

Aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Etablierung und Validierung eines Modells der
kombinierten Kolitis und Atherosklerose in SMC-
spezifischen *Lineage tracing* Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Anastasia Tsilke
2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckler

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Meiner Familie und Ceyhan Cevirgen gewidmet.

I. Zusammenfassung

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zählen zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), die mit intermittierenden Entzündungen des Gastrointestinaltrakts einhergehen. Humane Studien konnten zeigen, dass Patienten mit CED vor allem während der akuten Phase der gastrointestinalen Inflammation ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie die der Atherosklerose aufweisen. Die Atherosklerose ist eine sich langsam entwickelnde und ständig fortschreitende entzündliche Erkrankung der arteriellen Blutgefäße, deren Charakteristikum die Plaqueentwicklung ist. Eine entscheidende Rolle in der Atherogenese spielen Lipide und Immunzellen sowie die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima der Arterie mit Formation einer fibrösen Kappe. Im Zusammenhang mit der Plaqueentwicklung haben die glatten Muskelzellen die Fähigkeit ihren Phänotyp zu verändern. Dabei exprimieren sie unter anderem Marker, die eigentlich zum Nachweis der Makrophagen verwendet werden, wodurch eine Differenzierung der veränderten glatten Muskelzellen mit Makrophagencharakter von echten Makrophagen erschwert wird. Dieses Phänomen wird als *Phänotyp-Switch* bezeichnet und konnte in Studien im Hinblick auf Plaquerupturen als protektiv eingestuft werden.

In einem murinen Kolitismodell konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Plaquezusammensetzung der Kolitis-Tiere stark von der Kontrollgruppe unterscheidet. Ob dieser Unterschied im Zusammenhang mit dem *Phänotyp-Switch* der glatten Muskelzellen steht, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Für den Nachweis des *Phänotyp-Switches* wurden *smooth muscle cell* (SMC)-spezifische *yellow fluorescent protein* (YFP)-*Lineage tracing* Mäuse mit Apolipoprotein E-Defizienz verwendet, die spontan atherosklerotische Läsionen ausbilden. Hierzu sollte das Modell der chemisch-induzierten, chronischen Kolitis in der *Lineage tracing* Maus validiert werden. Die Induktion der chronischen Kolitis erfolgte durch die zyklische Gabe von 1%igem Dextrannatriumsulfat (DSS) über das Trinkwasser. Die Kontrolltiere erhielten Wasser. Die Untersuchung der atherosklerotischen Plaques in den *Arteriae brachiocephalicae* ergab einen höheren Anteil echter Makrophagen in der DSS-Gruppe. Die Anzahl der Zellen, die einen *Phänotyp-Switch* durchlaufen haben, war in der DSS-Gruppe reduziert. Auch konnte in diesen Tieren eine schmalere fibröse Kappe detektiert werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die atherosklerotischen Plaques der Kolitis-Tiere aufgrund eines erhöhten Makrophagenanteils eine vermehrte

inflammatorische Eigenschaft besitzen und eine verringerte Stabilität aufweisen. Hinsichtlich der möglichen Translation in Patienten mit CED, müsste auf Basis der hier erhobenen Befunde die Frage gestellt werden, ob zusätzlich eine antiinflammatorische Therapie in Betracht gezogen werden sollte.

II. Abstract

Crohn's disease and ulcerative colitis are inflammatory bowel diseases (IBD) associated with intermittent inflammation of the gastrointestinal tract. Human studies have shown that patients with IBD have an increased risk of cardiovascular disease, such as atherosclerosis, especially during the acute phase of gastrointestinal inflammation.

Atherosclerosis is a slowly developing and steadily progressive inflammatory disease of arterial blood vessels with the characteristic to develop plaques. A crucial role in atherogenesis is played by lipids and immune cells, as well as proliferation and migration of smooth muscle cells from the media into the intima of the arterial wall with formation of a fibrous cap. In the context of plaque development, smooth muscle cells have the ability to change their phenotype. Among other markers, they express markers used to detect macrophages, making it difficult to differentiate altered smooth muscle cells with macrophage character from true macrophages. This phenomenon is termed phenotype-switch and has been shown in studies to be protective against rupture.

In a murine colitis model, it has already been shown that the plaque composition of colitis animals differs from the control group. Whether this difference is related to the phenotype-switch of smooth muscle cells will be investigated in this work. Smooth muscle cell (SMC)-specific yellow fluorescent protein (YFP) lineage tracing mice with apolipoprotein E deficiency that spontaneously form atherosclerotic lesions were used to detect the phenotype-switch. For this purpose, the model of chemically-induced chronic colitis was to be validated in the lineage tracing mouse. Induction of chronic colitis was achieved by cyclic administration of 1% dextran sodium sulfate (DSS) via drinking water. Control animals received water.

Examination of the atherosclerotic plaques in the brachiocephalic arteries revealed a significantly higher proportion of true macrophages in the DSS group. The number of cells undergoing phenotype-switch was reduced in the DSS group. A narrower fibrous cap was also detected in these animals.

The data collected in this project suggest that the atherosclerotic plaques of the colitis animals have increased inflammatory properties due to an increased macrophage content and reduced stability. With regard to possible translation in patients with IBD, the question should be asked on the basis of the findings obtained here as to whether additional anti-inflammatory therapy should be considered.

III. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i>
ACTA2	<i>actin alpha 2</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ApoE	Apolipoprotein E
BCA	<i>Arteria brachiocephalica</i>
BGW	Bindegewebe
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CCL5	CC-Chemokinligand 5
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	<i>Cyclization recombinase</i>
CRP	C-reaktives Protein
Cy3	Cyanid 3
DAB	Diaminobenzidin
DSS	Dextrannatriumsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER(T2)	Estrogenrezeptor 2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS-Analyse	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FCS	<i>fetal calf serum</i>
flox	<i>flanked by loxP</i>
GDWA	Gesamter Darmwandabschnitt
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A
HR	<i>Hazard ratio</i>

IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IRR	<i>Incidence rate ratio</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LF	Lymphfollikel
LGALS3	<i>lectin, galactosidase-binding, soluble, 3</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LM	<i>Lamina muscularis</i>
LMM	<i>Lamina muscularis mucosae</i>
LP	<i>Lamina propria</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mucosa
MAC2	Galectin-3
MeOH	Methanol
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
MONICA	Multinational MONItoring of trends and determinants in CARDiovascular disease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MYH 11	<i>myosin heavy chain 11</i>
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
OCT4	<i>octamer-binding transcriptional factor 4</i>
ÖRO	Öl-rot-O
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>

qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROSA26	<i>Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26</i>
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase
SM	Submukosa
SD	Standardabweichung
SM22 α	<i>smooth muscle 22α</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i> , glatte Muskelzellen
T	Tamoxifen
TB	<i>tris buffer</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TLR4	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TCF21	<i>transcription factor 21</i>
WHO	<i>world health organization</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

IV. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	I
II. Abstract.....	III
III. Abkürzungsverzeichnis	IV
IV. Inhaltsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Atherosklerose.....	1
1.1.1 Wandaufbau arterieller Gefäße	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Pathogenese.....	2
1.1.4 Klinische Bedeutung und Risikofaktoren.....	5
1.1.5 Prävention und Therapie.....	8
1.1.6 Atherosklerose im Mausmodell	9
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	10
1.2.1 Histologie des Verdauungssystems	10
1.2.2 Epidemiologie.....	10
1.2.3 Pathogenese.....	11
1.2.4 Klinik und Risikofaktoren	11
1.2.5 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell	12
1.3 Verbindung zwischen Atherosklerose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	13
1.4 Phänotyp-Switch.....	15
1.5 Ziel der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterial	22
2.1.3 Chemikalien	23

2.1.4 Puffer und Lösungen	24
2.1.5 Arzneimittel und Substanzen für die Behandlung der Tiere.....	25
2.1.6 Kits	26
2.1.7 Erstantikörper.....	26
2.1.8 Zweitantikörper	27
2.2 Versuchstiere	27
2.3 Das <i>Lineage tracing</i> Modell zum Nachweis des Phänotyp-Switches.....	28
2.4 Studiendesign	29
2.5 Gewebepreparation und Vorbereitung der Präparate	31
2.5.1 Präparatgewinnung	31
2.5.2 Histologische Aufarbeitung des Gewebes	32
2.5.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	33
2.6 Färbungen	35
2.6.1 H&E-Färbung	35
2.6.2 Öl-rot-O-Färbung	36
2.6.3 Mac2-Färbung	37
2.6.4 Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2	38
2.7 Bestimmung der mRNA-Expression.....	41
2.7.1 RNA-Isolation.....	41
2.7.2 RNA-Quantifizierung.....	42
2.7.3 cDNA-Synthese	43
2.7.4 Quantitative RealTime PCR.....	44
2.8 Auswertung	44
2.8.1 Mikroskopie.....	44
2.8.2 Auswertung mit dem Programm ImageJ	45
2.8.3 Auswertung mit dem Programm ZEN.....	46
2.8.4 Kolitis-Score	48
2.8.5 Statistik.....	50
3 Ergebnisse	51
3.1 Etablierung des DSS-Kolitismodells in <i>Lineage tracing</i> Mäusen	51
3.1.1 Gewichtsverlauf.....	51
3.1.2 Histologische Beurteilung der Darmstruktur.....	53
3.1.3 Gewebeständige Inflammation	54
3.2 Einfluss der Kolitis auf die Progression der Atherosklerose	55

3.2.1 Plaque-Entwicklung in der Aorta	55
3.2.2 Plaque-Entwicklung in der <i>A. brachiocephalica</i>	56
3.2.3 Plaque-Entwicklung im aortalen Ursprung und das Vorkommen von Makrophagen im Plaque	58
3.3 Auswertung der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2.....	60
4 Diskussion	63
4.1 Etablierung und Validierung der Kolitis in <i>Lineage tracing</i> Mäusen	63
4.2 Validierung des Einflusses der Kolitis auf die Progression atherosklerotischer Plaques	66
4.3 Einfluss der Kolitis auf den Phänotyp-Switch	71
4.4 Einfluss auf die Plaquestabilität	76
4.5 Ausblick	78
4.6 Fazit.....	79
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	80
6. Anhang.....	107
6.1 Tabellenverzeichnis	107
6.2 Abbildungsverzeichnis	108
7. Danksagung	110

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine über Jahre langsam fortschreitende entzündliche Erkrankung der arteriellen Blutgefäße, deren Charakteristikum die chronisch progrediente Plaqueentwicklung ist (Piepoli *et al.*, 2016). Es handelt sich dabei um ein multifaktorielles Geschehen, welches vor allem die Intima betrifft (Libby *et al.*, 2002; Russell, 1999). Die Atherosklerose kann sich weiter auf die äußeren Schichten der Arterie ausbreiten. In der Media kann es zu Verdickung und Verhärtung kommen (Ho und Shanahan, 2016). Eine Ausbreitung auf die Adventitia ist von einer lokalisierten Entzündung geprägt (Spagnoli *et al.*, 2007). Abhängig von den Strömungsverhältnissen entwickeln sich die Plaques an verschiedenen Stellen des Körpers. Prädispositionsstellen sind besonders die Verzweigungsstellen der Gefäße, da sie hier einer hämodynamischen Belastung unterliegen. Die daraus resultierende Verengung der Gefäße führt zu einer Mangelversorgung des Gewebes mit ischämiebedingten Symptomen. Nennenswerte Lokalisationen sind die Herzkranzgefäße mit dem führenden Symptom der Brustenge, die Karotiden mit sensomotorischen Ausfällen, die Poplitealarterien mit Schmerzen sowie Ausfällen der unteren Extremität und die abdominale Aorta mit dem Bild eines akuten Abdomens (Frangos, 1999; Herold, 2021).

1.1.1 Wandaufbau arterieller Gefäße

Die arteriellen Gefäße, die das sauerstoffreiche Blut in die Peripherie führen, sind wie folgt aufgebaut: Die innerste Schicht, die mit dem Blut in Berührung kommt, wird als Intima bezeichnet. Auf die Intima folgt die Media und ganz außen befindet sich die Adventitia. Die Intima und die Media werden von der *Membrana elastica interna* getrennt, die Media und die Adventitia hingegen von der *Membrana elastica externa*. Die Intima teilt sich nochmal in das Endothel mit Endothelzellen sowie in das *Stratum subendotheliale* auf und fungiert als Diffusionsbarriere (Wang *et al.*, 2017; Welsch *et al.*, 2018). In der Media sind reichlich glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) lokalisiert, welche dem Gefäß die Möglichkeit geben, den Widerstand in Abhängigkeit zu den Gefäßdrücken zu ändern (Wang *et al.*, 2017; Welsch *et al.*, 2018). Über die

Adventitia ist das Gefäß mit der Umgebung verankert und wird hier durch die *Vasa vasorum* versorgt (Mewis *et al.*, 2004). Während der Atherosklerose kommt es zur Verdickung der sonst dünnen Intima. Zusätzlich entstehen Schaumzellen und es kommt zur Formierung eines lumenwärts gerichteten Plaques (Chistiakov *et al.*, 2017; Libby *et al.*, 2002). Die pathophysiologischen Prozesse werden weiter unten ausführlich erklärt.

1.1.2 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören mit zu den häufigsten Todesursachen. So gab das statistische Bundesamt bekannt, dass bei 939 520 Todesfällen in Deutschland im Jahre 2019 35,5% auf das Kreislaufsystem zurückzuführen waren ("Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken," 2020).

Die Ergebnisse der beiden Studien GEDA 2014/2015-EHIS und GEDA 2019/2020-EHIS zeigen einen steigenden Trend hinsichtlich der 12-Monats Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit. Während in den Jahren 2014/2015 die Prävalenz bei Frauen 3,7 % und bei Männern 6 % betrug, stieg diese in den Jahren 2019/2020 auf 5,1 % bei Frauen und 6,6% bei Männern (Busch und Kuhnert, 2017; Heidemann *et al.*, 2021). Somit bleibt die Forschung der kardiovaskulären Erkrankungen weiterhin ein relevantes Thema.

Dem statistischen Bundesamt ist weiterhin zu entnehmen, dass 2015 die kardiovaskulären Erkrankungen die höchsten Krankheitskosten in Höhe von 46,4 Milliarden Euro aufwiesen ("Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten," 2017).

Nicht nur in Deutschland, sondern auch europaweit rangieren kardiovaskuläre Erkrankungen an erster Stelle hinsichtlich der Todesursachen (Timmis *et al.*, 2020).

2019 starben weltweit 17,9 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. Das beläuft sich auf 32% aller Todesfälle ("Cardiovascular diseases (CVDs)," 2021).

1.1.3 Pathogenese

Das Verständnis über die Pathogenese der Atherosklerose beruht auf der Hypothese „*Response to Injury*“. Dabei geht man davon aus, dass die Entwicklung der Atherosklerose eine Antwort auf eine Schädigung des Gefäßes ist (Russell, 1999). Es werden verschiedene Arten von Schädigung, wie z.B. mechanischer oder chemischer Stress unterschieden (Libby *et al.*, 2002). Mechanischer Stress wird durch besondere Strömungsverhältnisse induziert, wie diese bei arterieller Hypertonie vorliegen können.

Unter chemischem Stress wird die oxidative Modifikation von in die Intima eingewanderten Lipoproteinen verstanden.

Diese Verletzungen setzen eine Kaskade von Reaktionen in Gang, die das Fortschreiten immer weiter fördern. Lange ist man nur von dem Konzept eines vulnerablen Plaques ausgegangen ist, welcher einen großen Lipidkern mit Schaumzellen sowie Makrophagen besitzt und von einer dünnen faserreichen Kappe umgeben ist. Diese kann potentiell rupturgefährdet sein (Libby *et al.*, 2019). Durch die z.B. mechanische oder chemische Schädigung verliert das Endothel seine Funktion als Schutzbarriere und wird permeabel für zirkulierende Lipoproteine. Die in der Intima akkumulierten Lipoproteine oxidieren durch die Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies und begünstigen so die Migration der Monozyten im Sinne einer Chemotaxis, welche dann weitere entzündliche Reaktionen auslösen (Weber *et al.*, 2008; Weber und Noels, 2011). Es werden zusätzlich Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und Chemokine wie CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und CC-Chemokinligand 5 (CCL5) freigesetzt, die das Einwandern von Leukozyten in die Intima begünstigen (Combadière *et al.*, 2008). Infolgedessen werden weitere Adhäsionsmoleküle wie Selektine für Monozyten auf den Endothelzellen exprimiert (Mestas und Ley, 2008).

Monozyten treten durch das Endothel in die Gefäßwand ein und differenzieren zu Makrophagen (Hansson und Hermansson, 2011). Makrophagen fungieren als Entzündungszellen, da sie Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) exprimieren. Darüber hinaus verfügen Makrophagen über sog. *Scavenger*-Rezeptoren, die oxidierte Lipoproteine aufnehmen und eliminieren sollen (Moore *et al.*, 2013). Das Aufnehmen der oxidierten Lipoproteine ist für die Entstehung von Schaumzellen verantwortlich, in welchen abgestorbene Zellen und Lipide internalisiert sind (Hansson und Hermansson, 2011).

Gleichzeitig wird die Formation der fibrösen Kappe angestoßen. Hierfür werden in der Media gatte Muskelzellen stimuliert, die nach Migration in die Intima extrazelluläre Matrixmoleküle, wie Matrix-Metalloproteinasen produzieren und somit die Entstehung der fibrösen Kappe fördern (Hansson und Hermansson, 2011; Weber und Noels, 2011) (Abbildung 1). Die fibröse Kappe dient dabei der Stabilisierung des Plaques. Es besteht dabei eine negative Korrelation hinsichtlich der Plaquedicke und des Rupturrisikos. Je dünner die fibröse Kappe ist, desto größer das Risiko einer Ruptur (Bentzon *et al.*, 2014). Weiter verstärkt wird die Formation der fibrösen Kappe durch Wachstumsfaktoren wie *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Transforming growth factor* β (TGF β) und TNF-

α , welche ebenso von Makrophagen sezerniert werden (Fava und Montagnana, 2018). Für SMC ist das ein weiteres Signal zur Translokation in die Intima. Die Läsion wächst immer weiter, sodass der Gefäßdurchmesser sich verengt (Bentzon *et al.*, 2014). Heute weiß man jedoch, dass man dem Konzept eines rupturierten Plaques auch das Konzept eines erosiven Plaques mit einer Fissur gegenüberstellen muss. Es wird angenommen, dass das angeborene Immunsystem und die Zerstörung der Endothelzellverankerung eine besondere Rolle bei der Pathogenese spielen. Der genaue Mechanismus ist aber weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Im Vergleich zum rupturgefährdeten Plaque handelt es sich bei den erosiven Plaques um matrixreiche Strukturen mit weniger Entzündungszellen. Die Unterscheidung beider Plaques ist von hoher Relevanz, da sie bei Patienten eine differenzierte Therapie erfordern würden (Libby *et al.*, 2019).

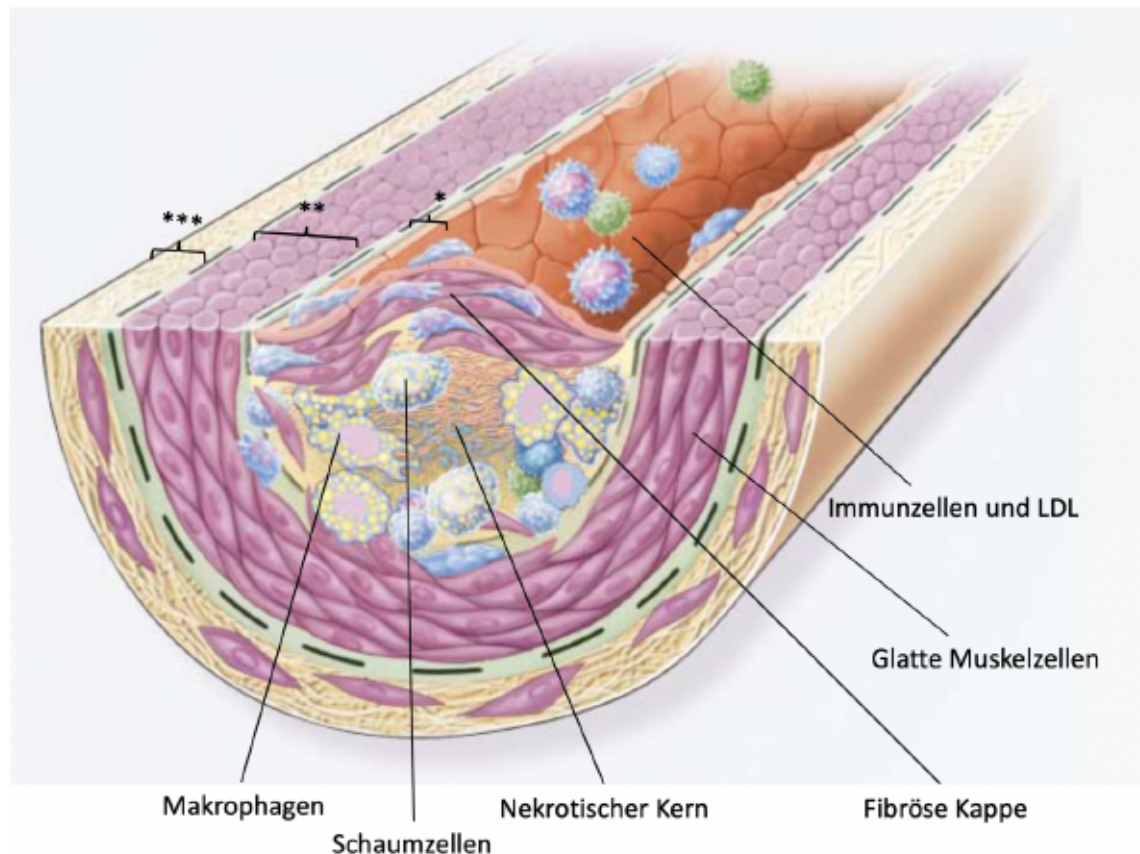


Abbildung 1 Die Entstehung eines atherosklerotischen Plaques mit Formation eines nekrotischen Kerns und einer fibrösen Kappe

Das aus den drei Schichten, * Intima, ** Media und *** Adventitia, bestehende Gefäß unterliegt bei einer endothelialen Dysfunktion der Progression atherosklerotischer Plaques. Dabei kommt es zum Übertritt von LDL und Immunzellen aus der Blutstrombahn in die Intima. LDL oxidiert und wird von Makrophagen phagozytiert, woraufhin Schaumzellen entstehen. Zusätzlich kommt es zur Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima, was die Entwicklung eines Plaques mit nekrotischem Kern und einer fibrösen Kappe fördert. Abkürzungen: *Low Density Lipoprotein*, LDL. Abbildung reproduziert und modifiziert nach Ross *et al* (Russell, 1999) mit Genehmigung, Copyright Massachusetts Medical Society.

1.1.4 Klinische Bedeutung und Risikofaktoren

Die Entwicklung der Atherosklerose schreitet chronisch über einen langen Zeitraum voran, ohne zunächst symptomatisch zu sein und entdeckt zu werden. Erste Symptome manifestieren sich erst nach etwa 10 Jahren, wenn die Plaqueentwicklung bereits eingesetzt hat. Dann gilt es den weiteren Prozess zu stoppen, ohne die bisherige Entwicklung rückgängig machen zu können (Falk, 2006).

Es erfolgt die Differenzierung in stabile und instabile Plaques. Bei stabilen Plaques sind fibrotische Anteile vorherrschend und besitzen eher einen geringen Fettanteil. Diesen entgegensetzen sind instabile Plaques mit entsprechend höherem Fettanteil und einem inflammatorischen Hintergrund (Stierle und Weil, 2020). Patienten mit einem stabilen Plaque können lange Zeit unauffällig bleiben und erst bei Belastung wie körperlicher Arbeit, emotionalem Schmerz, belastende Mahlzeiten oder bei physikalischer Kälte Symptome verspüren. Bei Belastung übersteigt der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot. Dieses Missverhältnis löst im entsprechenden peripheren Gewebe Schmerzen aus (Herold, 2021; Stierle und Weil, 2020). Potenziell lebensbedrohlich wird dieser Pathomechanismus insbesondere in den Koronararterien, was zum typischen klinischen Bild der *Angina pectoris* mit Schmerzen in der Brust führt (Herold, 2021).

Patienten mit einem instabilen Plaque laufen Gefahr, eine spontane Ruptur ohne vorherige Symptome zu erleiden. Zu einer Ruptur kann es z.B. durch hohen Blutdruck kommen oder durch weitere anhaltende Risikofaktoren. Die schützende Endothelschicht wird kleiner und der Plaque reißt auf. Plaquebestandteile wie Kollagen und tote Zellen kommen in Kontakt mit dem Blutstrom. Hierdurch werden Thrombozyten, die im physiologischen Zustand ohne Interaktion zirkulieren, aktiviert. In erster Linie stellt die freiliegende intrazelluläre Matrix einen Trigger für Thrombozyten dar. Innerhalb weniger Sekunden kommt es zur Okklusion der Koronararterien, was gemeinhin zum Herzinfarkt mit potenziell letalem Verlauf führen kann (Furie und Furie, 2008). Der Blutfluss muss dann unverzüglich wiederhergestellt werden. Vor diesem Hintergrund ist es entscheidend bereits die Entwicklung zu verlangsamen oder gar zu stoppen.

Folglich versterben Patienten somit nicht an der Atherosklerose selbst, sondern an den daraus resultierenden Komplikationen. Zu den häufigsten und auch gefährlichsten Komplikationen gehören Myokardinfarkte und Schlaganfälle.

Von Mitte der 80er- bis Mitte der 90er-Jahre wurde von der *World Health Organization* (WHO) die weltweite Kohortenstudie mit 13 Millionen Menschen in 21 Ländern, die *Multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease* (MONICA)-Studie durchgeführt, welche Aufschluss über die verschiedenen Risikofaktoren der Atherosklerose brachte (Keil, 2005). Eine weitere sehr bekannte Studie ist die Framingham Studie, die 1948 begann, bis heute andauert und als Ziel hat, die verschiedenen Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheiten (KHK) zu ermitteln (Kannel *et al.*, 1976). Es können modifizierbare und nicht modifizierbare Risikofaktoren unterschieden werden. In der Gruppe der nicht-modifizierbare Risikofaktoren spielen das

Lebensalter und genetische Prädispositionen eine große Rolle (Choudhury *et al.*, 2015). Durch den medizinischen Fortschritt steigt die Lebenserwartung sukzessive an und Patienten kommen in ein Alter, in dem eine Stenose hämodynamisch relevant wird (Felder, 2006).

Beiden Gruppen zuzuordnen ist die Hyperlipoproteinämie. Diese kann angeboren sein oder sekundär durch ungesunden Lifestyle verursacht werden. Der moderne Mensch führt immer mehr sitzende Tätigkeiten aus und ernährt sich aufgrund des Überangebots tendenziell unbewusst (Katzmann *et al.*, 2019). Besonders zu nennen ist hier die negative Auswirkung von gesättigten Fettsäuren auf die Entwicklung koronarer Herzerkrankungen (Zong *et al.*, 2016). Diese verminderte Fettverbrennung mit vermehrter Fettaufnahme hat eine negative Auswirkung auf die Entwicklung der Atherosklerose. Die beiden Lipoproteine *Low density lipoprotein* (LDL) und *High density lipoprotein* (HDL) spielen hierbei die wichtigste Rolle (Castelli *et al.*, 1992; Hao und Friedman, 2014). LDL wird in der Leber gebildet und transportiert Cholesterin über die Blutbahn in die Peripherie zu den Organen. Die Aufgabe von HDL ist der Transport von Cholesterin zurück zur Leber, wo es z.B. in Form von Galle ausgeschieden werden kann. Bei einem Missverhältnis von LDL und HDL zugunsten von LDL, verbleibt viel mehr cholesterinbeladenes LDL in der Peripherie. LDL oxidiert und wird von Makrophagen über *Scavenger*-Rezeptoren aufgenommen, woraufhin sich Schaumzellen bilden. Durch diese Lipidablagerung schreitet die Atherogenese weiter voran (Heinrich *et al.*, 2014; Herold, 2021; Moore *et al.*, 2013).

Ein weiterer modifizierbarer Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie (Stokes *et al.*, 1989). Durch den erhöhten Blutdruck unterliegen die Gefäße einer starken hämodynamischen Belastung, die zu Veränderungen des Gefäßendothels führt. Durch Mikrotraumen bilden sich vermehrt Plaques, die zusätzlich einem erhöhtem Risiko unterliegen, zu reißen (Arnett *et al.*, 2019; Poznyak *et al.*, 2022). Zudem fördert ein erhöhter Blutdruck durch Angiotensin 2, ein wichtiger Mediator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, vermittelte Oxidationsprozesse durch eine Erhöhung der reaktive Sauerstoffspezies. Folge ist die steigende Oxidation von LDL mit anschließender Akkumulation (Cheng *et al.*, 2005).

Ein wichtiger vermeidbarer Risikofaktor ist der Nikotinkonsum (Freund *et al.*, 1993). Nikotin fördert oxidativen Stress und damit eine Entzündungsreaktion (Ambrose und Barua, 2004). Zudem konnte beobachtet werden, dass Patienten mit Nikotinkonsum

Veränderungen im Lipidstoffwechsel aufzeigen mit einem erhöhten Anteil von schädigenden oxidierten LDL-Partikel (Campbell *et al.*, 2008).

Bei einem an Diabetes mellitus erkrankten Patienten führt eine überwiegend hyperglykämische Stoffwechsellage zu irreversiblen Zellschäden. Die Zellschäden entstehen durch die nicht-enzymatische Reaktion zwischen Glucose und Proteinen. In arteriellen Gefäßen ist es vor allem die Bindung von Glucose an Lipoproteine, die als oxidierte Lipoproteine in die Intima gelangen und dort oxidativen Stress verursachen (Arnett *et al.*, 2019; Heinrich *et al.*, 2014; Kannel und McGee, 1979; Kennedy und Baynes, 1984; Lyons, 1993).

1.1.5 Prävention und Therapie

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen entwickeln sich langsam und graduell, weswegen präventive Maßnahmen und eine frühzeitige Reduktion der Risikofaktoren eine entscheidende Rolle spielen. Zu diesen Maßnahmen zählt die Veränderung des Lebensstils wie Nikotinkarenz, körperliche Aktivität und Einhaltung einer mediterranen Diät (Dalen und Devries, 2014; Van Trier *et al.*, 2022). Blutdruck und die Blutzuckerwerte bei Patienten mit Diabetes mellitus sollten streng eingestellt werden (Mach *et al.*, 2020).

Eine weitere wichtige Säule der präventiven Maßnahme ist die Sekundärprävention mittels medikamentöser Therapie bei bereits erhöhten Lipidwerten. Nach Leitlinie werden den Patienten für die Lipidsenkung in den meisten Fällen Statine verabreicht (Mach *et al.*, 2020). Bei Statinen handelt es sich um 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktasehemmer. Sie hemmen die körpereigene Cholesterinsynthese. Durch den verminderten Cholesterinspiegel steigen kompensatorisch die Zahl der LDL-Rezeptoren. Diese nehmen vermehrt LDL in die Zellen auf und der LDL-Spiegel sinkt (Istvan und Deisenhofer, 2001; Yu *et al.*, 2017). Statine verfügen zusätzlich über pleiotrope Effekte. Das bedeutet, dass sie neben der Hauptwirkung der Cholesterinsenkung weitere pharmakologische Eigenschaften vorweisen. Zu diesen Effekten zählt die gesteigerte Bildung des Transmitters Stickstoffmonoxid (NO), die reduzierte LDL-Oxidation und die Abnahme inflammatorischer sowie thrombogener Geschehnisse (Alfon *et al.*, 1999; Aviram *et al.*, 1992; Laufs *et al.*, 1998; Ridker *et al.*, 1999).

Zu den weiteren lipidsenkenden Medikamenten zählen die Fibrate, Ezetimib, Gallensäurebinder und Proproteinase Subtilisin Kexin Typ 9 (PCSK9)-Hemmer (Mach *et al.*, 2020).

1.1.6 Atherosklerose im Mausmodell

Atherosklerose ist ein langsam fortschreitender Prozess mit Plaqueablagerungen in den Gefäßwänden (Libby, 2002). Für Forschungszwecke ist es von großer Bedeutung, dass die Progression in Versuchstieren schneller und gezielter voranschreitet. Im Jahre 1992 wurde das erste Mausmodell entwickelt, in dem Mäuse durch das Ausschalten des Gens für Apolipoprotein E (ApoE) atherosklerotische Läsionen entwickeln (Plump *et al.*, 1992). ApoE ist ein Glykoprotein und wird im physiologischen Zustand in der Leber synthetisiert und in die Peripherie abgegeben (Mahley und Rall, 2000). Es sorgt für die Entfernung von Lipoproteinen aus dem Blutplasma, sodass ein *knockout* in einem Überschuss von Lipoproteinen resultiert (Plump *et al.*, 1992). Die Inaktivierung des *ApoE* Gens erfolgt in embryonalen Stammzellen der Maus durch homologe Rekombination (Jawień *et al.*, 2004; Plump *et al.*, 1992). Bevor das *ApoE knockout* Modell entwickelt wurde, konnte man atherosklerotische Läsionen durch fettreiche Diäten induzieren (Breslow, 1996; Paigen *et al.*, 1987). Fettreiche Diäten sind jedoch weiterhin eine relevante Methode in der aktuellen Forschung und werden auch mit *ApoE knockout* Mäusen kombiniert (Getz und Reardon, 2006; Liu *et al.*, 2022). Außerdem wurde auch mit Verletzungsmodellen gearbeitet (Schwartz *et al.*, 1995).

Eine Alternative zum *ApoE knockout* Modell ist heute z.B. unter anderem das LDL-Rezeptor *knockout* Modell, bei dem das LDL-Rezeptor Gen ausgeschaltet wird (Ishibashi *et al.*, 1993). Der LDL-Rezeptor spielt eine große Rolle bei der Aufnahme von Cholesterin in die Leber, in der es weiter verwertet wird (Istvan und Deisenhofer, 2001; Yu *et al.*, 2017). Bei Fehlen des LDL Rezeptors verbleibt vermehrt Cholesterin im Blut, wo es durch Ablagerung atherosklerotischen Schaden anrichten kann (Sanan *et al.*, 1998). Vergleicht man jedoch, das *ApoE knockout* Modell mit dem LDL-Rezeptor *knockout* Modell, so entwickeln *ApoE knockout* Mäuse eine schwerere und schnellere Atherosklerose (Nakashima *et al.*, 1994; Zadelaar *et al.*, 2007). Zudem zeigt das *ApoE knockout* Modell eine größere physiologische Bedeutung, denn im Lipidstoffwechsel ist die Funktion von dem LDL-Rezeptor dem ApoE untergeordnet (Getz und Reardon, 2016; Lo Sasso *et al.*, 2016).

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zählen zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Dabei handelt es sich um Erkrankungen, die mit intermittierenden oder permanenten Entzündungen des Gastrointestinaltrakts einhergehen (Herold, 2021; Podolsky, 2002).

1.2.1 Histologie des Verdauungssystems

Zu den Funktionen des Darms gehören die Resorption von Nährstoffen, die Rückresorption von Wasser und die Ausscheidung von Resten. Grundsätzlich zeigt der gesamte Gastrointestinaltrakt histologisch denselben Grundaufbau mit spezifischen, lokalen Unterschieden, je nach spezifischer Funktion des jeweiligen Abschnitts. Von innen nach außen lässt sich die Darmwand in die *Tunica mucosa*, die *Tela submucosa*, die *Tunica muscularis* und die *Tunica serosa* bzw. *Tunica adventitia* untergliedern. Die *Tunica mucosa* ist die Schleimhaut und besteht aus der *Lamina epithelialis*, der *Lamina propria mucosae* und der *Lamina muscularis mucosae*. Die *Tela submucosa* beinhaltet den *Plexus submucosus* sowie Blut- und Lymphgefäße. Die *Tunica muscularis* kann man in ein *Stratum circulare* und ein *Stratum longitudinale* unterteilen mit dem dazwischenliegenden *Plexus myentericus*. In Abhängigkeit der Lage der Organe zum Peritoneum spricht man von intraperitoneal gelegenen Organen, die von einer *Tunica serosa* umgeben werden und von extraperitoneal gelegenen Organen, die von einer *Tunica adventitia* ummantelt sind (Ulfig, 2019; Welsch *et al.*, 2018). Das Kolon besitzt in der Epithelschicht zusätzlich Becherzellen zur Schleimproduktion. Typisch sind auch die fehlenden Zotten und vermehrten Krypten sowie die hohe Anzahl an Lymphfollikeln (Ulfig, 2019; Welsch *et al.*, 2018).

1.2.2 Epidemiologie

Während im 20. Jahrhundert die chronisch entzündliche Darmerkrankung eher in den westlichen Industriestaaten dominierte, ist sie heute im 21. Jahrhundert eine weltweite Erkrankung geworden. Die neuen industriellen Staaten präsentieren immer höhere Fallzahlen. Dem könnte das westlich geprägte Essen zu Grunde liegen, welches immer mehr in anderen Teilen der Welt konsumiert wird (Barreiro-de Acosta *et al.*, 2011; Kaplan

und Ng, 2017; Molodecky *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2013). Verglichen zu 2010 soll sich die Prävalenz im Jahr 2030 schätzungsweise verdoppeln (Kaplan und Windsor, 2021). Von 1990 bis 2016 lag die Prävalenz von Morbus Crohn in Deutschland bei 322 auf 100.000 und von Colitis ulcerosa bei 412 auf 100.000 (Ng *et al.*, 2017). Durch die immer weiter steigenden Zahlen rücken chronisch entzündliche Erkrankungen immer mehr in den Fokus.

1.2.3 Pathogenese

Eine konkrete Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, da komplexe Interaktionen zur Krankheitsentstehung beitragen. Eine Dysregulation des Immunsystems, die zu einer Schädigung des Darmepithels führt, welche mit einer veränderten Schleimschicht der Darmwand und einer gesteigerten Durchlässigkeit des Darmepithels einhergeht, scheint von Wichtigkeit zu sein (Klag *et al.*, 2013; Podolsky, 2002; Strober *et al.*, 2007). Der Einfluss der oben genannten Risikofaktoren führt nämlich zu einer Immunantwort im Darm mit Steigerung der *cluster of differentiation 4* (CD4)⁺-Lymphozyten.

Es können drei hypothetische Phasen unterschieden werden. In der ersten Phase kommt es zu einer Störung der Barriere, die so eine Eintrittspforte für Bakterien darstellt. Die zweite Phase ist von einer pathologischen Abwehrreaktion gekennzeichnet. In der dritten Phase entstehen als Reaktion auf die ersten beiden Phasen Gewebsschädigungen mit Erosionen und Nekrosen (Herold, 2021).

1.2.4 Klinik und Risikofaktoren

Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung präsentieren sich mit chronisch-rezidivierenden Abdominalschmerzen und Durchfällen (Herold, 2021). Eine fettreiche Ernährung und ein stressdominierender Lebensstil sind mögliche Faktoren, die zur Pathogenese beitragen (Ananthakrishnan, 2015; Vanuytsel *et al.*, 2014). Zu den weiteren Risikofaktoren zählen Nikotinabusus, eine genetische Prädisposition sowie ein verändertes Mikrobiom. (De Bie *et al.*, 2015; Shaw *et al.*, 2011; Sheehan *et al.*, 2015). Ursachen für ein verändertes Mikrobiom können die erwähnten Risikofaktoren wie fettreiche Ernährung und Nikotinabusus sein. Weiterhin auch verarbeitete Lebensmittel, Antibiotika und Adipositas (Sheehan *et al.*, 2015).

In der Klinik müssen die Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa differenziert betrachtet werden, da beide Erkrankungen wesentliche Unterschiede aufweisen. Während Morbus Crohn den gesamten Gastrointestinaltrakt segmental und transmural befällt, ist die Colitis ulcerosa durch eine kontinuierliche Ausbreitung im Darm gekennzeichnet, die sich allerdings auf Mukosa und Submukosa beschränkt (Podolsky, 2002). Morbus Crohn manifestiert sich vor allem im terminalen Ileum und im proximalen Kolon. Bei der Colitis ulcerosa hingegen beginnt der Befall im Rektum und breitet sich dann nach proximal weiter aus (Herold, 2021). Diese verschiedenen Hauptlokalisationen bedingen dementsprechend verschiedene Symptome. Beim Morbus Crohn wird durch die Entzündung vermehrt Wasser in das Darmlumen sezerniert, was eher wässrige Durchfälle zur Folge hat. Bei der Colitis ulcerosa leiden Patienten an blutigen Durchfällen (Herold, 2021).

Beide Erkrankungen verursachen weitere Komplikationen. Beim Morbus Crohn überwiegen eher Stenosen, Abszesse und Fisteln. Die Patienten mit Colitis ulcerosa haben hingegen ein 2,4fach erhöhtes Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Herold, 2021).

Mehr als die Hälfte der Patienten stellen sich außerdem mit extraintestinalen Symptomen vor (Doßow und Arnim, 2019). Beide Erkrankungen haben Auswirkungen auf Haut, Augen, Gelenke und Leber (Herold, 2021).

1.2.5 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Mausmodell

In experimentellen Studien wird eine Kolitis über das Verabreichen von Dextranatriumsulfat (DSS) über das Trinkwasser induziert. DSS ist ein sulfatiertes Polysaccharid und verursacht in den Versuchstieren eine Entzündung des Darms (Chassaing *et al.*, 2014). Zu möglichen Alternativen zählen z.B. das Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Modell und ein Modell mit Interleukin-10 (IL-10)-defizienten Mäusen (Antoniou *et al.*, 2016; Jofra *et al.*, 2019). Die einfache Anwendung und die Steuerbarkeit des Schweregrades machen das DSS Modell zu einer beliebten Methode (Chassaing *et al.*, 2014). Je nach Versuchsaufbau mit unterschiedlicher Dauer und variierenden Zyklen der DSS Gabe kann eine akute oder eine chronische Kolitis induziert werden. Für die Induktion einer akuten Kolitis wird DSS über einen bestimmten Zeitraum hinweg verabreicht mit einer anschließenden Regenerationsphase. Für die

chronische Kolitis werden die Abläufe DSS Gabe und Regeneration über mehrere Zyklen wiederholt (Wirtz *et al.*, 2007). Die Dauer und die Konzentration sind dabei abhängig von dem Tiermodell, von der Fragestellung sowie auch von der Erfahrung. Meistens liegt die Konzentration von DSS zwischen 1 und 5% (Chassaing *et al.*, 2014; Melgar *et al.*, 2005). Eine zu hohe Konzentration kann toxisch sein und über das Maß hinausgehende Schädigung der Darmwand herbeiführen. Regelmäßige Kontrollen der Mäuse mit Bestimmung des Zustands und des Gewichtsverhaltens sind während des Versuchs wichtig (Melgar *et al.*, 2005).

1.3 Verbindung zwischen Atherosklerose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Es ist bereits bekannt, dass entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und Lupus erythematodes mit der Progression einer KHK in Verbindung stehen (Salmon und Roman, 2008). Eine Studie von Bernstein *et al.* konnte zeigen, dass auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen einen Effekt auf die Entstehung der KHK haben könnten. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit CED ein 26% höheres Risiko zeigten einen ischämischen Herzinfarkt zu erleiden (1,26 IRR; 95% KI, 1,11-1,44) (Bernstein *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2017).

Weitere Studien konnten diesen Zusammenhang bestätigen. In einer retrospektiven Fall-Kontroll Studie von Yarur *et al.* wurden 356 CED Patienten mit 712 Kontrollen über 50 Monate verglichen. Dabei wurde in der CED Gruppe ein erhöhtes Risiko eine KHK zu entwickeln als in der Kontrollgruppe nachgewiesen (2,85 HR; 95% KI, 1,84-4,46) (Yarur *et al.*, 2011).

In einem Beobachtungszeitraum von 13 Jahren wurden in Dänemark 28,833 Patienten mit CED mit über 4,5 Millionen Menschen ohne CED verglichen. Das Ergebnis zeigte eine 59% (1,59 IRR; 95% KI, 1,50-1,69) höhere Inzidenz von KHK in der CED Gruppe (Rungoe *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017).

Eine weitere interessante Tatsache ist, dass diese Patienten diese Korrelation zeigten, obwohl sie nicht die für KHK typischen Risikofaktoren aufwiesen. Diese Patienten litten eher weniger an Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes und zeigten deutlich niedrigere *Body-Mass-Index* (BMI)-Werte (Yarur *et al.*, 2011).

Eine dänische Studie konnte zudem den Unterschied zwischen den Aktivitätsphasen von CED darlegen. In einer Kohortenstudie wurden 20795 Patienten mit CED und 199978

Patienten ohne CED verglichen. Während der aktiven und persistierenden Phase zeigten Patienten ein höheres Risiko einen ischämischen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden. In der Remissionsphase wurde kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ausgemacht (Kristensen *et al.*, 2013). Die Abhängigkeit des KHK-Risikos von der Aktivitätsphase der CED wurde auch in weiteren Studien beobachtet (Aniwan *et al.*, 2018; Tsai *et al.*, 2014; Zöller *et al.*, 2012). Zur Differenzierung der Phasen verwenden die meisten Studien Marker wie Steroidgebrauch oder Therapieeskalation und Krankenhauseinweisung (Weissman *et al.*, 2020).

Eine französische Studie von Kirchengesner *et al.* konnte herausfinden, dass Frauen eher einem erhöhten Risiko, eine KHK zu entwickeln, ausgesetzt sind. Auch das Alter scheint dabei eine Rolle zu spielen. Das höchste Risiko konnte im Alter zwischen 35 und 54 Jahren festgehalten werden (Kirchengesner *et al.*, 2018).

Im Jahr 2019 wurde eine weitere Studie von Panhwar *et al.* publiziert, die eine Metaanalyse aus einer Datenbank der Vereinigten Staaten darstellt. Sie konnten ebenso ein geschlechter- und altersspezifisches Risiko ausmachen (Panhwar *et al.*, 2019).

Noch existiert keine umfassende Erklärung wie eine CED die Entstehung von Atherosklerose fördert. Es wurden aber bereits verschiedene Erklärungsansätze präsentiert. Zum einen sind bei Patienten mit CED das C-reaktive Protein (CRP) und proinflammatorische Zytokine wie TNF α und Interleukin 6 (IL6) systemisch erhöht (Hatoum und Binion, 2005; Schicho *et al.*, 2015; Schinzari *et al.*, 2008). Diese systemische Inflammation trägt zur Entstehung der KHK bei (Hansson, 2005; Harbord *et al.*, 2016; Ridker *et al.*, 2008b). Hohe Spiegel der Marker CRP, TNF α und IL6 bei Patienten mit CED deuten auf eine beschleunigte Atherogenese hin (Bunu *et al.*, 2019). Durch die systemische Inflammation wird die Antwort des Immunsystems ausgelöst und dieses könnte zur endothelialen Dysfunktion beitragen (Principi *et al.*, 2013).

Zum anderen haben Patienten mit CED eine gestörte Darmbarriere. Dadurch bietet die Darmwand eine Eintrittspforte für Bakterien und weiterer Produkte aus der Darmflora. Zu diesen Produkten gehören Lipopolysaccharide (LPS). LPS ist ein Endotoxin und löst durch Bindung an entsprechende Rezeptoren wie z.B. *Toll-like* Rezeptoren 4 (TLR4) eine proinflammatorische Reaktion aus (Dunne und O'Neill, 2003; Wiesner *et al.*, 2010). Diese proinflammatorische Reaktion begünstigt eine weitere Schädigung des Gefäßendothels durch eine vermehrte Oxidation von LDL und Aktivierung von Makrophagen (Schicho *et al.*, 2015).

Eine weitere Schnittstelle zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der Atherosklerose bildet die Aminosäure Homocystein. Oussalah *et al.* zeigten, dass Patienten mit CED ein höheres Level an Homocystein als die Kontrollgruppe aufwiesen (Oussalah *et al.*, 2011). Homocystein steht im Verdacht oxidativen Stress sowie eine endotheliale Dysfunktion zu fördern (Wu *et al.*, 2017).

1.4 Phänotyp-Switch

Die gesamte Erbinformation eines Organismus oder einer Zelle wird durch den Genotyp beschrieben. Somit macht der Genotyp eine Aussage über die ursprüngliche Art einer Zelle. Hingegen beschreibt der Phänotyp äußerliche Merkmale wie z.B. die Funktion oder das Aussehen einer Zelle (Churchill, 1974). Dabei definiert ein Genotyp nicht nur einen Phänotypen. Aus einem Genotypen können sich je nach äußerer Einwirkung verschiedene Phänotypen entwickeln. Die Zellen können sogar einen bereits ausgeprägten Phänotypen ändern. Diese Fähigkeit wird als phänotypische Plastizität bzw. als Phänotyp-Switch bezeichnet (Fusco und Minelli, 2010; Garland und Kelly, 2008). Diesen Phänotyp-Switch konnte man bereits in verschiedenen Zellen beobachten, wie z.B. in Krebszellen oder in glatten Muskelzellen eines Gefäßes (Gomez und Owens, 2012; Hoek und Goding, 2010). In einem atherosklerotischen Plaque sind mehrere verschiedene Zellarten enthalten. Zu diesen Zellen gehören beispielsweise SMC und Makrophagen. Reife SMC weisen weiterhin eine sehr hohe Plastizität auf (Alexander und Owens, 2012). Zu den Aufgaben der SMC gehört die Gefäßentwicklung mit hohen Proliferations-, Migrations- und Produktionsraten von Extrazellulärmatrix (EZM) sowie die Kontraktion zur Regulation von Gefäßdurchmesser, Blutdruck und zur Verteilung des Blutflusses. Weiterhin sind sie auch für die Gefäßreparatur bei Verletzungen zuständig (Owens *et al.*, 2004).

Innerhalb der Atherogenese und -progression besitzen sie neben der Proliferation und Migration auch die Fähigkeit, ihren Phänotyp zu ändern (Owens *et al.*, 2004). Dieses spezielle Phänomen wird, wie oben bereits erwähnt auch bei anderen Zellarten beobachtet und wird als Phänotyp-Switch bezeichnet (Gomez und Owens, 2012; Hoek und Goding, 2010).

Dabei können glatte Muskelzellen verschiedene Phänotypen einnehmen. Literaturbekannt ist bereits die Differenzierung zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen, mesenchymalen Stammzell-ähnlichen Zellen und zu Makrophagen-ähnlichen Zellen (Badi *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2020; Rong *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2022). Insbesondere

auf den Phänotyp-*Switch* zu Makrophagen-ähnlichen Zellen wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt.

SMC können anhand von Markern wie *myosin heavy chain 11*(MYH11), *actin alpha 2* (ACTA2), *smooth muscle* (SM)-22α und *SM-myosin heavy chain* (MHC) immunhistologisch identifiziert werden (Bennett *et al.*, 2016). Nach dem Phänotyp-*Switch* werden diese Marker nicht nur in der Expression unterdrückt. Es werden zusätzlich auch andere Marker exprimiert, die klassischerweise zur Identifizierung von Entzündungszellen wie Makrophagen dienen, z.B. Marker vom Typ *Galectin 3* (Mac2), kodiert vom Gen *lectin galactoside-binding soluble 3* (LGALS3) (Gomez und Owens, 2012) (Abbildung 2).

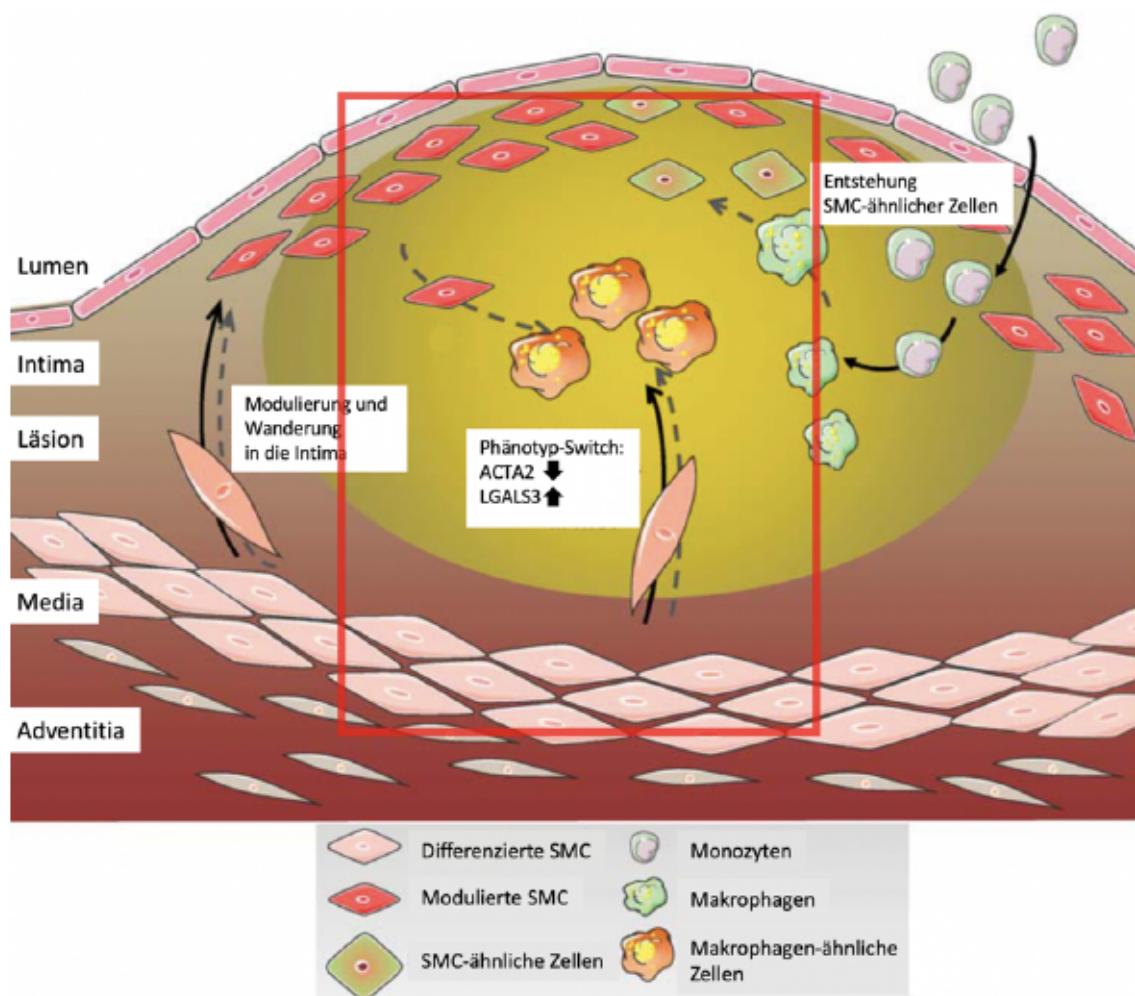


Abbildung 2 Phänotyp-Switch im atherosklerotischen Plaque

Im unteren Bereich der Abbildung sind die in der Media liegenden differenzierten SMC zu sehen. Bei Bedarf, wie z.B. bei der Formierung einer fibrösen Kappe, werden diese moduliert und wandern in die Intima. Ein Teil der differenzierten SMC verliert seine herkömmlichen SMC-spezifischen Marker wie ACTA2. Stattdessen werden Makrophagen-Marker exprimiert wie LGALS3. Dieser Prozess wird auch bei anderen Zellarten beobachtet und wird als Phänotyp-Switch bezeichnet und ist hier mit einem roten Kasten versehen. Die entstandenen Makrophagen-ähnlichen Zellen sind durch die zusätzliche Expression entsprechender Marker nicht zu unterscheiden. Die Entstehung SMC-ähnlicher Zellen konnte ebenso beobachtet werden, soll in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter thematisiert werden. Abbildung modifiziert nach Gomez und Owens (Gomez und Owens, 2012).

Andreeva, *et al.* konnten bereits 1997 das Koexistieren eines Makrophagen Markers und eines Markers für glatte Muskelzellen nachweisen (Andreeva *et al.*, 1997). Weiter wurden auch Zellen mit alleiniger Expression eines Makrophagenmarkers und Fehlen eines Markers für glatte Muskelzellen entdeckt, die dennoch keinen hämatopoetischen

Ursprung aufweisen (Bentzon *et al.*, 2014). Als Folge einer Kultivierung von glatten Muskelzellen mit Beladung von Cholesterol kam es zu einer Verschiebung in Richtung einer vermehrten Expression von Makrophagenmarkern und gleichzeitiger Reduktion der Marker für glatte Muskelzellen (Rong *et al.*, 2003). Das Charakteristikum für Makrophagen-ähnliche Zellen ohne hämatopoetischen Hintergrund ist somit die Herabregulierung von Markern für SMC und Heraufregulierung von Makrophagenmarkern (Feil *et al.*, 2014). Dadurch können die Zellen eines atherosklerotischen Plaques ihrem Genotypen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. (Gomez und Owens, 2012). Shankman *et al.* weisen darauf hin, dass >80% der SMC nicht detektiert werden können, da sie ihre klassischen Marker herunterregulieren (Shankman *et al.*, 2015). 2020 wurde diese Tatsache von Alencar *et al.* bestätigt (Alencar *et al.*, 2020). Darüber hinaus konnten Shankman *et al.* nachweisen, dass etwa 30% aller Zellen im Plaque einen Phänotyp-Switch durchlaufen (Shankman *et al.*, 2015).

Die Ursachen für diesen Phänotyp-Switch sind nicht gänzlich geklärt. Die Exposition gegenüber Einflüssen aus den atherosklerotischen Läsionen scheinen dabei eine große Rolle zu spielen. Zu diesen Einflüssen gehören die Cholesterinbeladung, *Platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) und IL-1 β (Dandré und Owens, 2004; Gomez *et al.*, 2018; Rong *et al.*, 2003). Hervorzuheben ist außerdem, dass eine vermehrte Expression von Makrophagenmarkern in Makrophagen-ähnlichen Zellen keine Makrophagen-ähnliche Funktion nach sich zieht. In einem Experiment von Vengrenyuk *et al.* wurde die Phagozytoseaktivität dieser Zellen mit der Phagozytoseaktivität echter, ursprünglich von Myeloidzellen stammender Makrophagen in Mäusen verglichen. Die Ergebnisse belegten eine signifikant verringerte Aktivität in Makrophagen-ähnlichen Zellen (Vengrenyuk *et al.*, 2015).

Darüber hinaus sind in der Literatur sowohl positive als auch negative Auswirkungen des Phänotyp-Switches auf atherosklerotische Läsionen beschrieben (Alencar *et al.*, 2020). Shankman *et al.* analysierten in Mäusen den Effekt eines *knockouts* für *Krüppel-like factor 4* (KLF4). In der Folge konnte beobachtet werden, dass Makrophagen mit SMC Hintergrund, also Zellen mit Phänotyp-Switch, in ihrer Zahl reduziert waren. Gleichzeitig wurden die Abnahme der Läsionsgröße sowie eine Zunahme der Plaquestabilität durch Ausbildung einer massiveren fibrösen Kappe festgestellt (Shankman *et al.*, 2015). Gemäß dieser Arbeit hat der Phänotyp-Switch negative Auswirkungen auf atherosklerotische Läsionen. Negative Auswirkungen wurden auch in der Arbeit von Rong *et al.* beobachtet. Die Arbeitsgruppe belud aortale glatte Muskelzellen von Mäusen für 72 Stunden mit

Cholesterol. So konnte sowohl der Einfluss einer Cholesterinbeladung auf den Phänotyp-Switch als auch eine Akzeleration der Atherosklerose in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden (Rong *et al.*, 2003). Dem gegenüberzustellen ist z.B. der *knockout* des *octamer-binding transcriptional factor 4* (OCT4) in Mäusen. Eine vermehrte Expression von OCT4 ist mit einem Phänotyp-Switch vergesellschaftet. Ein *knockout* hingegen führt zu einer vergrößerten Läsionsfläche mit verringerter Plaquestabilität (Cherepanova *et al.*, 2016). Wirka *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass die Expression des *transcription factor 21* (TCF21) Gens sowohl mit steigendem Phänotyp-Switch als auch mit abfallenden Ereignissen von koronaren Herzkrankheiten korreliert. Diesen Ergebnissen zur Folge konnte dem TCF21 Gen und somit dem Phänotyp-Switch eine eher atheroprotektive Rolle zugesprochen werden (Wirka *et al.*, 2019).

Das Wissen über den Phänotyp-Switch ist von großer Relevanz, da es zum einen bedeutet, dass durch den fehlenden Nachweis potentieller SMC Zellen vergangene Experimente im Hinblick auf die Ergebnisse kritisch hinterfragt werden müssen, zum anderen könnte es neue Möglichkeiten der Therapie der Atherosklerose bieten (Bennett *et al.*, 2016).

1.5 Ziel der Arbeit

In Vorarbeiten konnte in *Apoe*-defizienten (*Apoe*^{-/-}) Mäusen der atherogene Einfluss einer chemisch induzierten Kolitis nachgewiesen werden. Es wurde nicht nur eine größere Plaquebelastung in Tieren mit einer chemisch induzierten Kolitis beobachtet, sondern auch eine unterschiedliche Plaque-Zusammensetzung. Im Rahmen der Dissertation beschäftigte sich Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie unter anderem mit der Entwicklung der Plaquebelastung in der Aorta und des Plaquevolumens in der Arteria (A.) brachiocephalica (BCA) von Mäusen, die vorher mit DSS behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Erhöhung der Plaquebelastung mit einer veränderten Plaquekomposition in der mit DSS behandelten Gruppe. Dr. med Helena Schäffer konnte in ihrer Dissertation zudem Veränderungen in der extrazellulären Matrix und in der Lipidretention nachweisen (Ostendorf, 2019; Schäffer, 2022).

Ziel dieser Arbeit war es die Plaquekomposition im kombinierten Atherosklerose-Kolitis Modell im Hinblick auf den Phänotyp-Switch weiter zu untersuchen, wobei zunächst das Modell in der SMC-spezifischen *Yellow fluorescent protein* (YFP)-Lineage tracing Maus etabliert werden musste.

Um in dem Modell der kombinierten Atherosklerose und DSS induzierten chronischen Kolitis die Plaqueentwicklung als auch den Phänotyp-*Switch* verfolgen zu können und um einzelne Komponenten der Plaques präzise identifizieren zu können, soll das bereits bestehende DSS-Mausmodell auf *Lineage tracing* Mäuse mit *Apoe*-Defizienz übertragen werden. *Lineage tracing* ist eine Methode, die es ermöglicht sich die Entwicklung oder Differenzierung von Zellen anzusehen. Dafür werden die zu untersuchenden Organismen gentechnisch so verändert, dass sie ein fluoreszierendes Protein exprimieren. In der Forschung ermöglicht diese Methode bestimmte Krankheitsentwicklung zu verstehen, indem Kenntnisse über zelluläre Mechanismen gewonnen werden (Kretzschmar und Watt, 2012). Die *Apoe*-Defizienz sorgt hier für die Entwicklung von Läsionen und Plaques in den Gefäßen (Nakashima *et al.*, 1994; Plump *et al.*, 1992).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Firma
Brutofen	Heraeus Typ B 5050	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
cDNA Cycler	Eppendorf Master Cycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Digitalkamera	Canon Power Shot G10	Canon, Tokio, JPN
Dissoziator	gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Gewebeentwässerungs-automat	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek GmbH, Alphen aan den Rijn, NLD
Kühlplatte	Leica EG 1150c	Leica, Wetzlar, DE
Mikroskop	Axio Imager.M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikroskop	Axio Observer.Z1/7	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Paraffinstreckbad	Medax 25900	MEDAX, Neumünster, DE
Pipetten	Einkanalpipetten, Mikroliterpipetten: 0,5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Realtime-PCR System	StepOnePlus™	Life Technologies, Eugene, OR, USA
RNA-Spektrometer	Nanodrop-1000	Peqlab, Erlangen, DE

Rotationsmikrotom	RM2255	Leica , Wetzlar, DE
Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle	Stemi 2000-C KL 1500 LCD	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge	Centrifuge 5481 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Ort
Deckgläschen 24x60mm	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, DE
Einbettkassetten	Leica, Wetzlar, DE
Einmal-Injektions-Kanüle, Größe 17	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Eppendorf-Cups: 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Falcons 50ml	Corning Science Mexico, MEX
gentleMACS™ M Röhrchen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Objektträgerkasten	CEESEM, Marburg, DE
Objektträger weiß mit Mattrand, SuperFrost Plus® 25mm x 75mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE
Pipettenspitzen mit Filter: 10µl, 100µl, 200 µl, 1000µl	Starlab GmbH, Hamburg, DE
Spritzen: 1ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Stripetten: 5ml, 10ml, 25ml	Corning Incorporated, New York, USA
Tücher	WEPA Professional GmbH, Amsberg, DE

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 Substanzen

Substanz	Katalognummer	Hersteller, Ort
<i>Antigen Unmasking Solution</i> (Auf Citratbasis)	H-3300-250	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Chloroform	Y015.2	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
DAB-Substrate Kit DAB + Chromogen	DAB-530	Zytomed Systems, Berlin, DE
Ethanol absolut	85033.360	VWR Chemicals, Radnor, USA
Fischhautgelatine	G7765	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd 4%, phosphatgepuffert	3105.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Hoechst 33342	H1399	Invitrogen, CA, USA
Lithiumchlorid	105679	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Mayers Hämalaunlösung	1092490500	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Methanol	106012	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumacetat	106281	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	109137	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Öl-rot-O	O0625	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Pferdeserum	H1270	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roticlear	A538.5	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Roti-Mount (Eindeckmedium)	HP68.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
TRIzol™ Reagenz	15596018	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween20	9127.1	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Hersteller, Ort
Blockierlösung (Dreifachfärbung)	Pferdeserum wird 1:10 in Gelatine-Mix eingesetzt	
Blockierlösung (Mac2- Färbung)	10 % 10xTBS, 10 %FCS, 1 % BSA ad destilliertes Wasser	
EDTA	100 mM EDTA 0,9 % NaCl pH 7	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Eosin 1%	1g Eosin Y Dinatrium-Salz in 100ml destilliertem Wasser 0,05% Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 96%	159010	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE
Ethanol 70%	85825.360	VWR Chemicals, Radnor, USA

Gelatine-Mix	3 g Fischhautgelatine in 500 ml 1xPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H ₂ O ₂	3% H ₂ O ₂ 1:10 mit 1xPBS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Öl-rot-O-Färbelösung	35 ml 0,5% Öl-rot-O (in Methanol) 10 ml 1 M NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl) 1%	1 % HCl in destilliertem Wasser	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
1% BSA	1 g BSA in 100 ml 1xPBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.5 Arzneimittel und Substanzen für die Behandlung der Tiere

Tabelle 5 Arzneimittel und Substanzen für die Behandlung der Tiere

Arzneimittel/Substanzen zur Behandlung	Zusammensetzung	Hersteller, Ort
Dextrannatriumsulfat (<i>dextran sodium sulfate</i> , DSS) 36-50 kDa	1 % DSS in destilliertem Wasser	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, DE
Tamoxifen	20 mg Tamoxifen in 2 ml Erdnussöl gelöst	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

2.1.6 Kits

Tabelle 6 Kits

Kit	Katalognummer	Hersteller, Ort
Autofluorescence-Quenching-Kit TrueVIEW®	SP-8400-15	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG Kit	11733046	Invitrogen, CA, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	205313	Qiagen, Hilden, DE
RNA Clean & Concentrator-25 Kit	R1018	Zymo Research, Irvine, CA, USA

2.1.7 Erstantikörper

Tabelle 7 Erstantikörper

Erstantikörper	Hersteller, Ort	Katalognummer	Verdünnung
Monoklonaler Anti-Aktin, α -Glattmuskel-Cy3™ Maus-Antikörper	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C6198	1:400
Ratte-Anti-Mac2 (Mac2-Färbung)	Cedarlane, Burlington, CAN	CL8942AP	1:1000 (Mac2-Färbung) 1:100 (Dreifachfärbung)
Ziege-Anti-GFP	Abcam, Cambridge, UK	Ab6673	1:50

2.1.8 Zweitantikörper

Tabelle 8 Zweitantikörper

Zweitantikörper	Hersteller, Ort	Katalognummer	Verdünnung
Esel-Anti-Ziege-IgG-Alexa Fluor® 488	Invitrogen, CA, USA	A32814	1:200
Ziege-Anti-Ratte-Alexa Fluor® 647	Invitrogen, CA, USA	A-21247	1:200
Ziege-Anti-Ratte IgG2a HRP	Novus Biologicals, Wiesbaden, DE	NB7126	1:1500

2.2 Versuchstiere

Verwendet wurden männliche SMC *YFP^{+/+}Apoe^{-/-} (Myh11-CreER^{T2} ROSA26 floxed STOP eYFP^{+/+} Apoe^{-/-})* Mäuse im Alter von 6 Wochen, die auf Grund der *Apoe*-Defizienz spontan atherosklerotische Läsionen ausbilden.

Durch Kreuzung einer *Myh11-CreER^{T2} ROSA floxed STOP eYFP^{+/+}*-Maus und einer *Apoe^{-/-}*-Maus wurden in dieser Mauslinie zwei Modelle, die *Apoe*-Defizienz und das *Lineage tracing* System, vereint. Durch die *Apoe*-Defizienz wird das Ausbilden von Läsionen in den Gefäßen sichergestellt (Plump *et al.*, 1992). In dieser Arbeit exprimierten die Mäuse kein ApoE-Protein, welches unter normalen Umständen Cholesterin aufnimmt und zur Leber transportiert. Die Mäuse sind somit nicht mehr in der Lage Cholesterin abzubauen und es reichert sich in den Gefäßen weiter an. Durch Akkumulation entstehen ohne zusätzliche fettreiche Diäten atherosklerotische Plaques (Kennedy *et al.*, 2010; Plump *et al.*, 1992). Das *Lineage tracing* System dient hier der Verfolgung der SMC.

Die Mäuse wurden aus dem Owens Labor der Universität von Virginia in Charlottesville, USA bezogen und in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Standardbedingungen gezüchtet und gehalten. Den Tieren standen Futter und pathogen-freies Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Alle geplanten Versuche wurden nach den gesetzlichen Vorgaben nach § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) geprüft und genehmigt. Das Aktenzeichen lautet: Az. 84-02.04.2015.A364.

Alle *in vivo* Behandlungen inklusive der Tötung und der Organentnahme wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf durchgeführt. Es wurde jedoch bei der Organentnahme unterstützt. Die der Präparatgewinnung folgende Paraffineinbettung wurde ebenso von Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf übernommen. Alle weiteren *ex vivo* Gewebepreparationsschritte wie das Anfertigen von Paraffinschnitten, das Durchführen der Färbungen mit H&E, Öl-rot-O, Mac2 und einer Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 wurden von der Verfasserin unternommen. Die Schritte der Bestimmung der mRNA-Expression bis auf die *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), welche von der technischen Assistentin, Peggy Marra-Mann durchgeführt wurden, wurden ebenfalls von der Verfasserin erledigt sowie die nachfolgende Auswertung der Ergebnisse.

2.3 Das *Lineage tracing* Modell zum Nachweis des Phänotyp-Switches

Das *Lineage tracing* Modell beruht auf dem Prinzip der Expression eines fluoreszierenden Gens und gibt somit die Möglichkeit die Zelle zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops zu identifizieren. Dadurch kann der Genotyp auch bei Änderung des Phänotyps weiterhin ausfindig gemacht werden. In der Abbildung 3 ist das fluoreszierende Gen, das *YFP*-Gen, welches im Nukleus der Kontrolle des Promoters *Reverse oriented splice acceptor 26* (ROSA26) und einer geflochten STOP-Sequenz unterliegt, dargestellt. Für die Aktivierung des *YFP*-Gens ist die Behandlung mit Tamoxifen entscheidend. Da die *cyclization recombinase* (CRE-Rekombinase) unter Kontrolle eines SMC spezifischen MYH11 Promoters steht, wird sichergestellt, dass nur SMC detektiert werden (Miano *et al.*, 1994). Wichtig für das Verständnis ist also, dass nur SMC die CRE-Rekombinase herstellen. Damit die CRE-Rekombinase nicht durchgehend aktiviert ist, wurde die CRE-Rekombinase mit dem liganden-abhängigen Östrogenrezeptor Typ 2 (ER(T2)) fusioniert, der durch Zugabe von Tamoxifen aktiviert wird (Chakraborty *et al.*, 2019; Feil *et al.*, 1996). Die sich im Cytoplasma befindliche CRE-Rekombinase gelangt als Komplex mit dem ER(T2) und mit Tamoxifen in den Zellkern (Herring *et al.*, 2014). Im Zellkern befindet sich das *YFP* Gen, welches am Promoter ROSA26 sowie an einer STOP-Sequenz sitzt, die wiederum die Expression von *YFP* verhindert. Der Komplex aus CRE-Rekombinase, ER(T2) und Tamoxifen induziert eine Rekombination mit Schleifenbildung der geflochten Stellen und

nachfolgender Abspaltung der STOP-Sequenz (Chakraborty *et al.*, 2019). Nach Abspaltung liegt das *YFP*-Gen frei und kann für die Transkription abgelesen werden. Die SMC können anschließend mit dem Mikroskop detektiert werden.

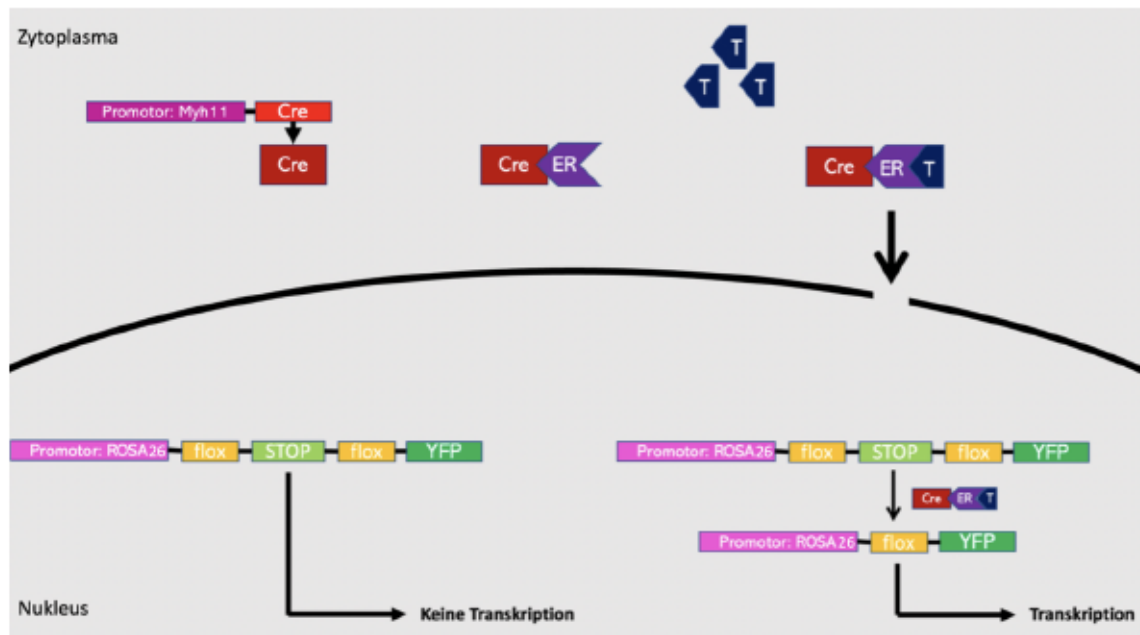


Abbildung 3 Aktivierung der YFP Expression

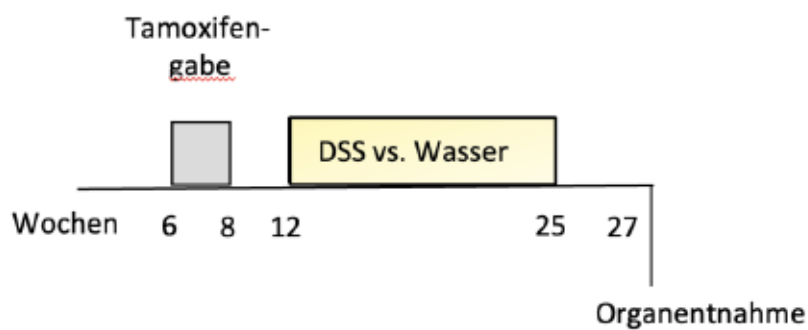
Die Abbildung zeigt das Zytoplasma oben und den Nukleus unten. Nach Andocken von Tamoxifen an den ER(T2)-Rezeptor, ist der Komplex aus Cre-Rekombinase, ER(T2) und Tamoxifen in der Lage, in den Nukleus zu gelangen und dort durch Entfernen der STOP-Sequenz die Transkription des *YFP*-Gens zu aktivieren. Die Abbildung wurde in Anlehnung an die Beschreibungen des Systems von Chakraborty *et al.* und Herring *et al.* hergestellt. Abkürzungen: Cre, *cyclization recombinase*; ER, Östrogenrezeptor; flox, *flanked by loxP*; Myh11, *myosin heavy chain 11*; ROSA 26; *reverse oriented splice acceptor clone 26*; T, Tamoxifen.

2.4 Studiendesign

Die oben beschriebenen Versuchstiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Interventionsgruppe bekam Trinkwasser mit DSS und die Kontrollgruppe nur Wasser. Um die YFP-Expression zu aktivieren, wurde den Tieren zunächst ab der 6. Woche für zwei Wochen 100 µl Tamoxifen intraperitoneal injiziert (Abbildung 4 A). Zuvor wurden 20 mg Tamoxifen in 2 ml Erdnussöl auf einem 55 °C warmen Heizblock gelöst. Die anschließende Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C. Die Tamoxifen-Injektion wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt mit anschließender 2-tägiger Pause. Nach insgesamt 2-wöchiger Behandlung mit Tamoxifen folgte eine 4-wöchige Auswaschphase bevor mit der DSS-Applikation begonnen wurde. Die Induktion der

chronischen Kolitis erfolgte in der Interventionsgruppe durch die Gabe von 1%igem DSS (36-50 kDa großes DSS-Salz) über das Trinkwasser. Um eine chronische Kolitis zu erreichen, wurde das DSS ab der achten Lebenswoche in 5 Zyklen verabreicht. Dabei bestand jeder Zyklus aus einer 6-tägigen DSS-Applikation und einer 14-tägigen Erholungsphase mit Trinkwasser (Abbildung 4 B). Die Kontrollgruppe erhielt ebenso Trinkwasser.

A



B

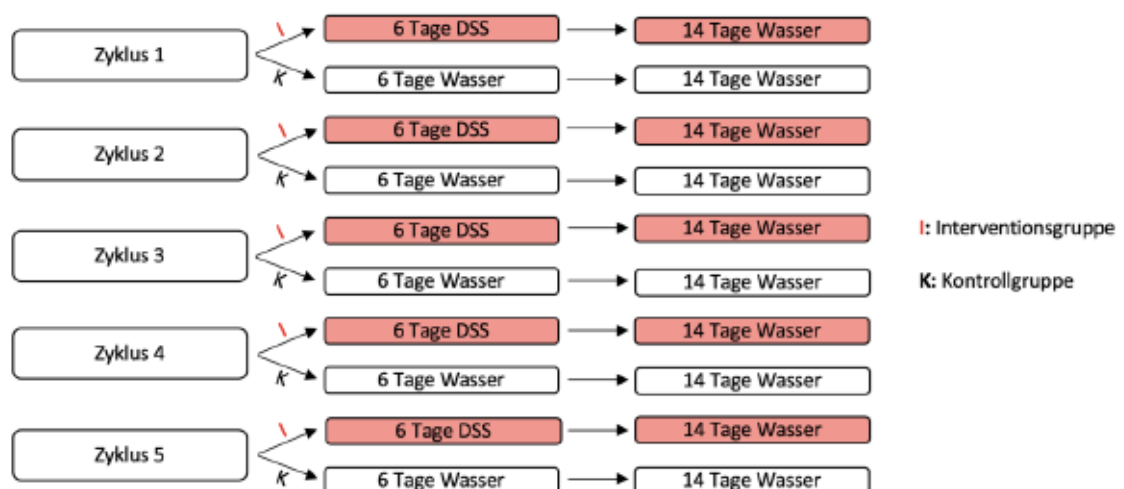


Abbildung 4 Studiendesign

(A) Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Studiendesigns. In den Wochen sechs bis acht wurden den Tieren beider Gruppen Tamoxifen injiziert. Ab Woche zwölf wurde der Interventionsgruppe DSS verabreicht und der Kontrollgruppe Trinkwasser. Nach der 27. Woche wurden die Tiere für die Organentnahme getötet. (B) Zu sehen ist der Plan für die Induktion der chronischen Kolitis, bestehend aus 5 Zyklen. Die Interventionsgruppe wird hier mit einem roten I und die Kontrollgruppe mit einem schwarzen K bezeichnet.

2.5 Gewebepräparation und Vorbereitung der Präparate

Für die Untersuchung der Kolitis, der Plaqueentwicklung und des Phänotyp-Switches wurden immunhistologische Bilder vorbereitet, anhand derer die Auswertung der Plaques hinsichtlich der Plaqueprogression und des Phänotyp-Switches vorgenommen werden konnte sowie die Beurteilung des Schweregrades der Kolitis an Darmpräparaten. In der Abbildung 5 ist die Aorta mit ihren Gefäßabgängen dargestellt. Die für die Auswertung der Plaques zu untersuchenden Strukturen sind markiert.

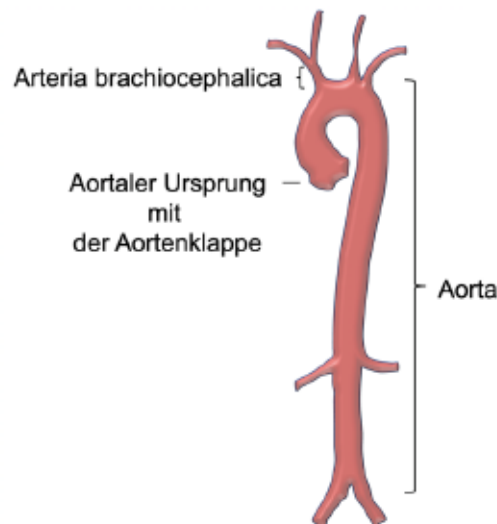


Abbildung 5 Die Aorta

Dargestellt ist die Aorta mit ihren Abgängen. Für diese Arbeit wurde die gesamte Aorta im Längsschnitt untersucht. Zusätzlich wurden Präparate von der *Arteria brachiocephalica* und der Aortenklappe des aortalen Ursprungs im Querschnitt erstellt. Die gekennzeichneten Strukturen wurden in dieser Arbeit näher untersucht.

2.5.1 Präparatgewinnung

Die Tiere wurden in einem Lebensalter von 27 Wochen durch Kohlendioxid (CO₂) tierschutzgerecht euthanasiert. Zunächst wurde Blut aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen, mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoaguliert und nach abgeschlossener Präparatgewinnung zur Plasmagewinnung für weitere Auswertungen außerhalb dieser Dissertation aufgearbeitet. Bevor die Organe für die Weiterverarbeitung herausgenommen wurden, wurde das Gefäßsystem mit *phosphate buffered saline* (PBS) gespült, um ein möglichst blutfreies Arbeiten zu gewährleisten. Der Darm wurde zwischen Rektum und Appendix entfernt und längs in zwei Teile geteilt, wobei ein Teil für die Histologie schneckenförmig aufgerollt wurde, sodass das aborale Ende in der

Mitte zu liegen kommt und das orale Ende außen (Abbildung 6). Der zweite Teil wurde für die Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in Stickstoff tiefgefroren.

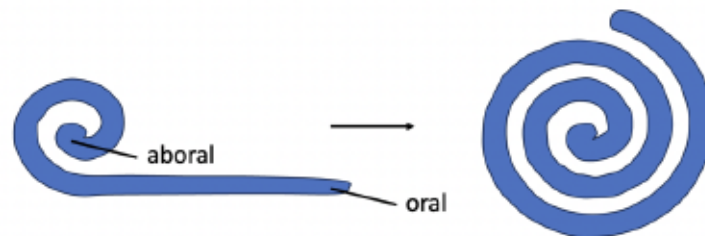


Abbildung 6 Schematische Darstellung des schneckenförmigen Aufrollens des Darmpräparates

Nachdem das entnommene Darmstück zwischen Rektum und Appendix längs geteilt wurde, wird es für die Paraffineinbettung schneckenförmig aufgerollt, sodass der aborale Teil zentral zu liegen kommt und sich der orale Teil außen befindet.

Die *Arteria (A.) brachiocephalica* (BCA) wurde an ihrem Abgang aus der Aorta sowie an der Bifurkation zu der rechten *A. subclavia* und der rechten *A. carotis communis* getrennt. Zudem wurde die Aorta mit dem Herzen entnommen und anschließend kurz über dem Ursprung vom Herzen abgetrennt. Der Darm, die BCA, die Aorta und das Herz wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 4% Formaldehyd für die weitere Aufarbeitung gelagert. Nach 24-stündiger Fixation wurden die Gewebeteile bei 4 °C in 1xPBS bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die Aorta wurde unter einem Stereomikroskop von umliegendem Gewebe vorsichtig freipräpariert und Gefäßabgänge wurden entfernt.

Folgend wurden auch Leber, Milz und epifasiales Fettgewebe für andere Versuche oder für zusätzliche aufkommende Fragestellungen außerhalb dieser Dissertation in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen tiefgefroren. Alle in Stickstoff eingefrorenen Organe wurden anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.5.2 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Die Gewebeteile Herz, Darm und BCA wurden, nach der Lagerung in 1xPBS, entwässert und von Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf in Paraffin eingebettet. Dafür wurde das Herz in der Mitte geteilt, da der untere Teil mit der Herzspitze in dieser Dissertation nicht von Interesse ist und wurde anschließend in die Einbettkassetten aufgestellt. Die BCA wurden

ebenso aufgestellt und die zuvor schneckenförmig eingerollten Darmabschnitte wurden in die Einbettkassetten gelegt.

Zum Herstellen von Schnitten vom eingebetteten Gewebe wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Die Paraffinblöcke wurden dabei präzise in Scheiben gleicher Dicke geschnitten, welche anschließend im Wasserbad gestreckt wurden, um sie dann auf beschichtete Objektträger aufzuziehen. Bei ca. 62 °C wurden diese für eine Stunde hitzefixiert und bis zum weiteren Vorgehen in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.5.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Im gesamten Gefäßsystem herrschen verschiedene Strömungsverhältnisse. Atherosklerotische Plaques bilden sich dabei bevorzugt an Verzweigungen da hier ein turbulenter Blutfluss herrscht (Conway und Schwartz, 2013; Prado *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Abschnitte analysiert.

Die Aortenklappe bildet den zuvor erwähnten Ursprung der Aorta und trennt somit den linksventrikulären Ausflusstrakt vom Aortenbulbus. Sie ist aufgrund der hämodynamischen Verhältnisse prädisponiert für Plaques. Die Schnittrichtung erfolgte von der Herzmitte in Richtung Herzbasis. Die Aortenklappe setzt sich aus drei Taschen zusammen und wird deshalb auch als Taschenklappe bezeichnet. Sobald eine der drei Taschen zu sehen war wurde jeder Schnitt mit einer Dicke von 5 µm aufgenommen. Im Verlauf musste der Block mit dem Präparat fallweise nachjustiert werden, bis eine Ansicht erreicht werden konnte, die der Abbildung 7 glich. Dabei ordnete man jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger und schnitt konsekutiv weiter bis die Aortenklappe bzw. der Ursprung nicht mehr zu sehen war. Für jede Maus wurde anschließend ein Schnitt mit allen drei Taschen ausgewählt und mit Mac2 gefärbt.



Abbildung 7 Die Aortenklappe des aortalen Ursprungs im Querschnitt

Dargestellt ist die Aortenklappe des aortalen Ursprungs im Querschnitt mit den drei Taschen.

Die BCA wurde so in Paraffin eingebettet, dass sich beim Schneiden eine Schneiderichtung von dem Aortenabgang in Richtung Aufzweigung in die rechte *A.subclavia* und die rechte *A.carotis communis* ergab und sich somit Querschnitte des Gefäßes präsentierten. Sobald eine runde geschlossene Struktur zu erkennen war und der Querschnitt somit eingestellt war, wurden die Schnitte der BCA auf Objektträger transferiert. Für jeden Schnitt wurde an dieser Stelle eine Dicke von 10 µm gewählt, da diese Dicke für die anschließende Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 benötigt wurde. Es wurden konsekutiv drei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und erst bei der Aufteilung der Arterie in die rechte *A.subclavia* und die rechte *A.carotis communis* wurde das Schneiden beendet. Da auch innerhalb eines Gefäßes die Atheroskleroseprogression variiert, wurden anschließend drei Ebenen im Abstand von 300 µm zueinander betrachtet. Die Bereiche in 180 µm, 480 µm und 780 µm Entfernung zur Aorta wurden mit H&E (Kapitel 2.6.1) gefärbt und die Bereiche in 210 µm, 510 µm und 810 µm Entfernung zur Aorta wurden einer Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 (Kapitel 2.6.4) unterzogen.

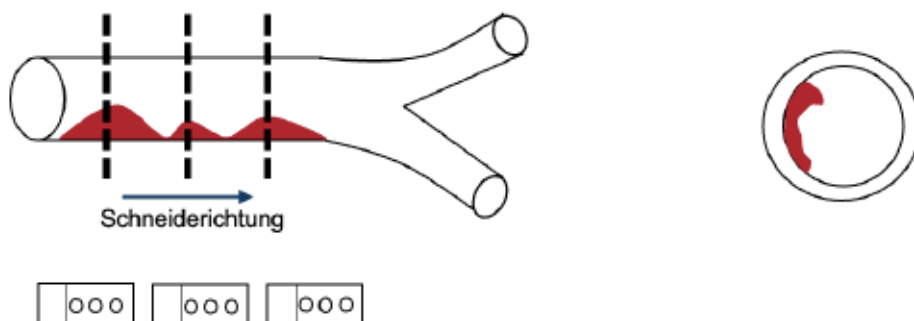


Abbildung 8 Eine Illustration der BCA im Längs- und Querschnitt

Dargestellt ist auf der linken Seite die BCA im Längsschnitt. Die Schneiderichtung erfolgte von dem Aortenabgang in Richtung Aufzweigung in die rechte *A.subclavia* und die rechte *A.carotis communis*. Die Plaques können sich im Gefäßverlauf an verschiedenen Stellen in unterschiedlich starker Ausprägung entwickeln. So wurden definierte Bereiche gewählt und für jeden Bereich ergab sich ein Objektträger mit drei konsekutiv aufgenommenen Schnitten. Auf der rechten Seite ist ein Gefäß mit einem Plaque im Querschnitt zu erkennen.

Die Schnittebene für den zuvor in schneckenform eingerollten Darm so ausgewählt, dass die meisten Krypten parallel ausgerichtet waren. Für die Auswertung wurde anschließend ein 5 µm Schnitt verwendet und mit H&E gefärbt.

2.6 Färbungen

2.6.1 H&E-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Standardfärbung, die der morphologischen Untersuchung einen Überblick von verschiedenen Gewebearten ermöglicht und somit Hinweise auf pathologisch veränderte Strukturen gibt. Dafür wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet: Hämalan färbt basophile Strukturen, wie z.B. DNA und ist somit zur Kernfärbung geeignet. Eosin wird als Gegenfärbung genutzt und färbt eosinophile Strukturen, wie z.B. Komponenten des Zytoplasmas, Zellproteine und Kollagen. Vor der Färbung erfolgte für dreimal 15 Minuten die Entparaffinierung der Paraffinschnitte mit *Roticlear* sowie eine Rehydrierung in einer in der Konzentration absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol absolut, 96% und 70 % für je zwei Minuten. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in 1xPBS und für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für eine Minute in Hämalan überführt wurden. Hämatoxylin ist ein natürliches Färbemittel, welches als basischer Farbstoff saure Komponenten blau anfärbt. Damit Hämatoxylin die Färbereigenschaft erhält, wird es zunächst zu Hämalan oxidiert. Im sauren Bereich geht es mit basophilen Strukturen eine Bindung ein und erscheint zunächst rot. Im Folgenden wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser und in 1% Salzsäure (HCl) getaucht. Erst mit dem Anheben des *potentia hydrogeni* (pH)-Wertes erreicht man den Farbumschlag in die blau/violette Farbe. Dieser Prozess wird als Bläuen bezeichnet. Dafür wurden die Schnitte für 10 Minuten in fließendes Leitungswasser gehalten. Dafür wurde die Küvette so unter den Wasserstrahl platziert, dass in der gesamten Küvette ein gerichteter Fluss herrscht, ohne dabei direkt mit Druck auf die Objektträger zu fließen.

Eosin wurde anschließend für die Gegenfärbung genutzt. Im Gegenzug zu Hämalan ist Eosin ein synthetischer Farbstoff, welcher negativ geladen ist und eosinophile Strukturen rot anfärbt. Für ein intensiveres Farbergebnis wurden 10 µl Eisessig zu 150 ml Eosin hinzugefügt und für eine Minute zu den Schnitten gegeben. Nach der Färbung wurden die Schnitte wiederum für je 2 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol 70%, 96% und absolut gebracht, 5 Minuten mit *Roticlear* geklärt und dann mit *Roti-Mount* eingedeckt, was dem gefärbten Gewebe zum einen Schutz vor Staub oder Schädigungen bietet, sodass damit auch das Lagern der Schnitte ermöglicht wird. Zum anderen verbessert es die Qualität der Schnitte für die mikroskopische Betrachtung.

2.6.2 Öl-rot-O-Färbung

Öl-rot-O (ÖRO) ist ein synthetischer Farbstoff der Gruppe der Azofarbstoffe. Die Farbe kommt durch die Stickstoff-Doppelbindung zustande, durch die auch energiearmes und langwelliges Licht absorbiert und sichtbar gemacht werden kann. Der rote fettlösliche Azofarbstoff wird für die quantitative Analyse der atherosklerotischen Plaques verwendet, indem Triglyzeride und proteingebundene Lipide angefärbt werden.

Für die Waschschrirte wurde 78%iges Methanol benötigt. Zur Herstellung der ÖRO-Färbelösung wurde ÖRO in einer Konzentration von 0,5% in Methanol gelöst und anschließend mit Natriumhydroxid (NaOH) vermischt (Tabelle 4). Diese Färbelösung wurde anschließend durch ein Filterpapier filtriert, um grobe Farbrückstände zu entfernen. Für die Färbung wurde wie in der Abbildung 9A dargestellt eine Mikrotiterplatte benutzt, wobei die erste sowie die dritte Reihe für das Waschen mit 78%igem Methanol vorgesehen waren und die zweite Reihe mit der Färbelösung aufgefüllt wurde. Nachdem die Aorten sorgfältig von der Adventitia befreit wurden, wurden sie zunächst für 5 Minuten in die erste Reihe mit Methanol gebracht, daraufhin für 90 Minuten in die Färbelösung überführt und abschließend nochmals 5 Minuten in Methanol gewaschen. Im Anschluss wurden die Aorten der Länge nach aufgeschnitten und aufgeklappt (Abbildung 9 B).

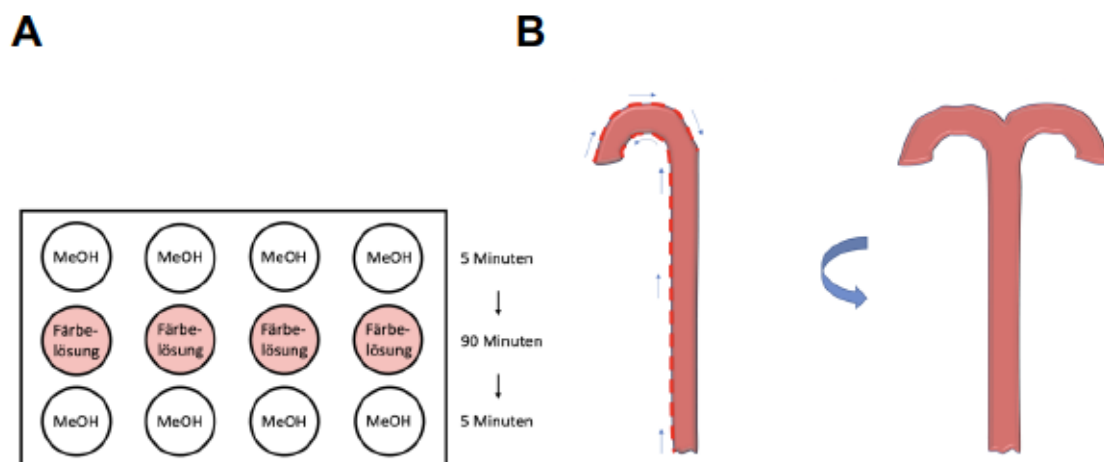


Abbildung 9 Öl-rot-O-Färbung

(A) Die Abbildung zeigt die schematische Abfolge der drei Schritte der Öl-rot-O-Färbung. Nach 5-minütigem Eintauchen der Schnitte in Methanol folgt eine 90-minütige Inkubation in der Färbelösung und abschließend ein erneutes Waschen in Methanol für 5 Minuten. **(B)** Die Aorta wurde entlang der gestrichelten Linie in Pfeilrichtung aufgeschnitten und aufgeklappt. Abkürzungen: Methanol, MeOH.

2.6.3 Mac2-Färbung

Für die Identifizierung von Makrophagen wurde der spezifische Marker Mac2, welcher von dem *LGALS3* Gen kodiert wird, verwendet. Die immunhistochemische Mac2-Färbung wurde nach einem bereits etablierten Protokoll durchgeführt.

Zunächst erfolgte der Schritt der Entparaffinierung. Dafür wurden die Schnitte dreimal für 15 Minuten in *Roticlear* getaucht und anschließend für jeweils zwei Minuten in die absteigende Alkoholreihe mit Ethanol absolut, 96% und 70% gebracht. Daraufhin erfolgte ein 15-minütiger Waschschriff in 1xPBS. Sich diesem anschließend wurde ein Blockierschritt mit einer Blockierlösung bestehend aus *tris buffered saline* (TBS), *fetal calf serum* (FCS) und *bovine serum albumin* (BSA) für eine Stunde bei RT eingeleitet. Der Blockierschritt ist wichtig, um die erforderliche chemische Basis zu schaffen und unspezifische Signale durch Lösen unspezifischer Proteinbindungen zu verhindern. Folgend wurde der 1. Antikörper, Ratte-Anti-Mac2 in einer Verdünnung von 1:1000 in 1%BSA/1xPBS auf einen Schnitt pro Objektträger pipettiert. Auf den zweiten Schnitt wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus 1%BSA/1xPBS ohne Antikörper gegeben. Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal für 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte für 5 Minuten eine Blockierung mit 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und dann ein erneuter Waschschriff in 1xPBS. Der 2. Antikörper, *anti-rat* IgG2a HRP wurde in einer Verdünnung von 1:1500 in 1xPBS auf alle Schnitte gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 Minuten in 1xPBS gewaschen. Daraufhin wurde der Detektionsschritt eingeleitet. Dafür wurden die Schnitte für 10 Minuten in *tris buffer* (TB) gewaschen und anschließend mit Diaminobenzidin (DAB) inkubiert. Die Detektion erfolgte unter ständiger Beobachtung und wurde nach 5 Minuten bei ausreichendem Signal mit einer erneuten 5-minütigen Waschung in TB gestoppt. Die Schnitte wurden dann zusätzlich für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen.

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für eine Minute in Hämalaun getaucht. Anschließend wurden sie kurz in Leitungswasser gegeben und dann in 1% HCl, bevor sie für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden. Nach dem Bläuen erfolgte ein letzter Waschschriff für eine Minute in destilliertem Wasser. Vor dem Eindecken wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol 70%, 96%

und Ethanol absolut überführt und für 5 Minuten in *Roticlear* getaucht. Abschließend wurden die Schnitte mit *Roti Mount* permanent eingedeckt.

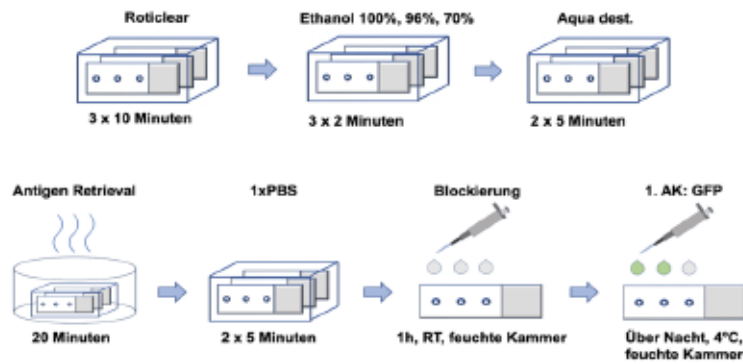
2.6.4 Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2

Die Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 dient der Identifizierung der Zellen im atherosklerotischen Plaque. Mit dem Antikörper *green fluorescent protein* (GFP) wird YFP detektiert. Während GFP direkt von der Qualle *Aequorea Victoria* stammt, ist YFP eine genetische Mutante des GFP-Proteins (Dąbrowski *et al.*, 1999). Der GFP-Antikörper ist in der Lage auch Varianten des GFP-Proteins wie YFP zu erkennen. Wie bereits im Kapitel 1.5 erklärt, befindet sich YFP in Zellkernen von glatten Muskelzellen und ermöglicht somit deren Identifizierung. Mac2 ist ein Marker für Makrophagen und Cyanid 3 (Cy3) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an den Anti-ACTA2-Antikörper gebunden ist und so der Ermittlung von glatten Muskelzellen dient.

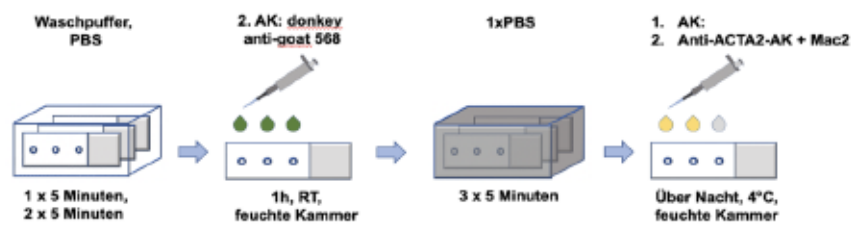
Die Färbung wurde an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dafür wurden für jedes Tier drei Schnitte der BCA mit einem Abstand von 300 µm ausgewählt, um eine repräsentative Aussage zu gewährleisten. Zunächst wurden die Schnitte für die Entparaffinierung dreimal einer jeweils 10-minütigen Roticlearreihe zugeführt und anschließend zum Rehydrieren dreimal einer jeweils 2-minütigen absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol absolut, 96% und 70% (Abbildung 10A). Dann folgte für zweimal fünf Minuten ein Waschschriff in destilliertem Wasser. In der Zeit wurde das *Antigen Retrieval* vorbereitet, indem 750 µl *Antigen Unmasking Solution* in 80 ml destilliertem Wasser verdünnt wurde. Das *Antigen Retrieval* ist notwendig, um die Antigene besser zugänglich zu machen. Durch die Fixierung der Gewebeproben verlieren diese ihre übliche Anordnung. Mit dem *Antigen Retrieval* wird die Sensitivität wieder hergestellt. Die Schnitte wurden zunächst für 15 Minuten mit Dampf behandelt und dann für 30 Minuten bei RT abgekühlt. Es folgte ein 10-minütiger Waschschriff in 1xPBS. Als nächstes wurde ein Gelatine-Mix fertiggestellt, der bei 4 °C gelagert wird und die darauffolgenden Tage ebenso genutzt wurde. Für den Gelatine-Mix wurden 3 g Fisch-Gelatine ad 500 ml 1xPBS verwendet. Für die Blockierschritte und für die Verdünnung der Antikörper wurde eine Blockierlösung hergestellt, wobei ein Pferdeserum 1:10 im Gelatine-Mix verdünnt wurde. Zur Blockierung wurden auf jeden Gewebeschnitt 20 µl Blockierlösung pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Dann wurde der 1. Antikörper, Ziege-Anti-GFP 1:50 in Blockierlösung verdünnt und pro Objektträger auf

zwei Schnitte gegeben. Auf den dritten wurde eine Negativkontrolle, nur aus Blockierlösung bestehend, gegeben. Bis zum nächsten Tag wurden die Schnitte bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am zweiten Tag wurde zuerst der Waschpuffer für den nächsten Waschschrift vorbereitet. Für die Herstellung des Waschpuffers wurde dem Gelatine-Mix Tween20 in einer Konzentration von 0,1% (v/v) beigelegt. Die Schnitte wurden für 5 Minuten im Waschpuffer und 10 Minuten in 1xPBS gewaschen (Abbildung 10B). Anschließend wurde der 2. Antikörper, Esel-Anti-Ziege-IgG-Alexa Fluor 488 1:200 mit der Blockierlösung verdünnt und auf alle Schnitte pipettiert. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei RT in einer feuchten und dunklen Kammer inkubiert. Für die weitere Durchführung war das Arbeiten im Dunkeln von großer Bedeutung, um das Ausbleichen der Schnitte zu minimieren. Durch wiederholte Lichteinstrahlung kann sich nämlich die Leuchtkraft verringern und die Qualität kann damit beeinträchtigt werden. Nach einem weiteren Waschschrift für 15 Minuten in 1xPBS wurde der 1. Antikörper, Monoklonaler Anti-Aktin α -Glattmuskel Cy3 in einer Verdünnung 1:400 mit der Blockierlösung und der 1. Antikörper Ratte-Anti-Mac2 in einer Verdünnung 1:100 fertiggestellt und auf die Positivkontrollen der Objektträger gegeben. Als Negativkontrolle wurde reine Blockierlösung verwendet. Die Objektträger wurden zum Inkubieren bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer gelassen (Abbildung 10B). Am dritten Tag wurden die Schnitte zunächst für 5 Minuten im Waschpuffer sowie für 10 Minuten in 1xPBS gewaschen (Abbildung 10C). Daraufhin wurde der 2. Antikörper Ziege-Anti-Ratte-Alexa Fluor 647 in der Verdünnung 1:200 mit Blockierlösung auf alle Schnitte gegeben und für 1 Stunde bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte für 15 Minuten in 1xPBS gewaschen. Dem schloss sich der *Quenching Step* an, um die Autofluoreszenz auszulöschen. Dafür wurde nach Herstellerangaben das *Autofluorescence-Quenching-Kit TrueVIEW®* verwendet. Daraufhin wurden die Schnitte einem weiteren Waschschrift für 5 Minuten in 1xPBS unterzogen. Für die anschließende Kernfärbung wurde *Hoechst 33342* in der Verdünnung 1:10.000 in 1xPBS verwendet. Bevor die Schnitte mit *Vectashield Vibrance Antifade Mounting Medium*, das zum oben genannten *Autofluorescence-Quenching-Kit TrueVIEW®* dazugehört, eingedeckt wurden, wurden diese ein letztes Mal für 5 Minuten im Waschpuffer und für 10 Minuten in 1xPBS gewaschen.

A



B



C

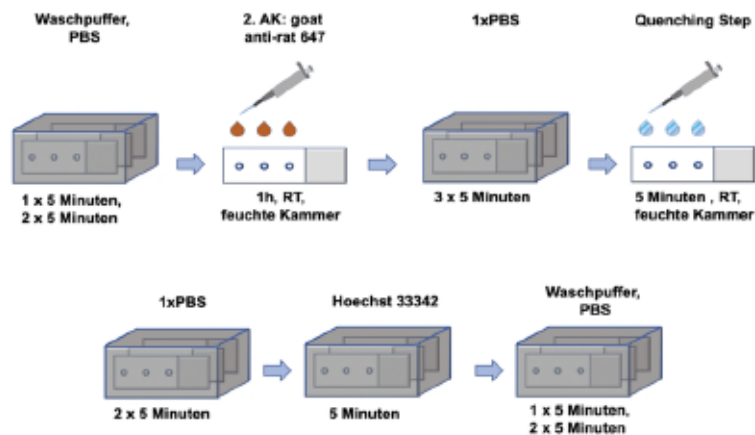


Abbildung 10 Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2

(A) Am ersten Tag wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert sowie mit Alkohol behandelt und anschließend einem *Antigen Retrieval* unterzogen. Nach einem Waschschrift wurden die Schnitte mit einer Blockierlösung blockiert und anschließend mit GFP gefärbt. (B) Der zweite Tag bestand aus einem Waschschrift und der Zugabe des Erstantikörpers Affe-Anti-Ziege-Alexa Fluor 568. Bevor die Schnitte mit den Erstantikörpern Anti-ACTA2-AK und Mac2 gewaschen wurden, erfolgte eine Waschung mit 1xPBS. (C) Am dritten Tag wurden die Schnitte erneut gewaschen bevor der Zweitantikörper Ziege-Anti-Ratte 647 zugegeben wurde. Es folgten der *Quenching Step* und die Kernfärbung mit *Hoechst 33342* mit dazwischen stattfindenden Waschschriften.

2.7 Bestimmung der mRNA-Expression

2.7.1 RNA-Isolation

Das DSS, das den Mäusen über das Trinkwasser zur Induktion der Kolitis verabreicht wurde, hemmt die reverse Transkriptase und die *TaqPolymerase* und erschwert damit die qPCR Amplifikation. Um diese Hemmung zu umgehen ist der Waschschrift mit 8M Lithiumchlorid (LiCl) von besonderer Wichtigkeit und gibt die Möglichkeit, die RNA trotz DSS-Behandlung vollständig zu reinigen (Viennois *et al.*, 2013).

Der erste Schritt beinhaltete die Gewebehomogenisierung. Dafür wurden die zuvor bei -80 °C gefrorenen Darmproben mit 700 µl Trizol in *gentleMACS™* Röhrchen gebracht und in einem mit ihnen kompatiblen Dissoziator lysiert. Die Röhrchen wurden dann für eine Minute bei 4 °C und bei einer Beschleunigungsgröße von 3000 g zentrifugiert. Der Inhalt wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 140 µl Chloroform vermischt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und einer Beschleunigungsgröße von 14000 g entstanden drei Phasen, wobei sich die RNA in der oberen flüssigen Phase befand (Abbildung 11A). Dieser flüssige Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Ethanol absolut in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß versetzt. In den weiteren Schritten wurde das *RNA Clean & Concentration Kit* von *Zymo Research* nach Herstellerangaben verwendet. Die Technik beruht auf einem einzigen Puffersystem sowie auf einem *Zymo Spin* Säulenmechanismus. Die in den Säulen integrierten Filter enthalten positiv geladene Silica-Partikel, die in der Lage sind, die negativ geladene RNA zu binden. Der Inhalt aus dem 1,5 ml Eppendorf -Reaktionsgefäß wurde in die Säule überführt und für 30 Sekunden bei 4 °C und einer Beschleunigungsgröße von 14000 g zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und es wurden jeweils 400 µl *RNA prep buffer* pipettiert. Es erfolgte anschließend ein erneuter Zentrifugationsschritt und die sich in der Säule befindliche Flüssigkeit wurde verworfen. Als nächstes wurden 700 µl *RNA wash buffer* pipettiert und nachfolgend wieder der Zentrifugationsschritt bei 14000 g durchgeführt. Die Flüssigkeit wurde ein weiteres Mal verworfen und es wurden anschließend 400 µl *RNA wash buffer* hinzugegeben. Die daraufhin folgende Zentrifugation erfolgte 2 Minuten bei 4 °C und einer Beschleunigungsgröße von 14000 g. Der Filter wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und es wurden 50 µl RNase freies Wasser zugegeben, um die aufgereinigte RNA zu eluieren. Abschließend wurden die Proben bis zum nächsten Schritt bei -80 °C eingefroren.

Der nächste Schritt begann mit der Zugabe von 8M LiCl in das RNase freie Wasser mit der aufgereinigten RNA in einem Verhältnis von 1:10. Die Proben wurden für zwei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und einer Beschleunigungszahl von 14000 g zentrifugiert, so dass sich ein Pellet am Boden mit der darin enthaltenen RNA bildete (Abbildung 11B). Der Überstand wurde abgesaugt und es folgte ein erneuter Waschschriff mit 200 µl RNase freiem Wasser und zusätzlich 20 µl LiCl. Nach 2 Stunden Inkubation und 30 Minuten Zentrifugation bei 14000 g wurde der Überstand abgesaugt und es folgte ein Waschschriff mit 200 µl RNase freiem Wasser, 20 µl Natriumacetat (NaAc) und 400 µl Ethanol 100%. Die Proben wurden wieder für zwei Stunden auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand wurde erneut abgesaugt. Es wurde dann 1 ml Ethanol 70% zugegeben und 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Proben wurden auf einer Wärmeplatte bei 60 °C gewärmt, bis keine Flüssigkeit mehr vorhanden war. Das verbliebene Pellet wurde mit 15 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und es folgte die RNA-Quantifizierung.



Abbildung 11 RNA-Isolation

(A) Die Abbildung zeigt die drei entstandenen Phasen, nachdem der Darm in Trizol lysiert und mit Chloroform vermengt wurde. Dazwischengeschaltet waren mehrere Zentrifugationsschritte. Die RNA befindet sich in der oberen flüssigen Phase und wurde für die weiteren Schritte verwendet. (B) Das für die Induktion der Kolitis über das Trinkwasser den Mäusen verabreichte DSS beeinflusst die reverse Transkriptase und die TaqPolymerase und macht damit die qRT-PCR Amplifikation unmöglich, weswegen die RNA in mehreren Schritten mit Lithiumchlorid gewaschen wurde. Dabei entstand nach jedem Wasch- und Zentrifugationsschritt ein Pellet, in dem die RNA enthalten ist. Der flüssige Überschuss wurde abgesaugt.

2.7.2 RNA-Quantifizierung

Die RNA Quantifizierung erfolgte mit dem RNA-Spektrometer *Nanodrop-1000*. Dabei wurden die Konzentration und Probenreinheit photometrisch bestimmt.

Zunächst musste ein Blindwert gemessen werden, indem RNase freies Wasser auf den Messsockel gegeben wurde. Dann wurde 1 µl der in Wasser gelösten RNA gemessen. Die Konzentration wurde vom Programm unter Verwendung des Lambert-beerschen Gesetzes berechnet. Sie wurde bei einer Absorption bei 260 nm bestimmt und als ng/µl angegeben. Die Probenreinheit errechnet sich aus dem Verhältnis des Absorptionsmaximums für die RNA bei 260 nm (A260) und des Absorptionsmaximums für Proteine bei 280 nm (A280). Ein Wert von $A_{260}/A_{280} = 2$ wird als rein angesehen.

2.7.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) aus der mRNA als Vorlage erfolgte mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von *Qiagen*. Das Kit besteht aus einem DNA *Wipeout Buffer*, aus der reversen Transkriptase (RTase), einem RTase *Buffer* und einem RTase *Primer Mix*. Zunächst musste die RNA so in 12 µl Wasser verdünnt werden, dass in der Probe eine RNA-Konzentration von 1 µg enthalten war. In einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde zur RNA 2 µl *Wipeout Buffer* gegeben und im *Cycler* für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert (Abbildung 12). In jedes Eppendorf Cup wurden 1 µl Primer, 1 µl Enzym und 4 µl Puffer pipettiert. Für die reverse Transkription wurde das Gemisch für 30 Minuten automatisch bei 42 °C erwärmt und anschließend für die Inaktivierung des Enzyms 3 Minuten auf 95 °C erhitzt (Abbildung 12). Abschließend wurden 100 µl RNase freies Wasser hinzugegeben und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

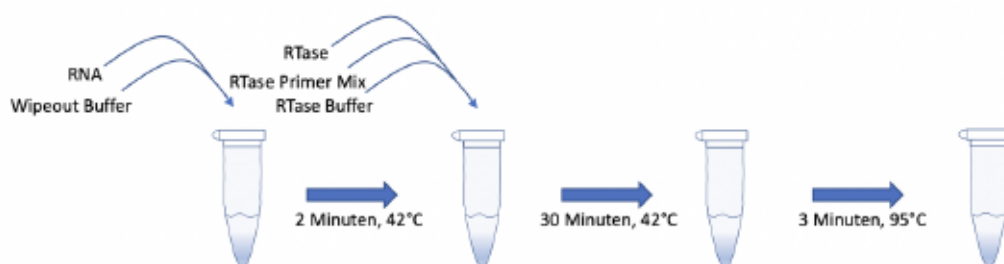


Abbildung 12 cDNA-Synthese

Dargestellt sind die Schritte der cDNA-Synthese. Die RNA und ein *Wipeout Buffer* wurden zusammen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Minuten bei 42 °C im *Cycler* wurden RTase, RTase *Buffer* und *Primer* dazugegeben. Der *Cycler* erwärmte das Gemisch zunächst 30 Minuten bei 42 °C und anschließend 3 Minuten bei 95 °C. Abkürzungen: *reverse Transkriptase*, RTase.

2.7.4 Quantitative RealTime PCR

Die nachfolgend beschriebene quantitative *RealTime* (qRT) PCR wurde freundlicherweise von Peggy Marra-Mann durchgeführt. Für die PCR wurde die SYBR Green Methode mit dem Platinum™ SYBR™ Green qPCR Super-Mix-UDG Kit herangezogen. Nach Herstellerangaben wurde das Expressionslevel der Zielgene *Tnfa* und *Il1b* analysiert. Der Reaktionsmix bestand aus 5µl Platinum SuperMix-UDG mit dem ROX-Referenzfarbstoff, 2,5µl cDNA (2,083 ng/µl) und der 2,5µl Primerlösung (Endkonzentration 0,625µM). Zur endogenen Kontrolle wurde 18S verwendet. Die verwendeten Primersequenzen sind in der Tabelle 9 gelistet. Zur Analyse diente das *StepOnePlus RealTime* PCR System. Zur Ermittlung der Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode herangezogen (Livak und Schmittgen, 2001).

Tabelle 9 qPCR-Primersequenzen

Gen	Vorwärts-Primer (5'-3')	Rückwärts-Primer (5'-3')
<i>18S</i>	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
<i>Il1b</i>	GGATGAGGACATGAGCCCT	CGTCACACACCAGCAGGTTA
<i>Tnfa</i>	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG

2.8 Auswertung

2.8.1 Mikroskopie

Das Aufnehmen der mit H&E gefärbten Schnitte erfolgte am Mikroskop *Axio Imager.M2* von Zeiss mit dem Programm *ZEN blue*. Für die Durchlichtaufnahmen des Darms wurden drei Objektive verwendet. Ein Objektiv mit 2,5-facher Vergrößerung diente der Übersichtsaufnahme. Detailaufnahmen erfolgten mit einer 5-fachen und einer 10-fachen Vergrößerung. Für die BCA wurde das 10-fache Objektiv verwendet. Die Mac2 Färbung wurde ebenfalls mittels Durchlicht mikroskopiert. Dafür wurde das 5-fache Objektiv benutzt.

Die Fluoreszenzaufnahmen der Dreifachfärbung erfolgten am Mikroskop *Axio Observer.Z1/7* mit *Apotome*. Bei dem hier verwendeten Objektiv handelte es sich um das *Plan-Apochromate 20x*. Je nach charakteristischer Eigenschaft der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurden die für sie passenden Filter am Mikroskop mit den richtigen Emissionsmaxima ausgewählt. Wichtig war hier die Erstellung von Z-Stapeln und Mosaikaufnahmen, um ein präzises und qualitatives Bild von den Zellen in

unterschiedlichen Fokusebenen zu erreichen. Für jede Aufnahme wurden Z-Stapel, orientierend am YFP-Signal mit einer Dicke von 1 μm erstellt. So konnte die Sichtbarkeit auf alle Zellen aus den unterschiedlichen Fokusebenen eingestellt werden.

Die mit ÖRO gefärbten Aorten wurden unter Verwendung eines Stereomikroskops untersucht. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Digitalkamera, die an das Okularstück gehalten wurde.

2.8.2 Auswertung mit dem Programm ImageJ

Sowohl die Auswertung der ÖRO-Färbung der Aorta als auch die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Mac2 des aortalen Ursprungs wurde mittels *ImageJ* durchgeführt.

Für die Auswertung der Aorta wurde das Bild in der *Software* geöffnet und die Fläche der Aorta wurde mit dem *Selection Brush Tool* eingegrenzt. In diesen eingegrenzten Bereich wurde eine *region of interest* (ROI) gesetzt, damit nur die zu untersuchende Aorta berücksichtigt wird. Der Hintergrund wurde mit der Einstellung *Subtract background* reduziert und das Bild in 8-bit konvertiert. Anhand von drei Bildern wurde ein *Threshold* ermittelt, welcher für alle Bilder einer Färbung beibehalten wurde, um durch diese einheitliche Analyse eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten. Die dann vom Programm automatisch erfasste Plaquebelastung wurde auf die gesamte Fläche der Aorta bezogen.

Wichtig für die Bestimmung des Makrophagenanteils im aortalen Ursprung war die Funktion *Color Deconvolution*, die das Bild in drei verschiedene Farbkanäle teilt. Der grüne und blaue Kanal, welche die Kernfärbung und weitere unspezifische Hintergrundfärbungen enthalten, wurden nicht untersucht. Im roten Farbkanal wurde mit dem *Selection Brush Tool* die Fläche der Plaques in den drei Taschen zusammen bestimmt und es wurde auch hier ein *Threshold* ausgewählt, welcher für alle Bilder einer Färbung galt. Mit dem *ROI Manager* wurden eine ROI in den zu untersuchenden Bereich gelegt. Das Programm erkannte den gefärbten Makrophagenanteil und detektierte die unterschiedliche Intensität je nach Menge der Makrophagen im Plaque. Der Makrophagenanteil wurde anschließend automatisch auf die gesamte Plaquefläche bezogen.

2.8.3 Auswertung mit dem Programm ZEN

Sowohl die Ermittlung der Plaquefläche in der BCA und im aortalen Ursprung als auch die Untersuchung des Phänotyp-Switches nach der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 wurden mit der *Software ZEN blue* durchgeführt.

Nach dem Öffnen der Dateien mit den BCA in *ZEN* wurde der Plaque umrandet und dessen Fläche bestimmt. Weiterhin wurden auch die Flächen der *Lamina elastica interna* und der *Lamina elastica externa* bestimmt und miteinander verglichen. Für die Bestimmung der Plaquegröße im aortalen Ursprung wurde die Fläche des kompletten Ursprungs und die Plaquefläche der drei einzelnen Taschen herangezogen. Die drei Plaqueflächen wurden addiert und auf die Fläche des gesamten Ursprungs bezogen.

Zur Untersuchung des Phänotyp-Switches wurden die BCA an drei verschiedenen Lokalisationen in 300 µm Abständen zueinander mit der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 behandelt. Glatte Muskelzellen tragen das *YFP* Gen und können auch mit GFP sichtbar gemacht werden. Mac2 ist ein Makrophagenmarker. Der Anti-ACTA2-Antikörper färbt Aktinfilamente der glatten Muskelzelle an. Für die genaue Betrachtung der 10 µm dicken Schnitte wurden Z-Stapel erstellt. Zur Auswertung dieser Färbung wurde das Programm *Zen-blue 2.5* genutzt. Im ersten Schritt wurde der atherosklerotische Plaque mit einer farblichen Umrandung eingegrenzt. Nur in diesem Bereich wurden anschließend die Zellkerne, die glatten Muskelzellen mit Makrophagencharakter, die glatten Muskelzellen und die Makrophagen gezählt. Die verschiedenen Symbole, die als Markierung für die verschiedenen Zellen dienten, sind in der Tabelle 10 dargestellt. Beim Durchgehen der einzelnen Fokusebenen in den Z-Stapeln wurden zunächst alle mit blau gefärbten Zellkerne mit einem roten Kreuz versehen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem YFP-Signal mit einem grünen Kreuz markiert. Den glatten Muskelzellen wurde ein blaues Kreuz zugeordnet und den Makrophagen ein gelbes Kreuz. Zur Detektion der glatten Muskelzellen mit Phänotyp-Switch wurden die Zellen mit einem gelben Quadrat markiert, die positiv für YFP und Mac2, aber negativ für ACTA2 waren. Glatte Muskelzellen mit einem YFP-Signal, die positiv für ACTA2, jedoch negativ für Mac2 waren, wurden rot eingekreist. Mit einem Pfeil wurden die Zellen kenntlich gemacht, die sowohl für YFP und Mac2 als auch für ACTA2 positiv waren. Alle einzelnen Zellen und die verschiedenen Signalkonstellationen wurden manuell gezählt und in einer Excel-Tabelle gegenübergestellt. Ein Beispiel mit markierten Zellen ist in der Abbildung 13 dargestellt.

Tabelle 10 Symbole für die Signalmarkierung

Die Tabelle listet alle Symbole auf, die zur Identifizierung einzelner Signale und für die verschiedenen Signalkonstellationen genutzt wurden.

Signal	Symbol
Hoechst 33342	✗
YFP	✗
ACTA2	✗
Mac2	✗
YFP+ Mac2- ACTA2+	○
YFP+ Mac2+ ACTA2-	□
YFP- Mac2+ ACTA2+	□
YFP+ Mac2+ ACTA2+	➔

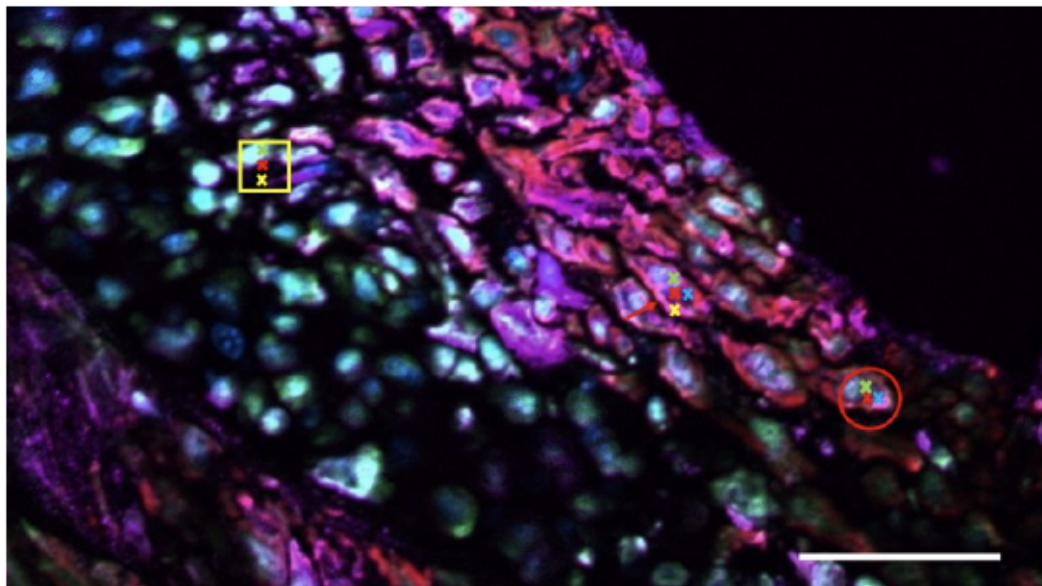


Abbildung 13 Einzelne Zellen und Zellkombinationen werden mit entsprechenden Symbolen markiert

Dargestellt ist ein beispielhaftes Bild eines atherosklerotischen Plaques nach der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 zur Verdeutlichung der Zellzählung mit den Symbolen. Rotes Kreuz: *Hoechst* 33342; Grünes Kreuz: YFP+; Gelbes Kreuz: Mac2+; Blaues Kreuz: ACTA2+; gelbes Viereck: YFP+Mac2+ACTA2-; roter Pfeil: YFP+Mac2+ACTA2+, roter Kreis: YFP+Mac2- ACTA2+. Der Maßstab Balken entspricht 50 µm.

2.8.4 Kolitis-Score

Zur Beurteilung des Entzündungsgrads des Darms wurde ein Kolitis-Score genutzt. Bei dem Kolitis-Score handelt es sich um einen Punktescore, welcher von Annette von Glinski in Anlehnung an Lahat *et al.* modifiziert wurde (Lahat *et al.*, 2007). Er beinhaltet die für eine durch DSS-induzierten Kolitis spezifischen histologischen Kriterien, dargestellt in der Tabelle 11. Zuvor wurden repräsentative Schnitte für jede Maus der Versuchsgruppen mit Hämalun und Eosin gefärbt und mit dem Mikroskop *Axio Imager.M2* aufgenommen. Mit dem 2,5x Objektiv wurden Übersichtsaufnahmen gemacht und die mit dem 5x Objektiv und 10x Objektiv erstellten Bilder wurden als Detailaufnahmen genutzt. Anschließend wurden für jedes Kriterium Punkte von 0 bis 3 verteilt. Je höher die Summe aller vergebenen Punkte, desto stärker ist die histologische entzündungsbedingte Veränderung im Darm. Die Abbildung 14 zeigt eine Detailaufnahme eines Abschnittes mit den für die Bewertung relevanten mikroskopischen Strukturen.

Tabelle 11 Kolitis-Score

Der dargestellte Kolitis-Score wurde von Annette von Glinski in Anlehnung an Lahat *et al.* modifiziert und beinhaltet mehrere entzündungsspezifische Kriterien mit Punktzahlen von 0 bis maximal 3. Der höchste erreichbare Wert beträgt 18. Abkürzungen: Bindegewebe, BGW; Gesamter Darmwandabschnitt, GDWA; Lymphfollikel, LF; *Lamina muscularis*, LM; *Lamina muscularis mucosae*, LMM; Mukosa, *Lamina propria*, LP; Mucosa, M; Submukosa, SM;

Punkte	Beschreibung
I. Kryptentiefe	
0: normal	bis LMM
1: leicht abgenommen	auf 2/3 M (lokal, < 10 % GDWA)
2: stark abgenommen	auf 2/3 M (generalisiert, > 10 % GDWA) oder < 1/3 der M
3: nicht beurteilbar	völliger Verlust der Kriptenstruktur
II. Kriptenstruktur	
0: normal	tubulär, scharf abgrenzbarer geschlossener Zellverband
1: vereinzelt entformt	< 10 % des GDWA
2: mäßig entformt	10 -70 % des GDWA
3: stark entformt	> 70 % des GDWA

III. Submukosa	
0: normal	kompakt, sehr dünn, schwer abgrenzbar
1: verbreitert	BGW/Zellen vermehrt, aufgelockerte SM
2: abgesetzt	zusätzlich komplette Absetzung zur LM
IV. Zelluntergang	
0: physiologisch	kompaktes Gewebe, Zellzusammenhalt, Homogenität
1: gering gesteigert	Oberflächenepithel verstärkt abgelöst
2: stark apoptotisch	Krypten der M apoptotisch, unklare Abgrenzung des Zylinderepithels, faserig, löcherige Zelloberfläche
3: komplett zerstört	GDWA zerstört
V. Inflammation	
0: nicht gesteigert	LP schmal, unscharfe Abgrenzung zur LMM und Kryptenepithel
1: leicht	LP umgibt komplett basale Anteile des Kryptenepithels
2: mäßig	Zunahme der Zellen der LP bis 10 % des gesamten M oder 1 markanter Lokus
3: stark	Zellzunahme mit Verbreiterung der LP > 10 % gesamte M
Vla. Lymphfollikel	
0: Nicht vorhanden	Kein LF vorhanden
1: < 2	< 2 LF
2: > 2	> 2 LF
Vlb. Becherzellen	
0: 50 % - 100 %	Becherzellen füllen Krypten nahezu komplett aus
1: 10 % - 50 %	10 % - 50 % Becherzellen vorhanden
2: < 10 %	< 10 % Becherzellen vorhanden

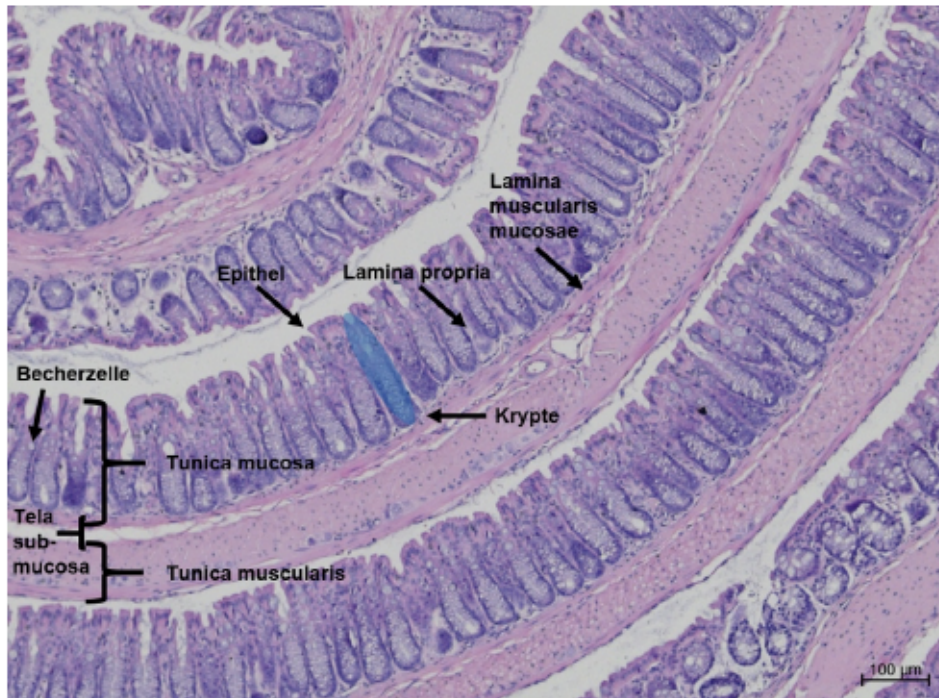


Abbildung 14 Histologische Aufnahme des Darms

Die Detailaufnahme des Darms zeigt die charakteristische Aufteilung der Darmwand mit den verschiedenen für den Darm typischen Strukturen. Es sind mehrere Ebenen zu sehen, da der Darm für die Aufnahme aufgerollt wurde.

2.8.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit der Software *Graphpad PRISM* durchgeführt. Der Test nach Grubbs diente der Detektion und dem Ausschluss von Ausreißern zum Niveau $\alpha = 0,05$. Von Bedeutung war die Ermittlung der Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test und die Kontrolle der Varianzen mit dem F-Test. Für normalverteilte Daten ohne Varianzunterschiede wurde der ungepaarte t-Test genutzt und bei Vorliegen von Varianzunterschieden der Welch-Test. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde zur Analyse der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Die Auswertung der Gewichtsverläufe, der mit H&E gefärbten BCA und der mit der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 gefärbten BCA erfolgte mittels *Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und Sidak-Test. Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die oben beschriebenen Experimente wurden durchgeführt, um die Auswirkung einer durch DSS induzierten Kolitis auf den Phänotyp-Switch in atherosklerotischen Plaques im murinen Modell analysieren zu können. Zunächst wurde das kombinierte Modell der Kolitis und Atherosklerose in *Lineage tracing* Mäusen etabliert und validiert. Neben dem *Lineage tracing* System besteht bei den Tieren eine *Apoe*-Defizienz, die die Ausbildung atherosklerotischer Plaques auch ohne atherogener Diäten fördert. Die Kolitis wurde über die zyklische Gabe von DSS, einem Polysaccharid, das die Darmbarriere zerstört und damit einen entzündlichen Prozess initiiert, induziert. (Chassaing *et al.*, 2014).

3.1 Etablierung des DSS-Kolitismodells in *Lineage tracing* Mäusen

Die Auswirkung der DSS Gabe auf den Darm wurde anhand von drei verschiedenen Aspekten beurteilt. Erstens wurden über Gewichtsveränderungen Rückschlüsse auf das Wohlergehen der Mäuse und deren Krankheitsgeschehen geschlossen. Zweitens wurde der Darm mikroskopisch untersucht, um Veränderungen hinsichtlich Kryptentiefe, Kriptenstruktur, Zelluntergang und Inflammation festzustellen. Drittens wurde das Entzündungsgeschehen auf molekularer Ebene durch die Analyse von Inflammasmarkern erfasst. Durch die Berücksichtigung aller drei Aspekte, konnte eine umfassende Beurteilung der Kolitis vorgenommen werden.

3.1.1 Gewichtsverlauf

Patienten, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden und sich noch in keiner Therapie befinden, fallen unter anderem mit Gewichtsverlust auf (Preiß *et al.*, 2014). Experimentelle Studien an Mäusen zeigen ebenfalls einen Gewichtsverlust im Falle einer Kolitisinduktion mit DSS auf (Chassaing *et al.*, 2014; Perše und Cerar, 2012). Da das Gewicht somit als Parameter für die Ausprägung einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung dient, wurde es hier aus diesem Grund auch als Parameter für die Induktion einer Kolitis verwendet. Darüber hinaus lässt das Gewicht Rückschlüsse auf das Wohlbefinden der Mäuse zu.

Das Gewicht wurde über einen Zeitraum von 15 Wochen zwischen der 12. und 27. Lebenswoche beobachtet. In der Abbildung 15 zeigt die Abszisse das Alter in Wochen und die Ordinate die relative Gewichtszunahme in Prozent. Der graue Balken stellt jeweils die DSS Gabe dar. Die weiße Fläche dazwischen bildet die Remissionsphase ab. Die repetitive Gabe von DSS simuliert den Krankheitsverlauf in der humanen Situation. Das Gewicht in Woche 12 wurde auf 100% gesetzt und die weiteren Gewichtsangaben beziehen sich jeweils auf Woche 12 als Startgewicht. Im weiteren Verlauf wurde das Gewicht weiterhin immer vor und nach jedem DSS-Zyklus bestimmt sowie in der 27. Woche nach der zweiwöchigen Remissionsphase bzw. vor der Organentnahme der Mäuse. Die mit DSS behandelte Gruppe (roter Graph) zeigt insgesamt bis zur 24. Woche einen Gewichtszuwachs, der aber im Vergleich zur Referenzgruppe geringer ausfällt. In den DSS-Zyklen 3,4 und 5 ist sogar ein Gewichtsverlust zu erkennen. In den Remissionsphasen nach der DSS Gabe nehmen die Mäuse erneut an Gewicht zu. Insgesamt bleibt die Gewichtszunahme der Mäuse in der DSS-Gruppe unter dem Wert der Kontrollgruppe. Einen signifikanten Unterschied sieht man bereits in der 16. Woche nach dem 2. DSS-Zyklus. Besonders nach dem 4. und 5. Zyklus ist ein Unterschied mit hoher Signifikanz ($P < 0,0001$) zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen. Die mit dem schwarzen Graphen dargestellte Kontrolle nimmt in jeder Phase an Gewicht zu.

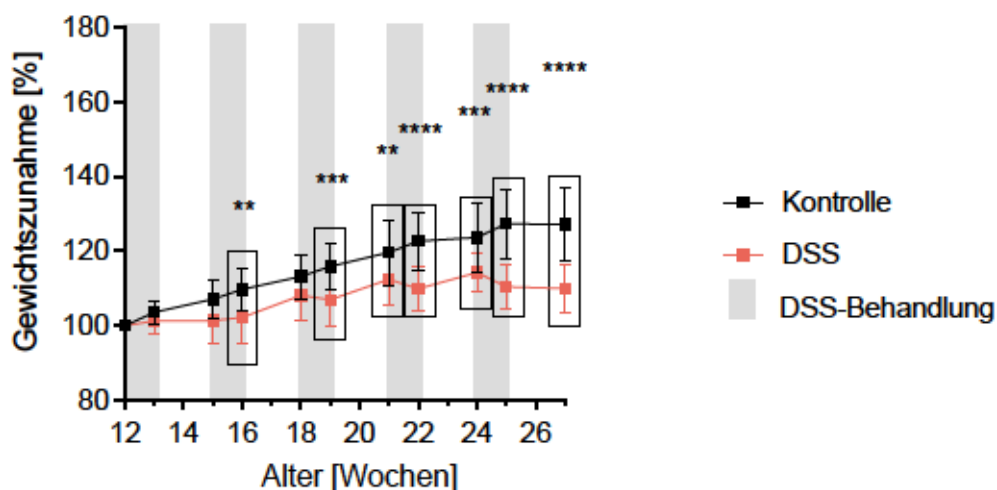


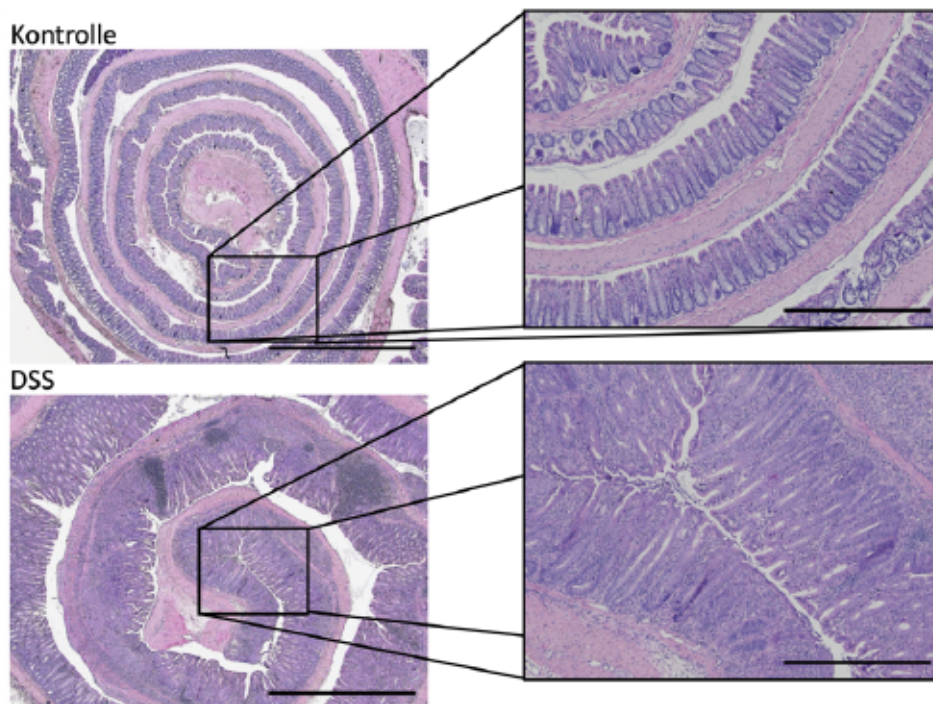
Abbildung 15 Relativer Gewichtsverlauf

Das Diagramm zeigt den relativen Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe sowie der mit DSS behandelten Gruppe. Das Gewicht ist über einen Zeitraum von 15 Wochen aufgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 20,19$ (Kontrolle,DSS). Statistik: Two-way ANOVA, Sidak-Test * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. Abkürzungen: DSS, Dextrannatriumsulfat.

3.1.2 Histologische Beurteilung der Darmstruktur

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen verursachen charakteristische Veränderungen in der Darmwand, die auf mikroskopischer Ebene beurteilt werden können. Für die Untersuchung wurden Längsschnitte von Darmproben angefertigt und mit H&E gefärbt. Die mit DSS behandelten Tiere zeigten eine vergleichsweise zerstörte bzw. deformierte Kryptenstruktur. Außerdem war durch die Vermehrung von Bindegewebe und Zellen eine aufgelockerte Submukosa zu sehen. In dieser Gruppe waren vermehrt Lymphfollikel zu erkennen, die auch in den repräsentativen Schnitten in der Abbildung 16A zu sehen sind. Um die Veränderungen beurteilen zu können, wurden je nach Ausprägung Punktwerte vergeben und für jedes Tier ergab sich somit eine Punktesumme. Die Abbildung 16B fasst dieses Ergebnis zusammen. Die mit DSS behandelte Gruppe nahm Werte zwischen 3 und 16 an, die Kontrollgruppe hingegen Werte zwischen 0 und 3. Somit erreichte die DSS-Gruppe insgesamt signifikant ($P < 0,0001$) höhere Punktwerte.

A



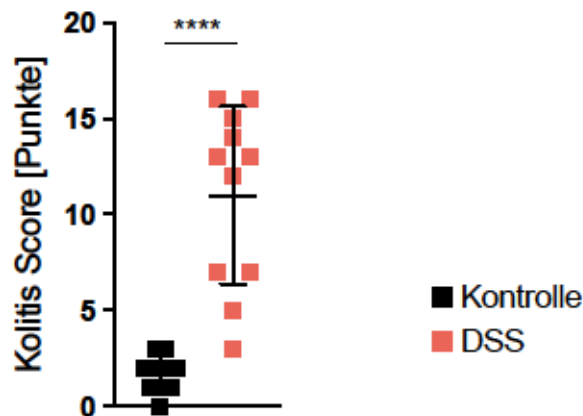
B

Abbildung 16 Signifikant höhere Werte im Kolitis-Score in der mit DSS behandelten Gruppe nach der 27. Lebenswoche

(A) Dargestellt sind exemplarische Bilder der Darmabschnitte, aufgenommen mit einem 2,5x Okular (links) und einem 5x Okular (rechts). Die oberen zwei Bilder zeigen die Kontrolle und die unteren zwei Bilder die DSS-Gruppe. Der Maßstabsbalken entspricht links 2000 μm und rechts 500 μm . (B) Dargestellt ist die Auswertung des Kolitis-Scores. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 10,11$ (Kontrolle,DSS). Statistik: Welch-Test, **** $P \leq 0,0001$. Abkürzungen: DSS, Dextrannatriumsulfat.

3.1.3 Gewebeständige Inflammation

Bei Entzündungsreaktionen werden verschiedene Entzündungsmarker exprimiert. Zu diesen gehören beispielsweise *Tnfa* und *Il1b*. Um sich vor allem das entzündliche Geschehen lokal anzusehen, wurden beide Marker mittels qRT-PCR direkt aus dem Darm bestimmt. Die Darstellung erfolgt als relative Quantifizierung der Genexpression. Dafür wurde der Ct-Wert von dem Referenzgen, dem *housekeeping gene*, als Kontrollwert genommen, weil dieser stabil ist und konstant exprimiert wird. Die Differenz der Ct-Werte der zu untersuchenden Gene und des Referenzgens wird als ΔCt bezeichnet. Zur Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes wurde die Differenz aus dem ΔCt und einer weiteren Kontrolle bestimmt. Um den Faktor zu berechnen, um den die zu untersuchenden Gene im Vergleich zum Referenzgen exprimiert werden, wurde die $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Formel angewandt. Die mit DSS behandelte Gruppe zeigte eine signifikant ($P < 0,001$) stärkere Expression der Entzündungsmarker *Tnfa* und *Il1b* als die Kontrollgruppe im Vergleich (Abbildung 17).

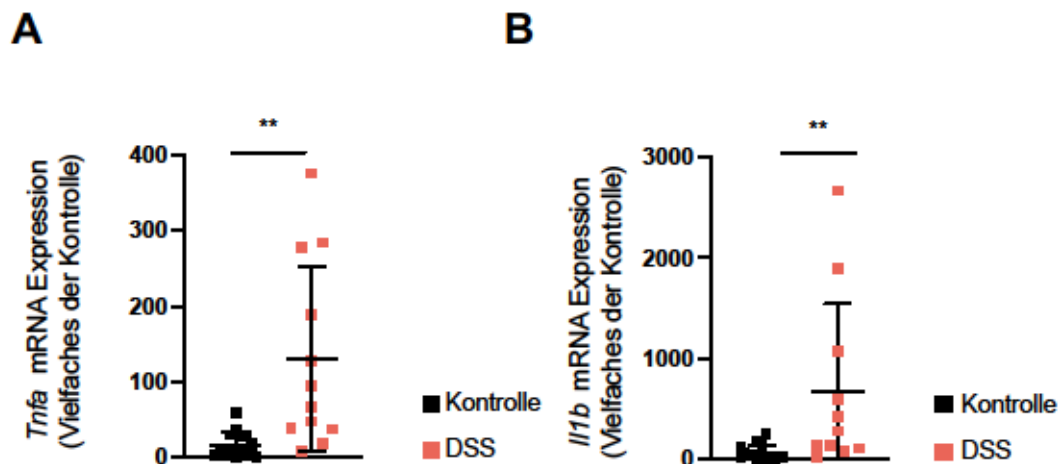


Abbildung 17 Die Expression der gewebeständigen Entzündungsmarker *Tnfa* und *Il1b* ist in der mit DSS behandelten Gruppe signifikant höher nach der 27. Lebenswoche

Dargestellt ist die vielfache Expression der Entzündungsmarker (A) *Tnfa* und (B) *Il1b* im Darm der mit DSS behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n=16,12$ (Kontrolle,DSS) (A), $15,11$ (Kontrolle,DSS) (B). Statistik: Mann-Whitney-U-Test, ** $P \leq 0,01$. Abkürzungen: DSS, Dextranatriumsulfat.

3.2 Einfluss der Kolitis auf die Progression der Atherosklerose

Atherosklerose entwickelt sich vor allem dort, wo in den arteriellen Blutgefäßen turbulente Strömungsverhältnisse vorliegen (Frangos, 1999; Malek, 1999). Dementsprechend kann sich die Atherosklerose im gesamten Körper an unterschiedlichen Stellen manifestieren. Um die wichtigen Entstehungsorte im Gefäßsystem abzubilden, wurde die Plaquebelastung an unterschiedlichen Gefäßabschnitten analysiert.

3.2.1 Plaque-Entwicklung in der Aorta

Zunächst wurden die aortalen Läsionen in der gesamten Aorta untersucht. Dafür wurde an den zuvor freipräparierten aber noch geschlossenen Aorten der Tiere eine ÖRO-Färbung durchgeführt, bei der Lipidansammlungen innerhalb eines Plaques rot angefärbt werden (Abbildung 18A). Anschließend wurden sie aufgeschnitten und mit Hilfe eines Stereomikroskops untersucht. Dabei war zwischen der mit DSS behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 18B).

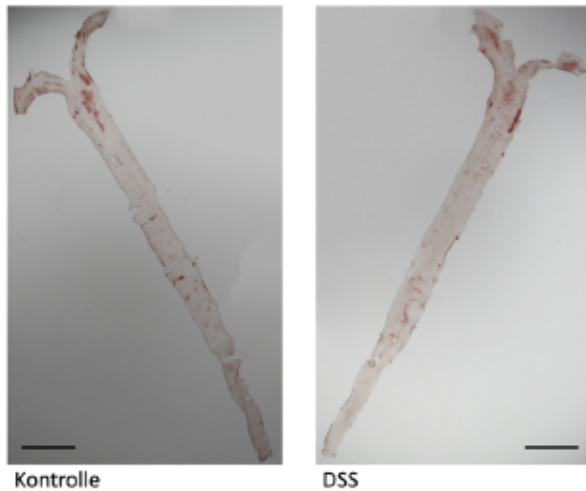
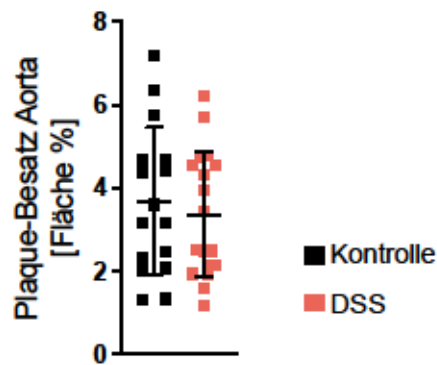
A**B**

Abbildung 18 Kein Effekt der DSS Gabe auf die Progression atherosklerotischer Plaques in der Aorta nach der 27. Lebenswoche

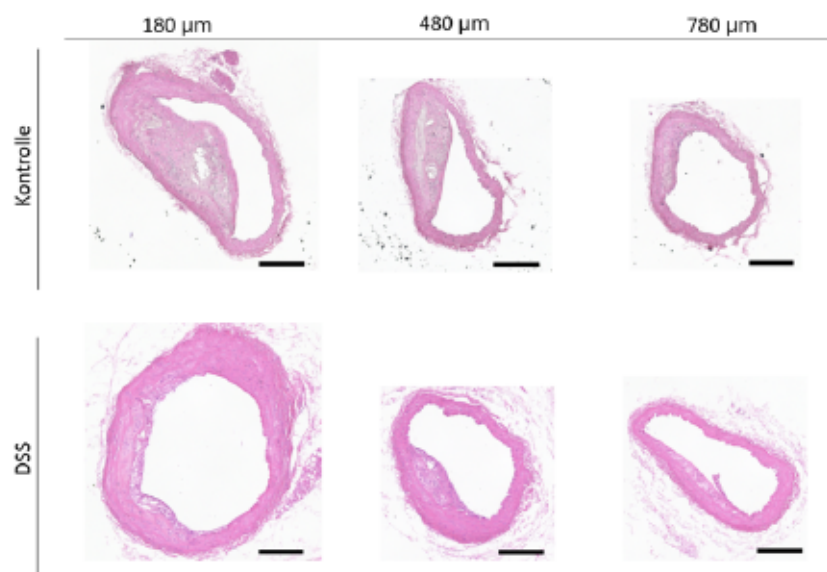
(A) Dargestellt sind exemplarische Bilder der Aorten aus der Kontrollgruppe (links) und aus der mit DSS behandelten Gruppe (rechts). Die Färbung erfolgte mit Öl-Rot-O. Der Maßstabsbalken entspricht 5 mm. (B) Das Diagramm zeigt die Plaquebelastung in der gesamten Aorta. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 16,18$ (Kontrolle,DSS). Statistik: ungepaarter t-Test. Abkürzungen: DSS, Dextrannatriumsulfat.

3.2.2 Plaque-Entwicklung in der *A. brachiocephalica*

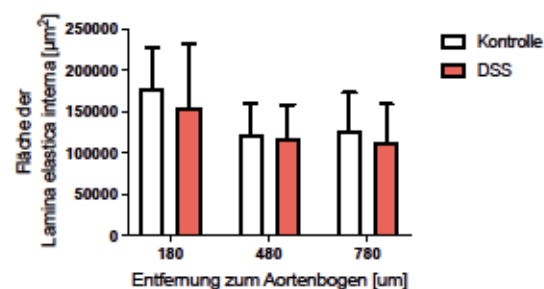
Als nächstes wurde die Plaquebelastung in der BCA bestimmt. Dafür wurden drei repräsentative Schnitte im Abstand von 300 μ m ausgewählt, der erste Schnitt bei einer Entfernung zur Aorta von 180 μ m, der zweite bei 480 μ m und der letzte bei 780 μ m (Abbildung 19A). Zunächst wurden die Flächen der *Lamina elastica interna* sowie der *Lamina elastica externa* bestimmt. Beide ergaben keinen signifikanten Unterschied

hinsichtlich der Flächengröße (Abbildung 19B und 19C). Der Vergleich der Läsionsfläche wies einen signifikanten Unterschied in 180 μm Entfernung zur Aorta mit einer reduzierten Plaquefläche in der mit DSS behandelten Gruppe auf (Abbildung 19D). Für eine stärkere Aussagekraft wurde die Läsionsfläche auf die Fläche der *Lamina elastica interna* bezogen. Hier bestand ebenso ein signifikanter Unterschied im Bereich von 180 μm Entfernung zur Aorta (Abbildung 19E).

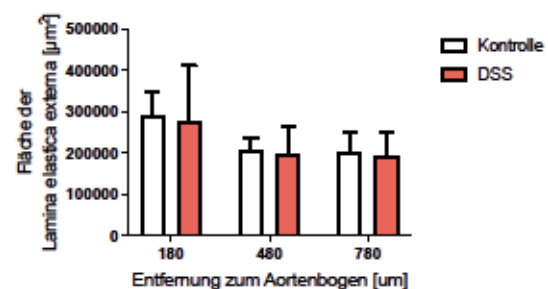
A



B



C



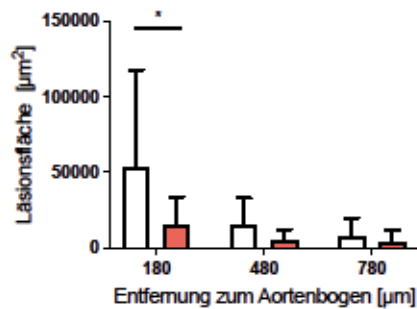
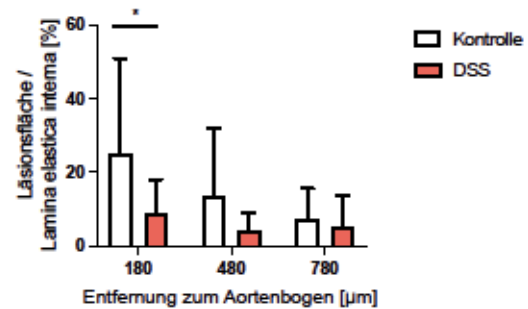
D**E**

Abbildung 19 Kein Unterschied in der Plaquebelastung in der *A. brachiocephalica* nach der 27. Lebenswoche

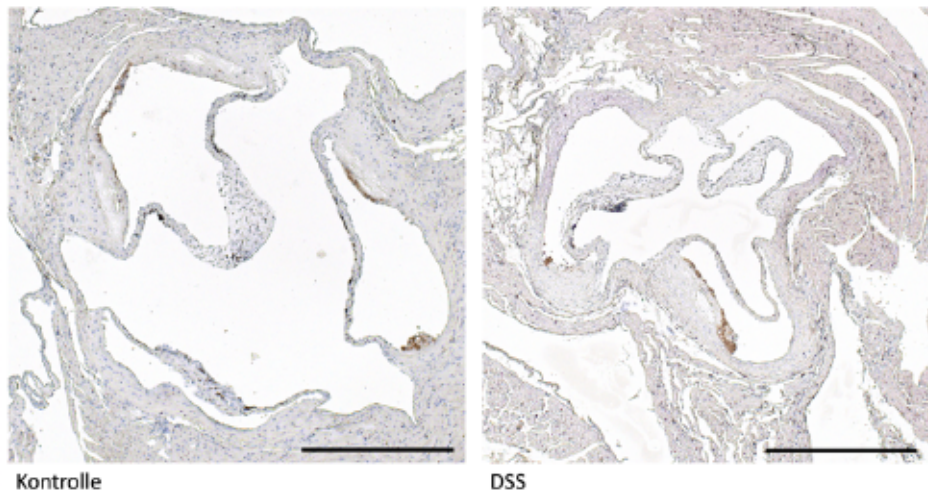
(A) Dargestellt sind exemplarische Bilder der *A. brachiocephalica* aus der Kontrollgruppe sowie aus der mit DSS behandelten Gruppe. Die Entfernungen 180 μm , 480 μm und 780 μm stellen die Distanz zum Aortenbogen dar. Die Färbung erfolgte mit H&E. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . (B) zeigt die Fläche der *Lamina elastica interna* und (C) zeigt die Fläche der *Lamina elastica externa*. (D) Die Darstellung präsentiert die Läsionsfläche in der *A. brachiocephalica*. (E) Die Darstellung präsentiert die Läsionsfläche bezogen auf *Lamina elastica interna*. Bei den Diagrammen sind auf der x-Achse die Abstände zum Aortenbogen zu erkennen. Der weiße Balken repräsentiert die Kontrollgruppe und der rote Balken die mit DSS behandelte Gruppe. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 15, 14$ (Kontrolle, DSS). Statistik: Two Way ANOVA, Sidak-Test * $P \leq 0,05$. Abkürzungen: DSS, Dextranatriumsulfat.

3.2.3 Plaque-Entwicklung im aortalen Ursprung und das Vorkommen von Makrophagen im Plaque

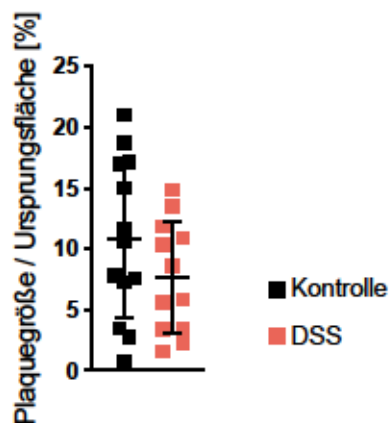
Wie bereits beschrieben existieren verschiedene Prädispositionsstellen für die Ablagerung von Plaques. Besonders am Übergang vom Herzen zur Aorta bestehen turbulente Strömungsverhältnisse. Aus diesem Grund war es von großer Bedeutung sich auch den Aortenursprung anzusehen. Dafür wurde für jedes Tier eine repräsentative Stelle ausgewertet. Die Stelle wurde so ausgewählt, dass alle drei Taschen der Aorta im Bild zu erkennen waren (Abbildung 20A). Zur Färbung wurde die Makrophagen-spezifische immunhistochemische Mac2-Färbung herangezogen, da sich damit sowohl das Plaquevolumen als auch der Makrophagenanteil bestimmen lassen. Hierbei konnte in den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 20B).

Der Makrophagenanteil ließ sich mittels *ImageJ* bestimmen. Es konnte kein Unterschied in beiden Gruppen nachgewiesen werden. Sowohl unter Behandlung mit DSS als auch in der Kontrollgruppe war der Makrophagenanteil gleich (Abbildung 20C).

A



B



C

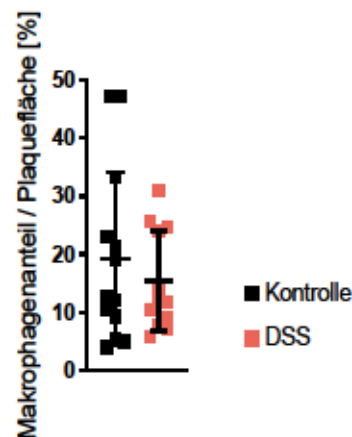


Abbildung 20 Kein Unterschied hinsichtlich der Plaquegröße und des Makrophagenanteils im aortalen Ursprung nach der 27. Lebenswoche.

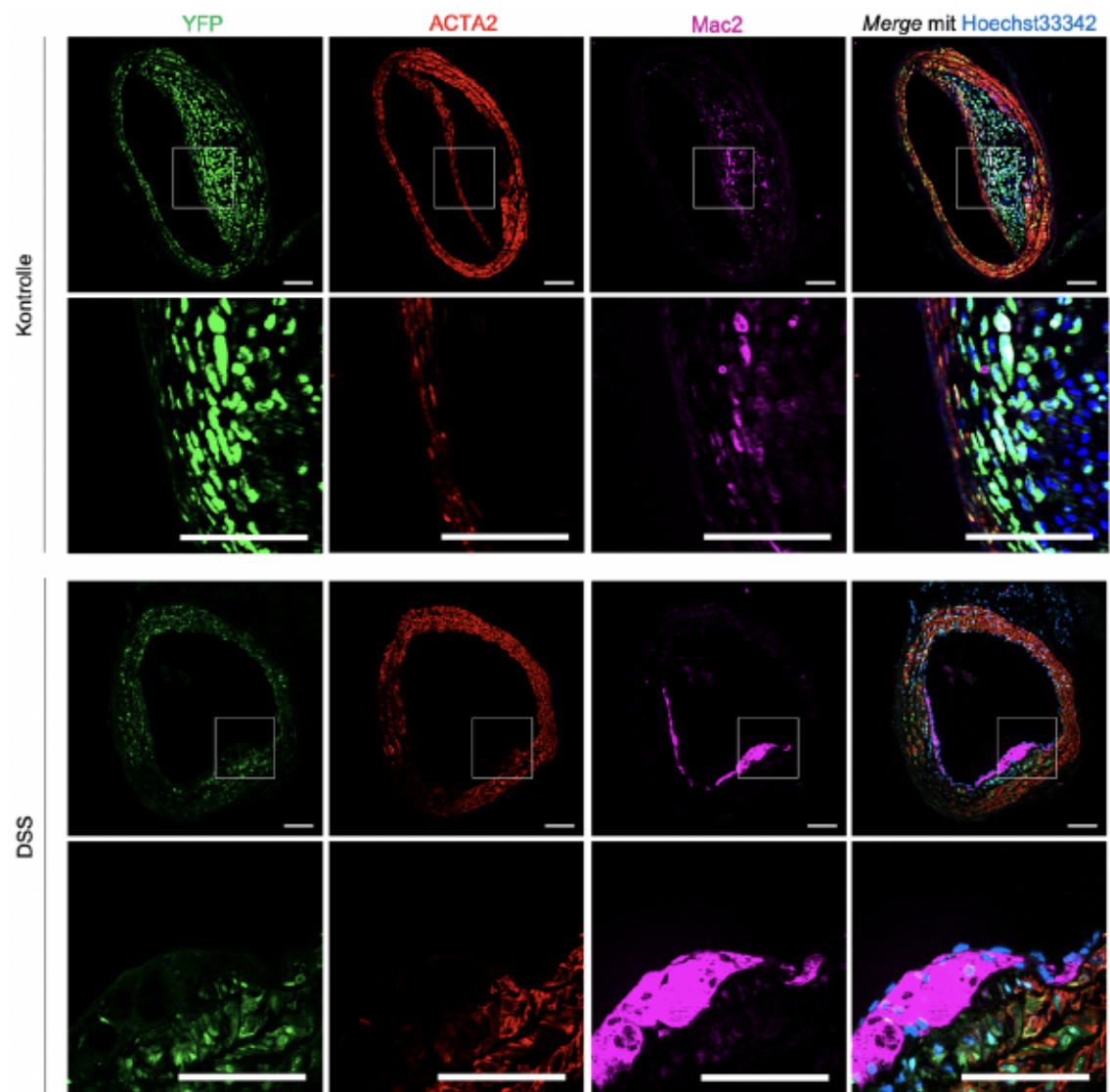
(A) Dargestellt sind exemplarische Bilder des aortalen Ursprungs. Die Schnitte wurden immunhistochemisch mit Mac2 gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m. Das linke Diagramm (B) zeigt die Plaquegröße bezogen auf die Ursprungsfläche in Prozent und das rechte Diagramm (C) zeigt den prozentualen Makrophagenbesatz in der Läsion. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, n = 13,12 (Kontrolle,DSS). Statistik: ungepaarter t-Test (B), Mann-Whitney-Test (C). Abkürzungen: DSS, Dextranatriumsulfat.

3.3 Auswertung der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2

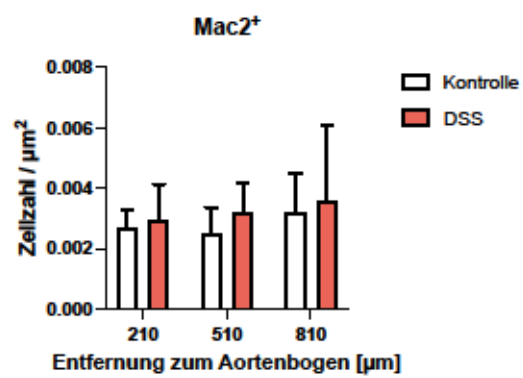
Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit war die Analyse des Phänotyp-Switches in den atherosklerotischen Plaques der BCA. Beim Phänotyp-Switch kommt es zu Veränderungen der Expression von Oberflächenmarkern. So verlieren glatte Muskelzellen ihre ursprünglichen Marker und exprimieren Marker von Makrophagen. Um diesen Prozess bei der Atherosklerose festzuhalten und nachzuvollziehen, sollten die einzelnen Zellen mittels sog. *Lineage tracing* Mäuse detektiert und verglichen werden. Die Abbildung 21A zeigt einen Querschnitt der BCA der mit DSS behandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe in die einzelnen Farbkanäle aufgeschlüsselt. Um die unterschiedlichen Flächen der BCA zu berücksichtigen, wurden die Zellzahlen auf diese normiert. Das in der Abbildung 21B dargestellte Diagramm legt nahe, dass die Zahl der Makrophagen, also alle Mac2+ Zellen, in der mit DSS behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe gleich ist. Durch die Hinzunahme des YFP Signals war es möglich glatte Muskelzellen, die einen Makrophagenmarker tragen, aufzufinden und somit Aussagen über den Phänotyp-Switch zu treffen. In der mit DSS behandelten Gruppe war der Phänotyp-Switch signifikant ($P < 0,05$) reduziert (Abbildung 21C). Hingegen zeigte sich in der mit DSS behandelten Gruppe ein Trend, der darauf hindeutet, dass in der mit DSS behandelten Gruppe eine erhöhte Anzahl echter Makrophagen, also Mac2+ aber YFP- Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet wird (Abbildung 21D).

Zur Formation atherosklerotischer Plaques gehört die Ausbildung einer fibrösen Kappe. Diese verleiht dem Plaque Stabilität und Schutz vor Rupturen (Hansson, 2005). Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die Plaques der mit DSS behandelten Gruppe verglichen zur Kontrolle eine kleinere fibröse und somit vulnerable Kappe ausbilden. Dieses Ergebnis konnte in der 210 μm zur Aorta entfernten Ebene als statistisch signifikant ($P < 0,001$) eingestuft werden (Abbildung 21E).

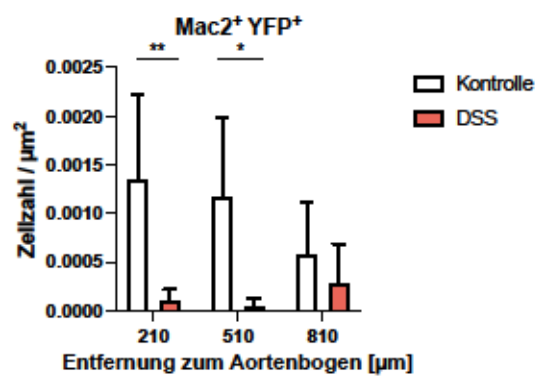
A



B



C



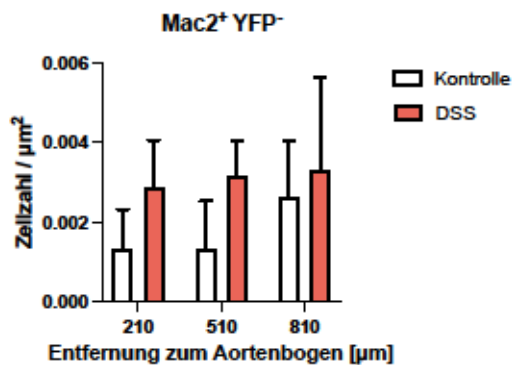
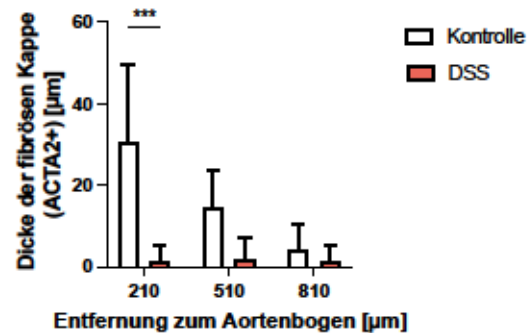
D**E**

Abbildung 21 Reduzierter Phänotypen-Switch und tendenziell erhöhte Makrophagenanzahl in DSS-behandelten Tieren nach der 27. Lebenswoche

(A) Dargestellt sind repräsentative Bilder der Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2. Für die Kontrolle und für die mit DSS behandelte Gruppe wurde je ein Bild aus der 210 μm entfernten Ebene zur Aorta ausgewählt. Die ersten beiden Reihen zeigen die Kontrolle und die letzten beiden Reihen zeigen die mit DSS behandelte Gruppe. Die weiße Box in der ersten und dritten Reihe entspricht dem vergrößerten Bereich in der zweiten und vierten Reihe. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Die Diagramme zeigen (B) die totale Menge an Makrophagen im Plaque, (C) die Menge an Zellen, die positiv für Mac2 sowie YFP sind und somit einem Phänotyp-Switch unterliegen und (D) die Zellen, die positiv für Mac2 sind, aber kein YFP exprimieren, weswegen es sich somit um echte Makrophagen handelt. (E) Die Dicke der fibrösen Kappe in μm wurde anhand des ACTA2 Signals bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ SD, $n = 6$. Statistik: Two Way ANOVA, Sidak-Test * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Abkürzungen: DSS, Detranatriumsulfat; YFP, yellow fluorescent protein; ACTA2, actin alpha 2.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Entwicklung und Progression atherosklerotischer Plaques sowie die Plaquekomposition im kombinierten Atherosklerose-Kolitis-Modell untersucht werden. Ein Fokus lag hierbei auf den sog. Phänotyp-Switch, daher wurde das Modell erstmalig in der YFP-*Lineage tracing* Maus genutzt. Mittels Kombination des murinen Modells der DSS-induzierten chronischen Kolitis und der akzelerierten Atherosklerose in *Apoe*-defizienten Tieren wurde weiterhin ein *Lineage tracing* System inkludiert, mit dessen Hilfe sich der Verbleib glatter Muskelzellen auch nach Verlust der spezifischen Marker nachweisen ließ.

Der Zusammenhang zwischen einer CED und der Entwicklung von Atherosklerose ist bereits bekannt. Humane Studien zeigten, dass CED Atherosklerose fördern (Bernstein *et al.*, 2008; Cainzos-Achirica *et al.*, 2020; Nasir *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2017; Yarur *et al.*, 2011). Es ist bisher jedoch noch nicht geklärt welche Pathomechanismen diesem Zusammenhang unterliegen. Bekannt ist zudem, dass der Phänotyp-Switch glatter Muskelzellen einen Einfluss auf die Plaquezusammensetzung und -stabilität in der Atherosklerose hat (Gomez und Owens, 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob ein gesteigerter Phänotyp-Switch auch im Rahmen der chronischen Kolitis eine Rolle spielen könnte.

4.1 Etablierung und Validierung der Kolitis in *Lineage tracing* Mäusen

Im murinen Modell kann die Kolitis durch die Zugabe von DSS in das Trinkwasser induziert werden. Je nach Studiendesign können akute und chronische Verläufe durch unterschiedliche Dosierung in Menge und Frequenz sowie Dauer der Gabe im Mausmodell imitiert werden (Chassaing *et al.*, 2014; Perše und Cerar, 2012). In dieser Arbeit sollte eine chronische Kolitis etabliert werden. Wie bereits im Abschnitt 2.4 beschrieben, wird diese durch die wiederholte Exposition gegenüber DSS erreicht.

Die 6-tägige DSS-Applikation stellt hierbei die akute inflammatorische Phase dar und die 14-tägige Erholungsphase imitiert nachfolgend die Remissionsphase der humanen Erkrankung. Auch im Patienten wird die CED in eine aktive und in eine ruhige Phase eingeteilt. Die aktive Phase äußert sich durch Bauchschmerzen, Durchfälle und Gewichtsverlust. Es kommt zu Schädigung und Entzündung der Darmschleimhaut. Es kann eine ruhige Phase, die Remission, folgen, in der die Symptome abnehmen. In dieser

Phase erholt sich der Darm und es besteht die Zeit für Reparaturvorgänge (Herold, 2021). Mittels des gewählten murinen Modells ließ sich genau dieser Wechsel zwischen aktiver und ruhiger Phase simulieren. Sowohl im murinen Modell als auch im Menschen führt dies zu Entzündungsreaktionen und zur Gewebeschädigung und macht damit die Prozesse vergleichbar (Chassaing *et al.*, 2014; Herold, 2021).

Das vor und nach jeder DSS-Behandlung ermittelte Gewicht illustriert eine reduzierte Gewichtszunahme in der mit DSS behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle über den gesamten Verlauf der Behandlung. Wie die Abbildung 15 zeigt, verlieren die Tiere der mit DSS behandelten Gruppe in der akuten Phase an Gewicht.

Das Kriterium Gewichtsverlust wurde hier als Marker der Stärke der induzierten Kolitis gewählt, da CED im humanen Organismus ebenso mit einem Gewichtsverlust assoziiert sind und dieser bei nicht therapierten Patienten sogar zu den prägnanten Kardinalsymptomen gehört (Cushing und Higgins, 2021). Elsherif und Kollegen führten an 494 Patienten eine retrospektive Studie zur Ermittlung der Prävalenz der Gewichtsabnahme durch. Dabei wurde festgestellt, dass mehr als die Hälfte der Patienten noch vor Diagnose mit Gewichtsabnahme konfrontiert waren. Der BMI der Patienten mit Morbus Crohn war bei Diagnose um 9,76% reduziert zum Ursprungswert. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa betrug der Rückgang 7,63% (Elsherif *et al.*, 2014).

Das Endgewicht ist vor allem auch ein wichtiges Vergleichskriterium zwischen einer klassischen Atherosklerose und einer durch CED induzierten Atherosklerose, weil Patienten ohne CED als Risikofaktor eher dem metabolischen Syndrom unterliegen und somit oft adipös sind (Visseren *et al.*, 2021). Patienten mit CED als Risikofaktor leiden eher an Gewichtsverlust und sind dennoch dem Risiko ausgesetzt, Atherosklerose zu entwickeln (Elsherif *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017).

Stellt sich ein Patient mit den entsprechenden Symptomen vor und es besteht der Verdacht auf CED, wird eine weitere Diagnostik mittels Koloskopie eingeleitet. Diese ermöglicht die Ermittlung der genauen Lokalisation sowie der Ausdehnung der entzündlichen Erkrankung und bietet die Möglichkeit Gewebe für die Histologie zu entnehmen (Maaser *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch der Darm der Versuchstiere histologisch untersucht. Um die Ausprägung der Erkrankung messbar zu machen, wurde ein sogenannter *Kolitis-Score* herangezogen. Dabei wurden Punkte für bestimmte Kriterien wie Kryptenarchitektur und Inflammation vergeben. Alle Kriterien mit den entsprechenden Punktwerten sind in der Tabelle 11 im Abschnitt 2.8.4 zu finden. Die

Kriterien wurden in einer Dissertation aus dem hiesigen Labor (Annette von Glinski) in Anlehnung an Lahat *et al.* (Lahat *et al.*, 2007) in einem *Score* zusammengestellt, um die erfolgreiche Induktion einer Kolitis durch das zugeführte DSS einheitlich für alle Darmproben beurteilen zu können. In der Pathologie findet man Kriterien wie Verlust der Kryptenarchitektur, Inflammation und Reduzierung von Becherzellen wieder (Kucharzik *et al.*, 2018; Sturm *et al.*, 2022). Die morphologische Beurteilung der Darmpräparate, dargestellt im Abschnitt 3.1.2, weisen in der mit DSS behandelten Gruppe pathologische Veränderungen mit veränderter Darmstruktur und vermehrter Inflammation verglichen zur Kontrollgruppe auf. Unter dieser Befundkonstellation lässt sich demnach konstatieren, dass das oral zugeführte DSS sich nachteilig auf das Darmgewebe auswirkt und auch der humanen Situation ähnelt. Dabei ist zu erwähnen, dass weder Morbus Crohn, noch Colitis ulcerosa exakt in ihrer Komplexität herbeigeführt werden können. Zwar ähneln die pathologischen Ergebnisse vor allem der Colitis ulcerosa, dennoch handelt es sich eher um ein Modell, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit ihren Symptomen und Merkmalen allgemein darstellen soll (Solomon *et al.*, 2010). Es bietet die Möglichkeit, Erklärungsansätze für Entzündungsgeschehen und ihre Folgen heranzuführen (Chassaing *et al.*, 2014; Solomon *et al.*, 2010).

Zudem wurden die Inflammationsmarker *Tnfa* und *Il1b* im Darm beider Gruppen bestimmt. TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird während entzündlicher Vorgänge u.a. von Makrophagen ausgeschüttet (Shurety *et al.*, 2000). Bei Patienten mit CED sind die TNF- α Plasmaspiegel erhöht und so stellen diese bei der Behandlung der CED einen möglichen Angriffspunkt dar (Adegbola *et al.*, 2018; Gareb *et al.*, 2020). Für die Bestimmung von *Tnfa* wurden in dieser Arbeit Darmproben der Versuchstiere hinsichtlich der relativen mRNA Expression untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine höhere Expression in der mit DSS behandelten Gruppe. Einen zusätzlichen proinflammatorischen Marker stellt IL-1 β dar (Lopez-Castejon und Brough, 2011). Auch dieser wies in der vorliegenden Arbeit eine relativ erhöhte mRNA Expression auf in Gegenüberstellung mit der Kontrollgruppe. In Studien wurde bereits der Einfluss von DSS auf die Produktion inflammatorischer Mediatoren im murinen Modell untersucht. Es wurden ebenso höhere Werte für *Tnfa* und *Il1b* verzeichnet (Yan *et al.*, 2009). Yan *et al.* verabreichten Mäusen über fünf Tage DSS in einer Konzentration von 3,5%. Während der fünf Tage stieg die *Il1b* Expression im Darm kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum am fünften Tag. Nach Abbruch der DSS Gabe sank der Wert wieder ab. Die

Tnfa Expression war bereits am ersten Tag deutlich erhöht, stieg zum fünften Tag hin nochmal etwas, sank nach Abbruch der DSS Gabe ebenso wieder ab. Sowohl *Il1b*, als auch *Tnfa* erreichten auch am 14. Tag nach Start des Experiments den Ausgangswert nicht (Yan *et al.*, 2009). Somit sprechen diese Ergebnisse für ein deutlich höheres inflammatorisches Geschehen im Darmgewebe der mit DSS behandelten Mäuse als Ausdruck der induzierten Kolitis. Folglich stehen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Resultate im Einklang mit den Erkenntnissen vorheriger Studien und bestätigen die Entwicklung einer intestinalen Inflammation. In dieser Arbeit wurde die Expression von *Tnfa* und *Il1b* in der 27. Lebenswoche bestimmt. Auch hier wäre es interessant die Expression in einer zeitlichen Sequenz zu betrachten, um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer kontinuierlich ansteigenden Expression und anderen Pathomechanismen wie z.B. der Atheroprogression herzustellen. In der praktischen Umsetzung müsste man mehrere Tierkohorten planen, die zu unterschiedlichen Zeiten untersucht werden.

Wie im Kapitel 1.2.5 erwähnt, handelt es sich bei dem durch DSS induzierten Kolitis-Modell um ein bereits etabliertes Modell (Chassaing *et al.*, 2014; Wirtz *et al.*, 2007). Die Daten lassen somit die Annahme einer gesicherten Reproduktion dieses Modells auch in den hier verwendeten *Apoe*-defizienten *Lineage tracing* Mäusen zu. Dieser Schritt stellt eine wichtige Voraussetzung zur Erörterung des Zusammenhangs zur Entwicklung der Atherosklerose dar und musste daher zweifelsfrei im ersten Schritt belegt werden. Auf makroskopischer, mikroskopischer und molekularer Ebene konnte somit die Kolitis wie oben beschrieben sicher nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten sind zudem kongruent mit den Ergebnissen anderer Studien (Chassaing *et al.*, 2014; Ito *et al.*, 2008; Lama *et al.*, 2020; Shea-Donohue *et al.*, 2008). Die Resultate in dieser Arbeit legitimieren weitere Forschungsabsichten auf diesem Gebiet.

4.2 Validierung des Einflusses der Kolitis auf die Progression atherosklerotischer Plaques

Die Atherosklerose bildet sich im ganzen Gefäßsystem nicht gleichmäßig aus. Es konnten unterschiedliche Flusssituationen beobachtet werden. Während Stellen mit einem laminaren Fluss eher ausgespart bleiben, ist die Progression der atherosklerotischen Plaques in einem Gebiet turbulenter Strömungen verstärkt (Frangos, 1999; Malek, 1999).

Infolgedessen wurden die zu untersuchenden Gefäßabschnitte entsprechend den beschriebenen Prädilektionsstellen ausgewählt.

Im ersten Ansatz wurde die gesamten Aorten der Versuchstiere im Hinblick auf die Plaquebelastung untersucht. Die Untersuchung erbrachte keinen Unterschied in der mit DSS behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Eine weitere Prädilektionsstelle ist der Ursprung der Aorta im Herzen (Nakashima *et al.*, 1994). Die nach der Mac2-Färbung durchgeführte Auswertung der Ursprünge konnte keine Differenz in der Plaquegröße nahelegen. Unter Berücksichtigung dieser Daten scheint die induzierte Kolitis weder einen nennenswerten positiven noch negativen Effekt auf das Ausmaß der Atherosklerose auszuüben. Der aortale Ursprung wurde erstmals im Jahre 1980 als Prädilektionsstelle von atherosklerotischen Plaques bei Mäusen beschrieben und wird bis heute üblich als mögliche Lokalisation für die Quantifizierung von Plaques genutzt (Chen *et al.*, 2022; Kayashima und Maeda-Smithies, 2020; Paigen *et al.*, 1987). Von daher würde man bei einem möglichen Effekt von DSS auf die Entwicklung der Atherosklerose auch vor allem im aortalen Ursprung vermehrt Plaques erwarten. Vor allem der direkte Vergleich zum Menschen ist hier ein wichtiger Punkt. Häufig entwickelt sich die Atherosklerose an der Aortenklappe im aortalen Ursprung und wird bei Manifestation als Aortenklappenstenose bezeichnet (Goody *et al.*, 2020). Eine kalzifizierte Aortenklappe ist auch beim Menschen ein Zeichen für eine vermehrte Atherosklerose (Pohle *et al.*, 2001).

Zur Analyse der Plaquebelastung eignet sich als Lokalisation weiterhin die BCA (Rosenfeld *et al.*, 2000). Auf die BCA folgt im Gefäßsystem die Karotis und diese wird in der Humanmedizin als früher Prädiktor für mögliche atherosklerotische Läsionen in anderen Teilen des Gefäßsystems genutzt. Praktisch wird dies als nicht-invasive Methode durch die Messung der Intimadicke der Karotis mit Hilfe der Sonografie umgesetzt (Darabian *et al.*, 2013). Die Plaqueentwicklung kann auch in diesem Gefäß an mehreren lokalen Stellen mit unterschiedlicher Ausprägung beginnen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, einen Plaque zu detektieren, wurden drei Schnitte in 300 µm Entfernung zueinander aufgenommen. In 180 µm Entfernung zur Aorta war ein signifikanter Unterschied mit weniger Plaques in der mit DSS behandelten Gruppe zu verzeichnen. In 480 µm und 780 µm entfernter Entfernung zur Aorta bestand hingegen kein Unterschied in der Plaquebelastung.

Zusammengenommen bestand an drei unterschiedlichen Lokalisationen nach drei verschiedenen Färbungen kein Hinweis auf eine vermehrte Plaqueprogression in der

DSS-Gruppe. Nun bleibt es zu klären ob das in dieser Arbeit verwendete Modell noch optimiert werden sollte, um den Effekt darstellen zu können. Bei den Versuchstieren handelt es sich um Tiere auf *Apoe*-defizientem Hintergrund, die spontan atherosklerotische Plaques ausbilden können. Wie oben erwähnt, können abhängig von der Konzentration des zugeführten DSS unterschiedliche Kolitis-Modelle erzeugt werden. Die Tiere in der vorliegenden Arbeit erhielten DSS in 1%iger Konzentration. Das wirft die Frage auf, ob eine eventuell höhere Konzentration an DSS die Ausbreitung der Atherosklerose in der mit DSS behandelten Gruppe begünstigen würde. Die verwendete Konzentration konnte offensichtlich zwar eine Kolitis auslösen, jedoch ist an dieser Stelle fraglich, ob die Dosierung auch ausreicht, um Einfluss auf die Progression der Atherosklerose auszuüben, zumindest im Hinblick auf die Quantität. Zur Klärung dieser Frage müsste der Versuchsaufbau durch höhere Dosierungen und weniger Zyklen modifiziert werden. Exemplarisch könnte 2,5%iges DSS bei drei Zyklen verwendet werden (Deng *et al.*, 2022).

Eine weitere Ursache könnte die zeitliche Verzögerung der DSS Gabe bedingt durch die zusätzliche Tamoxifen-Injektion sein. Das verwendete *Apoe*^{-/-} Mausmodell beinhaltet ein *Lineage tracing* System und benötigt für die Aktivierung des Systems die Injektion von Tamoxifen. Erst das Tamoxifen ermöglicht die lückenlose Nachverfolgung der glatten Muskelzellen. Durch diesen Eingriff hat sich der Zeitpunkt der DSS Gabe nach hinten verschoben. Dementsprechend später startete die Immunantwort und letztendlich auch die Entwicklung einer möglichen Atherosklerose. Eine Manifestation im früheren Alter könnte möglicherweise andere Ergebnisse bringen. Alternativ hätte eventuell auch eine im Anschluss an die Tamoxifengabe verlängerte DSS Anwendung ein anderes Resultat erbracht. Es ist bisher nicht bekannt wie sich das DSS Modell im *Lineage tracing* System auswirkt bzw. ob das Studiendesign bezüglich der DSS Zyklen Anpassungen bedarf. Eine Überlegung wäre, die DSS Gabe auf mehr als die hier angewendeten 5 Zyklen auszuweiten und erst zu einem späteren Zeitpunkt die Entnahme der Organe vorzunehmen. Durch die verlängerte Exposition bliebe mehr Zeit für einen möglichen atherosklerotischen Umbau.

Weiterhin ist zu überlegen, ob das Tamoxifen selbst Eigeneffekte auf die Atheroprogession im Mausmodell ausüben kann. Tamoxifen gehört zur Gruppe der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren und wird vorwiegend in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt (Clarke *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass Östrogen eine protektive Auswirkung auf die KHK-Entstehung hat, so dass sich Frauen vor allem erst

nach der Menopause bei sinkenden Östrogenspiegel mit einer symptomatischen KHK vorstellen (Hodis *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2016; Prabakaran *et al.*, 2021). In Studien konnte dargelegt werden, dass ein positiver Nebeneffekt der Therapie des Mammakarzinoms mit Tamoxifen die Reduktion von Myokardinfarkten ist (McDonald und Stewart, 1991). Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig verstanden. Clarke *et al.* rekrutierten 31 Männer mit einer koronarangiografisch nachgewiesenen KHK. Die Interventionsgruppe, bestehend aus 16 Männern, bekam für 56 Tage täglich 40 mg Tamoxifen verabreicht. Die Kontrollgruppe, bestehend aus 15 Männern, blieben diesbezüglich unbehandelt. Beide Gruppen bekamen darüber hinaus Statine und Acetylsalicylsäure. Bei allen Patienten wurde regelmäßig die endothelabhängige flussvermittelte Dilatation der *A. brachialis* gemessen. Die Endothelfunktion verbesserte sich signifikant in der Interventionsgruppe um 2,1% bis 7,5% ($2,1 \pm 0,3\%$ bis $7,5 \pm 0,7\%$, $p < 0,0001$) (Clarke *et al.*, 2001). Somit scheint Tamoxifen Eigeneffekte auf das Endothel und damit auch wohlmöglich auf die Atheroprogression zu besitzen.

Die Tiere in dieser Arbeit wurden somit mit zwei chemischen Substanzen behandelt: zunächst mit Tamoxifen in der 7. und 8. Lebenswoche und ab der 12. Lebenswoche mit DSS. Beide Substanzen wurden zeitlich versetzt auf unterschiedlichen Applikationswegen verabreicht. Tamoxifen wurde subkutan injiziert und DSS oral angewendet. Dennoch ist eine Interferenz des Tamoxifens mit DSS nicht auszuschließen. Es konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass Tamoxifen eine veränderte gastrointestinale Motilität hervorruft (Bhave *et al.*, 2022). Vor diesem Hintergrund kann ein verändertes Wirkprofil des DSS durch Beeinflussung seiner gastrointestinalen Passage nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dass ein toxischer Effekt des DSS auf den Darm besteht, wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Es kann keine definitive Aussage dazu gemacht werden, ob die toxische Potenz des DSS in diesem Mausmodell ohne Tamoxifen stärker ausgeprägt wäre. Denkbar könnte sein, dass eine Dosisanpassung des DSS bei gleichzeitigem Einsatz von Tamoxifen in einem Mausmodell notwendig ist. In dieser Arbeit wurde bewusst auf eine fettreiche Western Diät zusätzlich zum *ApoE*-defizienten Modell verzichtet, damit diese nicht als Co-Variable zu möglichen Fehlinterpretationen führt. Zum einen ist bekannt, dass die Western Diät selbst einen Einfluss auf Inflamationsprozesse hat (Christ *et al.*, 2018). Zum anderen könnte es durch die Western Diät als zweiten Atherosklerose fördernden Faktor zu einer starken akzelerierten Atherosklerose kommen, die durch dieses schnelle Wachstum wichtige Zwischenprozesse maskieren könnte (Meir und Leitersdorf, 2004; Nakashima *et al.*,

1994). Da man in dieser Arbeit kaum vergrößerte Plaques feststellen konnte, ist es dennoch zu überlegen, ob man hier eine Western Diät zusätzlich integriert unter Beachtung der möglichen Interaktionen. Insbesondere vor dem Hintergrund einer potenziellen Beeinflussung der Plaqueentwicklung durch Tamoxifen bzw. auch einer gewissen Interferenz mit dem DSS könnte eine Western Diät als atherosklerosefördernder Faktor eine Überlegung wert sein.

Wie bereits erwähnt legen die Ergebnisse aus dem Abschnitt 3.1 nahe, dass in den Tieren erfolgreich eine Kolitis induziert werden konnte. Die Analyse der gewebeständigen Inflammation zeigte signifikante Unterschiede zugunsten der mit DSS behandelten Gruppe. Somit wurde durch die Bestimmung von *Tnfa* und *Il1b* vor allem im Darm ein entzündliches Geschehen in den mit DSS behandelten Tieren dokumentiert. Zusätzlich zu den hier erzielten Ergebnissen könnte auch als Ausblick ergänzend die systemische Inflammation überprüft werden. Hierzu müssten die zirkulierenden Werte für TNF- α und IL-1 β in den Blutseren der Tiere ermittelt werden. Darüber hinaus wäre es von großer Bedeutung, weitere Entzündungszellen wie z.B. Leukozyten in der fluoreszenzaktivierten Fluoreszenzanalyse (FACS-Analyse) zu bestimmen.

In Vorarbeiten von Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf konnten größere Plaques in der DSS-Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe gesichert werden. Dabei waren die Plaques insgesamt kleiner als die Plaques, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden. Ein Erklärungsansatz dafür könnte sein, dass die Versuchstiere in den Vorarbeiten zu einem Zeitpunkt untersucht wurden, in dem die Atheroprogression noch nicht stark vorangeschritten war. Somit waren die Unterschiede noch gut detektierbar. Eventuell würde also ein früherer Untersuchungszeitpunkt auch für das in dieser Arbeit untersuchte Modell eher Unterschiede sichtbar machen. Wenn die Atheroprogression sowohl in der DSS-Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe vorangeschritten ist, so lassen sich Größenunterschiede nicht mehr herauskristallisieren. Die Ergebnisse aus dem Kapitel 3.2 heben zudem die Bedeutung einer genaueren Analyse der Zellzusammensetzung hervor. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der Fokus auf die Überprüfung der Plaquequalität auf Zellebene gelegt. Obschon die Auswertung der Gesamtmakrophagen keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zeigte, offenbarten sich diese nach detaillierter Analyse hinsichtlich des Phänotyp-*Switches*. Hierbei konnten erstmalig Unterschiede sichtbar gemacht werden, welche ohne die Nutzung des Mausmodells verborgen geblieben wären. Auch wenn die Größe des Plaques keine Unterschiede zeigte, können doch bereits Änderungen auf zellulärer Ebene vorhanden sein, die die

Plaquequantität noch nicht bestimmen. Sollte es bereits in dieser Phase zu zellulären Abweichungen in der mit DSS behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kommen, so würde dies neue Optionen für frühe Interventionstherapien ermöglichen. Atherosklerotische Plaque verfügen über einen komplizierten Aufbau, in den verschiedene Zellen und verschiedene Bestandteile der Extrazellulärmatrix involviert sind (Falk, 2006; Hansson und Hermansson, 2011; Libby, 2002). So kommt es z.B. in *Apoe^{-/-}*-Mäusen zu einer Überexpression von Decorin aus der Extrazellulären Matrix und damit zu Veränderungen während der Plaqueprogression, die je nach weiteren Einflussfaktoren einen anderen Verlauf nehmen können (Al Haj Zen *et al.*, 2006). Während der Atheroskleroseentwicklung können Zellen ihre ursprünglichen Funktionen ändern. Sie verlieren dabei ihre charakteristischen Marker und gewinnen dafür andere. Dieses Phänomen wird als *Phänotyp-Switch* bezeichnet und wurde im Kapitel 1.4 ausführlich erklärt (Alexander und Owens, 2012; Pan *et al.*, 2020). Es ist in seiner Komplexität noch nicht hinreichend erfasst und verstanden worden ist. Dieser Themenkomplex ist somit noch Gegenstand aktueller Forschung und soll in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

4.3 Einfluss der Kolitis auf den *Phänotyp-Switch*

Das Wissen um den *Phänotyp-Switch* ist essentiell, da das Herab- und Heraufregulieren von Markern eine genaue Zuordnung der Zellen gerade in histologischen Färbungen erschwert (Bennett *et al.*, 2016). Angesichts dieser Dynamik bleibt es herausfordernd endgültige Aussagen über die Zellzusammensetzung zu treffen. Um unvollständige Ergebnisse zu vermeiden, ist eine detaillierte Analyse der Zellen mittels eines *Lineage tracing* Systems unabdingbar geworden.

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob eine Kolitis Auswirkungen auf die Plaquekomposition hat und ob der *Phänotyp-Switch* ein möglicher Mechanismus dessen ist. Dafür wurde die Anzahl von Zellen bestimmt, die unter anderem Marker für Makrophagen tragen oder positiv für YFP sind. Vergleicht man in beiden Gruppen allgemein die Makrophagen, so findet man keinen Unterschied. Es ist bekannt, dass glatte Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques ihre herkömmlichen Marker wie ACTA2 herunterregulieren und stattdessen Mac2 exprimieren. Daher war es besonders interessant sich die doppelpositiven Zellen, also Mac2+YFP+, anzusehen. Durch die Hinzunahme des YFP Signals war es möglich glatte Muskelzellen, die einen Makrophagenmarker

tragen, ausfindig zu machen und somit Aussagen über den Phänotyp-Switch zu treffen. Nach Hinzunahme dieses YFP Signals konnte beobachtet werden, dass der Phänotyp-Switch in der mit DSS behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war. Weiter war es zudem interessant sich die Anzahl echter Makrophagen anzusehen. Diese Makrophagen sind charakterisiert als die Zellen, die Mac2⁺ sind aber YFP⁻. Das fehlende YFP Signal deutet darauf, dass diese Zellen nie glatte Muskelzellen und bereits von Beginn an Makrophagen waren. Die Zahl echter Makrophagen war in der mit DSS behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Unter Würdigung der Erkenntnisse in dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass die atherosklerotischen Plaques in der mit DSS behandelten Gruppe von inflammatorischer Genese sind. Als unmittelbare Folge der Kolitis scheint der Phänotyp-Switch in diesen Plaques im Vergleich zur Referenzgruppe herunterreguliert zu sein, da die Zahl der Zellen mit einem doppelpositiven Signal für YFP und Makrophagen vermindert ist. Somit existierten hier weniger SMC, die einen Phänotyp-Switch zu Makrophagen unterliefen. Es erfolgte hier also weder ein spezifischer Markerverlust noch eine gesonderte Expression von Makrophagen-Markern. Stattdessen ist der Anteil echter Makrophagen, also Makrophagen, die ursprünglich auch schon Makrophagen waren und keinem Phänotyp-Switch unterliegen, tendenziell erhöht. Dies äußerte sich in den Experimenten durch ein negatives Signal für YFP und ein positives für Makrophagen. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der inflammatorischen Hypothese.

Die inflammatorische Hypothese beschäftigt sich mit dem Einfluss der Inflammation im Körper auf die Atherogenese (Blankenberg und Yusuf, 2006). Lange Zeit wurde als einer der Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose der Cholesterin-Level gezählt (Bergheanu *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2016). Heutzutage erfolgt eine differenziertere Betrachtung. Der Tatsache, dass eine Erhöhung des inflammatorischen Markers CRP im Zusammenhang mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen steht, wird eine zunehmende Bedeutung beigemessen (Badimon *et al.*, 2018; Libby, 2021; Sun *et al.*, 2005). Folgende Studien kommen in diesem Kontext zum Tragen: Für die Jupiter-Studie (*Justification for Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*) wurden 17802 Probanden mit normalen Cholesterinwerten unter 130 mg/dl (3,4 mmol/Liter) rekrutiert (Ridker *et al.*, 2012). Im Gegenzug sollte als weiteres Einschlusskriterium der CRP Wert über 2,0 mg/l liegen. Das Studiendesign war dabei eine randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie, die multizentrisch an 1315 Orten in 26 Ländern durchgeführt wurde. In diese wurden sowohl Männer über 50 Jahre als auch Frauen über

60 Jahre eingeschlossen. Der Hälfte der Probanden wurden 20 mg Rosuvastatin, ein HMG-CoA-Reduktasehemmer, verabreicht und der anderen Hälfte ein Placebo. Insgesamt wurde die Studie für 5 Jahre angelegt. Nach 12 Monaten wurde eine mediane LDL Senkung von 50% erreicht und eine mediane Senkung des CRPs von 37%.

Nach 1,9 Jahren wurde die Studie aufgrund stark abweichender Ergebnisse hinsichtlich der primären Endpunkte gestoppt. Zu den Endpunkten zählen Herzinfarkte, Schlaganfälle, instabile Angina pectoris, invasive Koronareingriffe sowie kardiovaskulärer Tod. In der Rosuvastatin Gruppe erreichten 142 der Probanden mindestens einen der kardiovaskulären Endpunkte, während in der Kontrollgruppe sogar 251 Probanden betroffen waren. Somit führte die Rosuvastatineinnahme zu einer deutlichen Risikoreduktion von 44% (HR 0,56; 95% KI 0,46–0,69 $P < 0,00001$) (Ridker *et al.*, 2008).

Unklar war an dieser Stelle jedoch weiterhin, auf welchen Effekt diese signifikante Reduktion der Inzidenz zurückzuführen war. Als Ursache für den positiven Nutzen stand einerseits das stark gesenkte LDL, andererseits das gesenkte CRP zur Debatte. Auch das Zusammenwirken beider Parameter könnte einen Einfluss haben, zumal Statine sowohl zu einer starken LDL-Cholesterinsenkung führen als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen. Um der Frage auf den Grund zu gehen, wurden weitere Studien konzipiert und durch die Entwicklung neuer Medikamentenklassen wie den PCSK9-Hemmern ermöglicht (Ridker *et al.*, 2017; Tardif *et al.*, 2019).

In der praktischen Anwendung existieren bereits Therapieoptionen, die diese unterschiedlichen Ansätze adressieren. Klassischerweise haben sich die Statine in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen durchgesetzt. Sie führen nachweislich sowohl zu einer Senkung der LDL-Konzentration als auch des CRP-Levels durch pleiotrope Effekte und schließen somit beide Therapiekonzepte ein (Kavalipati *et al.*, 2015; Ridker *et al.*, 2008). Zur Senkung der Lipidwerte existiert ein Leitfaden, der die Hinzunahme oder den Austausch von weiteren Medikamenten beinhaltet (Mach *et al.*, 2020). Zusätzlich wurden die neuartigen PCSK9-Hemmer eingeführt und haben Einzug in die alltägliche Praxis genommen. Im Gegensatz zu den Statinen entfalten sie ihre Wirkung durch eine isolierte LDL-Senkung und werden eingesetzt, wenn andere Medikamente nicht greifen (Barale *et al.*, 2021; Mach *et al.*, 2020). Eine isolierte LDL-Senkung würde vermutlich aber bei Patienten mit Plaques inflammatorischer Genese keinen optimalen Nutzen erzielen. Diese könnten stattdessen von Medikamenten aus dem antiinflammatorischen Formenkreis profitieren. Ein

Medikament, das zur CRP-Absenkung führt ist z.B. das Canakinumab, welches in der CANTOS (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*)-Studie einer Prüfung unterzogen wurde. Die im *New England Journal of Medicine* publizierte CANTOS-Studie startete im Jahr 2011 und ging bis 2017. Es handelte sich um eine randomisierte und placebokontrollierte Doppelblindstudie, für die insgesamt an 1132 Zentren in 39 Ländern 10.061 Probanden mit einem Myokardinfarkt in der Anamnese und hohen CRP-Level rekrutiert wurden. Es wurden insgesamt vier Gruppen angesetzt: Der ersten Gruppe wurde alle drei Monate 50 mg Canakinumab injiziert, der zweiten Gruppe 150 mg und der dritten Gruppe 300 mg. Bei der vierten Gruppe handelte es sich um eine Placebogruppe (Ridker *et al.*, 2017). Canakinumab ist ein monoklonaler Antikörper, der seine antientzündliche Wirkung über die Hemmung des Zytokins IL-1 β entfaltet (Dhimolea, 2010). Beide Gruppen wurden hinsichtlich der primären Endpunkte verglichen, zu denen der Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, nicht-tödlicher Herzinfarkt und nicht-tödlicher Schlaganfall gehörten. Kardiovaskuläre Ereignisse konnten in der 150mg-Gruppe um bis zu 15% der Fälle gesenkt werden (Ridker *et al.*, 2017). Da die Zahl tödlicher Infektionen jedoch anstieg, wurde eine Prophylaxe mit Canakinumab verworfen (Ridker *et al.*, 2017).

Der Einsatz in der Sekundärprophylaxe muss jedoch individuell entschieden werden. Nach Leitlinie bekommen die betroffenen Patienten zunächst eine Hochdosis eines Statins zur Sekundärprophylaxe (Mach *et al.*, 2020). Die Blutwerte der Patienten können sich jedoch erheblich unterscheiden, was unterschiedliche Konsequenzen zur Folge haben würde. Bei fehlendem Therapieerfolg mit weiterhin erhöhten LDL-Werten sollte ein zweites Medikament zur reinen LDL-Senkung in Betracht gezogen werden. Demgegenüber stehen Patienten, die trotz Statinen weiterhin hohe CRP-Werte aufweisen und konsequenterweise ein zweites Medikament mit antiinflammatorischem Wirkungsprofil erhalten. Lange Zeit galt die vorherrschende Meinung, dass eine LDL-Senkung zur Prophylaxe ausreicht (Corti *et al.*, 2005). Heutzutage ist man hiervon jedoch abgerückt und ist der Überzeugung, dass Patienten ebenso von einer antientzündlichen Therapie profitieren können (Forrester und Libby, 2007; Libby, 2021; Ridker *et al.*, 2017). Isoliert erhöhte Entzündungswerte können somit ebenso behandlungsbedürftig sein. Herzinfarktpatienten sind in der Pathogenese auf zellulärer Ebene nicht identisch und erfordern somit eine multimodale Behandlungsstrategie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit knüpfen hier an und lassen darauf schließen, dass zwischen der Atherosklerose mit und ohne CED unterschieden werden muss. Wie oben beschrieben

konnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Plaques in beiden Tiergruppen nachgewiesen werden. Die Plaques in der Kolitis-Gruppe waren durch das vermehrte Vorkommen von Makrophagen charakterisiert, was eher für einen entzündlichen Prozess spricht. Obwohl dieser Zusammenhang statistisch gesehen keine eindeutige Signifikanz aufwies, zeichnete sich doch ein Trend als Fingerzeig ab und könnte möglicherweise auf eine potenzielle Bedeutung der Makrophagen in der Pathophysiologie der Atherosklerose bei CED hinweisen. Weitere umfangreichere Untersuchungen und Analysen, die eine höhere Zahl von Versuchstieren einschließen, ist erforderlich, um diesen Trend zu bestätigen und ein tieferes Verständnis für die mögliche Rolle der Makrophagen in diesem Zusammenhang zu erlangen. Vor diesem Hintergrund muss die Frage aufgeworfen werden, ob Patienten mit einer durch CED bedingten Atherosklerose mit inflammatorischen Plaques nicht zusätzlich von einer antientzündlichen Therapie profitieren und eher weniger auf eine isolierte LDL-Senkung ansprechen. Insbesondere die Tatsache, dass Patienten mit CED keine klassischen Risikofaktoren für Atherosklerose und auch keine erhöhten LDL-Level aufweisen, unterstreicht die Relevanz dieses Themas (Yarur *et al.*, 2011). Zudem zeigten institutsinterne Vorarbeiten von Dr. med. Helene Schäffer eine verminderte Lipidretention in den Plaques der mit DSS behandelten Gruppe (Schäffer, 2022).

Ein weiteres anti-entzündliches Medikament, das neben Canakinumab therapeutisch denkbar ist, ist das Colchicin. Colchicin wird in der Therapie der Gicht und Perikarditis eingesetzt (Imazio *et al.*, 2005). Mit der COLCOT (*Colchicine Cardiovascular Outcome Trial*)-Studie konnte belegt werden, dass die antientzündliche Therapie mit Colchicin eine Verbesserung der Langzeitkomplikation nach Myokardinfarkt mit sich bringt und als zusätzliches Medikament in der Postinfarktprophylaxe in Erwägung gezogen werden kann (Tardif *et al.*, 2019). Die Nebenwirkungen in der COLCOT-Studie sind mit 16% in der Colchicin-Gruppe und 15,8% in der Kontrollgruppe in etwa gleich. Das verstärkt nochmal den potentiellen Einsatz von Colchicin in der Sekundärprophylaxe von Infarkt-Patienten (Tardif *et al.*, 2019). In der COLCOT-Studie wurden Patienten mit CED ausgeschlossen (Tardif *et al.*, 2019). Die Daten aus dieser Arbeit könnten durch eine entsprechende Studie, die genau diese Patienten einschließt, bestätigt werden und letztendlich einen Colchicineffekt auf die Plaquemodifikation von CED Patienten untersuchen. Eine entzündungssenkende Therapie mit Colchicin bei CED Patienten könnte einen großen Nutzen gegenüber der herkömmlichen Statintherapie in Aussicht stellen. Gleichzeitig muss auch geprüft werden, ob Patienten mit CED überhaupt auf

einen Statineinsatz ansprechen. Die bisherigen Kolitis-Studien konnten nämlich aufzeigen, dass auch CED Patienten ohne klassische Risikofaktoren anfällig für kardiovaskuläre Erkrankungen sind und lediglich das Merkmal der Inflammation aufwiesen (Yarur *et al.*, 2011).

Obwohl die Analyse der Plaquequantität keinen Unterschied in der mit DSS behandelten Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe erbrachte, ergeben sich Hinweise für Unterschiede in der Plaquequalität mit vermindertem Phänotyp-*Switch* und einem Trend zu einer höheren Zahl echter Makrophagen in der mit DSS behandelten Gruppe. Die Plaquebildung in den mit DSS behandelten Tieren scheint schon in der frühen Entwicklung anders abzulaufen. Hinsichtlich einer potenziellen therapeutischen Intervention kann sich hieraus die Konsequenz ergeben, diese Form der Plaques bereits in der sehr frühen Entstehungsphase effektiv behandeln zu können und ihre Progression aufzuhalten.

Hervorzuheben ist nochmals die Relevanz des Phänotyp-*Switches* als tragender anti-inflammatorischer Trigger, auf welchen ein besonderes Augenmerk gelegt werden muss. Der Makrophagenanteil ist nach der Mac2-Färbung im aortalen Ursprung der Versuchstiere in beiden Gruppen gleich, was aus der Auswertung im Abschnitt 3.2.3 hervorgeht. Der gesamte Makrophagenanteil zeigt auch in den BCAs in der Abbildung 21B keine Unterschiede. Erst durch die Aufschlüsselung anhand des YFP-Signals in echte Makrophagen und Makrophagen-ähnliche Zellen kann der tatsächliche Makrophagenanteil errechnet werden (Abbildung 21D). Eine Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2 der aortalen Ursprünge sollte ebenso ergänzend durchgeführt werden und könnte hier nämlich aufschlussreiche Informationen über den realen Makrophagenanteil bieten. Um Aussagen über die Anzahl von Makrophagen treffen zu können, sollte immer eine Aufschlüsselung anhand des YFP-Signals erfolgen.

4.4 Einfluss auf die Plaquestabilität

In dieser Arbeit wurde speziell der Phänotyp-*Switch* von glatten Muskelzellen zu Makrophagen durch Herunterregulierung von Markern für glatte Muskelzellen und Heraufregulierung von Markern für Makrophagen untersucht. Darüber hinaus existieren Arbeiten zum Phänotyp-*Switch* anderer Zellarten (Hartmann *et al.*, 2021; Wirka *et al.*, 2019).

Wissenschaftliche Arbeiten deuten darauf, dass der Phänotyp-Switch anderer Zellarten eine protektive Rolle in der Plaqueentwicklung spielen könnte. Wirka *et al.* haben eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung der phänotypisch veränderten glatten Muskelzellen vorgenommen mit dem Ergebnis, dass hierdurch nicht klassische Makrophagen-ähnliche Zellen entstehen, sondern eher fibroblasten-ähnliche Zellen. Diese besitzen die Fähigkeit extrazelluläre Matrix herzustellen. (Wirka *et al.*, 2019). Extrazelluläre Matrix ist ein Bestandteil der fibrösen Kappe der atherosklerotischen Plaques und verleiht diesen Stabilität und Beständigkeit (Hansson, 2005). Zusätzlich legen die Ergebnisse von Hartmann *et al.* nahe, dass ein Fehlen der Hyaluronsäure-Synthase 3 mit dem vermehrten Auftreten von phänotypisch modulierten Zellen und dadurch gleichzeitig auch von höheren Menge Kollagen einhergeht (Hartmann *et al.*, 2021). Da Kollagen zu einem sehr hohen Anteil in EZM enthalten ist, scheint hier ein protektiver Zusammenhang zu herrschen. Die Protektion ist auf eine dicke und kollagenreichere fibröse Kappe des atherosklerotischen Plaques zurückzuführen, welche das Rupturrisiko minimiert (Bazan *et al.*, 2022; Bentzon *et al.*, 2014; Kurihara *et al.*, 2021).

Vor diesem Hintergrund lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung zu, dass die Induktion der Kolitis durch DSS instabile Plaques durch Herunterregulation des Phänotyp-Switches fördert. Mikroskopisch konnte dies dann auch durch Beobachtung der schmalen fibrotischen Kappe belegt werden, was in der Abbildung 21E dargestellt ist. Es konnte in dieser Arbeit also gezeigt werden, dass die Herunterregulation des Phänotyp-Switches mit einer schmalen fibrotischen Kappe einhergeht. Eine schmale fibrotische Kappe definiert wiederum gemeinsam mit den weiteren Kriterien wie Kollagenarmut, das Fehlen glatter Muskelzellen und das Vorhandensein von Makrophagen einen instabilen Plaque, welcher prädestiniert ist für Rupturen (Kurihara *et al.*, 2021; Libby *et al.*, 2011). Atherosklerotische Plaques sind gemeinhin mit einer fibrotischen Kappe versehen, die zum Schutz vor spontanen Rupturen dienen soll (Bentzon *et al.*, 2014). Die mit DSS behandelte Gruppe in dieser Arbeit hingegen bildete eine sehr dünne fibrotische Kappe aus. Die Kontrollgruppe ohne Kolitis wies eine fibrotische Kappe vor, die reich an glatten Muskelzellen war. Anhand dieser Befundkonstellation kann darauf zurückgeschlossen werden, dass die Tiere aus der Versuchsgruppe anfälliger für spontane Rupturen sind als die Tiere der Kontrollgruppe. Interessant wäre es das Endstadium der Atherosklerose, eine Plaqueruptur, genauer zu erforschen. Diesbezüglich muss jedoch erwähnt werden, dass eine Limitation hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus besteht, weil die Ruptur im murinen Modell unterschiedlich zum menschlichen

Organismus verläuft (Schwartz *et al.*, 2007). Jedoch wäre es ebenso von großem Interesse, sich weitere Stabilitätsmarker wie z.B. den Erythrozytenmarker TER119 oder auch die Kollagenmenge mithilfe einer Pikrosiriusrot-Färbung sowie den Decorinanteil mit einer DAB-Färbung anzusehen. Weitere Aussagen würde man auch mit der Analyse des Phänotyp-Switch anderer Zellen erhalten, wie z.B. die Untersuchung der oben genannten Fibroblasten-ähnlichen Zellen.

4.5 Ausblick

Eine uneingeschränkte Übertragung vom murinen Modell auf den menschlichen Organismus ist aufgrund der Komplexität nicht ohne weiteres möglich, auch wenn es eine sehr gute Basis für die Erforschung von Erkrankungen bietet.

Zur weiteren Erforschung für die klinische Relevanz müssten daher klinische Studien generiert werden, die sich Patienten mit CED widmen. Die Interventionsgruppe müsste z.B. ein antiinflammatorisches Medikament wie Colchicin erhalten und einem Kontrollkollektiv mit Statinbehandlung als bereits bestehendes Behandlungsangebot gegenübergestellt werden (*treatment-as-usual*). Dafür müsste man eine prospektiv geplante klinische Studie über mehrere Jahre ansetzen und dann das Outcome entsprechend protokollieren.

In diesem Experiment wurden zudem nur männliche Mäuse untersucht, da bisher nur bei diesen das *Lineage tracing* System etabliert werden konnte. Das liegt daran, dass der *Myh11*-Promotor, der speziell für SMC ist, nur auf dem Y-Chromosom detektiert wurde. Das schränkt die Aussagekraft auf den menschlichen Organismus weiter ein. Frauen und Männer sind gleichermaßen an Colitis ulcerosa erkrankt, während mehr Frauen von Morbus Crohn betroffen sind (Greuter *et al.*, 2020; Okoro und Kane, 2009). Auch hinsichtlich der Atherosklerose herrschen geschlechterspezifische Unterschiede. Während Frauen im prämenopausalen Alter eine geringere Inzidenz aufweisen, einen Myokardinfarkt zu erleiden, steigt diese im postmenopausalen Alter (Patell, 2014; Pedersen *et al.*, 2016; Prabakaran *et al.*, 2021). In einer Arbeit von Singh *et al.* konnte gezeigt werden, dass insbesondere Frauen gefährdet sind, eine durch CED bedingte ischämische Herzerkrankung zu entwickeln (Singh *et al.*, 2014). Das unterstreicht die Relevanz geschlechter-abhängiger Untersuchungen und zunehmend auch gleichermaßen Frauen in Studien einzuschließen. Liao *et al.* konnten Mäuse züchten, die *Myh11*-ER(T2) auf dem X-Chromosom tragen (Liao *et al.*, 2017). Damit ist es möglich sowohl männliche

als auch weibliche Mäuse auf dieses Merkmal hin zu untersuchen. Auch Deaton *et al.* konnten in dem Labor, aus dem die Mäuse für diese Arbeit bezogen wurden, neuerdings eine neue Mauslinie etablieren, die den Myh11-Promotor auf dem Chromosom 2 trägt und somit sowohl in männlichen als auch in weiblichen Mäusen zu finden ist (Deaton *et al.*, 2023). Es ist interessant herauszufinden, ob sich dieselben Ergebnisse auch für die weiblichen Tiere reproduzieren lassen. Heute rückt die Gendermedizin immer weiter in den Vordergrund und ist ein großes Thema. Vor allem Frauen sind häufig in den vergangenen Studiendesigns in der Forschung unterrepräsentiert. Für klinische Studien werden häufiger Männer rekrutiert, da Frauen hormonellen Schwankungen unterliegen und immer auch das Risiko einer Schwangerschaft mit potenzieller Gefährdung vorliegt. Hormonelle Schwankungen sind auch ein Grund, warum eher männliche Versuchstiere in experimentelle Studien einbezogen werden. Dabei ist schon lange klar, dass Frauen und Männer häufig Unterschiede in Krankheitsverläufen und Therapieansprechen bieten. Als Beispiel kann an dieser Stelle angeführt werden, dass Männer zwar häufiger Herzinfarkte erleiden, Frauen jedoch eine höhere Mortalität aufweisen (Nichols *et al.*, 2014, 2012; Pedersen *et al.*, 2016). Als Ursache wird eine unterschiedliche Symptomkonstellation und Krankheitsbewusstsein vermutet. Wie bereits erwähnt, konnte eine französische Studie von Kirchgesner *et al.* herausfinden, dass eher Frauen einem höheren Risiko, eine durch CED bedingte KHK zu entwickeln, ausgesetzt sind (Kirchgesner *et al.*, 2018).

4.6 Fazit

Insgesamt zeigt sich bei der Betrachtung der Daten zusammenfassend, dass die experimentelle DSS-induzierte Kolitis in den atherosklerotischen Plaques des murinen Modells den Phänotyp-Switch hemmt. Durch das vermehrte Vorhandensein von Makrophagen erhalten die Plaques eine instabile Struktur mit ausgedünnter fibrotischen Kappe. Diese instabile Struktur könnte ein größeres Risiko für eine Plaqueruptur darstellen. Diese Form der atherosklerotischen Plaques ist eher auf eine inflammatorische Kaskade zurückzuführen. Übertragen auf den menschlichen Organismus könnte dies bedeuten, dass eine herkömmliche Therapie mit Statinen für eine solche Konstellation keine ausreichende medikamentöse Therapie darstellt und ergänzt werden muss. Hier müsste ein zusätzlicher antiinflammatorischer Ansatz in Erwägung gezogen werden.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adegbola, S.O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A., Tozer, P., 2018. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2244.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082244>
- Al Haj Zen, A., Caligiuri, G., Sainz, J., Lemitre, M., Demerens, C., Lafont, A., 2006. Decorin overexpression reduces atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 187, 31–39.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.023>
- Alencar, G.F., Owsiany, K.M., Karnewar, S., Sukhavasi, K., Mocci, G., Nguyen, A.T., Williams, C.M., Shamsuzzaman, S., Mokry, M., Henderson, C.A., Haskins, R., Baylis, R.A., Finn, A.V., McNamara, C.A., Zunder, E.R., Venkata, V., Pasterkamp, G., Björkegren, J., Bekiranov, S., Owens, G.K., 2020. Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis. *Circulation* 142, 2045–2059.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046672>
- Alexander, M.R., Owens, G.K., 2012. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 13–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142315>
- Alfon, J., Royo, T., Garcia-Moll, X., Badimon, L., 1999. Platelet Deposition on Eroded Vessel Walls at a Stenotic Shear Rate Is Inhibited by Lipid-Lowering Treatment With Atorvastatin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1812–1817.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.7.1812>
- Ambrose, J.A., Barua, R.S., 2004. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 1731–1737.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.12.047>
- Ananthakrishnan, A.N., 2015. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: A Review. *Dig. Dis. Sci.* 60, 290–298. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3350-9>
- Andreeva, E.R., Pugach, I.M., Orekhov, A.N., 1997. Subendothelial smooth muscle

cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* 135, 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00136-6)

Aniwan, S., Pardi, D.S., Tremaine, W.J., Loftus, E.V., 2018. Increased Risk of Acute Myocardial Infarction and Heart Failure in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 1607-1615.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.031>

Antoniou, E., Margonis, G.A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., Papalois, A., Pikoulis, E., 2016. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann. Med. Surg.* 11, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2016.07.019>

Arnett, D.K., Blumenthal, R.S., Albert, M.A., Buroker, A.B., Goldberger, Z.D., Hahn, E.J., Himmelfarb, C.D., Khera, A., Lloyd-Jones, D., McEvoy, J.W., Michos, E.D., Miedema, M.D., Muñoz, D., Smith, S.C., Virani, S.S., Williams, K.A., Yeboah, J., Ziaeian, B., 2019. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 140. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>

Aviram, M., Dankner, G., Cogan, U., Hochgraf, E., Brook, J.G., 1992. Lovastatin inhibits low-density lipoprotein oxidation and alters its fluidity and uptake by macrophages: In vitro and in vivo studies. *Metabolism* 41, 229–235. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(92\)90263-A](https://doi.org/10.1016/0026-0495(92)90263-A)

Badi, I., Mancinelli, L., Polizzotto, A., Ferri, D., Zeni, F., Burba, I., Milano, G., Brambilla, F., Saccu, C., Bianchi, M.E., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., Raucci, A., 2018. miR-34a Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Downregulating SIRT1 (Sirtuin 1) and Axl (AXL Receptor Tyrosine Kinase). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 2079–2090. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311298>

Badimon, L., Peña, E., Arderiu, G., Padró, T., Slevin, M., Vilahur, G., Chiva-Blanch, G., 2018. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front. Immunol.* 9, 430. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00430>

Barale, C., Melchionda, E., Morotti, A., Russo, I., 2021. PCSK9 Biology and Its Role in Atherothrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5880. <https://doi.org/10.3390/ijms22115880>

- Barreiro-de Acosta, M., Alvarez Castro, A., Souto, R., Iglesias, M., Lorenzo, A., Dominguez-Muñoz, J.E., 2011. Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* 5, 566–569. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.05.009>
- Bazan, H.A., Brooks, A.J., Vongbunyong, K., Tee, C., Douglas, H.F., Klingenberg, N.C., Woods, T.C., 2022. A pro-inflammatory and fibrous cap thinning transcriptome profile accompanies carotid plaque rupture leading to stroke. *Sci. Rep.* 12, 13499. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17546-9>
- Bennett, M.R., Sinha, S., Owens, G.K., 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 692–702. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306361>
- Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., Falk, E., 2014. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ. Res.* 114, 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Bergheanu, S.C., Bodde, M.C., Jukema, J.W., 2017. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis: Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. *Neth. Heart J.* 25, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s12471-017-0959-2>
- Bernstein, C.N., Wajda, A., Blanchard, J.F., 2008. The Incidence of Arterial Thromboembolic Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.09.016>
- Bhave, S., Ho, W.L.N., Cheng, K., Omer, M., Bousquet, N., Guyer, R.A., Hotta, R., Goldstein, A.M., 2022. Tamoxifen administration alters gastrointestinal motility in mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 34, e14357. <https://doi.org/10.1111/nmo.14357>
- Blankenberg, S., Yusuf, S., 2006. The Inflammatory Hypothesis: Any Progress in Risk Stratification and Therapeutic Targets? *Circulation* 114, 1557–1560. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652081>
- Breslow, J.L., 1996. Mouse Models of Atherosclerosis. *Science* 272, 685–688. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.685>
- Bunu, D.-M., Timofte, C.-E., Ciocoiu, M., Floria, M., Tamiceriu, C.-C., Barboi, O.-B., Tanase, D.-M., 2019. Cardiovascular Manifestations of Inflammatory Bowel Disease:

Pathogenesis, Diagnosis, and Preventive Strategies. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/3012509>

Busch, M.A., Kuhnert, R., 2017. 12-Monats-Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit in Deutschland. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-009>

Cainzos-Achirica, M., Glassner, K., Zawahir, H.S., Dey, A.K., Agrawal, T., Quigley, E.M.M., Abraham, B.P., Acquah, I., Yahya, T., Mehta, N.N., Nasir, K., 2020. Inflammatory Bowel Disease and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76, 2895–2905. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.10.027>

Campbell, S.C., Moffatt, R.J., Stamford, B.A., 2008. Smoking and smoking cessation—The relationship between cardiovascular disease and lipoprotein metabolism: A review. *Atherosclerosis* 201, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.046>

Cardiovascular diseases (CVDs) [WWW Document], 2021. URL [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed 6.1.22).

Castelli, W.P., Anderson, K., Wilson, P.W.F., Levy, D., 1992. Lipids and risk of coronary heart disease The Framingham Study. *Ann. Epidemiol.* 2, 23–28. [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(92\)90033-M](https://doi.org/10.1016/1047-2797(92)90033-M)

Chakraborty, R., Saddouk, F.Z., Carrao, A.C., Krause, D.S., Greif, D.M., Martin, K.A., 2019. Promoters to Study Vascular Smooth Muscle: Mistaken Identity? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 603–612. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312449>

Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., Vijay-Kumar, M., 2014. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 104. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>

Chen, H., Howatt, D.A., Franklin, M.K., Amioka, N., Sawada, H., Daugherty, A., Lu, H.S., 2022. A mini-review on quantification of atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Glob. Transl. Med.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.36922/gtm.v1i1.76>

Cheng, Z.J., Vapaatalo, H., Mervaala, E., 2005. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 12.

Cherepanova, O.A., Gomez, D., Shankman, L.S., Swiatlowska, P., Williams, J., Sarmiento, O.F., Alencar, G.F., Hess, D.L., Bevard, M.H., Greene, E.S., Murgai, M.,

- Turner, S.D., Geng, Y.-J., Bekiranov, S., Connelly, J.J., Tomilin, A., Owens, G.K., 2016. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective. *Nat. Med.* 22, 657–665. <https://doi.org/10.1038/nm.4109>
- Chistiakov, D.A., Melnichenko, A.A., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2017. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J. Mol. Med.* 95, 1153–1165. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8>
- Choudhury, M.J.H., Chowdhury, M.T.I., Nayeem, A., Jahan, W.A., 2015. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors of Stroke: A Review Update. *J. Natl. Inst. Neurosci. Bangladesh* 1, 22–26. <https://doi.org/10.3329/jninb.v1i1.22944>
- Christ, A., Günther, P., Lauterbach, M.A.R., Duewell, P., Biswas, D., Pelka, K., Scholz, C.J., Oosting, M., Haendler, K., Baßler, K., Klee, K., Schulte-Schrepping, J., Ulas, T., Moorlag, S.J.C.F.M., Kumar, V., Park, M.H., Joosten, L.A.B., Groh, L.A., Riksen, N.P., Espevik, T., Schlitzer, A., Li, Y., Fitzgerald, M.L., Netea, M.G., Schultze, J.L., Latz, E., 2018. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* 172, 162–175.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.013>
- Churchill, F.B., 1974. William Johannsen and the genotype concept. *J. Hist. Biol.* 7, 5–30. <https://doi.org/10.1007/BF00179291>
- Clarke, S.C., Schofield, P.M., Grace, A.A., Metcalfe, J.C., Kirschenlohr, H.L., 2001. Tamoxifen Effects on Endothelial Function and Cardiovascular Risk Factors in Men With Advanced Atherosclerosis. *Circulation* 103, 1497–1502. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.11.1497>
- Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., Mallat, Z., 2008. Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation* 117, 1649–1657. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091>
- Conway, D.E., Schwartz, M.A., 2013. Flow-dependent cellular mechanotransduction in atherosclerosis. *J. Cell Sci.* jcs.138313. <https://doi.org/10.1242/jcs.138313>
- Corti, R., Worthley, S.G., Helft, G., Viles-Gonzalez, J.F., Badimon, J.J., Corti, R., Fuster, V., Fayad, Z.A., Worthley, S.G., Helft, G., Chaplin, W.F., Viles-Gonzalez, J.F., Smith, D.A., Mizsei, G., Badimon, J.J., Weinberger, J., Corti, R., Muntwyler, J., 2005.

Effects of Aggressive Versus Conventional Lipid-Lowering Therapy by Simvastatin on Human Atherosclerotic Lesions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 106–112.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.054>

Cushing, K., Higgins, P.D.R., 2021. Management of Crohn Disease: A Review. *JAMA* 325, 69. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.18936>

Dąbrowski, S., Brillowska, A., Kur, J., 1999. Use of the Green Fluorescent Protein Variant (YFP) to Monitor MetArg Human Proinsulin Production in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 16, 315–323. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1072>

Dalen, J.E., Devries, S., 2014. Diets to Prevent Coronary Heart Disease 1957-2013: What Have We Learned? *Am. J. Med.* 127, 364–369.

<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.12.014>

Dandré, F., Owens, G.K., 2004. Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 286, H2042–H2051. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00625.2003>

Darabian, S., Hormuz, M., Latif, M.A., Pahlevan, S., Budoff, M.J., 2013. The Role of Carotid Intimal Thickness Testing and Risk Prediction in the Development of Coronary Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, 306. <https://doi.org/10.1007/s11883-012-0306-4>

De Bie, C., Ballet, V., Hendriks, N., Coenen, S., Weyts, E., Van Assche, G., Vermeire, S., Ferrante, M., 2015. Smoking behaviour and knowledge of the health effects of smoking in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 42, 1294–1302. <https://doi.org/10.1111/apt.13423>

Deaton, R.A., Bulut, G., Serbulea, V., Salamon, A., Shankman, L.S., Nguyen, A.T., Owens, G.K., 2023. A New Autosomal *Myh11-CreER^{T2}* Smooth Muscle Cell Lineage Tracing and Gene Knockout Mouse Model—Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 43, 203–211. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318160>

Deng, L., Guo, H., Wang, S., Liu, X., Lin, Y., Zhang, R., Tan, W., 2022. The Attenuation of Chronic Ulcerative Colitis by (R)-salbutamol in Repeated DSS-Induced Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2022/9318721>

- Dhimolea, E., 2010. Canakinumab. *mAbs* 2, 3–13.
<https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10328>
- Doßow, L., Arnim, U. von, 2019. Extraintestinale Manifestationen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen: Muskuloskelettale, Haut- und Augenbeteiligungen. *Klin.* 48, 295–300. <https://doi.org/10.1055/a-0969-1642>
- Dunne, A., O'Neill, L.A.J., 2003. The Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense.
- Elsherif, Y., Alexakis, C., Mendall, M., 2014. Determinants of Weight Loss prior to Diagnosis in Inflammatory Bowel Disease: A Retrospective Observational Study. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/762191>
- Falk, E., 2006. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, C7–C12.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>
- Fava, C., Montagnana, M., 2018. Atherosclerosis Is an Inflammatory Disease which Lacks a Common Anti-inflammatory Therapy: How Human Genetics Can Help to This Issue. A Narrative Review. *Front. Pharmacol.* 9, 55.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00055>
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P., 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10887–10890. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10887>
- Feil, S., Fehrenbacher, B., Lukowski, R., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Schaller, M., Feil, R., 2014. Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Macrophage-Like Cells During Atherogenesis. *Circ. Res.* 115, 662–667.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304634>
- Felder, S., 2006. Lebenserwartung, medizinischer Fortschritt und Gesundheitsausgaben: Theorie und Empirie. *Perspekt. Wirtsch.* 7, 49–73. <https://doi.org/10.1111/j.1465-6493.2006.00216.x>
- Forrester, J.S., Libby, P., 2007. The Inflammation Hypothesis and Its Potential Relevance to Statin Therapy. *Am. J. Cardiol.* 99, 732–738.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.09.125>
- Frangos, S.G., 1999. Localization of Atherosclerosis: Role of Hemodynamics. *Arch.*

Surg. 134, 1142. <https://doi.org/10.1001/archsurg.134.10.1142>

Freund, K.M., Belanger, A.J., D'Agostino, R.B., Kannel, W.B., 1993. The health risks of smoking the framingham study: 34 years of follow-up. *Ann. Epidemiol.* 3, 417–424. [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(93\)90070-K](https://doi.org/10.1016/1047-2797(93)90070-K)

Furie, B., Furie, B.C., 2008. Mechanisms of Thrombus Formation. *N. Engl. J. Med.* 359, 938–949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>

Fusco, G., Minelli, A., 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 547–556. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0267>

Gareb, B., Otten, A.T., Frijlink, H.W., Dijkstra, G., Kosterink, J.G.W., 2020. Review: Local Tumor Necrosis Factor- α Inhibition in Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceutics* 12, 539. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060539>

Garland, T., Kelly, S.A., 2008. Phenotypic plasticity and experimental evolution. *J. Exp. Biol.* 211, 2725–2725. <https://doi.org/10.1242/jeb.022673>

Getz, G.S., Reardon, C.A., 2016. Do the *Apoe*^{-/-} and *Ldlr*^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1734–1741. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.306874>

Getz, G.S., Reardon, C.A., 2006. Diet and Murine Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 242–249. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201071.49029.17>

Gomez, D., Baylis, R.A., Durgin, B.G., Newman, A.A.C., Alencar, G.F., Mahan, S., St. Hilaire, C., Müller, W., Waisman, A., Francis, S.E., Pinteaux, E., Randolph, G.J., Gram, H., Owens, G.K., 2018. Interleukin-1 β has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice. *Nat. Med.* 24, 1418–1429. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0124-5>

Gomez, D., Owens, G.K., 2012. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 95, 156–164. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs115>

Goody, P.R., Hosen, M.R., Christmann, D., Niepmann, S.T., Zietzer, A., Adam, M., Bönner, F., Zimmer, S., Nickenig, G., Jansen, F., 2020. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40,

885–900. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313067>

Greuter, T., Manser, C., Pittet, V., Vavricka, S.R., Biedermann, L.,
on behalf of Swiss IBDnet, an official working group of the Swiss Society of
Gastroenterology, 2020. Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*
101, 98–104. <https://doi.org/10.1159/000504701>

Hansson, G.K., 2005. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* 11.

Hansson, G.K., Hermansson, A., 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 12, 204–212. <https://doi.org/10.1038/ni.2001>

Hao, W., Friedman, A., 2014. The LDL-HDL Profile Determines the Risk of
Atherosclerosis: A Mathematical Model. *PLoS ONE* 9, e90497.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090497>

Harbord, M., Annesse, V., Vavricka, S.R., Allez, M., Barreiro-de Acosta, M., Boberg,
K.M., Burisch, J., De Vos, M., De Vries, A.-M., Dick, A.D., Juillerat, P., Karlsen, T.H.,
Koutroubakis, I., Lakatos, P.L., Orchard, T., Papay, P., Raine, T., Reinshagen, M.,
Thaci, D., Tilg, H., Carbonnel, F., for the European Crohn's and Colitis Organisation
[ECCO], 2016. The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal
Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *J. Crohns Colitis* 10, 239–254.
<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv213>

Hartmann, F., Gorski, D.J., Newman, A.A.C., Homann, S., Petz, A., Owsiany, K.M.,
Serbulea, V., Zhou, Y.-Q., Deaton, R.A., Bendeck, M., Owens, G.K., Fischer, J.W.,
2021. SMC-Derived Hyaluronan Modulates Vascular SMC Phenotype in Murine
Atherosclerosis. *Circ. Res.* 129, 992–1005.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318479>

Hatoum, O.A., Binion, D.G., 2005. the Vasculature and Inflammatory Bowel Disease.
Contribution to Pathogenesis and Clinical Pathology: *Inflamm. Bowel Dis.* 11, 304–
313. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000160772.78951.61>

Heidemann, C., Scheidt-Nave, C., Beyer, A.-K., Baumert, J., Thamm, R., Maier, B.,
Neuhauser, H., Fuchs, J., Kuhnert, R., Hapke, U., 2021. Gesundheitliche Lage von
Erwachsenen in Deutschland – Ergebnisse zu ausgewählten Indikatoren der Studie
GEDA 2019/2020-EHIS. Robert Koch-Institut. <https://doi.org/10.25646/8456>

- Heinrich, P., Müller, M., Graeve, L., 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. ed. Springer Berlin, Berlin.
- Herold, G., 2021. Innere Medizin. Herold, Gerd, Köln.
- Herring, B., Hoggatt, A.M., Burlak, C., Offermanns, S., 2014. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vasc. Cell* 6, 21. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-6-21>
- Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten [WWW Document], 2017. URL https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html (accessed 6.1.22).
- Ho, C.Y., Shanahan, C.M., 2016. Medial Arterial Calcification: An Overlooked Player in Peripheral Arterial Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1475–1482. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.306717>
- Hodis, H.N., Mack, W.J., Lobo, R.A., Shoupe, D., Sevanian, A., Mahrer, P.R., Selzer, R.H., Liu, Chao-ran, Liu, Ci-hua, Azen, S.P., for the Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group*, 2001. Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* 135, 939. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-135-11-200112040-00005>
- Hoek, K.S., Goding, C.R., 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma: Phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 746–759. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>
- Imazio, M., Bobbio, M., Cecchi, E., Demarie, D., Demichelis, B., Pomari, F., Moratti, M., Gaschino, G., Giammaria, M., Ghisio, A., Belli, R., Trincherò, R., 2005. Colchicine in Addition to Conventional Therapy for Acute Pericarditis: Results of the COLchicine for acute PERicarditis (COPE) Trial. *Circulation* 112, 2012–2016. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542738>
- Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer, R.E., Herz, J., 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92, 883–893. <https://doi.org/10.1172/JCI116663>

- Istvan, E.S., Deisenhofer, J., 2001. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292, 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1059344>
- Ito, R., Kita, M., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Iwakura, Y., Okanoue, T., Yoshikawa, T., Kataoka, K., Mazda, O., 2008. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.019>
- Jawieñ, J., Nasta, P., Korbut, R., 2004. MOUSE MODELS OF EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS.
- Jofra, T., Galvani, G., Cosorich, I., De Giorgi, L., Annoni, A., Vecchione, A., Sorini, C., Falcone, M., Fousteri, G., 2019. Experimental colitis in *IL-10* -deficient mice ameliorates in the absence of PTPN22. *Clin. Exp. Immunol.* 197, 263–275. <https://doi.org/10.1111/cei.13339>
- Kannel, W.B., McGee, D., Gordon, T., 1976. A general cardiovascular risk profile: The Framingham study. *Am. J. Cardiol.* 38, 46–51. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(76\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0002-9149(76)90061-8)
- Kannel, W.B., McGee, D.L., 1979. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation* 59, 8–13. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.59.1.8>
- Kaplan, G.G., Ng, S.C., 2017. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 152, 313–321.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>
- Kaplan, G.G., Windsor, J.W., 2021. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 56–66. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00360-x>
- Katzmann, J.L., Tünnemann-Tarr, A., Laufs, U., 2019. Europäische Leitlinien zu Lipiden 2019: Was ist neu? *Herz* 44, 688–695. <https://doi.org/10.1007/s00059-019-04861-7>
- Kavalipati, N., Shah, J., Ramakrishan, A., Vasawala, H., 2015. Pleiotropic effects of statins. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 19, 554. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.163106>
- Kayashima, Y., Maeda-Smithies, N., 2020. Atherosclerosis in Different Vascular Locations Unbiasedly Approached with Mouse Genetics. *Genes* 11, 1427.

<https://doi.org/10.3390/genes11121427>

Keil, U., 2005. Das weltweite WHO-MONICA-Projekt: Ergebnisse und Ausblick. *Gesundheitswesen* 67, 38–45. <https://doi.org/10.1055/s-2005-858240>

Kennedy, A.J., Ellacott, K.L.J., King, V.L., Hasty, A.H., 2010. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 3, 156–166. <https://doi.org/10.1242/dmm.003467>

Kennedy, L., Baynes, J.W., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia* 26. <https://doi.org/10.1007/BF00281113>

Kirchgesner, J., Beaugerie, L., Carrat, F., Andersen, N.N., Jess, T., Schwarzsinger, M., 2018. Increased risk of acute arterial events in young patients and severely active IBD: a nationwide French cohort study. *Gut* 67, 1261–1268. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314015>

Klag, T., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2013. Defective Antibacterial Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis.* 31, 310–316. <https://doi.org/10.1159/000354858>

Kretschmar, K., Watt, F.M., 2012. Lineage Tracing. *Cell* 148, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.002>

Kristensen, S.L., Ahlehoff, O., Lindhardsen, J., Erichsen, R., Jensen, G.V., Torp-Pedersen, C., Nielsen, O.H., Gislason, G.H., Hansen, P.R., 2013. 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* 8, e56944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056944>

Kucharzik, T., Dignass, A., Atreya, R., Bokemeyer, B., 2018. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS): AWMF-Register-Nr. 021/009. *Z. Für Gastroenterol.* 56, 1087–1169. <https://doi.org/10.1055/a-0651-8174>

Kurihara, O., Takano, M., Miyauchi, Y., Mizuno, K., Shimizu, W., 2021. Vulnerable atherosclerotic plaque features: findings from coronary imaging. *J. Geriatr. Cardiol.*

Lahat, G., Halperin, D., Barazovsky, E., Shalit, I., Rabau, M., Klausner, J., Fabian, I.,

2007. Immunomodulatory effects of ciprofloxacin in TNBS-induced colitis in mice: *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 557–565. <https://doi.org/10.1002/ibd.20077>
- Lama, A., Provensi, G., Amoriello, R., Pirozzi, C., Rani, B., Mollica, M.P., Raso, G.M., Ballerini, C., Meli, R., Passani, M.B., 2020. The anti-inflammatory and immune-modulatory effects of OEA limit DSS-induced colitis in mice. *Biomed. Pharmacother.* 129, 110368. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110368>
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J.K., 1998. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG CoA Reductase Inhibitors. *Circulation* 97, 1129–1135. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.12.1129>
- Liao, M., Zhou, J., Wang, F., Ali, Y.H., Chan, K.L., Zou, F., Offermanns, S., Jiang, Zhisheng, Jiang, Zhihua, 2017. An X-linked *Myh11-CreER^{T2}* mouse line resulting from Y to X chromosome-translocation of the *Cre* allele. *genesis* 55, e23054. <https://doi.org/10.1002/dvg.23054>
- Libby, P., 2021. Inflammation in Atherosclerosis—No Longer a Theory. *Clin. Chem.* 67, 131–142. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa275>
- Libby, P., 2002. Inflammation in atherosclerosis 420, 7.
- Libby, P., Pasterkamp, G., Crea, F., Jang, I.-K., 2019. Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes: The “Vulnerable Plaque” and Superficial Erosion. *Circ. Res.* 124, 150–160. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311098>
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A., 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135–1143. <https://doi.org/10.1161/hc0902.104353>
- Liu, D., Ji, Y., Cheng, Q., Zhu, Y., Zhang, H., Guo, Y., Cao, X., Wang, H., 2022. Dietary astaxanthin-rich extract ameliorates atherosclerosis/retinopathy and restructures gut microbiome in apolipoprotein E-deficient mice fed on a high-fat diet. *Food Funct.* 13, 10461–10475. <https://doi.org/10.1039/D2FO02102A>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Lo Sasso, G., Schlage, W.K., Boué, S., Veljkovic, E., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2016. The Apoe^{-/-} mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J. Transl. Med.* 14, 146. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0901-1>
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lyons, T.J., 1993. Glycation and oxidation: A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 71, B26–B31. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(93\)90142-Y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90142-Y)
- Maaser, C., Sturm, A., Vavricka, S.R., Kucharzik, T., Fiorino, G., Annese, V., Calabrese, E., Baumgart, D.C., Bettenworth, D., Borralho Nunes, P., Burisch, J., Castiglione, F., Eliakim, R., Ellul, P., González-Lama, Y., Gordon, H., Halligan, S., Katsanos, K., Kopylov, U., Kotze, P.G., Krstić, E., Laghi, A., Limdi, J.K., Rieder, F., Rimola, J., Taylor, S.A., Tolan, D., van Rheenen, P., Verstockt, B., Stoker, J., European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR], 2019. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J. Crohns Colitis* 13, 144–164K. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy113>
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A.L., Koskinas, K.C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M.J., De Backer, G.G., Delgado, V., Ference, B.A., Graham, I.M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T.R., Riccardi, G., Richter, D.J., Sabatine, M.S., Taskinen, M.-R., Tokgozoglu, L., Wiklund, O., ESC Scientific Document Group, Mueller, C., Drexel, H., Aboyans, V., Corsini, A., Doehner, W., Farnier, M., Gigante, B., Kayikcioglu, M., Krstacic, G., Lambrinou, E., Lewis, B.S., Masip, J., Moulin, P., Petersen, S., Petronio, A.S., Piepoli, M.F., Pintó, X., Räber, L., Ray, K.K., Reiner, Ž., Riesen, W.F., Roffi, M., Schmid, J.-P., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Stroes, E., Sudano, I., Tselepis, A.D., Viigimaa, M., Vindis, C., Vonbank, A., Vrablik, M., Vrsalovic, M., Zamorano, J.L., Collet, J.-P., Koskinas, K.C., Casula, M., Badimon, L., John Chapman, M., De Backer, G.G., Delgado, V., Ference, B.A., Graham, I.M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T.R., Riccardi, G., Richter, D.J., Sabatine, M.S., Taskinen, M.-R., Tokgozoglu, L., Wiklund, O.,

Windecker, S., Aboyans, V., Baigent, C., Collet, J.-P., Dean, V., Delgado, V., Fitzsimons, D., Gale, C.P., Grobbee, D., Halvorsen, S., Hindricks, G., Iung, B., Jüni, P., Katus, H.A., Landmesser, U., Leclercq, C., Lettino, M., Lewis, B.S., Merkely, B., Mueller, C., Petersen, S., Petronio, A.S., Richter, D.J., Roffi, M., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Sousa-Uva, M., Touyz, R.M., Nibouche, D., Zelveian, P.H., Siostrzonek, P., Najafov, R., van de Borne, P., Pojskic, B., Postadzhiyan, A., Kypris, L., Špinar, J., Larsen, M.L., Eldin, H.S., Viigimaa, M., Strandberg, T.E., Ferrières, J., Agladze, R., Laufs, U., Rallidis, L., Bajnok, L., Gudjónsson, T., Maher, V., Henkin, Y., Gulizia, M.M., Mussagaliyeva, A., Bajraktari, G., Kerimkulova, A., Latkovskis, G., Hamoui, O., Slapikas, R., Visser, L., Dingli, P., Ivanov, V., Boskovic, A., Nazzi, M., Visseren, F., Mitevska, I., Retterstøl, K., Jankowski, P., Fontes-Carvalho, R., Gaita, D., Ezhov, M., Foscoli, M., Giga, V., Pella, D., Fras, Z., de Isla, L.P., Hagström, E., Lehmann, R., Abid, L., Ozdogan, O., Mitchenko, O., Patel, R.S., 2020. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* 41, 111–188. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>

Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>

Malek, A.M., 1999. Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *JAMA* 282, 2035. <https://doi.org/10.1001/jama.282.21.2035>

McDonald, C.C., Stewart, H.J., 1991. Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee. *BMJ* 303, 435–437. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6800.435>

Meir, K.S., Leitersdorf, E., 2004. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1006–1014. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000128849.12617.f4>

Melgar, S., Karlsson, A., Michaëlsson, E., 2005. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G1328–G1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>

Mestas, J., Ley, K., 2008. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development

of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 228–232.

<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2008.11.004>

Mewis, C., Riessen, R., Spyridopoulos, I., 2004. *Kardiologie compact*.

Miano, J.M., Cserjesi, P., Ligon, K.L., Periasamy, M., Olson, E.N., 1994. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ. Res.* 75, 803–812. <https://doi.org/10.1161/01.RES.75.5.803>

Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G., 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology* 142, 46–54.e42. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>

Moore, K.J., Sheedy, F.J., Fisher, E.A., 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 709–721. <https://doi.org/10.1038/nri3520>

Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R., 1994. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* 14, 133–140. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.14.1.133>

Nasir, K., Acquah, I., Dey, A.K., Agrawal, T., Hassan, S.Z., Glassner, K., Abraham, B., Quigley, E.M.M., Blankstein, R., Virani, S.S., Blaha, M.J., Valero-Elizondo, J., Cainzos-Achirica, M., Mehta, N.N., 2022. Inflammatory bowel disease and atherosclerotic cardiovascular disease in U.S. adults—A population-level analysis in the national health interview survey. *Am. J. Prev. Cardiol.* 9, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.ajpc.2022.100316>

Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Tysk, C., O’Morain, C., Moum, B., Colombel, J.-F., on behalf of the Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD), 2013. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 630–649. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303661>

Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century:

- a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., Rayner, M., 2014. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur. Heart J.* 35, 2950–2959.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu299>
- Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., Rayner, M., 2012. European cardiovascular disease statistics.
- Okoro, N.I., Kane, S.V., 2009. Gender-related issues in the female inflammatory bowel disease patient. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 145–154.
<https://doi.org/10.1586/egh.09.1>
- Ostendorf, Y., 2019. Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose im Mausmodell. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Oussalah, A., Guéant, J.-L., Peyrin-Biroulet, L., 2011. Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases: Meta-analysis: hyperhomocysteinemia in inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 1173–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04864.x>
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* 84, 767–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>
- Paigen, B., Morrow, A., Holmes, P.A., Mitchell, D., Williams, R.A., 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68, 231–240.
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90202-4](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90202-4)
- Pan, H., Xue, C., Auerbach, B.J., Fan, J., Bashore, A.C., Cui, J., Yang, D.Y., Trignano, S.B., Liu, W., Shi, J., Ihuegbu, C.O., Bush, E.C., Worley, J., Vlahos, L., Laise, P., Solomon, R.A., Connolly, E.S., Califano, A., Sims, P.A., Zhang, H., Li, M., Reilly, M.P., 2020. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation* 142, 2060–2075.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048378>

- Panhwar, M.S., Mansoor, E., Al-Kindi, S.G., Sinh, P., Katz, J., Oliveira, G.H., Cooper, G.S., Ginwalla, M., 2019. Risk of Myocardial Infarction in Inflammatory Bowel Disease: A Population-based National Study. *Inflamm. Bowel Dis.* 25, 1080–1087. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy354>
- Patell, R., 2014. Cardiovascular Disease and Menopause. *J. Clin. Diagn. Res.* <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6457.4009>
- Pedersen, L.R., Frestad, D., Michelsen, M.M., Mygind, N.D., Rasmussen, H., Suhrs, H.E., Prescott, E., 2016. Risk Factors for Myocardial Infarction in Women and Men: A Review of the Current Literature. *Bentham Sci.* <https://doi.org/DOI:10.2174/13816128226661603091>
- Perše, M., Cerar, A., 2012. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/718617>
- Peters, S.A.E., Singhathe, Y., Mackay, D., Huxley, R.R., Woodward, M., 2016. Total cholesterol as a risk factor for coronary heart disease and stroke in women compared with men: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 248, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.016>
- Piepoli, M.F., Hoes, A.W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A.L., Cooney, M.-T., Corrà, U., Cosyns, B., Deaton, C., Graham, I., Hall, M.S., Hobbs, F.D.R., Løchen, M.-L., Löllgen, H., Marques-Vidal, P., Perk, J., Prescott, E., Redon, J., Richter, D.J., Sattar, N., Smulders, Y., Tiberi, M., van der Worp, H.B., van Dis, I., Verschuren, W.M.M., 2016. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur. Heart J.* 37, 2315–2381. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw106>
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., Breslow, J.L., 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343–353. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-G)

- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 13.
- Pohle, K., Mäffert, R., Ropers, D., Moshage, W., Stilianakis, N., Daniel, W.G., Achenbach, S., 2001. Progression of Aortic Valve Calcification: Association With Coronary Atherosclerosis and Cardiovascular Risk Factors. *Circulation* 104, 1927–1932. <https://doi.org/10.1161/hc4101.097527>
- Poznyak, A.V., Sadykhov, N.K., Kartuesov, A.G., Borisov, E.E., Melnichenko, A.A., Grechko, A.V., Orekhov, A.N., 2022. Hypertension as a risk factor for atherosclerosis: Cardiovascular risk assessment. *Front. Cardiovasc. Med.* 9, 959285. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.959285>
- Prabakaran, S., Schwartz, A., Lundberg, G., 2021. Cardiovascular risk in menopausal women and our evolving understanding of menopausal hormone therapy: risks, benefits, and current guidelines for use. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*
- Prado, C.M., Ramos, S.G., Jr, J.E., Rossi, M.A., 2008. Turbulent blood flow plays an essential localizing role in the development of atherosclerotic lesions in experimentally induced hypercholesterolaemia in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 9.
- Preiß, J., Bokemeyer, B., Buhr, H., Dignaß, A., Häuser, W., Hartmann, F., Herrlinger, K., Kaltz, B., Kienle, P., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, J., Schreiber, S., Siegmund, B., Stallmach, A., Stange, E., Stein, J., Hoffmann, J., 2014. Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014. *Z. Für Gastroenterol.* 52, 1431–1484. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1385199>
- Principi, M., Mastrolonardo, M., Scicchitano, P., Gesualdo, M., Sassara, M., Guida, P., Bucci, A., Zito, A., Caputo, P., Albano, F., Ierardi, E., Di Leo, A., Ciccone, M.M., 2013. Endothelial function and cardiovascular risk in active inflammatory bowel diseases. *J. Crohns Colitis* 7, e427–e433. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.02.001>
- Ridker, P.M., Danielson, E., Fonseca, F.A.H., Genest, J., Gotto, A.M., Kastelein, J.J.P., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A.J., MacFadyen, J.G., Nordestgaard, B.G., Shepherd, J., Willerson, J.T., Glynn, R.J., 2008a. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N. Engl. J. Med.* 359, 2195–2207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0807646>
- Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., Kastelein, J.J.P., Cornel, J.H.,

- Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P.R.F., Troquay, R.P.T., Libby, P., Glynn, R.J., 2017. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1119–1131.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoal707914>
- Ridker, P.M., Paynter, N.P., Rifai, N., Gaziano, J.M., Cook, N.R., 2008b. C-Reactive Protein and Parental History Improve Global Cardiovascular Risk Prediction: The Reynolds Risk Score for Men. *Circulation* 118, 2243–2251.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814251>
- Ridker, P.M., Pradhan, A., MacFadyen, J.G., Libby, P., Glynn, R.J., 2012. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *The Lancet* 380, 565–571.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61190-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61190-8)
- Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M.A., Sacks, F., Braunwald, E., 1999. Long-Term Effects of Pravastatin on Plasma Concentration of C-reactive Protein. *Circulation* 100, 230–235. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.3.230>
- Rong, J.X., Shapiro, M., Trogan, E., Fisher, E.A., 2003. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13531–13536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735526100>
- Rosenfeld, M.E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., Schwartz, S.M., 2000. Advanced Atherosclerotic Lesions in the Innominate Artery of the ApoE Knockout Mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2587–2592.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.12.2587>
- Rungoe, C., Basit, S., Ranthe, M.F., Wohlfahrt, J., Langholz, E., Jess, T., 2013. Risk of ischaemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide Danish cohort study. *Gut* 62, 689–694. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303285>
- Russell, R., 1999. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* 12.
- Salmon, J.E., Roman, M.J., 2008. Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Am. J. Med.* 121, S3–S8.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.06.010>

Sanan, D.A., Newland, D.L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., Hammer, R.E., Hobbs, H.H., 1998. 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.* 95, 4544–4549.

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4544>

Schäffer, H.M., 2022. Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auf die Matrixkomposition atherosklerotischer Läsionen im Mausmodell. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.

Schicho, R., Marsche, G., Storr, M., 2015. Cardiovascular Complications in Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Drug Targets* 16, 181–188.

<https://doi.org/10.2174/1389450116666150202161500>

Schinzari, F., Armuzzi, A., De Pascalis, B., Mores, N., Tesaro, M., Melina, D., Cardillo, C., 2008. Tumor Necrosis Factor- α Antagonism Improves Endothelial Dysfunction in Patients With Crohn's Disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 70–76.

<https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100229>

Schwartz, S.M., deBlois, D., O'Brien, E.R.M., 1995. The Intima: Soil for Atherosclerosis and Restenosis. *Circ. Res.* 77, 445–465.

<https://doi.org/10.1161/01.RES.77.3.445>

Schwartz, S.M., Galis, Z.S., Rosenfeld, M.E., Falk, E., 2007. Plaque Rupture in Humans and Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 705–713.

<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000261709.34878.20>

Shankman, L.S., Gomez, D., Cherepanova, O.A., Salmon, M., Alencar, G.F., Haskins, R.M., Swiatlowska, P., Newman, A.A.C., Greene, E.S., Straub, A.C., Isakson, B., Randolph, G.J., Owens, G.K., 2015. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 21, 628–637. <https://doi.org/10.1038/nm.3866>

Shaw, M.H., Kamada, N., Warner, N., Kim, Y.-G., Nuñez, G., 2011. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol.* 32, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.12.007>

Shea-Donohue, T., Thomas, K., Cody, M.J., Aiping Zhao, DeTolla, L.J., Kopydlowski, K.M., Fukata, M., Lira, S.A., Vogel, S.N., 2008. Mice deficient in the CXCR2 ligand,

- CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immun.* 14, 117–124.
<https://doi.org/10.1177/1753425908088724>
- Sheehan, D., Moran, C., Shanahan, F., 2015. The microbiota in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 50, 495–507. <https://doi.org/10.1007/s00535-015-1064-1>
- Shurety, W., Merino-Trigo, A., Brown, D., Hume, D.A., Stow, J.L., 2000. Localization and Post-Golgi Trafficking of Tumor Necrosis Factor- α in Macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 427–438. <https://doi.org/10.1089/107999000312379>
- Singh, S., Singh, H., Loftus, E.V., Pardi, D.S., 2014. Risk of Cerebrovascular Accidents and Ischemic Heart Disease in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 382–393.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.08.023>
- Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., Gardiner, K., 2010. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 235–239. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-0979-4>
- Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., Mauriello, A., 2007. Role of Inflammation in Atherosclerosis. *J. Nucl. Med.* 48, 1800–1815.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.107.038661>
- Stierle, U., Weil, J., 2020. *Klinikleitfaden Kardiologie.*
- Stokes, J., Kannel, W.B., Wolf, P.A., D’Agostino, R.B., Cupples, L.A., 1989. Blood pressure as a risk factor for cardiovascular disease. The Framingham Study--30 years of follow-up. *Hypertension* 13. https://doi.org/10.1161/01.HYP.13.5_Suppl.I13
- Strober, W., Fuss, I., Mannon, P., 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 117, 514–521. <https://doi.org/10.1172/JCI30587>
- Sturm, A., Atreya, R., Bettenworth, D., Bokemeyer, B., Dignaß, A., Ehehalt, R., Germer, C., Grunert, P.C., Helwig, U., Herrlinger, K., Kienle, P., Kreis, M.E., Kucharzik, T., Langhorst, J., Maaser, C., Ockenga, J., Ott, C., Siegmund, B., Zeißig, S., Stallmach, A., Collaborators:, 2022. Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – August 2021 – AWMF-

Registernummer: 021-004. Z. Für Gastroenterol. 60, 332–418.

<https://doi.org/10.1055/a-1713-3941>

Sun, H., Koike, T., Ichikawa, T., Hatakeyama, K., Shiomi, M., Zhang, B., Kitajima, S., Morimoto, M., Watanabe, T., Asada, Y., Chen, Y.E., Fan, J., 2005. C-Reactive Protein in Atherosclerotic Lesions. *Am. J. Pathol.* 167, 1139–1148.

[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61202-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61202-3)

Tardif, J.-C., Kouz, S., Waters, D.D., Bertrand, O.F., Diaz, R., Maggioni, A.P., Pinto, F.J., Ibrahim, R., Gamra, H., Kiwan, G.S., Berry, C., López-Sendón, J., Ostadal, P., Koenig, W., Angoulvant, D., Grégoire, J.C., Lavoie, M.-A., Dubé, M.-P., Rhainds, D., Provencher, M., Blondeau, L., Orfanos, A., L'Allier, P.L., Guertin, M.-C., Roubille, F., 2019. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* 381, 2497–2505. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1912388>

Timmis, A., Townsend, N., Gale, C.P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S.E., Mossialos, E.A., Maggioni, A.P., Kazakiewicz, D., May, H.T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J.F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., Achenbach, S., Wright, L., Vardas, P., European Society of Cardiology, Mimosza, L., Artan, G., Aurel, D., Chettibi, M., Hammoudi, N., Sisakian, H., Pepoyan, S., Metzler, B., Siostrzonek, P., Weidinger, F., Jahangirov, T., Aliyev, F., Rustamova, Y., Manak, N., Mrochak, A., Lancellotti, P., Pasquet, A., Claeys, M., Kušljugić, Z., Dizdarević Hudić, L., Smajić, E., Tokmakova, M.P., Gatzov, P.M., Milicic, D., Bergovec, M., Christou, C., Moustra, H.H., Christodoulides, T., Linhart, A., Taborsky, M., Hansen, H.S., Holmvang, L., Kristensen, S.D., Abdelhamid, M., Shokry, K., Kampus, P., Viigimaa, M., Ryödi, E., Niemelä, M., Rissanen, T.T., Le Heuzey, J.-Y., Gilard, M., Aladashvili, A., Gamkrelidze, A., Kereselidze, M., Zeiher, A., Katus, H., Bestehorn, K., Tsioufis, C., Goudevenos, J., Csanádi, Z., Becker, D., Tóth, K., Jóna Hrafnkelsdóttir, Þ., Crowley, J., Kearney, P., Dalton, B., Zahger, D., Wolak, A., Gabrielli, D., Indolfi, C., Urbinati, S., Imantayeva, G., Berkinbayev, S., Bajraktari, G., Ahmeti, A., Berisha, G., Erkin, M., Saamay, A., Erglis, A., Bajare, I., Jegere, S., Mohammed, M., Sarkis, A., Saadeh, G., Zvirblyte, R., Sakalyte, G., Slapikas, R., Ellafi, K., El Ghamari, F., Banu, C., Beissel, J., Felice, T., Buttigieg, S.C., Xuereb, R.G., Popovici, M., Boskovic, A., Rabrenovic, M., Ztot, S., Abir-Khalil, S., van Rossum, A.C., Mulder, B.J.M., Elsendoom, M.W., Srbinovska-Kostovska, E., Kostov, J.,

Marjan, B., Steigen, T., Mjølstad, O.C., Ponikowski, P., Witkowski, A., Jankowski, P., Gil, V.M., Mimoso, J., Baptista, S., Vinereanu, D., Chioncel, O., Popescu, B.A., Shlyakhto, E., Oganov, R., Foscoli, M., Zavatta, M., Dikic, A.D., Beleslin, B., Radovanovic, M.R., Hlivák, P., Hatala, R., Kaliská, G., Kenda, M., Fras, Z., Anguita, M., Cequier, Á., Muñiz, J., James, S., Johansson, B., Platonov, P., Zellweger, M.J., Pedrazzini, G.B., Carballo, D., Shebli, H.E., Kabbani, S., Abid, L., Addad, F., Bozkurt, E., Kayıkçıoğlu, M., Erol, M.K., Kovalenko, V., Nesukay, E., Wragg, A., Ludman, P., Ray, S., Kurbanov, R., Boateng, D., Daval, G., de Benito Rubio, V., Sebastiao, D., de Courtelary, P.T., Bardinet, I., 2020. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur. Heart J.* 41, 12–85.

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>

Tsai, M.-S., Lin, C.-L., Chen, H.-P., Lee, P.-H., Sung, F.-C., Kao, C.-H., 2014. Long-term Risk of Acute Coronary Syndrome in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A 13-year Nationwide Cohort Study in an Asian Population. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 502–507. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441200.10454.4f>

Ulfig, N., 2019. *Kurzlehrbuch Histologie*, 5. ed. Thieme, Stuttgart.

Van Trier, T.J., Mohammadnia, N., Snaterse, M., Peters, R.J.G., Jørstad, H.T., Bax, W.A., 2022. Lifestyle management to prevent atherosclerotic cardiovascular disease: evidence and challenges. *Neth. Heart J.* 30, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12471-021-01642-y>

Vanuytsel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschueren, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckstaens, G., Verbeke, K., Tack, J., 2014. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 63, 1293–1299. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>

Vengrenyuk, Y., Nishi, H., Long, X., Ouimet, M., Savji, N., Martinez, F.O., Cassella, C.P., Moore, K.J., Ramsey, S.A., Miano, J.M., Fisher, E.A., 2015. Cholesterol Loading Reprograms the MicroRNA-143/145–Myocardin Axis to Convert Aortic Smooth Muscle Cells to a Dysfunctional Macrophage-Like Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 535–546. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304029>

Viennois, E., Chen, F., Laroui, H., Baker, M.T., Merlin, D., 2013. Dextran sodium

sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. BMC Res. Notes 6, 360. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-360>

Visseren, F.L.J., Mach, F., Smulders, Y.M., Carballo, D., Koskinas, K.C., Bäck, Maria, Benetos, A., Biffi, A., Boavida, J.-M., Capodanno, D., Cosyns, B., Crawford, C., Davos, C.H., Desormais, I., Di Angelantonio, E., Franco, O.H., Halvorsen, S., Hobbs, F.D.R., Hollander, M., Jankowska, E.A., Michal, M., Sacco, S., Sattar, N., Tokgozoglu, L., Tonstad, S., Tsioufis, K.P., Van Dis, I., Van Gelder, I.C., Wanner, C., Williams, B., ESC Scientific Document Group, De Backer, G., Regitz-Zagrosek, V., Aamodt, A.H., Abdelhamid, M., Aboyans, V., Albus, C., Asteggiano, R., Bäck, Magnus, Borger, M.A., Brotons, C., Čelutkienė, J., Cifkova, R., Cikes, M., Cosentino, F., Dagres, N., De Backer, T., De Bacquer, D., Delgado, V., Den Ruijter, H., Dendale, P., Drexel, H., Falk, V., Fauchier, L., Ference, B.A., Ferrières, J., Ferrini, M., Fisher, M., Fliser, D., Fras, Z., Gaita, D., Giampaoli, S., Gielen, S., Graham, I., Jennings, C., Jorgensen, T., Kautzky-Willer, A., Kavousi, M., Koenig, W., Konradi, A., Kotecha, D., Landmesser, U., Lettino, M., Lewis, B.S., Linhart, A., Løchen, M.-L., Makrilakis, K., Mancia, G., Marques-Vidal, P., McEvoy, J.W., McGreavy, P., Merkely, B., Neubeck, L., Nielsen, J.C., Perk, J., Petersen, S.E., Petronio, A.S., Piepoli, M., Pogosova, N.G., Prescott, E.I.B., Ray, K.K., Reiner, Z., Richter, D.J., Rydén, L., Shlyakhto, E., Sitges, M., Sousa-Uva, M., Sudano, I., Tiberi, M., Touyz, R.M., Ungar, A., Verschuren, W.M.M., Wiklund, O., Wood, D., Zamorano, J.L., Smulders, Y.M., Carballo, D., Koskinas, K.C., Bäck, Maria, Benetos, A., Biffi, A., Boavida, J.-M., Capodanno, D., Cosyns, B., Crawford, C.A., Davos, C.H., Desormais, I., Di Angelantonio, E., Franco Duran, O.H., Halvorsen, S., Richard Hobbs, F.D., Hollander, M., Jankowska, E.A., Michal, M., Sacco, S., Sattar, N., Tokgozoglu, L., Tonstad, S., Tsioufis, K.P., Dis, I.V., Van Gelder, I.C., Wanner, C., Williams, B., 2021. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur. Heart J. 42, 3227–3337. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484>

Wang, D., Wang, Z., Zhang, L., Wang, Y., 2017. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. Mediators Inflamm. 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/8135934>

Weber, C., Noels, H., 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic

options. *Nat. Med.* 17, 1410–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.2538>

Weber, C., Zerneck, A., Libby, P., 2008. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 802–815. <https://doi.org/10.1038/nri2415>

Weissman, S., Sinh, P., Mehta, T.I., Thaker, R.K., Derman, A., Heiberger, C., Qureshi, N., Amrutiya, V., Atoot, A., Dave, M., Tabibian, J.H., 2020. Atherosclerotic cardiovascular disease in inflammatory bowel disease: The role of chronic inflammation. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 11, 104–113. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v11.i5.104>

Welsch, U., Kummer, W., Deller, T., 2018. *Histologie - Das Lehrbuch*. Urban & Fischer in Elsevier, München.

Wiesner, P., Choi, S.-H., Almazan, F., Benner, C., Huang, W., Diehl, C.J., Gonen, A., Butler, S., Witztum, J.L., Glass, C.K., Miller, Y.I., 2010. Low Doses of Lipopolysaccharide and Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Cooperatively Activate Macrophages via Nuclear Factor κ B and Activator Protein-1: Possible Mechanism for Acceleration of Atherosclerosis by Subclinical Endotoxemia. *Circ. Res.* 107, 56–65. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218420>

Wirka, R.C., Wagh, D., Paik, D.T., Pjanic, M., Nguyen, T., Miller, C.L., Kundu, R., Nagao, M., Coller, J., Koyano, T.K., Fong, R., Woo, Y.J., Liu, B., Montgomery, S.B., Wu, J.C., Zhu, K., Chang, R., Alamprese, M., Tallquist, M.D., Kim, J.B., Quertermous, T., 2019. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat. Med.* 25, 1280–1289. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0512-5>

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., Neurath, M.F., 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2, 541–546. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.41>

Wu, P., Jia, F., Zhang, B., Zhang, P., 2017. Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease. *Exp. Ther. Med.* 13, 395–400. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3966>

Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S.V., Merlin, D., 2009. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in

Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. PLoS ONE 4, e6073.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006073>

Yarur, A.J., Deshpande, A.R., Pechman, D.M., Tamariz, L., Abreu, M.T., Sussman, D.A., 2011. Inflammatory Bowel Disease Is Associated With an Increased Incidence of Cardiovascular Events. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 741–747.

<https://doi.org/10.1038/ajg.2011.63>

Yu, Q., Chen, Y., Xu, C.-B., 2017. Statins and New-Onset Diabetes Mellitus: LDL Receptor May Provide a Key Link. *Front. Pharmacol.* 8, 372.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00372>

Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., De Vries-Van Der Weij, J., Van Der Hoorn, J., Princen, H.M., Kooistra, T., 2007. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1706–1721.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.142570>

Zahl der Todesfälle im Jahr 2019 um 1,6 % gesunken [WWW Document], 2020. .

destatis.de. URL [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html#:~:text=Die%20häufigste%20Todesursache%20im%20Jahr,Männer%20und%20178%20596%20Frauen.)

[Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html#:~:text=Die%20häufigste%20Todesursache%20im%20Jahr,Männer%20und%20178%20596%20Frauen.](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html#:~:text=Die%20häufigste%20Todesursache%20im%20Jahr,Männer%20und%20178%20596%20Frauen.) (accessed 5.23.23).

Zhang, F., Guo, X., Xia, Y., Mao, L., 2022. An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 6. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04079-z>

Zöller, B., Li, X., Sundquist, J., Sundquist, K., 2012. Risk of Subsequent Coronary Heart Disease in Patients Hospitalized for Immune-Mediated Diseases: A Nationwide Follow-Up Study from Sweden. PLoS ONE 7, e33442.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033442>

Zong, G., Li, Y., Wanders, A.J., Alsema, M., Zock, P.L., Willett, W.C., Hu, F.B., Sun, Q., 2016. Intake of individual saturated fatty acids and risk of coronary heart disease in US men and women: two prospective longitudinal cohort studies. *BMJ* i5796.

<https://doi.org/10.1136/bmj.i5796>

6. Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte

Tabelle 2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3 Substanzen

Tabelle 4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Arzneimittel und Substanzen für die Behandlung der Tiere

Tabelle 6 Kits

Tabelle 7 Erstantikörper

Tabelle 8 Zweitantikörper

Tabelle 9 qPCR-Primersequenzen

Tabelle 10 Symbole für die Signalmarkierung

Tabelle 11 Kolitis-Score

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Entstehung eines atherosklerotischen Plaques mit Formation eines nekrotischen Kerns und einer fibrösen Kappe

Abbildung 2 Phänotyp-Switch im atherosklerotischen Plaque

Abbildung 3 Aktivierung der YFP Expression

Abbildung 4 Studiendesign

Abbildung 5 Die Aorta

Abbildung 6 Schematische Darstellung des schneckenförmigen Aufrollens des Darmpräparates

Abbildung 7 Die Aortenklappe des aortalen Ursprungs im Querschnitt

Abbildung 8 Eine Illustration der BCA im Längs- und Querschnitt

Abbildung 9 Öl-rot-O-Färbung

Abbildung 10 Dreifachfärbung für YFP, Mac2 und ACTA2

Abbildung 11 RNA-Isolation

Abbildung 12 cDNA-Synthese

Abbildung 13 Einzelne Zellen und Zellkombinationen werden mit entsprechenden Symbolen markiert

Abbildung 14 Histologische Aufnahme des Darms

Abbildung 15 Relativer Gewichtsverlauf

Abbildung 16 Signifikant höhere Werte im Kolitis-Score in der mit DSS behandelten Gruppe nach der 27. Lebenswoche

Abbildung 17 Die Expression der gewebeständigen Entzündungsmarker *Tnfa* und *Il1b* ist in der mit DSS behandelten Gruppe signifikant höher nach der 27. Lebenswoche

Abbildung 18 Kein Effekt der DSS Gabe auf die Progression atherosklerotischer Plaques in der Aorta nach der 27. Lebenswoche

Abbildung 19 Kein Unterschied in der Plaquebelastung in der *A. brachiocephalica* nach der 27. Lebenswoche

Abbildung 20 Kein Unterschied hinsichtlich der Plaquegröße und des Makrophagenanteils im aortalen Ursprung nach der 27. Lebenswoche

Abbildung 21 Reduzierter Phänotypen-Switch und tendenziell erhöhte Makrophagenanzahl in DSS-behandelten Tieren nach der 27. Lebenswoche

7. Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Allen voran gebührt mein großer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Maria Grandoch für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und damit dem entgegengebrachten Vertrauen. Ich schätze die erfahrenen und wertvollen Anregungen sehr. Das Forschungsprojekt wird mir immer positiv in Erinnerung bleiben.

Weiter möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger für die Übernahme des Korreferats und für die schnellen Rückmeldungen bedanken.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf. Sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite. Die ständige Erreichbarkeit und die produktiven Gespräche haben mir sehr geholfen. Danke auch für die Geduld und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Im Labor war mir Annika Zimmermann eine sehr große Unterstützung. Ich bedanke mich für die labortechnische Anleitung und für die großartige Hilfestellung bei meinen Fragen und Problemen. Danke auch für die Durchsicht meines Kapitels „Material und Methoden“. Einen herzlichen Dank an Kerstin Freidel und Peggy Marra-Mann für die sehr freundliche und entgegenkommende Hilfestellung im Labor.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. rer. nat. Nicole Fitzner für das Korrekturlesen.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Team für die nette Atmosphäre. Ich habe die Zeit im Labor sehr genossen und werde sie vermissen.

Ein großer Dank geht auch in mein persönliches Umfeld. Ich danke meine Eltern Oxana Tsilke und Andreas Zilke sowie meinen Geschwistern Viktoria und Emilia Zilke für den Rückhalt und die Ermutigung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Partner Dr. med. Ceyhun Cevirgen, der mich während des gesamten Studiums und während der Promotionszeit immer motiviert hat und mich bedingungslos in allen Situationen unterstützt hat. Vielen Dank für die ermutigenden Worte und für die vielen Gespräche zu meinem Dissertationsthema.

Ich bin meinen Söhnen Timur und Ilyas Cevirgen sehr dankbar: Timur für das ansteckende Lachen und Ilyas für die wachhaltenden Tritte in meinem Bauch.

Danke an meine Freundinnen Nora Boukka, Luisa Habighorst und Neslihan Kula für die wunderbare Abwechslung abseits der Doktorarbeit.

Ein letzter Dank geht an meinen Großvater Leo Zilke (†2016), der mich überhaupt erst zum Medizinstudium motiviert hat und ständig an mich geglaubt hat.