i>	ACCACAAGTGTCTGGCAGTG	ACAAGGAAGCTTGGGGACAT
<i>Sele</i>	CGAGACGCCATCATGCAAAG	CCTGCAACGTGAAACTCTGC
<i>Tnfa</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG
<i>Ccl3</i>	CCGGAAGATTCCACGCCAAT	CTTGGACCCAGGTCTCTTTGG
<i>Ccl5</i>	AGCAGCAAGTGCTCCAATCT	CCCACTTCTTCTCTGGGTTG
<i>Mcp1</i>	CCACTCACCTGCTGCTACTC	GCACAGACCTCTCTTTGAGC
<i>Il1β</i>	GTGGCAGCTACCTGTGTCTT	AATGGGAACGTACACACCA
<i>Ly6g</i>	GGGGCTGGAGTGCTACAATT	TCAGAGAAGGGGCAGGTAGT

2.8 Statistische Auswertung

Die Durchführung der statistischen Auswertung erfolgte mittels *GraphPad Prism Software Version 7.0*. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistischen Ausreißer wurden mittels *Grubb's Test* ($\alpha=0,05$) identifiziert und von den Berechnungen ausgeschlossen. Bei der statistischen Analyse wurde von einer Normalverteilung nach Gauß ausgegangen, wobei im Vergleich zweier Datensätze ein ungepaarter, zweiseitiger *Student's t-test* angewendet wurde. Bei einem signifikanten F-Test, der die Varianz zwischen zwei Gruppen vergleicht, wurde ein

ungepaarter, zweiseitiger *Mann-Whitney Test* eingesetzt. Zur statistischen Analyse der Gentranskriptionsdaten wurden diese vor der statistischen Analyse logarithmiert. Bei allen Zeitverlaufsanalysen wurde zur statistischen Berechnung die *Two-Way-ANOVA* verwendet. Ein *P*-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

Die folgenden Daten wurden erhoben, um den Einfluss einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose in einem murinen Modell zu untersuchen und potenzielle zugrundeliegende Mechanismen für die Beobachtungen aufzuklären. Hierzu wurden *Apolipoprotein E (ApoE)*-defiziente Mäuse im Alter von sechs Wochen verwendet. Aufgrund einer globalen Deletion des *ApoE* Gens entwickeln diese Mäuse spontan, ohne atherogene Diät, atherosklerotische Läsionen. Die Induktion der chronischen intestinalen Inflammation erfolgte mittels Dextrannatriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS). Das DSS-Modell stellt ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Pathogenese der gastrointestinalen Inflammation dar.

3.1 Dextrannatriumsulfat -induzierte Kolitis in *ApoE*^{-/-} Mäusen

Zur Induktion einer chronischen Kolitis in *ApoE*^{-/-} Mäusen wurde DSS über fünf Zyklen mit dem Trinkwasser verabreicht. Ein Zyklus bestand hierbei aus einer sechstägigen DSS-Behandlung und einer zweiwöchigen Erholungsphase ohne DSS-Gabe (Abb. 3; Material und Methoden) [137]. Der Zyklusaufbau wurde in dieser Form gestaltet, um den klinischen Verlauf einer CED zu imitieren, die im Wesentlichen aus den drei Phasen der akuten Inflammation, der persistierenden Inflammation sowie der Remission besteht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten autoklaviertes Trinkwasser; beide Gruppen bekamen gewöhnliches Haltungsfutter.

3.1.1 Gewichtsverlauf

Der Gewichtsverlust ist sowohl bei Patienten mit einer CED als auch in Tiermodellen der Kolitis für das DSS-induzierte Kolitismodell ein Charakteristikum, daher erfolgte die Verifizierung der chronischen Kolitis unter anderem durch die Detektion der reduzierten Zunahme des Körpergewichts der behandelten Mäuse. Das Gewicht wurde über den gesamten Behandlungsverlauf der Tiere vor und nach jeder DSS-Gabe aufgezeichnet. Es zeigte sich am Ende jeder DSS-Behandlung eine Tendenz zur verminderten Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unmittelbar nach der dritten DSS-Behandlung, also im Alter von 13 Wochen, war die Zunahme des Körpergewichts bei DSS-behandelten Tieren verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe über die Zeit reduziert. Diese signifikant reduzierte Gewichtszunahme zeigte sich zunehmend deutlicher nach den Zyklen vier und fünf. Trotz dessen, dass die Tiere während der Erholungsphase an Gewicht zunehmen, bleibt ab der dritten DSS-Behandlung die reduzierte Gewichtszunahme signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 5).

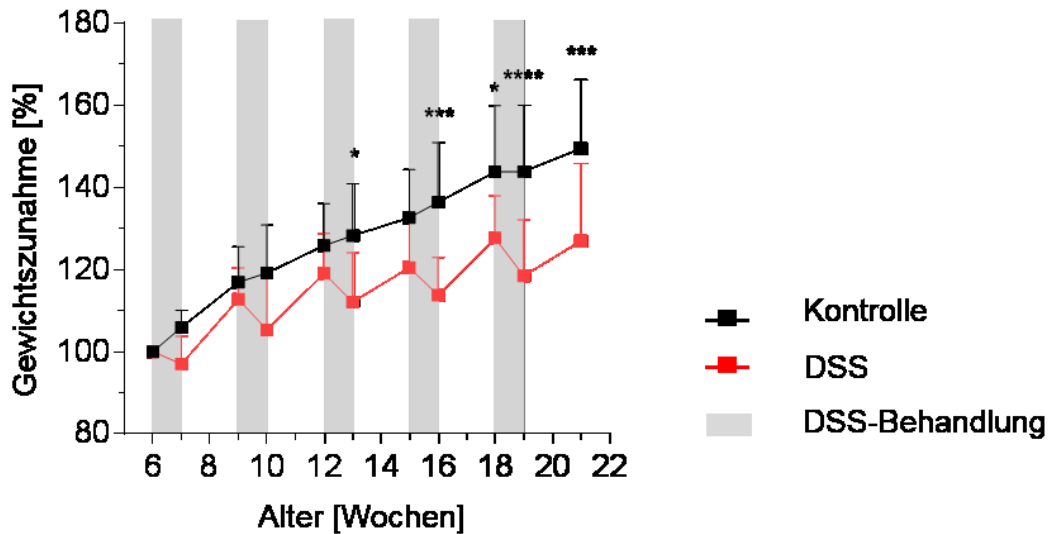


Abb. 5 DSS-behandelte *ApoE*^{-/-} Mäuse weisen eine reduzierte Gewichtszunahme auf.

Die Gewichtsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 15 Wochen, n=10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2 Inflammation des Kolons

Zur weiteren Verifizierung der chronisch-persistierenden Inflammation des Kolons wurde eine mRNA-Expressionsanalyse des Darmgewebes durchgeführt. Dabei wurde das RNA-Transkript des Inflammationsmarkers *Tumor Nekrose Faktor (TNF) α* nachgewiesen. Nach dem fünften DSS-Zyklus, im Alter von 21 Wochen, zeigte sich in der DSS-behandelten Gruppe eine fast 10-fach gesteigerte Expression des Transkripts im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 6).

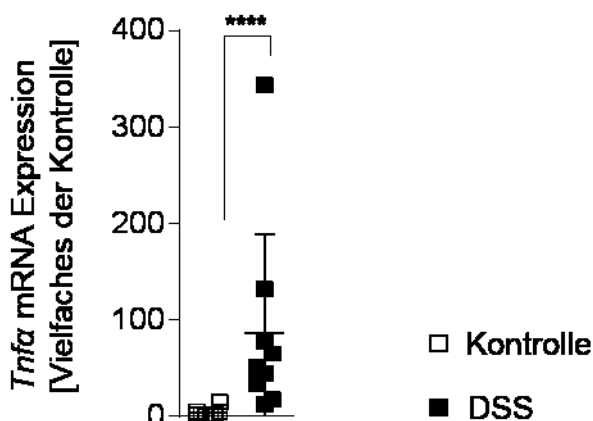


Abb. 6 Erhöhte mRNA-Expression von *Tnfa* des Kolons in DSS-behandelten *ApoE*^{-/-} Mäusen nach fünf DSS-Zyklen.

Der Nachweis der mRNA-Expression von *Tnfa* im Kolon erfolgte mittels der quantitativen *Real-Time-PCR* im Alter von 21 Wochen, n=8/9. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.3 Morphologie des Darms

Eine chronische Entzündung des Darmgewebes führt aufgrund ihres rezidivierenden Charakters zu einer dauerhaften Schädigung des Gewebes. Zur weiteren Kontrolle einer manifesten Darmentzündung wurde die Morphologie des Darms im Längsschnitt nach einer H&E-Färbung betrachtet. Es zeigte sich in der Gesamtheit der hier untersuchten Mäuse sowohl eine diskontinuierliche Epithelschicht als auch eine anormale Kryptenarchitektur nach dem fünften Zyklus der DSS-Behandlung (Abb. 7). Primär konnten diese Beobachtungen im distalen Bereich des Kolons zum Rektum hin beobachtet werden.

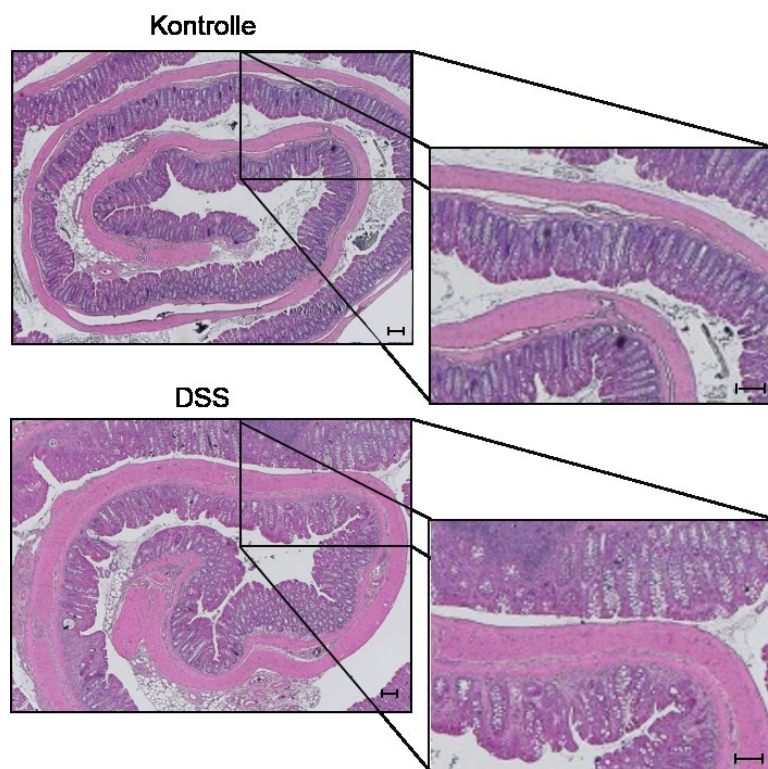


Abb. 7 Verlust der Kryptenarchitektur des Kolons in *ApoE*^{-/-} Mäusen im CED Modell.

Repräsentative Aufnahmen des H&E-gefärbten Kolons einer DSS-behandelten und einer Kontrollmaus im Alter von 21 Wochen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm ; 10-fache bzw. 20-fache Vergrößerung.

3.2 Atherosklerose im Kollitismodell.

Um den Einfluss der CED auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose zu untersuchen, wurde die Plaque-Belastung an zwei Lokalisationen bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 21 Wochen alt. Zum einen wurde der Plaque-Besatz anhand der Lipideinlagerung in der Aorta untersucht, zum anderen wurde das Volumen der Läsionen im *Truncus brachiocephalicus* (*brachiocephalic artery, BCA*), dem ersten Gefäßabgang vom Aortenbogen, bestimmt.

3.2.1 Plaque-Entwicklung

Spezifisch wurde die Lipideinlagerung in der Aorta anhand einer ÖRO-Färbung untersucht, wobei die eingelagerten Lipide rot angefärbt werden. Die Untersuchung zeigte, dass die Mäuse mit einer chemisch-induzierten Kolitis im Vergleich zur Kontrollgruppe eine beinahe doppelt so hohe Plaque-Belastung aufwiesen (Abb. 8 A).

Die Bestimmung des Plaque-Volumens erfolgte nach einer H&E-Färbung der BCA an fünf Ebenen in einem Abstand von 75 μm . Dabei zeigte sich eine signifikante Verdopplung des Volumens der Plaques in der BCA von *ApoE*^{-/-} Mäusen nach der DSS-Behandlung über fünf Zyklen (Abb. 8 B).

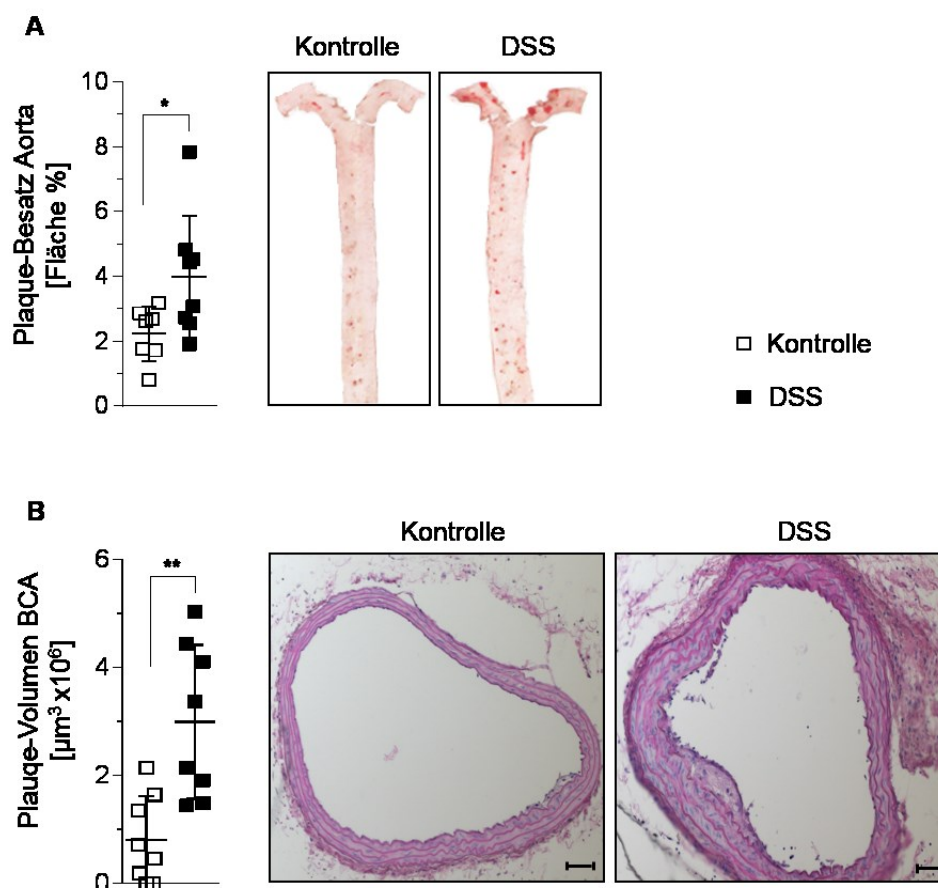


Abb. 8 Erhöhte Plaque-Belastung in *ApoE*^{-/-} Mäusen nach DSS-Behandlung im Alter von 21 Wochen.

Die Bestimmung des Plaque-Besatzes in der Aorta und des Plaque-Volumens in der BCA erfolgte im Alter von 21 Wochen. **A** Bestimmung der Plaque-Belastung der Aorta anhand der ÖRO-Färbung, $n=7/8$, mit repräsentativen Aufnahmen. **B** Quantifizierung des Plaque-Volumens in der BCA anhand einer H&E-Färbung, $n=8$, mit repräsentativen Aufnahmen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Einfluss der Kolitis auf die systemische und aortale Inflammation nach fünf DSS-Zyklen

Die Entwicklung der Atherosklerose ist ein komplexer multifaktorieller Vorgang. Neben Lipiden und Matrixkomponenten spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Die Migration der Immunzellen in die Aortenwand und die Induktion einer chronischen Inflammation sind Schlüsselereignisse der Atherogenese [6].

Auch bei der entzündlichen Darmerkrankung wird eine fehlregulierte Immunantwort als ursächlich erachtet. Somit ist die Untersuchung der beteiligten Komponenten des Immunsystems sowohl in der Zirkulation als auch im aortalen Gewebe unerlässlich.

3.3.1 Plasma-Cholesterinkonzentration

In den Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Lipidgehalt der Läsionen im Aorten-Ursprung reduziert ist. Dennoch konnte anhand der quantitativen Analyse der Plaques der gesamten Aorta ein signifikant erhöhter Plaque-Besatz detektiert werden. Da eine Hyperlipidämie allgemein als Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose gilt, wurde diese auch in dem Kolitismodell untersucht.

Der kolorimetrische Nachweis des Gesamt-Cholesterins erfolgte im EDTA-Plasma von 21 Wochen alten DSS-behandelten und unbehandelten Tieren. Die Tiere mit einer chronischen Darmentzündung zeigten einen deutlich reduzierten Cholesterinspiegel im Plasma verglichen mit den Kontrolltieren (Abb. 9).

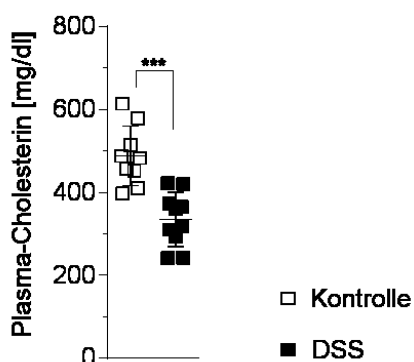


Abb. 9 Reduziertes Plasma-Cholesterin in CED Mäusen im Alter von 21 Wochen.

Kolorimetrische Messung des Gesamt-Cholesterins im Plasma von DSS-behandelten Mäusen und Kontrolltieren im Alter von 21 Wochen, $n=9/10$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.2 Zirkulierende Zytokine

Im Alter von 21 Wochen befanden sich die Tiere in der Erholungsphase nach der letzten DSS-Gabe. Dieser Zeitpunkt ist vergleichbar mit der Remissionsphase des klinischen Verlaufs einer CED. Um die systemischen Entzündungsprozesse zu diesem Zeitpunkt zu untersuchen, wurden die zirkulierenden Zytokine analysiert. Dabei konnte ein in proinflammatorische Richtung tendierendes Profil detektiert werden (Abb. 10 A).

Eine detailliertere Aufschlüsselung der einzelnen Zytokine ergab eine signifikant erhöhte Konzentration des Zytokins G-CSF in den DSS-behandelten Tieren (Abb. 10 B). CCL5 und MPC-1 sind ebenfalls proinflammatorische Zytokine, die im Zusammenhang mit Inflammationsgeschehen untersucht werden. Die Plasmakonzentration von CCL5 zeigte eine Tendenz zur Erhöhung in den behandelten Tieren, die von MCP-1 war jedoch in DSS-behandelten Tieren unverändert. (Abb. 10 C-D).

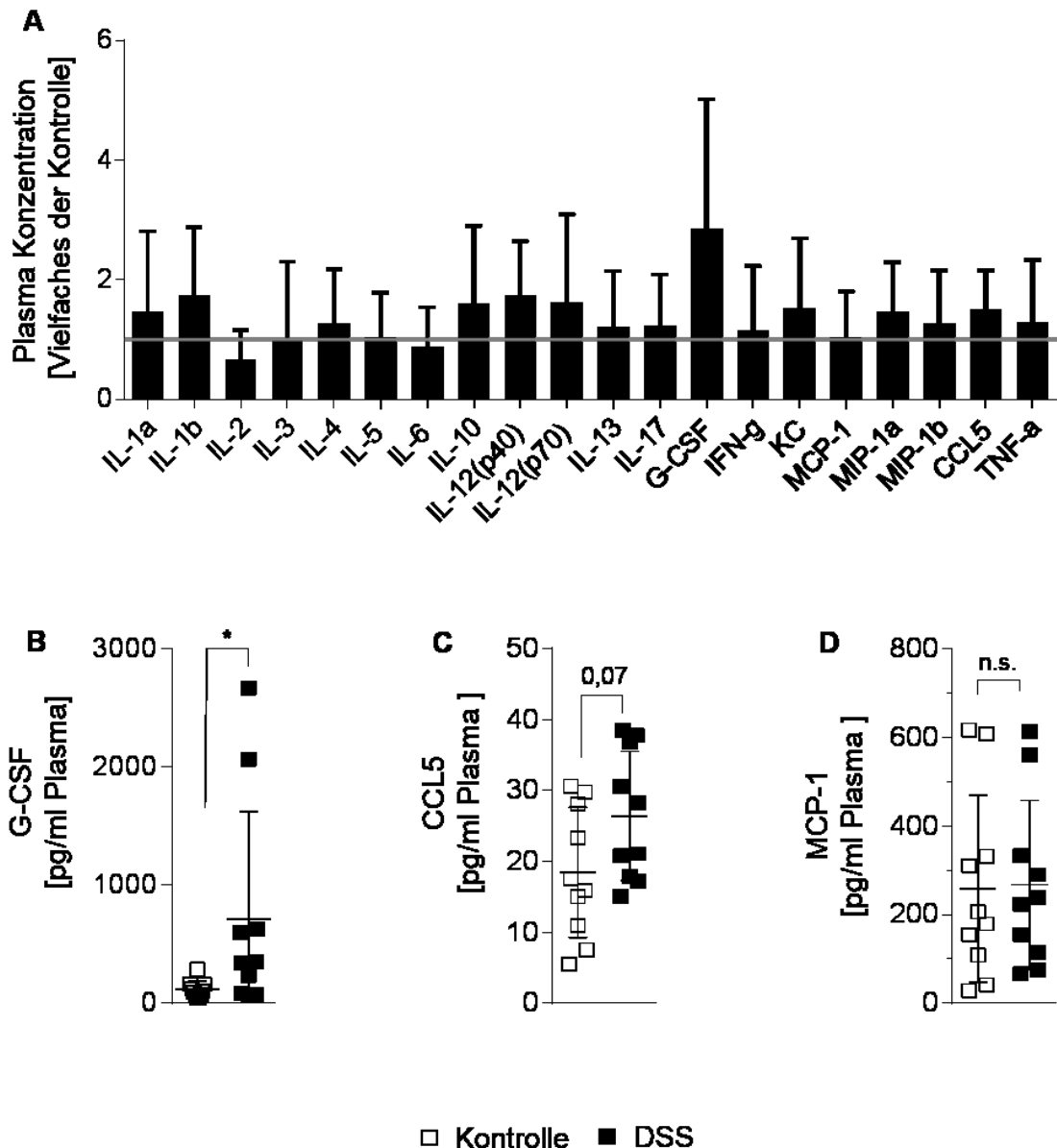


Abb. 10 Leicht erhöhte systemische Inflammation nach Induktion einer chronischen Entzündung in *ApoE*^{-/-} Mäusen.

Multiplexanalyse ausgewählter zirkulierender Zytokine im Plasma von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 21 Wochen. **A** Übersicht aller detektierten Zytokine im Plasma, n=7-10. Quantifizierung der **B** G-CSF-, **C** CCL5- und **D** MCP-1-Konzentration, n=10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit Mann-Whitney-U-Test (B) oder ungepaartem t-Test (C, D); * $P < 0,05$; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.3 Zirkulierende Immunzellen

Eine differenzierte Betrachtung der zirkulierenden Immunzellen erlaubt eine genaue Analyse der systemischen Entzündung. Hierzu wurde das kardiale Blut 21 Wochen alter *ApoE*^{-/-} Mäuse mit und ohne chronischer intestinaler Entzündung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die Analyse ergab keine Veränderung der

Immunzellzusammensetzung im Blut DSS-behandelter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 11).

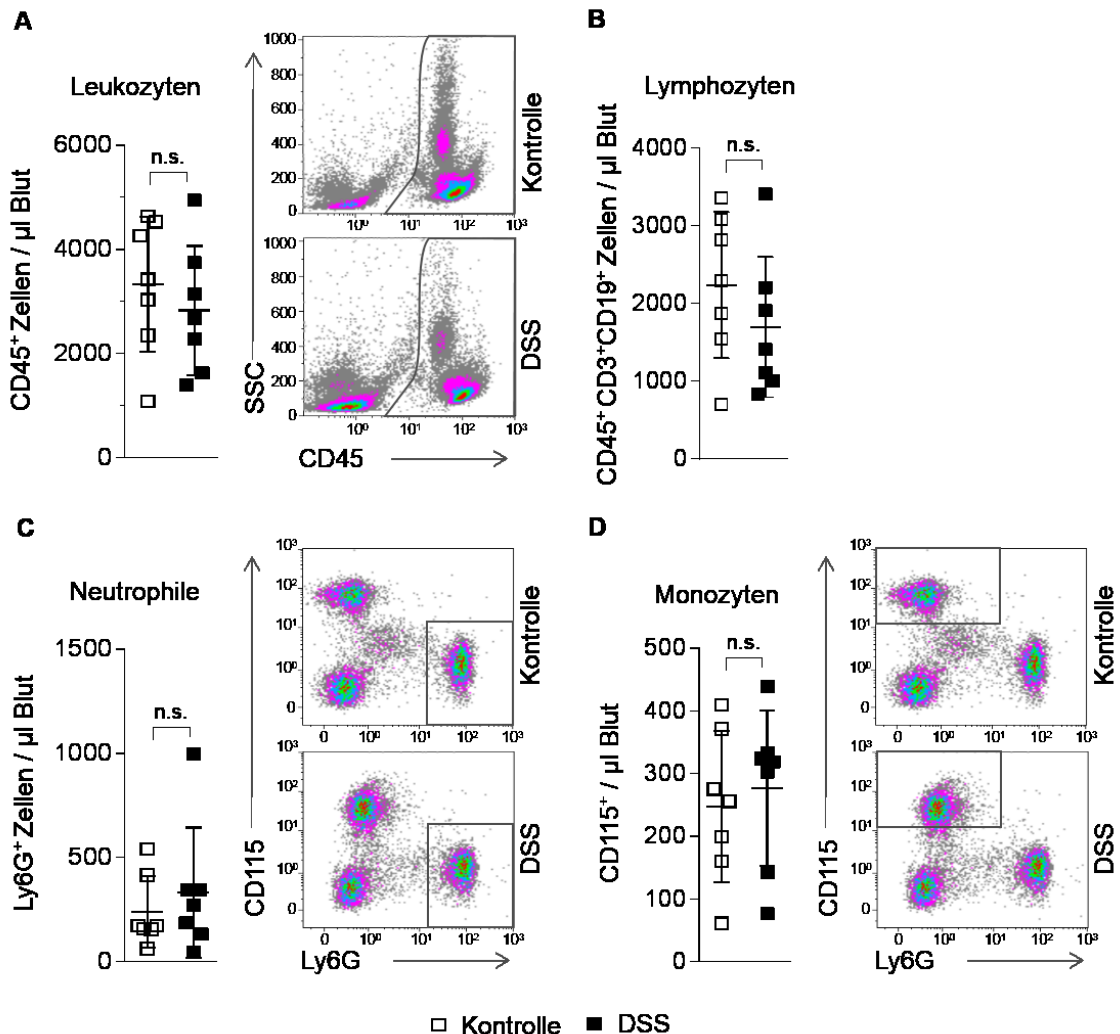


Abb. 11 Die Zusammensetzung der zirkulierenden Immunzellen von *ApoE*^{-/-} Mäusen mit CED ist im Alter von 21 Wochen unverändert.

Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im Blut von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 21 Wochen. **A** Leukozyten (CD45⁺ Zellen), **B** Lymphozyten (CD45⁺CD3⁺CD19⁺ Zellen), **C** neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6G⁺ Zellen), **D** Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD115⁺ Zellen), mit repräsentativen Plots (für A, C-D), n=7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.4 Aortale Immunzellen

Auch wenn sich die systemische Entzündung zu diesem Zeitpunkt nur moderat darstellte, kann der Gehalt der Immunzellen in den atherosklerotischen Läsionen verändert sein. Die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques wird nicht allein durch Matrixmoleküle und/oder durch die Lipideinlagerung bestimmt, auch die eingewanderten Immunzellen nehmen Einfluss auf die Plaque-Qualität und somit auf die klinische Entwicklung.

Die durchflusszytometrische Analyse der aortalen Immunzellen zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Versuchstieren im Alter von 21 Wochen, also am Ende der zwei-wöchigen Erholungsphase im letzten DSS-Zyklus (Abb. 5).

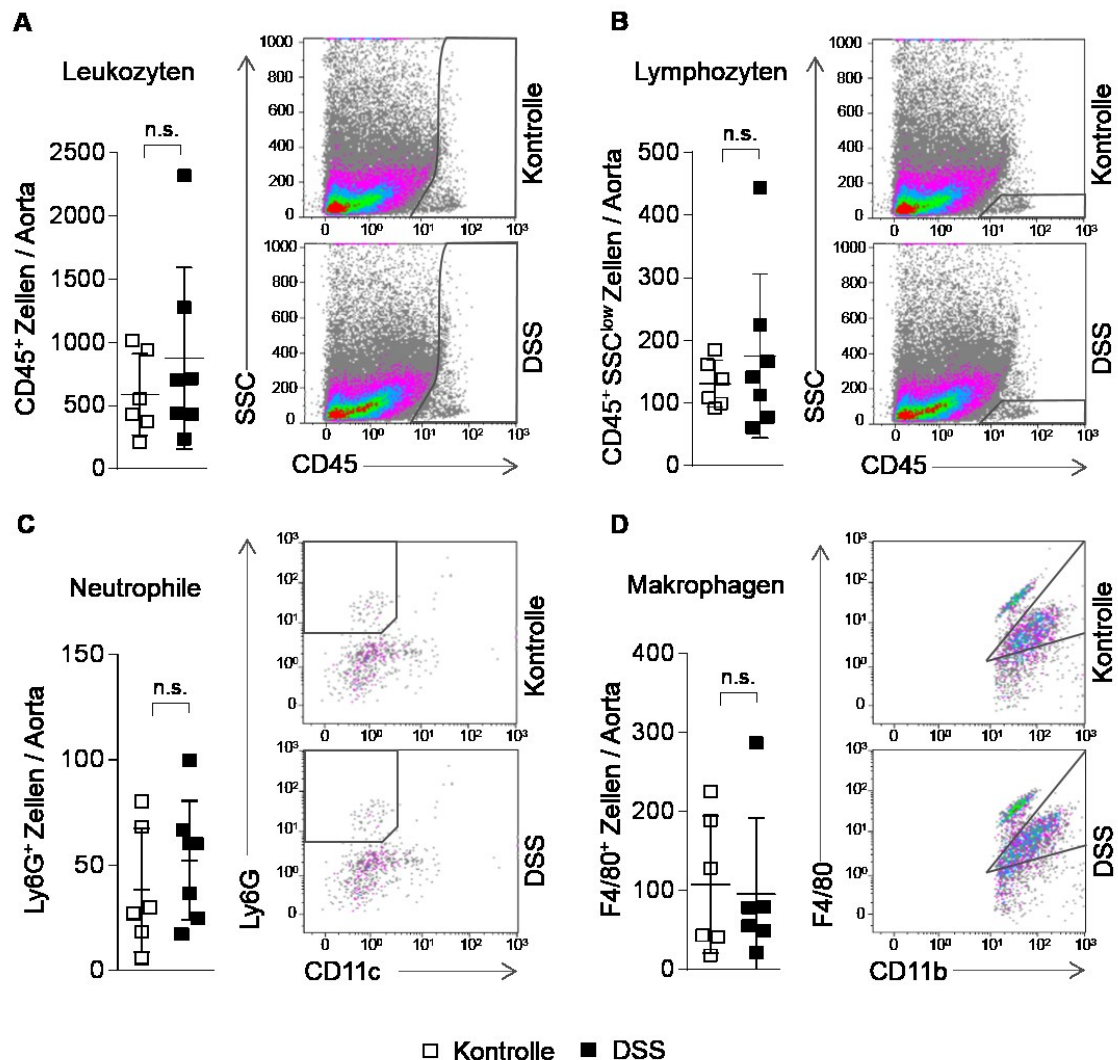


Abb. 12 Keine Veränderungen der aortalen Immunzellen nach Induktion einer chronischen Entzündung in *ApoE*^{-/-} Mäusen nach fünf DSS-Zyklen.

Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen der Aorta im Alter von 21 Wochen. **A** Leukozyten (CD45⁺ Zellen), **B** Lymphozyten (CD45⁺SSC^{low} Zellen), **C** neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺Ly6G⁺ Zellen), **D** Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺CD115⁻F4/80⁺ Zellen), mit gepoolten Plots aus allen Proben je Behandlung, n=6/7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.4 Veränderung der Immunzellen im Verlauf einer chronischen Kolitis

Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der verstärkten Plaque-Bildung in *ApoE^{-/-}* Mäusen mit chronischer intestinaler Inflammation sollte der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die initialen Veränderungen bezüglich der Atherogenese ihren Ursprung haben könnten.

Dazu wurden sowohl zirkulierende als auch aortale Immunzellen mittels Durchflusszytometrie im Verlauf der chronischen Entzündung untersucht. Die Analyse fand jeweils vor der DSS-Behandlung, danach sowie in der Erholungsphase statt. Dabei erfolgte die erste Messung im Alter von 6 Wochen und die letzte Messung unmittelbar nach der dritten DSS-Gabe, dies entspricht einem Alter von 13 Wochen.

3.4.1 Zirkulierende Immunzellen

Die Zahl der zirkulierenden Immunzellen im Verlauf der chemisch-induzierten Kolitis zeigten nach den ersten beiden DSS-Behandlungen keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Abb. 13).

Nach der zweiten DSS-Applikation zirkulierte eine signifikant höhere Zahl an neutrophilen Granulozyten im Blut als bei den unbehandelten Tieren. Bei den Monozyten war zum selben Zeitpunkt keine signifikante Veränderung zu erkennen. Es zeichnete sich lediglich eine leichte Tendenz zu erhöhten Zellzahlen ab (Abb. 13 B).

Nach der dritten DSS-Gabe war nicht nur die Zahl der neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht, sondern nun auch die Anzahl der Monozyten. Diese Entwicklung spiegelte sich auch in der Gesamtzahl der zirkulierenden Leukozyten, mit signifikant mehr Leukozyten, im Alter von 13 Wochen wider. Die Anzahl der Immunzellen der Kontrollgruppe ohne chronische Entzündung veränderte sich dagegen nur unwesentlich im Verlauf der sieben Wochen (Abb. 13).

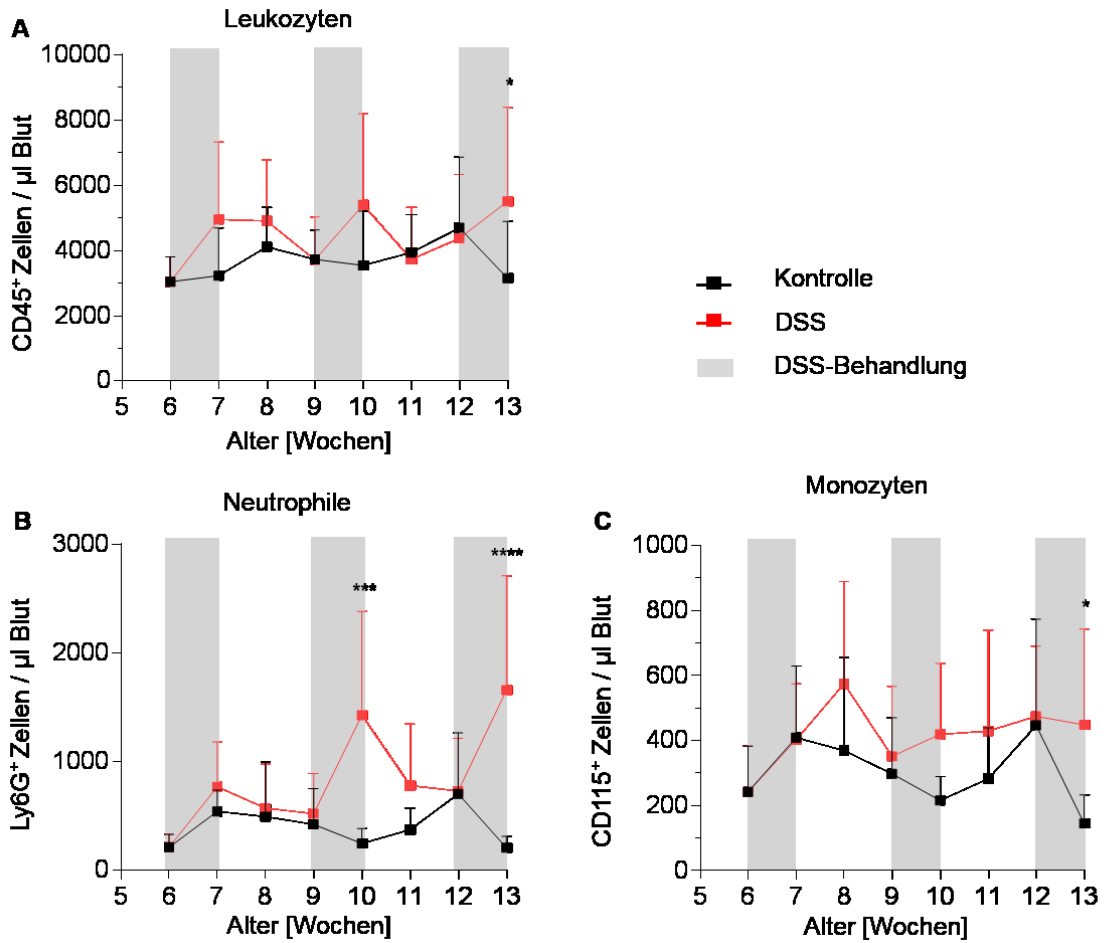


Abb. 13 Oszillierender Anstieg der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in *ApoE*^{-/-} Mäusen während einer intestinalen Inflammation.

Durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Verlauf einer chemisch-induzierten chronischen Inflammation. Quantifizierung der **A** Leukozyten (CD45⁺ Zellen), **B** neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺CD115⁻Ly6G⁺ Zellen), **C** Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD115⁺ Zellen), n=5-11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.2 Aortale Immunzellen

Auch die Verteilung der Immunzellen in der Aorta wurde über einen zeitlichen Verlauf von 7 Wochen unter Einfluss einer Kolitis untersucht. Hier zeigte sich, dass die induzierte Kolitis die Anzahl der Immunzellen in der Gefäßwand beeinflusst. Allerdings erst nach der dritten DSS-Gabe zeigten sich hier Unterschiede in den Behandlungsgruppen. Dabei waren in der DSS-behandelten Gruppe ca. 7.000 Leukozyten/ μ l messbar, wohingegen in der Kontrollgruppe nur ca. 4.000 Leukozyten/ μ l gemessen wurden (Abb. 14 A).

Bei der Analyse der neutrophilen Granulozyten wurde zuvor gezeigt, dass in der Zirkulation der erste signifikante Anstieg im Vergleich zur Kontrolle bereits nach der zweiten DSS-Gabe messbar war (Abb. 13B). Auch die Analyse der neutrophilen Granulozyten in der Aorta zeigte den ersten signifikanten Anstieg nach der zweiten DSS-Applikation. Dies wiederholte sich erneut nach der dritten Kolitis-Induktion, im Alter von 13 Wochen. Bei Betrachtung der Kontrolltiere über die Dauer der sieben Wochen blieb die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten über den gesamten Beobachtungszeitraum unverändert (Abb. 14 B).

Über den gesamten Untersuchungszeitraum betrachtet zeigten die Makrophagen keine signifikanten Veränderungen verglichen mit der Kontrollgruppe. Erst nach der dritten DSS-Applikation, im Alter von 13 Wochen, konnte ein Anstieg der Makrophagen detektiert werden. (Abb. 14 C).

Der Verlauf der Immunzellen der Kontrolltiere zeigte eine leichte Tendenz zum Anstieg der Zellzahlen der Leukozyten und Makrophagen über den Versuchszeitraum betrachtet. Jedoch blieb die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Aorta von Kontrolltieren über den Verlauf der chronischen Entzündung im Wesentlichen unverändert (Abb. 14).

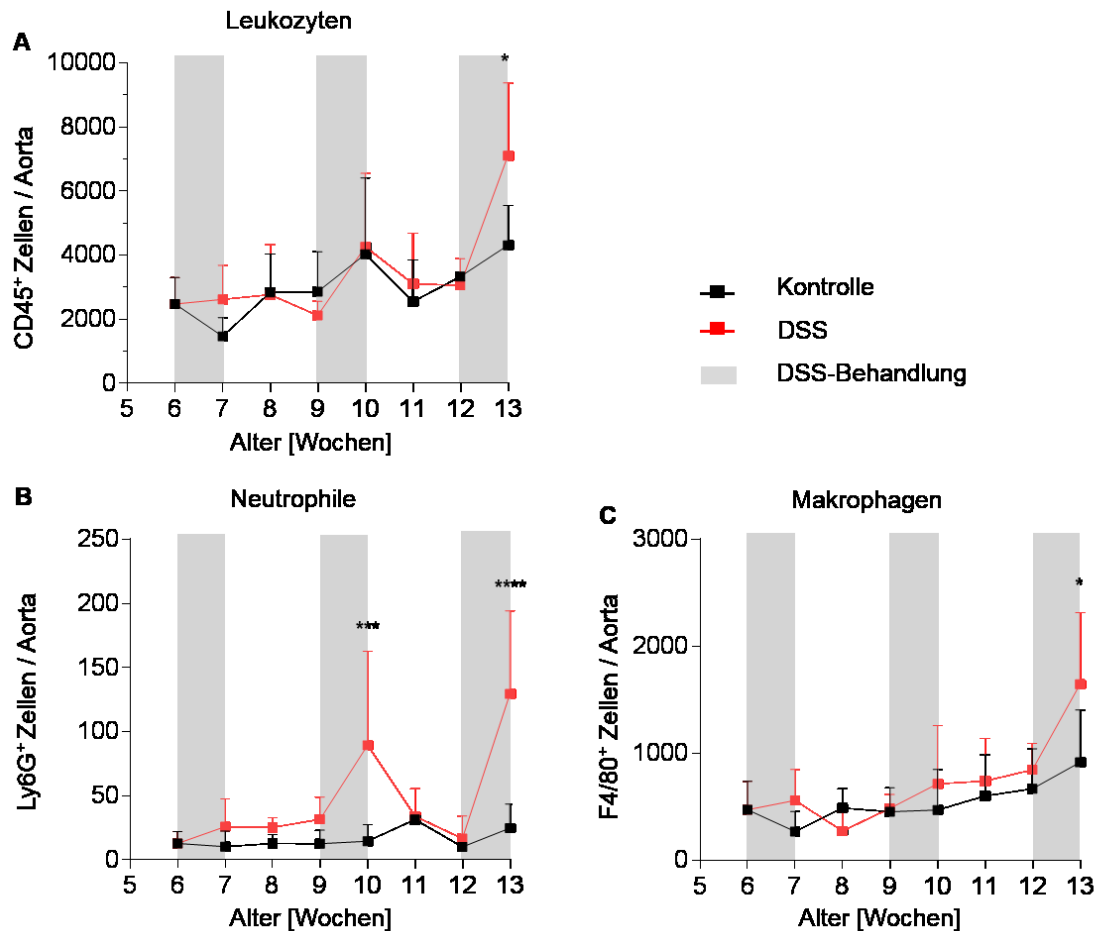


Abb. 14 Oszillierende neutrophilen Granulozyten-Akkumulation in der Aortenwand von *ApoE*^{-/-} Mäusen während einer intestinalen Inflammation.

Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen in der gesamten Aorta im Verlauf einer chemisch-induzierten chronischen Inflammation. Quantifizierung der **A** Leukozyten (CD45⁺ Zellen), **B** neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen CD45⁺CD11b⁺CD115⁻Ly6G⁺ Zellen) und **C** Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁻F4/80⁺ Zellen), n=2-10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.5 Veränderung der Inflammation im Alter von 13 Wochen

Die Untersuchung der zirkulierenden und aortalen Immunzellen im Verlauf der induzierten Kolitis zeigte eine deutliche Veränderung der Immunzellzusammensetzung zum Zeitpunkt von 13 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Tiere in der Phase der akuten Inflammation, direkt nach der DSS-Applikation, wodurch die Phase der akuten Inflammation des klinischen Verlaufs einer CED imitiert wurde. Aufgrund der signifikant veränderten Zusammensetzung der Immunzellen sowohl in der Aorta als auch in der Zirkulation kristallisierte sich der 13 Wochenzeitpunkt als ein möglicher Wendepunkt in der Pathogenese der Atherosklerose der Kolitis-Tiere. Daher folgten weitere Analysen der Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt.

3.5.1 Zirkulierende Zytokine

Um die systemische Inflammation zu diesem frühen Zeitpunkt zu charakterisieren, wurden die zirkulierenden Zytokine mittels Multiplex-ELISA untersucht. Dabei zeigte sich in den Kolitis-Tieren ein deutlicher Anstieg der G-CSF-Konzentration im Vergleich zu den anderen Zytokinen. In der Gesamtanalyse war das G-CSF um das 15-fache erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 α , IL-6, IL-12 und MCP-1 zeigten in den Kolitis-Tieren in diesem Vergleich nur eine Tendenz zur erhöhten Konzentration. Insgesamt betrachtet zeigt sich ein proinflammatorisches Zytokinprofil (Abb. 15 A).

Die separate Betrachtung der Zytokine im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte eine erhöhte Konzentration der klassischen proinflammatorischen Zytokine wie G-CSF, MCP-1 und IL-12 (Abb. 15 B-D). Allein CCL5 war zu diesem Zeitpunkt, im Gegensatz zum Zeitpunkt von 21 Wochen, durch die DSS-Gabe nicht verändert (Abb. 15 E).

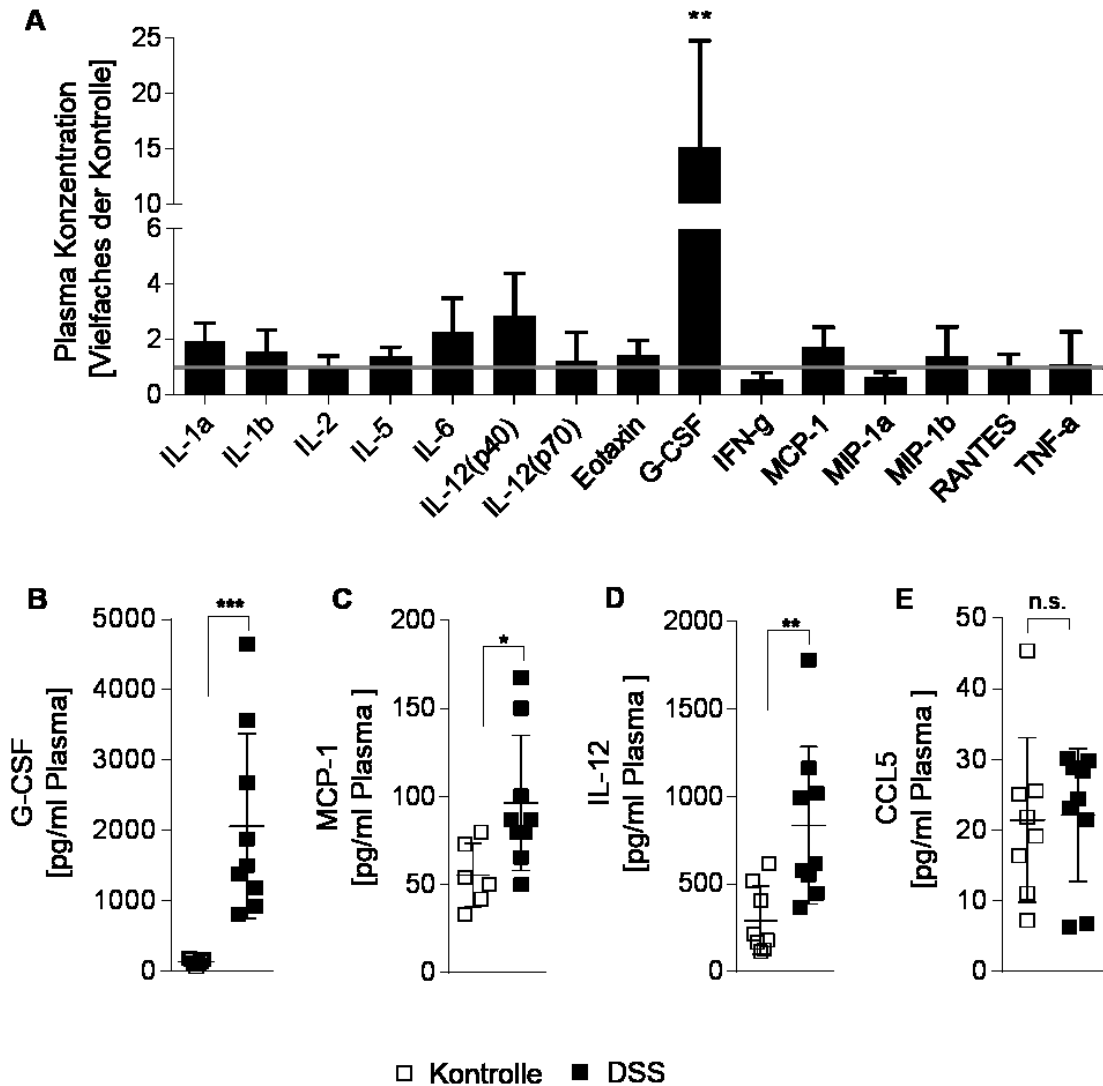


Abb. 15 Proinflammatorisches Zytokinprofil in DSS-behandelten *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen.

Multiplexanalyse ausgewählter zirkulierender Zytokine im Plasma von Mäusen im Alter von 13 Wochen. **A** Übersicht aller detektierten Zytokine im Plasma, n=7-10. Quantifizierung der **B** G-CSF-, **C** MCP-1-, **D** IL-12- und **E** CCL5-Konzentration, n=6-9. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit einer *One-Way ANOVA* (A), ungepaartem t-Test (B, E) oder Mann-Whitney-U-Test (C, D): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.5.2 G-CSF Konzentration im Verlauf einer chronischen Kolitis

G-CSF, ein wichtiger Inflammationsmarker, war sowohl nach dem dritten DSS-Zyklus als auch nach dem fünften DSS-Zyklus signifikant erhöht. G-CSF ist in viele immunologische Prozesse involviert und hat ebenfalls einen Einfluss auf die neutrophilen Granulozyten [145]. Nach dem dritten Behandlungszyklus war auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten sowohl im Blut als auch in der Aorta signifikant erhöht. Der erste Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten konnte bereits nach dem zweiten DSS-Zyklus in beiden Kompartimenten, Blut und Aorta, detektiert werden.

Aufgrund dieser Schlüsselrolle von G-CSF wurde nachfolgend die Konzentration von G-CSF im Verlauf der chronischen intestinalen Entzündung im Blutplasma bestimmt.

Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von sieben Wochen, jeweils vor und nach der DSS-Behandlung. Dabei zeigte sich ein oszillierender Verlauf der G-CSF Konzentration im Blut in den DSS-behandelten Gruppen. Bereits nach der ersten DSS-Applikation war eine leichte Tendenz zur erhöhten Plasmakonzentration zu erkennen. Nach der zweiten und besonders nach der dritten DSS-Gabe zeigte sich eine signifikant erhöhte G-CSF Konzentration im Plasma der DSS-behandelten *ApoE*^{-/-} Mäuse. Vor und nach der Behandlung sank die G-CSF Konzentration wieder nahezu auf den basalen Wert ab (Abb. 16).

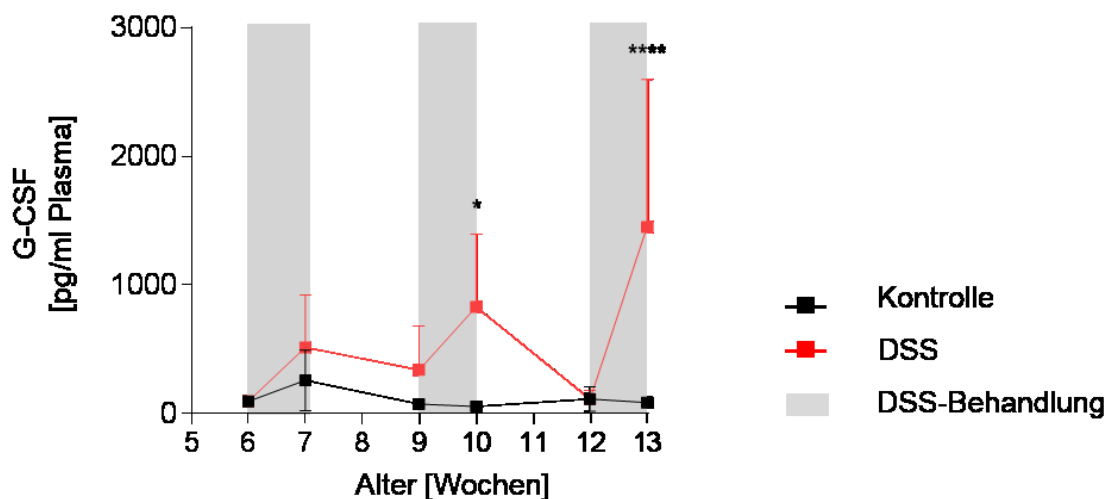


Abb. 16 Gesteigerte G-CSF Konzentration im Plasma nach DSS-Gabe im Verlauf einer chronisch-induzierten Kolitis.

G-CSF Nachweis mittels ELISA im Plasma von *ApoE*^{-/-} Mäusen, n=6-9. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: * $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.5.3 Immunzellzusammensetzung in der Zirkulation

Die Zytokin-Analysen sowie die Zeitverlaufsanalyse der zirkulierenden Immunzellen zeigten deutliche Veränderungen der Entzündungsprozesse. So war vor allem im Alter von 13 Wochen bei DSS-behandelten *ApoE*^{-/-}-Mäusen eine signifikant höhere Zahl an neutrophilen Granulozyten gemessen worden (Abb. 13 B und Abb. 17 A).

Auch die Anzahl der Monozyten war zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht (Abb. 13 C und Abb. 17 B). Monozyten spielen wie neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle in der Atherogenese. Insbesondere den *Ly6C*^{high} Monozyten wird eine invasive Rolle zugewiesen, *Ly6C*^{low} Monozyten hingegen patrouillieren an der Gefäßwand und

übernehmen eine überwachende Rolle. Sie untersuchen das Endothel nach möglichen Veränderungen [146].

Eine genauere Auftrennung der Monozyten in ihre Subpopulationen zeigte jedoch, dass der Anstieg der Monozyten in den DSS-behandelten Mäusen sowohl in den Ly6C^{high} als auch den Ly6C^{low} Monozyten zu verzeichnen war und somit keine Verschiebung zu den pro-inflammatorischen Ly6C^{high} Monozyten stattgefunden hatte (Abb. 17 C, D).

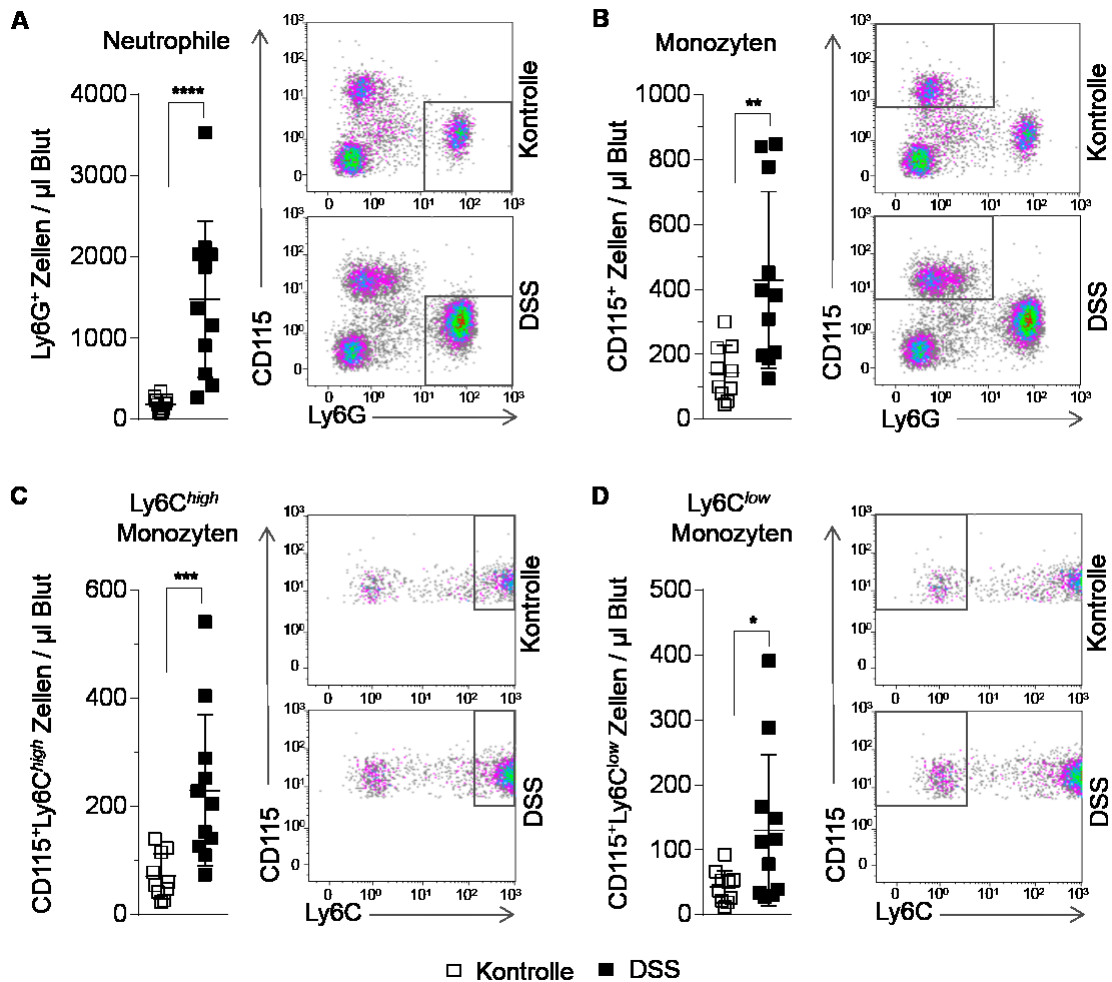


Abb. 17 Starke systemische Inflammation bereits nach dem dritten DSS-Zyklus in *ApoE*^{-/-} Mäusen mit Kolitis.

Durchflusszytometrische Untersuchung der zirkulierenden Immunzellen in *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen. Quantifizierung der **A** Neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen-CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6G⁺ Zellen), **B** Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD115⁺ Zellen), **C** Ly6C^{high} Monozyten (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{high} Zellen), **D** Ly6C^{low} Monozyten (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6C^{low} Zellen) mit repräsentativen Plots, n=10/11. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit Mann-Whitney-U-Test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.5.4 Komposition der aortalen Immunzellen

Die Betrachtung der Immunzellen in der Aorta zeigte bereits im Zeitverlauf, dass zum Zeitpunkt von 13 Wochen in den DSS-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle signifikant höhere Zahlen neutrophiler Granulozyten und Makrophagen detektiert werden konnten (Abb. 14 B,C und Abb. 18 A,B).

Die durchflusszytometrische Analyse weiterer Immunzellen wie den Monozyten zeigte hingegen keine Veränderungen. Lediglich eine Tendenz zur Erhöhung der Anzahl an Monozyten konnte in der Aorta von Tieren mit induzierter Kolitis detektiert werden (Abb. 18 C).

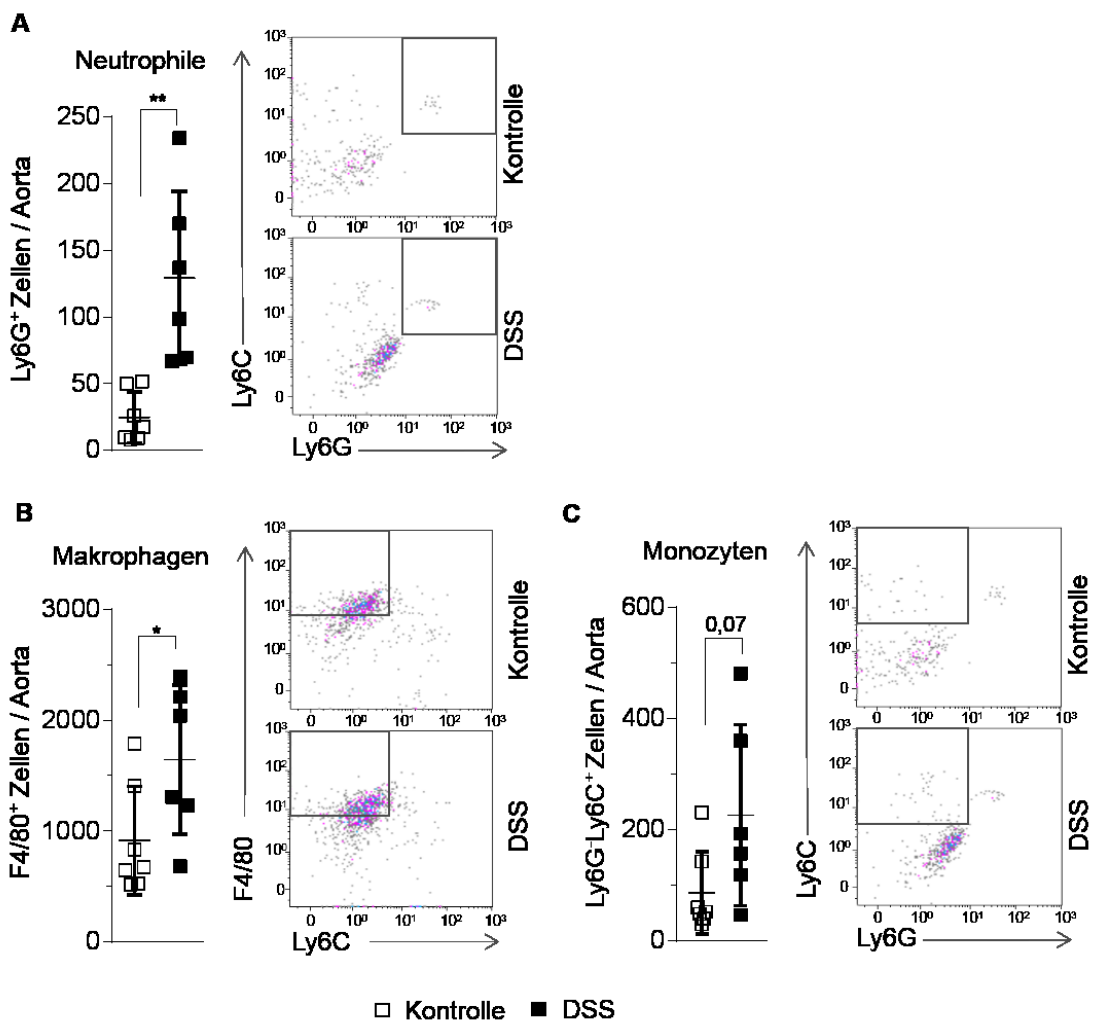


Abb. 18 Gesteigerte Inflamationsreaktion in der Aorta nach Induktion einer chronischen Kolitis im dritten DSS-Zyklus.

Durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellzusammensetzung in der gesamten Aorta in *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen. Quantifizierung der **A** Neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺F4/80⁻Ly6G⁺ Zellen), **B** Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ Zellen) und **C** Monozyten (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁻Ly6G⁻Ly6C⁺ Zellen) mit repräsentativen Plots, n=7/6. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.6 Inflammation des Darms im Verlauf der chemisch induzierten Kolitis

Die chronische Inflammation wird als eine mögliche zugrundeliegende Ursache für die gesteigerte Atherogenese im Rahmen der chronisch-inflammatorischen Darmerkrankungen betrachtet, da Entzündungsprozesse aktiviert und zahlreiche Inflammationsmediatoren in die Zirkulation sekretiert werden.

Die zuvor erhobenen Daten zeigten eine deutliche Beteiligung des Zytokins G-CSF und der neutrophilen Granulozyten in diesem Zusammenhang. Zunächst wurde eine Quelle der gesteigerten G-CSF Spiegel gesucht und dafür speziell das Kolongewebe mittels mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Entzündungsmediatoren untersucht.

3.6.1 mRNA-Expression von neutrophilen Granulozyten-spezifischen Markern und Entzündungsmediatoren / Zytokinen

Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten während der ersten drei Zyklen der induzierten Kolitis zeigte sowohl in der Zirkulation als auch in der Aorta einen oszillierenden Verlauf (Abb. 13 B, Abb. 14 B).

Ly6G ist ein spezifischer Oberflächenmarker für neutrophile Granulozyten, dessen Expression im Kolongewebe gemessen wurde. Die Messung der Expression der *Ly6g* mRNA ergab ebenfalls einen oszillierenden Verlauf. Bereits nach der zweiten Kolitis-Induktion war eine Tendenz zu erhöhter *Ly6g* mRNA-Expression zu erkennen, die sich nach der dritten DSS-Applikation im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant steigerte. In den Erholungsphasen hingegen sank die *Ly6g* mRNA-Expression und nähert sich dem Wert der Kontrollgruppe an (Abb. 19 A).

Auch die mRNA-Expression von *Gcsf* zeigt einen ähnlichen Verlauf wie zuvor für *Ly6g* beschrieben. Nach dem zweiten Zyklus der induzierten Kolitis, im Alter von 10 Wochen, ist der Anstieg im Vergleich zur Kontrolle bereits signifikant erhöht. Im Alter von 13 Wochen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression. Zwischen den DSS-Zyklen sinkt diese im Kolon von DSS-behandelten Tieren auf den basalen Wert und ist zum Teil in beiden Gruppen mittels qPCR Methode nicht mehr zu detektieren (Abb. 19 B).

Die mRNA-Expression der klassischen proinflammatorischen Zytokine *Mcp1*, *Tnfa* und *Il1 β* spiegelt ebenfalls zum Teil die drei Phasen der akuten Inflammation, der persistierenden Inflammation sowie der Remission des klinischen Verlaufs einer CED wider. Nach der ersten Entzündungsphase im Alter von 7 Wochen sind die Entzündungsmarker unverändert verglichen mit den unbehandelten Tieren. Nach der

zweiten Induktion der Kolitis im Alter von 10 Wochen steigt die Expression der mRNA der Zytokine *Mcp1*, *Tnfa* und *Il1 β* signifikant an. Derselbe Effekt ist auch im Alter von 13 Wochen zu detektieren. In den Phasen vor der DSS-Behandlung zeigen die Werte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 19 C-E).

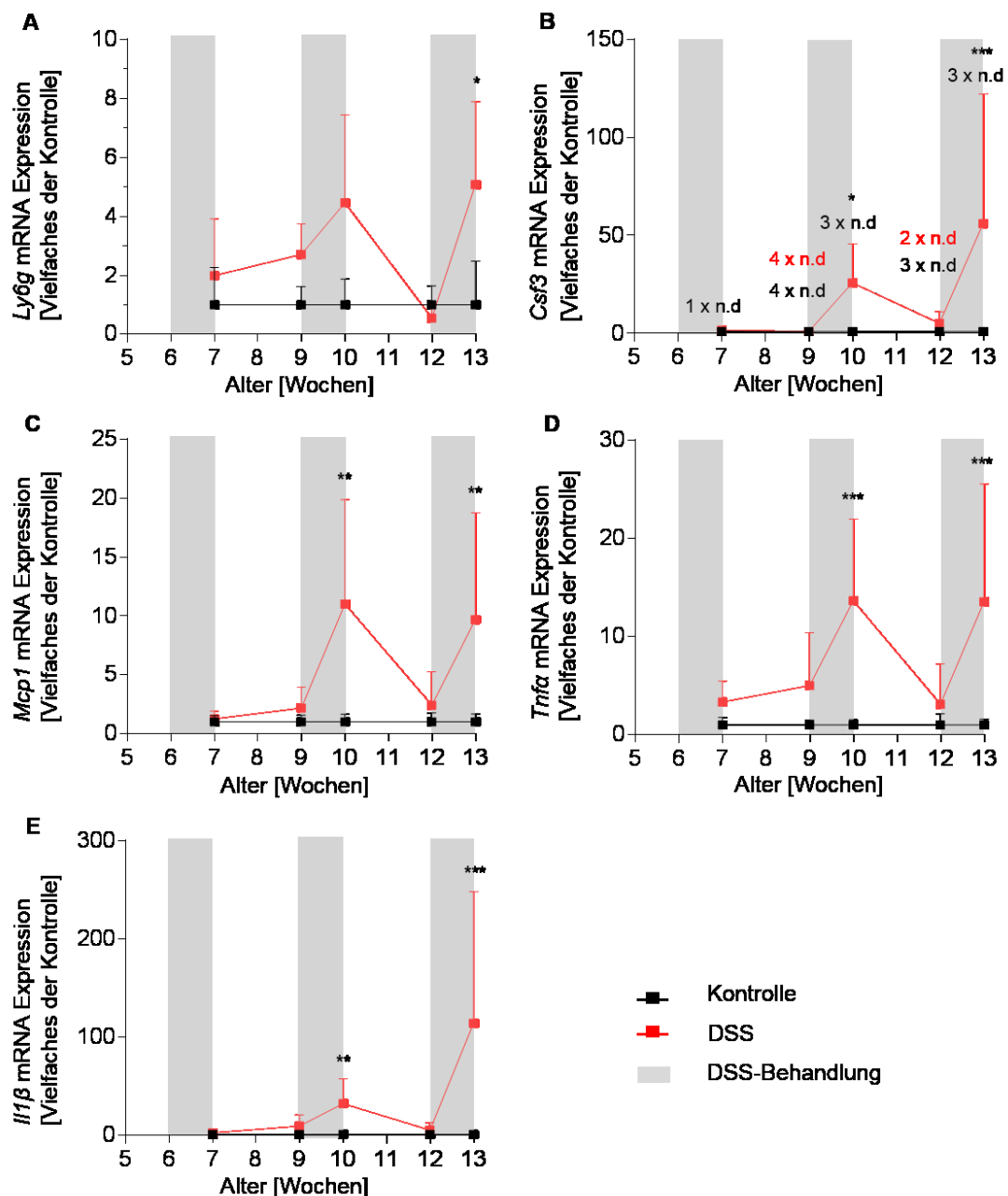


Abb. 19 Gesteigerte mRNA-Expression von Inflammationsmarkern im Kolon von *ApoE^{-/-}* Mäusen nach DSS-Behandlung.

Der Nachweis der mRNA-Expression von **A** *Ly6g*, **B** *Csf3*, **C** *Mcp1*, **D** *Tnfa*, und **E** *Il1 β* im Kolon erfolgte mittels quantitativer *Real-Time-PCR* im Verlauf einer chemisch-induzierten chronischen Inflammation über 7 Wochen, n=4-7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle, n.d. = nicht detektiert.

3.6.2 Ex vivo Sekretion von Zytokinen

Die Untersuchung der Sekretion von proinflammatorischen Faktoren aus dem Kolon ist eine weitere Methode zur Klärung der Frage, ob die intestinale Inflammation eine Ursache der G-CSF Sekretionen sein könnte. Dafür wurde ein Stück des Kolons DSS-behandelter und –unbehandelter Versuchstiere entnommen und für 24 Stunden in Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die in das Medium sekretierten Zytokine analysiert.

Hier zeigte sich, dass die Konzentration von G-CSF in Mediumsüberständen des Darmgewebes von DSS-behandelten Mäusen gegenüber der von unbehandelten Tieren fast vierfach erhöht war (Abb. 20 A). Die Konzentration von MCP-1 im Medium hingegen war zwischen den Gruppen unverändert, lediglich eine leichte, nicht signifikante Entwicklung in Richtung erhöhter Sekretion konnte gemessen werden. (Abb. 20 B). Die Analyse von IL-12 zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Sekretion zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 20 C).

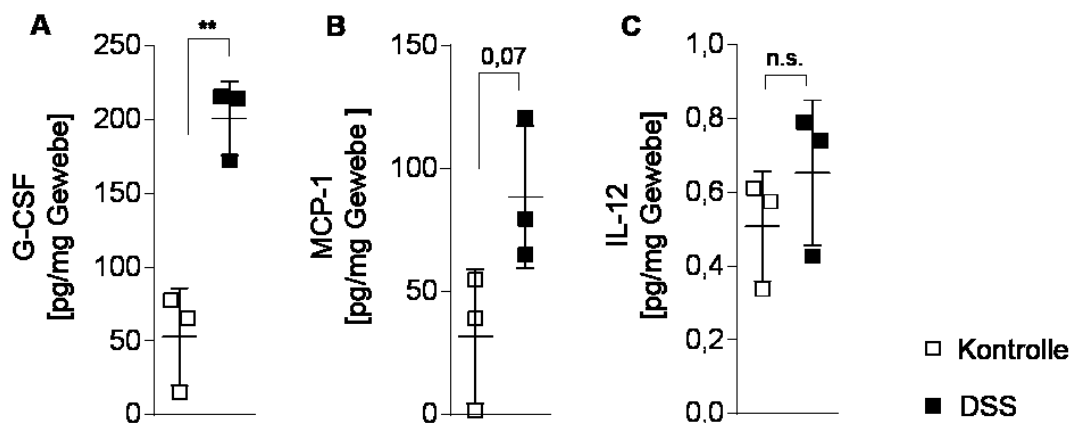


Abb. 20 Erhöhte G-CSF Sekretion aus kultivierten Darmabschnitten von *ApoE*^{-/-} Mäusen mit einer intestinalen Inflammation.

Der Zytokin-Nachweis im Überstand einer Organkultur des Kolons von DSS-behandelten und –unbehandelten *ApoE*^{-/-} Mäusen erfolgte mittels ELISA, n=3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: ** $P < 0,01$; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.7 Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt von 13 Wochen

Im Alter von 13 Wochen sind die Zahlen der Immunzellen wie der neutrophilen Granulozyten sowohl in der Aorta als auch in der Zirkulation DSS-behandelter Tiere erhöht. Auch ist die Konzentration einiger zirkulierender proinflammatorischer Zytokine, vor allem G-CSF, angestiegen. G-CSF ist nicht nur ein Inflammationsmarker, sondern es spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Hämato- und der Myeloopoese. Dies

erforderte die Untersuchung der Knochenmarkszellen, deren Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgte.

3.7.1 Reife Immunzellen des Knochenmarks

Zur Untersuchung des Einflusses von G-CSF auf mögliche Veränderungen in der Hämatopoese und damit auch der Immunzellreifung im Knochenmark, wurde dieses nach der dritten DSS-Applikation isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei zeigte sich nach der dritten DSS-Applikation eine signifikant erhöhte Gesamtzellzahl im Knochenmark (Abb. 21 A). Bei genauerer Betrachtung der Subpopulationen wiesen die *ApoE^{-/-}* Mäuse mit einer induzierten Kolitis neben der erhöhten Gesamtzellzahl auch eine erhöhte Anzahl der Monozyten im Knochenmark auf (Abb. 21 B). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zellzahl der gesamten neutrophilen Granulozyten als auch die Menge der reifen neutrophilen Granulozyten unverändert waren (Abb. 21 C, D).

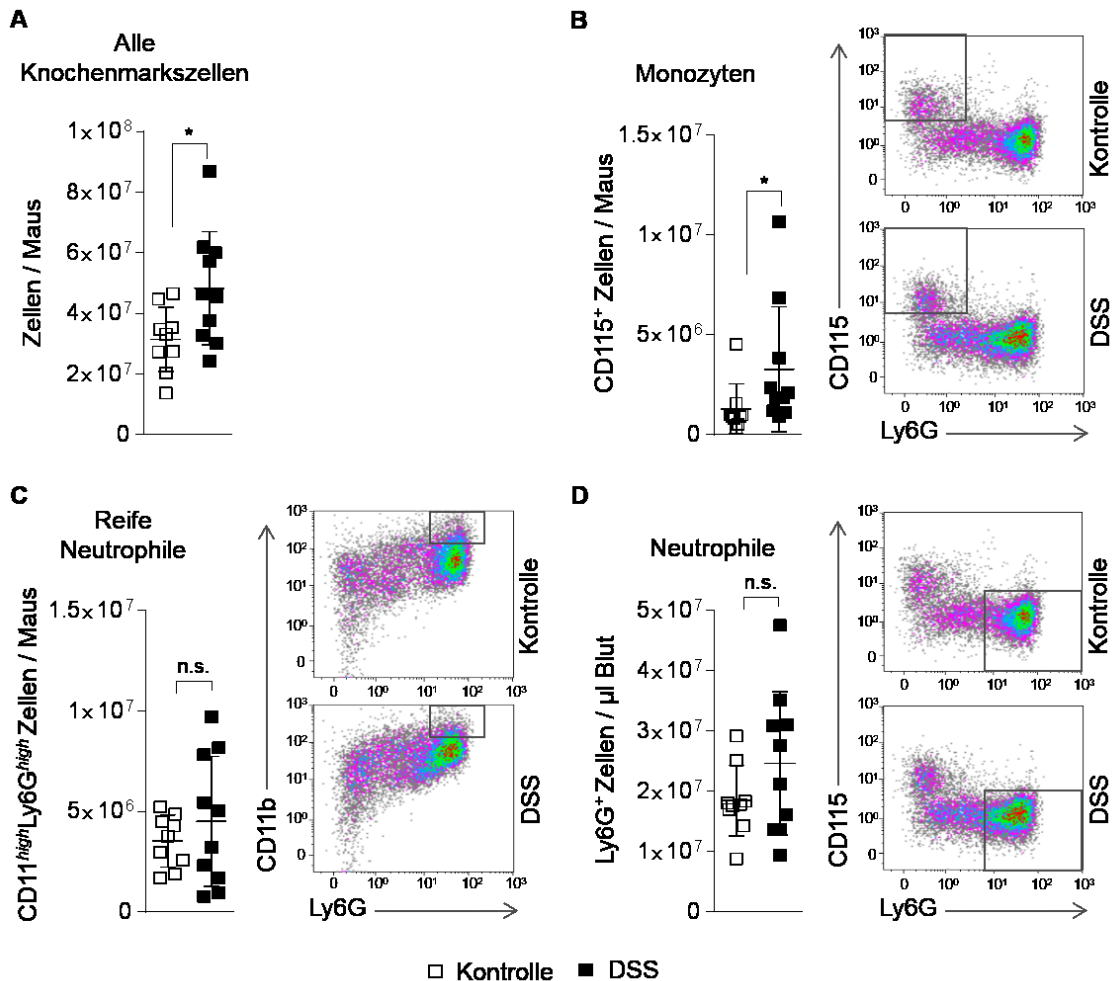


Abb. 21 Erhöhte Zellzahl im Knochenmark in *ApoE*^{-/-} Mäusen im dritten DSS-Zyklus.

Durchflusszytometrische Untersuchung der reifen Immunzellen und der Vorläuferzellen im Knochenmark von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen. Quantifizierung **A** aller Zellen, **B** der Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD115⁺ Zellen), **C** der reifen neutrophilen Granulozyten (reifen Neutrophilen- CD45⁺CD11b^{high}Ly6G⁺ Zellen), sowie **D** der Neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Ly6G⁺ Zellen), mit repräsentativen Plots, n=9/10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test (A) oder Mann-Whitney U Test (B, C, D): * $P < 0,05$; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.7.2 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks

Die Betrachtung der hämatopoetischen Stammzellen und weiterer Vorläuferzellen zum Zeitpunkt von 13 Wochen ergab eine insgesamt gesteigerte Hämatopoese in den Tieren mit einer induzierten intestinalen Inflammation. Neben den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen waren auch die myeloiden Vorläuferzellen signifikant erhöht verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 22 A, B).

Die detaillierte Analyse der myeloiden Vorläufer zeigte, dass die Zellzahlen der gemeinsamen myeloiden Vorläufer- und der Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen gestiegen waren (Abb. 22 C, D). Auch die Anzahl der Promyelozyten und Myelozyten war doppelt so hoch wie in der unbehandelten Gruppe (Abb. 22 E).

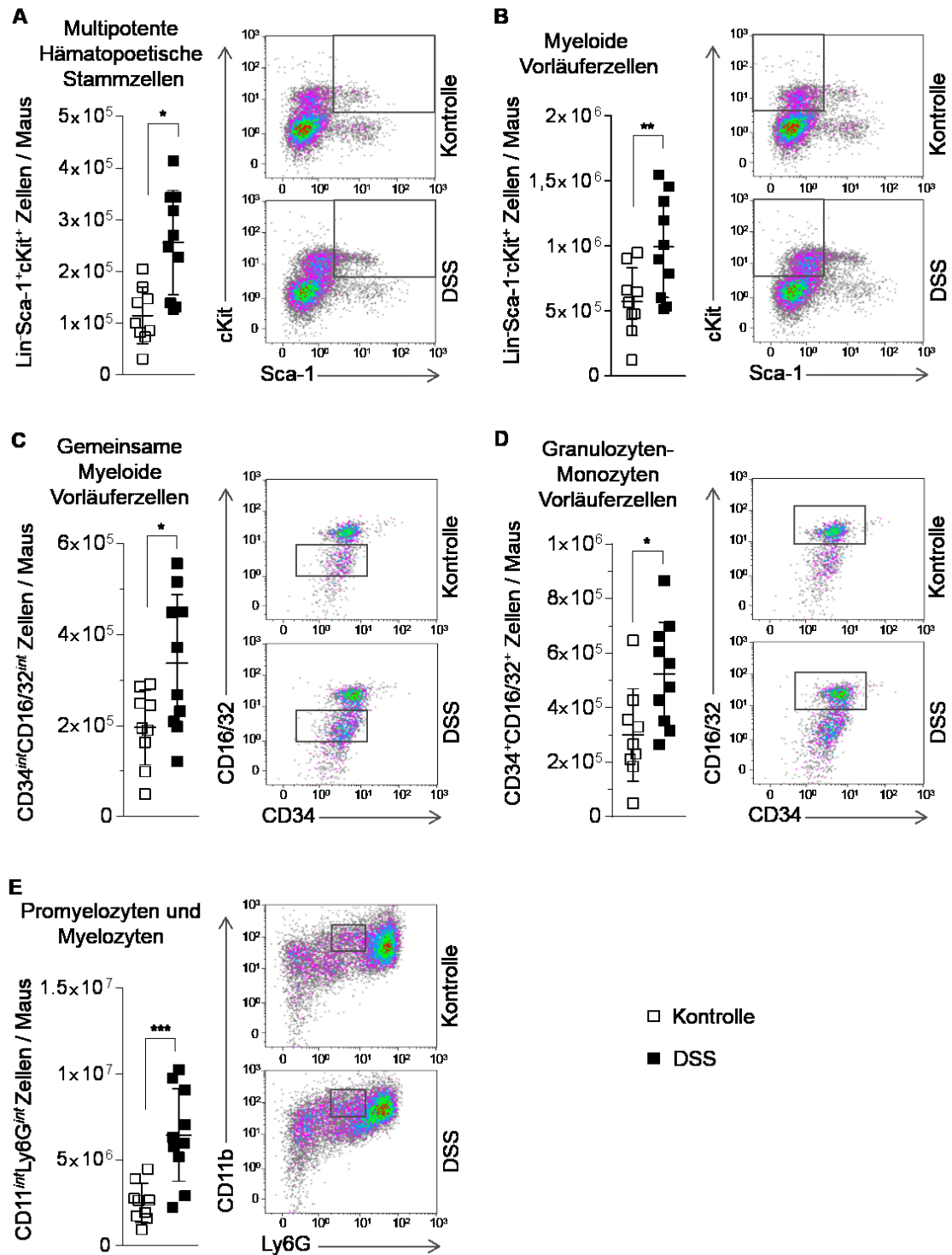


Abb. 22 Verstärkte Hämatopoese und Myeloese in *ApoE*^{-/-} Mäusen mit intestinaler Inflammation.

Durchflusszytometrische Untersuchung der Stammzellen im Knochenmark von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 13 Wochen. Quantifizierung der **A** multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (Lin-Sca-1⁺cKit⁺ Zellen), **B** myeloiden Vorläuferzellen (Lin-Sca-1⁺cKit⁺ Zellen), **C** gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CD34^{int}CD16/32^{int} Zellen), **D** Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (CD34⁺CD16/32⁺ Zellen) und **E** der Promyelozyten und Myelozyten (CD45⁺CD11b⁺ CD11^{int}Ly6G^{int} Zellen) mit repräsentativen Plots, n=9/10. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test (A-D) oder Mann-Whitney U Test (E). Signifikanzen: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.8 Zellen des Knochenmarks zum Zeitpunkt von 10 Wochen

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen die deutlichsten Veränderungen in der Inflammation zum Zeitpunkt von 13 Wochen, welcher dem Zeitpunkt nach der dritten DSS-Behandlung entspricht. Dabei wurde eine Erhöhung der Zahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten in Tieren mit einer induzierten Kolitis nachgewiesen. Auch die Untersuchung der Knochenmarkszellen zeigte eine gesteigerte Hämatopoese und Myelopoese. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark blieb jedoch unverändert im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Veränderung der Knochenmarkszellen könnte allgemein auf die intestinale Inflammation zurückzuführen sein. Allerdings könnten die Stärke und der rezidivierende Charakter der Inflammation auch einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der Knochenmarkszellen nehmen, sodass sich die Zellzusammensetzung im Knochenmark von Induktionszyklus zu Induktionszyklus verändern könnte. Um diesen Sachverhalt zu klären, sollte eine Untersuchung der Knochenmarkszellen zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen.

Im Alter von 10 Wochen befinden sich die Tiere wie zum Zeitpunkt von 13 Wochen in der Phase direkt nach einer DSS-Behandlung, genau einen Entzündungszyklus früher. Auch in dieser Phase konnte eine gesteigerte Zellzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde die Untersuchung zum Zeitpunkt von 10 Wochen durchgeführt.

3.8.1 Reife Immunzellen und myeloide Vorläuferzellen des Knochenmarks

Zum Zeitpunkt von 10 Wochen zeigte sich, dass die Gesamtzahl der Knochenmarkszellen in den Mäusen mit intestinaler Inflammation verglichen mit jener der Kontrolltiere reduziert war (Abb. 23 A). Die reifen Monozyten hingegen waren zum gleichen Zeitpunkt unverändert (Abb. 23 B). Anders als zum Zeitpunkt von 13 Wochen konnte nun gezeigt werden, dass die Zahl der reifen neutrophilen Granulozyten zu diesem sehr frühen Zeitpunkt der Inflammation im Knochenmark der DSS-behandelten Tiere ebenfalls reduziert war (Abb. 23 C). Bei Betrachtung der gesamten neutrophilen Granulozyten konnte jedoch nur ein Trend zu reduzierter Zellezahl detektiert werden (Abb. 23 D).

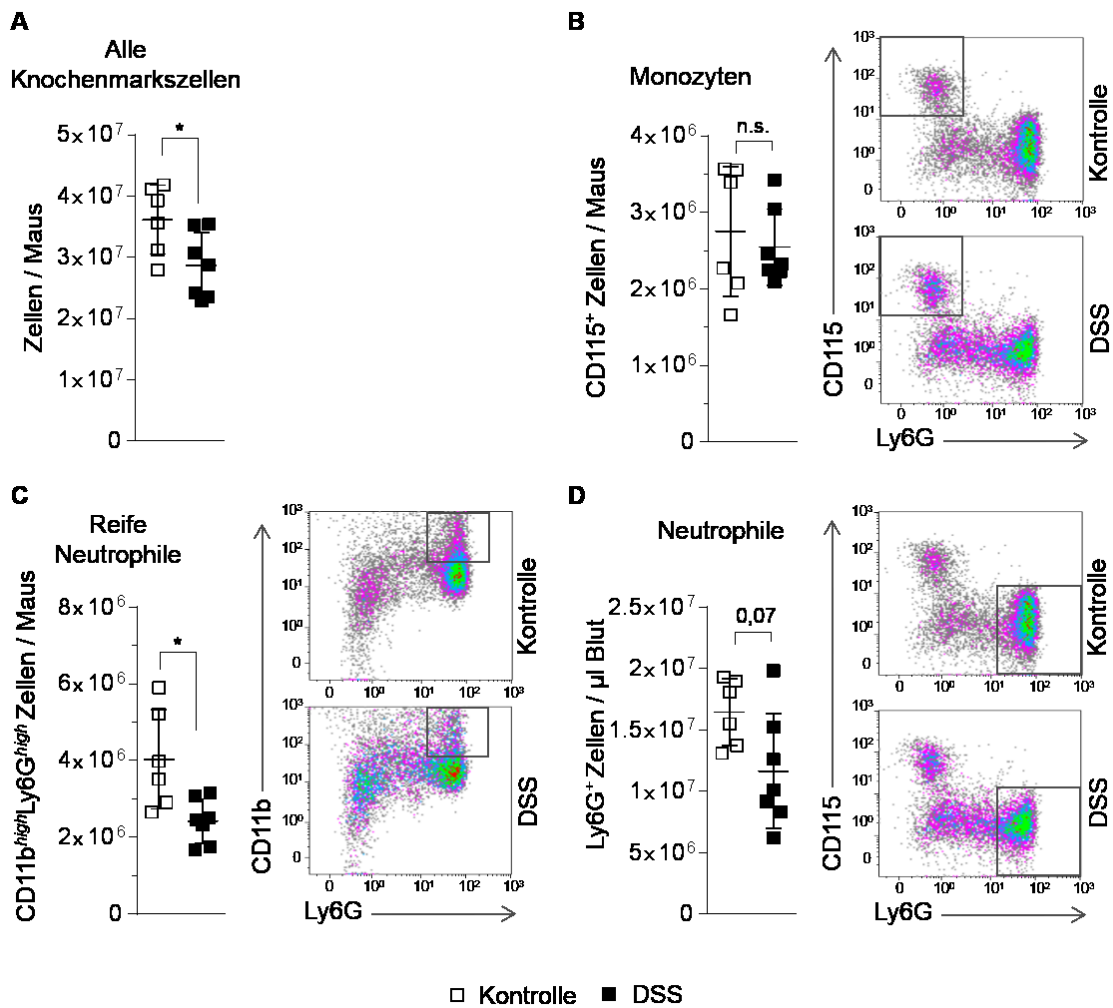


Abb. 23 Reduktion reifer Neutrophiler im Knochenmark nach beginnender intestinaler Inflammation.

Durchflusszytometrische Untersuchung der Immun- und Vorläuferzellen im Knochenmark von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 10 Wochen. Quantifizierung **A** aller Zellen, **B** der Monozyten (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻CD115⁺-Zellen), **C** der reifen neutrophilen Granulozyten (reifen Neutrophilen- CD45⁺CD11b^{high}Ly6G⁺-Zellen), sowie **D** der Neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen- CD45⁺CD11b⁺F4/80⁻Ly6G⁺-Zellen), mit repräsentativen Plots, n=6/7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test. Signifikanzen: * $P < 0,05$; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.8.2 Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks

Die Betrachtung der Hämatopoese in beiden Gruppen ergab einen Anstieg in den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen in den Tieren mit einer induzierten Inflammation (Abb. 24 A). Die untersuchten Vorläuferzellen waren in diesen Tieren unverändert, verglichen mit den Kontrolltieren ohne intestinale Entzündung (Abb. 24 B-E).

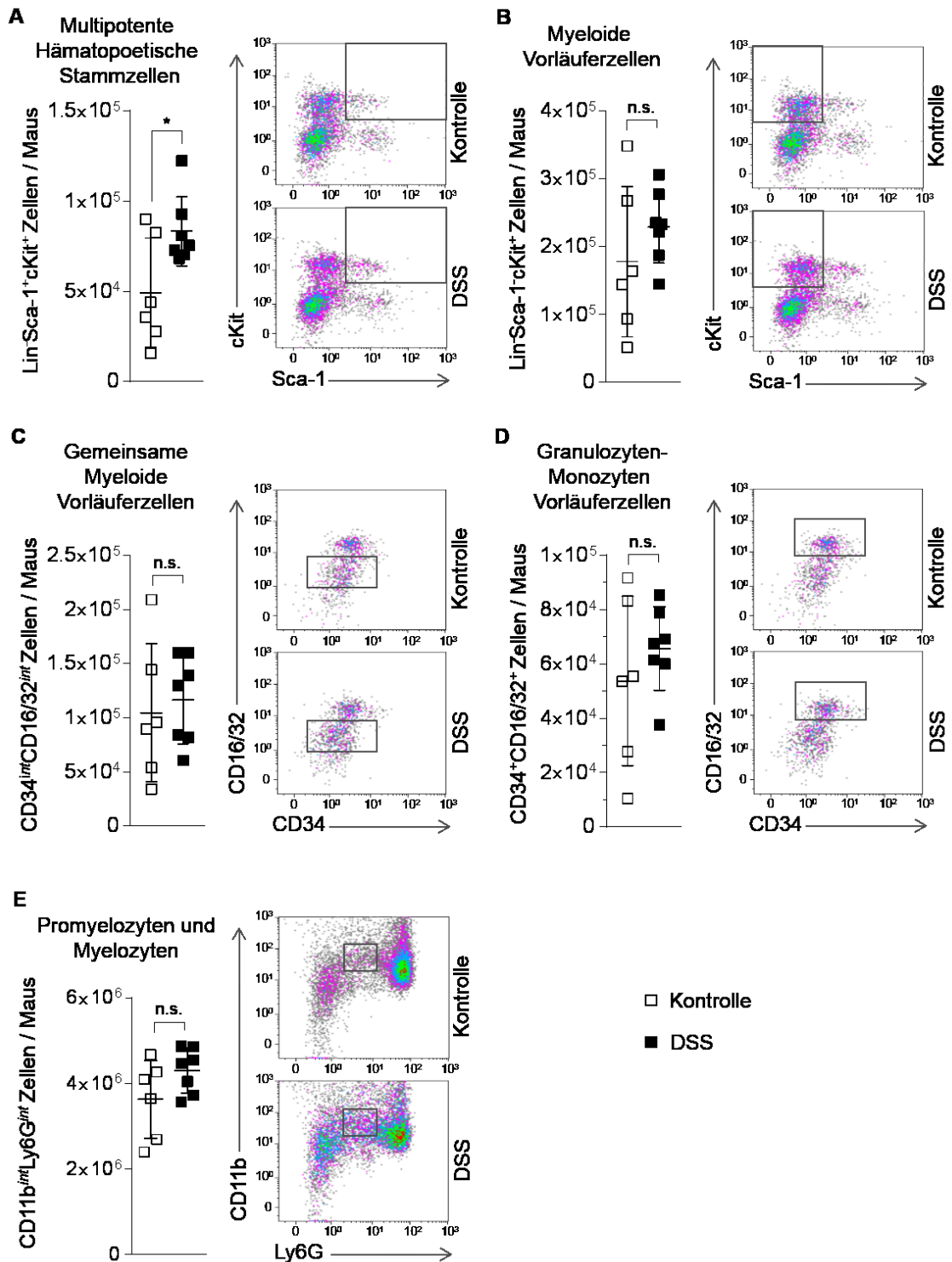


Abb. 24 Beginnende Veränderung der Hämatopoese im zweiten Zyklus der induzierten chronischen Darmentzündung.

Durchflusszytometrische Untersuchung der Stammzellen in *ApoE*^{-/-} Mäusen mit und ohne DSS-Behandlung im Alter von 10 Wochen. Quantifizierung der **A** multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (Lin-Sca-1⁺cKit⁺ Zellen), **B** myeloiden Vorläuferzellen (Lin-Sca-1⁺cKit⁺ Zellen), **C** gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CD34^{int}CD16/32^{int} Zellen), **D** Granulozyten-Monozyten Vorläuferzellen (CD34⁺CD16/32⁺ Zellen) und **E** der Promyelozyten und Myelozyten (CD45⁺CD11b^{int}Ly6G^{int} Zellen) mit repräsentativen Plots, n=6/7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test. Signifikanzen: * *P* < 0,05; n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.9 Einfluss der chronischen Inflammation auf die mRNA-Expression von Adhäsions- und Migrationsmarkern

In diesem Modell soll ein multikausaler Zusammenhang der intestinalen Inflammation auf die Atherogenese und –progression untersucht werden. Somit sollte nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der Immunzellen untersucht werden.

Die Zeitverlaufsanalyse der Immunzellen macht die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten in diesem Zusammenhang deutlich. Bereits nach der zweiten DSS-Behandlung war die Zahl der neutrophilen Granulozyten, noch vor der aller anderen untersuchten Immunzellen, in der Aorta signifikant erhöht.

Auch G-CSF ist ein immer wiederkehrender Faktor in diesem Inflammationsgeschehen und ist dafür bekannt, bei der Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark eine entscheidende Rolle zu spielen [147].

Die Migration der Immunzellen zum Inflammationsgeschehen erfordert zum einen die Expression von Migrations- und Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und zum anderen einen chemischen Stimulus als Wegweiser zur Inflammationsstelle [148].

3.9.1 mRNA-Expression der Migrations- und Adhäsionsmarker in Knochenmarksneutrophilen

Die Analyse der Knochenmarkszellen ergab, dass die intestinale Inflammation zwischen dem zweiten und dritten DSS-Zyklus einen Einfluss auf die Anzahl der Knochenmarkszellen hat. Um nun zu untersuchen, ob auch die Qualität der Zellen sich verändert, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, wurden diese nach der dritten DSS-Applikation aus dem Knochenmark behandelte und unbehandelte Tiere isoliert und die mRNA-Expression verschiedener Marker mittels qPCR untersucht. So konnte ein Trend zur gesteigerten Expression der *Gcsf* (*Csf3*) mRNA gezeigt werden (Abb. 25 A). Die Expression der mRNA des *Gcsf-Rezeptors* (*Csf3r*) und der mRNA des Adhäsionsmoleküls *P-Selektin Ligand* (*Psgl1*) waren in den Knochenmarksneutrophilen DSS-behandelte Tiere signifikant erhöht (Abb. 25 B, C). Das weitere Adhäsionsmolekül *E-Selektin Ligand* (*Glg1*) zeigte nur eine Tendenz zur erhöhten Expression der mRNA (Abb. 25 D).

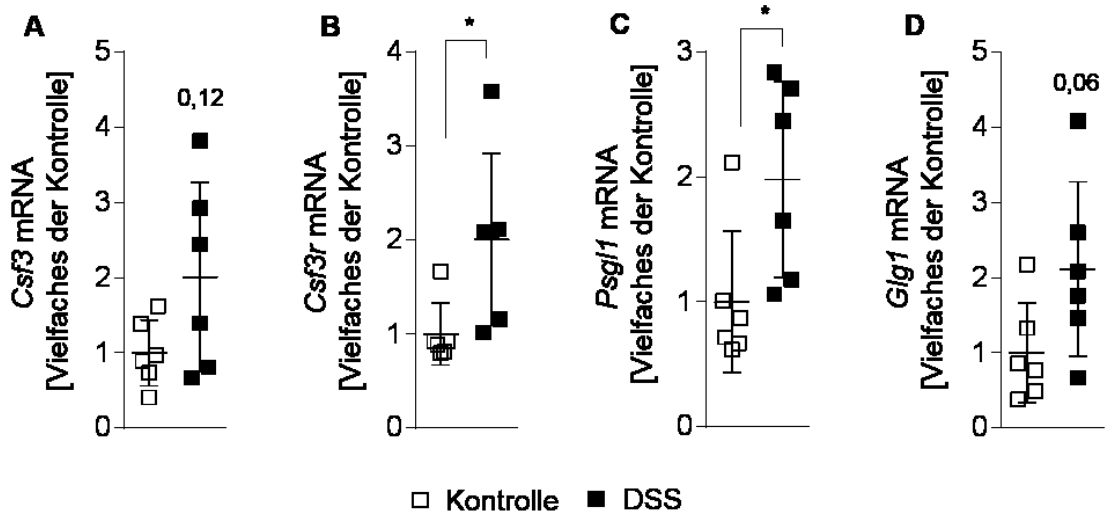


Abb. 25 Verstärkte mRNA-Expression von Migrations- und Adhäsionsproteinen in Knochenmarksneutrophilen von *ApoE*^{-/-} Mäusen mit CED.

Die Aufreinigung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von 13 Wochen alten *ApoE*^{-/-} Mäusen mit und ohne DSS-Behandlung erfolgte anhand von magnetischen Partikeln. Aus den isolierten Zellen wurde anschließend die RNA isoliert und die mRNA-Expression von **A** *Csf3*, **B** *Csf3r*, **C** *Psg1* und **D** *Glg1* mittels der quantitativen *Real-Time-PCR* untersucht, n=6. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.9.2 Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Zytokine in der Aorta

Findet eine Schädigung des Endothels statt, werden Zytokine ausgeschüttet, die den zirkulierenden Immunzellen als Migrationsstimulus dienen. Erster Schritt hierbei ist eine Adhäsion der Immunzellen an das Endothel erfolgen.

Um zu überprüfen, ob die induzierte Kolitis auch direkt einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in der Aorta hat, wurde die mRNA Expression von charakteristischen chemotaktischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in den Aorten beider Gruppen untersucht. Dabei konnte ein sehr starker Trend zur erhöhten mRNA-Expression von *E-Selektin* gezeigt werden (Abb. 5 A). *E-Selektin* kann zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten sowohl den E- als auch den P-Selektin Liganden binden. Die mRNA-Expression dieser war, wie zuvor in Abb. 25 gezeigt, in den neutrophilen Granulozyten nach der DSS-Behandlung hochreguliert. Auch die mRNA-Expression der für die Adhäsion und Migration wichtigen Zytokine wie *Ccl5* und *Ccl3* aber auch der Inflammationsmarker wie *Il1β* und *Mcp1* waren in Aorten von DSS-behandelten Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe stärker exprimiert (Abb. 26 B-E).

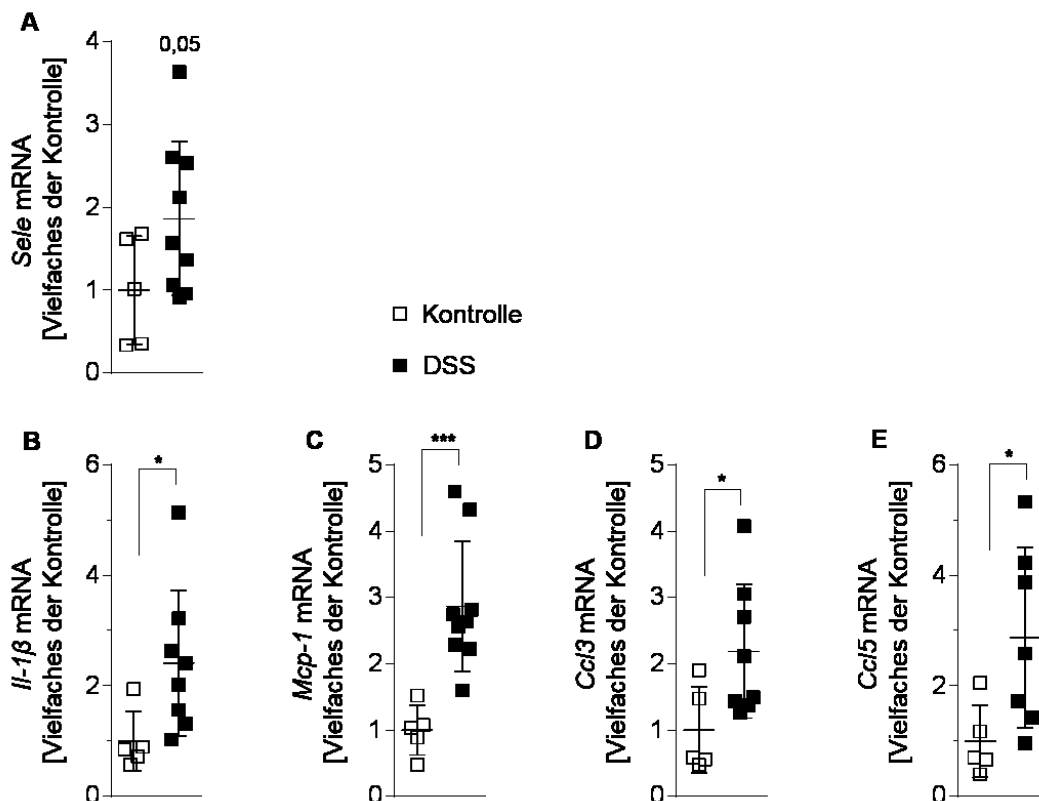


Abb. 26 Erhöhte mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Zytokinen in der Aorta von *ApoE*^{-/-} Mäusen mit induzierter Kolitis.

Der Nachweis der mRNA-Expression von **A** *Sele*, **B** *Il1β*, **C** *Mcp1*, **D** *Ccl3* und **E** *Ccl5* in der Aorta erfolgte mittels quantitativer *Real-Time-PCR* in 13 Wochen alten Mäusen, A, C n=5/9; B, D n=5/8; E n=5/7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.10 Ly6G-Depletion im Verlauf einer chronischen Kolitis

Um die kausale Rolle der neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer chronischen Kolitis für die gesteigerte Atherogenese und Progression der Atherosklerose in *ApoE*^{-/-} Mäusen zu untersuchen, erfolgte unter Verwendung eines Anti-Ly6G Antikörpers eine Depletion der neutrophilen Granulozyten. Mit der Applikation des Anti-Ly6G Antikörpers wurde zwar keine vollständige Neutropenie erreicht, jedoch wurde auch die Funktion der neutrophilen Granulozyten blockiert. Glycosylphosphatidylinositol-Anker-Protein (Ly6G) ist ein Oberflächenmarker, der zur spezifischen Identifizierung von neutrophilen Granulozyten verwendet wird. Wird dieser durch den spezifischen Antikörper blockiert, adhären die neutrophilen Granulozyten nicht mehr an das Gefäßendothel und kehren zurück zum Knochenmark wo sie abgebaut werden. Zusätzlich werden so aber auch Migrationsfähigkeit und Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in Richtung eines Stimulus beeinträchtigt. Somit wird auch durch eine Dosis, die keine vollständige Neutropenie induziert, die Funktion der neutrophilen Granulozyten nachhaltig inhibiert [149].

Im Kollitismodell wurde so über einen Zeitraum von 13 Wochen einerseits die effektive Blockierung des Ly6G Epitops, sowie andererseits die daraus resultierende Depletion der neutrophilen Granulozyten im Blut gemessen. Sowohl die Kontrollgruppe als auch die Neutrophilen-Depletions-Gruppe wurde fünf Zyklen mit DSS behandelt, um eine Kolitis zu induzieren. Der Kontrollgruppe wurde statt des Anti-Ly6G Antikörpers ein Isotyp Antikörper injiziert.

3.10.1 Vergleich der Entzündung des Kolons nach Applikation des Isotyp- oder Anti-Ly6G Antikörpers

Um zu bestätigen, dass die Behandlung mit dem Anti-Ly6G Antikörper keinen Effekt auf die DSS-induzierte Inflammation des Kolons hat, wurde zunächst die Gewichtszunahme der Tiere untersucht. In beiden Gruppen, sowohl der Isotyp- als auch Anti-Ly6G Antikörper behandelten, konnte eine vergleichbare Minderung der Gewichtszunahme beobachtet werden, wie bei allein mit DSS-behandelten Tieren im Vergleich zu der Kontrolle (Abb. 27).

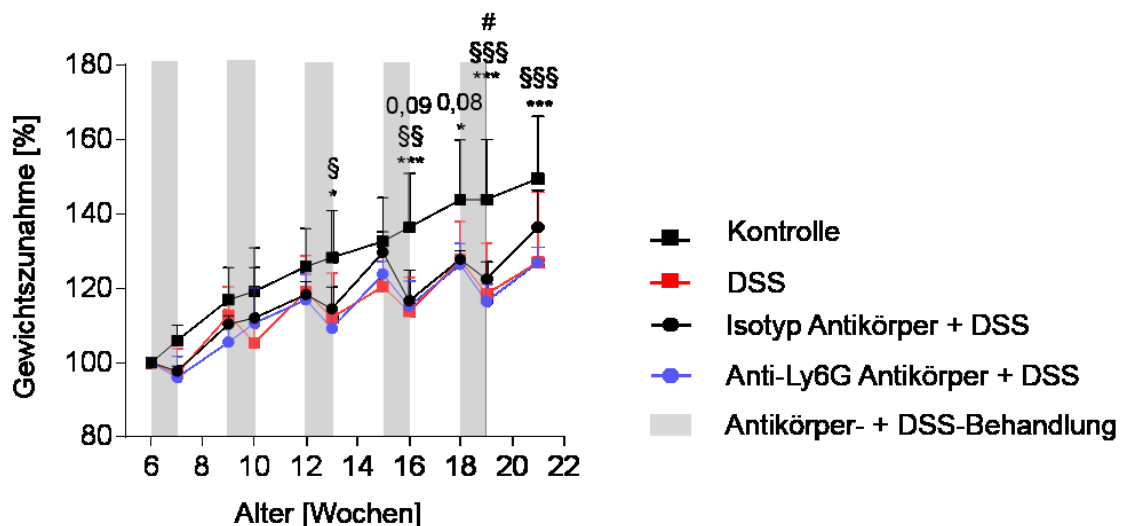


Abb. 27 Auch nach der Depletion der Neutrophilen weisen DSS-behandelte *ApoE*^{-/-} Mäuse eine reduzierte Gewichtszunahme auf.

Die Gewichtsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 15 Wochen, n=4-10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak: */§/# $P < 0,05$; §§ $P < 0,01$ ***/§§§ $P < 0,001$; * DSS vs. Kontrolle; #/0,09/0,08 Isotyp vs. Kontrolle; § Anti-Ly6G vs. Kontrolle.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression der Inflammationsmarker *Tnfa* und *IL1 β* im Kolongewebe der Isotyp- und Anti-Ly6G behandelten Tiere mittels der qPCR bestimmt. Auch hier konnte kein Effekt der Anti-Ly6G Behandlung detektiert werden und somit kein Unterschied in der Stärke der DSS induzierten Kolitis nachgewiesen werden (Abb. 28).

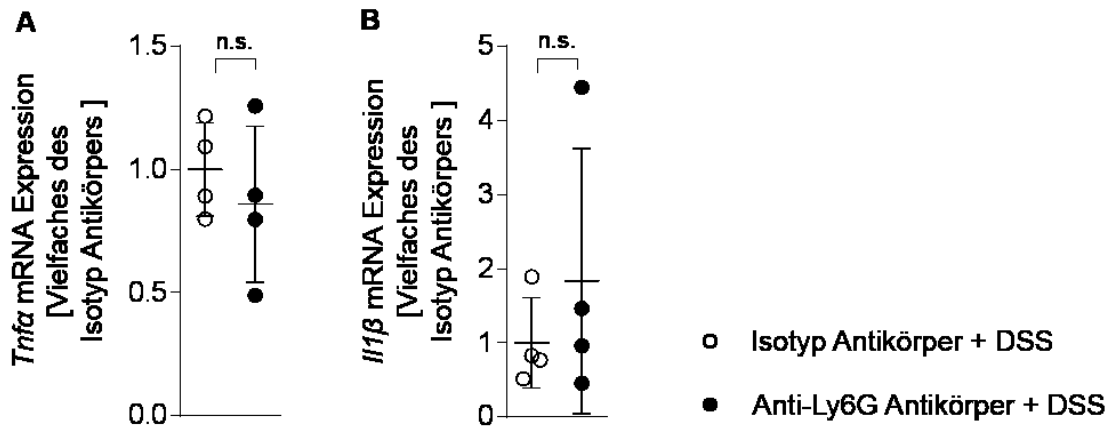


Abb. 28 Kein Unterschied in der Entzündung des Kolons nach Isotyp- oder Anti-Ly6G Antikörperbehandlung in *ApoE*^{-/-} Mäusen nach 5 DSS Zyklen.

Der Nachweis der mRNA Expression von A *Tnfa* und B *Il1β* im Kolon erfolgte mittels der quantitativen *Real-Time-PCR* im Alter von 21 Wochen, n=4. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen berechnet mit ungepaartem t-Test, n.s. = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

3.10.2 Verifizierung der effizienten Antikörper-Besetzung des Ly6G

Epitops

Nach der Blutentnahme vor und nach der DSS-Behandlung wurde die Analyse des Ly6G Epitops und der neutrophilen Granulozyten selbst mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Da die Blockierung des Ly6G Epitops mittels Antikörper die Detektion der neutrophilen Granulozyten über dieses Epitop verhindert, wurden die neutrophilen Granulozyten selbst als Ly6C⁺SSC^{high} identifiziert. Dabei wurde sichtbar, dass über alle fünf Zyklen hinweg der DSS-induzierte Anstieg Ly6G-positiver Zellen deutlich reduziert war (Abb. 29 A).

Bei Analyse der Depletion der neutrophilen Granulozyten war nach der ersten DSS-Applikation nur eine leichte Tendenz, nach der dritten als auch nach der fünften DSS-Applikation jedoch eine signifikant reduzierte Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Anti-Ly6G Gruppe gegenüber den Kontrolltieren zu erkennen (Abb. 29 B).

Bei der Darstellung der neutrophilen Granulozyten als Einzelzellen im *Dot-Plot* (SSC/Ly6C) ist eine Veränderung der neutrophilen Granulozyten nach der Depletion deutlich zu erkennen. Die Blockierung des Epitops bewirkt eine morphologische Veränderung der neutrophilen Granulozyten, sodass die verbliebenen neutrophilen Granulozyten deutlich tiefer im Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) erscheinen verglichen mit den neutrophilen Granulozyten nach Isotyp-Behandlung (Abb. 29 B).

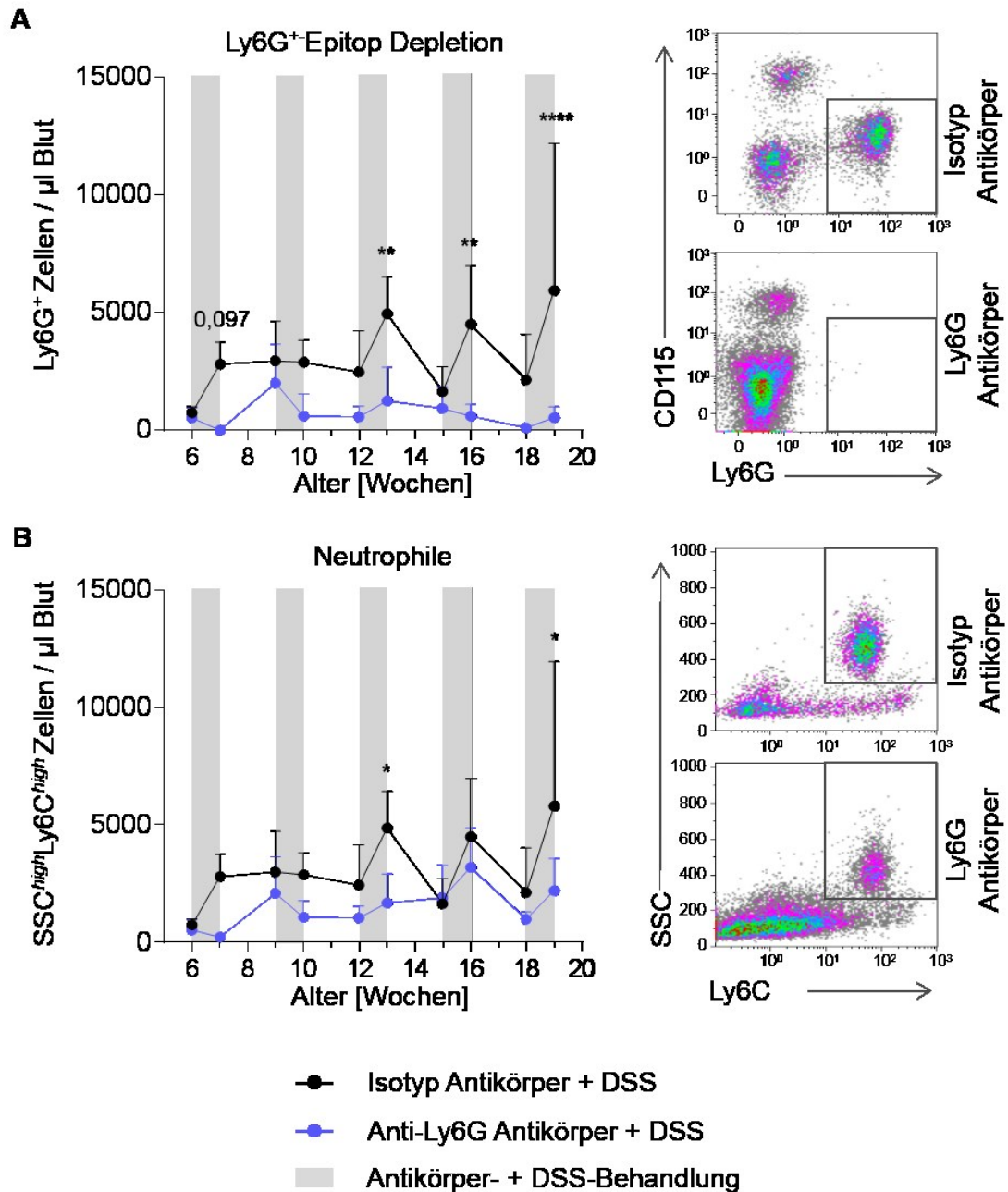


Abb. 29 Reduktion der Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten im Verlauf der chronischen Kolitis nach Applikation eines Anti-Ly6G Antikörpers.

Der Anti-Ly6G Antikörper bzw. die Isotyp-Kontrolle wurden während der DSS-Gabe intraperitoneal gespritzt. Über fünf Zyklen wurde vor und nach der DSS-Gabe Blut aus der Schwanzspitze entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. **A** Ly6G⁺ Epitop Detektion (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6G⁺ Zellen- Ly6G abhängiger Nachweis der neutrophilen Granulozyten), **B** Neutrophile (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺SSC^{high}Ly6C^{high} Zellen- Ly6G unabhängiger Nachweis der neutrophilen Granulozyten) mit repräsentativen Plots, n=4-5. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanz berechnet mit *Two-Way ANOVA*, nach Sidak. Signifikanzen: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.10.3 Atherosklerose nach Depletion der neutrophilen Granulozyten

Bei der Untersuchung des Einflusses der CED auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose wurden die oben aufgeführten Analysen durchgeführt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Zahl der neutrophilen Granulozyten sowohl im Blut als auch in der Aorta der DSS-Tiere während der Induktion der intestinalen Inflammation oszillierte und gegenüber der Kontrolle ab der zweiten Induktion signifikant erhöht war. Auch die Untersuchung der mRNA-Expression ergab eine gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle der Knochenmarksneutrophilen in den Kolitis-Tieren, welche auf einen proinflammatorischen Phänotyp hindeuten könnten.

Um nun die Frage zu klären, ob die neutrophilen Granulozyten im Kontext der Kolitis ein kausaler Faktor bei der Plaque-Entwicklung sind, wurden Anzahl und Funktion der neutrophilen Granulozyten mittels Anti-Ly6G Antikörper Applikation während der chronischen Inflammation inhibiert und die Entwicklung atherosklerotischer Plaques untersucht. Dazu wurde nach dem fünften DSS-Zyklus, zum Zeitpunkt von 21 Wochen, der Plaque-Besatz der Aorten anhand einer ÖRO-Färbung bestimmt. Die Analyse ergab, dass die Behandlung der *ApoE*^{-/-} Mäuse mit dem Anti-Ly6G Antikörper, verglichen mit der Isotyp-Behandlung, zu einer Reduktion der Plaque-Belastung um ca. 50 % in der Aorta führte (Abb. 30 A).

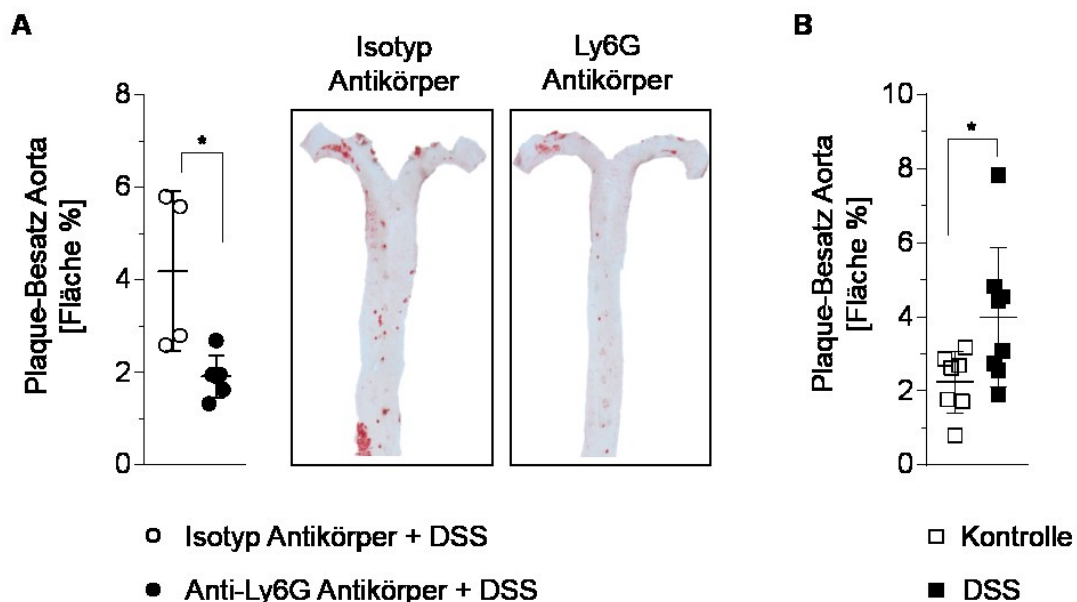


Abb. 30 Reduktion der Plaque-Belastung in der Aorta nach Depletion der neutrophilen Granulozyten während der chronischen intestinalen Inflammation.

Bestimmung des Plaque-Besatzes der Aorta von *ApoE*^{-/-} Mäusen im Alter von 21 Wochen anhand der ÖRO-Färbung. **A** Plaque-Belastung nach DSS-Behandlung und Applikation des Isotyp oder Anti-Ly6G Antikörpers, n=4/5, mit repräsentativen Aufnahmen. **B** Plaque-Belastung der Aorta nach DSS-Behandlung oder Vehikel (Kontrolle), n=7/8. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen berechnet mit Mann-Whitney U Test (A) und ungepaartem t-Test (B): * P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

4 Diskussion

Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED), charakterisiert durch eine intermittierende gastrointestinale Inflammation, ist eine Erkrankung bei der trotz Fehlen klassischer Risikofaktoren wie z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen und Übergewicht das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen insbesondere in den akuten Phasen der gastrointestinalen Inflammation signifikant höher ist verglichen mit den Kontrollgruppen. Da bei den CED Patienten trotz der Abwesenheit dieser Risikofaktoren ein erhöhtes Risiko für eine KHK vorliegt, ergibt sich die Frage offen, wodurch dies bedingt ist. Diese Fragestellung wurde in der hier vorliegenden Arbeit mittels eines geeigneten Mausmodells untersucht.

Die Untersuchung des Einflusses der CED auf die Entwicklung und die Progression der Atherosklerose im murinen Modell konnte die humanen Beobachtungen bestätigen: Nach der chemischen Induktion einer chronischen Kolitis in *ApoE*^{-/-} Mäusen konnte sowohl ein erhöhter Plaque-Besatz als auch ein größeres Plaque-Volumen im Alter von 21 Wochen in den DSS-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Somit scheint die chronische Entzündung im Darm die Atherogenese im murinen Modell zu fördern. Die zugrundeliegenden Pathomechanismen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit adressiert werden.

4.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankung im murinen Modell der akzelerierten Atherosklerose

Die DSS-induzierte Kolitis gehört zu den gängigsten Modellen zur Untersuchung der CED in Mäusen. Es kann sowohl zur Analyse einer akuten als auch chronischer Inflammation eingesetzt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Kolitis auf die Atherosklerose wurde eine chronische Kolitis über mehrere Zyklen in *ApoE*^{-/-} Mäusen mit DSS induziert. Um den Verlauf der Kolitis möglichst nah an das humane Krankheitsbild anzupassen, enthielt die Behandlung sowohl akute Phasen als auch Remissionsphasen. Für gewöhnlich wird im *ApoE*^{-/-} Modell eine hochkalorische Western Diät verwendet, um die Plaque-Entwicklung zu beschleunigen. Darauf wurde in diesem Modell verzichtet, um keine weiteren Variablen in das Modell zu integrieren, zumal neuere Arbeiten zeigen, dass die Fütterung der Western Diät alleine schon massive und langanhaltende Effekte auf die Inflammation mit sich bringt [150]. Um Unterschiede in der Plaque-Entwicklung möglichst gut abbilden zu können, wurden die Tiere über fünf Zyklen, einem Gesamtzeitraum von 15 Wochen entsprechend, beobachtet.

Die Verifizierung des Kolitismodells erfolgte nach fünf Behandlungszyklen anhand der reduzierten Gewichtszunahme, dem Nachweis einer abnormalen Kryptenarchitektur und der erhöhten mRNA-Expression von *Tnfa* im Kolon. Bei der Diagnose der CED werden ebenfalls ähnliche Kriterien eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es oft noch vor der Diagnose vor allem bei jungen Patienten zu einem Gewichtsverlust kommt. Neben dem Gewichtsverlust als Indikator werden die Entzündungsherde mittels Koloskopie und histologischer Untersuchung im Darm identifiziert [151, 152]. Auch im murinen Modell der DSS-induzierten Kolitis sind der Gewichtsverlust sowie eine abnormale Kryptenarchitektur Anzeichen für die erfolgreiche Induktion der Inflammation. TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das im Rahmen einer Inflammation von betroffenen Zellen freigesetzt wird und die Immunantwort reguliert. Somit stellt der Nachweis der *Tnfa* mRNA-Expression ein gängiges Verfahren zur Identifizierung einer Inflammation im Rahmen der CED im murinen Modell dar. Auch bei Patienten wird TNF- α als ein Surrogat-Parameter für die gastrointestinale Entzündung in der Diagnostik gemessen, wobei die Konzentration dieses Zytokins im Stuhl bestimmt wird [153-155].

Somit wurde das murine Kolitismodell sowohl im Versuchsaufbau als auch in den verwendeten Methoden zur Verifizierung der Kolitis an den humanen Krankheitsverlauf der CED möglichst nah angepasst.

Neben der Untersuchung der Entzündungsparameter wurde überprüft, ob durch die DSS-Gabe Atherosklerose-fördernde Parameter in den Mäusen verändert wurden. So sollte geprüft werden, ob im murinen Modell ebenfalls die typischen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen abwesend waren. Aus diesem Grund wurde vorerst die Konzentration von Cholesterin im Plasma bestimmt. Nach fünf Zyklen wiesen die DSS-behandelten Tiere einen signifikant reduzierten Plasma-Cholesteringehalt gegenüber den Kontrolltieren auf. In einer humanen Studie konnte gezeigt werden, dass CED Patienten häufig eine Hypocholesterinämie aufweisen [156]. In dem murinen Modell konnte keine Hypocholesterinämie (definiert nach Wu Yin *et al.*) erreicht werden, da die *ApoE*^{-/-}-Mäuse *per se* eine Hypercholesterinämie aufweisen [131]. Jedoch konnte durch die DSS-Behandlung eine deutliche Reduktion des Plasma-Cholesterins gegenüber den Kontrollen erzielt werden, sodass der Einfluss der Lipide als Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose auch im murinen Modell nicht die primäre Rolle in der Pathogenese einnimmt.

Die zyklische Induktion der Kolitis erfolgte über eine Gesamtdauer von 15 Wochen. Dieser Zeitraum ist ausreichend für eine chronische Manifestation der intestinalen Entzündung und war – wie bereits erwähnt – notwendig, damit die Tiere

atherosklerotische Läsionen entwickeln, welche in Größe und Komplexität die Untersuchung des Einflusses der chronischen Inflammation erlauben [129, 137, 157].

4.2 Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung der atherosklerotischen Plaques

Wie bereits die humanen Daten zeigen, besteht ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und der CED [121]. Die Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Karotiden ist ein gängiges Verfahren, um die humane Atherogenese abzuschätzen [124]. Auch in den murinen Untersuchungen konnte der Einfluss einer chronischen intestinalen Inflammation auf die Atherogenese nachgewiesen werden. Es konnte sowohl ein signifikant erhöhter Plaque-Besatz in der Aorta (Abb. 8 A) als auch ein größeres Plaque-Volumen in der BCA (Abb. 8 B) in den DSS-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Die Analyse unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen ist notwendig, da sowohl Scherstress als auch Strömungsturbulenzen einen Einfluss auf die Entwicklung der Läsionen haben. Somit kann die Atherogenese an den verschiedenen Lokalisationen unterschiedlich ausgeprägt sein [158, 159].

Neben der erhöhten Plaque-Belastung konnte auch eine Veränderung der Plaque-Komposition in den Vorarbeiten detektiert werden. Hierzu wurden unter anderem Komponenten der Extrazellulären Matrix und die Lipidretention im Aorten-Ursprung im Alter von 21 Wochen untersucht.

Die Akkumulation der Lipide in der Aortenwand stellt eines der Schlüsselereignisse bei der Plaque-Entwicklung dar [19, 20]. Eine humane Studie untersuchte Segmente der Koronararterien von 38 Patienten, die im Alter von 7 bis 49 Jahren verstarben. In dieser Untersuchung konnte ein frühes Stadium der Atherosklerose anhand von „*fatty streaks*“ identifiziert werden. Auch konnte eine Korrelation zwischen fortschreitender Lipidakkumulation in der Gefäßwand und Progression der atherosklerotischen Läsionen hergestellt werden [160]. Da die Plaquelast in den DSS-behandelten Tieren erhöht war, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Lipidretention in den CED Tieren erhöht war. Die Untersuchung zeigte jedoch entgegen der Vermutung eine verminderte Retention der Lipide, bemessen anhand der ÖRO-Färbung im Aorten-Ursprung (Vorarbeiten). Sowohl der Plaque-Besatz als auch die Lipidretention wurden mittels ÖRO-Färbung detektiert. Da der Plaque-Besatz signifikant erhöht war (Abb. 8 A) und die Lipidretention im Plaque reduziert war (Abb. 2 A), scheint es so, dass die DSS-behandelten Tiere zwar mehr Plaques entwickeln, diese aber lipidärmer sind als in den Vergleichstieren. Die reduzierte Lipidretention deckt sich mit dem Befund, dass die Tiere ein geringeres

Gewicht aufweisen und das Plasma-LDL reduziert ist. Somit ist nicht nur die Größe, sondern auch die zelluläre Komposition der Plaques unterschiedlich im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Ob die Veränderung der Plaque-Komposition im Zusammenhang mit der CED zu einer Plaque-Ruptur oder Erosion führt, kann hier nicht weiter analysiert werden, denn im *ApoE*^{-/-} Modell konnte bisher nicht gezeigt werden, dass ein Plaque, unabhängig von seiner Größe, spontan rupturiert. Auch scheinen diese Modelltiere ebenfalls resistent gegenüber der Thrombenbildung an der Läsion zu sein [161].

Da den Lipiden in diesem Modell scheinbar eine andere Rolle in der Pathogenese und -progression der Erkrankung zukommt als sonst, bleibt die Frage, ob anderen Faktoren für die progressive Entwicklung der Läsionen während der CED verantwortlich sind.

Zur Behandlung der Atherosklerose werden Statine als Goldstandard in der heutigen Medizin eingesetzt. Statine haben eine cholesterinsenkende Wirkung und günstige Auswirkungen in der primären und sekundären Prävention der Atherosklerose gezeigt [162]. Jedoch bringt der Einsatz von Statinen nicht immer den gewünschten Erfolg, denn ein Teil der behandelten Patienten entwickelt dennoch kardiovaskuläre Erkrankungen. Trotz der Therapie mit Statinen entwickeln diese Patienten atherosklerotische Läsionen. Die entstehenden Plaques sind lipidärmer und scheinen stabiler zu sein. Es kommt seltener zur Ruptur der Läsionen, die letztlich eine Stenose der Gefäße verursacht, dafür aber häufiger zur sog. Plaque-Erosion, wodurch Stenosen aufgrund der Bildung von „weißen“, fibrin- und thrombozytenreichen, Thromben entstehen [163-166]. Somit eröffnen neuere Überlegungen den alternativen Aspekt, dass sich die Pathogenese der atherosklerotischen Plaques aufgrund der Interventionstherapie in den letzten Jahrzehnten verändert hat [167].

Da eine lipidsenkende Therapie im Modell der chronischen Kolitis nicht zielführend wäre - die Plaques der Kolitis-Tiere sind bereits lipidarm - muss eine weitere Schlüsselkomponente der Plaque-Entwicklung genauer betrachtet werden. Wie bereits in der CANTOS-Studie gezeigt, ist eine rein lipidsenkende Therapie nicht immer ausreichend, um das Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis zu reduzieren, da auch die Inflammation eine Rolle spielt und somit ein Restrisiko auch bei optimaler LDL-Cholesterinsenkung bestehen bleibt. In der Studie wurde gezeigt, dass eine gezielte antiinflammatorische Therapie das kardiovaskuläre Risiko auch unabhängig von einem Einfluss auf die Plasmalipide reduzieren kann [168]. Daher wurde im Folgenden die Analyse der Immunkomponente in dem hier untersuchten Komorbiditätsmodell unabdingbar.

4.3 Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Komposition der Immunzellen und die Konzentration der Zytokine nach fünf Zyklen DSS-Behandlung

Eine Frage, die sich nun anschließt, ist: Hat die lokale intestinale Inflammation auch systemische Auswirkungen und beeinflusst sie somit die Entwicklung der Atherosklerose? Bei Betrachtung des Entzündungsstatus anhand zahlreicher pro- und antiinflammatorischer zirkulierender Zytokine wird deutlich, dass nur ein leichtes proinflammatorisches Zytokinprofil im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu detektieren ist. Das am stärksten regulierte Zytokin ist G-CSF. G-CSF ist ein Zytokin, dessen Plasmalevel im Rahmen einer Infektion stark ansteigt [169]. Auch in den Kolitis-Tieren war G-CSF in der Einzelbetrachtung im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 10). Dies deutet darauf hin, dass eine moderate systemische Inflammation zu diesem Zeitpunkt messbar ist.

Die Analyse der Immunzellen im Alter von 21 Wochen zeigte jedoch weder in der Aorta noch in der Zirkulation große Veränderungen durch die DSS-Behandlung (Abb. 11). Somit scheint zu diesem Zeitpunkt ein systemischer Einfluss der Inflammation im Kolon nicht mehr gegeben zu sein. Dennoch ist die Atherosklerose signifikant verstärkt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Kolitis-Tiere am Ende der zweiwöchigen Erholungsphase, in der sie akut kein DSS über das Trinkwasser bekommen. Sie haben jedoch zu diesem Zeitpunkt die Kolitis-induzierende Behandlung bereits fünf Mal erhalten. Somit ist die Entzündung des Darms in einen chronischen Zustand übergegangen, in welchem die lokale intestinale Inflammation nachweisbar ist. Systemisch kann aber lediglich eine moderate Inflammation mittels G-CSF detektiert werden. Diese Phase im vorliegenden Modell entspricht der Remissionsphase des humanen Krankheitsbildes. Auch die im murinen Modell beobachteten Auswirkungen auf die lokale Entzündung während der Remission entsprechen denen der humanen Erkrankung. Es ist bekannt, dass nach einer längeren Krankheitsperiode mit intermittierenden Inflammationsphasen die Patienten keine klinischen Symptome aufweisen, sich also in der Remission befinden. Die gastrointestinale Inflammation ist jedoch zum Teil endoskopisch und mikroskopisch nachweisbar [170]. Das Risiko einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit einer CED ist aber nur in der aktiven Phase der Erkrankung signifikant erhöht [121].

Nichtsdestotrotz konnte in dieser Phase der Remission am Ende des fünften DSS-Zyklus gezeigt werden, dass die CED auch im Mausmodell ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen durch eine gesteigerte Plaque-Ablagerung in der Aortenwand darstellt. Für die Untersuchung des Einflusses der Kolitis auf die

Entwicklung der Atherosklerose sollten jedoch auch die möglichen zugrundeliegenden Mechanismen aufgedeckt werden. Wie die Daten zeigen ist die Remissionsphase nach der fünften DSS-Behandlung hierfür ungeeignet.

4.4 Komposition der Immunzellen und die Konzentration der Zytokine in der akuten Phase der Inflammation

Die Induktion der chemischen Kolitis erfolgte über fünf Zyklen. Jeder dieser DSS-Behandlungen stellt zum Zeitpunkt der Behandlung eine aktive Phase dar, in der laut humaner Studien das Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis am höchsten ist [121]. Es ist jedoch fraglich, ob bereits der erste akute Kolitis-Schub schon einen bleibenden Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose hat.

Bei Betrachtung sowohl der zirkulierenden Immunzellen als auch der Immunzellen in der Aortenwand im Verlauf der CED, kristallisierte sich in Zeitgangsanalysen der Zeitpunkt nach der dritten DSS-Gabe als geeigneter Untersuchungszeitpunkt heraus. Denn zu diesem Zeitpunkt ist die chronische intestinale Inflammation erstmalig auch systemisch nachweisbar, da ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Immunzellen im Blut, bedingt durch den Anstieg der Zahl der Monozyten und auch der neutrophilen Granulozyten, gemessen werden konnte. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Untersuchung der aortalen Immunzellen. Auch hier war die Zahl der Immunzellen durch den Anstieg der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen.

Die signifikant erhöhte Zellzahl der Makrophagen zu diesem Zeitpunkt deutet auf eine gesteigerte Plaque-Entwicklung in den Kolitis-Tieren hin. Die Akkumulation der Makrophagen in atherosklerotischen Plaques ist assoziiert mit einer gesteigerten Progression der Atherosklerose [171, 172]. Die Akkumulation beruht dabei auf zwei Hauptmechanismen, der Differenzierung aus rekrutierten Monozyten und der Proliferation der Makrophagen in den Plaques [173-175]. Die gesteigerte Monozyten-Zahl, insbesondere die der Ly6C^{high}- Monozyten im Blut, unterstützt die Hypothese, dass die Rekrutierung der Monozyten und die darauffolgende Differenzierung für die erhöhte Makrophagen-Zahl verantwortlich ist [174]. Allerdings kann die Proliferationshypothese in diesem Zusammenhang noch nicht ausgeschlossen werden. Denn auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten ist im Blut und auch der Aorta der DSS-behandelten Tiere signifikant erhöht. Die Makrophagen-Differenzierung und -Proliferation können durch M-CSF beeinflusst werden. Da neutrophile Granulozyten zu den M-CSF-produzierenden Zellen gehören, können sie beide Prozesse fördern [176].

Der Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten war zum ersten Mal bereits nach der zweiten Kolitis-Induktion signifikant gegenüber den Kontrollen. Bei näherer Betrachtung der neutrophilen Granulozyten über die drei DSS-Zyklen wurde deutlich, dass die Zahl dieser in den DSS-behandelten Tieren im Verlauf oszilliert. Somit steigt die Zahl innerhalb der aktiven Inflammationsphase und sinkt in der Remissionsphase wieder auf das basale Niveau ab. Dieser oszillierende Ablauf war sowohl im Blut als auch in der Aorta zu detektieren. Von Stimmulationszyklus zu Stimmulationszyklus war der Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten stärker als im DSS-Zyklus davor. Auffällig war jedoch, dass in den Kontrolltieren die Zahl der neutrophilen Granulozyten in der Gefäßwand beinahe unverändert war. Die Zahl der Makrophagen in der Aorta stieg über den Zeitverlauf hingegen kontinuierlich leicht an, sowohl in den Kolitis-Tieren als auch in den Kontrolltieren. Erst nach der dritten DSS-Applikation konnte ein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Sowohl der Verlauf als auch der verstärkte Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten von Zyklus zu Zyklus, in der Zeitverlaufsanalyse, könnte in den Zusammenhang mit dem Konzept der „*trained immunity*“ gebracht werden. Dieses Konzept vertritt die Annahme, dass nicht nur das adaptive Immunsystem sich an eine wiederkehrende Präsentation eines Antigens (z.B. im Rahmen einer Infektion) anpassen kann, sondern auch das angeborene. Im Gegensatz zur der Immunantwort der Zellen des adaptiven Systems, ist die des angeborenen eher unspezifisch. Es findet eine Anpassung der Antwort myeloider Zellen statt, sodass auf einen wiederholten Stimulus schneller erfolgt [177]. Humane isolierte Monozyten wurden wiederholt mit einer niedrigen Dosis des Pathogens *Candida albicans* oder einer Zellwandkomponente des Pilzes stimuliert. Nach der zweiten Stimulation zeigte sich eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Faktoren [178]. Auch im murinen Modell konnte eine Anpassung des angeborenen Immunsystems an einen Stimulus beobachtet werden. Dazu wurden Mäuse, die über keine aktiven B- und T-Lymphozyten verfügten, mit einem nicht pathogenen *Candida albicans* Stamm infiziert. Diese vorbehandelten Tiere zeigten eine stärkere Immunität gegenüber der Infektion mit einem pathogenen Stamm, gemessen an der erhöhten Reaktionsfähigkeit von Monozyten und Makrophagen, als die nicht vorbehandelten Kontrolltiere [179-181]. Auch wenn das Phänomen der antrainierten Immunität der myeloiden Zellen einen Vorteil gegenüber einer erneuten Infektion bietet, kann diese „Lernfähigkeit“ der Zellen im Zusammenhang mit chronischen Inflammationen auch einen nachteiligen Effekt haben. In murinen atherosklerotischen Modell konnten bereits erste Zusammenhänge zwischen der antrainierten Immunität der myeloiden Zellen und der gesteigerten Atherosklerose gezeigt werden. Die Behandlung von *ApoE^{-/-}* Mäuse mit einer sehr geringen Lipopolysaccharid-Dosis verstärkte die

Atherosklerose in den Tieren. Aus diesen Tieren wurden Monozyten isoliert und in nicht behandelte Tiere transplantiert. Auch bei diesen Tieren konnte eine verstärkte Atherogenese nachgewiesen werden [182]. Auch humane Untersuchungen liefern bereits erste Hinweise im Zusammenhang mit der Pathogenese der Atherosklerose: Monozyten, isoliert aus Patienten mit erhöhtem Lipoprotein (a), einem Risikofaktor für die Atherosklerose, zeigten *ex vivo* eine erhöhte Zytokinproduktion sowie eine gesteigerte Adhäsionsfähigkeit und migratorische Kapazität [183]. Eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Faktoren in *ex vivo* stimulierten Monozyten konnte auch in Patienten mit einer schweren symptomatischen Atherosklerose verglichen mit Monozyten aus asymptomatischen Patienten beobachtet werden [184]. Das Konzept der „*trained immunity*“ bietet eine neue Richtung, um chronische Erkrankungen zu verstehen und gegebenenfalls eine neue Therapiemöglichkeit zu entwickeln.

Die Untersuchung der aortalen neutrophilen Granulozyten der DSS-Tiere in Zeitgangsanalysen zeigte bereits, dass möglicherweise auch diese Zellen die Fähigkeit haben sich auf einen wiederholten Stimulus einzustellen und schneller auf einen folgenden Stimulus zu reagieren. Ob die neutrophilen Granulozyten ebenso wie die Monozyten diese Fähigkeit aufweisen, ist bisher jedoch noch wenig untersucht. Grund hierfür ist auch die Annahme, dass das Konzept für Zellen mit einer kurzen Lebensdauer wie die der Neutrophilen eher unwahrscheinlich erscheint. Dieser Fragestellung wird aber derzeit verstärkt nachgegangen.

Es ist bereits bekannt, dass neutrophile Granulozyten zu den ersten Zellen gehören, die an der Entwicklung der Atherosklerose beteiligt sind [52]. Neben der Endothelzellaktivierung sind sie gemeinsam mit Thrombozyten in den Prozess der Monozyten-Rekrutierung involviert [71, 185]. Trotz der Bedeutung neutrophiler Granulozyten in der Atherogenese zeigen die Daten, dass sich zum Startzeitpunkt der Veränderungen in der Immunzellkomposition im Blut aber auch in der Aorta in den Kolitis-Mäusen, in den Kontrolltieren noch keine vermehrte Beteiligung der neutrophilen Granulozyten in der Aorta abzeichnet. Durch die neu gewonnenen Daten wird die Annahme getroffen, dass die frühe Infiltration der neutrophilen Granulozyten in die Aortenwand, initiiert durch die intestinale Inflammation, ein markantes Ereignis ist, welches Atherogenese und Atheroprogression beschleunigt. Somit scheinen die neutrophilen Granulozyten in diesem Komorbiditätsmodell eine kausal entscheidende Rolle zu spielen.

Verstärkt wird diese Annahme zudem durch die Veränderung des Zytokinniveaus nach DSS-Behandlung. Auch zum Zeitpunkt von 13 Wochen, in der aktiven Phase der

chemisch-induzierten Kolitis, konnte neben einem signifikanten Anstieg der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine MCP-1 und IL-12, erneut ein signifikanter aber auch stärkerer Anstieg der Konzentration des zirkulierenden G-CSF detektiert werden. In der Zeitverlaufsanalyse von G-CSF im Blutplasma konnte dasselbe oszillierende Muster wie jenes der Anzahl an neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Auch der Anstieg des Zytokins war, wie der der aortalen neutrophilen Granulozyten, von Stimulus zu Stimulus stärker.

Dass die intestinale Inflammation eine Quelle der G-CSF Sekretion sein könnte, zeigen das mRNA-Expressionsprofil und das Sekretionsprofil des Darmgewebes. Die mRNA-Expression des Zytokins *Gcsf* (*Csf3*) war während der akuten Phasen im Darmgewebe signifikant erhöht, bei den Kontrollen und während der Remissionsphase war es dagegen zum Teil nicht zu detektieren. Auch auf Proteinebene konnte dies belegt werden. Die Analyse der sezernierten Proteine nach der Darmkultivierung zeigte, dass neben MCP-1, dessen Konzentration im Überstand der Darmkultur nur leicht erhöht war, als einzige weitere Zytokinkonzentration die von G-CSF erhöht und dies sogar um das Vierfache (Abb. 20). Dies unterstützt die These von G-CSF als einen spezifischen Inflammationsmarker im Rahmen der Kolitis. Auch deckt sich dies wiederum mit humanen Daten, bei denen ebenfalls an Gewebeproben des Kolons aus CED Patienten eine verstärkte G-CSF Sekretion in der Organkultur gezeigt werden konnte. G-CSF reduzierte in diesem Kontext die Apoptose der neutrophilen Granulozyten und begründet damit die Akkumulation dieser im Darmgewebe. Die neutrophilen Granulozyten verweilen länger aktiv am Ort des Inflammationsgeschehen und rekrutieren weitere Granulozyten sowie auch andere Immunzellen [186].

G-CSF ist somit ein wichtiger Inflammationsmarker und erfüllt zahlreiche wichtige Funktionen in Bezug auf Immunmodulationen [169, 187]. Die immunmodulierende Wirkung von G-CSF basiert auf seinem Einfluss auf alle Zellen in der Abstammungslinie der neutrophilen Granulozyten, von den hämatopoetischen Stammzellen bis zu den reifen neutrophilen Granulozyten [188]. Die stärkste Einflussnahme dieses Zytokins erfolgt im Knochenmark durch die Induktion der Hämatopoese, die Steigerung der Proliferation sowohl von Stammzellen als auch von reifen Zellen, und durch Erhöhung der Lebensdauer der Zellen. G-CSF ist für die Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation verantwortlich [189-192].

Im Falle einer Inflammation steigt die G-CSF Konzentration im Blut rapide an und kann dabei sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf die Entzündung haben. Im murinen Modell konnte gezeigt werden, dass die Applikation von G-CSF die Tiere vor

einem septischen Schock nach Administration der bakteriellen Superantigene *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) und *staphylococcal enterotoxin B* (SEB) schützt [193]. Auch im Falle der Hapten-induzierten (*2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*, TNBS) Kolitis konnte nach G-CSF Applikation ein positiver Effekt auf die Entwicklung der Kolitis nachgewiesen werden [194]. Andererseits kann G-CSF jedoch auch eine Inflammation fördern, wie im Falle der Arthritis gezeigt wurde. Die Depletion von G-CSF mit einem anti-G-CSF Antikörper im murinen Arthritismodell zu Beginn der Arthritis-Erkrankung hatte eine günstige Wirkung auf ihre Progression [145].

Auch in der humanen Therapie weist G-CSF eine ambivalente Wirkung auf. Eine Therapie wurde in einer offenen Pilot-Studie an fünf Morbus Crohn-Patienten getestet. Diese Patienten befanden sich in der Remission, zeigten jedoch Auffälligkeiten in der Koloskopie. Nach G-CSF Gabe konnten positive Effekte auf den Entzündungsstatus der Mukosa beobachtet werden. Bei zwei Patienten konnte sogar eine vollständige Heilung der Mukosa erreicht werden [195]. Eine andere Patienten-Studie sollte die Sicherheit der G-CSF Applikation zur Stammzell-Mobilisierung an acht Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) untersuchen. Die Studie zeigte, dass durch die G-CSF Gabe in höherer Dosis zwar die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen erreicht werden konnte, jedoch alle Patienten erneut eine Inflammation entwickelten [196]. Obwohl also sowohl die CED als auch die RA durch eine chronische Inflammation charakterisiert sind und ihnen eine fehlregulierte Immunantwort zugrunde liegt, scheint G-CSF einen unterschiedlichen Einfluss auf die jeweiligen Erkrankungen zu haben.

Auch im Rahmen der Atherosklerose wird die Wirkung von G-CSF kontrovers diskutiert. Bei der Untersuchung der Rolle der neutrophilen Granulozyten im murinen Atherosklerosemodell konnte nach der hochkalorischen Fütterung ein Anstieg der Läsionen in der Aorta nachgewiesen werden. Parallel zur gesteigerten Atherosklerose konnte ebenfalls ein erhöhter G-CSF Plasmaspiegel detektiert werden, der eine Beteiligung an der Atherogenese vermuten lässt [196]. Die G-CSF Applikation über acht Wochen hingegen zeigte eine Verschlechterung der Atherosklerose in *ApoE*^{-/-} Mäusen [197]. Es konnte aber ebenso eine Reduktion der atherosklerotischen Plaques, ebenfalls in *ApoE*^{-/-} Mäusen, nach neun Wochen G-CSF Applikation nachgewiesen werden, doch wurden in diesem Fall die Tiere mit humanen G-CSF behandelt [198].

Eine Studie mit 280 Patienten mit einer stabilen koronaren Herzkrankheit zeigte, dass eine erhöhte G-CSF Konzentration in Blut als Marker für ein prognostiziertes kardiovaskuläres Ereignis eingesetzt werden kann [199]. Doch auch im Zusammenhang mit dem Myokardinfarkt (MI) ist der Einfluss dieses Zytokins noch nicht eindeutig geklärt.

Durch die Applikation des rekombinanten G-CSF vor und nach MI konnte sowohl die Überlebensrate als auch die ventrikuläre Leistung der Mäuse verbessert werden [200]. Andererseits zeigten mehrere Studien mit insgesamt 445 Patienten keinen positiven Effekt auf den kardialen Heilungsprozess durch die G-CSF Behandlung [201]. Nicht zu vernachlässigen sind auch die Nebeneffekte der G-CSF Therapie im Kontext eines MI. In Untersuchungen des Einflusses der G-CSF Behandlung auf den MI konnten zwar positive Ergebnisse auf den Heilungseffekt gezeigt werden, jedoch kam es häufiger zu In-Stent-Restenosen [202, 203].

G-CSF besitzt somit viele Funktionen in der Regulierung der Immunzellen unter physiologischen Bedingungen wie auch im Rahmen einer Inflammation. Wie der aktuelle Forschungsstand zeigt, hat G-CSF sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Wirkung. In den unterschiedlichen Krankheitsbildern zeigt es eine individuelle Wirkung. Die Idee, dieses Zytokin als Zielstruktur für verschiedene Erkrankungen mit Inflammationsbeteiligung einzusetzen, wird bereits seit einigen Jahren verfolgt, jedoch konnte aufgrund seiner ambivalenten Wirkung auf die Immunzellen noch keine gezielte Anwendung gefunden werden.

Auch zeigte eine präliminäre Untersuchung an einer kleinen Tiergruppe im Rahmen dieser Arbeit, dass die Inhibition des Zytokins während der CED in *ApoE^{-/-}* Mäusen nachteilige Effekte hatte. Die Tiere, welche den anti-G-CSF Antikörper erhalten hatten, zeigten eine so starke intestinale Inflammation, dass die Überlebensrate der behandelten Tiere bei 0 % lag (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der immunstimulierenden Wirkung könnte die Induktion des Zytokins hier zwar einen positiven Effekt auf die Kolitis haben, aber nachteilig auf die Entwicklung der Atherosklerose wirken.

4.5 Neutrophile Granulozyten als Bindeglied zwischen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und der Atherosklerose?

Die Analyse der neutrophilen Granulozyten im Zeitverlauf in der Aorta sowie der Zirkulation deuten auf eine bedeutsame Rolle dieser gegenüber den anderen Immunzellen in dem murinen Komorbiditätsmodell hin. Auch die gesteigerte Plasma-Konzentration des Zytokins G-CSF stellt ein weiteres Indiz der Beteiligung der neutrophilen Granulozyten dar. Diese Annahme wird durch die Analyse der Knochenmarkszellen bekräftigt. Zum Zeitpunkt der akuten Inflammation, nach der dritten DSS-Applikation, war sowohl die Hämatopoese als auch die Myelopoese in den DSS-behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 22). Zum selben Zeitpunkt war die Anzahl der reifen neutrophilen Granulozyten im Knochenmark

unverändert (Abb. 21). Die Betrachtung derselben Zellen im Knochenmark einen Zyklus zuvor zeigte jedoch einen anderen Status. Zwar ist auch hier die Hämatopoese in den Kolitis-Mäusen signifikant gesteigert, jedoch konnte keine Veränderung bei den myeloiden Vorläuferzellen detektiert werden. Die reifen neutrophilen Granulozyten waren zu diesem Zeitpunkt in den DSS-Tieren sogar signifikant reduziert. Dieser Umstand lässt annehmen, dass die neutrophilen Granulozyten in diesem Zusammenhang als Erste aus dem Knochenmark rekrutiert werden, da die Monozyten in beiden Gruppen unverändert sind. Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass zwischen dem zweiten und dritten Kolitis-Zyklus eine Veränderung der Zusammensetzung der Zellen des Knochenmarks stattfand.

Es liegt nahe, dass durch die rezidivierende Inflammation und der damit verbundenen Stimulation der Hämatopoese durch das G-CSF eine Veränderung im Knochenmark stattfindet. Dies könnte als physiologischer Schutzmechanismus auf die folgende Entzündungsphase gesehen werden, um schneller eine Immunantwort induzieren zu können und damit der Einwanderung der Bakterien durch die Epithelschädigung der Darmmukosa entgegenzuwirken.

Dass die Anzahl der reifen neutrophilen Granulozyten im Knochenmark zum Zeitpunkt von 13 Wochen unverändert ist, wohingegen sie einen Zyklus früher noch deutlich unter den Kontrolltieren lag, ist ebenfalls ein Indiz der Anpassung der Entzündungsreaktion durch die DSS-Behandlung. Aufgrund der erhöhten Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten ergibt sich die Vermutung, dass der Bedarf an neutrophilen Granulozyten durch die stärkere intestinale Inflammation gestiegen ist und somit nicht nur Vorläuferzellen, sondern auch bereits reife neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden [204]. Die Monozytenzahl ist zum Zeitpunkt von 10 Wochen unverändert, aber zum Zeitpunkt von 13 Wochen ist sie signifikant erhöht. Dies könnte bedeuten, dass der Bedarf an Monozyten erst nach der dritten DSS-Applikation steigt und die neutrophilen Granulozyten primär rekrutiert werden.

Der Mechanismus der Retention und Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut ist bereits gut untersucht. Für die Retention der neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen im Knochenmark ist die *CXC-motiv-chemokine-receptor 4 (CXCR4) / stromal cell-derived factor (SDF-1 α)*-Achse verantwortlich [205]. Wird während der Inflammation G-CSF gebildet, inhibiert es den CXCR4, der von reifen neutrophilen Granulozyten und den Vorläuferzellen exprimiert wird. Durch die CXCR4 Inhibition wird gleichzeitig das stromale SDF-1 α reduziert. Dieser Mechanismus führt

schließlich zur Hemmung der Retention der Zellen und damit zu deren Mobilisierung [206]. Somit hat G-CSF nur einen indirekten Einfluss auf die Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation [207]. Die CXCR4 / SDF-1 α -Achse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Die Annahme, dass dieser Mechanismus zur vermehrten Mobilisation der neutrophilen Granulozyten führt, basiert auf der Messung der erhöhten G-CSF Konzentration im Blut sowie der erhöhten Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Zirkulation und dem fehlenden Anstieg in der Anzahl reifer neutrophiler Granulozyten im Knochenmark trotz erhöhter Hämato- und Myelopoese.

Doch nicht nur die Quantität der neutrophilen Granulozyten scheint sich während der chronischen Entzündung zu verändern. Die detaillierte Analyse der mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen der Knochenmarksneutrophilen zeigte eine erhöhte mRNA Expression des *P*- und *E*-*Selektin-Liganden*. Beide Liganden spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration der neutrophilen Granulozyten im Prozess der Atherogenese [52, 69, 70]. Die erhöhte Expression spricht dafür, dass die neutrophilen Granulozyten während der rezidivierenden chronischen intestinalen Inflammationen eine Art Voraktivierungsprozess durchlaufen haben und daher nach der Mobilisierung in die Zirkulation schneller an die aktivierte Gefäßwand adhäreren oder sogar schneller das Endothel aktivieren könnten. Auch die signifikant erhöhte mRNA-Expression des G-CSF Rezeptors der Knochenmarksneutrophilen verstärkt die Annahme der Voraktivierung der neutrophilen Granulozyten durch die chronische Entzündung. Durch die erhöhte mRNA-Expression des Rezeptors könnten die neutrophilen Granulozyten und ihre Vorläufer schneller auf die G-CSF Stimulation ansprechen und dadurch schneller aus dem Knochenmark mobilisiert werden [208].

Auch im Rahmen der RA wurde bereits dargelegt, dass neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Erkrankung spielen. Antikörperbasierte Inhibition der Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin in einem Ratten-RA-Modell zeigte eine Reduktion des Influx der neutrophilen Granulozyten in das Gelenk. Auch die Analysen humaner neutrophiler Granulozyten von RA-Patienten zeigten eine erhöhte Expression einiger Adhäsionsmoleküle [209-211].

Die Untersuchung der Aorta zum Zeitpunkt von 13 Wochen unterstützt die Annahme, dass die Rekrutierung, Adhäsion und Migration der neutrophilen Granulozyten zum Inflammationsgeschehen Schlüsselereignisse darstellen könnten. Die mRNA-Expressionsanalyse der gesamten Aorta der Kolitis-Tiere ergab einen starken Trend zu erhöhter Expression der *E-Selektin* mRNA. E-Selektin ist ein Adhäsionsmarker,

der sowohl den P- als auch den E-Selektin Liganden bindet [32, 33]. In Verbindung mit der erhöhten Expression der Liganden auf den Knochenmarksneutrophilen wird vermutlich die Migration der neutrophilen Granulozyten begünstigt und die Atherogenese beschleunigt. Auch die erhöhte Expression der mRNA verschiedener Zytokine wie CCL3 und CCL5 in der Aorta der Kolitis-Tiere, die eine wichtige Rolle in der Rekrutierung und Migration der neutrophilen Granulozyten spielen, bestärkt die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten in diesem Zusammenhang [212]. Dass CCL3 und CCL5 in der kardiovaskulären Erkrankung essenziell sind, zeigen Untersuchungen von Patienten mit akutem Koronarsyndrom. Diese haben ergeben, dass CCL3 und CCL5 als prädiktive Marker für ein kardiovaskuläres Ereignis eingesetzt werden können [213, 214].

Sowohl die Untersuchung der Knochenmarksneutrophilen als auch der Aorta basieren auf der Analyse der mRNA-Expression. Da Veränderungen auf transkriptioneller Ebene nicht immer einen Einfluss auf Proteine haben, muss ebenfalls eine Analyse auf Proteinebene erfolgen, um die Ergebnisse zu bekräftigen. Auch war die Anzahl der untersuchten Tiere in diesem Fall gering, daher müssen die Daten mittels weiterer Analysen bestätigt werden. Diese wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, sollten aber im weiteren Verlauf der Untersuchungen noch angeschlossen werden. Die erfolgten mRNA-Untersuchungen liefern für die aufgestellte Hypothese bereits gute Indizien und stützen sie in Kombination mit den übrigen Ergebnissen schlüssig.

Der Nachweis der kausalen Rolle der neutrophilen Granulozyten für die gesteigerte Atherosklerose erfolgte über ein funktionales Wiederherstellungsexperiment (*rescue*-Experiment). Dabei wurde während der Induktion der Kolitis zu jedem Zyklus ein Ly6G-depletierender Antikörper verabreicht. Die Kontrollen erhielten parallel einen nicht-depletierenden Isotyp Antikörper. Da von Zyklus zu Zyklus die Inflammation und die Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten stärker wurden, musste die Konzentration des Antikörpers entsprechend angepasst werden, um ein konstantes Niveau der Depletion der neutrophilen Granulozyten zu erreichen. Da im Rahmen der Kolitis neutrophilen Granulozyten benötigt werden, um Bakterien zu eliminieren und um die Inflammation einzudämmen, durfte keine vollständige Depletion der neutrophilen Granulozyten erfolgen. Daher ist im Verlauf der chronischen Kolitis dennoch ein leichter Anstieg der neutrophilen Granulozyten sichtbar.

Die Blockierung des Ly6G Epitops führt zur Inhibierung der Funktion der neutrophilen Granulozyten. Durch das blockierte Epitop ist die β 2-Integrin-Expression der neutrophilen Granulozyten inhibiert, wodurch sie nicht mehr in der Lage sind an das Endothel zu adhären [149]. Die funktionsunfähigen neutrophilen Granulozyten kehren

zurück zum Knochenmark, wo sie von residenten Makrophagen abgebaut werden [215]. Dies erklärt die Detektion der neutrophilen Granulozyten selbst nach der Antikörper-Administration, allerdings sind diese nicht mehr funktionsfähig.

Durch die Depletion der neutrophilen Granulozyten in den DSS-behandelten Tieren konnte die Plaque-Belastung in der Aorta nach fünf Zyklen bei vergleichbarer Ausprägung der Kolitis (Abb. 27 und 28) fast um die Hälfte reduziert werden (Abb. 30 A). Somit erhärten die erhobenen Daten die Hypothese, dass die neutrophilen Granulozyten ein entscheidendes Bindeglied sein könnten, im Rahmen einer CED die Entwicklung der Atherosklerose begünstigen und dadurch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen.

Zusammenfassend führen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu der Hypothese, dass durch die repetitive chemisch-induzierte intestinale Inflammation das Zytokin G-CSF freigesetzt wird und dieses die Hämato- und Myelopoese im Knochenmark induziert. Die rezidivierende Inflammation und die damit verbundene Freisetzung des G-CSF löst eine Anpassung und auch Voraktivierung der neutrophilen Granulozyten aus. Diese Voraktivierung der Knochenmarksneutrophilen ist durch eine erhöhte mRNA-Expression des *Gcsf-Rezeptors* und der Adhäsionsmoleküle wie *Psg1* kennzeichnet. Die so veränderten neutrophilen Granulozyten werden schneller in die Zirkulation mobilisiert und adhären schneller und effektiver an das aktivierte Endothel der Gefäßwand. Dort migrieren sie in die Gefäßwand, rekrutieren weitere Immunzellen wie die Monozyten und fördern dadurch die Entwicklung der Atherosklerose (Abb. 31). Durch den chronischen Verlauf der Entzündung wird der Stimulus bei jeder akuten Phase erneut freigesetzt. Die Besonderheit liegt demnach nicht nur in der Quantität der freigesetzten neutrophilen Granulozyten, sondern auch in deren Anpassung an den wiederkehrenden Stimulus durch die Inflammation. Somit beeinflussen die neutrophilen Granulozyten nicht nur die Atherogenese und -progression, sondern haben auch einen Einfluss auf die Plaque-Zusammensetzung und hierdurch eventuell auch auf die Stabilität der Plaques.

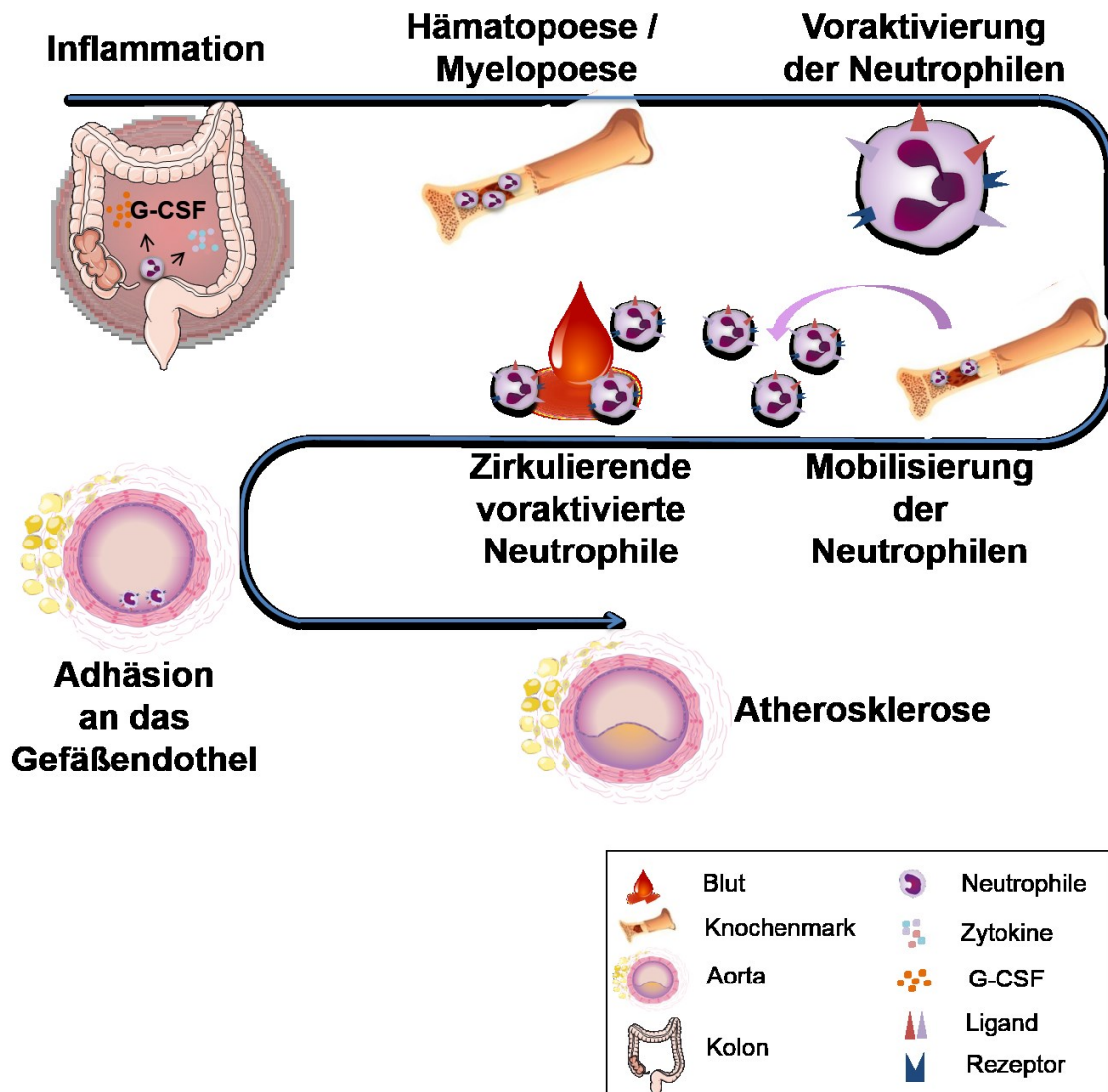


Abb. 31 Schematische Darstellung des möglichen Einflusses der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose.

Durch die chemisch-induzierte intestinale Inflammation wird G-CSF freigesetzt, was zur verstärkten Hämatopoese und Myelopoese führt. Der wiederkehrende Stimulus bewirkt eine Voraktivierung der neutrophilen Granulozyten. Diese werden schneller in die Zirkulation mobilisiert. Dort adhären sie schneller an das Gefäßendothel, migrieren durch die Intima und rekrutieren weitere Immunzellen und initiieren so die Atherogenese.

4.6 Limitierung und Ausblick

Die Untersuchung des Einflusses der CED auf die Atherosklerose an einem murinen Komorbiditätsmodell ergab eine verstärkte Plaque-Belastung in den Mäusen mit chronischer Kolitis. Die durchgeführten Analysen lassen vermuten, dass neben der Quantität der neutrophilen Granulozyten auch die Qualität dieser Zellen entscheidend für die verstärkte Atherosklerose ist.

Dabei muss beachtet werden, dass die Ergebnisse an einem murinen Modell erhoben wurden. Während die Ursache der CED in Patienten ein multifaktorieller Prozess ist, der bis heute nicht genau geklärt ist, kommt es im murinen Modell der chemisch-induzierten Kolitis primär zu einer massiven Schädigung der Epithelschicht [136, 138]. Weiterhin zählen die verwendeten *ApoE^{-/-}* Mäuse zwar zu dem gängigsten Modell zur Untersuchung der Atherosklerose, jedoch unterscheidet sich die Pathogenese deutlich von der humanen Atherosklerose. Neben den Unterschieden in den zirkulierenden Lipiden verläuft auch die Plaque-Entwicklung anders. Während die frühen humanen Plaques von Beginn an reich an glatten Muskelzellen sind, migrieren diese im murinen Modell erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Läsion [216]. Auch die Plaque-Lokalisationen variieren zwischen murinen und humanen atherosklerotischen Veränderungen [216]. Während sich im murinen Modell die ersten Plaques an Stellen mit starker Blutverwirbelung wie dem Aortenursprung oder dem Aortenbogen entwickeln, entstehen die humanen Plaques bevorzugt in kleineren koronaren Gefäßen [217]. Auch die Übertragung der Ergebnisse bezüglich der Plaque-Stabilität vom murinen Modell auf die humanen Gegebenheiten stellt eine Schwierigkeit dar, denn eine Plaque-Ruptur erfolgt im Mausmodell selten [161]. Obwohl die Strukturen des Immunsystems zwischen Mäusen und Menschen ähnlich sind, weisen auch diese einige Unterschiede auf. Bei Betrachtung des lymphatischen Systems zeigen sich die ersten deutlichen Variationen. Zum einen ist die Anzahl der Lymphknoten in Mäusen hoch, zum anderen verfügen Mäuse über ein wenig verzweigtes und einfaches Lymphgefäßsystem [218]. Die Funktion der murinen Milz weist bis in das hohe Alter eine hämatopoetische Funktion auf, die humane Milz dagegen nur bis zur Geburt [219, 220]. Einen weiteren gravierenden Unterschied stellt das Gleichgewicht zwischen der Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten dar. In humanem Blut ist das Gleichgewicht in Richtung der neutrophilen Granulozyten verschoben, Mäuse weisen jedoch eine größere Anzahl an Lymphozyten in der Zirkulation auf [221, 222]. Weiterhin exprimieren humane Makrophagen den CD4 Oberflächenmarker, während dieser im murinen System ausschließlich auf T-Lymphozyten exprimiert wird [223].

Trotz der oben genannten Limitationen ermöglichen die murinen Modelle der Atherosklerose bzw. der chronischen Kolitis die Untersuchung komplexer Zusammenhänge, welche in *in vitro* Studien nicht zu erfassen wären. Somit bleiben die Tiermodelle weiterhin unentbehrlich, auch wenn eine direkte Übertragung vom Tier auf den Menschen sicher nicht immer vollumfänglich gegeben ist.

Die neutrophilen Granulozyten stellen in diesem Komorbiditätsmodell ein zentrales Bindeglied zwischen den zwei Erkrankungen dar. Jedoch bedarf die Untersuchung der Qualität der neutrophilen Granulozyten genauerer Analysen. Neben Funktionsanalysen der Adhäsionsmoleküle auf Proteinebene muss zum einen geklärt werden, ob die neutrophilen Granulozyten auch verstärkt proinflammatorische Eigenschaften aufweisen und beispielsweise vermehrt neutrophile extrazelluläre Fallen (*Neutrophil Extracellular Traps* -NETs) ausbilden. Zum anderen sollten Subgruppen der neutrophilen Granulozyten analysiert werden, um den Effekt einer bestimmten Population zuschreiben zu können.

Eine genaue Analyse der neutrophilen Granulozyten ist dringend erforderlich, um eine Zielstruktur zu ermitteln und einen möglichen klinischen Ansatzpunkt zu finden, denn die neutrophilen Granulozyten eignen sich durch ihre wichtige Funktion in der Bekämpfung der frühen Entzündungsreaktion nicht als therapeutisches Ziel. Im Falle der rheumatoiden Arthritis wurde durch die Gabe eines niedrig dosierten Kortisons versucht, die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten zu inhibieren und so die Inflammation zu reduzieren [224]. Im Falle der Atherogenese würde diese Therapie vermutlich den gewünschten Effekt erzielen, jedoch gehört die Korticoïdtherapie bereits zur Standardtherapie der CED. Nichtsdestotrotz zeigt sich eine erhöhte Prävalenz für kardiovaskuläre Ereignisse, unabhängig von der gewählten Therapieform.

Somit haben die neutrophilen Granulozyten im Inflammationsgeschehen eine ambivalente Rolle, wie bereits im Zusammenhang mit dem Myokardinfarkt gezeigt. Sie werden benötigt, um die Inflammation einzudämmen, indem sie Zelldebris und apoptotische Zellen beseitigen und Zytokine ausschütten, welche die Differenzierung von Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp induzieren. Weiterhin können sie aber auch das Entzündungsgeschehen verstärken, indem sie ROS oder Proteasen sezernieren, die zur weiteren Gewebeschädigung beitragen [225]. Daher wird ein hoher Anspruch an die Neutrophilen-gerichtete Therapie gestellt: Es gilt eine ausgewogene Balance zu finden, um die neutrophilen Granulozyten zu kontrollieren, da eine pauschale Therapie mit neutrophilen Granulozyten als Zielstruktur schwer einzuschätzen wäre. Das Ziel muss somit sein, eine Therapie zu entwickeln, welche die individuellen

Veränderungen der neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang der CED berücksichtigt.

5 Zusammenfassung

Die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) ist eine weit verbreitete Erkrankung mit steigender Prävalenz. Die Erkrankung zeichnet sich durch eine rezidivierende chronische Inflammation des Magen-Darmtraktes aus. Zudem stellt die CED ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) dar. Der KHK liegt häufig eine Atherosklerose zugrunde, die durch die progrediente Entwicklung von Läsionen in der Gefäßwand charakterisiert ist. Die Erosion oder Ruptur dieser Läsionen verursacht Stenosen, die - je nach Lokalisation - einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt herbeiführen können. Es wurde gezeigt, dass CED Patienten vor allem in der aktiven Inflammationsphase ein erhöhtes Risiko für eine KHK aufweisen, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bis heute nicht im Einzelnen geklärt. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist daher die Aufklärung der Pathomechanismen von großer Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit ein murines Komorbiditätsmodell etabliert, um so die Entwicklung und Progression der Atherosklerose in *Apolipoprotein E (ApoE)*-defiziente Mäusen mit einer begleitenden Dextrantriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis zu untersuchen. Nach fünf Entzündungszyklen wurde zunächst die chronische intestinale Inflammation anhand der reduzierten Gewichtszunahme und des Verlustes der Kryptenarchitektur des Kolons in den Kolitis-Tieren verifiziert. Die Analyse der Progression der Atherosklerose in den Tieren wies sowohl einen gesteigerten aortalen Plaque-Besatz, als auch ein erhöhtes Plaque-Volumen in der *A. brachiocephalica* auf. Um die zugrundeliegenden Mechanismen der verstärkten Atherogenese zu identifizieren, wurden nachfolgend frühere Zeitpunkte im Krankheitsverlauf der CED untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die repetitive intestinale Inflammation *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) freigesetzt wird, wodurch es zu einer gesteigerten Hämatopoese und Myeloopoese sowie einer Voraktivierung der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark kommt. Letztere zeichnet sich durch eine erhöhte mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen aus. Auch in der Zirkulation und der aortalen Gefäßwand konnten mehr neutrophile Granulozyten detektiert werden, so dass zu vermuten ist, dass es zu einer gesteigerten Freisetzung der voraktivierten Zellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation mit nachfolgender Adhäsion an das Gefäßendothel und Einwanderung in die Gefäßwand kommt. Durch eine Antikörper-medierte Depletion der neutrophilen Granulozyten konnte schließlich ihr bedeutsamer atherogener Stellenwert im Kontext der CED gezeigt werden: die spezifische Depletion neutrophiler Granulozyten innerhalb der aktiven Phase der intestinalen Inflammation halbierte den aortalen Plaque-Besatz der behandelten Tiere im Vergleich zu nicht-behandelten Tieren mit Kolitis.

Zusammenfassend konnte die Arbeit die quantitativen und qualitativen Veränderungen neutrophiler Granulozyten hin zu einem adhäsiveren Phänotyp als einen bedeutsamen Faktor der verstärkten Atherogenese und –progression in Mäusen mit chronischer Kolitis identifizieren.

6 Summary

Chronic inflammatory bowel disease (IBD) is a widespread disease with increasing prevalence. The disease is characterized by relapsing chronic inflammation of the gastrointestinal tract. In addition, IBD represents an increased risk for the development of cardiovascular diseases such as coronary heart disease (CHD). Coronary artery disease is often caused by atherosclerosis, which is characterized by the progressive development of lesions in the vascular wall. The erosion or rupture of these lesions causes stenoses which, depending on their location, can lead to stroke or myocardial infarction. It has been shown that IBD patients have an increased risk of coronary heart disease, especially in the active phase of inflammation, but the underlying mechanisms have not yet been clarified. Therefore, the elucidation of pathomechanisms is of great importance for the development of new therapeutic approaches. For this purpose, a murine comorbidity model was established in the present work to investigate the development and progression of atherosclerosis in *apolipoprotein E (ApoE)*-deficient mice with accompanying dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. After five inflammatory cycles, chronic intestinal inflammation was first verified by reduced weight gain and loss of colonic cryptarchitecture in colitis animals. The analysis of the progression of atherosclerosis in the animals showed an increased aortic plaque population as well as an increased plaque volume in the brachiocephalica. In order to identify the underlying mechanisms of enhanced atherogenesis, earlier time points in the progress of IBD were investigated. It was shown that repetitive intestinal inflammation releases granulocyte colony-stimulating factor G-CSF, resulting in increased hematopoiesis and myelopoiesis as well as pre-activation of neutrophil granulocytes in the bone marrow. The activation is characterized by increased mRNA expression of adhesion molecules. Also, more neutrophil granulocytes could be detected in the circulation and the aortic vessel wall, so that it can be assumed that there is an increased release of the pre-activated cells from the bone marrow into the circulation with subsequent adhesion to the vessel endothelium and immigration into the vessel wall. The specific depletion of neutrophil granulocytes during the active phase of intestinal inflammation halved the aortic plaque population of the treated animals compared to untreated animals with colitis. In summary, the study identified the quantitative and qualitative changes of neutrophil granulocytes towards a more adhesive phenotype as a significant factor of increased atherogenesis and progression in mice with chronic colitis.

Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H. *NONCOMMUNICABLE DISEASES COUNTRY PROFILES 2018*. 2018 [cited 2019 16.08.2019]; Available from: <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>.
2. Sanchis-Gomar, F., et al., *Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome*. *Ann Transl Med*, 2016. **4**(13): p. 256.
3. 25865626Viola, J. and O. Soehnlein, *Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(3): p. 184-93.
4. Quillard, T., et al., *Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques*. *Curr Opin Lipidol*, 2017. **28**(5): p. 434-441.
5. Farb, A., et al., *Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death*. *Circulation*, 1996. **93**(7): p. 1354-63.
6. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
7. Arbustini, E., et al., *Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction*. *Heart*, 1999. **82**(3): p. 269-72.
8. Lara-Guzman, O.J., et al., *Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages*. *Redox Biol*, 2018. **15**: p. 1-11.
9. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 204-12.
10. 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.
11. Park, Y.M., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(1): p. 136-45.
12. Moos, M.P., et al., *The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2386-91.
13. Koenig, W. and N. Khuseyinova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(1): p. 15-26.
14. Stenmark, K.R., et al., *The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function*. *Annu Rev Physiol*, 2013. **75**: p. 23-47.
15. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. *J Physiol*, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
16. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1976. **295**(7): p. 369-77.

17. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
18. Sitia, S., et al., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(12): p. 830-4.
19. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
20. Kinlay, S., P. Libby, and P. Ganz, *Endothelial function and coronary artery disease*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(4): p. 383-9.
21. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
22. Slowik, M.R., et al., *Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1724-30.
23. Drexler, H., *Endothelial dysfunction: clinical implications*. Prog Cardiovasc Dis, 1997. **39**(4): p. 287-324.
24. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
25. Brand, K., et al., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1715-22.
26. Wang, Y., et al., *NF-kB activity-dependent P-selectin involved in ox-LDL-induced foam cell formation in U937 cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **411**(3): p. 543-8.
27. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
28. Lorant, D.E., et al., *Inflammatory roles of P-selectin*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 559-70.
29. Yu, G., et al., *Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3545-51.
30. Rosen, S.D. and C.R. Bertozzi, *The selectins and their ligands*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 663-73.
31. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
32. Katayama, Y., et al., *CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1183-9.
33. Steegmaier, M., et al., *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor*. Nature, 1995. **373**(6515): p. 615-20.

34. Ma, Y.Q., E.F. Plow, and J.G. Geng, *P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2549-56.
35. Sakai, A., et al., *P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(2): p. 310-6.
36. McLaughlin, F., et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium*. *Cell Adhes Commun*, 1998. **6**(5): p. 381-400.
37. Hwang, S.T., et al., *GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **184**(4): p. 1343-8.
38. Xie, J., et al., *Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain*. *J Immunol*, 1995. **155**(7): p. 3619-28.
39. Kurzinger, K., et al., *A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure*. *J Immunol*, 1981. **127**(2): p. 596-602.
40. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. *Cell Tissue Res*, 2010. **339**(1): p. 269-80.
41. Scalia, R., J.Z. Appel, 3rd, and A.M. Lefer, *Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(7): p. 1093-100.
42. Clinton, S.K., et al., *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(2): p. 301-16.
43. Smith, J.D., et al., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(18): p. 8264-8.
44. 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.
45. Rajamaki, K., et al., *Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation*. *PLoS One*, 2010. **5**(7): p. e11765.
46. Jiang, Y., et al., *Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1beta by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **425**(2): p. 121-6.
47. van Tits, L.J., et al., *Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2*. *Atherosclerosis*, 2011. **214**(2): p. 345-9.

48. Manning-Tobin, J.J., et al., *Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 19-26.
49. Chistiakov, D.A., Y.V. Bobryshev, and A.N. Orekhov, *Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis.* *J Cell Mol Med*, 2016. **20**(1): p. 17-28.
50. Kennedy, M.A., et al., *ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation.* *Cell Metab*, 2005. **1**(2): p. 121-31.
51. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, *Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(7): p. 1506-16.
52. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis.* *Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
53. Silvestre-Roig, C., et al., *Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death.* *Nature*, 2019. **569**(7755): p. 236-240.
54. Zerneck, A., et al., *Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis.* *Circ Res*, 2008. **102**(2): p. 209-17.
55. Soehnlein, O., *Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis.* *Circ Res*, 2012. **110**(6): p. 875-88.
56. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils.* *Blood*, 1994. **83**(6): p. 1640-9.
57. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils.* *J Immunol*, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
58. Delclaux, C., et al., *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(3): p. 288-95.
59. Mollinedo, F., et al., *Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils.* *Biochem J*, 1997. **327** (Pt 3): p. 917-23.
60. Zen, K., et al., *Cleavage of the CD11b extracellular domain by the leukocyte serprocidins is critical for neutrophil detachment during chemotaxis.* *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4885-94.
61. Chertov, O., et al., *Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils.* *J Exp Med*, 1997. **186**(5): p. 739-47.
62. Territo, M.C., et al., *Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils.* *J Clin Invest*, 1989. **84**(6): p. 2017-20.
63. Soehnlein, O., C. Weber, and L. Lindbom, *Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function.* *Trends Immunol*, 2009. **30**(11): p. 538-46.

64. Thorp, E.B., *Contrasting Inflammation Resolution during Atherosclerosis and Post Myocardial Infarction at the Level of Monocyte/Macrophage Phagocytic Clearance*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 39.
65. Miles, K., et al., *Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2122-32.
66. An, Z., et al., *Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF-kappaB signaling in macrophages*. Cell Cycle, 2019: p. 1-11.
67. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
68. Pilszczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
69. Pan, Z.Z., et al., *Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(4): p. L658-66.
70. Houard, X., et al., *Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 532-41.
71. van Oostrom, A.J., et al., *Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction*. J Lipid Res, 2003. **44**(3): p. 576-83.
72. Jacobi, J., et al., *Priming of polymorphonuclear leukocytes: a culprit in the initiation of endothelial cell injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H2051-8.
73. Araujo, F.B., et al., *Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia*. Atherosclerosis, 1995. **117**(1): p. 61-71.
74. Zhang, R., et al., *Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1802-10.
75. Rotzius, P., et al., *Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 493-500.
76. Ionita, M.G., et al., *High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(9): p. 1842-8.
77. Guasti, L., et al., *Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A systematic review on more than 34,000 subjects*. Thromb Haemost, 2011. **106**(4): p. 591-9.
78. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 799-810.

79. Angeli, V., et al., *Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 561-74.
80. Liu, A. and J. Frostegard, *PCSK9 plays a novel immunological role in oxidized LDL-induced dendritic cell maturation and activation of T cells from human blood and atherosclerotic plaque*. *J Intern Med*, 2018.
81. Zhou, X., et al., *Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2005. **96**(4): p. 427-34.
82. Roselaar, S.E., P.X. Kakkanathu, and A. Daugherty, *Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE -/- and LDL receptor -/- mice. Decreasing density with disease progression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(8): p. 1013-8.
83. Uyemura, K., et al., *Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(9): p. 2130-8.
84. Fatkhullina, A.R., I.O. Peshkova, and E.K. Koltsova, *The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis*. *Biochemistry (Mosc)*, 2016. **81**(11): p. 1358-1370.
85. Horkko, S., et al., *Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(1): p. 117-28.
86. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice*. *J Exp Med*, 2010. **207**(8): p. 1579-87.
87. Ng, S.C., et al., *Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies*. *Lancet*, 2018. **390**(10114): p. 2769-2778.
88. Sonnenberg, A., *Age distribution of IBD hospitalization*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(3): p. 452-7.
89. Rogers, B.H., L.M. Clark, and J.B. Kirsner, *The epidemiologic and demographic characteristics of inflammatory bowel disease: an analysis of a computerized file of 1400 patients*. *J Chronic Dis*, 1971. **24**(12): p. 743-73.
90. Michener, W.M., R.G. Farmer, and E.A. Mortimer, *Long-term prognosis of ulcerative colitis with onset in childhood or adolescence*. *J Clin Gastroenterol*, 1979. **1**(4): p. 301-5.
91. Farmer, R.G., W.A. Hawk, and R.B. Turnbull, Jr., *Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases*. *Gastroenterology*, 1975. **68**(4 Pt 1): p. 627-35.
92. Lennard-Jones, J.E., et al., *Assessment of severity in colitis: a preliminary study*. *Gut*, 1975. **16**(8): p. 579-84.
93. da Silva, B.C., et al., *Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(28): p. 9458-67.
94. Lichtenstein, G.R., et al., *Management of Crohn's disease in adults*. *Am J Gastroenterol*, 2009. **104**(2): p. 465-83; quiz 464, 484.

95. Jahnsen, J., et al., *Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(7): p. 1556-62.
96. Gillen, C.D., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis*. Gut, 1994. **35**(11): p. 1590-2.
97. Bahler, C., et al., *Chronic comorbidities associated with inflammatory bowel disease: prevalence and impact on healthcare costs in Switzerland*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2017. **29**(8): p. 916-925.
98. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
99. Gent, A.E., et al., *Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy*. Lancet, 1994. **343**(8900): p. 766-7.
100. Halfvarson, J., et al., *Dynamics of the human gut microbiome in inflammatory bowel disease*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17004.
101. Kuwahara, E., et al., *Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients*. J Gastroenterol, 2012. **47**(9): p. 961-8.
102. Sohrabpour, A.A., R. Malekzadeh, and A. Keshavarzian, *Current therapeutic approaches in inflammatory bowel disease*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(33): p. 3668-83.
103. Lamb, C.A., et al., *British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults*. Gut, 2019.
104. Feagan, B.G. and J.K. Macdonald, *Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **10**: p. CD000543.
105. Su, M., et al., *Assessment of the inhalation risks associated with working in printing rooms: a study on the staff of eight printing rooms in Beijing, China*. Environ Sci Pollut Res Int, 2018. **25**(17): p. 17137-17143.
106. Wu, X.W., H.Z. Ji, and F.Y. Wang, *Meta-analysis of ciprofloxacin in treatment of Crohn's disease*. Biomed Rep, 2015. **3**(1): p. 70-74.
107. D'Haens, G., et al., *Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1323-9.
108. Hanauer, S.B., et al., *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1541-9.
109. Rutgeerts, P., et al., *Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2462-76.
110. Hahn, L., et al., *Vedolizumab: An integrin-receptor antagonist for treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Am J Health Syst Pharm, 2015. **72**(15): p. 1271-8.

111. Osterman, M.T., et al., *Mucosal Biomarker of Innate Immune Activation Predicts Response to Vedolizumab in Crohn's Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2019.
112. Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho, *Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(1): p. 79-94.
113. Feinstein, A.R., *The Pre-Therapeutic Classification of Co-Morbidity in Chronic Disease*. *J Chronic Dis*, 1970. **23**(7): p. 455-68.
114. Klabunde, C.N., et al., *Development of a comorbidity index using physician claims data*. *J Clin Epidemiol*, 2000. **53**(12): p. 1258-67.
115. Valderas, J.M., et al., *Defining comorbidity: implications for understanding health and health services*. *Ann Fam Med*, 2009. **7**(4): p. 357-63.
116. Harbord, M., et al., *The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease*. *J Crohns Colitis*, 2016. **10**(3): p. 239-54.
117. Shetty, K., et al., *The risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(6): p. 1643-9.
118. Loftus, E.V., Jr., et al., *PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis*. *Gut*, 2005. **54**(1): p. 91-6.
119. Yarur, A.J., et al., *Inflammatory bowel disease is associated with an increased incidence of cardiovascular events*. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(4): p. 741-7.
120. Singh, S., et al., *Risk of cerebrovascular accidents and ischemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014. **12**(3): p. 382-93 e1: quiz e22.
121. Kristensen, S.L., et al., *Disease activity in inflammatory bowel disease is associated with increased risk of myocardial infarction, stroke and cardiovascular death--a Danish nationwide cohort study*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56944.
122. Urowitz, M.B., et al., *The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*, 1976. **60**(2): p. 221-5.
123. Maradit-Kremers, H., et al., *Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(2): p. 402-11.
124. Papa, A., et al., *Increased carotid intima-media thickness in patients with inflammatory bowel disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(9): p. 839-46.
125. 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.
126. 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.

127. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 883-93.
128. Sanan, D.A., et al., *Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4544-9.
129. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.
130. Merat, S., et al., *Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1223-30.
131. Yin, W., et al., *Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia*. J Lipid Res, 2012. **53**(1): p. 51-65.
132. Lee, Y.T., et al., *Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances*. Lipids Health Dis, 2017. **16**(1): p. 12.
133. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
134. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
135. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
136. Cooper, H.S., et al., *Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis*. Lab Invest, 1993. **69**(2): p. 238-49.
137. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 541-6.
138. Kim, J.J., et al., *Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD*. J Vis Exp, 2012(60).
139. Breslin, W.L., et al., *Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115*. J Immunol Methods, 2013. **390**(1-2): p. 1-8.
140. Jaeger, B.N., et al., *Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 565-80.
141. Ueda, Y., M. Kondo, and G. Kelsoe, *Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow*. J Exp Med, 2005. **201**(11): p. 1771-80.

142. Fiedler, K., et al., *Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1329-39.
143. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
144. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
145. Lawlor, K.E., et al., *Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11398-403.
146. Rahman, K., et al., *Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 2904-2915.
147. Kohler, A., et al., *G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands*. Blood, 2011. **117**(16): p. 4349-57.
148. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
149. Wang, J.X., et al., *Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism*. Blood, 2012. **120**(7): p. 1489-98.
150. Christ, A., et al., *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 162-175 e14.
151. Elsherif, Y., C. Alexakis, and M. Mendall, *Determinants of Weight Loss prior to Diagnosis in Inflammatory Bowel Disease: A Retrospective Observational Study*. Gastroenterol Res Pract, 2014. **2014**: p. 762191.
152. Passos, M.A.T., F.C. Chaves, and N. Chaves-Junior, *The Importance of Colonoscopy in Inflammatory Bowel Diseases*. Arq Bras Cir Dig, 2018. **31**(2): p. e1374.
153. Braegger, C.P., et al., *Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation*. Lancet, 1992. **339**(8785): p. 89-91.
154. Breese, E.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(6): p. 1455-66.
155. Maeda, M., et al., *Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1992. **14**(3): p. 451-61.
156. Agouridis, A.P., M. Elisaf, and H.J. Milionis, *An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease*. Ann Gastroenterol, 2011. **24**(3): p. 181-187.

157. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. *Curr Protoc Immunol*, 2014. **104**: p. Unit 15 25.
158. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis*. *JAMA*, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
159. Caro, C.G., J.M. Fitz-Gerald, and R.C. Schroter, *Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man*. *Nature*, 1969. **223**(5211): p. 1159-60.
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. Schwartz, S.M., et al., *Plaque rupture in humans and mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 705-13.
162. Stone, N.J., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(25 Pt B): p. 2889-934.
163. Nilsson, J., *Atherosclerotic plaque vulnerability in the statin era*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(21): p. 1638-1644.
164. Falk, E., et al., *Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view*. *Eur Heart J*, 2013. **34**(10): p. 719-28.
165. Lee, S.E., et al., *Effects of Statins on Coronary Atherosclerotic Plaques: The PARADIGM Study*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2018. **11**(10): p. 1475-1484.
166. Franck, G., et al., *Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury: Implications for Superficial Erosion*. *Circ Res*, 2018. **123**(1): p. 33-42.
167. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 56.
168. Aday, A.W. and P.M. Ridker, *Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 62.
169. Kawakami, M., et al., *Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections*. *Blood*, 1990. **76**(10): p. 1962-4.
170. Baars, J.E., et al., *Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2012. **18**(9): p. 1634-40.
171. Lendon, C.L., et al., *Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophages density is increased*. *Atherosclerosis*, 1991. **87**(1): p. 87-90.
172. Stoneman, V., et al., *Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques*. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 884-93.
173. Tang, J., et al., *Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation*. *Sci Adv*, 2015. **1**(3).

174. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 195-205.
175. Robbins, C.S., et al., *Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1166-72.
176. Tang, J., et al., *Neutrophil and Macrophage Cell Surface Colony-Stimulating Factor 1 Shed by ADAM17 Drives Mouse Macrophage Proliferation in Acute and Chronic Inflammation*. Mol Cell Biol, 2018. **38**(17).
177. Mulder, W.J.M., et al., *Therapeutic targeting of trained immunity*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(7): p. 553-566.
178. Ifrim, D.C., et al., *Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(4): p. 534-45.
179. Bistoni, F., et al., *Immunomodulation by a low-virulence, agerminative variant of Candida albicans. Further evidence for macrophage activation as one of the effector mechanisms of nonspecific anti-infectious protection*. J Med Vet Mycol, 1988. **26**(5): p. 285-99.
180. Bistoni, F., et al., *Evidence for macrophage-mediated protection against lethal Candida albicans infection*. Infect Immun, 1986. **51**(2): p. 668-74.
181. Quintin, J., et al., *Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(2): p. 223-32.
182. Geng, S., et al., *The persistence of low-grade inflammatory monocytes contributes to aggravated atherosclerosis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13436.
183. van der Valk, F.M., et al., *Oxidized Phospholipids on Lipoprotein(a) Elicit Arterial Wall Inflammation and an Inflammatory Monocyte Response in Humans*. Circulation, 2016. **134**(8): p. 611-24.
184. Bekkering, S., et al., *Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo*. Atherosclerosis, 2016. **254**: p. 228-236.
185. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.
186. Ina, K., et al., *Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease*. J Gastroenterol Hepatol, 1999. **14**(1): p. 46-53.
187. Cheers, C., et al., *Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs*. Infect Immun, 1988. **56**(1): p. 247-51.
188. McKinstry, W.J., et al., *Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **89**(1): p. 65-71.

189. Liu, F., et al., *Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice*. *Immunity*, 1996. **5**(5): p. 491-501.
190. Richards, M.K., et al., *Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3562-8.
191. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
192. Roberts, A.W., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* *Growth Factors*, 2005. **23**(1): p. 33-41.
193. Aoki, Y., et al., *Protective effect of granulocyte colony-stimulating factor against T-cell-mediated lethal shock triggered by superantigens*. *Blood*, 1995. **86**(4): p. 1420-7.
194. Egi, H., et al., *Regulation of T helper type-1 immunity in hapten-induced colitis by host pretreatment with granulocyte colony-stimulating factor*. *Cytokine*, 2003. **23**(1-2): p. 23-30.
195. Dejaco, C., et al., *An open-label pilot study of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of severe endoscopic postoperative recurrence in Crohn's disease*. *Digestion*, 2003. **68**(2-3): p. 63-70.
196. Snowden, J.A., et al., *A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilisation in patients with severe active rheumatoid arthritis*. *Bone Marrow Transplant*, 1998. **22**(11): p. 1035-41.
197. Haghghat, A., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2007. **115**(15): p. 2049-54.
198. Sinha, S.K., et al., *Effects of G-CSF on serum cholesterol and development of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice*. *Int J Clin Exp Med*, 2014. **7**(8): p. 1979-89.
199. Katsaros, K.M., et al., *G-CSF Predicts Cardiovascular Events in Patients with Stable Coronary Artery Disease*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0142532.
200. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
201. Zohlnhofer, D., et al., *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(15): p. 1429-37.
202. Kang, H.J., et al., *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial*. *Lancet*, 2004. **363**(9411): p. 751-6.

203. Kang, H.J., et al., *Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion (MAGIC Cell) 1 trial*. Am Heart J, 2007. **153**(2): p. 237 e1-8.
204. Ma, Q., D. Jones, and T.A. Springer, *The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 463-71.
205. Martin, C., et al., *Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 583-93.
206. Gregory, A.D., et al., *Regulation of systemic and local neutrophil responses by G-CSF during pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3235-43.
207. Semerad, C.L., et al., *G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 413-23.
208. Kim, H.K., et al., *G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells*. Blood, 2006. **108**(3): p. 812-20.
209. Wipke, B.T. and P.M. Allen, *Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1601-8.
210. Schimmer, R.C., et al., *Streptococcal cell wall-induced arthritis. Requirements for neutrophils, P-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and macrophage-inflammatory protein-2*. J Immunol, 1997. **159**(8): p. 4103-8.
211. Dominical, V.M., et al., *Neutrophils of rheumatoid arthritis patients on anti-TNF-alpha therapy and in disease remission present reduced adhesive functions in association with decreased circulating neutrophil-attractant chemokine levels*. Scand J Immunol, 2011. **73**(4): p. 309-18.
212. de Jager, S.C., et al., *Leukocyte-specific CCL3 deficiency inhibits atherosclerotic lesion development by affecting neutrophil accumulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(3): p. e75-83.
213. de Jager, S.C., et al., *Chemokines CCL3/MIP1alpha, CCL5/RANTES and CCL18/PARC are independent risk predictors of short-term mortality in patients with acute coronary syndromes*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45804.
214. Doring, Y., et al., *Deficiency of the sialyltransferase St3Gal4 reduces Ccl5-mediated myeloid cell recruitment and arrest: short communication*. Circ Res, 2014. **114**(6): p. 976-81.
215. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse*. FASEB J, 2008. **22**(9): p. 3111-9.

-
216. Bentzon, J.F. and E. Falk, *Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease?* Curr Opin Lipidol, 2010. **21**(5): p. 434-40.
217. Suo, J., et al., *Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 346-51.
218. Haley, P.J., *Species differences in the structure and function of the immune system.* Toxicology, 2003. **188**(1): p. 49-71.
219. Freedman, M.H. and E.F. Saunders, *Hematopoiesis in the human spleen.* Am J Hematol, 1981. **11**(3): p. 271-5.
220. Morita, Y., et al., *Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen.* Exp Hematol, 2011. **39**(3): p. 351-359 e3.
221. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.* J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
222. Doeing, D.C., J.L. Borowicz, and E.T. Crockett, *Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods.* BMC Clin Pathol, 2003. **3**(1): p. 3.
223. Crocker, P.R., et al., *Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen.* J Exp Med, 1987. **166**(2): p. 613-8.
224. Youssef, P.P., et al., *Neutrophil trafficking into inflamed joints in patients with rheumatoid arthritis, and the effects of methylprednisolone.* Arthritis Rheum, 1996. **39**(2): p. 216-25.
225. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype.* Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.

Appendix

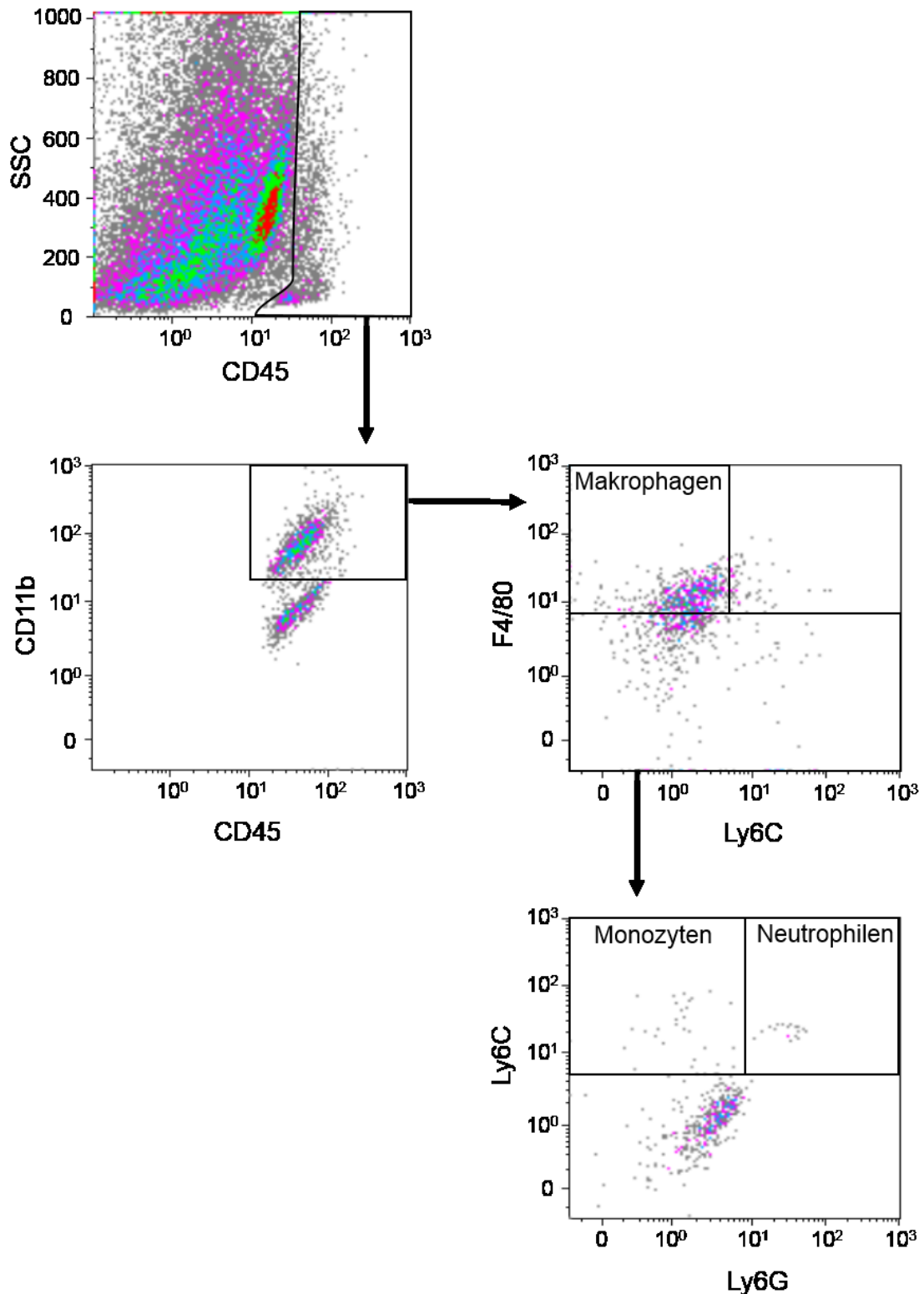


Abb. 32 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der aortalen Immunzellen.

Das Schema zeigt die Bestimmung der einzelnen Immunzellpopulationen in der Aorta nach ihren spezifischen Markern. Aus den CD45⁺CD11b⁺ Zellen wurden die F4/80⁺ Zellen abgegrenzt, die als Makrophagen bezeichnet wurden. Aus den F4/80⁻ Zellen wurden anschließend die Ly6G⁻Ly6C⁺ Monozyten und die Ly6C⁺Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten identifiziert.

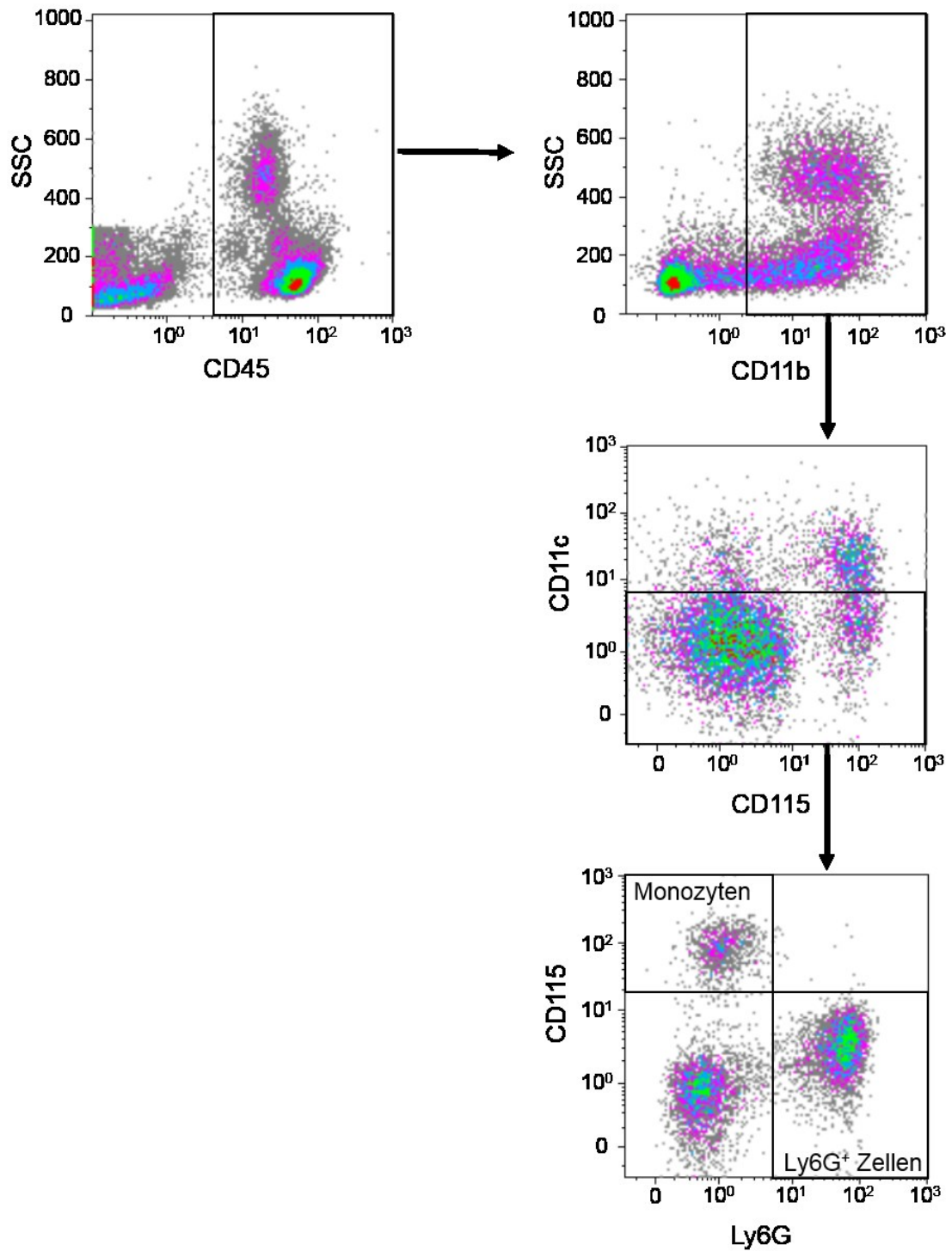


Abb. 33 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Ly6G⁺ Zellen.

Das Schema zeigt die Bestimmung der Ly6G⁺ Zellen aus dem Blut. Aus den CD45⁺CD11b⁺ Zellen wurden die CD11c⁻ Zellen abgegrenzt. Aus den CD11c⁻ Zellen wurden anschließend die Ly6G⁻ CD115⁺ Monozyten und die CD115⁻ Ly6G⁺ Zellen identifiziert.

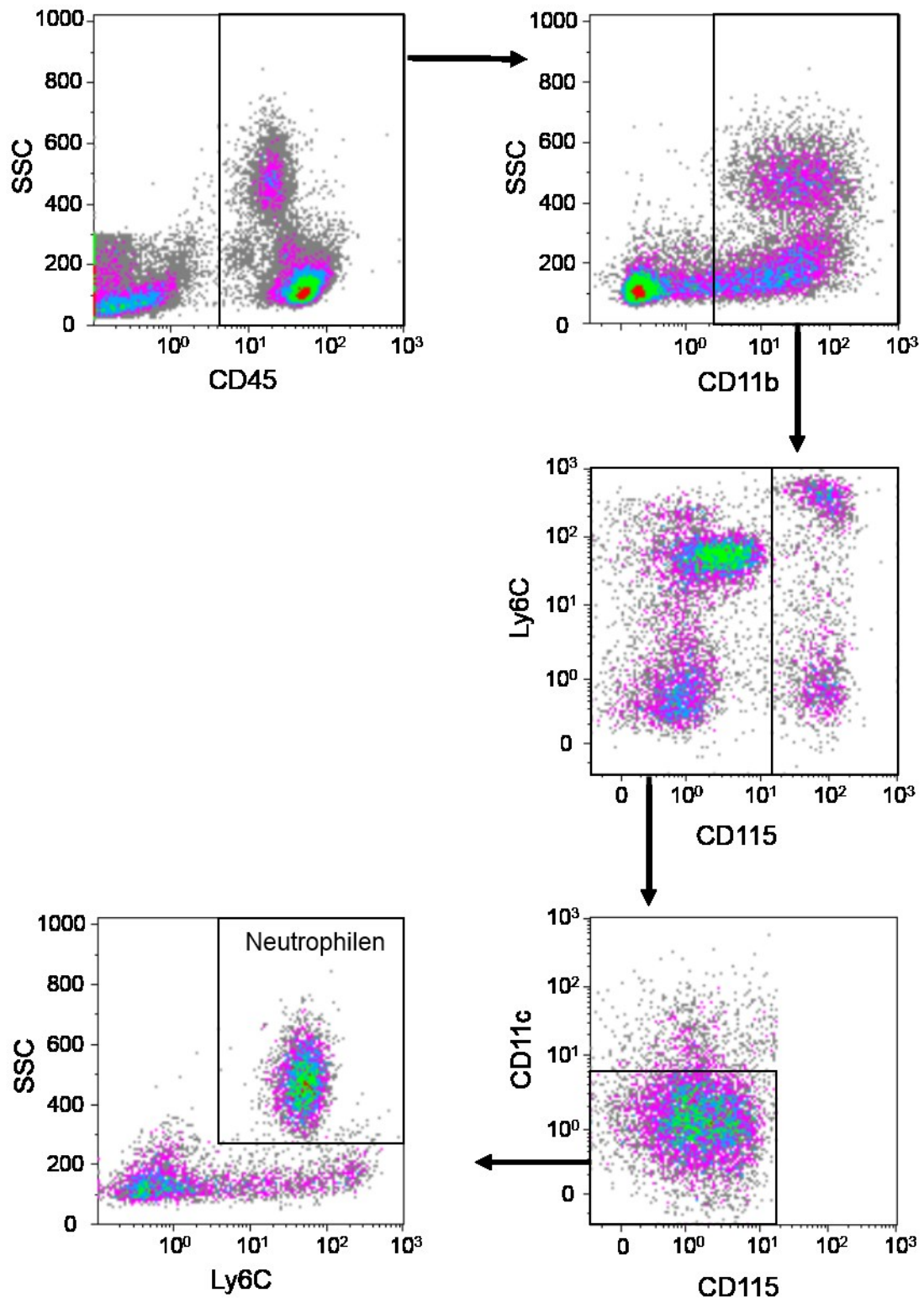


Abb. 34 Schema zur durchflusszytometrischen Untersuchung der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten.

Das Schema zeigt die Bestimmung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut ohne den Ly6G-Oberflächenmarker. Aus den CD45⁺CD11b⁺ Zellen wurden die CD115⁻ und CD11c⁻ Zellen abgegrenzt. Aus den CD115⁻ CD11c⁻ Zellen wurden anschließend die SSC^{high}Ly6C⁺ neutrophilen Granulozyten identifiziert.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue

Maria Grandoch, Ulrich Flögel, Sam Virtue, Julia K. Maier, Tomas Jelenik, Christina Kohlmorgen, Kathrin Feldmann, **Yanina Ostendorf**, Tamara R. Castañeda, Zhou Zhou, Yu Yamaguchi, Emmani B.M. Nascimento, Vivekananda G. Sunkari, Christine Goy, Martina Kinzig, Fritz Sörgel, Paul L. Bollyky, Patrick Schrauwen, Hadi Al-Hasani, Michael Roden, Susanne Keipert, Antonio Vidal-Puig, Martin Jastroch, Judith Haendeler, Jens W. Fischer

Nature Metabolism, 2019

Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyron co-medicated chronic artery disease patients.

Dannenberg L, Petzold T, Achilles A, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembele R, Mourikis P, **Podsvyadek Y**, Grandoch M, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Polzin A.

Eur J Clin Pharmacol., 2019

Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession.

Homann S, Grandoch M, Kiene LS, **Podsvyadek Y**, Feldmann K, Rabausch B, Nagy N, Lehr S, Kretschmer I, Oberhuber A, Bollyky P, Fischer JW.

Matrix Biol., 2018

Kongressbeiträge

Increased atherosclerosis in a murine model of colitis

Yanina Podsvyadek, Nina Pasch, Susanne Homann, Sonja Hartwig, Stefan Lehr, Jens W. Fischer, Maria Grandoch

Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V. (DGPT), 2017, 83 Heidelberg (Vortrag)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für das Überlassen des Projektes und für die großartige Betreuung bedanken. Unsere regelmäßigen Treffen waren mir immer willkommen. Insbesondere habe ich den regen Austausch, die hervorragenden Diskussionen und Anregungen zum Projekt sehr geschätzt und werde diese auch weiterhin schätzen. Auch in allen weiteren Belangen hatte sie stets ein offenes Ohr für mich und stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Durch Ihren Einsatz war es mir immer wieder möglich an Kongressen oder anderweitigen Weiterbildungsmöglichkeiten teilzunehmen und so mein Wissensfeld zu erweitern und Erfahrungen zu sammeln. Sie hat mich nicht nur stets gefördert, sondern auch in vielen Situationen gefordert. Dies ermöglichte mir über mich hinauszuwachsen und mich weiterzuentwickeln. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Ich danke Herrn Prof. Jens W. Fischer für die Möglichkeit im Rahmen dieses Projektes an dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie zu arbeiten sowie für die Unterstützung und die konstruktiven Gespräche.

Herrn Professor Dr. Ulrich Rüther danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Danken möchte ich auch Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig für die Durchführung der Multiplex-Messungen. Petra Rompel, Beate Weyrauther, Peggy Mann, Irmhild Rüter Kirsten Bartkowski und ganz besonders Annika Zimmermann und Kerstin Freidel waren immer sehr hilfsbereit und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Für diese Hilfsbereitschaft möchte ich mich besonders bedanken. Ich bedanke mich sehr bei Erika Lohmann, Karin Montag, Sabine Lohmann, und Ramona Quednau für die Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten. Ramona Quednau danke ich zudem für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gute Zusammenarbeit. Ich bin sehr froh über die zahlreichen gemeinsamen schönen Aktivitäten außerhalb des Labors. Besonders hervorheben möchte ich Susanne Hohmann, Christina Kohlmorgen und Christina Reichert, die mich stets unterstützt haben und immer für mich da waren. Sie haben mir in manch schweren Stunden eine Schulter geboten und manch langen Arbeitstag erleichtert.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Ehemann Peter Ostendorf. Sie haben mich auf diesem nicht immer leichten Weg begleitet, mir den Rücken gestärkt und stets ermutigt weiter zu gehen, wenn einmal die Kräfte fehlten.

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 16.10.2019

Yanina Ostendorf (geb. Podsvyadek)