

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mitochondriale Repression in humanen glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen
der Atherosklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laurina Cheyenne Bühner

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	11
Zusammenfassung.....	12
Abstract (English).....	14
1. Einleitung	15
1.1. Das menschliche Gefäßsystem	15
1.1.1. Gefäßhistologie	15
1.1.2. Physiologie des Gefäßsystems.....	16
1.2. Atherosklerose	17
1.2.1. Definition	17
1.2.2. Epidemiologie	17
1.2.3. Ätiologie	18
1.2.4. Pathophysiologie der Atherosklerose.....	19
1.2.5. Zelluläre Komponenten der Atherosklerose.....	23
1.2.6. Stadieneinteilung der Atherosklerose	31
1.2.7. Therapie.....	37
1.2.8. Herztransplantation.....	38
1.3. Mitochondrien.....	38
1.4. Wege der zellulären Energiegewinnung.....	40
1.4.1. Glykolyse.....	40

1.4.2.	β -Oxidation	42
1.4.3.	Citratzyklus	43
1.4.4.	Atmungskette	45
1.5.	Warburg Effekt	46
1.6.	Enzyme der Glykolyse	48
1.6.1.	PFKFB3	48
1.6.2.	LDHA	49
1.7.	Mitochondriale Enzyme	50
1.7.1.	IDH2	50
1.7.2.	COX IV	52
1.7.3.	ACADM	52
1.8.	Sirtuine	52
1.9.	Zielsetzung	54
2.	Materialien	55
2.1.	Chemikalien und Zusätze	55
2.2.	Puffer und Zusätze	56
2.3.	Antikörper	57
2.4.	Verbrauchsmaterialien	57
2.5.	Geräte	58
2.6.	Software	59
3.	Methoden	60
3.1.	Herkunft der humanen Gefäßproben	60

3.2.	Zusammensetzung der Studienpopulation	61
3.3.	Präparation	62
3.4.	Probenfixierung und –aufbereitung.....	63
3.5.	Anfertigung histologischer Schnitte	63
3.6.	Movat-Pentachrom-Färbung nach Verhöff	64
3.7.	Immunhistochemie.....	65
3.8.	Grundlagen der Elektronenmikroskopie.....	68
3.9.	Elektronenmikroskopie	68
3.10.	Histologische Auswertung	69
3.11.	Immunhistochemische Auswertung.....	70
3.12.	Elektronenmikroskopische Auswertung	71
3.13.	Statistische Analyse.....	71
4.	Ergebnisse	71
4.1.	Veränderungen der Expression glykolytischer Enzyme	73
4.1.1.	PFK-B	73
4.1.2.	LDHA	76
4.2.	Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels.....	79
4.2.1.	IDH2	79
4.2.2.	COX IV	82
4.2.3.	ACADM.....	84
4.3.	Elektronenmikroskopie	87
4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	91

5. Diskussion	93
5.1. Metabolische Veränderungen in glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose	93
5.1.1. Durch Atherosklerose verändern sich die Expressionsmuster von Schlüsselenzymen der Glykolyse und des Citratzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen	93
5.1.2. Veränderte mitochondriale Dynamik in glatten Gefäßmuskelzellen im Zusammenhang mit Atherosklerose	97
5.2. Beurteilung der Methodik	99
5.3. Beurteilung der statistischen Auswertung	102
5.4. Zusammenfassung und Ausblick	103
6. Literaturverzeichnis	104
Eidstattliche Versicherung	120
Lebenslauf	121
Danksagung	123

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
A.	Arteria
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACADM	Mittlere-Kette-spezifische Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACTA2	Smooth muscle actin
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyklin-dependent kinase
CD68	Cluster of Differentiation 68, Macrosialin
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CVD	Cardivascular Diseases
CY3	Cyanin 3
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenyldiol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyrebonucleic acid
DRP1	Dyamin-1-like-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazellulärmatrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat

HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HTx	Herztransplantation
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IDH2	Isocitratdehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF4	Kruppel-like factor 4
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDL	Low-density Lipoprotein
MFN	Mitofusin
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomografie
mtDNA	Mitochondriale DNA
MYH11	Myosin heavy chain 11
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffoxid
NOS	Stickstoffoxid-Synthase
OPA	Optic Atrophy
oxLDL	Oxidiertes low-density Lipoprotein
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-buffered saline
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin Kexin Typ 9
PDGF	Platlet-derived growth factor
PKD1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1
PET	Positronenemissionstomografie

PFKFB	Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RCA	Right coronary artery
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR	Relatives Risiko
SIRT	Sirtuin
SMA	Smooth muscle actin
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
SRF	Serum response factor
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WHO	World Health Organisation

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung

Abbildung 1: Entwicklungsstadien einer atherosklerotischen Läsion.....	22
Abbildung 2: Überblick über Mechanismen des phänotypischen Switchs glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose.	27
Abbildung 3: Bedeutung glatter Gefäßmuskelzellen in verschiedenen Stadien der Atherosklerose	28
Abbildung 4: Darstellung der Funktionsweise des Cre/LoxP-Systems.	31
Abbildung 5: Atherosklerosestadium I nach Stary	32
Abbildung 6: Atherosklerosestadium II nach Stary	33
Abbildung 7: Atherosklerosestadium III nach Stary.....	34
Abbildung 8: Atherosklerosestadium IV nach Stary	35
Abbildung 9a: Atherosklerosestadium Va nach Stary	36
Abbildung 9b: Atherosklerosestadium Vb nach Stary	36
Abbildung 10: Atherosklerosestadium VI nach Stary	37
Abbildung 11: Mitochondriale Dynamik als Reaktion auf Zellstress.....	39
Abbildung 12: Einzelreaktionen des Citratzyklus	44
Abbildung 13: Darstellung der Atmungskette.....	45
Abbildung 14: Überblick über die Metabolisierung von Glucose.....	46
Abbildung 15: Rolle der LDHA in der Glykolyse	50
Abbildung 16: Auswirkungen von verringerter IDH2-Konzentration auf Endothelzellen.....	51

Methoden

Abbildung 17: Die Vorderseite des menschlichen Herzens	60
Abbildung 18: Die Rückseite des menschlichen Herzen	61
Abbildung 19: Der Strahlengang in Transmissionselektronen- und Lichtmikroskop.....	68

Ergebnisse

Abbildung 20: Kolokalisation von α SMA und PFK-B in Fall- und Kontrollgruppe.....	73
Abbildung 21a: Beispielaufnahme PFK-B und α -SMA Kofärbung (Atherosklerose)	75
Abbildung 21b: Beispielaufnahme PFK-B und α -SMA Kofärbung (gesundes Gefäß).....	75
Abbildung 22: Kolokalisation von LDHA und α -SMA in Fall- und Kontrollgruppe	77
Abbildung 23a: Beispielaufnahme LDHA und α -SMA Kofärbung (Atherosklerose)	78

Abbildung 23b: Beispielaufnahme LDHA und α -SMA Kofärbung (gesundes Gefäß).....	78
Abbildung 24: Kolokalisation von α SMA und IDH2 in Fall- und Kontrollgruppe.....	80
Abbildung 25a: Beispielaufnahme IDH2 und α -SMA Kofärbung (Atherosklerose)	80
Abbildung 25b: Beispielaufnahme IDH2 und α -SMA Kofärbung (gesundes Gefäß).....	80
Abbildung 26: Kolokalisation von α SMA und COX IV in Fall- und Kontrollgruppe.....	82
Abbildung 27a: Beispielaufnahme COX IV und α -SMA Kofärbung (Atherosklerose)	83
Abbildung 27b: Beispielaufnahme COX IV und α -SMA Kofärbung (gesundes Gefäß).....	83
Abbildung 28: Kolokalisation von α SMA und ACADM in Fall- und Kontrollgruppe	85
Abbildung 29a: Beispielaufnahme ACADM und α -SMA Kofärbung (Atherosklerose).....	86
Abbildung 29b: Beispielaufnahme ACADM und α -SMA Kofärbung (gesundes Gefäß)	86
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme	87
Abbildung 31a: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (erste Aufnahmen).....	88
Abbildung 31b: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (nach Optimierungen).....	88
Abbildung 34a: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (vor Entkalkung)	88
Abbildung 34b: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (nach Entkalkung)	88
Abbildung 33a: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (Tunica intima, Atherosklerose)	90
Abbildung 33b: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (Tunica intima, gesundes Gefäß).....	90
Abbildung 33c: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (Tunica media, Atherosklerose)	90
Abbildung 33d: Beispielaufnahme Elektronenmikroskopie (Tunica media, gesundes Gefäß).....	90
Abbildung 34: Überblick über die Ergebnisse der Immunhistochemie	91
Abbildung 35a: Expression glykolytischer Enzyme nach Atherosklerose-Stadien	92
Abbildung 35b: Expression mitochondrialer Enzyme nach Atherosklerose-Stadien.....	91

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Schritte der Glykolyse.....	41
Tabelle 2: Reaktionsschritte der β -Oxidation.	43
Tabelle 3: Koronararterien in Fall- und Kontrollgruppe.....	61
Tabelle 4: Epidemiologische Daten der eingeschlossenen Patienten.	62
Tabelle 5: Färbeergebnis der Movat-Pentachrom-Färbung nach Verhöff	64
Tabelle 6: Expression der PFK-B in SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose- Stadien.....	75
Tabelle 7: Expression der LDHA in SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose- Stadien.....	78
Tabelle 8: Expression der IDH2 in α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose- Stadien.	81
Tabelle 9: Expression der COX IV in α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose- Stadien.....	84
Tabelle 10: Expression der ACADM in α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien.	86
Tabelle 11: Ergebnisse der Elektronenmikroskopie.....	89

Zusammenfassung

Trotz erheblicher Fortschritte in Diagnostik, Therapie und Prävention werden kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin als häufigste Todesursache in deutschen und weltweiten Todesursachenstatistiken aufgeführt.^{1,2} Angesichts dieser hohen Zahlen besteht ein enormes Potenzial, durch weiteren Erkenntnisgewinn über die Entstehungsprozesse der Erkrankung das Leben vieler Patienten maßgeblich zu verlängern und ihre Lebensqualität zu verbessern.

Der Atherosklerose liegt ein komplexer pathogenetischer Mechanismus zugrunde, bei dem Inflammation, unterschiedliche Zelltypen und atherogene Stimuli zusammenspielen. Eine Zelllinie von besonderer Bedeutung sind die glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* = VSMC). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass diese Zelltypen im Rahmen der Atherosklerose durch ihre erhebliche Plastizität ihren Phänotyp verändern und sich beispielsweise zu Makrophagen-ähnlichen Zellen entwickeln, was als *phenotypic switch* bezeichnet wird.^{3,4} Diese komplexen Veränderungen in Morphologie, Expressionsmuster und Funktion, gehen vermutlich mit einer deutlichen metabolischen Umstellung einher.

Eine ähnliche Verschiebung des Metabolismus ist der Forschung bei Tumorzellen als Reaktion auf Hypoxie schon lange bekannt und wird als Warburg-Effekt beschrieben. Im Rahmen dieser metabolischen Veränderungen kommt es zum Anstieg der zellulären glykolytischen Aktivität und aufgrund dessen zu einer erhöhten Laktatproduktion.⁵ Gleichzeitig ist eine Repression der Energiegewinnung über den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien zu beobachten.

Basierend auf unseren Erkenntnissen aus Zellkulturen und Atherosklerose-Mausmodellen, die ebenfalls die beschriebenen Verschiebungen im Metabolismus von VSMC im Rahmen von Atherosklerose nahelegten und vor dem Hintergrund, dass VSMC sich in atherosklerotischen Läsionen unter reduziertem Sauerstoffangebot erhalten, migrieren und proliferieren, stellten wir die Hypothese auf, dass auch humane VSMC in atherosklerotischen Gefäßen ihren Phänotyp ändern und dabei ihren Metabolismus auf eine Weise umstellen, die Parallelen zum Warburg Effekt aufweist. Um die Übertragbarkeit unserer bisherigen Ergebnisse auf humane VSMC zu untersuchen, wurden im Rahmen von Herztransplantationen, sowohl gesunde, als auch atherosklerotische humane Koronararterien entnommen (n=30). An diesen Proben wurden anschließend immunhistologische Färbungen von verschiedenen metabolischen Markerenzymen, sowie an einigen Proben (n=3) elektronenmikroskopische Analysen zur Beurteilung der Mitochondrienmorphologie durchgeführt.

Insgesamt waren in den VSMC der atherosklerotischen Gefäße deutliche Veränderungen des Metabolismus zu verzeichnen. Statistisch signifikante Ergebnisse zeigten sich als Ausdruck einer gesteigerten Glykolyse in der Hochregulation der Phosphofruktokinase B ($p=0,02$), und als Zeichen einer verringerten Aktivität des Citratzyklus in der Herunterregulation der Isocitrat-Dehydrogenase ($p=0,0003$). Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse müssen aufgrund der geringer Fallzahl mit Vorsicht interpretiert werden. Nichtsdestotrotz konnten wir in glatten Gefäßmuskelzellen atherosklerotischer Proben eine verringerte Mitochondriendichte, bei gleichzeitig erhöhter mitochondrialer Größe beobachten, was als Zeichen einer Dysbalance in der mitochondrialen Dynamik in Richtung vermehrten Fusion, zu werten sein könnte.

Abstract (English)

Despite enormous advances in diagnosis, therapy and prevention, cardiovascular diseases (CVD) remain the leading cause of death in Germany, as well as worldwide.^{1,2} In light of these high numbers, there is a high potential to prolong the life and improve the quality of life for a wide range of patients, through further knowledge about the underlying pathogenetic processes. Atherosclerosis develops as a result of a complex interaction between inflammation, different cell types and atherogenic influences. One cell type that has a special point of interest are vascular smooth muscle cells (VSMC). In the past it could be shown that due to their high plasticity VSMC are able to completely change their phenotype, in example into a macrophage-like phenotype, which is called phenotypic switching.^{3,4} These complex changes in morphology, expression and function, are allegedly associated with notable changes in cellular metabolism. A similar metabolic shift is well known as a reaction to hypoxic conditions in tumor cells and is called the Warburg effect. In course of these metabolic changes cells increase their glycolytic activity and lactate production, whereas the citrate cycle and the oxidative phosphorylation in the mitochondria is repressed.⁵ Based on our previous findings in cell cultures and mice atherosclerosis models, as well as considering that VSMC need to sustain themselves, migrate and proliferate in atherosclerotic lesions with limited oxygen supply, we assumed that human VSMC likewise, undergo a phenotypic switch including metabolic changes with parallels to the Warburg effect. To investigate the transferability to human VSMC, healthy and atherosclerotic coronary arteries from explanted hearts were collected in the course of heart transplantations (n=30). On those samples we performed immunohistochemical staining of different metabolic enzymes, as well as electron microscopy on a part of those samples (n=3) to investigate the mitochondrial morphology. Overall, we observed a statistically significant upregulation of phosphofructo kinase b (PFK-B) expression as a sign of increased glycolysis, in addition to a significant reduction of isocitrate dehydrogenase (IDH2) expression as an indicator for a decreased citrate cycle activity in VSMC in atherosclerotic lesions. Due to the small sample size (n=3) for electron microscopic analysis, the obtained results must be interpreted with caution. However, we noticed a reduction in mitochondria count, along with an increase in mitochondrial size in VSMC in atherosclerosis, which might be a sign of imbalance in mitochondrial dynamics by increased mitochondrial fusion.

1. Einleitung

1.1. Das menschliche Gefäßsystem

Der menschliche Kreislauf lässt sich nach den herrschenden Druckverhältnissen in zwei Systeme einteilen: das Hoch- und das Niederdrucksystem. Zum Hochdrucksystem, auf das sich im Rahmen dieser Studie konzentriert werden soll, gehören der linke Ventrikel während der Systole, die Aorta, sowie sämtliche Arterien und Arteriolen. Neben der Einteilung nach dem bestehenden Druck, können die Gefäße nach ihrer Funktion weiter in Windkessel-, Widerstands-, Austausch- und Kapazitätsgefäße eingeteilt werden. Die Windkesselgefäße werden auch als Arterien vom elastischen Typ bezeichnet, da sie vorwiegend aus elastischen Fasern bestehen. In diese Kategorie fallen die Aorta und ihre großen Abzweigungen.

Als Widerstandsgefäße oder auch Arterien vom muskulären Typ bezeichnet man die kleinen Arterien und Arteriolen. Namensgebend ist hier eine Vielzahl von Schichten glatter Gefäßmuskelzellen in der Tunica media, der mittleren Schicht der Gefäßwand. Diese Gefäße sind den Kapillaren vorgeschaltet und können über die glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* = VSMC) ihren Durchmesser und damit den Druck, sowie die Durchblutung in den dahinter liegenden Abschnitten beeinflussen.⁶ Die kleinsten Gefäße des Blutkreislaufs, die Kapillaren, werden auch Austauschgefäße genannt, da hier die Aufnahme und Abgabe von Stoffen und Gasen durch das Gewebe erfolgt.

Die letzte Gruppe von Blutgefäßen bildet das venöse System mit den Kapazitätsgefäßen. Wie der Name vermuten lässt, sind diese in der Lage einen großen Teil des vorhandenen Blutvolumens aufzunehmen und bei Bedarf auch wieder abzugeben.

Mit den hohen Druckverhältnissen in den Windkessel- und Widerstandsgefäßen geht auch eine erhöhte mechanische Belastung der Gefäßwand einher, die an Engstellen und Bifurkationen besonders ausgeprägt ist. Die (Patho-)Physiologie dieser Vorgänge wird unter 1.2.4 erläutert.

1.1.1. Gefäßhistologie

Der histologische Aufbau der größeren Gefäße folgt einem einheitlichen Schema. Von innen nach außen ist stets eine Dreischichtigkeit zu erkennen, die sich aus Tunica intima, Tunica media und Tunica externa zusammensetzt.⁷ Die Tunica intima dient der Auskleidung des Gefäßes von luminal und bildet damit eine Diffusionsbarriere. Des Weiteren hat die Intima einen regulatorischen Einfluss auf die Blutgerinnung, die Gefäßweite, Zelladhäsion und Angiogenese. Sie besteht aus einschichtigem Endothel, welches nach luminal von einer Glykokalix bedeckt wird, sowie einem

Stratum subendotheliale, welches lockeres Bindegewebe und einzelne glatte Muskelzellen enthält.⁸ Zur Tunica media wird die Tunica intima durch die Membrana elastica interna abgegrenzt, einer kräftigen Membran aus elastischen Fasern. Zirkulär angeordnete glatte Gefäßmuskelzellen charakterisieren die Tunica media. Durch sie kann der Gefäßdurchmesser und somit auch der Widerstand des Gefäßes reguliert werden. Außerdem sind die glatten Gefäßmuskelzellen an der Bildung der Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt. Die letzte, äußerste Schicht der Gefäßwand bildet die Tunica adventitia. Sie wird durch eine dünne Membrana elastica externa von der Tunica media getrennt und dient der Verankerung des Blutgefäßes im umliegenden Gewebe. Die Adventita ist überwiegend zellfrei und besteht vor allem aus lockerem Bindegewebe, elastischen Fasern und Kollagenen. Im Gegensatz zu den übrigen Schichten, die durch Diffusion ernährt werden, enthält die Tunica externa eigene kleine Gefäße zur Nährstoffversorgung, die Vasa vasorum.

1.1.2. Physiologie des Gefäßsystems

Die Funktionen des Kreislaufs werden zum einen zentral durch neuronale und humorale Faktoren reguliert, zum anderen spielt jedoch auch die Endothel-gesteuerte Autoregulation durch das Gefäß selbst eine große Rolle.

Das Endothel fungiert demnach nicht nur als Barriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe, sondern übernimmt eine Vielzahl von metabolischen Funktionen. Zum einen kann das Endothel über verschiedene Rezeptoren die Umgebungsbedingungen wahrnehmen und zum anderen auch aktiv auf diese reagieren. Dazu gehören die Produktion und der Abbau vasoaktiver Substanzen, die kontinuierliche Haltung eines Gleichgewichts zwischen pro- und antithrombotischen Faktoren und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Über diese Mechanismen können Gefäßtonus, Hämostase, Redoxgleichgewicht, Angiogenese und Einwanderung von Immunzellen moduliert werden. Vom Endothel sezerniertes Prostazyklin und Stickoxid (NO) bewirken eine Vasodilatation und induzieren eine Hemmung der Thrombozyten.⁹ Das Endothel kann andererseits auch vasokonstriktorisch wirksame Substanzen wie Endothelin, Thromboxan A2 freisetzen und so stets zu einer Anpassung des Gefäßtonus an lokale Anforderungen beitragen.¹⁰

Die zentrale Regulation erfolgt hauptsächlich über sympathische Fasern, die bis auf die Kapillaren alle Abschnitte des Gefäßsystems innervieren. Zudem gibt es eine Gruppe lokal wirkender Hormone, die den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur regulieren. Hierzu zählen Bradykinin, Histamin, Prostaglandine und Thromboxan A2.¹¹

Das Zusammenspiel dieser Mechanismen hat eine feine Regulation der Durchblutung der verschiedenen Organe zur Folge.

In den meisten Abschnitten des Gefäßsystems fließt das Blut laminar entlang des Gefäßlumens. Demensprechend bewegen sich alle Flüssigkeitsschichten parallel zur Gefäßwand. Es gibt jedoch auch besondere Bereiche, wie Teile der Aorta und Gefäßbifurkation, an denen diese Art der Strömung gestört wird und Turbulenzen entstehen. Durch diese Turbulenzen wird die Strömungsgeschwindigkeit vermindert und die Kontaktzeit zwischen Blut und Endothel verlängert.¹⁰ Außerdem treten Turbulenzen vermehrt an stenotischen Abschnitten des Gefäßsystems auf, da hier die laminare Strömung der äußeren Flüssigkeitsschichten unterbrochen wird. Die Bedeutung dieser Strömungsunregelmäßigkeiten für die Pathogenese der Atherosklerose wird unter 1.2.4 thematisiert.

1.2. Atherosklerose

1.2.1. Definition

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der großen bis mittleren Arterien, an deren Entstehung sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem beteiligt ist. Die Entwicklung von anfänglichen Endothelveränderungen bis hin zur fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion dauert zumeist mehrere Jahrzehnte und beginnt häufig schon in der Kindheit. Die häufigsten klinischen Manifestationen der Atherosklerose sind die koronare Herzkrankheit (KHK), der ischämische Schlaganfall, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die chronische Niereninsuffizienz.¹²

1.2.2. Epidemiologie

Durch steigende Populationszahlen und demographischen Wandel stieg die Anzahl von Todesfällen aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen in den letzten Jahrzehnten um etwa 30%.¹³ Trotz der starken Reduktion der prozentualen Mortalität von Atherosklerose-bedingten Erkrankungen über die letzten Jahrzehnte durch Fortschritte in Therapie und Diagnostik, stellen die Folgen der Atherosklerose in absoluten Zahlen die Gesundheitssysteme der ganzen Welt vor große Herausforderungen. Insgesamt führten kardiovaskuläre Erkrankungen, mit Atherosklerose als deren häufigste Ursache, 2016 laut WHO zu knapp 18 Millionen Todesfällen weltweit. Dies entspricht in etwa einem Drittel der gesamten Todesfälle.¹ Auch Deutschland bildet hier keine Ausnahme, so sind in der Statistik der Todesursachen auch 2018 noch Herz-Kreislaufkrankungen

mit 36,2 % als häufigste Todesursache aufgeführt.² Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer ischämischen Herzkrankheit zu erkranken, unterscheidet sich in Deutschland stark nach Geschlecht und sozialem Status, wobei Männer mit niedrigem sozialen Status mit 17,9 % die höchste und Frauen mit hohem sozialen Status mit 2,7 % die niedrigste Lebenszeitprävalenz haben.¹⁴

1.2.3. Ätiologie

Eine Vielzahl prospektiver Studien hat sich mit der Identifikation von Risikofaktoren der Atherosklerose beschäftigt und so dazu beigetragen, dass uns heute eine große Zahl bekannt ist. Besonders bedeutend sind hier die modifizierbaren Risikofaktoren, da deren Vermeidung, z.B. durch verändertes Gesundheitsverhalten, für alle Formen der Prävention genutzt werden kann und so eine große Rolle in der Senkung der weltweiten kardiovaskulären Mortalität spielt.

Tabakkonsum

Ein wichtiger und vor allem vermeidbarer Risikofaktor für Atherosklerose ist der Tabakkonsum. Die atherogene Wirkung von Zigarettenrauch ist vor allem durch erhöhten oxidativen Stress und verminderte Bioverfügbarkeit von NO zu erklären.¹⁵ Zudem wird durch Bestandteile von Tabakrauch auch die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und E-Selektin erhöht und so die lokale Entzündungsreaktion gefördert.¹⁶ Rauchen fördert jedoch nicht nur die Entstehung von Atherosklerose, sondern gefährdet auch die Plaquestabilität.^{17,18}

Hypertonie

Ebenso wurde der Zusammenhang zwischen erhöhtem Blutdruck und der Entwicklung von Atherosklerose ausführlich untersucht: eine im Jahre 2002 durchgeführte Metaanalyse mit über einer Million Teilnehmer, zeigte, dass ab einem Blutdruck von 115/75 mmHg eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks je 20 mmHg beziehungsweise des diastolischen Blutdrucks je 10 mmHg mit einer Verdopplung des Risikos an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben einhergeht.¹⁹

Dyslipidämie

Der Lipidmetabolismus scheint bei der Entwicklung von Atherosklerose ebenfalls eine besondere Rolle zu spielen. So können erhöhte Cholesterol-Spiegel sogar trotz Abwesenheit anderer Risikofaktoren zur Ausbildung von Atherosklerose führen.²⁰ Erhöhte LDL-Cholesterinkonzentrationen im Blut konnten durch mehrere große Studien als entscheidender Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose identifiziert werden.^{21,22}

Diabetes mellitus und weitere Risikofaktoren

Weiterhin stellt Diabetes mellitus einen etablierten Risikofaktor für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen dar. Im Rahmen der Hyperglykämie kommt es zu verminderter Verfügbarkeit von endotheliale, vasodilatatorischem NO, vermehrter Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe, erhöhter Konzentration von vasokonstriktivem Endothelin-1 und erhöhter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).²³ Diese Faktoren haben eine ausgeprägte atherogene Wirkung auf die Gefäßwand, indem sie Immunzellen rekrutieren und deren Adhäsion begünstigen. Überdies kommt es im Rahmen von Diabetes zu einer verminderten Kollagen-Produktion durch glatte Gefäßmuskelzellen und zu einer erhöhten Produktion von Matrix-Metallo-Proteasen (MMP), die vermehrt Kollagene abbauen und damit maßgeblich zur Plaqueinstabilität in fortgeschrittenen Läsionen beitragen.²⁴

Außer den genannten, zumindest teilweise beeinflussbaren Faktoren, existiert auch eine Reihe nicht modifizierbarer Risikofaktoren. Dazu zählen männliches Geschlecht, Alter und genetische Prädisposition. Bei der Entwicklung des *Reynolds Risk Scores* zur Risikoabschätzung von kardiovaskulären Ereignissen konnte außerdem eine erhöhte Konzentration von C-reaktivem Protein (CRP) mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose assoziiert werden.²⁵ Zu den modernen kardiovaskulären Risikofaktoren zählen zudem Bewegungsmangel, Hyperurikämie und Übergewicht.²⁶

1.2.4. Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Entstehung atherosklerotischer Läsionen ist ein multifaktorielles Geschehen, an dem verschiedenste gefäßschädigende Faktoren beteiligt sind. Dieser Prozess führt sich meist kontinuierlich über mehrere Jahrzehnte fort und resultiert in einer stetigen Aggravation. Die meiste Zeit dieser langen Periode bleibt die Erkrankung klinisch stumm und manifestiert sich erst ab einer Stenose des Gefäßes von etwa 50 % oder im Rahmen von Komplikationen.

Nach der „*Response to injury*“ Hypothese, die erstmalig von *R Ross* und *JA Glomset* im Jahre 1976 postuliert und seitdem kontinuierlich modifiziert wurde, beginnt dieser Prozess mit einer Schädigung der Gefäßwand durch gefäßtoxische Substanzen, wie beispielsweise ROS oder bakterielle Endotoxine, aber auch erhöhte mechanische Belastung kommt für die initiale Schädigung in Frage.²⁷

Mechanische Belastungen des Endothels entstehen durch veränderte, bspw. nicht-laminare Scherkräfte des vorbeiströmenden Blutes (siehe Kapitel 1.1.2). Besonders stark wirken diese

Scherkräfte sowohl an Gefäßbifurkationen durch turbulente Strömungen, was diese Bereiche des Kreislaufs deutlich vulnerabler für die Entwicklung von Atherosklerose macht, als auch beim Vorliegen einer arteriellen Hypertonie.

Durch die beschriebenen schädigenden Einflüsse werden komplexe zelluläre Signalwege in Gang gesetzt, die zu veränderten Funktionen und Eigenschaften des Endothels führen. Dieser Prozess wird auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und ist die erste wahrnehmbare Veränderung eines Gefäßes im Entstehungsprozess atherosklerotischer Läsionen.²⁸

In Folge der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer phänotypischen Veränderung der Endothelzellen hin zu einem proinflammatorischen, prothrombotischen Zustand.²⁹ Im Rahmen dieser dysfunktionalen Umstellung kommt es u.a. zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, die wiederum die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen wie E-Selektin, Chemokinen wie Interleukin-8 (IL-8) und prokoagulatorischen Molekülen wie *tissue factor* induzieren.³⁰ Diese kurzfristige Reaktion zur Rekrutierung von Immunzellen wird langfristig durch die Expression von *atherosclerosis-associated endothelial-leukocyte adhesion molecule* (VCAM-1) aufrechterhalten.³¹ Es findet also schon in anfänglichen Läsionen ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Teilen des Immunsystems statt, wodurch die entzündliche Komponente in der Entstehung von Atherosklerose deutlich wird.

Eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Progression atherosklerotischer Läsionen spielt, wie bereits unter 1.2.3 erwähnt, auch die erhöhte Konzentration von *low density lipoprotein* (LDL) im Blut. Nachdem chemisch modifiziert wurden, können diese Lipoproteine durch das vorgeschädigte, undichte Endothel in den subendothelialen Raum eindringen und akkumulieren.³² Dort finden anschließend weitere molekulare Veränderungen des LDL statt, wobei der Oxidation durch Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen oder Makrophagen wohl die größte Bedeutung zukommt, da oxidiertes LDL (oxLDL) deutlich schneller aufgenommen werden kann als natives LDL.^{33,34} Als verantwortliche Enzyme für diese Oxidationsprozesse werden Myeloperoxidasen, die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und die s15-Lipoxygenase diskutiert.²⁰

Das oxLDL führt zu einer verminderten Verfügbarkeit von NO, einer weiteren Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen und wirkt selbst chemotaktisch auf Monozyten, wodurch es zur weiteren Rekrutierung verschiedener inflammatorischer Zellen in den subendothelialen Raum kommt.³⁵ In besonderem Maße entscheidend für die weitere Progression der atherosklerotischen Läsion sind Monozyten (siehe Abbildung 1b). Sie differenzieren sich im subendothelialen Raum zu Makrophagen und exprimieren Scavenger-Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen das oxLDL in großen Mengen zu internalisieren.³⁶ Durch diese massive Aufnahme von oxLDL wird das

Erscheinungsbild der Makrophagen verändert und sie erreichen das Stadium der Schaumzellen. Da die Scavenger-Rezeptoren im Gegensatz zu den übrigen LDL-Rezeptoren durch intrazelluläre Lipidakkumulation nicht herunterreguliert werden, nehmen die Schaumzellen weiter LDL auf bis sie zu Grunde gehen.³⁷

Auch verschiedene Arten von T-Zellen sind in diesem Stadium am Voranschreiten der Läsion beteiligt. T-Helfer-Zellen sezernieren IFN- γ , während regulatorische T-Zellen IL-10 und TGF- β produzieren, wodurch die Immunreaktion in der Intima ebenfalls moduliert wird.³⁸

Abgesehen von Immunzellen spielen auch glatte Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle für den weiteren Fortschritt atherosklerotischer Läsionen. Sie wandern aus der Tunica media zunehmend in die Tunica intima ein und proliferieren dort vor allem durch den PDGF-vermittelten Wachstumsreiz.³⁹ Sie tragen damit zwar erheblich zur Verdickung der Gefäßwand bei, sind aber gleichzeitig durch Produktion von Kollagenen und anderen Proteinen der Extrazellulärmatrix maßgeblich an der Bildung der fibrösen Kappe, der schützenden Schicht zwischen Plaque und Gefäßlumen, beteiligt. So wird das Risiko einer Plaqueruptur mit potentiell schwerwiegenden klinischen Konsequenzen durch die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen entscheidend verringert.⁴⁰

Unterhalb dieser fibrösen Kappe kommt es im Rahmen des Untergangs von Schaumzellen durch Apoptose bzw. Nekrose, zur Entstehung eines nekrotischen Kerns mit hohem extrazellulärem Lipidanteil, der zu einer gesteigerten Instabilität des Plaques führt.⁴¹

Da sich Plaques ab einer gewissen Größe nicht mehr durch Diffusion aus dem eigentlichen Blutgefäß ernähren können, kommt es in fortgeschrittenen Läsionen zur Bildung von Vasa vasorum durch Angiogenese (siehe Abbildung 1c).⁴² Diese wachsen von der Adventita aus bis in den Plaque hinein und übernehmen anschließend dessen Versorgung. Die neugebildeten Gefäße exprimieren Leukozytenadhäsionsmoleküle und sind sehr fragil, wodurch es zu Einblutungen kommen kann.⁴³ Bei fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques kommt es außerdem häufig zu Kalzifizierungsprozessen. Diese Verkalkungen entstehen durch eine Dysregulation von Calcium-Ablagerungen und werden durch Osteogenese-ähnliche Prozesse gebildet.⁴⁴ Treten diese Kalzifikationen nur vereinzelt innerhalb des Plaques auf, führen sie tendenziell zu einer Instabilität des Plaques, während bei hochgradigen Verkalkungen eher das Gegenteil der Fall ist.^{45,46}

Die klinische Symptomatik atherosklerotischer Läsionen kann über zwei Wege hervorgerufen werden. Zum einen kann es durch eine hochgradige Stenose zur chronischen Minderperfusion der

poststenotischen Gefäßabschnitte kommen, die je nach Lokalisation klinisch z.B. als Angina pectoris oder Claudicatio intermittens imponieren kann. Zum anderen kann durch eine Plaqueruptur (siehe Abbildung 1d) weiter distal ein akutes thromboembolisches Ereignis entstehen, welches klinisch bspw. in einem Myokardinfarkt, ischämischen Schlaganfall oder Mesenterialinfarkt resultieren kann. Über das Auftreten einer solchen Plaqueruptur, entscheidet vor allem die Stabilität der fibrösen Kappe. Deren Integrität kann durch Makrophagen gefährdet werden, da diese proteolytische Enzyme wie MMP sezernieren.⁴⁷

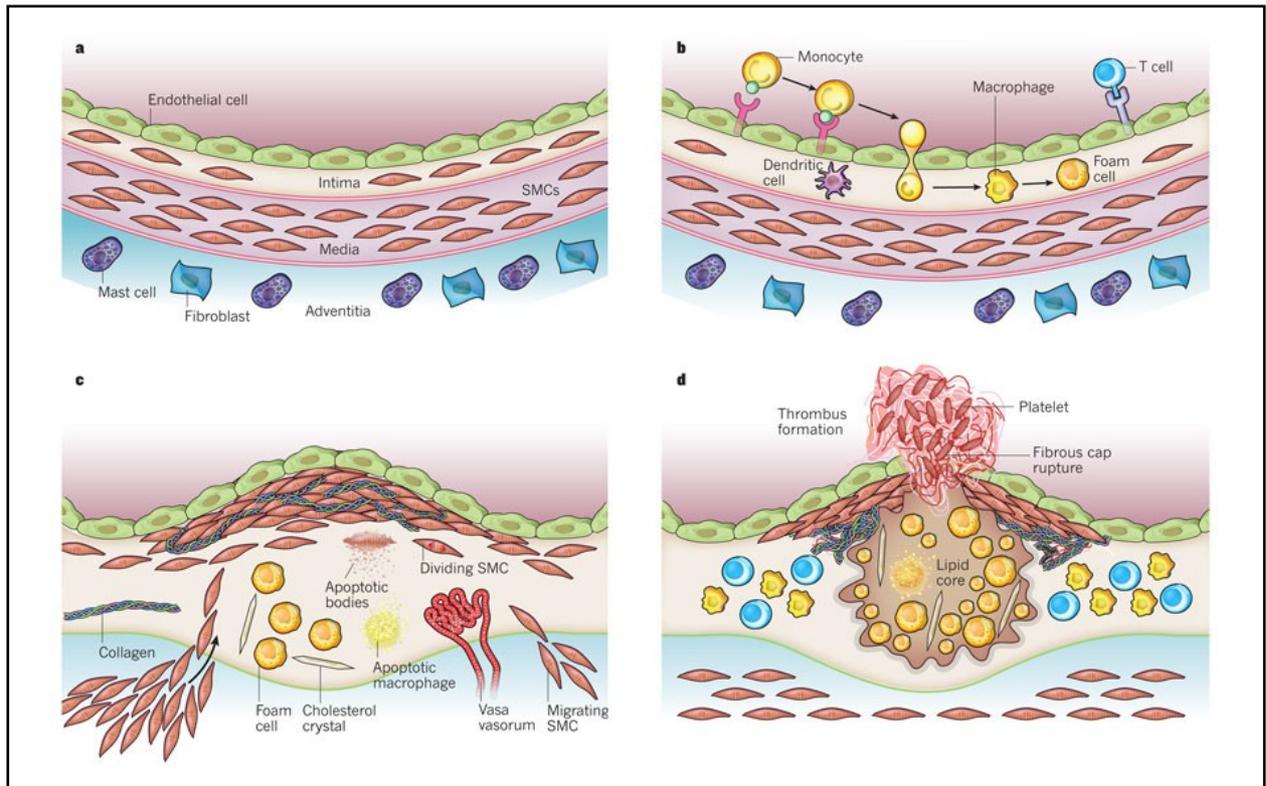


Abbildung 1: Verschiedene Entwicklungsstadien einer atherosklerotischen Läsion vom normalen Gefäß (a) bis hin zum rupturierten Plaque (d)

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Peter Libby et al, 2011.³⁸

Letztendlich bleibt die genaue Pathophysiologie der Atherosklerose trotz enormen Erkenntnisgewinns über die letzten Jahrzehnte nicht vollständig erklärt. Es existiert zwar eine Vielzahl von Erklärungsansätzen, jedoch hat noch keiner von ihnen Allgemeingültigkeit erlangt, so bleibt zu hoffen, dass diese Thematik auch in der Zukunft Gegenstand von vielen Forschungsarbeiten sein wird.

1.2.5. Zelluläre Komponenten der Atherosklerose

An den komplexen pathogenetischen Prozessen, die zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen führen, ist eine Vielzahl verschiedener Zelllinien beteiligt. Insbesondere glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und verschiedenen Entzündungszellen spielen hier eine entscheidende Rolle, die in diesem Kapitel genauer erörtert wird.

Endothelzellen

Da das gesamte Gefäßsystem von Endothelzellen ausgekleidet wird, kommen diese auch als erstes in Kontakt mit zirkulierenden gefäßtoxischen Substanzen und sind in besonderem Maße der mechanischen Belastung durch den Blutfluss ausgesetzt. Wie Endothelzellen auf diese Schädigung reagieren, ist unter 1.2.4 aufgeführt. In Folge gefäßschädigender Einflüsse kann nicht nur die Funktionalität, sondern auch die Morphologie von Endothelzellen verändert werden. So wurden gestörte Orientierung und rundliche Verformung von Endothelzellen im Rahmen von Atherosklerose beobachtet.⁴⁸

Makrophagen und Monozyten

In den Anfangsstadien von Atherosklerose sind im Rahmen einer Hyperlipidämie mehr zirkulierende Monozyten im Blut zu finden.⁴⁹ Diese können in die Gefäßwand migrieren und dort zu Makrophagen differenzieren. Anschließend werden die eingewanderten Makrophagen initial durch oxLDL und Phospholipide über pathogen-associated molecular patterns (PAMP) und über damage-associated molecular patterns (DAMP) aktiviert, woraufhin sie verschiedene pro- und antiinflammatorische Zytokine sezernieren.⁵⁰

Haben die Makrophagen durch massive Aufnahme von modifiziertem LDL das Stadium der Schaumzellen erreicht, kommt es zu Aktivierung der Caspase-1, die zur Freisetzung von IL-1 β und IL-18 führt, was in einer proinflammatorischen Wirkung resultiert.⁵¹

Während der Großteil der Makrophagen in frühen Stadien atherosklerotischer Läsionen durch Migration von Monozyten in die Gefäßwand gelangt, spielt in späteren Stadien die Proliferation von Makrophagen innerhalb der Gefäßwand eine größere Rolle.⁵²

In weit fortgeschrittenen Läsionen sind Makrophagen außerdem dafür verantwortlich, nach der Ruptur von neugebildeten, fragilen Gefäßen, für den Abbau von ausgetretenen Erythrozyten zu sorgen.⁵³ Eine eingeschränkte Phagozytosekapazität führt hier zu einem weiteren Progress der Erkrankung.

Mastzellen

Vorläufer von Mastzellen zirkulieren im Blut und können so von luminal oder aus den Vasa vasorum in die Gefäßwand eindringen.⁵⁴ Es konnte gezeigt werden, dass Mastzellen im Rahmen von Atherosklerose, insbesondere in instabilen Plaques und nach stattgefundenen Plaqueruptur, in Intima und Adventitia akkumulieren.⁵⁵ Demnach wird Mastzellen eine Rolle bei der Destabilisierung von atherosklerotischen Plaques nachgesagt.⁵⁶

Letztendlich ist die genaue Rolle von Mastzellen bei der Atherogenese nicht abschließend geklärt. Jedoch ist eine Mastzellinvasion in die Gefäßwand bei der Entwicklung von Atherosklerose ein eindeutiger Indikator für ihre Beteiligung an den pathophysiologischen Prozessen der Atherogenese.

B-Zellen

Sowohl B₁-, als auch B₂-Lymphozyten sind im Rahmen von Atherosklerose in der Gefäßwand zu finden. Da oxLDL eine hohe Antigenität besitzt, sind B₁-Zellen in der Lage, mit oxLDL zu reagieren und daraufhin IgM-Antikörper zu produzieren.⁵⁷ Diese Antikörper scheinen eine protektive Wirkung auf die Gefäßwand zu haben, während die T-Zell-abhängigen B₂-Zellen eher eine proatherogene Wirkung zeigen.⁵⁸

T-Zellen

In atherosklerotischen Läsionen sind vor allem CD4⁺ T-Helferzellen zu finden, wobei Th1-Zellen die größte Subgruppe dieser Zellpopulation darstellen. Sie werden durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert, die ihnen vermutlich Teile von oxLDL als Antigen präsentieren.⁵⁹ Die Th1-Zellen reagieren darauf mit der Produktion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ und IL-2 und vermutlich auch mit einer antigenspezifischen Immunreaktion.⁶⁰ Aber auch Th2-Zellen sind innerhalb von Plaques zu finden, sie unterstützen den Klassenwechsel der von den B-Zellen produzierten Immunglobuline gegen oxLDL von IgM zu IgG und produzieren antiinflammatorische Zytokine, wodurch sie mutmaßlich eine eher antiatherogene Wirkung innerhalb der Gefäßwand haben.⁶¹

Dendritische Zellen

Dendritische Zellen gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen und sind ebenso in atherosklerotischen Plaques präsent. Sie können, wie Makrophagen, über Scavenger-Rezeptoren in hohem Maße LDL aufnehmen und sich so ebenfalls zu Schaumzellen entwickeln.⁶² Nach Aufnahme von oxLDL kommt es zur verstärkten Migration von dendritischen Zellen in die regionalen

Lymphknoten, wo sie Teile des oxLDL als Antigen an T-Zellen präsentieren.⁶³ Innerhalb der Läsion ähneln sich dendritische Zellen und Makrophagen phänotypisch stark, weshalb sie nicht immer eindeutig voneinander abgrenzbar sind.⁶⁴

Glatte Gefäßmuskelzellen

Im Rahmen von Atherosklerose spielen glatte Gefäßmuskelzellen sowohl in der Entstehung von Plaques, als auch bei deren Stabilisierung eine entscheidende Rolle. Wie schon unter 1.2.4 beschrieben, kommt es vor allem in den Anfangsstadien der Atherosklerose zur starken Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Plaqueformation.

Früher ging man davon aus, dass sie durch Bildung der fibrösen Kappe und der daraus resultierender Stabilisierung des Plaques eine ausschließlich protektive Wirkung in derartigen Läsionen haben. Diese Annahme basierte jedoch vermutlich zu einem Großteil auf der falschen Zuordnung von Zellen innerhalb atherosklerotischer Läsionen.

Tatsächlich sind glatte Gefäßmuskelzellen im Gegensatz zu anderen Muskelzellen noch nicht terminal differenziert und können ihre Expressionsmustern und ihre Funktion veränderten Bedingungen anpassen.⁶⁵ Der Erkenntnisgewinn zu dieser hohen Plastizität glatter Gefäßmuskelzellen, stellte vorherige Annahme über die Rolle glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Atherogenese infrage. Im differenzierten Zustand ist es möglich, glatte Gefäßmuskelzellen durch einige Marker-Proteine, darunter MYH11 und α -SMA (auch als ACTA2 bezeichnet) zu identifizieren.

Im Mausmodell konnte jedoch gezeigt werden, dass ein großer Anteil glatter Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen, die Expression dieser Marker dramatisch reduziert und gleichzeitig eher zu Proliferation, Migration und Sekretion von Proteinen der Extrazellulärmatrix neigt.⁶⁶ Zudem können glatte Gefäßmuskelzellen auch beginnen, klassische Makrophagen-Marker wie CD68 zu exprimieren. Dieses Phänomen konnte in Studien bei ca. 30 % aller Zellen glattmuskulären Ursprungs beobachtet werden.^{3,4} Dieses Zusammenspiel aus Differenzierung, Dedifferenzierung, Proliferation und Migration ist entscheidend für den Umbau der Gefäßwandstruktur im Rahmen von Atherosklerose. Der Ablauf dieser Veränderungen im Expressionsmuster erfordert neben der Anwesenheit atherogener Faktoren wie PDGF oder oxidierten Lipiden vermutlich auch der des Transkriptionsfaktors KLF4 (siehe Abbildung 2).⁶⁷ Beim Knock-out von KLF4 im Mausmodell konnte eine Reduktion, der von glatten Gefäßmuskelzellen abstammenden Makrophagen-ähnlichen Zellen beobachtet werden, sodass KLF4 an dieser Änderung des Phänotyps beteiligt zu sein scheint.⁶⁸

KLF4 ist jedoch nicht allein für die Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen verantwortlich, auch der *serum response factor* (SRF) mit seinem Ko-Faktor Myokardin, sowie die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix nehmen hier Einfluss, wobei ein tieferes Verständnis für die molekularen Mechanismen des *phenotypic switch* Gegenstand aktueller Forschung ist.⁶⁹

In Abbildung 2 sind die möglichen Phänotypen, zu denen glatte Gefäßmuskelzellen dedifferenzieren können dargestellt. Im Rahmen der Dedifferenzierungsprozesse können glatte Gefäßmuskelzellen sowohl Makrophagen-, Myofibroblasten-, als auch mesenchymale Stammzell-ähnliche Phänotypen annehmen.⁷⁰ Aus bisherigen Forschungsarbeiten mit murinen Atherosklerosemodellen und Zellkulturen, geht die Vermutung hervor, dass diese phänotypischen Veränderungen auch mit veränderten Ansprüchen an den zellulären Metabolismus von glatten Gefäßmuskelzellen einhergehen.

Konkret wurden auf Ebene der Zellkultur in unserer Forschungsgruppe glatte Gefäßmuskelzellen mit PDGF inkubiert, wodurch Dedifferenzierungsprozesse angestoßen wurden. Dies führte einerseits zu einer deutlichen Reduktion der Expression glattmuskulärer Markerproteine (α SMA und MYH11). Andererseits zeigte sich im *in vitro* Seahorse-Experiment, einem Versuch bei dem Sauerstoffverbrauch und die extrazelluläre Azidifizierung bestimmt werden können, auch eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Glykolyse und mitochondrialer Energiegewinnung in Richtung glykolytischer Aktivität im Vergleich zur Kontrollkultur. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten) Diese Veränderungen wurden weiterhin auf Proteinebene untersucht, wobei sich hier vor allem die Expression glykolytischer Enzyme wie der Phosphofruktosekinase (PFK) und der Laktatdehydrogenase (LDH) im Vergleich zu den Kontrollen erhöht zeigte. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten) *In vivo* wurden diese metabolischen Veränderungen in einem Karotis-Ligatur-Mausmodell, sowie einem ApoE^{-/-} Mausmodell mit 12 Wochen westlicher Ernährung untersucht. Erkenntnisse brachte dabei vor allem das Karotis-Ligatur-Modell, bei dem nach Ligatur der A. carotis die mitochondriale DNA, mitochondriale Enzyme und die mitochondriale Masse vermindert waren. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

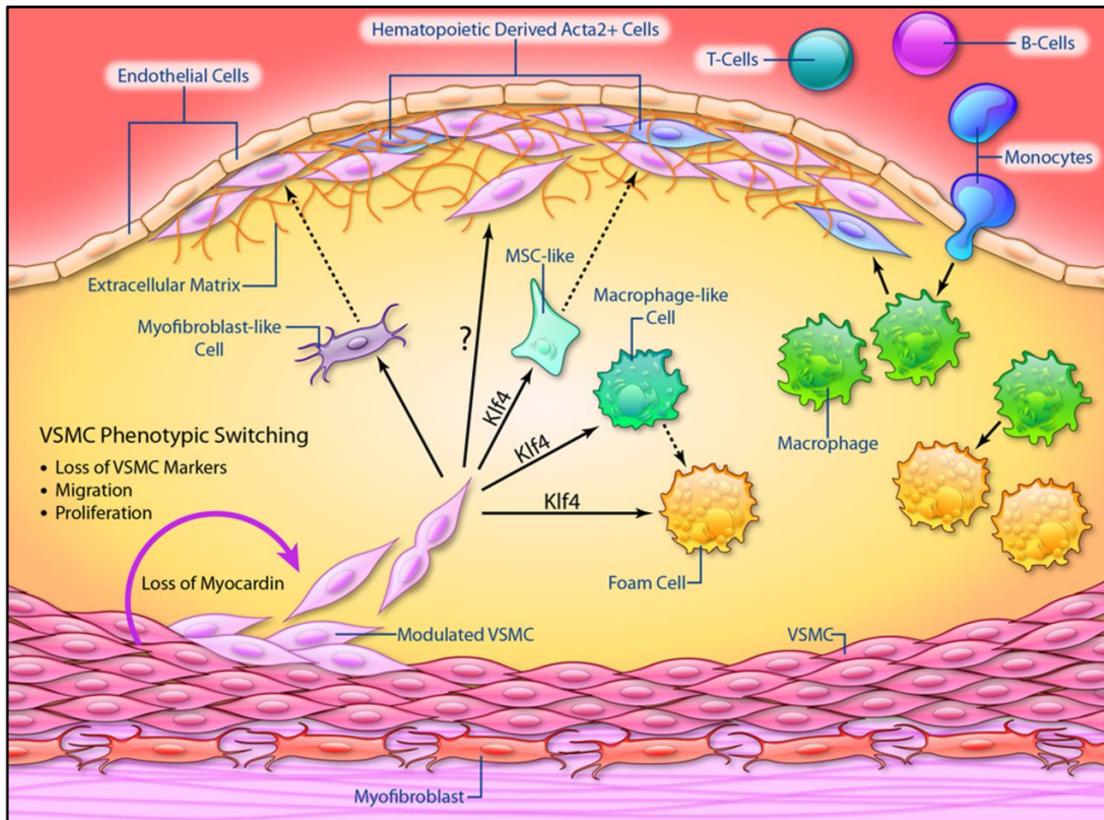


Abbildung 2: Überblick über Mechanismen des phänotypischen Switchs glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose.

Quelle: Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):692-702.

Trotz der Tatsache, dass sich dedifferenzierte glatte Gefäßmuskelzellen teils nur schwer von beispielsweise Makrophagen unterscheiden lassen, finden sich dennoch wichtige Unterschiede in der Funktion. So zeigen die aus Dedifferenzierungsprozessen hervorgehenden Makrophagen-ähnlichen glatten Gefäßmuskelzellen eine deutlich reduzierte Phagozytosekapazität im Vergleich zu klassischen Makrophagen myeloischen Ursprungs.⁷¹ Unzureichender Abtransport apoptotischer Zellen und Zelldebris ist ein bekanntes Problem fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen, da so eine verstärkte Inflammation ausgelöst wird, der nekrotische Kern wächst und die Plaquestabilität gefährdet wird (siehe Abbildung 3: „Plaque erosion“).⁷² An der Entstehung dieser Problematik sind glatte Gefäßmuskelzellen demnach zumindest mitbeteiligt.⁷³ Gerät das Gleichgewicht aus Einlagerung von Zelldebris und Cholesterolkristallen, sowie anderen Komponenten des nekrotischen Kern und der Resorption dieser Bestandteile, sowie Stabilisierung des Plaques aus dem Gleichgewicht, kann dies in einer Ruptur ebendiesem resultieren. Um auf eine solche Plaqueruptur adäquat reagieren zu können, ist eine starke Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen erforderlich, um den entstandenen Defekt in der Gefäßwand zu schließen. Es

wird jedoch vermutet, dass glatte Gefäßmuskelzellen sich in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen, zu einem erhöhten Anteil im Status der Zellseneszenz befinden.⁷⁴ Dieser Zustand zeichnet sich durch eine fehlende Proliferationsfähigkeit aus und kann durch Telomerverkürzung oder Zellstress ausgelöst werden. Ist ein erhöhter Anteil der glatten Gefäßmuskelzellen im Bereich der atherosklerotischen Läsion seneszent, kann eine zeitnahe Defektdeckung nach einer Plaqueruptur gefährdet sein.⁷⁰ Der unzureichende oder verzögerte Verschluss eines rupturierten Plaques resultiert schlussendlich in einer Einengung des Gefäßlumens und somit in einer verminderten Durchblutung distaler Gefäßabschnitte.

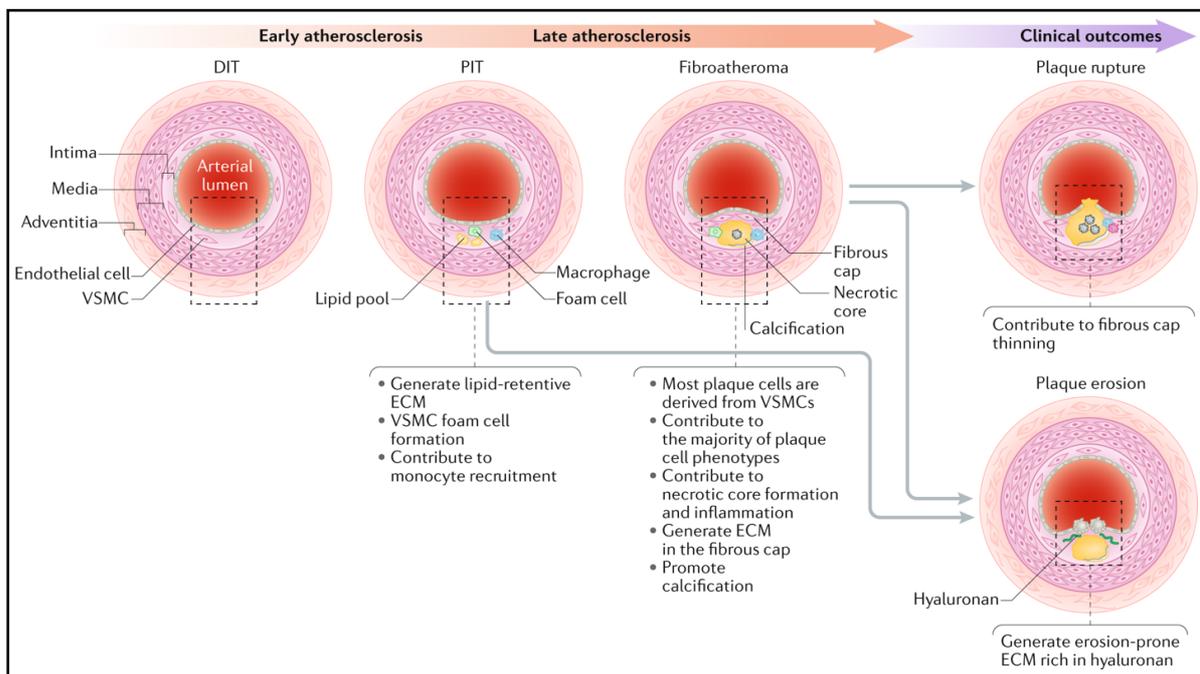


Abbildung 3: Bedeutung glatter Gefäßmuskelzellen in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Im physiologischen Zustand (ganz links) ist ihre Hauptaufgabe, den Durchmesser des Gefäßlumens zu regulieren. Bei der initialen Ausbildung von Atherosklerose beginnen die VSMC mit der vermehrten Produktion von Extrazellulärmatrix, einige glatte Gefäßmuskelzellen nehmen einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp an und werden durch die massive Aufnahme von LDL zu Schaumzellen. In fortgeschrittenen Läsionen stammt ein Großteil der Zellen innerhalb des Plaques von glatten Gefäßmuskelzellen ab. Durch ihre reduzierte Fähigkeit zur Phagozytose und den erhöhten Anteil glatter Gefäßmuskelzellen, die sich im Zustand der Zellseneszenz befinden, tragen sie maßgeblich zur Größenzunahme des nekrotischen Kerns bei.

Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Cardiology. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. Gemma L. Basatemur et al., 2019.

Die beschriebenen veränderten Expressionsmuster sind für die Identifikation von glatten Gefäßmuskelzellen in humanen Gefäßen ein großes Hindernis geblieben und führen hier weiterhin zur fälschlichen Zuordnung von Zellen in atherosklerotischen Plaques.

Erschwerend kommt hinzu, dass nicht nur glatte Gefäßmuskelzellen in der Lage sind, untypische Marker zu exprimieren. Es konnte sowohl in der Maus, als auch in humanen Proben gezeigt werden, dass Zellen myeloischen Ursprungs, wie beispielsweise Makrophagen, in der Lage sind, Marker glatter Gefäßmuskelzellen wie α SMA zu exprimieren.^{75,76} Im Falle von Schaumzellen wurde beobachtet, dass etwa die Hälfte sowohl Marker glatter Gefäßmuskeln, als auch Marker von Makrophagen exprimieren.⁷⁷ Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von CD68 durch glatte Gefäßmuskelzellen in der Zellkultur nach Inkubation mit Cholesterol, als proatherogener Faktor, untersucht, wobei sich die Expression im Vergleich zu den Kontrollen nach Cholesterolinkubation erhöhte. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Dementsprechend gestaltet sich die Unterscheidung zwischen myeloischen Zellen, bei denen es zur Aktivierung von glatten Gefäßmuskelmarkern kommt und Makrophagenmarker-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen anhand dieser klassischen Methoden äußerst schwierig. Vor einigen Jahren konnte jedoch eine epigenetische Modifikation als spezifisches Erkennungsmerkmal glatter Gefäßmuskelzellen von Mensch und Maus identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Demethylierung von Lysin 4 des Histons H3 (H3K4me2) am MYH11-Genlocus, die selbst bei glatten Gefäßmuskelzellen mit verändertem Phänotyp vorhanden ist und bisher an keinem anderen Zelltyp nachgewiesen wurde.⁷⁸

Zusammenfassend ist die Rolle der glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Plaques als ambivalent zu sehen. Einerseits ist ihre Migrations- und Proliferationsfähigkeit entscheidend, um in die Intima einwandern zu können und dort zu einer Stabilisierung des Plaques, sowie im Falle einer Ruptur zu einem Verschluss des Defektes beitragen zu können. Andererseits sind die durch proatherogene Faktoren induzierten Dedifferenzierungsprozesse entscheidend an Plaqueswachstum und -destabilisierung beteiligt. Sollte sich die Hypothese bestätigen, dass diese Dedifferenzierung zu proatherogenen Phänotypen eine Anpassung des Metabolismus erfordert, bietet sich hier gegebenenfalls ein Ansatzpunkt um die protektiven Phänotypen der glatten Gefäßmuskelzellen zu selektieren, beziehungsweise die Dedifferenzierung zu proatherogenen Phänotypen zu unterbinden.

Lineage Tracing

Um die Plastizität der glatten Gefäßmuskelzellen, die zunächst vor allem in der Zellkultur untersucht wurde, auch in vivo zu analysieren, ist es notwendig die Zellen glattmuskulären Ursprungs von den übrigen Zelllinien in atherosklerotischen Zellen zu unterscheiden. Die Befähigung glatter Gefäßmuskelzellen ihr Expressionsmuster so drastisch zu verändern, stellte dabei lange ein entscheidendes Hindernis dar. Durch die Etablierung des *Lineage tracings*, also der permanenten Markierung einer Zelle und ihrer Abkömmlinge, konnte diese Problematik in den letzten Jahren zumindest teilweise überwunden werden. Im Rahmen des *Lineage tracings* können Zellen bspw. mit einem Fluoreszenz-Reporter markiert werden, der an alle aus der Ursprungszelle hervorgehenden Tochterzellen weitergegeben wird, sodass man diese später sicher ihrer Abstammung zuordnen kann. Durch diese Möglichkeiten konnte in der Vergangenheit zumindest an Mäusen im Atherosklerosemodell die Herkunft glatter Gefäßmuskelmarker-exprimierender Zellen untersucht werden.⁴ Hierfür kam das Cre/Lox-System zum Einsatz, bei dem die Rekombinase Cre als Transgen mit dem Promotor eines gewebespezifischen Gens in das Genom einer Maus eingebracht wird. Diese Rekombinase bindet spezifisch an eine bestimmte Erkennungssequenz (Lox), welche zusammen mit einem Fluoreszenz-Reporter-Gen in das Genom einer zweiten Mauslinie eingebracht wird, die anschließend mit der ersten gekreuzt werden kann (siehe Abbildung 4).⁷⁹ Im Falle des Atherosklerose-Modells wird hierfür eine Liganden-abhängige Cre-Rekombinase genutzt, die erst durch die Bindung von Tamoxifen aktiviert wird. Die Rekombinase wird zum *Lineage tracing* glatter Gefäßmuskelzellen zusammen mit dem Promotor der *smooth muscle myosin heavy chain* und für das *Lineage tracing* von Makrophagen zusammen mit dem Promotor des M-Lysozyms in das Mausgenom eingebracht. Wird den Mäusen nun Tamoxifen verabreicht, wird die Cre-Rekombinase aktiviert, es findet ein Knockout der Zielgene statt und an deren Stelle wird ein Reportergen transkribiert. In den nach der beschriebenen Methodik durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass 16% der Zellen in atherosklerotischen Läsionen, die CD68+ sind, also einen klassischen Makrophagenmarker exprimieren, nicht myeloischen Ursprungs sind, sondern von glatten Gefäßmuskelzellen abstammen.⁴ Auf der anderen Seite stellte sich heraus, dass etwa ein Drittel der α SMA positiven Zellen, nicht aus glatten Gefäßmuskelzellen hervorgehen. Diese Beobachtungen stützen die Theorie einer erhöhten Plastizität verschiedener Zelltypen, insbesondere der glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen, im Rahmen von Atherosklerose enorm.

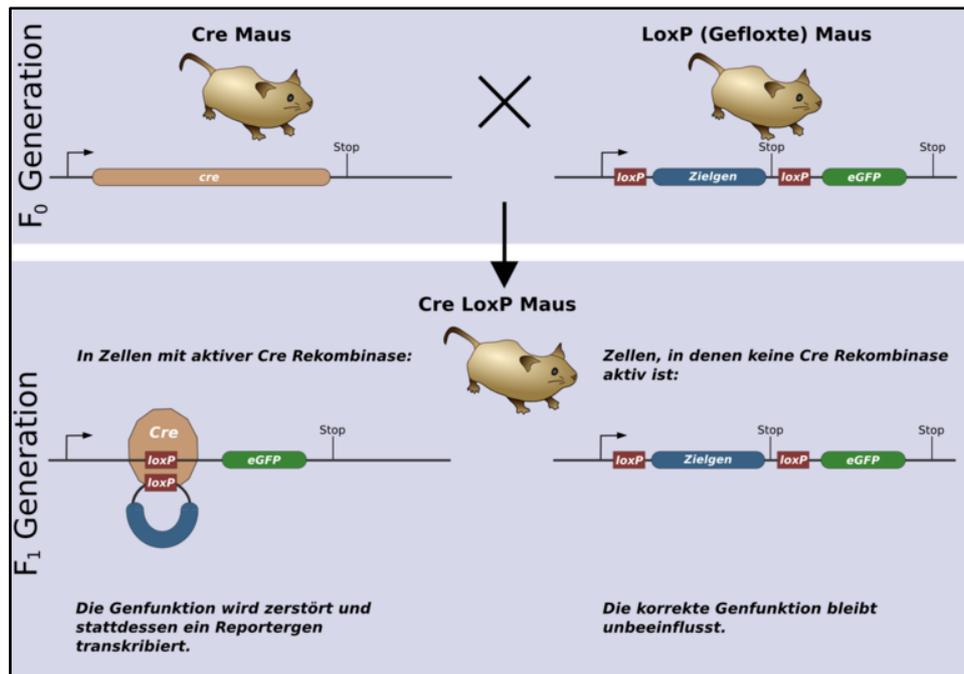


Abbildung 4: Darstellung der Funktionsweise des Cre/LoxP-Systems. In der F₀-Generation wird in eine Maus die Cre-Rekombinase und in eine andere Maus die LoxP-Sequenz eingebracht. Anschließend werden die Mäuse gekreuzt, wodurch es in der F₁-Generation Mäuse mit Cre-Rekombinase und LoxP-Sequenz gibt. Wird die Cre-Rekombinase aktiviert, wird das Zielgen inaktiviert und stattdessen ein Reporter-gen transkribiert.

Zepper M. Illustration eines Genetikversuchs, der sich des Cre / LoxP Systems bedient. Wikimedia Commons; 2008. Verfügbar unter: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CreLoxP_Modellversuch.png (zuletzt abgerufen am 25.08.2020).

1.2.6. Stadieneinteilung der Atherosklerose

Die Klassifikation der Atherosklerose wurde durch die American Heart Association nach Stary entsprechend ihrer histologischen Morphologie festgelegt und umfasst 8 Stadien. Es ist zu beachten, dass Umbauvorgänge in der Gefäßwand generell nicht nur im Rahmen von Atherosklerose auftreten, sondern auch Teil physiologischer Adaptionsprozesse sein können.⁸⁰ Diese umfassen beispielsweise eine Verdickung der Intima als Reaktion auf veränderte Strömungsbedingungen oder Gefäßwandspannung. Zu diesen Veränderungen kommt es keinesfalls erst im hohen Alter, vielmehr konnten sie bereits ab der ersten Lebenswoche nachgewiesen werden.⁸¹ Der fehlende Krankheitswert dieser Veränderungen liegt vor allem in der fehlenden Auswirkung auf den Durchmesser des Gefäßlumens, welches durch diese physiologischen Umbauprozesse unbeeinträchtigt bleibt. Die Bedeutung der Intimaverdickung liegt vielmehr darin, dass es sich in Anwesenheit von pro-atherosklerotischen Faktoren, wie erhöhten Serum-LDL-Spiegeln um Prädilektionsstellen („*lesion prone areas*“) für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen

handelt. Die Frage, ob diese initialen Intimaverdickungen als Vorläuferläsion oder reine Prädilektionsstellen eingeordnet werden sollten, bleibt offen.

Stadium I

Das erste Stadium der Klassifikation nach Sary ist durch geringe Mengen von Lipideinlagerungen in der Intima gekennzeichnet. Auch diese Läsionen können bereits im Kindesalter zu finden sein. Aufgrund des geringen Ausmaßes dieser Veränderungen, können sie für das ungeübte Auge auch unter dem Mikroskop kaum zu erkennen sein, da sich die Lipideinlagerungen lediglich als vereinzelte Gruppen lipidgefüllter Makrophagen präsentieren (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: 5 μm dicker Querschnitt des Ramus interventricularis anterior (RIVA) eines jungen Mannes. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. An der rechten Seite des Lumens ist eine Verdickung der Intima mit kleinen Lipideinlagerungen zu erkennen, demnach Stadium I nach Sary. 10-fache Vergrößerung.

Stadium II

Die ausgeprägteren Veränderungen bei Typ II-Läsionen, die sogenannten „*fatty streaks*“, können zum Teil bereits makroskopisch in Form von gelben Streifen auf der luminalen Seite der Gefäßwand sichtbar sein.⁴⁸ Wie die Typ-I-Läsionen können sie bereits im Kindesalter zu finden sein. Schaumzellen sind hier nicht mehr nur vereinzelt zu finden, sondern sind dicht in mehreren Schichten angeordnet (siehe Abbildung 6). Auch Lipid-enthaltende glatte Gefäßmuskelzellen, T-Lymphozyten und vereinzelt Mastzellen sind in dieser Art von Läsion anwesend.⁸² In diesem Stadium ist der Großteil der akkumulierten Lipide intrazellulär lokalisiert, während extrazelluläre Lipideinlagerungen eher rar sind. Da nur ein geringer Anteil der Stadium II Läsionen einen weiteren Progress zu fortgeschrittenen atherosklerotischen Veränderungen durchläuft, wurde eine weitere Einteilung in Subgruppen vorgenommen: zum einen die „*progression-prone*“- oder auch Typ Ila-Läsionen, bei denen ein Fortschreiten zu erwarten ist und die „*progression-resistant*“- oder auch Typ Iib-Läsionen, welche entweder sehr langsam oder nur in Anwesenheit hoher Lipoproteinkonzentrationen einen progredienten Verlauf zeigen.⁴⁸ Die Typ Ila-Läsionen zeichnen sich durch Akkumulation von Lipoproteinen und Makrophagen, sowie einer tieferreichenderen Lokalisation dieser Veränderungen aus.⁴⁸ Das Voranschreiten von Typ Ila-Läsionen ist bei den meisten Individuen als erstes an der dorsalen Seite der abdominellen Aorta zu beobachten, eine weitere Prädilektionsstelle für den Läsionsprogress ist der Ramus interventricularis anterior (RIVA).

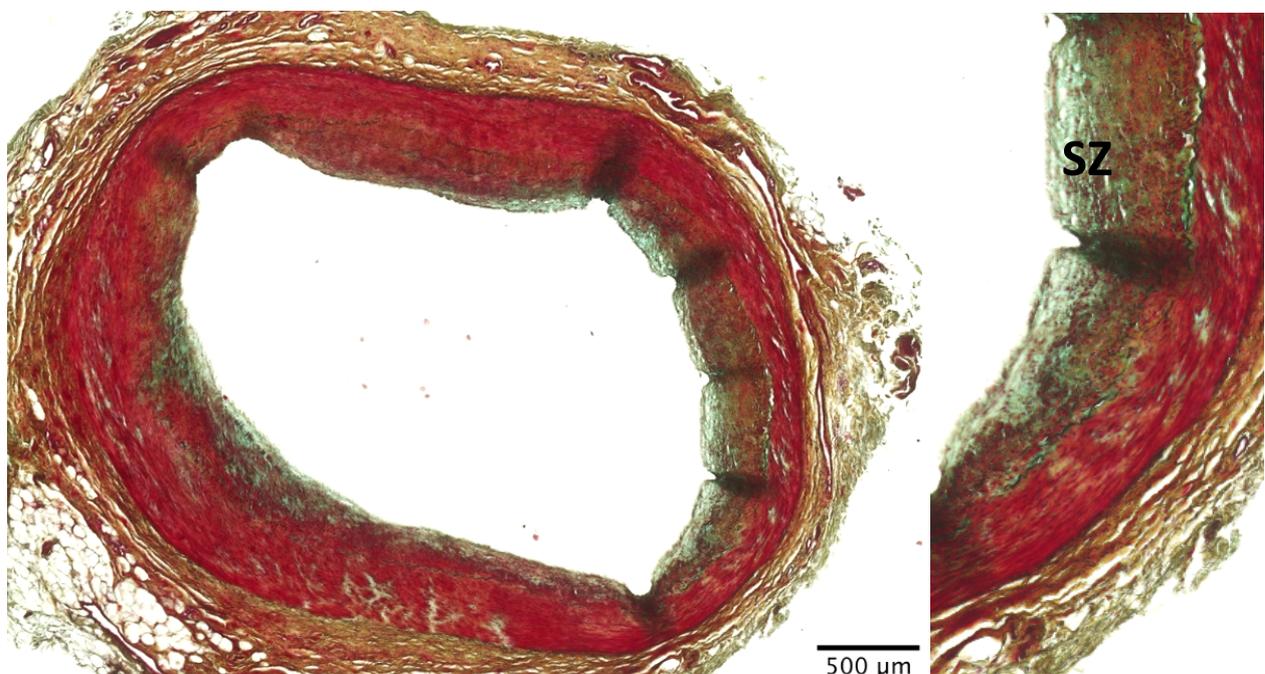


Abbildung 6: 5 µm dicker Querschnitt des RIVA eines jungen Mannes. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. An der rechten Seite des Lumens sind eine Intimahypertrophie und einige Schaumzellen (SZ) zu erkennen, demnach Stadium II nach Stary. 10-fache Vergrößerung.

Stadium III

Der Übergang zwischen den reversiblen Vorläuferläsionen der Stadien I und II und dem manifesten Atherom wird durch das Stadium III gebildet. Die in dieses Stadium einzuordnenden Läsionen werden daher auch als Präatherome bezeichnet.⁸³ Charakteristisch für Stadium-III-Läsionen ist die vermehrte Akkumulation von Lipidtröpfchen im extrazellulären Raum, wodurch die strukturelle Integrität der physiologischen Gefäßwandkomponenten beeinträchtigt wird (siehe Abbildung 7). Diese Lipidpools sind noch voneinander abgrenzbar und konfluieren nicht, sodass noch kein Lipidkern im Zentrum der Läsion ausgebildet ist.



Abbildung 7: 5 μm dicker Querschnitt des Ramus circumflexus (RCX) einer Frau im mittleren Erwachsenenalter. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. Es sind diffus verteilte, kleine Lipidpools in der Gefäßwand, jedoch kein Lipidkern erkennbar. Dementsprechend liegt eine Typ III-Läsion nach Sary vor. 10-fache Vergrößerung.

Stadium IV

Läsionen dieser Art bilden sich etwa ab dem 3. Lebensjahrzehnt. Das vierte Stadium nach Sary ist das erste, welches zu den fortgeschrittenen Läsionen zählt und zeichnet sich durch die massive Akkumulation von extrazellulären Lipiden in einem gut abgrenzbaren Bereich, dem Lipidkern, aus. Zwar führt dieser Lipidkern zu einer Verdickung der Gefäßwand, was jedoch eher zu einer Zunahme des Gefäßumfangs, als einer Einengung des Lumens führt.⁸⁴ Zwischen dem Lipidkern und dem Endothel sind Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen, Lymphozyten und Mastzellen zu finden.⁸⁵

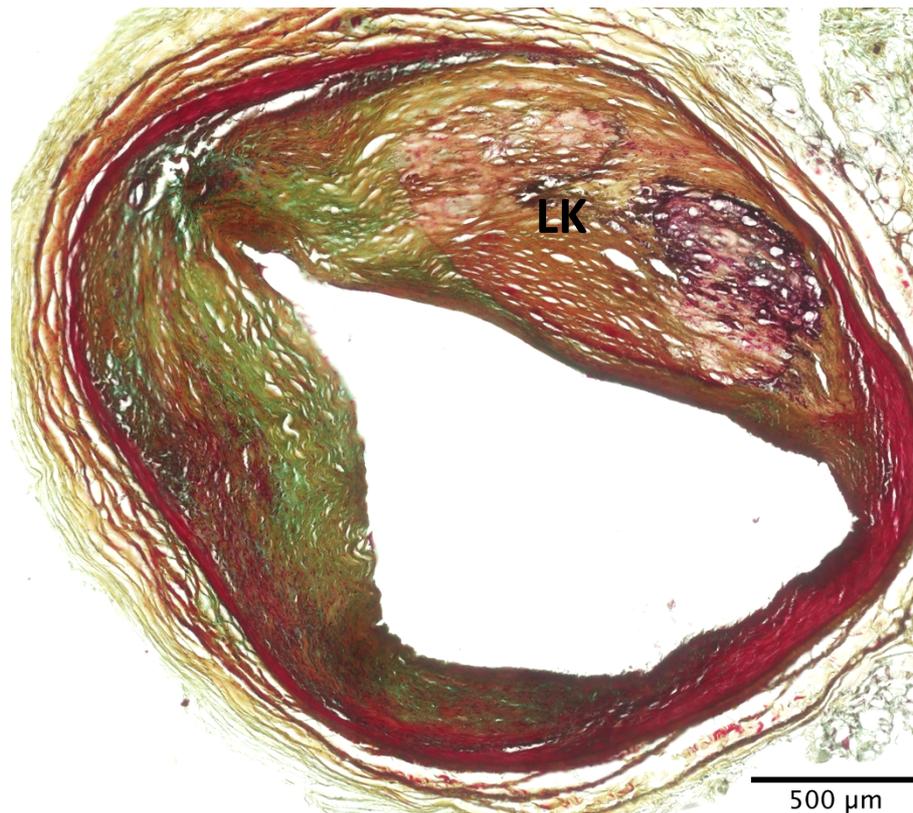


Abbildung 8: 5μm dicker Querschnitt des RIVA eines Mannes im mittleren Erwachsenenalter. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. An der oberen Seite des Gefäßes ist ein großer Lipidkern (LK), jedoch keine fibrotische Umwandlung des angrenzenden Gewebes zu erkennen. Demnach Stadium IV nach Sary. 10-fache Vergrößerung.

Stadium V

Der Übergang zu Typ V-Läsionen geht mit einer Fibrosierung des Bereichs zwischen Lipidkern und Endothel einher. Diese bindegewebige Neubildung enthält vor allem Kollagen und glatte Gefäßmuskelzellen und wird als Reaktion auf die Störung der Gefäßwandarchitektur im Rahmen der Verdrängung durch den Lipidkern gebildet, wobei die reaktive Gewebsverdickung die Dicke des Lipidkerns durchaus übersteigen kann.⁸⁶ Die Gruppe der Typ V-Läsionen wird wiederum in drei Subgruppen unterteilt: fibroatheromatöse Läsionen werden der Gruppe Va, Läsionen mit kalzifizierten Arealen der Gruppe Vb und überwiegend fibrotische Läsionen mit wenig oder sogar fehlenden Lipideinlagerungen der Gruppe Vc zugeordnet. Typ Va-Läsionen zeigen teilweise sogar mehrere Schichten von Lipidkernen, die durch dicke Lagen von fibrotischem Gewebe getrennt werden. Bei den Typ Vb-Läsionen kommt es zur Kalzifizierung von Zelldebris und extrazellulären Lipiden bis hin zu gesamten Lipidkernen (siehe Abbildung 9b).

Alle diese Subgruppen haben gemeinsam, dass sie im Gegensatz zu Läsionen des Stadium IV zu einer Einengung des Gefäßlumens führen und damit eine hohe klinische Relevanz haben. Zudem sind diese Läsionen anfälliger für die Ausbildung von Fissuren und Einblutungen, was ebenfalls zu

ihrer klinischen Bedeutung beiträgt. Je nach Ausmaß der Gefäßobstruktion können Typ V-Läsionen symptomatisch oder klinisch stumm verlaufen.

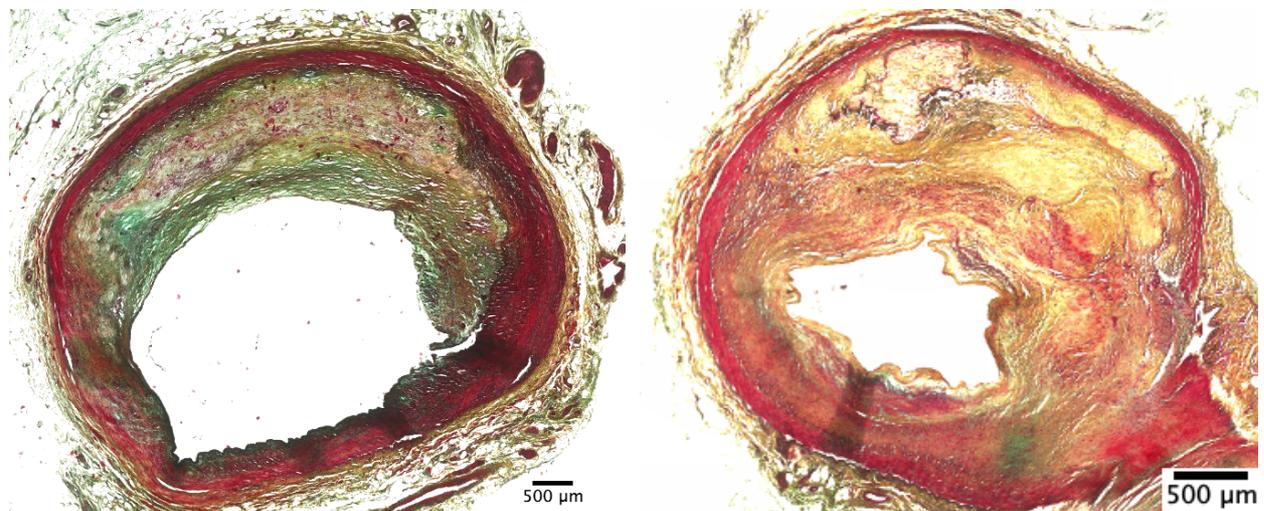


Abbildung 9a (links): 5 µm dicker Querschnitt des RIVA eines Mannes im mittleren Erwachsenenalter. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. An der oberen Seite des Gefäßes sind sowohl ein großer Lipidkern (LK), als auch eine fibrotische Umwandlung des angrenzenden Gewebes zu erkennen. Das Gefäßlumen ist sichtbar eingengt. Demnach Stadium Va nach Sary. 10-fache Vergrößerung.

Abbildung 9b (rechts): 5 µm dicker Querschnitt des RIVA eines Mannes im mittleren Erwachsenenalter mit ischämischer Kardiomyopathie. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. Die Gefäßwand ist überwiegend gelb gefärbt, was für eine ausgeprägte Kalzifizierung der Läsion spricht. Durch die ausgeprägten Umbauprozesse in der Gefäßwand ist das Lumen massiv eingengt. Demnach Stadium Vb nach Sary. 10-fache Vergrößerung.

Stadium VI

Kommt es bei Stadium V-Läsionen zu Verletzungen der Gefäßwand, Hämatomen, Hämorrhagien oder Thrombenbildung, werden sie dem Stadium VI zugeordnet und auch als komplizierte Läsionen bezeichnet (siehe Abbildung 10). Thromben und Blutungen können in den Plaque eingelagert werden und so zu einer zunehmenden Einengung des Gefäßlumens führen. Läsionen dieser Gruppe werden durch starke Obstruktion und der hohen Gefahr für thromboembolische Ereignisse meist symptomatisch.

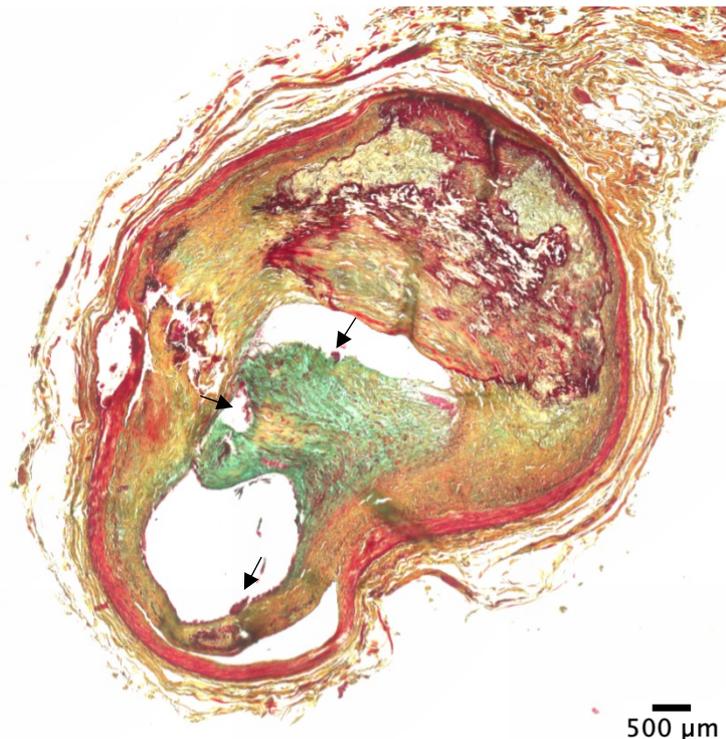


Abbildung 10: 5 μm dicker Querschnitt des RIVA einer Frau im mittleren Erwachsenenalter. Gefärbt mit Movat-Pentachrom-Färbung. Die Gefäßintegrität ist hochgradig gestört und an mehreren Stellen sind kleine Thromben zu erkennen. Das Gefäßlumen ist massiv eingengt. Demnach Stadium VI nach Stary. 10-fache Vergrößerung.

1.2.7. Therapie

Trotz multimodaler Ansätze in der Therapie der Atherosklerose, bestehend aus nicht-pharmakologischen, medikamentösen und interventionell-operativen Ansätzen, handelt es sich um eine Erkrankung, die wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, häufig zum Tode führt. Die Entwicklung neuer Gruppen pharmakologischer Therapeutika ist daher von großem Interesse für die Millionen von Betroffenen weltweit. Ein interessanter neuer Ansatzpunkt ist dabei der Metabolismus glatter Gefäßmuskelzellen. Der hohe Stellenwert glatter Gefäßmuskelzellen in der Atherogenese wurde bereits in Kapitel 1.2.5 behandelt und erklärt, weshalb es sich hier um einen vielversprechenden Angriffspunkt handelt. In der Vergangenheit wurde beispielsweise die Wirkung von Dichloracetat, einem Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK) auf Gefäße im Tiermodell untersucht. Die PDK führt physiologisch zu einer verminderten Oxidation von Pyruvat und somit einer vermehrten Umsetzung von Pyruvat zu Laktat.⁸⁷ Diese Reaktion scheint bedeutsam für die Bildung einer hyperplastischen Intima im Rahmen von Atherosklerose zu sein, sodass in verschiedenen Tiermodellen die verminderte Formation einer Neointima nach Gefäßverletzung gezeigt werden konnte.⁸⁸ Auch Sirtuine, deren Funktion und Bedeutung in Kapitel 1.8 noch einmal genauer

erläutert werden, stellen mögliche Zielmoleküle für die pharmakologische Therapie der Atherosklerose dar.

1.2.8. Herztransplantation

Die Herztransplantation spielt als letzte Therapiemöglichkeit bei terminaler Herzinsuffizienz, ebenfalls eine Rolle in der Therapie der kardialen Atherosklerose, wenngleich diese eher gering ist. Bei der Herztransplantation handelt es sich stets um eine Reservetherapie, deren Indikation äußerst streng zu stellen ist. Im Jahre 2019 wurden in Deutschland von 1136 Patienten auf der Warteliste 344 herztransplantiert, davon knapp 40 am Deutschen Herzzentrum Berlin.⁸⁹ Von dieser Gesamtheit der Transplantationen waren knapp ein Drittel aufgrund einer koronaren Herzerkrankung notwendig, die somit nach der Kardiomyopathie (57 %) die zweithäufigste zur Transplantation führende Diagnose ist.⁸⁹

1.3. Mitochondrien

Oft auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet, sind Mitochondrien der Hauptproduktionsort für Adenosintriphosphat (ATP) in menschlichen Zellen. Sie werden von einer äußeren und einer inneren, stark gefalteten Membran umgeben und gelangten einst als Bakterium in eine eukaryotische Vorläuferzelle. Eine Besonderheit dieser Zellorganelle liegt darin, dass sie ihre eigene, zirkuläre DNA besitzen: die nahezu ausschließlich maternal vererbte mtDNA. Ein Großteil dieser mtDNA wurde im Laufe der Evolution in den Zellkern ausgelagert, heute codiert sie noch 13 der ca. 1500 vom Mitochondrium benötigten Proteine.⁹⁰ Diese durch die mtDNA codierten Gene sind hauptsächlich der oxidativen Phosphorylierung dienlich und werden unabhängig von der restlichen, im Zellkern lokalisierten DNA repliziert.⁹¹ Mitochondrien sind jedoch an deutlich mehr zellulären Prozessen beteiligt, als nur der Bereitstellung von ATP. Dazu zählen unter anderem die Calcium-Homöostase, der programmierte Zelltod, die Modulation des angeborenen Immunsystems und die Autophagie.^{92,93,94} Lange dachte man, die einzelnen Mitochondrien einer Zelle seien statische, voneinander isolierte Zellorganelle, jedoch konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Ganz im Gegenteil handelt es sich in der Tat um ein Netzwerk von enormer Plastizität. Gerade in dieser mitochondrialen Dynamik liegt eine weitere Besonderheit dieser komplexen Organellen. Durch Fission und Fusion sind sie in der Lage, sich stetig zu vereinigen und zu teilen.⁹⁵ Die Fusion zweier Mitochondrien wird dabei durch Enzyme aus der Familie der GTPasen vermittelt, dazu gehören Mitofusin 1 und 2 (MFN1, MFN2) und Optic Atrophy 1 (OPA1) (siehe Abbildung 11). Wie genau die mitochondriale Fusion durch diese Enzyme mediiert wird, ist nicht

vollständig geklärt, jedoch scheinen MFN1 und MFN2 für die Fusion der äußeren Mitochondrienmembranen verantwortlich zu sein, während OPA1 die Fusion der inneren Membranen induziert.⁹⁶ Diese Proteine unterliegen einigen Regulationsmechanismen, so kann beispielweise die Enzymaktivität von OPA1 durch SIRT3, einer mitochondrialen Deacetylase, erhöht werden.⁹⁷ Die Verschmelzung zweier Mitochondrien resultiert nicht nur in einer Änderung ihrer Morphologie, sondern hat auch für den mitochondrialen Metabolismus Konsequenzen, denn sie können so mtDNA, Proteine und andere Metaboliten untereinander austauschen. Bei der Teilung eines Mitochondriums in zwei Tochtermitochondrien, der Fission, spielt das GTPase dynamin-related protein 1 (DRP1) wohl die größte Rolle, wobei auch noch eine Reihe weiterer Proteine daran beteiligt zu sein scheint (Mitochondrial Fission Factor, Fission 1 protein und Mitochondrial dynamics protein 49 und 51) (siehe Abbildung 11).^{98,99} Die Mitochondrien stehen dabei stetig miteinander in Kommunikation und können so die Gesamtanzahl der Mitochondrien einer Zelle, deren Größe und Position innerhalb der Zelle an die herrschenden Anforderungen anpassen.¹⁰⁰ Gelangen mitochondriale Fusion und Fission aus dem Gleichgewicht, z.B. durch Akkumulation von Mutationen in den Genen der regulatorischen Proteine, resultiert dies in einem dysfunktionalen Zustand der Zelle. Übermäßige Fragmentation des mitochondrialen Netzwerks in viele, kleine Mitochondrien, tritt beispielsweise im Rahmen von erhöhtem Zellstress auf (siehe Abbildung 11).¹⁰¹

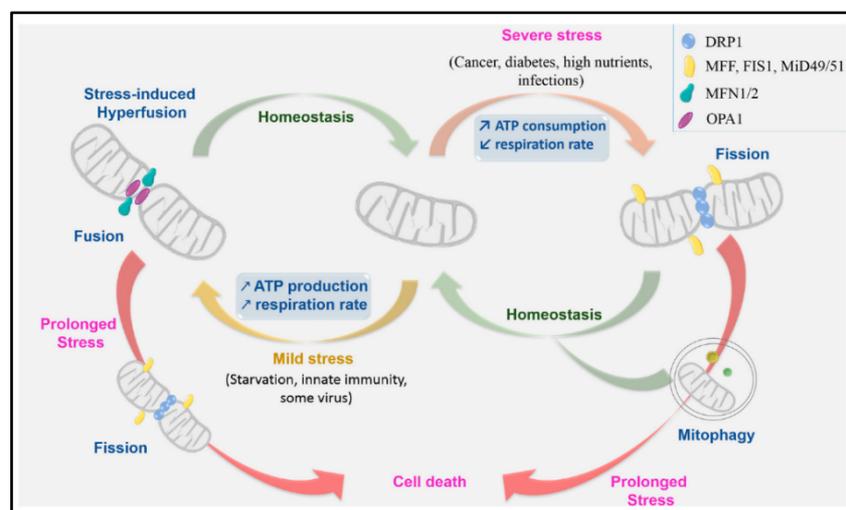


Abbildung 11: Mitochondriale Dynamik als Reaktion auf Zellstress. Wird die Zelle mit mildem Stress, wie im Rahmen von Nährstoffmangel, konfrontiert, fusionieren Mitochondrien bevorzugt miteinander, erhöhen die Produktion von ATP und entgehen so ihrer Elimination durch Mitophagie. Anders verhält es bei starkem Zellstress: hier kommt es vermehrt zur Fission. DRP1: Dynamin-Related Protein 1; MFF: Mitochondrial Fission Factor; FIS1: Fission 1; MiD49/51: Mitochondrial Dynamics 49/51; Mfn1/2: Mitofusin 1/2; OPA1: Optic Atrophy 1.

Aus: Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(2):564.

Eine gestörte mitochondriale Dynamik konnte bereits mit einer Vielzahl von Pathologien, darunter Typ II-Diabetes mellitus, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, in Verbindung gebracht werden.^{102,103,104}

Auch die Rolle von Mitochondrien in der Pathogenese von Atherosklerose wurde schon häufiger in Forschungsarbeiten thematisiert. Unter 1.2.4 wurde die endotheliale Dysfunktion als erste wahrnehmbare Veränderung beschrieben und ROS als mögliche Trigger identifiziert. In fortgeschrittenen Stadien tragen ROS durch Apoptoseinduktion endothelialer Zellen, proinflammatorische Wirkung und Aktivierung von MMP zur Destabilisierung der Läsion bei und führen entsprechend ihrem Namen auch zur vermehrter Bildung von oxLDL.¹⁰⁵ Da Mitochondrien der Hauptproduktionsort für ROS in der Zelle sind, haben sie einen direkten Einfluss auf die beschriebenen Prozesse und ihre Dysfunktionalität resultiert in einer atherogenen Wirkung. ROS werden von Mitochondrien verstärkt gebildet, wenn diese in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wobei diese mitochondriale Dysfunktion auch durch ROS ausgelöst werden kann, da Mitochondrien besonders sensibel auf ROS reagieren. Durch diese Art der Interaktion verstärken sich hohe Konzentrationen von ROS und dysfunktionale Mitochondrien gegenseitig und ein Circulus vitiosus entsteht.¹⁰⁶

1.4. Wege der zellulären Energiegewinnung

Der menschlichen Zelle stehen prinzipiell drei Gruppen von Substraten zur Energiegewinnung zur Verfügung: Fette, Kohlenhydrate und Proteine. Alle diese Substrate können zu Acetyl-CoA verstoffwechselt und damit in den Citratzyklus eingespeist werden. Dieser bildet damit das Drehkreuz des zellulären Energiestoffwechsels.

1.4.1. Glykolyse

Das Ziel der Glykolyse ist der Abbau von Glucose zu Pyruvat, wobei je zwei Moleküle ATP und NADH/H⁺ entstehen. Das gewonnene NADH/H⁺ kann wiederum genutzt werden, um über die Atmungskette ATP zu generieren. Der Abbau von Glucose erfordert zehn einzelne Reaktionsschritte, die im Zytosol stattfinden. Die einzelnen Reaktionen sind in tabellarischer Form im Folgenden aufgeführt.

Reaktionsgleichung der Glykolyse:



Drei der zehn an der Glykolyse beteiligten Enzyme werden als Schlüsselenzyme bezeichnet, wobei die PFK das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist. Die verbleibenden zwei Schlüsselenzyme sind die Hexokinase und die Pyruvatkinase. Alle diese Enzyme unterliegen Regulationsmechanismen: die Hexokinase kann allosterisch durch Glucose-6-Phosphat, die PFK durch ATP, fallenden pH-Wert sowie Citrat und die Pyruvatkinase durch ATP und Alanin gehemmt werden.¹⁰⁷ Die Hexokinase kann zusätzlich hormonell durch Glucagon und Insulin reguliert werden, wobei Insulin die Transkription der Hexokinase steigert und Glucagon ebendiese vermindert.¹⁰⁸ Fructose-1,6-Bisphosphat führt sowohl zu einer Aktivierung der PFK, als auch der Pyruvatkinase.

1. Phase der Glykolyse: Umwandlung von Glucose zu Fructose-1,6-Bisphosphat

Substrat	Katalysierendes Enzym	Produkt
Glucose	<u>Hexokinase</u>	Glucose-6-Phosphat
Glucose-6-Phosphat	Isomerase	Fructose-6-Phosphat
Fructose-6-Phosphat	<u>Phosphofruktokinase</u>	Fructose-1,6-Bisphosphat

2. Phase der Glykolyse: Spaltung von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP)

Substrat	Katalysierendes Enzym	Produkt
Fructose-1,6-Bisphosphat	Aldolase	GAP und Dihydroxyacetonphosphat (DAP)
DAP	Triosephosphat-Isomerase	GAP

3. Phase der Glykolyse: Umwandlung von GAP in Pyruvat

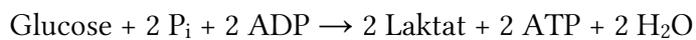
Substrat	Katalysierendes Enzym	Produkt
GAP	GAP-Dehydrogenase	1,3-Bisphosphoglycerat (BPG)
BPG	Phosphoglyceratkinase	3-Phosphoglycerat
3-Phosphoglycerat	Phosphoglyceratmutase	2-Phosphoglycerat
2-Phosphoglycerat	Enolase	Phosphoenolpyruvat (PEP) und H ₂ O
PEP	<u>Pyruvatkinase</u>	Pyruvat

Tabelle 1: Überblick über die einzelnen Schritte der Glykolyse. Schlüsselenzyme sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Ist die Glucose erst einmal zu Pyruvat umgesetzt, hat die Zelle zwei unterschiedliche Möglichkeiten, dieses Substrat weiter zu nutzen. Unter aeroben Bedingungen wird das Pyruvat bevorzugt in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA metabolisiert, welches anschließend für den Citratzyklus genutzt werden kann. Diese Reaktion ist irreversibel und wird durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex mit seinen fünf Ko-Faktoren Thiamin-Pyrophosphat, Liponsäure, Coenzym A, FAD und NAD⁺ katalysiert.¹⁰⁹

Der zweite Weg der Umsetzung von Pyruvat, die Reduktion zu Laktat im Zytosol, findet vor allem unter anaeroben Bedingungen statt, wobei NAD⁺ regeneriert werden kann.

Energiebilanz der anaeroben Glykolyse:



1.4.2. β -Oxidation

Als β -Oxidation bezeichnet man den Abbau von Fettsäuren mit dem Ziel der Energiegewinnung. Die β -Oxidation selbst findet in der Mitochondrienmatrix statt, wobei dem zwei Reaktionsschritte voraus gehen. Zunächst werden die Fettsäuren außerhalb des Mitochondriums durch die Acyl-CoA-Synthetase unter ATP-Verbrauch aktiviert. Anschließend wird das entstandene Acyl-CoA in das Innere der Mitochondrien transportiert, wofür Acyl-CoA vorübergehend in Carnitin umgeestert werden muss.¹¹⁰ Diese Reaktion ist geschwindigkeitsbestimmend für die β -Oxidation und wird durch die Carnitin-Palmityltransferase 1 katalysiert. In der mitochondrialen Matrix angelangt, wird das Acyl-CoA im Rahmen der β -Oxidation konsekutiv abgebaut, bis zwei Moleküle Acetyl-CoA übrigbleiben, die anschließend im Citratzyklus genutzt werden können. Da sich die zu verwertenden Fettsäuren in ihrer Kettenlänge stark unterscheiden, existieren von den an der β -Oxidation beteiligten Enzymen für die unterschiedlichen Kettenlängen spezifische Isoenzyme. Die einzelnen Reaktionsschritte der β -Oxidation werden in Tabelle 2 aufgeführt. Aus den Einzelreaktionen wird ersichtlich, dass es während der β -Oxidation auch zur Regeneration von FADH₂ und NADH/H⁺ kommt, wodurch die Energieausbeute der β -Oxidation stark ansteigt, sofern die Reduktionsäquivalente in der Atmungskette genutzt werden können.¹¹⁰

Substrat(e)	Katalysierendes Enzym	Produkt
Acyl-CoA, FAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Trans- Δ^2 -Enoyl-CoA, FADH ₂
Trans- Δ^2 -Enoyl-CoA	Enoyl-CoA-Hydratase	β -Hydroxyacyl-CoA
β -Hydroxyacyl-CoA, NAD	β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	3-Ketoacyl-CoA, NADH/H ⁺
3-Ketoacyl-CoA, Acyl-CoA	Ketothiolase	Acetyl-CoA, Acyl-CoA

Tabelle 2: Reaktionsschritte der β -Oxidation.

1.4.3. Citratzyklus

Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA in der mitochondrialen Matrix zu zwei CO₂-Molekülen und acht Wasserstoffatomen (H⁺) abgebaut, wobei in einigen Reaktionsschritten die Reduktionsäquivalente FADH₂ und NADH/H⁺ entstehen (siehe Abbildung 12).¹¹¹ Durch die Metabolisierung von einem Molekül Acetyl-CoA können so ein Molekül FADH₂ und drei Moleküle NADH/H⁺ gewonnen werden. Da aus einem Molekül Glucose zwei Acetyl-CoA-Moleküle gebildet werden, ist die Bilanz pro Glucose Molekül doppelt so hoch, also zwei FADH₂ und sechs NADH/H⁺. Die katalysierenden Enzyme für die Bildung der Reduktionsäquivalente sind Dehydrogenasen, namentlich die Isocitratdehydrogenase (IDH), die α -Ketoglutaratdehydrogenase, die Succinatdehydrogenase, sowie die Malatdehydrogenase. Der Citratzyklus hat im Gegensatz zu vielen anderen Stoffwechselwegen kein Schlüsselenzym, über das die vollständige Reaktion reguliert werden kann. Daher erfolgt die Regulation des Citratzyklus über die einzelnen Reaktionsschritte, wobei viele der beteiligten Enzyme über ihre Produkte gehemmt und über ihre Substrate aktiviert werden.¹¹² Die IDH wird außerdem durch ATP gehemmt und durch ADP und Calcium aktiviert. Eine hormonelle Beeinflussung des Citratzyklus ist nicht bekannt.

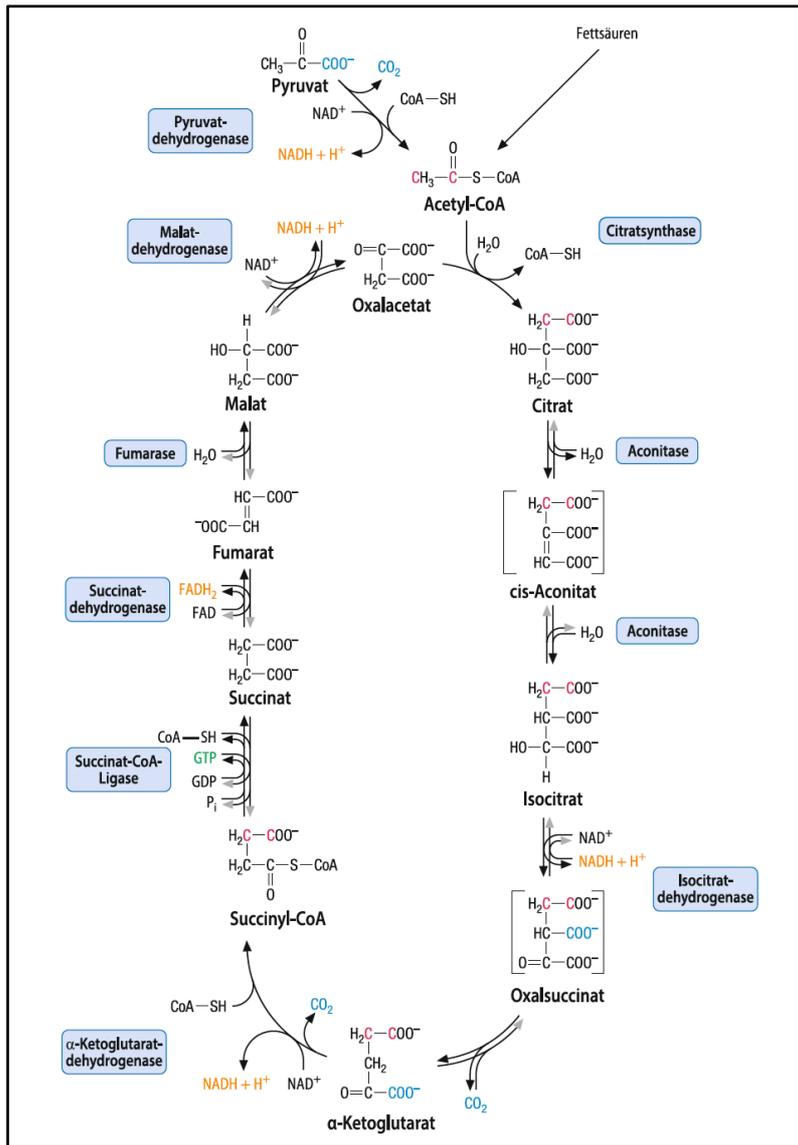


Abbildung 12: Darstellung der Einzelreaktionen des Citratzyklus inkl. ihrer katalysierenden Enzyme.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Der Citratzyklus – Abbau von Acetyl-CoA zu CO₂ und H₂O. Löffler G, Müller M, 2019.

1.4.4. Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung findet an der inneren Mitochondrienmembran statt, wodurch sie räumlich sehr eng mit dem Citratzyklus verbunden ist. An der Atmungskette sind vier große Enzymkomplexe beteiligt, welche durch die Oxidation von den aus dem Citratzyklus gewonnenen Reduktionäquivalenten FADH_2 und NADH/H^+ in der Lage sind, ATP zu synthetisieren (siehe Abbildung 13).¹¹³ Die freiwerdenden Elektronen werden dabei in Form einer Elektronentransportkette entlang der vier, beziehungsweise im Falle von FADH_2 drei Komplexe der Atmungskette transportiert und schließlich auf Sauerstoff übertragen, sodass Wasser entsteht.¹¹³ Da Sauerstoff notwendig ist, um den Elektronenfluss aufrecht zu erhalten, kann die Atmungskette nur unter aeroben Bedingungen stattfinden. Die im Rahmen des Elektronentransportes freiwerdende Energie wird genutzt um einen Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Da NADH/H^+ durch Komplex I in die Atmungskette eintritt, FADH_2 aber erst durch Komplex II, können durch NADH/H^+ mehr Protonen in den Intermembranraum transportiert werden.¹¹⁴ Diese Protonen werden anschließend durch die ATP-Synthase wieder entlang ihres Gradienten zurück in den Matrixraum transportiert und die dabei freigesetzte Energie zur Synthese von ATP genutzt. Dabei reicht die Energie von etwa drei transportierten Protonen zur Phosphorylierung von einem Molekül ADP zu ATP.¹¹⁵

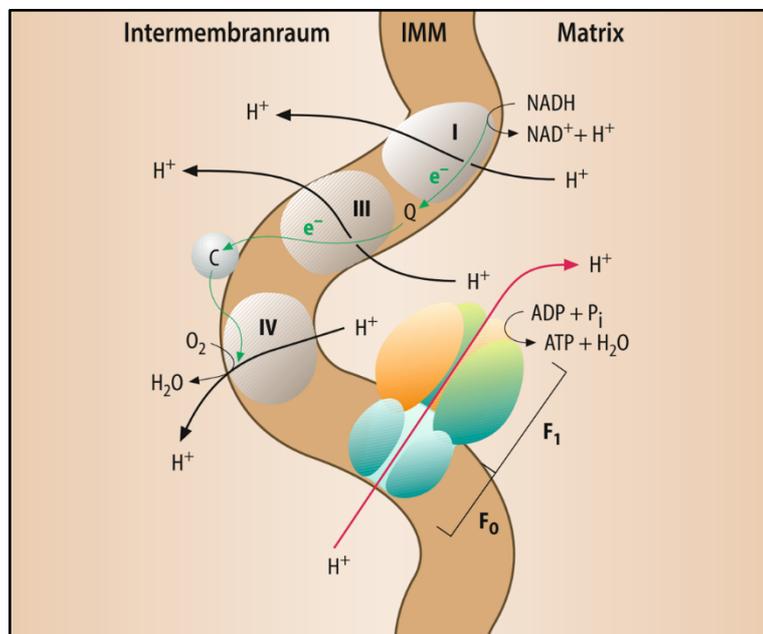


Abbildung 13: Darstellung der Elektronentransportkette und des Protonenflusses in der Atmungskette. Schließlich wird der Protonengradient durch die ATP-Synthase genutzt, um ATP aus ADP und Phosphat zu synthetisieren. IMM= Intermembranraum.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Mitochondrien – Organelle der ATP-Gewinnung. Brandt U 2019.

Während der Atmungskette kann es zur Bildung von Superoxidanionen (O_2^-) kommen, die eine zelltoxische Wirkung zeigen. Um diesen schädigenden Einfluss zu verhindern, steht der Zelle ein Schutzmechanismus in Form von Superoxiddismutase und Katalase zur Verfügung. Die Superoxiddismutase setzt zwei O_2^- mit zwei H^+ zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um, welches wiederum durch die Katalase in Sauerstoff und Wasser gespalten und somit unschädlich für die Zelle gemacht wird. Die Regulation der Atmungskette erfolgt hauptsächlich über die Verfügbarkeit der Substrate ADP und Phosphat, was auch als Atmungskontrolle bezeichnet wird.¹¹⁶

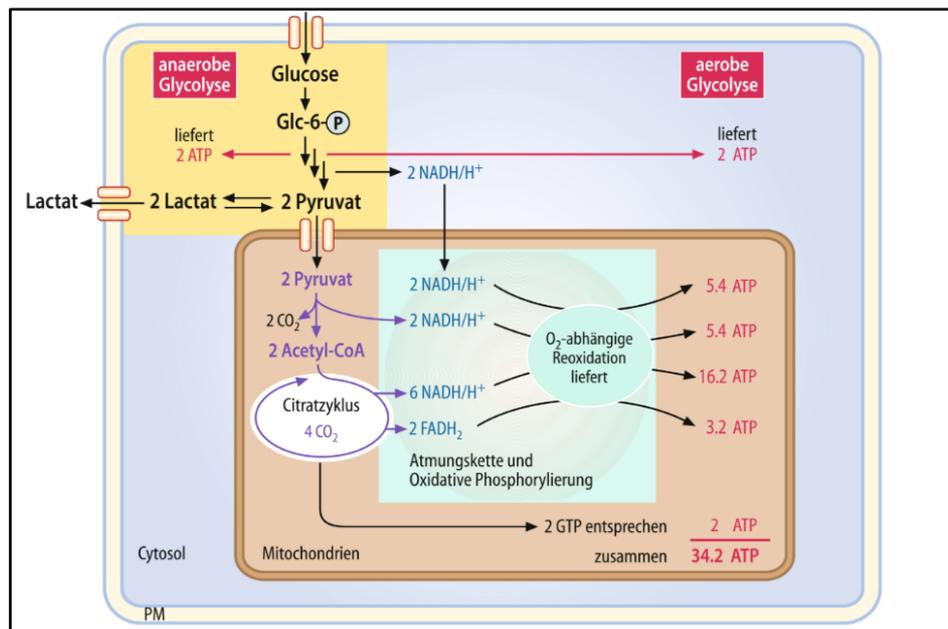


Abbildung 14: Überblick über die Metabolisierung von Glucose in Form von aerober und anaerober Glykolyse mit anschließender Verstoffwechslung von Pyruvat über Acetyl-CoA im Citratzyklus. Die deutlichen Unterschiede in der Energiebilanz werden deutlich.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Glucose – Schlüssel­molekül des Kohlenhydratstoffwechsels. Löffler G, Müller M, 2019.

1.5. Warburg Effekt

Der Warburg Effekt ist der Wissenschaft nun seit fast 100 Jahren bekannt und wurde erstmals im Jahre 1925 von Otto Warburg beschrieben. Entgegen seinen Erwartungen konnte er zeigen, dass Tumorzellen, im Vergleich zu gesundem Gewebe, zum einen über eine gesteigerte glykolytische Aktivität verfügen und zum anderen das gewonnene Pyruvat in größerem Maße zu Laktat umsetzen, als es für die oxidative Phosphorylierung zu nutzen. Die von ihm untersuchten Zellen, taten dies zudem unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit.⁵ Die Unterschiede in der Nutzung der beiden Stoffwechselwege am gesamten Energiegewinn zwischen gesundem und entartetem, proliferierendem Gewebe sind dramatisch: in einer Studie von Karl Brand stellte man die Wege der

ATP-Gewinnung von ruhenden und proliferierenden Thymozyten gegenüber. Wurden in den ruhenden Zellen 88 % des ATP über oxidative Phosphorylierung und nur 12 % durch Glykolyse gewonnen, so waren es in den proliferierenden Zellen 86 % durch Glykolyse und nur 14 % durch oxidative Phosphorylierung.¹¹⁷

Die positiven Effekte dieser metabolischen Veränderungen auf das Wachstum und die Proliferation von Tumorzellen war in den letzten Jahren vielfacher Gegenstand von Forschungsarbeiten, wobei eine große Zahl an möglichen Auswirkungen diskutiert wurden. Ein Vorteil der Energiegewinnung über Laktat, könnte die zeitliche Überlegenheit gegenüber der oxidativen Phosphorylierung sein. Zwar hat die oxidative Phosphorylierung pro Glukose-Molekül eine höhere ATP Bilanz, jedoch läuft sie deutlich langsamer ab, sodass in derselben Zeit weniger ATP bereitgestellt werden kann.¹¹⁸ Auch ist die Energiebilanz der Stoffwechselwege bei komplexen Organismen eher von geringer Bedeutung, da über einen funktionierenden Kreislauf eine konstante Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Glukose gewährleistet wird, sodass diese nicht zum limitierenden Faktor wird.¹¹⁹ Ein weiterer Erklärungsansatz sieht die Vorteile der gesteigerten Glykolyse weniger in der Generation von ATP, sondern in der Bereitstellung anderer Substrate, wie NAD⁺ und Kohlenstoff, die entscheidend für das Wachstum und die Proliferation von Zellen sind. Weitere diskutierte Effekte, die sich positiv auf die Wachstumsbedingungen von Tumoren auswirken, sind Immunmodulation und erleichterte Tumorumgebung durch das ausgeschiedene Laktat und Verminderung des oxidativen Zellstress durch geringere Produktion von ROS, die zu einem großen Teil bei der oxidativen Phosphorylierung anfallen.^{120,121,122}

Nicht nur über den Nutzen des Warburg Effektes gibt es verschiedene Theorien, sondern auch darüber, wie er induziert wird. Maßgeblich daran beteiligt scheint der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) zu sein.¹²³ Da im Rahmen des schnellen Wachstums von Tumorgewebe die Sauerstoffversorgung durch eine erhöhte Diffusionsstrecke reduziert ist, kommt es unter diesen hypoxischen Bedingungen zur Induktion von HIF-1 und damit zur Transkription seiner Zielgene, darunter verschiedene Glucose-Transporter, der Laktatdehydrogenase A (LDHA), der Phosphofruktokinase L (PFKL) und Pyruvatkinase M.¹²⁴ Hierbei handelt es sich um entscheidende Enzyme und Transporter des Glukosestoffwechsels, wodurch eine erhöhte Transkription dieser Gene auch eine gesteigerte glykolytische Aktivität der Zelle erklären würde. Die Steigerung der aeroben Glykolyse scheint nicht nur den Progress von Tumorerkrankungen voran zu treiben, sondern auch bei einer Vielzahl nicht-maligner Erkrankungen, unter anderem bei der Atherosklerose, eine entscheidende Rolle zu spielen.¹²⁵ Im Tiermodell konnte bereits eine gesteigerte GLUT-1-vermittelte Glucose-Aufnahme und eine erhöhte Verwendung von Glucose für

die Produktion von Laktat durch neointimale glatte Gefäßmuskelzellen gezeigt werden.¹²⁶ Diese Veränderungen gingen zudem mit einer Beeinträchtigung der Gefäßkontraktilität und mit einer Hypertrophie der Media einher.¹²⁷ Erklären lassen sich diese metabolischen Alterationen einerseits durch Sekretion von PDGF im Rahmen von Gefäßwandverletzungen und im Verlauf, wie im Tumorgewebe, durch die Induktion von HIF-1.^{128,129}

1.6. Enzyme der Glykolyse

1.6.1. PFKFB3

Die regulatorischen PFKFB (Phosphfructokinasen/Fructosebisphosphatasen) dienen der Phosphorylierung beziehungsweise Dephosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat, welches wiederum zur Aktivierung der PFK-1, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Glykolyse führt. Aus der Familie der PFKFB sind vier Isoenzyme bekannt (PFKFB 1-4), wobei die PFKB3 das höchste Verhältnis von Kinase- zu Phosphataseaktivität aus dieser Enzymfamilie aufweist.¹³⁰

Die Expression der PFKB3 wird u.a. durch Hypoxie induziert, indem HIF-1 α an das hypoxia response Element in der Promotorregion bindet.¹³¹ Demzufolge überrascht es nicht, dass PFKB3 vermehrt in stark proliferierenden Zellen und Tumorgeweben exprimiert wird.¹³²

Erst vor einigen Jahren kam man zu der Erkenntnis, dass die PFK nicht nur ein Schlüsselenzym der Glykolyse ist, sondern auch im Zellkern präsent ist und dort Einflüsse auf den Zellzyklus nimmt.¹³³ Das im Nukleus produzierte Fructose-2,6-Bisphosphat scheint eine antiapoptotische Wirkung zu haben, indem eine vermehrte Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens p27 durch die Cyclin-dependent Kinase (CDK) erfolgt.¹³⁴ Nachdem p27 phosphoryliert wurde, kommt es zu einer gesteigerten Degradation im Proteasom und die Apoptoseinduktion am G1-Checkpoint wird gehemmt.¹³⁴

Diesen Mechanismen entsprechend kann die PFKB3 je nach Lokalisation in der Zelle verschiedene Einflüsse auf den Metabolismus haben: im Nukleus führt sie zu einer Steigerung der CDK-1-Aktivität, ohne dabei die Glykolyse zu beeinflussen und im Zytosol induziert sie über die Aktivierung der PFK-1 eine Steigerung der glykolytischen Aktivität.

Die Aktivität der PFKFB kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Beispielsweise wird die PFKFB von Endothelzellen in Anwesenheit angiogenetischer Stimuli wie VEGF stark überexprimiert, wodurch diese ihre glykolytische Aktivität nahezu verdoppeln können.¹³⁵ Da VEGF auch im Rahmen von Atherosklerose sezerniert wird, wäre auch hier eine vermehrte Expression der PFKFB zu erwarten. Inwiefern nicht nur Endothelzellen, sondern auch

glatte Gefäßmuskelzellen in der Lage sind eine Hochregulation der PFKB3-Expression zu vollziehen, wird in dieser Arbeit untersucht.

1.6.2. LDHA

Die LDHA ist ein tetrameres Enzym und gehört zu einer Familie aus fünf Isoenzymen. Ihre Rolle als entscheidendes Enzym der anaeroben Glykolyse, wird der LDHA durch die Katalyse der Reduktion von Pyruvat zu Laktat am Ende der Glykolyse zuteil. Zusätzlich zur Laktatsynthese, führt diese Reaktion zur Generierung von NAD⁺, welches für die Metabolisierung weiterer Glukosemoleküle erforderlich ist (siehe Abbildung 15).

Diese Form der Energiegewinnung wird vor allem von Skelettmuskelfasern in Belastungssituationen genutzt, jedoch wurde auch in vielen verschiedenen Tumoren eine erhöhte Konzentration der LDHA im Rahmen des Warburg-Effektes nachgewiesen.¹³⁶ Wird die LDHA in neoplastischem Gewebe inhibiert, so kann der weitere Progress verzögert werden, was die Bedeutung der LDHA im Tumorstoffwechsel unterstreicht.¹³⁷ Die Transkription der LDHA kann durch c-MYC und durch HIF-1 α induziert werden, wodurch die reduzierte Energiegewinnung über oxidative Phosphorylierung unter hypoxischen Bedingungen kompensiert werden kann.¹³⁸ Auch in atherosklerotischen Läsionen sind hypoxische Bedingungen durch verlängerte Diffusionsstrecken keine Seltenheit, daher konnte in einem Rattenmodell nach Ballon-Angioplastie der A. carotis, beziehungsweise nach Stimulation durch PDGF eine erhöhte Expression der LDHA nachgewiesen werden.¹³⁹ In besagter Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen nach PDGF-Stimulus bei Knock-out der LDHA signifikant reduziert war.¹³⁹ Diese Beobachtungen implizieren, dass glatte Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose in gewisser Weise abhängig von einer Hochregulation der aeroben Glykolyse sind, wodurch dies ein potentieller Interventionspunkt ist, um das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen zu verhindern.

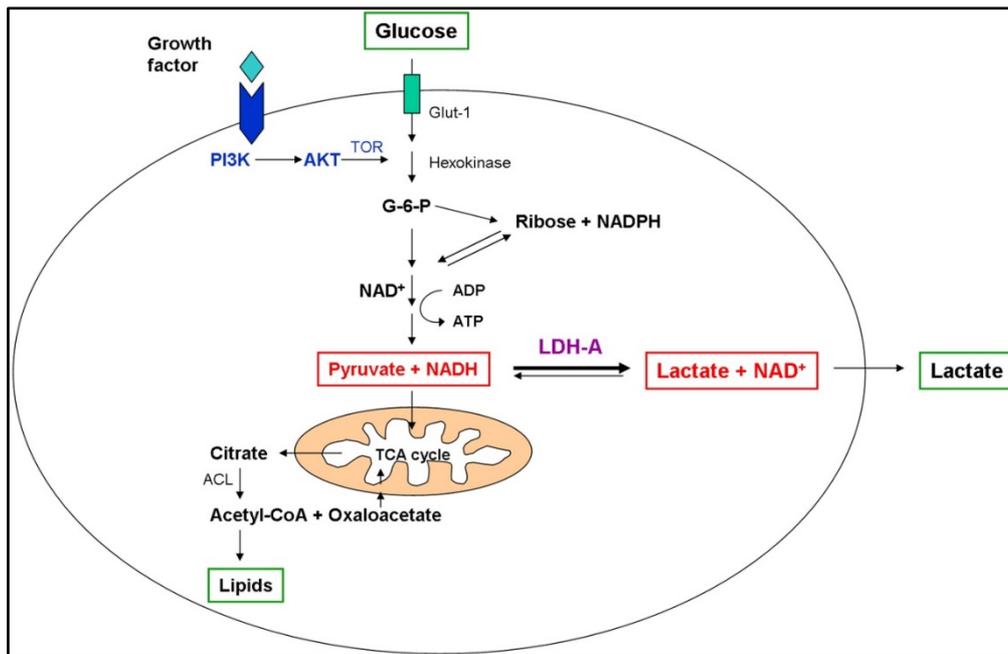


Abbildung 15: Rolle der LDHA in der Glykolyse: Katalyse der Reduktion von Pyruvat mit Hilfe von NADH zu Laktat und NAD^+ .

Reprinted from Cancer Cell, Vol 9 / Issue 6, Bui T and Thompson C B, Cancer's sweet tooth, Pages 419-420, Copyright (2006), with permission from Elsevier.

1.7. Mitochondriale Enzyme

Die Mitochondrien sind, wie unter 1.3 erläutert, ein wichtiges Zentrum des zellulären Stoffwechsels. Nicht nur entscheidende Abläufe des katabolen Stoffwechsels, wie β -Oxidation der Fettsäuren, Citratzyklus und Atmungskette finden in den Mitochondrien statt, sondern auch Schritte der Harnstoff-, Steroidhormon- und Häm-Biosynthese.¹⁴⁰ Da der zelluläre Energiestoffwechsel für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist, wurden für β -Oxidation, Citratzyklus und Atmungskette repräsentative Enzyme zur Beurteilung dieser Stoffwechselwege ausgewählt. Diese drei Enzyme werden in diesem Kapitel genauer beschrieben.

1.7.1. IDH2

Die IDH2 ist ein mitochondriales, homodimeres Enzym und katalysiert im Citratzyklus die reversible, oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat, wobei NADPH entsteht (siehe Abbildung 12). Die Produktion von NADPH in diesem Reaktionsschritt spielt eine entscheidende Rolle im Umgang der Zelle mit oxidativem Stress, da viele Enzyme des antioxidativen Schutzsystems NADPH-abhängig sind.¹⁴¹ Unter hypoxischen Bedingungen ist die IDH2 außerdem in der Lage die entgegengesetzte Reaktion, also die reduktive Carboxylierung von

α -Ketoglutarat zu Isocitrat, zu katalysieren.¹⁴² Dies geschieht im Rahmen von HIF1-induzierter metabolischer Reprogrammierung und konnte in Krebszellen in erhöhtem Maße beobachtet werden.¹⁴³ Während unter physiologischen Bedingungen das vom Mitochondrium benötigte Citrat über Acetyl-CoA aus der Glykolyse gewonnen wird, kann unter hypoxischen Bedingungen auch Glutamin zur Synthese von Citrat genutzt werden. Diese Umstellung des Metabolismus scheint Zellen in die Lage zu versetzen, auch unter hypoxischen Bedingungen noch proliferieren zu können.¹⁴⁴ Ob die vermehrte reduktive Aktivität der IDH2 unter hypoxischen Bedingungen auch mit einer veränderten Expression einher geht ist allerdings noch nicht geklärt. Hinzukommend hat die IDH2-Aktivität einen regulatorischen Einfluss auf die mitochondriale Dynamik. Demnach konnte in einer Forschungsarbeit durch IDH2-Knockout in einer Zellkultur muriner Endothelzellen eine signifikant verringerte Expression von Mfn-1 und Drp-1, jedoch eine erhöhte Expression von OPA-1 beobachtet werden.¹⁴¹ Diese Studie konnte außerdem zeigen, dass eine verringerte Konzentration der IDH2 die Funktion der NOS in Endothelzellen beeinträchtigt und damit mit einer gestörten Vasomotorik durch verminderte Produktion von NO einhergeht (siehe Abbildung 16). Weiterhin sind durch die erhöhte Produktion von ROS bei IDH2-Mangel verringerte Expression beziehungsweise Aktivität der Komplexe 1,3 und 4 der Atmungskette zu beobachten. COX IV

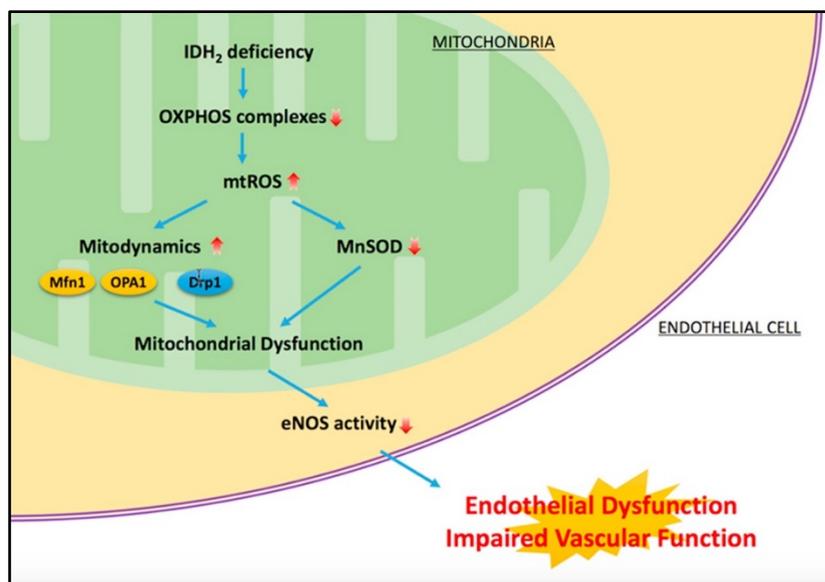


Abbildung 16: Auswirkungen von verringerter IDH2-Konzentration auf Endothelzellen: es kommt zur verminderten Expression von Komplexen der oxidativen Phosphorylierung, gestörte mitochondriale Dynamik und verringerter Aktivität der NOS.

Reprinted from Free Radical Biology and Medicine, Vol 94, Park JB, Nagar H, Choi S, Jung S, Kim HW, Kwang Kang S, Wan Lee J, Hyup Lee J, Park JW, Irani K, Jeon BH, Song HJ, Kim CS, IDH2 deficiency impairs mitochondrial function in endothelial cells and endothelium-dependent vasomotor function, Pages 36-46, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

1.7.2. COX IV

Die COX IV ist eine von 13 Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase (COX), einem Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette. Die Cytochrom-C-Oxidase wird auch als Komplex 4 bezeichnet, da sie den vierten und damit letzten Schritt der Atmungskette katalysiert und ist für den Elektronentransfer von Ferro-Cytochrom auf molekularen Sauerstoff verantwortlich.¹⁴⁵ Durch diese Reaktion entsteht ein Protonengradient entlang der Mitochondrienmembran, was entscheidend für die mitochondriale Synthese von ATP ist.¹⁴⁶ Ein Teil der Untereinheiten von Komplex 4 wird von der mitochondrialen DNA selbst codiert, wobei die COX IV auf dem nukleären Genom lokalisiert ist. Die Aktivität der COX wird über das Gleichgewicht von ATP zu ADP und durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen, unter anderem Cardiolipin reguliert.^{147,148} An dieser Regulation ist auch die COX IV beteiligt: kommt es zu Bindung von ATP statt ADP an die COX IV, induziert dies eine allosterische Hemmung der COX.¹⁴⁹

1.7.3. ACADM

Die mittlere-Ketten-spezifische Acyl-Coenzym A-Dehydrogenase (ACADM) katalysiert den ersten Schritt der mitochondrialen β -Oxidation von Fettsäuren. Dabei werden speziell mittelkettige Acyl-Ketten mit vier bis zwölf Kohlenstoffatomen mit Hilfe von FAD oxidiert, wodurch FADH₂ und trans-Enoyl-CoA entstehen.¹⁵⁰

Interessanterweise kann die Expression der ACADM in Makrophagen durch IL-4, einen Entzündungsmediator, stimuliert werden.¹⁵¹ Diese Reaktion könnte ebenso auch durch inflammatorische Stimuli im Rahmen von Atherosklerose initiiert werden. Ein Mangel an, beziehungsweise ein Defekt der ACADM hingegen resultiert in der Akkumulation von Intermediärprodukten des Fettsäurestoffwechsels, welche die oxidative Energiegewinnung in den Mitochondrien hemmen und gleichzeitig den oxidativen Stress, dem die Zelle ausgesetzt ist erhöhen.¹⁵² Die Repression der oxidativen Phosphorylierung kommt vermutlich durch eine Assoziation der ACADM mit dem OXPHOS Superkomplex, welcher die Komplexe I, III und IV der Atmungskette umfasst, zustande.¹⁵³

1.8. Sirtuine

Als Sirtuine bezeichnet man eine Reihe hochkonservierter Proteine menschlicher Zellen, wobei sieben Isoformen bekannt sind (SIRT1-SIRT7). Es handelt sich dabei um NAD⁺ abhängige Histondeacetylasen, die der Regulation wichtiger metabolischer Prozesse dienen und die im Rahmen von fallenden zellulären Energiespeichern aktiviert werden.¹⁵⁴ Kommt es zur

Deacetylierung von Histonen, so erhöht sich deren Affinität gegenüber der DNA, sodass die Transkription der gebundenen DNA-Abschnitte auf ein niedrigeres Niveau reguliert wird. Die Erforderlichkeit von NAD⁺ für die meisten ihrer enzymatischen Funktionen macht sie von einer kontinuierlichen, ausreichenden NAD⁺-Verfügbarkeit und damit von einem einwandfreien metabolischen Zustand der Zelle abhängig. Die Sirtuine 3, 4 und 5 sind in den Mitochondrien lokalisiert.¹⁵⁵

SIRT3 ist dabei vor allem dafür zuständig die Produktion von ROS in den Mitochondrien zu inhibieren, indem die Superoxiddismutase 2 aktiviert wird, reguliert aber ebenfalls eine Vielzahl mitochondrialer Proteine, darunter auch die IDH2.^{156,157}

Im Gegensatz zu allen anderen Proteinen der SIRT-Familie zeigt SIRT4 keine Deacetylase-Aktivität, sondern fungiert als ADP-Ribosyltransferase, wodurch SIRT4 eine Bedeutung bei der Zellzyklusregulation zukommt.

Die Sirtuine 1,3 und 6 stehen im Verdacht, eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose zu spielen. SIRT 1 wird in hohem Maße durch Endothelzellen exprimiert. Kommt es hier zu einer Minderverfügbarkeit steigen, zumindest in der Zellkultur, inflammatorische Aktivitäten, oxidativer Stress und Schaumzellbildung.¹⁵⁸ Die Rolle von SIRT3 bei der Atherogenese ist weniger genau erforscht, es wird jedoch eine Beeinflussung der Plaquekalzifizierung in Betracht gezogen.¹⁵⁹ Auch in Bezug auf SIRT6 sind die Interaktionsmechanismen bisher nicht bekannt, jedoch wurde sowohl in atherosklerotischen Plaques von Mäusen, als auch von Menschen eine verminderte Expression beobachtet.^{160,161} Möglicherweise vermindert SIRT6 die Entzündungsreaktion, sowie die endotheliale Dysfunktion.¹⁶² In einigen Zelllinien, unter anderem in glatten Gefäßmuskelzellen, ist SIRT6 zudem in der Lage über epigenetische Mechanismen direkt in den Metabolismus einzugreifen. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von SIRT6 zu einer vermehrten Expression glykolytischer Enzyme, wie der LDH und PFK führt.¹⁶³ Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine Repression des Transkriptionsfaktors HIF1 α vermutet.¹⁶³ Die Zielgene von HIF1 α wurden bereits in Kapitel 1.5 erläutert. Insgesamt stellen Sirtuine, durch vielfältige Bedeutungen in der Athereogenese, vielversprechende Zielmoleküle für neue Therapieansätze der Atherosklerose dar.

1.9. Zielsetzung

Trotz weitentwickelter Therapieformen der Atherosklerose und Ihrer Risikofaktoren, bleiben ihre Folgen die häufigste Todesursache in den Industrienationen.^{1,2} Daher ist es von hoher Bedeutung, die Pathophysiologie der Erkrankung noch weitreichender zu untersuchen und zu verstehen, um neue therapeutische Angriffspunkte, beziehungsweise neue Präventionsstrategien entwickeln zu können.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, die Übertragbarkeit der bisher in Proteomics und Mausmodell beobachteten Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener metabolischer Surrogatmarker als Reaktion auf atherogene Stimuli durch humane glatte Gefäßmuskelzellen zu untersuchen, um eine Einschätzung über deren klinische Relevanz treffen zu können. Konkret werden auf Proteinebene die Expressionsmuster der PFKFB, LDHA, ACADM, IDH2 und COX IV untersucht.

Um festzustellen, inwiefern sich zu den veränderten Expressionsmustern auch ein ultrastrukturelles Korrelat auf Ebene der Mitochondrien findet, erfolgen zusätzlich elektronenmikroskopische Analysen der Mitochondrien, bei denen deren Zahl und Größe untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es für humane Koronarien ein verlässliches Verfahrensprotokoll für die elektronenmikroskopische Untersuchung von humanen Koronararterien zu erstellen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

2. Materialien

2.1. Chemikalien und Zusätze

Reagenzien	Hersteller
ABC-Kit (VECTASTAIN)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Ziegenserum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Citrat Monohydrat	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Dako Pen	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
DPBS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
EDTA-K-Salz	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glutaraldehyd	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hämatoxylin Harris	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
HCl	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Isopentan	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
Kaliumhydroxid-Plätzchen	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Movat Pentachrom nach Verhöff Färbekit	MORPHISTO GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Neo-Clear	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
NeoMount	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Paraffin	Richard Allan Scientific (Kalamazoo, USA)
ROTI®Histofix 4%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tissue-Tek	Sakura Finetek (Staufen, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Ferack (Berlin, Deutschland)
Vector Red Substrate Kit, Alkaline Phosphatase	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.2. Puffer und Zusätze

Phosphat buffered saline (PBS)

Reagenzien	Menge
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
HCl	Titrieren auf pH 7.4

10mM Citrat-Puffer zum Antigenretrieval (pH 6.0)

Reagenzien	Menge
Citrat Monohydrat	2,1g
NaOH	Titrieren auf pH 6.0

Mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen.

0,27M EDTA-Entkalkungs-Lösung (pH 7.4)

Reagenzien	Menge
EDTA-Kalium-Salz	109 g
KOH	Titrieren auf pH 7.4

Mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen.

Vector Red Tris Puffer

Reagenzien	Menge
Tris	100mM
HCl	Titrieren auf pH 8.2-8.4

2.3. Antikörper

Antikörper gegen	Isotyp	Hersteller	Produktkennung	Verwendete Konzentration
PFK-B	Kaninchen, monoklonal	Abcam (Cambridge, GB)	[EPR12594] (ab181861)	1:50
LDHA	Kaninchen, monoklonal	Abcam (Cambridge, GB)	[EPR1564] (ab101562),	1:250
α -SMA	Maus, monoklonal	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)	AB_2574461	1:100
COX IV	Kaninchen, polyklonal	Abcam (Cambridge, GB)	(ab16056)	1:100
IDH2	Kaninchen, polyklonal	Abcam (Cambridge, GB)	[EPR7577] (ab131263),	1:150
ACADM	Kaninchen, monoklonal	Abcam(Cambridge, GB)	[EPR3708] (ab92461)	1:100
Kaninchen IgG	Schaf, biotinyliert	Vector Laboratories (Burlingame, USA)	B1000	1:200

2.4. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Einbettkassetten	Medite (Burgdorf, Deutschland)
Deckgläser	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen 1000 μ l	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 200 μ l	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnberg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 μ l	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Mikroreaktionsgefäße 5ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml, 1ml, 1,5ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürnberg, Deutschland)

S35 Mikrotomklingen	Feather (Osaka, Japan)
Reaktionsgefäße 50ml, 15ml	Falcon
Superfrost-Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tissue Tek Kryomold	Sakura Finetek (Staufen, Deutschland)
Objektträger adhesive surface	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, Deutschland)
Vasco Nitril Handschuhe	B. Braun (Melsungen, Deutschland)

2.5. Geräte

Geräte	Hersteller
Abzugbank	Molecular Devices/Köttermann
Brutschrank	Heraeus Instruments, Memmert
Shandon Citadel 1000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Elektronenmikroskop LEO TM 912	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Einbettautomat Microm EC 350-1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
BZ 9000 (Biorevo) Fluoreszenzmikroskop	Keyence (Osaka, Japan)
Kühlplatte Microm EC 350-2	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlplatte MR 3002	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Lichtmikroskop HM LUX3	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotom HM 325	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
pH-Meter WTW pH 330i	WTW Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG (Weilheim, Deutschland)
Pipetten 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rührplatte Leica 1130	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Schwenkplatte Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)
Sterilbank Holten LaminAir	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)

Tischzentrifuge Sprout	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Schüttelapparat Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage Practum BP610	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Wärmebecken	Störk Tronik (Stuttgart, Deutschland)

2.6. Software

Name des Programms	Anwendungsbereich
ImageJ 2018	Analyse der elektronenmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen
Microsoft PowerPoint 2019	Erstellen von Grafiken und Diagrammen
Microsoft Excel 2019	Dokumentation der Messwerte, statistische Analyse
Microsoft Word 2019	Verfassen von Texten

3. Methoden

3.1. Herkunft der humanen Gefäßproben

Alle verwendeten Proben wurden im Rahmen von Herztransplantationen im Deutschen Herzzentrum Berlin im Zeitraum von Juli 2015 bis Januar 2019 gewonnen (n=30). In der Zeitspanne von Juli 2015 bis Oktober 2017 wurden die Proben von meinem Vorgänger, Herrn Malte Pietron, gewonnen, in der restlichen Zeit von Oktober 2017 bis Januar 2019 erfolgten sämtliche Probenentnahmen durch die Autorin dieser Dissertation. Es wurden ausschließlich Proben aus Gefäßabschnitten entnommen, die im Rahmen der Operation entfernt wurden. Sowohl Teile der Aorta ascendens, als auch Koronararterien wurden extrahiert, wobei in dieser Arbeit letztendlich nur eine Analyse der Koronarien erfolgte. In Tabelle 3 ist dargestellt, welche Koronargefäße in Fall- und Kontrollgruppe eingeschlossen wurden. Alle eingeschlossenen Patienten haben der Verwendung von während der Operation entnommenem Gewebe für wissenschaftliche Zwecke schriftlich zugestimmt. Das Projekt wurde der Ethikkommission der Charité vorgelegt und durch das Ethik-Votum Nummer EA2/043/14 genehmigt.

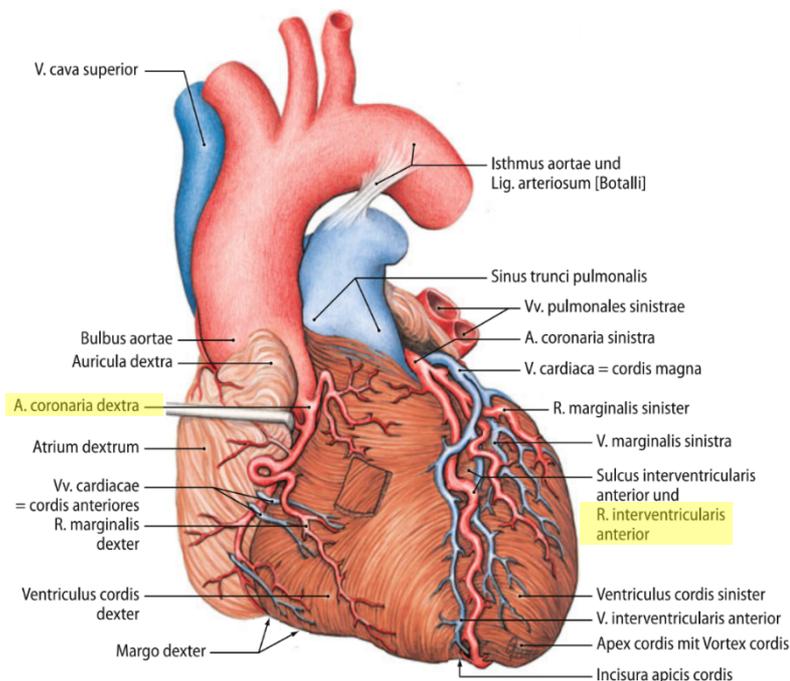


Abbildung 17: Darstellung der Vorderseite des menschlichen Herzens. Die entnommenen Gefäße (RIVA und Ateria coronaria dextra) sind gelb markiert.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Organe des Blutkreislaufs. Hildebrand R, 2010.

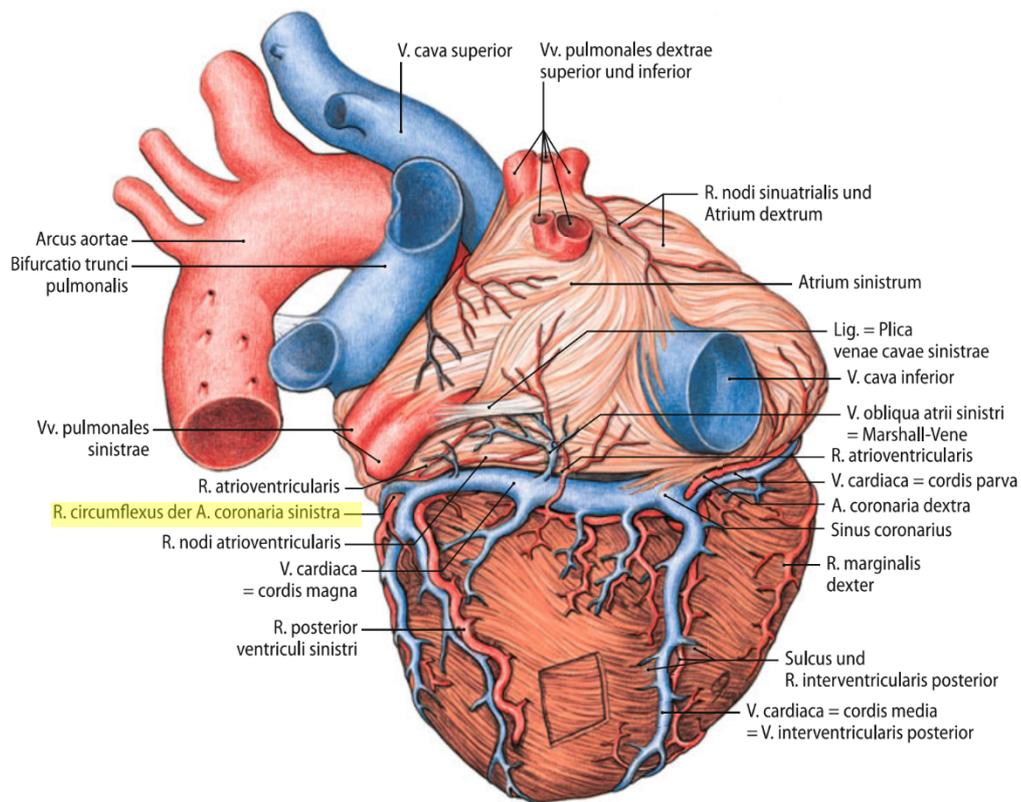


Abbildung 18: Darstellung der Rückseite des menschlichen Herzens. Die entnommenen Gefäße (RCX) sind gelb markiert.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Organe des Blutkreislaufs. Hildebrand R, 2010.

	Fallgruppe (n=15)	Kontrollgruppe (n=15)
RIVA	6	8
RCX	5	5
RCA	4	2

Tabelle 3: Verteilung der verschiedenen Koronararterien innerhalb von Fall- und Kontrollgruppe. In beiden Gruppen stammen die meisten Proben aus dem RIVA. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, stammen in der Fallgruppe mehr Proben aus der rechten Koronararterie.

3.2. Zusammensetzung der Studienpopulation

Es konnten im Rahmen der Herztransplantationen von 16 Patienten insgesamt 30 Proben verschiedener Koronararterien gewonnen werden. Da von einigen Patienten (n=4) sowohl gesunde Koronarien, als auch Gefäße mit atherosklerotischen Läsionen entnommen wurden, sind solche Patienten in dieser Arbeit sowohl der Atherosklerose- als auch der Kontrollgruppe zugeteilt worden. Gab es von einem Patienten mehrere Proben aus unterschiedlichen Koronarien, so wurden diese einzeln ausgewertet und als eigener Fall betrachtet.

Soweit es im Rahmen der kleinen Studienpopulation möglich war, wurden die Patienten in Fall- und Kontrollgruppe vor Färbungen und Analyse nach Alter und Geschlecht gematcht. Da bei Patienten im höheren Lebensalter nur selten vollständig gesund erscheinende Koronargefäße gefunden werden, ist die Kontrollgruppe durchschnittlich etwas jünger. Das Alter der gesamten Studienpopulation lag zwischen 23 und 59 Jahren zum Zeitpunkt der Herztransplantation. Außerdem unterscheiden sich die Gruppen leicht in Bezug auf die Diagnose, die letztendlich zur Transplantation führte. Zwar wurde in beiden Gruppen der Großteil aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie transplantiert, bei der Fallgruppe kamen jedoch noch zwei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie, in der Kontrollgruppe zwei Patienten mit angeborenen Herzfehlern hinzu.

	Fallgruppe (n=9)	Kontrollgruppe (n=11)
Alter zum OP Zeitpunkt	49,2 Jahre (95 % KI: 40,5-57,9 Jahre)	44,0 Jahre (95 % KI: 36,8-51,2 Jahre)
Geschlecht	55,6 % (5) weiblich 44,4 % (4) männlich	44,5 % (5) weiblich 54,5 % (6) männlich,
Zur HTx-führende Diagnose	78,8 % (7) DCM 22,2 % (2) ICM	81,8 % (9) DCM 18,2 % (2) Angeborene Herzfehler

Tabelle 4 Überblick über epidemiologische Daten der eingeschlossenen Patienten. Bezüglich des Alters handelt es sich um Mittelwerte, in den anderen Kategorien sind in Klammern die absoluten Zahlen angegeben. KI = Konfidenzintervall. DCM = dilatative Kardiomyopathie. ICM = ischämische Kardiomyopathie.

3.3. Präparation

Die Probenentnahme aus dem explantierten Herzen erfolgte etwa 10 Minuten nach Organentnahme, wenn die Freigabe des Organs durch den Operateur erfolgt war, unter sterilen Bedingungen im Operationssaal. Insofern es die Präparation des explantierten Herzens durch die Herzchirurgen möglich machte, erfolgte die Abtrennung einer gesamten Aortenzirkumferenz ca. 1,5 cm oberhalb der Aortenklappe mittels chirurgischer Schere. War dies nicht möglich wurden Teilstücke herausgeschnitten. Die Präparation der Koronararterien erfolgte mittels Koronarmesser, Schere und anatomischer Pinzette. Durch dieses Verfahren konnten in der Regel Abschnitte des linken Hauptstammes, des RIVA, der Arteria coronaria dextra (RCA) und des RCX mit einer Länge von ein bis vier Zentimetern präpariert und entnommen werden. Anschließend wurden die extrahierten Gefäßabschnitte von etwaigem Fett- und Bindegewebe getrennt und für kurze Zeit in

NaCl zwischengelagert. War die gesamte Präparation abgeschlossen, wurden alle Proben in den unsterilen Bereich überführt und dort weiter aufbereitet.

3.4. Probenfixierung und –aufbereitung

Probenanteile, die für die Anfertigung von Paraffin-Schnitten bestimmt waren, wurden für 12 bis 48 Stunden in Paraformaldehyd fixiert, um autolytische Prozesse zu verhindern und danach in 70%igem Ethanol bei 4°C gelagert. Anschließend wurde bei allen Proben eine Entkalkung mittels Lagerung in 0,27 mol EDTA-Lösung (pH 7,41) für 24-36 Stunden mit anschließender Wässerung für 3x15 Minuten in Aqua dest. durchgeführt. Für den Fall, dass die Einbettung in Paraffin nicht unmittelbar nach der Entkalkung erfolgen konnte, wurde die Zeit bis dahin durch Rückführung in 70%iges Ethanol überbrückt.

Für die Elektronenmikroskopie wurden unmittelbar nach der Entnahme eines Gefäßabschnittes ca. 1-2mm dicke Schnitte der Koronarzirumferenz, beziehungsweise 2mm x 2mm große Quadrate der Aorta abgetrennt. Die Anfertigung dieser Schnitte erfolgte mittels Rasierklingen auf Dentalwachs, um etwaige Quetschungen zu vermeiden. Wenn die Möglichkeit bestand das Fixans für die Elektronenmikroskopie (Glutaraldehyd) durch eine Person im unsterilen Bereich anreichen zu lassen, wurden die Proben unmittelbar nach der Präparation dahin überführt. Bestand diese Möglichkeit nicht, wurden die Proben zwischenzeitlich in NaCl aufbewahrt. Die Proben wurden für maximal 3 Wochen in Glutaraldehyd gelagert und der Core-Facility für Elektronenmikroskopie der Charité zur Einbettung und Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten übergeben.

3.5. Anfertigung histologischer Schnitte

Zunächst erfolgte die Paraffin-Einbettung in einer Citadelle mit Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe, Entfettung und Entalkoholisierung durch Xylol und schließlich Durchtränkung mit warmem Paraffin. Die Proben wurden anschließend mithilfe eines Einbettautomaten in Paraffinblöcke gebettet. Abschließend wurden die Paraffinblöcke für ca. eine Stunde auf eine Kühlplatte zum Aushärten gelegt. Unter Zuhilfenahme eines Mikrotoms wurden histologische Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt, zur Glättung in ein warmes Wasserbad überführt und schließlich auf SuperFrost-beschichtete Objektträger aufgebracht. Daraufhin erfolgte die Trocknung, zunächst für mindestens eine Stunde bei 64° C Grad im Wärmeschrank, danach über Nacht bei Raumtemperatur.

3.6. Movat-Pentachrom-Färbung nach Verhöff

Die Movat-Pentachrom-Färbung war der erste Schritt in der weiteren Analyse der Proben, da sie die Basis für die Einteilung in Fall- und Kontrollgruppe lieferte. Sie ermöglicht durch die differenzierte Färbung verschiedener Gewebeatypen einen detaillierten Einblick in die Läsionsmorphologie. Eine Übersicht über die Färberegebnisse in den verschiedenen Geweben wird in Tabelle 5 dargestellt.

Struktur/Gewebe	Färbung
Zellkerne	Blau-schwarz
Muskeln	Rot
Grundsubstanz	Blau
Knorpelgewebe	Blau-grün bis gelblich
Kollagen	Gelb
Elastische Fasern	Schwarz
Knochen	Gelb bis rot

Tabelle 5: Färberegebnis der Movat-Pentachrom-Färbung nach Verhöff in den verschiedenen Geweben.¹⁶⁴

Die Durchführung der Movat-Pentachrom-Färbung erfolgte manuell. Der dabei befolgte Ablauf ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

1. Entparaffinierung und Rehydrierung	
Neo-Clear	10 Minuten
Neo-Clear	10 Minuten
Ethanol 96 %	5 Minuten
Ethanol 80 %	5 Minuten
Ethanol 70 %	5 Minuten
Ethanol 60 %	5 Minuten
Aqua dest. (fließend)	2 Minuten

2. Färbung

Essigsäure 3 %	30 Sekunden
Alcainblau	30 Minuten
Aqua non-dest. (fließend)	2Minuten
Verhoeffsche Gebrauchslösung	8 Minuten
Fe-III-Chlorid	1 Minute
Aqua non-dest.	10 Minuten
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	6 Minuten
Essigsäure 1 %	30 Sekunden
Ethanol 99 %	3 Minuten
Ethanol 99 %	15 Minuten
Safran du Gâtinais	15 Minuten

3. Dehydrierung

Ethanol 99 %	2 Minuten
Ethanol 99 %	2 Minuten
2-Propanol	5 Minuten
Neo-Clear	10 Minuten
Neo-Clear	10 Minuten

3.7. Immunhistochemie

Zur Erarbeitung der Färbeprotokolle, wurden Testfärbungen an älteren Paraffinschnitten der Aorta ascendens und von Koronarien durchgeführt. Um das bestmögliche Färbeergebnis zu erzielen wurden verschiedene Antikörperverdünnungen (je nach Antikörper 1:25, 1:50, 1:100, 1:150 und 1:250), verschiedene Dauern der hitzeinduzierten Antigendemaskierung (2, 4 und 5 Minuten) und verschiedene Entwicklungszeiten bei der Chromogen-Inkubation (10, 20 und 30 Minuten) erprobt. Bei jedem dieser Probedurchläufe wurde durch Auslassen des Primärantikörpers eine Negativkontrolle angefertigt, um die Erkennung von unspezifischen bzw. Hintergrundfärbungen zu ermöglichen. Die besten Ergebnisse wurden bei allen Antikörpern mit einer Erhitzungszeit von 5 Minuten erzielt, wohingegen sich ideale Konzentration des Primärantikörpers und die Entwicklungszeit bei allen Antikörpern unterschieden. Die verwendeten Konzentrationen sind unter 2.3 Antikörper nachzulesen.

Für die Entwicklung des Ko-Färbeprotokolls mit α SMA wurden sowohl verschiedene Konzentrationen des Primärantikörpers (1:100, 1:150, 1:250 und 1:500), als auch verschiedene

Inkubationszeiten des Primärantikörpers (2 Stunden und über Nacht) getestet. Eine Inkubation über Nacht mit einer Konzentration von 1:100 erwies sich hier als die beste Methode. Das genaue Vorgehen bei den immunhistochemischen Färbungen wird in den folgenden Tabellen dargestellt.

1. Entparaffinierung und Rehydrierung	
Neo-Clear	5 Minuten
Neo-Clear	5 Minuten
Ethanol 96 %	3 Dips
Ethanol 80 %	3 Dips
Ethanol 70 %	3 Dips
Ethanol 60 %	1 Minute
Aqua dest.	1Minuten
2. Permeabilisierung	
0.025 % Triton-X in PBS	5 Minuten
0.025 % Triton-X in PBS	5 Minuten
PBS	2 Minuten
3. Antigendemaskierung	
10mM Citrat-Puffer (pH 6.0)	5 Minuten Kochen in der Mikrowelle bei 600 W
Aqua dest.	10 Minuten
4. Färbung des metabolischen Markers	
Blocking Buffer (1 % BSA und 10 % Ziegen Serum in PBS)	60 Minuten in einer feuchten Kammer
PBS	2 Minuten auf einer Schwenkplatte
Primärantikörper	Über Nacht bei 4° in einer feuchten Kammer
PBS	5 Minuten auf einer Schwenkplatte
Biotinylierter Sekundärantikörper	1 Stunde bei Raumtemperatur
PBS	2 Minuten auf der Schwenkplatte
ABC-KIT (30 Minuten vor Verwendung ansetzen)	30 Minuten in einer feuchten Kammer
PBS	2 Minuten auf einer Schwenkplatte

Vector-Red	10-30 Minuten in Abhängigkeit der Färbungsintensität
Aqua dest.	5 Minuten

5. Kofärbung mit α SMA-Antikörper

PBS	5 Minuten auf einer Schwenkplatte
Blocking Buffer (1 % BSA und 10 % Schafserum in PBS)	60 Minuten in einer feuchten Kammer
PBS	2 Minuten auf einer Schwenkplatte
Fluoreszenzmarkierter alpha-SMA-Antikörper	Über Nacht bei 4° in einer feuchten Kammer
PBS	2 Minuten auf einer Schwenkplatte
PBS	2 Minuten auf einer Schwenkplatte
Eindeckmedium mit DAPI	2 Minuten

Abschließend Auflegen eines Deckglases und Versiegelung mit Klarlack.

3.8. Grundlagen der Elektronenmikroskopie

Im Rahmen der Transmissions-Elektronenmikroskopie wird die zu untersuchende Probe durch einen Elektronenstrahl durchdrungen und durch eine elektronenoptische Linse vergrößert. Der benötigte Elektronenstrahl wird dabei aus einer Kathode emittiert, im Vakuum bis zur Anode beschleunigt und vor der Durchdringung der Probe durch eine elektromagnetische Linse fokussiert.¹⁶⁵ Bei der Durchdringung der Probe durch den Elektronenstrahl gilt: je dicker das zu durchdringende Gewebe, desto mehr Elektronen werden absorbiert oder gestreut. Diese Elektronen fehlen anschließend im Elektronenstrahl und bedingen so einen dunkleren Bereich im Bild. Das erzeugte Bild wird anschließend auf einem Fluoreszenzschirm für den Betrachter sichtbar gemacht. Für diese Art der Elektronenmikroskopie sind sehr dünne Proben von etwa 0,1 μm erforderlich. Dieses Prinzip der Elektronenmikroskopie wurde auch in der vorliegenden Arbeit genutzt.

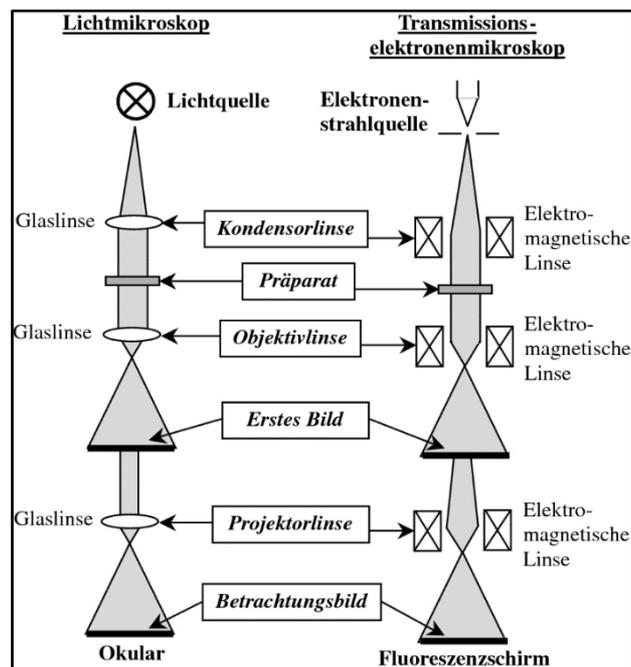


Abbildung 19: Visualisierung des Strahlengangs in einem Transmissionselektronenmikroskop und Vergleich mit einem klassischen Lichtmikroskop.

Reprinted by permission from Springer Nature: Springer eBook. Richtungen der Elektronenmikroskopie. Michler GH 2019.

3.9. Elektronenmikroskopie

Die Methodik für den Umgang mit humanen Koronargefäßen für die Elektronenmikroskopie musste in dieser Arbeit erst etabliert werden. Die Schwierigkeiten begannen hier bei der Entnahme der Proben. Für eine adäquate Fixierung der Proben, sollten diese innerhalb von 5 Minuten nach

Organentnahme in Glutaraldehyd überführt werden. Dies ist jedoch im Rahmen einer Herztransplantation selbst unter günstigsten Bedingungen nicht zu erreichen, da allein die Freigabe des explantierten Organs durch den Operateur etwa 10 Minuten in Anspruch nimmt. Nach der Freigabe des Organs erfolgte dann eine recht zeitintensive Präparation der Koronarien unter sterilen Bedingungen, die weitere 10 Minuten in Anspruch nahm. Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich durch die hohe Toxizität von Glutaraldehyd, wodurch die Überführung in den sterilen Bereich ungünstig ist. Ob die Proben also direkt nach der Präparation fixiert werden konnten, hing von den personellen Kapazitäten im OP ab. Glücklicherweise war ein Anreichen durch OP-Pflegende bei der Mehrzahl der Operationen möglich und die Fixierung konnte so etwa 20 Minuten nach Organentnahme beginnen.

Bei den eingeschlossenen Proben wurden sehr dünne (etwa 1 mm dicke) Querschnitte angefertigt, die eine adäquate Fixierung der Mitochondrien, bei gleichzeitig erhaltener Orientierungsmöglichkeit bieten konnten. Bis diese zufriedenstellende Probenqualität erreicht werden konnte, war bedauerlicherweise viel Zeit und somit viele Herztransplantationen vergangen, sodass in dieser Arbeit nur drei Proben der insgesamt 30 akquirierten Proben, elektronenmikroskopisch ausgewertet werden konnten.

Alle Proben wurden nach der Fixierung in Glutaraldehyd an die Core-Facility für Elektronenmikroskopie der Charité übergeben und dort für die Elektronenmikroskopie aufbereitet (Härtung, Kontrastierung, Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten).

Für jede der Proben wurden je 40 Bilder in 12930x Vergrößerung mit dem Elektronenmikroskop LEO TM (Zeiss) angefertigt.

3.10. Histologische Auswertung

Zur Auswertung der Movat-Pentachrom-gefärbten histologischen Schnitte wurden zunächst lichtmikroskopische Bilder in 10-facher Vergrößerung angefertigt, wobei über die Merge-Funktion des Mikroskops für jede Probe ein Bild des gesamten Gefäßquerschnitts aufgenommen wurde. Die anschließende Zuordnung zu einem der acht Atherosklerosestadien nach Stary erfolgte zum einen durch Vergleich mit Beispielbildern und zum anderen anhand der morphologischen Charakteristika der entsprechenden Läsionen. Alle Proben die maximal Stadium II zuzuordnen waren, sind der Kontrollgruppe zugeführt worden, alle weiter fortgeschrittenen Läsionen wurden Teil der Fallgruppe.

3.11. Immunhistochemische Auswertung

Der erste Schritt in der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen lag in der Anfertigung von Bildern in 20-facher Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Bei kleinen Gefäßen wurde die ganze Zirkumferenz mittels Merge-Funktion fotografiert, bei Gefäßen eines größeren Kalibers wurden pro Gefäß je nach Größe ca. 10 bis 15 repräsentative Bilder angefertigt.

Die anschließende Bildanalyse erfolgte mit dem Analyseprogramm ImageJ. Eine Kenntnis der zu erwartenden Expressionsmuster bestand zu diesem Zeitpunkt nicht. Darüber hinaus wurden alle Proben durch einen alphanummerischen Code anonymisiert, wodurch die Zuordnung zu Fall-beziehungsweise Kontrollgruppe während der Auswertung nicht ersichtlich war.

Zunächst erfolgte das Wegschneiden der Adventitia unter Orientierung an der Membrana elastica externa (sofern sichtbar) mittels manuellem Schnitt-Tool, da diese von der Auswertung ausgeschlossen werden sollte. Anschließend wurde der Querschnitt durch Intima und Media in eine neue Bilddatei eingefügt, die als Basis für alle weiteren Auswertungen diente.

Die quantitative Analyse der gefärbten Flächen erfolgte im CY3- (metabolische Markerenzyme) beziehungsweise GFP-Channel (α -SMA) über die Color-Threshold-Funktion. Dazu mussten vor der Auswertung aller Färbungen eines metabolischen Markers, zunächst die idealen Einstellungen für diese Funktion ermittelt werden, die das Färbeergebnis auf jedem Bild gleichermaßen abbilden. Diese Einstellungen wurden anschließend für die Analyse jedes einzelnen Bildes beibehalten. Dasselbe Vorgehen gilt auch für die Auswertung des Färbeergebnis von α -SMA. Das Ziel in der Bildanalyse bestand darin, den Anteil der Kolo-kalisation der jeweiligen metabolischen Enzyme und α -SMA zu bestimmen. Dazu wurde zunächst die gesamte α -SMA-positive Fläche markiert und ausgemessen. Anschließend wurde in der ursprünglichen Bilddatei im CY3-Channel die positive Fläche des metabolischen Enzyms ausgewählt und diese Markierungen im „ROI-Manager“ gespeichert. Im letzten Schritt wurden die Markierungen in den GFP-Channel übertragen, sodass die umrandeten Flächen ausgeschnitten und in eine neue Bilddatei eingefügt werden konnten. In dieser neuen Bilddatei befanden sich so nur noch die α -SMA-positiven Bereiche, an deren Stelle im CY3-Channel der metabolische Marker angefärbt war. Die so verbliebenen α -SMA-positiven Areale wurden ebenfalls ausgemessen.

Die Gesamte α -SMA-positive Fläche, sowie die Fläche mit positiver Kolo-kalisation konnten schließlich in eine Excel-Tabelle eingetragen und ins Verhältnis gesetzt werden. Da für jede Probe eine Vielzahl von Bildern analysiert wurden, die jeweils unterschiedliche Ergebnisse lieferten, wurden für die einzelnen Proben Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

3.12. Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Analyse der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte ebenfalls mit dem Programm ImageJ, wobei pro Probe 30 elektronenmikroskopische Bilder ausgewertet wurden. Zunächst wurde bei jedem Bild manuell die Zellmembran markiert und die Größe der eingeschlossenen Fläche bestimmt. Die sich innerhalb dieser Fläche befindlichen Mitochondrien wurden ausgezählt und die äußere Mitochondrien-Membran markiert. Über die „Particle“-Analyse-Funktion des Programms konnten so Fläche und Circularity der Mitochondrien bestimmt werden. Alle so bestimmten Werte wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert und anschließend weiter ausgewertet. Durch Bildung des Verhältnisses aus Zellfläche und Mitochondrienanzahl konnte für jede Probe die Mitochondriendichte berechnet werden. Bezüglich aller untersuchten Werte wurden für jede Probe aus den 30 analysierten Bildern Mittelwerte gebildet.

3.13. Statistische Analyse

Die Dokumentation aller Daten und Ergebnisse sowie letztlich auch die statistische Auswertung erfolgten mittels Excel 2018. Für Patientendaten und Ergebnisse der Experimente wurden zunächst deskriptive Statistiken (Mittelwert, Median, Standardabweichung, 95 % Konfidenzintervall) durchgeführt. Um die Ergebnisse der Immunhistochemie zwischen Fall- und Kontrollgruppe vergleichen zu können, wurden die Werte zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Ihre Normalverteilung hin untersucht. Da sich bei allen Wertegruppen der immunhistochemischen Analysen eine Normalverteilung zeigte, wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant definiert und führten damit zur Ablehnung der Nullhypothese.

Für die Auswertung der elektronenmikroskopischen Ergebnisse, wurde sich aufgrund der geringen Fallzahl auf deskriptive Statistiken beschränkt und es wurden keine weiteren statistischen Analysen durchgeführt.

4. Ergebnisse

Die Rationale dieser Arbeit war es, die bisherigen Erkenntnisse der Arbeitsgruppe Althoff et al., aus Zellkulturen und Mausmodellen in humanen Proben zu validieren.

Zusammenfassend konnte bisher in der Zellkultur eine durch PDGF- beziehungsweise Cholesterol-induzierte Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen, also ein Verlust von glattmuskulären Markerproteinen, gezeigt werden. Gleichzeitig ging dieser Dedifferenzierungsprozess mit einer

Erhöhung der glykolytischen Aktivität, erhöhter Expression glykolytischer Enzyme und verminderter Expression mitochondrialer Enzyme einher. Im Mausmodell konnte außerdem festgestellt werden, dass nach Karotisligatur die Expression glykolytischer Enzyme in murinen glatten Gefäßmuskelzellen zunimmt und gleichzeitig die Anzahl mitochondrialer DNA-Kopien, die Expression mitochondrialer Enzyme und die mitochondriale Masse abnimmt.

Konkret sollte aufgezeigt werden, inwiefern sich auf Proteinebene in humanen glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose die Expressionsmuster metabolischer Enzyme verändern und ob sich im Falle einer Repression mitochondrialer Enzyme ein ultrastrukturelles Korrelat in der Elektronenmikroskopie findet.

Um die gewonnenen Proben entweder der Fall- oder der Kontrollgruppe zuordnen zu können wurde zu Beginn bei Schnitten aller eingeschlossenen Proben eine Movat-Pentachrom-Färbung durchgeführt. So konnte das Atherosklerosestadium, in dem sich die untersuchten Gefäße befanden, bestimmt und ein Zusammenhang zwischen den metabolischen Veränderungen und einem Progress der Erkrankung untersucht werden.

Bei fünf der 30 untersuchten Proben waren bis auf eine adaptive Intimaverdickung keine atherosklerotischen Vorläuferläsionen sichtbar, sechs Proben wurden Stadium I und vier Proben Stadium II zugeordnet. Von den 15 Proben der Fallgruppe wurden vier dem Stadium III, zwei dem Stadium IV, sechs dem Stadium Va, eine dem Stadium Vb und zwei dem Stadium VI nach Stary zugeordnet.

4.1. Veränderungen der Expression glykolytischer Enzyme

Da die Energiebilanz der anaeroben Energiegewinnung je Glucose-Molekül deutlich weniger effizient ist, als die der oxidativen Phosphorylierung, wird entsprechend mehr Glucose benötigt, um eine adäquate Versorgung mit ATP erhalten zu können. Wenn man bedenkt, dass die Sauerstoffversorgung und damit die Möglichkeit zur aeroben Energiegewinnung in atherosklerotischen Plaques herabgesetzt sein kann, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Zellen auf diese Bedingungen mit einer vermehrten glykolytischen Aktivität reagieren, worauf außerdem auch die bisherigen Ergebnisse unserer Forschungsgruppe hindeuten.¹⁶⁶

4.1.1. PFK-B

Die PFK-B, als Schlüsselenzym der Glykolyse, wurde hier als Markerprotein genutzt, um Hinweise auf eine Veränderung in der glykolytischen Aktivität zu untersuchen. Zudem ist bezüglich der PFK-B bekannt, dass die Expression, wie unter 1.6.1 erklärt, durch HIF-1, also im Rahmen von Hypoxie, induziert werden kann. Dieser Mechanismus erhärtet die Vermutung, dass die PFK-B in Zellen innerhalb von atherosklerotischen Läsionen eine Hochregulation erfährt. Entsprechend dieser Hypothese zeigt sich bei der Expressionsanalyse der PFK-B, dass α SMA-positive Zellen atherosklerotischer Proben eine signifikante Erhöhung der Expression gegenüber denen in unveränderten Gefäßen aufweisen ($p=0,02$). Während in den pathologisch veränderten Gefäßen durchschnittlich 27,2 % (95 %-KI 17,6-36,9 %) der α SMA-positiven Zellen dieses Enzym exprimierten, traf dies nur auf 15,9 % (95 %-KI 9,40-22,4 %) der α SMA-positiven Zellen im gesunden Gewebe zu. Die gesteigerte Expression in atherosklerotischen Gefäßen entspricht einer Zunahme von 71,1 % gegenüber den nicht-atherosklerotischen Gefäßen. Die Verteilung der beobachteten Werte innerhalb von Fall- und Kontrollgruppe ist in Abbildung 20 dargestellt.

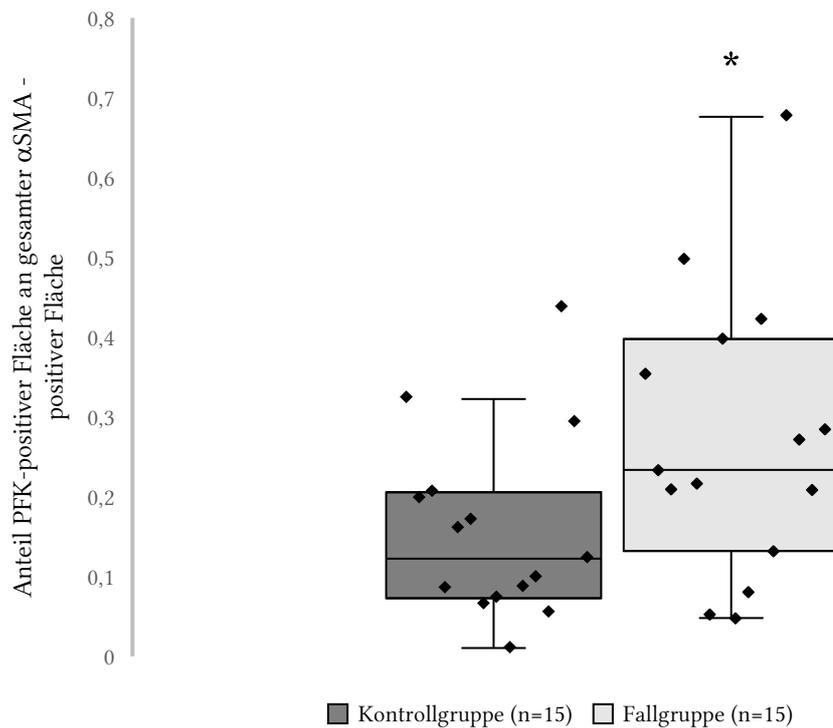


Abbildung 20: Boxplot mit einzelnen Datenpunkten zur Darstellung der Kolo-kalisation von PFK-B und α -SMA in immunhistochemischen Färbungen in Fall- und Kontrollgruppe. Dazu wurde der Anteil der PFK-B-positiven Fläche an der α -SMA-positiven Fläche errechnet und für Fall- und Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Anschließend wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. * $p < 0,05$.

In den Abbildungen 21a und 21b werden die Expressionsmuster in Fall- und Kontrollgruppe auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen exemplarisch gegenübergestellt. Auch in der Kontrollprobe sind PFK-B-positive (rote) Bereiche sichtbar, jedoch ist nur wenig bis keine Kolo-kalisation mit α SMA (grün) zu erkennen. Es fällt zudem auf, dass in der gesunden Probe vermehrt PFK-B im Zellkern vorhanden zu sein scheint. Diese Bereiche erscheinen im Overlay durch die Kernfärbung mit DAPI (blau) rosa. Zwar sind solche Bereiche auch in der atherosklerotisch veränderten Probe zu finden, der Großteil der angefärbten PFK-B ist jedoch zytoplasmatisch lokalisiert und erscheint so orange.

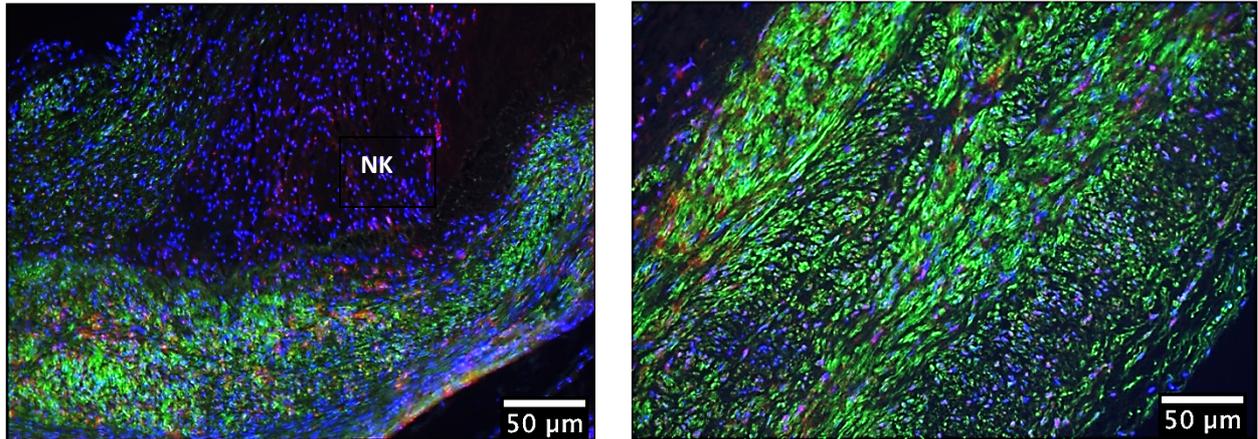


Abbildung 21a (links): Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie eines 5 μm dicken Querschnitts durch den RCX eines 54-jährigen Patienten mit atherosklerotischer Läsion. Der dunkle Bereich in der Mitte entspricht dem nekrotischen Kern (NK) des Plaques. 20-fache Vergrößerung. **Abbildung 21b (rechts):** Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie eines 5 μm dicken Querschnitts durch den RCX eines 34-jährigen Patienten ohne atherosklerotische Veränderungen. Die Kolokalisation von αSMA und PFK-B erscheint orange. Die Lokalisation von PFK-B innerhalb des Zellkerns erscheint rosa. 20-fache Vergrößerung.

■ PFKB ■ DAPI ■ αSMA

Für eine genauere Charakterisierung der beobachteten Werte, wurden diese nach Aufteilung in die Stadien der Atherosklerose nach Sary erneut ausgewertet (Tabelle 6). In gesunden Gefäßen ($n=5$) betrug der Anteil PFK-B-positiver an αSMA -positiven Zellen 24,2 %. Von Stadium I bis Stadium V konnte eine kontinuierliche Zunahme der Expression von 10,9 % bis auf 34,3 % beobachtet werden. In den Stadien VII und VIII nahm dieser Wert wieder deutlich ab, mit einem Anteil PFK-B-positiver Zellen von 8,1 % (Stadium VII) bzw. 27,5 % (Stadium VIII). Diesen Stadien wurden jedoch auch die wenigsten Proben zugeordnet.

Atherosklerose Stadium nach Sary-Klassifikation	N	Mittelwert (SD)
Normales Gefäß	5	0,242 (0,14)
Stadium I	6	0,109 (0,07)
Stadium II	4	0,130 (0,18)
Stadium III	4	0,211 (0,12)
Stadium IV	2	0,278 (0,01)
Stadium Va	6	0,343 (0,19)
Stadium Vb	1	0,081
Stadium VI	2	0,275 (0,31)

Tabelle 6: Anteil der PFK-B-exprimierenden Zellen an der Gesamtheit der αSMA -positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien.

4.1.2. LDHA

In dieser Arbeit sollte nicht nur nach Hinweisen auf eine veränderte glykolytische Aktivität gesucht werden, sondern auch nach Anhaltspunkten wie das gewonnene Pyruvat weiter metabolisiert wird. Unter physiologischen Bedingungen wird der Großteil des Pyruvats in den Citratzyklus eingespeist, jedoch hat die Zelle auch die Möglichkeit das Pyruvat in Laktat umzuwandeln, wie es im Rahmen des Warburg Effektes vermehrt beobachtet wird.⁵ Um dem nachzugehen erfolgte eine immunhistochemische Analyse der LDHA, welche die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Da die vermehrte Produktion von Laktat, eines der ersten Phänomene war, welches auf den veränderten Metabolismus von Tumorzellen aufmerksam machte und wir bei glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose durch unsere bisherigen Ergebnisse von ähnlichen metabolischen Verschiebungen ausgehen, wären im Expressionsmuster der LDHA deutliche Veränderungen zu erwarten gewesen.

Es konnte zwar ein erhöhter Anteil LDHA-exprimierender α -SMA-positiver Zellen beobachtet werden, sodass man gegebenenfalls auch von einer verstärkten Laktatproduktion dieser Zellen ausgehen kann, jedoch zeigten diese Änderungen keine statistische Signifikanz ($p=0,08$). Während in den pathologisch veränderten Gefäßen durchschnittlich 46,1 % (95 %-KI 35,8-56,5 %) der α SMA-positiven Zellen die LDHA exprimierten, traf dies nur auf 37,8 % (95 %-KI 30,4-45,2 %) der α SMA-positiven Zellen im gesunden Gewebe zu. Die gesteigerte Expression in atherosklerotischen Gefäßen entspricht einer Zunahme von 18,0 % gegenüber den nicht-atherosklerotischen Gefäßen. Die Verteilung der einzelnen Messwerte ist in Abbildung 22 visualisiert.

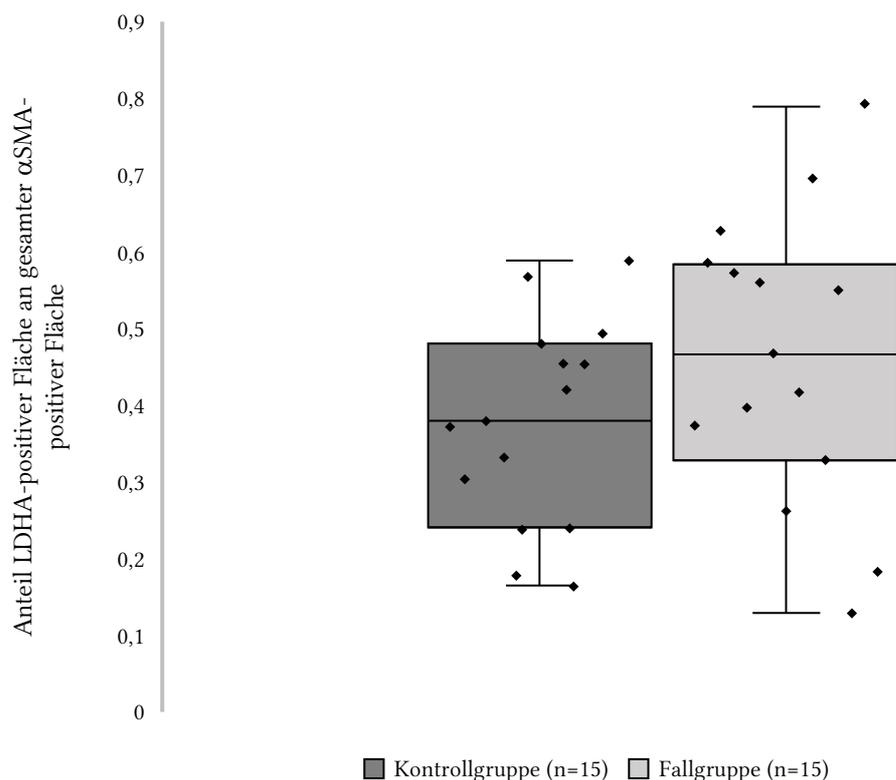


Abbildung 22: Boxplot mit einzelnen Datenpunkten zur Darstellung der Kolo-kalisation von LDHA und α -SMA in immunhistochemischen Färbungen in Fall- und Kontrollgruppe. Dazu wurde der Anteil der LDHA-positiven Fläche an der α -SMA-positiven Fläche errechnet und für Fall- und Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Anschließend wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. $p=0,08$.

In den Abbildungen 23a und 23b werden exemplarisch je eine Probe aus Fall- und Kontrollgruppe bezüglich ihrer Expressionsmuster verglichen. Die Unterschiede in der Expression der LDHA fallen bei diesen Proben schon bei der Betrachtung auf: während im gesunden Gefäß die LDHA-positiven Bereiche eher als vereinzelte rote Punkte imponieren, sind im atherosklerotischen Gefäß inselartige Bereiche mit erhöhter LDHA-Expression zu erkennen. Auf beiden Aufnahmen besteht eine recht hohe Kolo-kalisation mit α -SMA, die durch die etwas orangene Färbung der entsprechenden Areale zu erkennen ist. Da auch eine Färbung der Zellkerne mit DAPI durchgeführt wurde, können ebenfalls Rückschlüsse über die Lokalisation der LDHA innerhalb der Zelle gemacht werden, die hier zytosolisch einzuschätzen ist. Dies ist dadurch erkennbar, dass wenig Überlappung zwischen der blauen DAPI-Kernfärbung und der roten Färbung der LDHA, welche sonst rosa erscheinen würde, sichtbar ist. Bestünde eine höhere Kolo-kalisation dieser beiden Färbungen, spräche dies für eine nukleäre Lokalisation der LDHA. Da über die LDHA bekannt ist, dass es sich um ein zytosolisch aktives Enzym handelt, ist dies eine plausible Beobachtung.

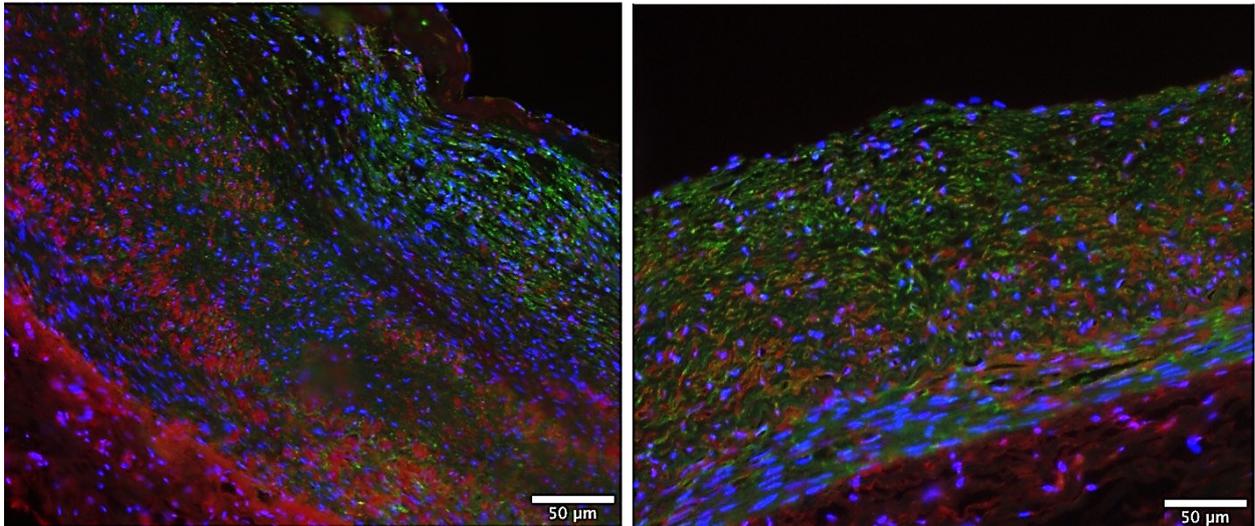


Abbildung 23a (links): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 5 µm dicken Querschnitts durch den RIVA eines 54-jährigen Patienten mit 3-Gefäß-KHK. Es ist eine deutliche Verdickung der Gefäßwand zu erkennen. Besonders im Bereich der Tunica media sind Bereiche mit starker LDHA-Expression zu erkennen (rot). 20-fache Vergrößerung.

Abbildung 23b (rechts): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 5 µm dicken Querschnitts durch den RIVA einer 43-jährigen Patientin ohne atherosklerotische Veränderungen. Auch hier ist eine LDHA-Expression erkennbar, wobei sie im Vergleich zu Abbildung 23a deutlich geringer ausfällt.

■ LDHA ■ DAPI ■ αSMA

Auch bezüglich der LDHA-Expression wurden die gemessenen Werte nach Aufteilung in die Atherosklerose-Stadien nach Sary betrachtet und in Tabelle 7 abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von LDHA durch αSMA+ Zellen mit zunehmendem Atherosklerosestadium ebenfalls ansteigt, wobei die gemessenen Werte in Stadium IV nicht diesem Schema folgen. Dennoch ist beachtlich, dass sich die Expression der LDHA in Stadium VI gegenüber den normalen Gefäßen nahezu verdoppelt hat (56,4 % vs. 29,7 % der αSMA+ Zellen).

Atherosklerose Stadium nach Sary-Klassifikation	N	Mittelwert (SD)
Normales Gefäß	5	0,297 (0,11)
Stadium I	6	0,406 (0,15)
Stadium II	4	0,439 (0,11)
Stadium III	4	0,501 (0,23)
Stadium IV	2	0,156 (0,04)
Stadium Va	6	0,509 (0,12)
Stadium Vb	1	0,548
Stadium VI	2	0,564 (0,01)

Tabelle 7: Anteil der LDHA-exprimierenden Zellen an der Gesamtheit der αSMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien..

4.2. Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels

Da sich sowohl im Rahmen der bisherigen Experimente der Arbeitsgruppe Althoff et al. in der Zellkultur, als auch im Mausmodell infolge von Dedifferenzierungsprozessen nicht nur eine verstärkte glykolytische Aktivität beziehungsweise eine verstärkte Expression glykolytischer Enzyme durch glatte Gefäßmuskelzellen, sondern gleichzeitig auch ein Rückgang der Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung zeigten, wurden im Zuge dieser Studie verschiedene Enzyme des mitochondrialen Stoffwechsels untersucht. Zum einen die COX IV, stellvertretend für die Atmungskette und als Indikator für die Mitochondrienanzahl, die ACADM repräsentativ für die β -Oxidation und die IDH2 für den Citratzyklus.

4.2.1. IDH2

Die Expression der IDH2 durch α SMA-positive Zellen zeigte in den immunhistochemischen Analysen atherosklerotischer Proben einen signifikanten Rückgang gegenüber gesunden Gefäßen ($p=0,0003$). Während in den gesunden Gefäßen im Mittel 58,7 % (95 %-KI 49,8 %-67,7 %) der α SMA-positiven Zellen die IDH2 exprimierten, traf dies nur auf 36,2 % (95%-KI 27,6 %-44,8 %) der α SMA-positiven Zellen im pathologisch veränderten Gewebe zu. Die gesteigerte Expression in atherosklerotischen Gefäßen entspricht mit einer Abnahme der IDH2-Expression um 38,3 %, einer Reduktion von über einem Drittel gegenüber den nicht-atherosklerotischen Gefäßen. Die Verteilung der Messwerte ist in Abbildung 24 dargestellt.

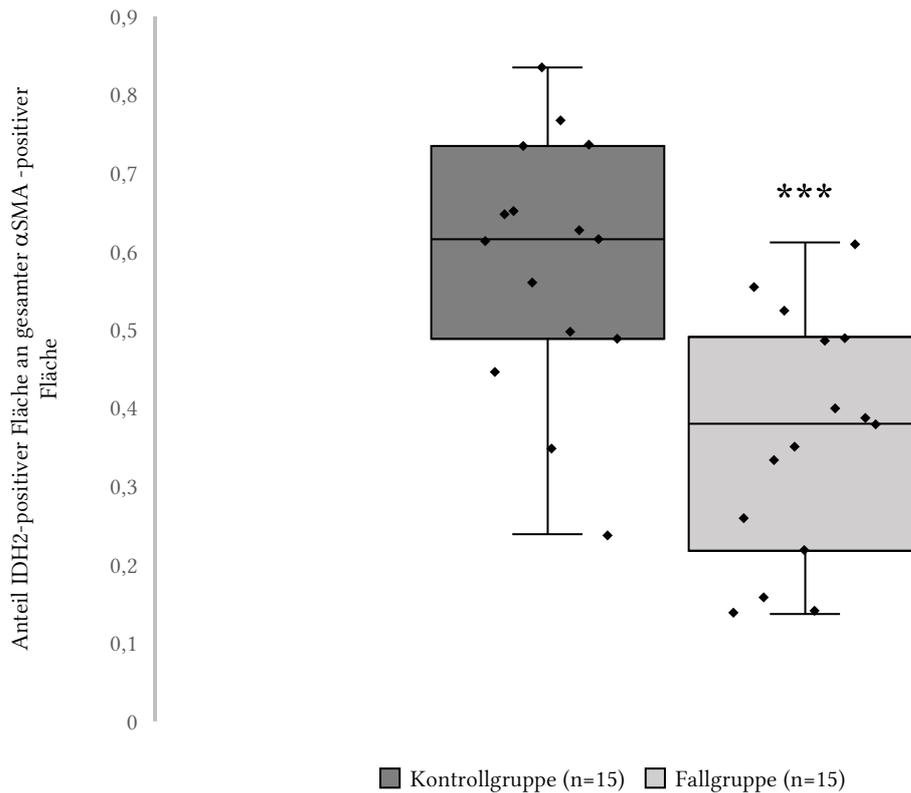


Abbildung 24: Boxplot mit einzelnen Datenpunkten zur Darstellung der Kolo-kalisation von IDH2 und α -SMA in immunhistochemischen Färbungen in Fall- und Kontrollgruppe. Dazu wurde der Anteil der IDH2-positiven Fläche an der α -SMA-positiven Fläche errechnet und für Fall- und Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Anschließend wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. *** $p < 0,001$.

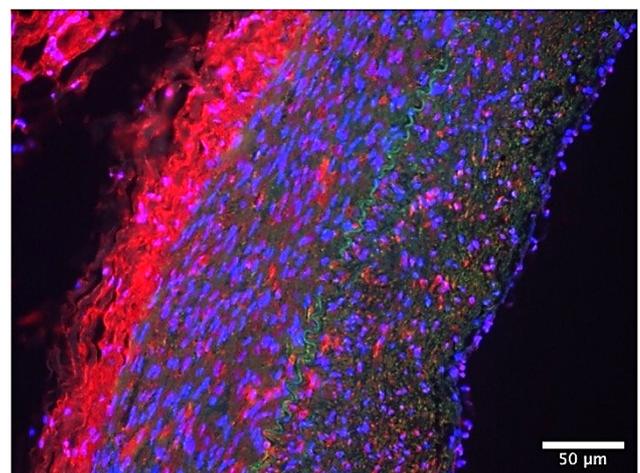
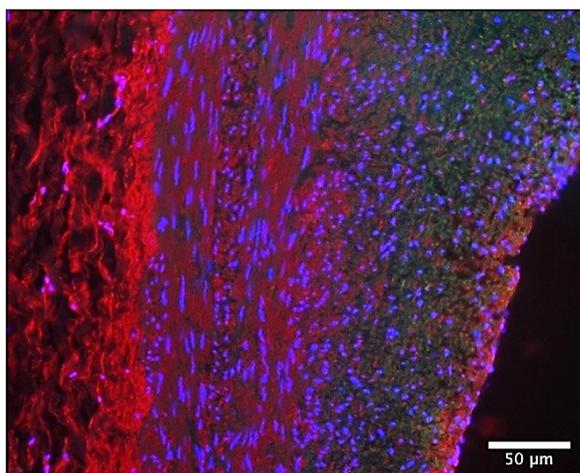


Abbildung 25a (links): Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop einer atherosklerotisch veränderten RCA von einer 39-jährigen Patientin. Es sind eine Verdickung der Gefäßwand, sowie eine hypotrophierte Tunica Media zu erkennen. Besonders im oberen, stark verdickten Bereich sind kaum IDH2-positive Bereiche zu erkennen. 20-fache Vergrößerung.

Abbildung 25b (rechts): Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop von einem Querschnitt durch den RCX eines 52-jährigen Patienten ohne Atherosklerose. In der gesamten Gefäßwand sind stark IDH2-positive Bereiche zu erkennen. 20-fache Vergrößerung.

■ IDH2 ■ DAPI ■ α SMA

In den Abbildungen 25a und 25b werden eine atherosklerotische und eine gesunde Probe exemplarisch verglichen. Die unterschiedlichen Expressionsmuster sind in diesen Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop auch ohne Bildanalyse-Tool deutlich erkennbar. Sowohl in der Media, als auch in der Intima des gesunden Gefäßes sind durch den IDH2-Antikörper stark gefärbte Areale sichtbar. Dahingegen ist in der Intima der atherosklerotischen Probe nur wenig Färbung zu erkennen. In der Media ist zwar eine Färbung ersichtlich, jedoch ist kaum Kolo-kalisation mit α SMA zu sehen.

Nach Aufteilung der beobachteten Werte in die Atherosklerose-Stadien nach Sary ist zwar eine Tendenz in Richtung sukzessiver Abnahme der IDH2 Expression zu erkennen (siehe Tabelle 8), jedoch wird dieser Trend in den Stadien III und IVb durch einen starken Einbruch in der IDH2-Expression unterbrochen. Vergleicht man nur gesunde Gefäße mit dem am weitesten fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose (Stadium VI), fällt auf, dass sich die Expression von IDH2 durch α SMA+ Zellen nahezu halbiert hat (34,1 vs. 61,9 %).

Atherosklerose Stadium nach Sary-Klassifikation	N	Mittelwert (SD)
Normales Gefäß	5	0,652 (0,05)
Stadium I	6	0,548 (0,16)
Stadium II	4	0,488 (0,23)
Stadium III	4	0,250 (0,10)
Stadium IV	2	0,495 (0,16)
Stadium V	6	0,436 (0,09)
Stadium VII	1	0,139
Stadium VIII	2	0,341 (0,26)

Tabelle 8: Anteil der IDH2-exprimierenden Zellen an der Gesamtheit der α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien.

4.2.2. COX IV

In den immunhistochemischen Färbungen zur Beurteilung der COX IV-Expression zeigte sich in der Fallgruppe ein verminderter Anteil von Zellen, die sowohl durch Anti-COX-IV-Antikörper, als auch durch Anti- α SMA-Antikörper angefärbt wurden, wobei die Unterschiede knapp unter dem festgelegten Signifikanzniveau von $p=0,05$ lagen ($p=0,06$). Während in den gesunden Gefäßen im Mittel 51,9 % (95 %-KI 43,6-60,3 %) der α SMA-positiven Zellen die COX IV exprimierten, traf dies nur auf 43,6 % (95%-KI 36,0-51,2 %) der α SMA-positiven Zellen im pathologisch veränderten Gewebe zu. Die gesteigerte Expression in atherosklerotischen Gefäßen entspricht einer durchschnittlichen Abnahme von 16,0 % gegenüber den nicht-atherosklerotischen Gefäßen.

In Abbildung 26 wird die Verteilung der Messwerte innerhalb von Fall- und Kontrollgruppe dargestellt, wobei zwei Extremwerte deutlich werden. Diese Werte befinden sich in dieser normalverteilten Messgruppe jedoch noch im Bereich von Mittelwert $+3*SD$ ($SD = 0,15$) und wurden daher nicht als Ausreißer betrachtet und in die weiteren Berechnungen miteinbezogen.

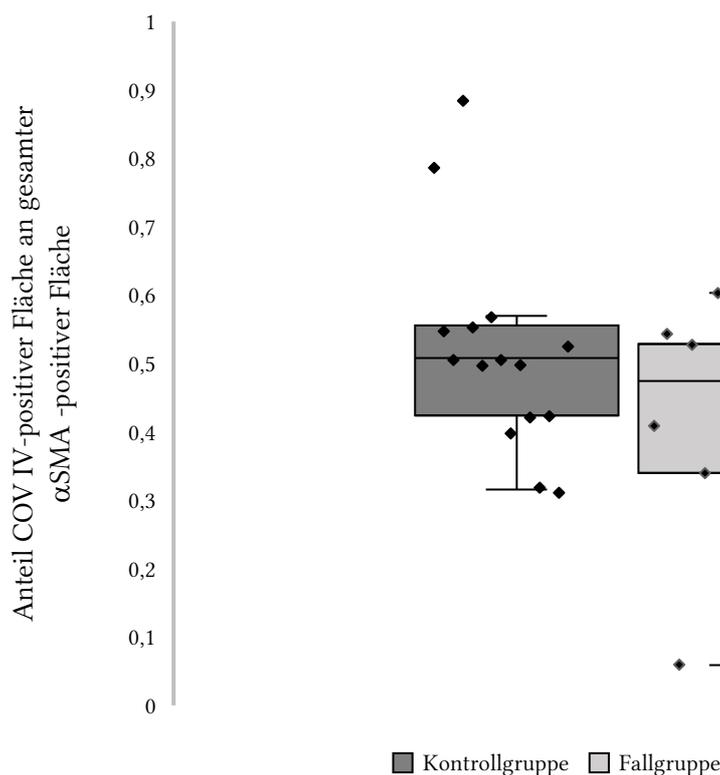


Abbildung 26: Boxplot mit einzelnen Datenpunkten zur Darstellung der Kolo-kalisation von LDHA und α -SMA in immunhistochemischen Färbungen in Fall- und Kontrollgruppe. Dazu wurde der Anteil der LDHA-positiven Fläche an der α -SMA-positiven Fläche errechnet und für Fall- und Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Anschließend wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. $p=0,06$.

In den Abbildungen 27a und 27b werden zwei exemplarische Proben aus Fall- und Kontrollgruppe verglichen, die sich hinsichtlich ihrer Expressionsmuster stark unterscheiden.

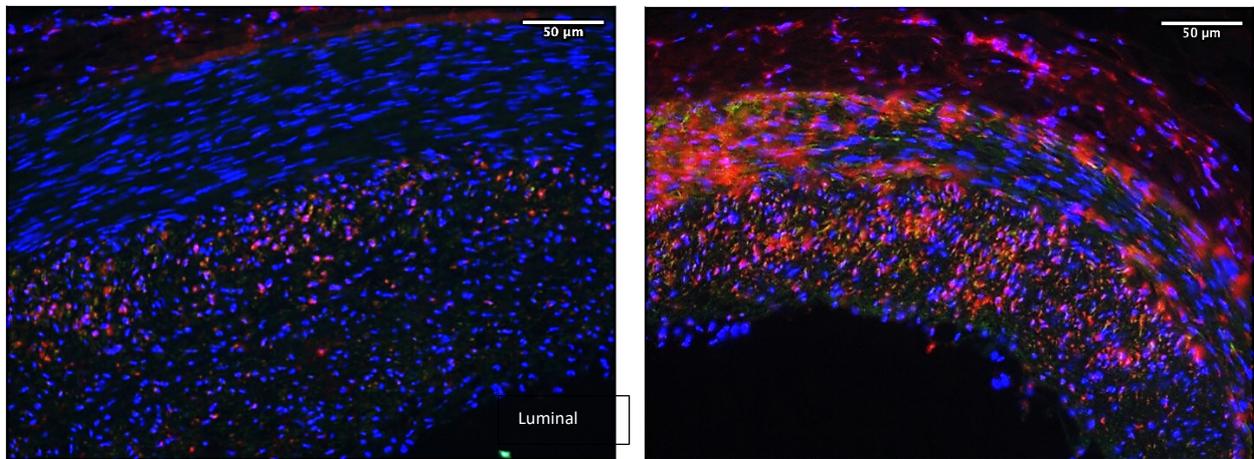


Abbildung 27a (links): Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie des atherosklerotisch veränderten RCX einer 55-jährigen Patientin. 5 μm dicker Querschnitt durch den Plaque. Besonders die Verdickung der Tunica intima fällt hier auf. Sowohl die Expression von αSMA , als auch von COX IV fällt eher gering aus. Die Kernfärbung mit DAPI lässt auf eine hohe Zellzahl in dem abgebildeten Bereich schließen. Um die gesamte Gefäßwand in 20-facher Vergrößerung darstellen zu können wurden mehrere Bilder zusammengeschnitten.

Abbildung 27b (rechts): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 5 μm dicken Querschnitts durch die RCA einer 53-jährigen Patientin. Im Vergleich zur atherosklerotisch veränderten Koronararterie in Abbildung 27a sind deutlich mehr COX IV-positive Bereiche sichtbar, die durch ihr zum großen Teil orangenes Erscheinen auf eine starke Kolokalisation mit αSMA und damit auf eine verstärkte Expression durch glatte Gefäßmuskelzellen hinweisen. 20-fache Vergrößerung.

■ COX IV ■ DAPI ■ αSMA

Betrachtet man die gemessenen Werte nach Aufteilung nach Sary-Klassifikation, so ist zwar kein kontinuierlicher Abwärtstrend erkennbar, jedoch fällt auf, dass die höchste Expression von COX IV durch glatte Gefäßmuskelzellen mit 63,2 % in unveränderten Gefäßen und die geringste Expressionsrate mit 38 % im Stadium Va nach Sary zu finden ist (siehe Tabelle 9), wobei die Expression in den höheren Atherosklerosestadien wieder zunimmt.

Atherosklerose Stadium nach Sary-Klassifikation	N	Mittelwert (SD)
Normales Gefäß	5	0,632 (0,19)
Stadium I	6	0,508 (0,06)
Stadium II	4	0,393 (0,09)
Stadium III	4	0,452 (0,10)
Stadium IV	2	0,384 (0,13)
Stadium Va	6	0,380 (0,17)
Stadium Vb	1	0,555
Stadium VI	2	0,565 (0,05)

Tabelle 9: Anteil der COX-IV-exprimierenden Zellen an der Gesamtheit der α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien

4.2.3. ACADM

Abschließend wurde die ACADM untersucht, um einen möglichst umfassenden Eindruck des mitochondrialen Metabolismus abbilden zu können. Auch wenn sich in der Immunhistochemie hier in Bezug auf die Mittelwerte deutliche Unterschiede zeigten, blieb eine statistische Signifikanz durch die starke Streuung der Werte, insbesondere in der Kontrollgruppe, aus ($p=0,24$).

Während in den gesunden Gefäßen im Mittel 43,6 % (95 %-KI 31,8-55,4 %) der α SMA-positiven Zellen die ACADM exprimierten, war dies bei 39,0 % (95 %-KI 31,1-46,8 %) der α SMA-positiven Zellen im atherosklerotischen Gewebe der Fall. Die Abnahme der ACADM-Expression den atherosklerotischen Proben fällt mit durchschnittlich 10,6 % also eher gering aus.

In Abbildung 28 ist die Verteilung der Werte dargestellt. Hier wird deutlich, dass sowohl die stärkste, als auch die schwächste ACADM-Expression durch glatte Gefäßmuskelzellen in der Kontrollgruppe zu finden ist, was die hohe Bandbreite der Werte unterstreicht.

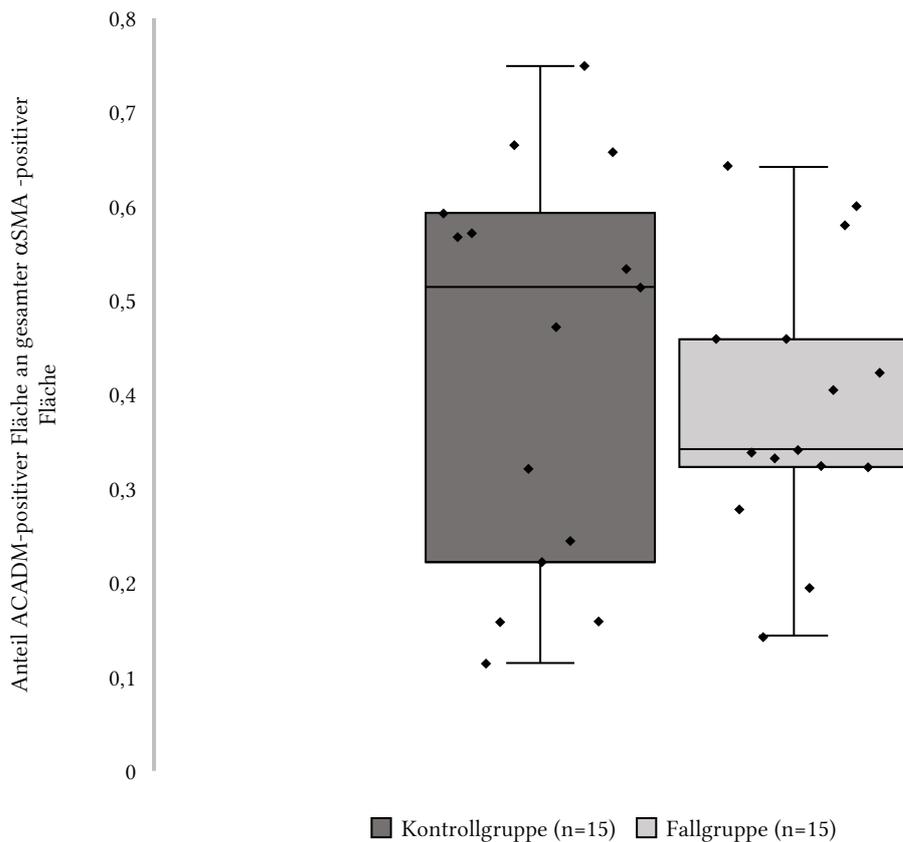


Abbildung 28: Boxplot mit einzelnen Datenpunkten zur Darstellung der Kolo-kalisation von ACADM und α -SMA in immunhistochemischen Färbungen in Fall- und Kontrollgruppe. Dazu wurde der Anteil der ACADM-positiven Fläche an der α -SMA-positiven Fläche errechnet und für Fall- und Kontrollgruppe Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Anschließend wurde zur Signifikanzanalyse ein T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. $p=0,24$

In den Abbildungen 29a und 29b werden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von zwei Proben aus der Fall- und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Neben der unterschiedlichen Expressionsstärke von α SMA und ACADM, fällt ebenfalls auf, dass in Abbildung 29a deutlich mehr Bereiche rosa erscheinen. Diese Farbe kommt durch Überlagerung der rot gefärbten ACADM und den durch DAPI blau gefärbten Zellkernen zustande und könnte somit darauf hinweisen, dass die ACADM im Rahmen von Atherosklerose zu einem größeren Teil nukleär, statt zytosolisch lokalisiert ist.

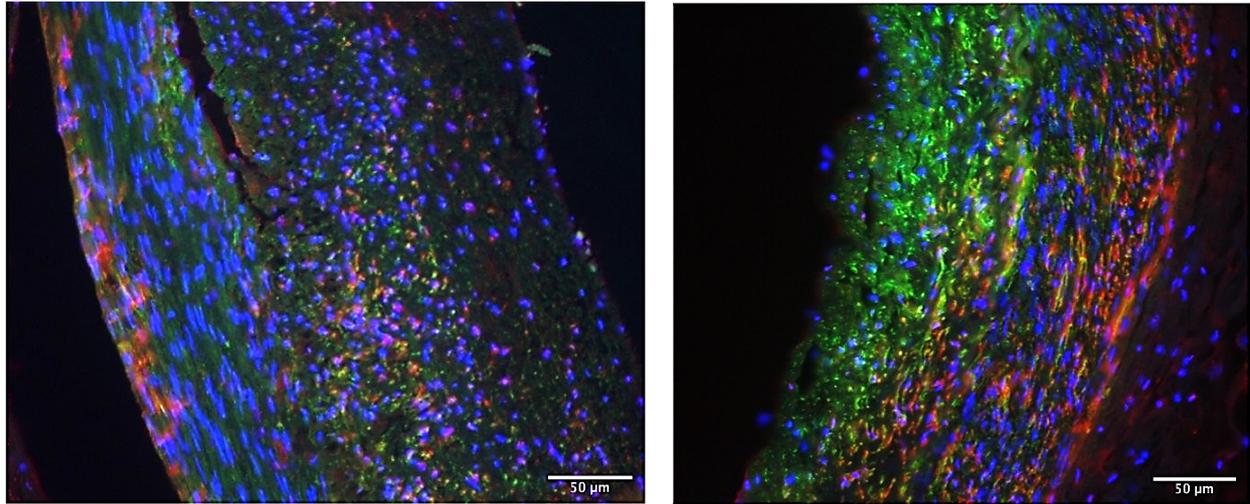


Abbildung 29a (rechts): Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie der atherosklerotisch veränderten RCA einer 55-jährigen Patientin. 5 μ m dicker Querschnitt. Man sieht eine allgemeine Verdickung der Gefäßwand bei insgesamt reduzierter Expression von α SMA. In der Tunica media sind fast keine ACADM-positiven Bereiche zu erkennen. In der Tunica intima sind einzelne anfärbare Zellen zu erkennen, wobei auffällt, dass diese eher rosa statt rot erscheinen. 20-fache Vergrößerung. **Abbildung 29b (links):** Aufnahme eines 5 μ m Querschnitts durch die gesunde RCA einer 59-jährigen Patientin mit dem Fluoreszenzmikroskop. Im Vergleich zu Abbildung 29a fällt sowohl eine deutlich stärkere Expression von α SMA, als auch der ACADM auf. In dieser Probe sind die ACADM-positiven Bereiche vor allem in der Tunica media zu finden. 20-fache Vergrößerung.

■ COX IV ■ DAPI ■ α SMA

Auch die gemessenen Werte bezüglich der ACADM-Expression durch glatte Gefäßmuskelzellen wurde in Sary-Atherosklerose-Stadien aufgeteilt (siehe Tabelle 10). Dabei sind in gesunden Gefäßen und frühen atherosklerotischen Läsionen relativ konstante Mittelwerte erkennbar, während die Expression in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien deutlich abnimmt.

Atherosklerose Stadium nach Sary-Klassifikation	N	Mittelwert (SD)
Normales Gefäß	5	0,419 (0,26)
Stadium I	6	0,464 (0,16)
Stadium II	4	0,416 (0,27)
Stadium III	4	0,441 (0,15)
Stadium IV	2	0,511 (0,12)
Stadium Va	6	0,365 (0,15)
Stadium Vb	1	0,196
Stadium VI	2	0,336 (0,004)

Tabelle 10: Anteil der ACADM-exprimierenden Zellen an der Gesamtheit der α SMA-positiven Zellen aufgeschlüsselt nach Atherosklerose-Stadien.

4.3. Elektronenmikroskopie

Um die Veränderungen des Stoffwechsels in glatten Gefäßmuskelzellen nicht nur über Modifikationen auf Ebene der Proteinexpression zu analysieren, wurde die Elektronenmikroskopie gewählt, um sich dem metabolischen Wandel über eine zweite Methode zu nähern. Diese ermöglichte es, die Mitochondrien als zentrale Organelle des Energiestoffwechsels in ihrer Morphologie und Anzahl zu untersuchen. Wie bereits unter 1.9 erwähnt, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit den Aufarbeitungsprozess humaner Gefäßproben für die Weiterverarbeitung zur Elektronenmikroskopie zu optimieren. Da unsere Arbeitsgruppe bisher nur Erfahrungen mit der Elektronenmikroskopie von murinen Gefäßproben hatten, waren vor allem die veränderten Größendimensionen eine Herausforderung. Bei den ersten Entnahmen wurden kleine Quadrate aus der Gefäßwand mit einer Kantenlänge von 1-2 mm entnommen, um ein möglichst schnelles Durchdringen der gesamten Probe durch das Glutaraldehyd und so eine gute Fixierung der Mitochondrien zu erreichen. Bei diesem Vorgehen war jedoch die Orientierung schon im Semidünnschnitt sehr schwierig, sodass zu einer anderen Methode bei der Präparation übergegangen werden musste.

Wie unter 3.9 beschrieben, stellte sich die Anfertigung sehr dünner Gefäßquerschnitte als bester Kompromiss zwischen erhaltener Orientierung innerhalb der Probe und optimaler Fixierung der Mitochondrien dar (siehe Abbildung 31b).

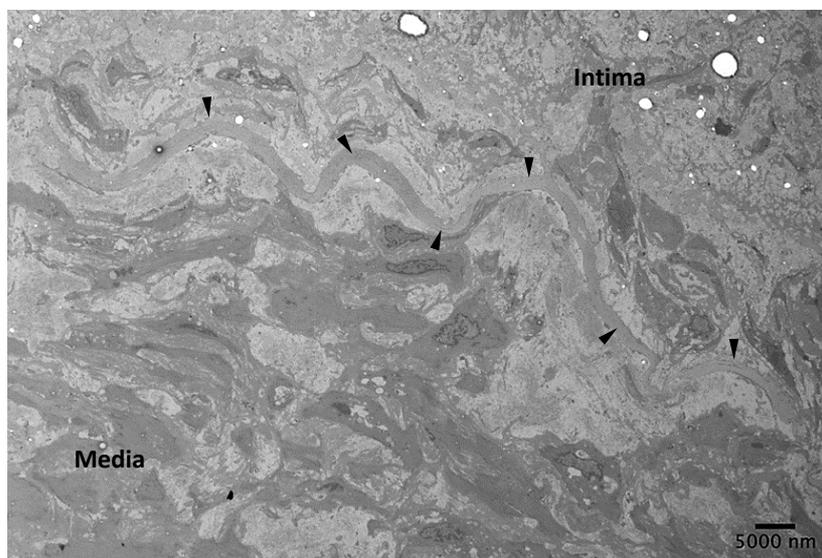
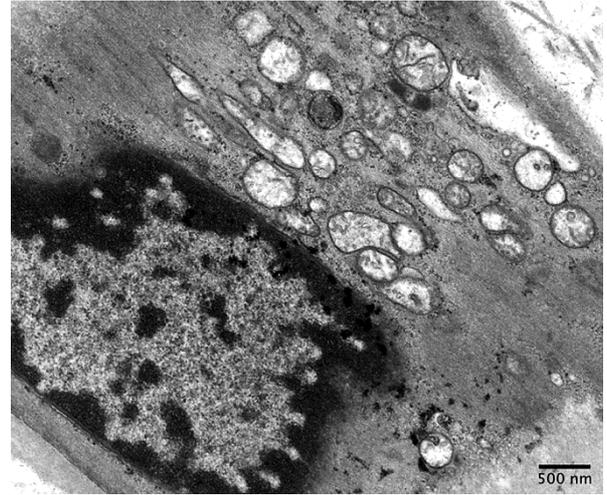
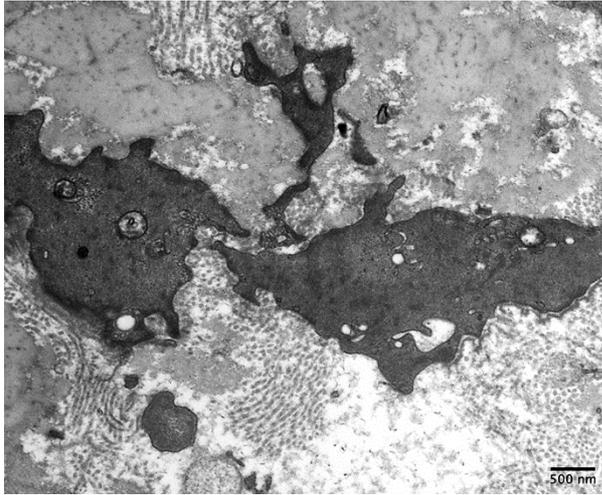


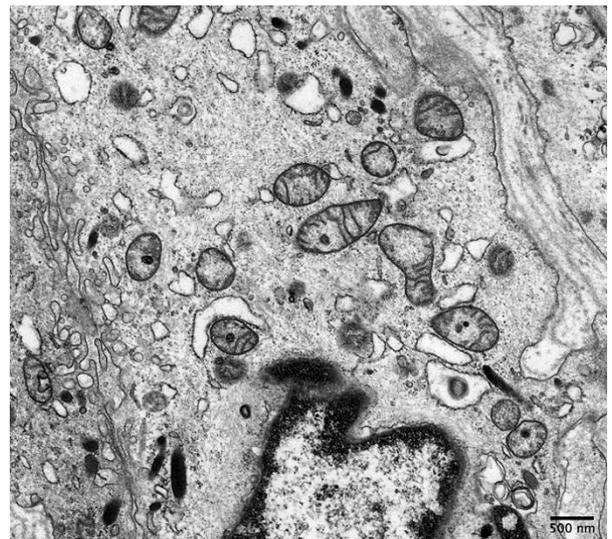
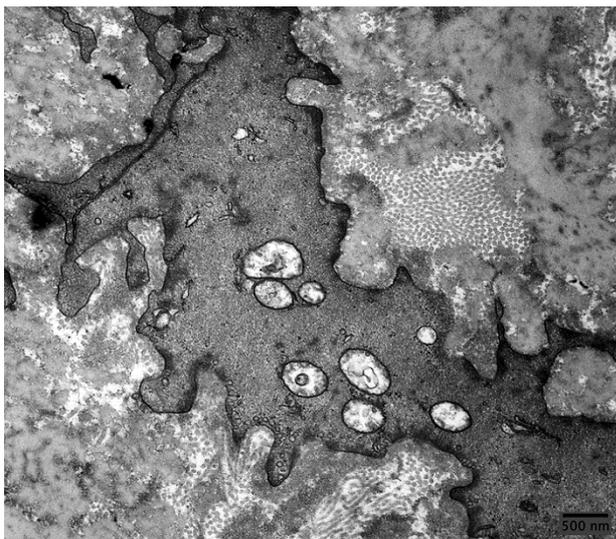
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme in 770-facher Vergrößerung. Mit Pfeilen ist die Membrana elastica interna markiert, sodass der Übergang von Intima zu Media erkennbar ist. Durch diese Übersichtsaufnahmen konnte später durch Fokussierung und Vergrößerung eines bestimmten Bildbereichs gezielte Aufnahmen von Intima oder Media erfolgen.



Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Koronararterien in 12.930-facher Vergrößerung

Abbildung 31a (links): Dieses Bild entstand im Rahmen erster Probeaufnahmen. Es sind nur vereinzelt Mitochondrien zu erkennen, wobei bei den abgebildeten Mitochondrien die inneren Strukturen (wie bspw. Cristae) kaum sichtbar sind. **Abbildung 31b (rechts):** Diese Aufnahme entstand, nachdem der Aufbereitungsprozess der Proben optimiert wurde. Hier sind die Mitochondrien inklusive ihrer inneren Strukturen deutlich besser zu erkennen.

Ein weiteres Problem, auf das wir stießen, waren die z.T. enormen Verkalkungen atherosklerotischer Proben, die durch ihre Beschaffenheit eine potentielle Gefahr für das Diamantmesser zur Anfertigung von Ultradünnschnitten darstellten. Daher testeten wir zunächst an einigen Probeschnitten, wie sich die Entkalkung der Proben durch 0,27M EDTA-Entkalkungslösung (pH 7.4) nach der Fixierung auf die Qualität der Proben auswirkt. Glücklicherweise konnten wir hier keine negativen Effekte feststellen (siehe Abbildungen 32a und 32b) und führten die Entkalkung bei allen folgenden Proben durch.



Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Koronararterien in 12.930-facher Vergrößerung

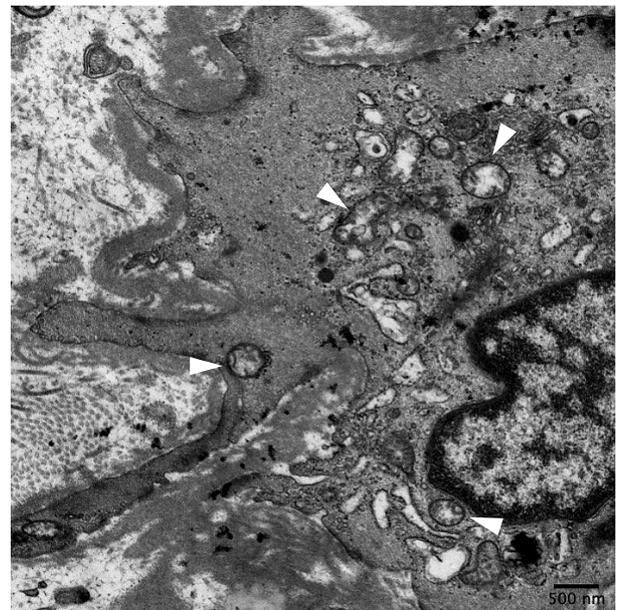
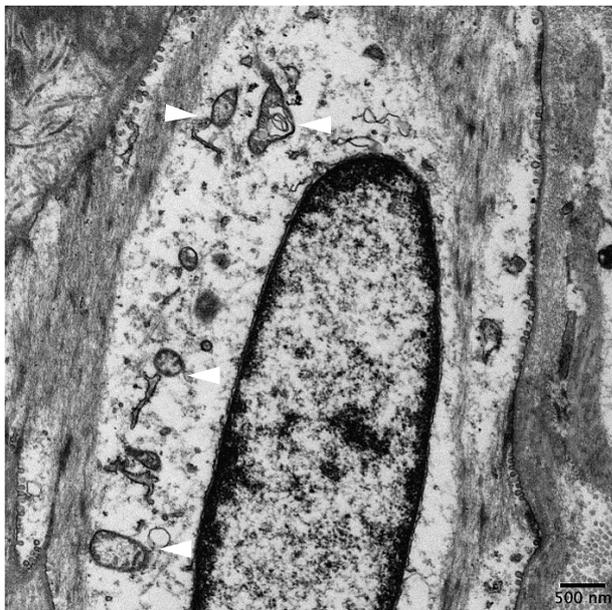
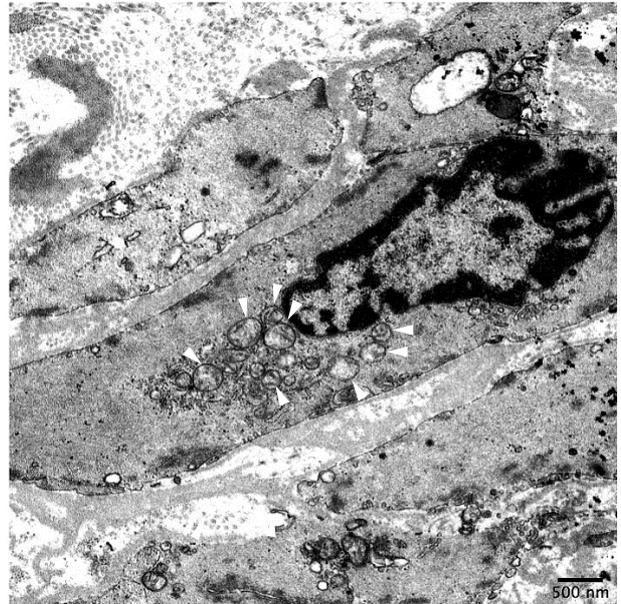
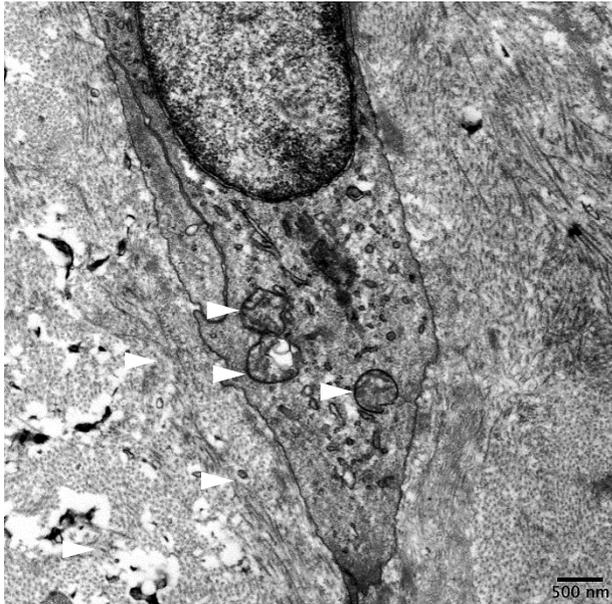
Abbildung 32a (links): Aufnahme einer Probe ohne Entkalkung. **Abbildung 32b (rechts):** Aufnahme einer Probe nach Entkalkung. Negative Auswirkungen auf die Mitochondrienmorphologie sind nicht auszumachen

Nachdem dieses Verfahren etabliert war, lieferten die so behandelten Proben zuverlässig qualitativ hochwertige Ergebnisse. Durch die beschriebenen Herausforderungen, welche die Elektronenmikroskopie mit sich brachte, konnten mit dieser Methodik letztendlich nur wenige Proben in die abschließende Analyse einbezogen werden, die aber dennoch interessante Ergebnisse lieferte. So waren einerseits deutliche Unterschiede in der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle wahrnehmbar: in glatten Gefäßmuskelzellen der Media gesunder Gefäße fiel die Zahl mehr als doppelt so hoch aus, wie in denen atherosklerotischer Gefäße (siehe Tabelle 11). Andererseits scheint auch die Größe der Mitochondrien im Rahmen von Atherosklerose eine erhebliche Änderung zu erfahren. Dementsprechend fiel die mitochondriale Fläche in atherosklerotischen Proben durchschnittlich knapp doppelt so hoch aus, wie in gesunden Gefäßen.

Abgesehen von Anzahl und Größe wurden auch ein Parameter zur Analyse der Mitochondrienmorphologie bestimmt (Circularity), wobei hier nahezu keine Veränderungen zu verzeichnen waren.

	Intima Fälle (n=2)	Intima Kontrolle (n=1)	Media Fälle (n=2)	Media Kontrolle (n=1)
Mitochondrien pro 10 μm^2 Zellfläche	2,6	4,8	2,1	4,3
Mitochondriale Größe in μm^2	0,18	0,101	0,21	0,102
Anteil mitochondrialer Fläche an gesamter Zellfläche	4,68 %	4,84 %	4,41 %	4,38 %
Circularity	0,81	0,86	0,82	0,81

Tabelle 11: Überblick über die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie. In der Fallgruppe handelt es sich jeweils um Mittelwerte.



Elektronenmikroskopische Aufnahmen glatter Gefäßmuskelzellen humaner Koronararterien in 12.930-facher Vergrößerung.

Abbildung 33a (oben links): Tunica Intima einer atherosklerotisch veränderten humanen Koronararterie. Die Mitochondrien sind mit Pfeilen markiert und imponieren recht groß.

Abbildung 33b (oben rechts): Tunica Intima einer gesunden humanen Koronararterie. Es sind mehrere glatte Gefäßmuskelzellen angeschnitten. Die Mitochondrien der mittleren Zelle sind mit Pfeilen markiert und sind im Vergleich zu denen auf Abbildung 33a deutlich kleiner.

Abbildung 33c (unten links): Tunica Media einer atherosklerotisch veränderten humanen Koronararterie. Die Mitochondrien sind mit Pfeilen markiert und scheinen z.T. deutlich vergrößert.

Abbildung 33d (unten rechts): Tunica Media einer gesunden humanen Koronararterie. Einige Mitochondrien sind exemplarisch mit Pfeilen markiert.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Insgesamt zeigten sich bezüglich aller untersuchten Enzyme Veränderungen im Expressionsmuster durch glatte Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Gefäßen. Besonders eindeutig fielen die Ergebnisse dabei hinsichtlich der PFKB als geschwindigkeitsbestimmendem Enzym der Glykolyse aus. Hier konnte eine signifikante Erhöhung der Expression durch α SMA-positive Zellen gezeigt werden. In Bezug auf die IDH2, als Enzym des Citratzyklus, gingen die Ergebnisse in die entgegengesetzte Richtung: hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Expression durch glatte Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose. Hinsichtlich Laktatweg, β -Oxidation und oxidativer Phosphorylierung zuzuordnenden Enzymen konnten zwar keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden, jedoch liefern die Ergebnisse auch hier Hinweise auf eine erhöhte Expression der LDHA, bei gleichzeitig verminderter Expression von ACADM und COX IV. In Abbildung 34 sind die zusammengefassten Ergebnisse graphisch dargestellt.

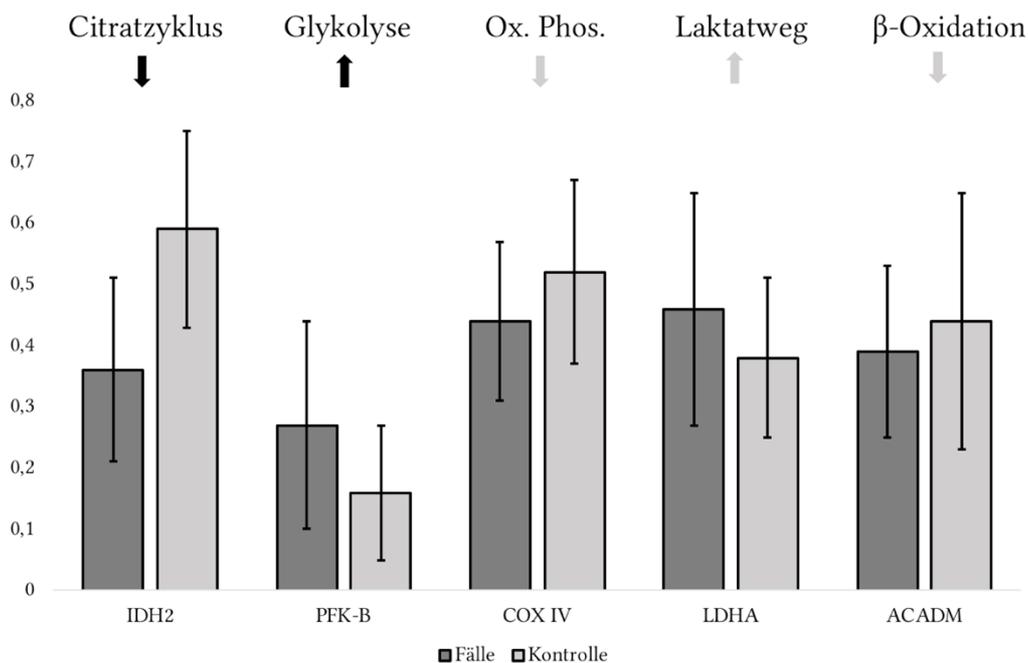


Abbildung 34: Übersicht über die Ergebnisse der Immunhistochemie. Es ist jeweils der Anteil der Enzym-positiven Fläche an der α SMA-positiven Fläche dargestellt. Oberhalb der Balken sind die Stoffwechselwege vermerkt, an denen die untersuchten Enzyme beteiligt sind. Die Trends in atherosklerotischem Gewebe sind durch Pfeile markiert, wobei signifikante Veränderungen durch schwarze und nicht-signifikante Veränderungen durch graue Pfeile gekennzeichnet sind.

Die Ergebnisse, aufgeteilt nach Stary-Klassifikation, sind in den Abbildungen 35a und 35b zusammengefasst, wobei in Abbildung 35a die glykolytischen und in Abbildung 35b die mitochondrialen Enzyme dargestellt sind. Hier wird deutlich, dass trotz einiger „Ausreißer“ insgesamt eine kontinuierliche Entwicklung beobachtet werden kann. Dementsprechend kommt es

zu einem relativ stetigen Anstieg der Expression glykolytischer Enzyme, während die Expression mitochondrialer Enzyme in der Tendenz sinkt. Jedoch ist zu beachten, dass die Fallzahlen in den einzelnen Stadien zu gering sind, um anhand dieser Ergebnisse eine eindeutige Aussage über Beginn und Entwicklung metabolischer Veränderungen in glatten Gefäßmuskelzellen durch Atherosklerose treffen zu können.

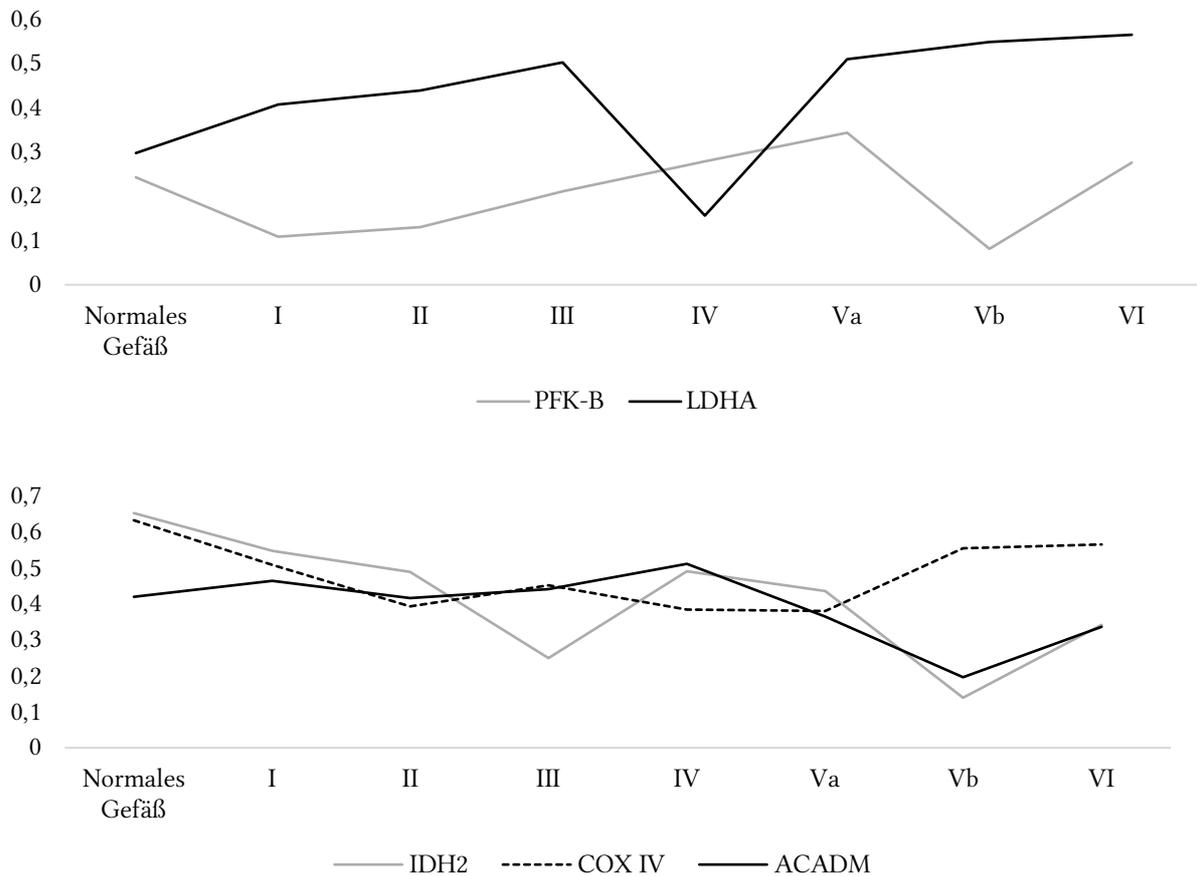


Abbildung 35a: Entwicklung des Anteils glatter Gefäßmuskelzellen, welche die untersuchten glykolytischen Enzyme exprimieren in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Es sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Stadien angegeben. Die PFK-B-Expression zeigt, mit Ausnahme von Stadium IV, eine kontinuierliche Zunahme, während bezüglich der LDHA-Expression kein klarer Trend erkennbar ist.

Abbildung 35b: Entwicklung des Anteils glatter Gefäßmuskelzellen, welche die untersuchten mitochondrialen Enzyme exprimieren in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Es sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Stadien angegeben. Bei IDH2 und ACADM wird eine relative kontinuierliche Abnahme deutlich, während die COX IV-Expression in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien erneut ansteigt.

5. Diskussion

5.1. Metabolische Veränderungen in glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose

In dieser Studie wurden metabolische Veränderungen von glatten Gefäßmuskelzellen im Zusammenhang mit Atherosklerose untersucht. Zu diesem Zweck wurden über immunhistochemische Untersuchungen die Expressionsmuster der glatten Gefäßmuskelzellen von Enzymen der Glykolyse, des Citratzyklus, der oxidativen Phosphorylierung und der β -Oxidation in atherosklerotischen und Kontrollgefäßen bestimmt.

5.1.1. Durch Atherosklerose verändern sich die Expressionsmuster von Schlüsselenzymen der Glykolyse und des Citratzyklus in glatten Gefäßmuskelzellen

Durch die immunhistochemischen Analysen zeigte sich, dass glatte Gefäßmuskelzellen im Kontext von Atherosklerose zur erhöhten Expression der PFKB neigen. Als Schlüsselenzym der Glykolyse ist die Verfügbarkeit der PFKB der geschwindigkeitsbestimmende Faktor dieses Stoffwechselwegs. Die PFKB katalysiert dabei die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat und kann, wie unter 1.6.1 beschrieben, durch HIF-1, d.h. im Rahmen von Hypoxie, induziert werden. Die Beteiligung von HIF-1 an der Induktion der PFKB-Expression im Rahmen von Atherosklerose ist durchaus denkbar. Kommt es zu einer starken Zunahme des Gefäßwanddurchmessers, wird die Nähr- und Sauerstoffversorgung aus Gefäßlumen und Vasa vasorum gefährdet und es kann zu hypoxischen Zuständen kommen.¹⁶⁶

Die signifikant verstärkte Expression der PFKB ist ein starker Hinweis für eine erhöhte glykolytische Aktivität der glatten Gefäßmuskelzellen. Sowohl in Tumorzellen, als auch im Rattenmodell, konnte eine gesteigerte glykolytische Aktivität im Rahmen von erhöhter PFKB-Expression gezeigt werden.^{167,168} In diesen Studien kam es sowohl zu einer erhöhten Aufnahme von Glucose durch die Zellen, als auch zu einem Anstieg der Konzentration von Fructose-2,6-Bisphosphat, dem Produkt der PFKB.

In Kapitel 1.6.1 wurde ebenfalls der mögliche Einfluss der PFKB auf den Zellzyklus bei Lokalisation im Nukleus durch vermehrte Phosphorylierung eines Tumorsuppressorgens und damit Hemmung der Apoptose thematisiert. Da in den Proben atherosklerotischer Koronararterien nur wenig Kolo-kalisation von Nuklei und PFKB zu sehen war, scheinen im Rahmen von Atherosklerose keinen antiapoptotischen Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen zu wirken. Die Ergebnisse der humanen Proben, passen darüber hinaus zu unveröffentlichten Ergebnissen des Labors Dr. Althoff

aus der Zellkultur und dem Mausmodell. Im Mausmodell wurde in der qPCR nach Ligatur der *A. carotis communis*, die zu Dedifferenzierung, verstärkter Proliferation und erhöhter Migration der glatten Gefäßmuskelzellen führt, ebenfalls eine Erhöhung der PFKB im Vergleich zu den Kontrollgefäßen festgestellt. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Wie unter 1.6.1 dargelegt, wurde eine erhöhte PFKB-Expression in der Vergangenheit auch bereits in Endothelzellen beobachtet.¹³⁵ Bezüglich dieses Zelltyps ist eine erhöhte glykolytische Aktivität und damit die Verfügbarkeit der PFKB besonders für die Proliferation und Migration im Rahmen von Angiogenese ein entscheidender Faktor – ein *Silencing* der PFKB kann dementsprechend zur Hemmung der Gefäßneubildung führen.¹⁶⁹ Hier stellt sich nun die Frage ob für eine gesteigerte Bereitschaft von Endothelzellen zu Proliferation und Migration vor allem die erhöhte glykolytische Aktivität oder die antiapoptischen Effekte im Zellkerne durch die PFKB entscheidend sind. Zu dieser Problematik wurde bereits im Mausmodell die Lokalisation der PFKB innerhalb von Endothelzellen untersucht. Hier zeigte sich, analog zu den Ergebnissen dieser Studie, dass die PFKB vorwiegend zytosolisch und nicht im Nukleus lokalisiert ist.¹⁶⁹ Dieses Resultat impliziert, dass die PFKB auch unabhängig von ihrer Lokalisation innerhalb von Zellen deren Proliferations- und Migrationsverhalten steigern kann beziehungsweise für diese Fähigkeiten erforderlich ist. Es wäre also durchaus denkbar, dass auch glatte Gefäßmuskelzellen in diesen Prozessen eine gewisse Abhängigkeit von einer hohen Verfügbarkeit der PFKB aufweisen. Betrachtet man nun den unter 1.2.5 erläuterten Stellenwert von Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen für die pathogenetischen Prozesse atherosklerotischer Läsionen, wird die Bedeutsamkeit dieses möglichen Zusammenhangs deutlich.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie lieferten außerdem Hinweise auf Veränderung des mitochondrialen Stoffwechsels im Kontext der Atherosklerose. Wie bereits unter 1.2.5 beschrieben, zeigten sich in den vorangegangenen Studien dieses Projektes *in vitro* und im Mausmodell Hinweise auf eine Repression der mitochondrialen Energiegewinnung, unter anderem durch verminderte Anzahl mitochondrialer DNA-Kopien und verminderter Expression mitochondrialer Enzyme. In der Untersuchung der humanen Proben konnte nun eine signifikante Abnahme der IDH2-Expression, einem Enzym des Citratzyklus, durch glatte Gefäßmuskelzellen atherosklerotischer Gefäße gezeigt werden.

Da der Citratzyklus kein Schlüsselenzym besitzt, kann stets nur eine Hemmung, beziehungsweise Aktivierung, der einzelnen Reaktionsschritte erfolgen. So kann man im Zuge der IDH2-Verminderung höchstwahrscheinlich von einer reduzierten Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und damit von einer verminderten NADH/H⁺-Produktion ausgehen. Wie sich diese

Inhibition auf die Gesamtheit des Citratzyklus auswirkt, ist jedoch unklar, da α -Ketoglutarat auch durch alternative Stoffwechselwege aus L-Glutamat synthetisiert werden kann.

Die Einflüsse einer veränderten IDH2-Expression auf die Mitochondrien sind jedoch weitreichender. So kommt es im Zuge von IDH2-Defizienz zur vermehrten Produktion von ROS, zur verminderten Expression von Komplexen der oxidativen Phosphorylierung, sowie zur veränderten Expression mitochondrialer Fusionsproteine und damit zu einem dysfunktionalen Zustand der Mitochondrien.¹⁶⁷ Auch bezüglich der IDH2-Expression konnten in der Zellkultur und im Karotis-Ligatur-Mausmodell analoge Beobachtungen gemacht werden. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Passend zu der Hypothese, dass Atmungskettenkomplexe durch verminderte Verfügbarkeit der IDH2 weniger exprimiert werden, bestätigte sich dies in der Untersuchung der COX IV Expression, wobei die Abnahme knapp unter dem festgelegten Signifikanzniveau von $p=0,05$ blieb. Eine Reduktion der Expression von COX IV durch glatte Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose kann einerseits als Hinweis auf eine verminderte Aktivität der Atmungskette, aber auch als Zeichen einer reduzierten Mitochondrienzahl interpretiert werden.

Geht man nun durch die reduzierte Expression von COX IV und IDH2 von einer verminderten Metabolisierung von durch die Glykolyse entstandenem Pyruvat über Citratzyklus und Atmungskette aus, stellt sich die Frage wie dieses stattdessen verstoffwechselt wird.

Als alternativer Stoffwechselweg steht der Zelle die Milchsäuregärung zur Verfügung. Dabei wird Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert, wobei NAD^+ regeneriert werden kann. Diese Rolle macht die LDH zu einem Schlüsselenzym der anaeroben Glykolyse. Als Indiz für eine vermehrte Laktatproduktion, konnte in den atherosklerotischen Proben ein Anstieg der LDHA-Expression nachgewiesen werden.

Zwar blieb diese Veränderung unter dem festgelegten statistischen Signifikanzniveau, jedoch konnten in bisherigen Studien der Forschungsgruppe ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So kam es in der Zellkultur nach Applikation von PDGF und im Mausmodell nach Karotisligatur zu einer Erhöhung der LDHA in der qPCR. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Eine verminderte LDHA-Konzentration konnte in Studien in der Zellkultur mit einer verminderten Sekretion von Laktat in Verbindung gebracht werden, wodurch man vermuten kann, dass das Expressionslevel der LDHA auch mit der tatsächlichen Laktatproduktion zusammenhängt.¹⁷⁰ Zumal die LDHA, wie auch die PFKB, durch HIF-1 induziert werden kann, ist dies eine denkbare Ursache für die Überexpression im Rahmen von Atherosklerose. Weiterhin besteht die Hypothese,

dass Veränderungen in der LDHA-Expression sich auch auf das Proliferations- und Migrationsverhalten glatter Gefäßmuskelzellen auswirken.¹³⁹ Dabei scheint die LDHA für die Reaktionsfähigkeit glatter Gefäßmuskelzellen auf Wachstumsfaktoren wie PDGF erforderlich zu sein.¹³⁹ Da es im Rahmen von Atherosklerose bekanntermaßen zu einer erhöhten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und einer erhöhten Migration innerhalb der Gefäßwand kommt, ist es ebenfalls vorstellbar, dass die Überexpression der LDHA diesem Zweck dient.

Am wenigsten aussagekräftig blieben die Ergebnisse aus der Analyse der ACADM-Expression. Dieses Enzym ist im Rahmen der β -Oxidation von Fettsäuren speziell am Abbau mittelkettiger Fettsäuren beteiligt. Indirekt wirkt die ACADM, vermutlich durch Verbindung mit dem OXPHOS Superkomplex, auch auf die Atmungskette, wodurch es bei einem Mangel oder Defekt der ACADM zu einer Reduktion der oxidativen Phosphorylierung kommt.^{141,153}

Besonders in der Kontrollgruppe wiesen die gemessenen Werte eine hohe Streuung auf, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Dennoch ist eine leichte Tendenz in Richtung Abnahme der ACDM-Expression im atherosklerotischen Gewebe erkennbar. Durch Experimente in der Zellkultur konnte in der Arbeitsgruppe eine Herunterregulation der ACADM-Expression nach Inkubation mit Cholesterol sowie nach Inkubation mit PDGF auch im Mausmodell gezeigt werden. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten) Inwiefern die β -Oxidation in humanen glatten Gefäßmuskelzellen im Zuge von Atherosklerose beeinträchtigt wird, bleibt unklar, zumal die ACADM keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der β -Oxidation katalysiert.

Insgesamt spiegelt sich die hohe phänotypische Versatilität glatter Gefäßmuskelzellen in den Ergebnissen der Immunhistochemie wider. Die im Rahmen von Atherosklerose deutlich veränderten Expressionsmuster legen nahe, dass sie in der Lage sind ihren Stoffwechsel an lokale Begebenheiten anzupassen. Diese veränderte Expression metabolischer Enzyme, scheint nicht zwingend mit einer starken Veränderung des Expressionsmusters für glatte Gefäßmuskelmarker einherzugehen. Wäre dies der Fall gewesen, hätte die metabolische Verschiebung in dieser Studie nicht detektiert werden können, da hier die Identifikation von glatten Gefäßmuskelzellen allein über den klassischen glatten Gefäßmuskel-Marker α -SMA erfolgte. Die insgesamt beobachtete erhöhte Expression glykolytischer Enzyme, bei gleichzeitig verminderter Expression von Enzymen des aeroben mitochondrialen Metabolismus, passt ebenfalls zu den Ergebnissen, die innerhalb der Arbeitsgruppe im *in vitro* Seahorse-Experiment erhalten wurden. Bei diesem Experiment wurden murine glatte Gefäßmuskelzellen mit PDGF oder Cholesterol inkubiert und dabei die mitochondriale Atmung (in Form von Sauerstoffverbrauch), sowie die glykolytische Aktivität (in

Form der extrazellulären Azidifizierung durch Laktat) gemessen. Dabei konnte im Vergleich zu Kontrollzellen eine Steigerung der glykolytischen Aktivität, sowie eine leichte Abnahme des Sauerstoffverbrauchs durch die Mitochondrien beobachtet werden. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Weiterhin unbekannt bleiben die Mechanismen, durch die es in glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose zu den beschriebenen Veränderungen kommt. Hier ist HIF-1 als ein potentieller Auslöser, zumindest bezüglich der Induktion glykolytischer Enzyme, zu nennen. Jedoch sind auch Auswirkungen auf den mitochondrialen Stoffwechsel denkbar. Obwohl HIF-1 nicht direkt auf die Transkription der IDH2 wirkt, wird doch auf anderer Ebene in den Citratzyklus eingegriffen. Durch Induktion der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), wird die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und somit ein wichtiger Schritt des Citratzyklus gehemmt.¹⁷¹ In Atherosklerose-Modellen an ApoE^{-/-} Mäusen, konnte durch die Inhibition des HIF-1 *Pathways* eine Reduktion von atherosklerotischen Veränderungen an der murinen Gefäßwand gezeigt werden, was die Rolle von HIF-1 und seinen Zielgenen bei der Pathogenese von Atherosklerose unterstreicht.¹⁷²

5.1.2. Veränderte mitochondriale Dynamik in glatten Gefäßmuskelzellen im Zusammenhang mit Atherosklerose

Um metabolische Veränderungen glatter Gefäßmuskelzellen auch auf dem Niveau der Zellorganellen, speziell auf Ebene der Mitochondrien, zu untersuchen, wurde neben den immunhistochemischen Analysen auch die Elektronenmikroskopie genutzt. Wie unter 5.1.1 beschrieben, sollte so der Frage nachgegangen werden, ob die reduzierte Expression mitochondrialer Enzyme durch glatte Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose als Zeichen für eine reduzierte Mitochondrienanzahl interpretiert werden kann. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich eine Abnahme der Mitochondriendichte, bei gleichzeitiger Zunahme der durchschnittlichen Mitochondrienfläche in den atherosklerotischen Proben. Im Zuge dieser Beobachtung erhalten die Ergebnisse der Immunhistochemie als Anhaltspunkte für eine Repression der aeroben Energiegewinnung noch mehr Gewicht.

Analog zu dem beobachteten Wandel in humanen Proben, fielen ähnliche Veränderungen auch im Mausmodell nach Karotisligatur auf. Hier zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Mitochondriendichte, sowie eine dezente Zunahme der mitochondrialen Größe. In den murinen Proben wurde zusätzlich auch der Gehalt an mitochondrialer DNA bestimmt, welcher nach Ligatur ebenfalls verringert war. (Wöltje K, unveröffentlichte Daten)

Auffallend in den humanen Proben war, dass trotz erheblicher Reduktion der Mitochondrienzahl im Zusammenhang mit Atherosklerose durch die gleichzeitige Größenzunahme, der Anteil der Fläche, die in einer Zelle durchschnittlich durch Mitochondrien eingenommen wird, relativ konstant geblieben ist (siehe Tabelle 11). Die verringerte Zahl, aber erhöhte Größe der Mitochondrien könnte darauf hindeuten, dass Mitochondrien im Rahmen ihrer verringerten metabolischen Aktivität in Zellen atherosklerotischer Gefäße eher zu Fusion, als zu Fission neigen. Die Regulationsmechanismen der mitochondrialen Dynamik sind in Kapitel 1.3 nachzulesen. Nach den dort erläuterten Prinzipien führt eine milde Form des Zellstress, wie beispielsweise in Form von Nährstoffmangel zu einer vermehrten Fusion von Mitochondrien, während es unter schwerem Zellstress eher zur Fission kommt.¹⁰¹ Die in atherosklerotischen Läsionen herrschenden Bedingungen für die Zellen, wären durch das reduzierte Angebot von Nährstoffen und Sauerstoff durchaus mit mildem Zellstress vereinbar und die gemessenen Werte würden so zu diesem Konzept passen.

Die beschriebene Umstellung der mitochondrialen Dynamik könnte ebenfalls durch eine, im Zuge der IDH2-Defizienz entstandene, erhöhte Verfügbarkeit des mitochondrialen Fusionsproteins OPA-1 zustande kommen. Im Gegensatz dazu gingen vorherige Studien davon aus, dass die verringerte Expression von Mfn-1 im Rahmen eines IDH2-Mangels, die vermehrte Expression von OPA-1 überwiegt und es dadurch bei IDH2-Defizienz eher zu einer erhöhten Fragmentation von Mitochondrien kommt.¹⁴³ Im Rattenmodell wurde eine vermehrte mitochondriale Fragmentation außerdem mit Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen in Verbindung gebracht.¹⁷³

In jedem Falle deutet eine Imbalance zwischen mitochondrialer Fusion und Fragmentation auf dysfunktionale mitochondriale Prozesse hin, die in der Regel mit einer verstärkten Bildung von ROS einhergehen.¹⁰⁴ Der verstärkte Anfall von ROS hat wiederum atherogene Effekte, die unter 1.3 bereits beschrieben wurden.

Die Beobachtungen der Elektronenmikroskopie sprechen schlussendlich sowohl dafür, dass sich die mitochondriale Dynamik im Rahmen von milder Hypoxie in Richtung Fusion entwickelt (siehe Abbildung 11), als auch, dass eine veränderte Mitochondrienfunktion direkte Auswirkungen auf den Progress atherosklerotischer Läsionen hat.

Die Beurteilbarkeit der Morphologie und der Funktionalität von mitochondrialen Netzwerken, allein über die Elektronenmikroskopie bleibt jedoch limitiert. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, bilden die Mitochondrien innerhalb der Zelle ein hochdynamisches Netzwerk, dass sich im stetigen Wandel befindet, sodass die Elektronenmikroskopie immer nur eine Momentaufnahme dieses Prozesses wiedergeben kann. Zudem wird durch die Elektronenmikroskopie stets nur ein

zweidimensionales Bild erzeugt, wodurch die tatsächliche Form und Anzahl der Mitochondrien innerhalb einer Zelle ebenfalls nicht gänzlich abgebildet werden kann.

Trotz der methodisch bedingten Limitationen erschienen die Mitochondrien glatter Gefäßmuskelzellen insgesamt im Rahmen von Atherosklerose in ihrer Zahl vermindert und in ihrer Dynamik verändert zu sein.

Allerdings sind die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie nicht nur durch die Methodik, sondern auch durch die geringe Fallzahl in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Hier wäre unbedingt eine tiefergehende Untersuchung unter verbesserten methodischen Bedingungen notwendig, um eine eindeutigere Aussage auf dieser Ebene treffen zu können.

5.2. Beurteilung der Methodik

Aufgrund der Tatsache, dass alle Proben im Rahmen von Herztransplantationen gewonnen wurden, stammen sie ausnahmslos von kardial vorerkrankten Patienten. Es ist nicht auszuschließen, dass im Rahmen von kardialer Remodellierung bei Kardiomyopathien, die bei den meisten Patienten die zur Transplantation führende Grunderkrankung waren (siehe Tabelle 4), eventuell auch Veränderungen des Stoffwechsels von glatten Gefäßmuskelzellen hervorgerufen werden, die so bei anderen Patienten mit Atherosklerose nicht auftreten würden. Andererseits könnte die kardiale Vorbelastung der Patienten auch in nicht-atherosklerotisch veränderten Gefäßen zu einer Umstellung des Metabolismus glatter Gefäßmuskelzellen geführt haben und so die tatsächlichen Unterschiede zwischen gesundem und krankem Gefäß verfälschen.

Kritisch ist außerdem zu betrachten, dass in dieser Arbeit teilweise Fall- und Kontrollproben vom selben Patienten stammten. Hatte ein Patient beispielsweise eine atherosklerotische Läsion im RIVA, aber einen unauffälligen RCX, so wurde die eine Koronararterie der Fall- und die andere der Kontrollgruppe zugeführt. Geht man nun davon aus, dass es sich bei der Atherosklerose um eine systemische Erkrankung handelt, stellt dies den Einsatz von Kontrollproben aus Patienten, die bereits in anderen Gefäßabschnitten atherosklerotische Veränderungen zeigen, in Frage. Andererseits wird es in der Altersgruppe, in der sich ein Großteil des Fallgruppenkollektivs befindet, kaum Individuen geben, die nicht an gewissen Stellen ihres Gefäßsystems Zeichen atherosklerotischer Veränderungen aufweisen.

Zusätzlich ging der Einteilung in Fall- und Kontrollgruppe eine gründliche Beurteilung der jeweiligen Gefäßmorphologie durch die Movat-Färbung voraus, wodurch sichtbare atherosklerotische Läsionen in der Kontrollgruppe sicher ausgeschlossen werden konnten.

Wir entschieden uns in dieser Studie dazu alle immunhistochemischen Analysen in Paraffinschnitten durchzuführen, was zwar im Vergleich zur Kryofixierung eine verminderte Antigenität mit sich zieht, die Morphologie des Gefäßes dafür aber besser erhält. In der Tat blieb die Morphologie der untersuchten Proben, vor allem in den gesunden Geweben sehr gut bestehen. Bei stark atherosklerotischem Gewebe kam es teilweise zur leichten Beeinträchtigung der Struktur im Rahmen der Schnitthanfertigung. Diese Schäden konnten jedoch durch den Entkalkungsprozess vor der Paraffineinbettung und Kühlung der Paraffinblöcke vor dem Schneiden stark minimiert werden. Letztendlich konnten in den Paraffinschnitten sehr zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden und eine zu geringe Antigenität der untersuchten Proteine stellte nach ausreichend langem hitzeinduziertem *Antigenretrieval* kein Problem dar.

Lediglich die immunhistochemische Färbung der PFK-B stellte durch die geringe Expression im untersuchten Gewebe eine Herausforderung dar, weshalb die Verwendung des entsprechenden Antikörpers in einer hohen Konzentration und eine ausreichend lange Entwicklungszeit von ca. 30 Minuten mit dem Chromogen notwendig waren.

Generell unterliegt die Auswertung immunhistochemischer Färbungen stets einem gewissen subjektiven Einfluss, da beispielsweise das Wegschneiden der Adventitia durch manuelles Nachvollziehen der Membrana elastica externa erfolgte und auch das passende Niveau für Farbintensität und -helligkeit manuell festgelegt werden muss.

Dies trifft gleichermaßen auf die Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder zu, da alle Mitochondrien und Zellen manuell markiert und so ausgemessen wurden.

Bei allen immunhistochemischen Analysen ist außerdem zu beachten, dass Proben bis einschließlich Stadium II der Atherosklerose nach Sary-Klassifikation der Kontrollgruppe zugeordnet wurden. Betrachtet man nun die Expressionsmuster nach Aufteilung in die Atherosklerosestadien (siehe Abbildung 35a und 35b), fällt auf, dass die Veränderungen in der Expression schon in diesen frühen Stadien beginnen. Der tatsächliche Unterschied zwischen gesundem Gefäß und starker Atherosklerose könnte dadurch etwas unterschätzt werden.

Eine weitere Limitation der Immunhistochemie kommt durch die Methode zur Identifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen zustande. Diese erfolgte über die immunhistologische Färbung von α SMA, einem Markerprotein für glatte Gefäßmuskelzellen. Leider ist dieser Marker jedoch nicht ausreichend spezifisch, um positive Zellen eindeutig als glatte Gefäßmuskelzellen zu identifizieren, da einerseits glatte Gefäßmuskelzellen im Rahmen des phänotypischen *Switchs* die Expression dieses Markers verlieren können und andererseits auch andere Zellen in der Lage sind α SMA zu exprimieren.³⁷ Wie in Kapitel 1.2.5 beschrieben, wird davon ausgegangen, dass etwa ein Drittel der

α SMA-positiven Zellen nicht von glatten Gefäßmuskelzellen abstammen.⁴ Diese Zellen werden dementsprechend fälschlicher Weise in dieser Studie in die Analysen miteinbezogen.

Bis zum heutigen Tag gestaltet sich die sichere Differenzierung zwischen glatten Gefäßmuskelzellen und anderen α SMA-exprimierenden Zellen in humanem Gewebe äußerst schwierig. Steht einem im Tiermodell das mittlerweile relativ verbreitete *lineage tracing* zu Verfügung, ist es beim Menschen deutlich komplizierter glatte Gefäßmuskelzellen eindeutig zu erkennen (bspw. *Y-tracing* nach *cross-gender* Herztransplantation). Da vor einigen Jahren gezeigt werden konnte, dass die Demethylierung von Lysin 4 des Histons H3 (H3K4me2) am MYH11-Genlocus auch bei humanen glatten Gefäßmuskelzellen zur eindeutigen Identifizierung geeignet ist, wäre dies bei Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Antikörper eine mögliche Methode um in Zukunft sicherzustellen, dass einerseits keine falschen Zellen und andererseits auch dedifferenzierte glatte Gefäßmuskelzellen in derartige Analysen mit einbezogen werden.⁷⁸

In dieser Arbeit konnten somit in der Immunhistochemie dedifferenzierte glatte Gefäßmuskelzellen, sobald diese ihre Fähigkeit α SMA zu exprimieren verloren haben, nicht mehr erfasst werden. Gleichzeitig wurden dadurch mit Sicherheit auch einige Zellen in die Analyse miteinbezogen, die eigentlich anderen Ursprungs sind, wie beispielsweise Makrophagen. Diese Einschränkungen sollte man sich bei der Interpretation und Bewertung der Ergebnisse bewusstmachen. Nichtsdestotrotz bleibt eine Kofärbung mit α SMA zum jetzigen Zeitpunkt die beste verfügbare Möglichkeit glatte Gefäßmuskelzellen in humaner Proben zu identifizieren.

Bei der Interpretation aller Ergebnisse sollte man ebenfalls bedenken, dass ausschließlich glatte Gefäßmuskelzellen in Koronararterien untersucht wurden. Da diese embryologisch gesehen aus anderen Geweben entstammen, als die glatten Gefäßmuskelzellen von Arterien außerhalb des Myokards, ist nicht auszuschließen, dass sich glatte Gefäßmuskelzellen je nach embryologischer Herkunft im Rahmen von Atherosklerose unterschiedlich verhalten. Tatsächlich besteht sogar die Vermutung dass sich die verschiedenen Linien glatter Gefäßmuskelzellen beispielweise bezüglich ihrer Reaktion auf proatherogene Stimuli unterscheiden.¹⁷⁴

5.3. Beurteilung der statistischen Auswertung

Die Aquirierung von Proben im Rahmen von Herztransplantationen geht durch die geringen jährlichen Fallzahlen mit einem erheblichen Zeitaufwand einher, sodass in dieser Studie nur eine Fallzahl von $n=30$ erreicht werden konnte.

Selbst an einem großen Transplantationszentrum wie dem Deutschen Herzzentrum Berlin, finden jährlich nur etwa 30 Transplantationen statt, von denen zudem nicht alle für diese Studie geeignet waren, beispielsweise, weil Kinderherzen transplantiert wurden.

Zweifelsohne ist die Aussagekraft der statistischen Analysen durch die geringe Fallzahl eingeschränkt, sie wird jedoch durch die analogen Ergebnisse im Mausmodell gestützt.

Fehlende Signifikanzen bezüglich der Analyse der ACADM-, COX IV- und LDHA-Expression können also gut auf die geringe Fallzahl, aber selbstverständlich auch auf das Fehlen tatsächlich signifikanter Unterschiede in den Expressionsmustern zurückzuführen sein.

Insgesamt muss, bedingt durch die geringen Fallzahlen, das Fehlen, aber auch der Nachweis von Signifikanzen in dieser Arbeit vorsichtig interpretiert werden

Sowohl Fall-, als auch Kontrollgruppe zeigten bezüglich der Atherosklerosestadien nach Stary eine heterogene Zusammensetzung, wodurch Proben nahezu jedes Stadiums in dieser Arbeit vertreten sind. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte jedoch nur eine rein deskriptive Analyse der Ergebnisse nach Aufteilung in die Atherosklerose-Stadien erfolgen. Dies könnte in der Zukunft ein interessanter Forschungsgegenstand sein, um die metabolische Verschiebungen glatter Gefäßmuskelnzellen gegebenenfalls auch einem Zeitpunkt in der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen zuordnen zu können und so weiter zu charakterisieren.

5.4. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend liefern die erzielten Ergebnisse Anhaltspunkte für eine metabolische Verschiebung mit Parallelen zum Warburg-Effekt bei glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen von Atherosklerose. Durch die Umgebungsbedingungen in atherosklerotischen Gefäßen und atherogene Stimuli scheinen glatte Gefäßmuskelzellen die Energiegewinnung durch Glykolyse gegenüber der oxidativen Phosphorylierung bevorzugen.

Es gibt zwar die Vermutung, dass HIF-1 an der Entstehung dieser Präferenzen beteiligt ist, die genauen zellulären Mechanismen, die zur Umstellung des Metabolismus führen, sind jedoch unbekannt.

Zusätzlich zu der schon länger bekannten Fähigkeit glatter Gefäßmuskelzellen ihren Phänotyp je nach lokalen Bedingungen im Sinne eines *phenotypic switch* zu ändern, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sie dabei ihren Metabolismus anpassen, was die enorme Versatilität dieser Zelllinie unterstreicht. Zieht man in Betracht, dass die Verschiebungen im Metabolismus glatter Gefäßmuskelzellen nicht nur eine Begleiterscheinung ihrer Dedifferenzierung, sondern auch eine notwendige Voraussetzung für den Übergang in einen proatherogenen Phänotyp sind, stellt der Metabolismus glatter Gefäßmuskelzellen einen potentiellen Angriffspunkt für neue pharmakologische Therapien der Atherosklerose dar. In der Krebsforschung werden Inhibitoren von glykolytischen Enzymen bereits seit längerem als potentielle Therapeutika diskutiert, wobei unter experimentellen Bedingungen einige Erfolge hinsichtlich Reduktion des Tumorwachstums erzielt werden konnten.¹⁷⁵ Da die direkte Inhibition glykolytischer Enzyme beziehungsweise die Induktion mitochondrialer Enzyme durch ihre systemische Wirkung vermutlich nicht tolerable Nebenwirkungen zeigen würden, stellen die in Kapitel 1.8 thematisierten Sirtuine einen interessanten Ansatzpunkt dar, um den Stoffwechsel glatter Gefäßmuskelzellen gezielter zu beeinflussen.

Dadurch, dass die Veränderungen in den Expressionsmustern schon früh im Entstehungsprozess atherosklerotischer Läsion zu beginnen scheinen (siehe Abbildungen 35a und 35b) und mit Fortschreiten der Erkrankung ebenfalls eine Aggravation erfahren, ist in Betracht zu ziehen, dass die metabolischen Veränderungen maßgeblich am Progress der Atherosklerose beteiligt sein könnten. Die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung des Metabolismus glatter Gefäßmuskelzellen bei Atherosklerose könnte so ein interessantes therapeutisches Konzept der Zukunft sein.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ WHO. Cardiovascular Diseases. (zuletzt aufgerufen am 14. August 2020); Online verfügbar unter: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1.
- ² Statistisches Bundesamt. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - Ausführliche vierstellige ICD10-Klassifikation – 2018. 2020. (zuletzt aufgerufen am 16. August 2020); Online verfügbar unter: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Publikationen/Downloads-Todesursachen/todesursachen-2120400157004.pdf?__blob=publicationFile.
- ³ Frismantiene A, Philippova M, Erne P, Resink TJ. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell Signal*. 2018 Dec;52:48-64. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.08.019. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30172025.
- ⁴ Albarrán-Juárez J, Kaur H, Grimm M, Offermanns S, Wetzschureck N. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2016;251:445-453. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.012.
- ⁵ Warburg O. The Metabolism Of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*. 1925;9:148-163. doi: 10.1158/jcr.1925.148.
- ⁶ Rettig R, Kuschinsky W. Hochdrucksystem. In: Speckmann EJ, Heschler J, Köhling R, Rintelen H. *Physiologie*. London: Elsevier Health Sciences Germany; 2013. p. 406-408.
- ⁷ Leibeshöhlen und ihre Organe. In: Schiebler TH. *Anatomie*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005. p. 511. https://doi.org/10.1007/3-540-26525-2_8.
- ⁸ Luft JH: The structure and properties of the cell surface coat. *Int Rev Cytol* 1976;45:291-382.
- ⁹ Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013 Nov 9;9(10):1057-69. doi: 10.7150/ijbs.7502. PMID: 24250251; PMCID: PMC3831119.
- ¹⁰ Sperandio M., Brandes R. Autakoide. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF (eds). *Physiologie des Menschen*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. pp. 248-249 https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4_20.
- ¹¹ Rettig R, Kuschinsky W. Kreislaufregulation. In: Speckmann EJ, Heschler J, Köhling R, Rintelen H. *Physiologie*. London: Elsevier Health Sciences Germany; 2013. pp. 414-425.
- ¹² Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):535-46. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611. PMID: 26892956.
- ¹³ Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour

-
- LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S., Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2095-128. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61728-0. Erratum in: *Lancet*. 2013 Feb 23;381(9867):628.
- ¹⁴ Gösswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013; 56(5-6):650-5. DOI 10.1007/s00103-013-1666-9.
- ¹⁵ Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(10):1731-1737. doi:10.1016/j.jacc.2003.12.047.
- ¹⁶ Mazzone A, Cusa C, Mazzucchelli I, Vezzoli M, Ottini E, Ghio S, Tossini G, Pacifici R, Zuccaro P. Cigarette smoking and hypertension influence nitric oxide release and plasma levels of adhesion molecules. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39(9):822-6. doi: 10.1515/CCLM.2001.136.
- ¹⁷ Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997 May 1;336(18):1276-82. doi: 10.1056/NEJM199705013361802. PMID: 9113930.
- ¹⁸ Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang Y, Smialek J, Virmani R. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*. 1998;97(21):2110-2116. doi:10.1161/01.cir.97.21.2110.
- ¹⁹ Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual

-
- data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903-13. doi: 10.1016/s0140-6736(02)11911-8. Erratum in: *Lancet*. 2003 Mar 22;361(9362):1060. PMID: 12493255.
- ²⁰ Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503-16. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00238-0. PMID: 11239408.
- ²¹ Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J, Collins R. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010 Nov 13;376(9753):1670-81. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21067804; PMCID: PMC2988224.
- ²² Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007 Dec 1;370(9602):1829-39. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61778-4. Erratum in: *Lancet*. 2008 Jul 26;372(9635):292. PMID: 18061058.
- ²³ Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Mar 1;27(3):567-74. doi: 10.1016/0735-1097(95)00522-6. PMID: 8606266.
- ²⁴ Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njølstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J; Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med*. 2011 Mar 3;364(9):829-841. doi: 10.1056/NEJMoa1008862. Erratum in: *N Engl J Med*. 2011 Mar 31;364(13):1281. PMID: 21366474; PMCID: PMC4109980.
- ²⁵ Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, Gaziano JM, Cook NR. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction: the Reynolds Risk Score for men. *Circulation*. 2008 Nov 25;118(22):2243-51, 4p following 2251. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814251. Epub 2008 Nov 9. PMID: 18997194; PMCID: PMC2752381.
- ²⁶ Mora S, Lee IM, Buring JE, Ridker PM. Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. *JAMA*. 2006 Mar 22;295(12):1412-9. doi: 10.1001/jama.295.12.1412. PMID: 16551713.
- ²⁷ Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):369-77. doi: 10.1056/NEJM197608122950707. PMID: 819830.
- ²⁸ Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301. PMID: 26892962; PMCID: PMC4762052.
- ²⁹ Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II27-33. doi: 10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f. PMID: 15173060.
- ³⁰ Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):803-15. doi: 10.1038/nri2171. PMID: 17893694.

-
- ³¹ Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999 Jul 23;85(2):199-207. doi: 10.1161/01.res.85.2.199. PMID: 10417402.
- ³² Summerhill VI, Grechko AV, Yet SF, Sobenin IA, Orekhov AN. The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 20;20(14):3561. doi: 10.3390/ijms20143561. PMID: 31330845; PMCID: PMC6678182.
- ³³ Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Sep 18;19(11):42. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6. PMID: 28921056.
- ³⁴ Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *JAMA*. 1990 Dec 19;264(23):3047-52. PMID: 2243434.
- ³⁵ Itabe H. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. *J Clin Biochem Nutr*. 2012 Jul;51(1):1-8. doi: 10.3164/jcbn.11-00020R1. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22798705; PMCID: PMC3391857.
- ³⁶ Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2007 Aug 1;75(3):468-77. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.010. Epub 2007 Mar 14. PMID: 17442283.
- ³⁷ Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Nov;95(11):1153-1165. doi: 10.1007/s00109-017-1575-8. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28785870.
- ³⁸ Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):317-25. doi: 10.1038/nature10146. PMID: 21593864.
- ³⁹ Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-12. doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068. PMID: 16631513.
- ⁴⁰ Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2000 Sep;2(5):422-9. doi: 10.1007/s11883-000-0081-5. PMID: 11122774.
- ⁴¹ Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jan;10(1):36-46. doi: 10.1038/nri2675. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19960040; PMCID: PMC2854623.
- ⁴² JC, Dutzmann J, Haverich A, Bauersachs J. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol*. 2018 Apr 17;9:706. doi: 10.3389/fimmu.2018.00706. PMID: 29719532; PMCID: PMC5913371.
- ⁴³ Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Oct;25(10):2054-61. doi: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18. Epub 2005 Jul 21. PMID: 16037567.

-
- ⁴⁴ Ruiz JL, Hutcheson JD, Aikawa E. Cardiovascular calcification: current controversies and novel concepts. *Cardiovasc Pathol*. 2015;24(4):207-212. doi:10.1016/j.carpath.2015.03.002.
- ⁴⁵ Ruiz JL, Weinbaum S, Aikawa E, Hutcheson JD. Zooming in on the genesis of atherosclerotic plaque microcalcifications. *J Physiol*. 2016;594(11):2915-2927. doi:10.1113/JP271339.
- ⁴⁶ Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2001;103(8):1051-1056. doi:10.1161/01.cir.103.8.1051.
- ⁴⁷ Libby P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S352-7. doi: 10.1194/jlr.R800099-JLR200. Epub 2008 Dec 18. PMID: 19096046; PMCID: PMC2674742.
- ⁴⁸ Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-78. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2462. PMID: 8181179.
- ⁴⁹ Bobryshev YV, Nikiforov NG, Elizova NV, Orekhov AN. Macrophages and Their Contribution to the Development of Atherosclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:273-298. doi:10.1007/978-3-319-54090-0_11.
- ⁵⁰ Bories GFP, Leitinger N. Macrophage metabolism in atherosclerosis. *FEBS Lett*. 2017 Oct;591(19):3042-3060. doi: 10.1002/1873-3468.12786. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28796886.
- ⁵¹ Nhan TQ, Liles WC, Schwartz SM. Role of caspases in death and survival of the plaque macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):895-903. doi: 10.1161/01.ATV.0000159519.07181.33. Epub 2005 Feb 17. PMID: 15718496.
- ⁵² Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbatov R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 Sep;19(9):1166-72. doi: 10.1038/nm.3258.
- ⁵³ Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res*. 2014;114(11):1757-1771.
- ⁵⁴ Shi GP, Bot I, Kovanen PT. Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(11):643-658. doi:10.1038/nrcardio.2015.117.
- ⁵⁵ Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. 1995;92(5):1084-1088. doi:10.1161/01.cir.92.5.1084.
- ⁵⁶ Willems S, Vink A, Bot I, Quax PH, de Borst GJ, de Vries JP, van de Weg SM, Moll FL, Kuiper J, Kovanen PT, de Kleijn DP, Hoefler IE, Pasterkamp G. Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur Heart J*. 2013 Dec;34(48):3699-706. doi: 10.1093/eurheartj/eh186. Epub 2013 Jun 11. PMID: 23756333.

-
- ⁵⁷ Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(11):1743-1756. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301145.
- ⁵⁸ Kyaw T, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Protective role of natural IgM-producing B1a cells in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2012 Feb;22(2):48-53. doi: 10.1016/j.tcm.2012.06.011. Epub 2012 Jul 28. PMID: 22841841.
- ⁵⁹ Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(9):3893-3897. doi:10.1073/pnas.92.9.3893.
- ⁶⁰ Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Dec;26(6):673-85. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003. Epub 2015 May 12. PMID: 26005197; PMCID: PMC4671520.
- ⁶¹ Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S364-9. doi: 10.1194/jlr.R800092-JLR200. Epub 2008 Dec 2. PMID: 19050311; PMCID: PMC2674704.
- ⁶² Paulson KE, Zhu SN, Chen M, Nurmohamed S, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;106(2):383-390. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210781.
- ⁶³ Sun L, Zhang W, Zhao Y, Wang F, Liu S, Liu L, Zhao L, Lu W, Li M, Xu Y. Dendritic Cells and T Cells, Partners in Atherogenesis and the Translating Road Ahead. *Front Immunol.* 2020 Jul 29;11:1456. doi: 10.3389/fimmu.2020.01456. PMID: 32849502; PMCID: PMC7403484.
- ⁶⁴ Cho HJ, Shashkin P, Gleissner CA, Dunson D, Jain N, Lee JK, Miller Y, Ley K. Induction of dendritic cell-like phenotype in macrophages during foam cell formation. *Physiol Genomics.* 2007 Apr 24;29(2):149-60. doi: 10.1152/physiolgenomics.00051.2006. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17244792.
- ⁶⁵ Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995 Jul;75(3):487-517. doi: 10.1152/physrev.1995.75.3.487. PMID: 7624392.
- ⁶⁶ Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13-40. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142315. Epub 2011 Oct 10. PMID: 22017177.
- ⁶⁷ Salmon M, Gomez D, Greene E, Shankman L, Owens GK. Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22 α promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circ Res.* 2012 Aug 31;111(6):685-96. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.269811. Epub 2012 Jul 18. PMID: 22811558; PMCID: PMC3517884.
- ⁶⁸ Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med.* 2015 Jun;21(6):628-37. doi: 10.1038/nm.3866. Epub 2015 May 18. Erratum in: *Nat Med.* 2016 Feb;22(2):217. PMID: 25985364; PMCID: PMC4552085.

-
- ⁶⁹ Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):767-801. doi: 10.1152/physrev.00041.2003. PMID: 15269336.
- ⁷⁰ Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):692-702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361. PMID: 26892967; PMCID: PMC4762053.
- ⁷¹ Vengrenyuk Y, Nishi H, Long X, Ouimet M, Savji N, Martinez FO, Cassella CP, Moore KJ, Ramsey SA, Miano JM, Fisher EA. 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.* 2015 Mar;35(3):535-46. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304029. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25573853; PMCID: PMC4344402.
- ⁷² Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* 2006 Sep;12(9):1075-80. doi: 10.1038/nm1459. Epub 2006 Aug 6. PMID: 16892061.
- ⁷³ Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jun;25(6):1256-61. doi: 10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831805.
- ⁷⁴ Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res.* 2006 Jul 21;99(2):156-64. doi: 10.1161/01.RES.0000233315.38086.bc. Epub 2006 Jun 22. PMID: 16794190.
- ⁷⁵ Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002 Apr;8(4):403-9. doi: 10.1038/nm0402-403. PMID: 11927948.
- ⁷⁶ Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV, Russell SJ, Litzow MR, Edwards WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 15;100(8):4754-9. doi: 10.1073/pnas.0730743100. Epub 2003 Mar 28. PMID: 12665618; PMCID: PMC153628.
- ⁷⁷ Owsiany KM, Alencar GF, Owens GK. Revealing the Origins of Foam Cells in Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 May;39(5):836-838. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312557. PMID: 31017823; PMCID: PMC6482855.
- ⁷⁸ Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT, Owens GK. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods.* 2013 Feb;10(2):171-7. doi: 10.1038/nmeth.2332. Epub 2013 Jan 13. PMID: 23314172; PMCID: PMC3560316.
- ⁷⁹ Spanjaard B, Junker JP. Methods for lineage tracing on the organism-wide level. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;49:16-21. doi:10.1016/j.ceb.2017.11.004.

-
- ⁸⁰ Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992 Jan;85(1):391-405. doi: 10.1161/01.cir.85.1.391. PMID: 1728483.
- ⁸¹ Stary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 1987 Apr;64(2-3):91-108. doi: 10.1016/0021-9150(87)90234-6. PMID: 3606726.
- ⁸² Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults. *Am J Pathol*. 1992 Apr;140(4):907-14. PMID: 1562051; PMCID: PMC1886367.
- ⁸³ Insull W Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*. 2009 Jan;122(1 Suppl):S3-S14. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.10.013. PMID: 19110086.
- ⁸⁴ Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987 May 28;316(22):1371-5. doi: 10.1056/NEJM198705283162204. PMID: 3574413.
- ⁸⁵ Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986 Mar-Apr;6(2):131-8. doi: 10.1161/01.atv.6.2.131. PMID: 2937395.
- ⁸⁶ Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74. doi: 10.1161/01.cir.92.5.1355. PMID: 7648691.
- ⁸⁷ Sugden MC, Holness MJ. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 May;284(5):E855-62. doi: 10.1152/ajpendo.00526.2002. PMID: 12676647.
- ⁸⁸ Deuse T, Hua X, Wang D, Maegdefessel L, Heeren J, Scheja L, Bolaños JP, Rakovic A, Spin JM, Stubbendorff M, Ikeno F, Länger F, Zeller T, Schulte-Uentrop L, Stoehr A, Itagaki R, Haddad F, Eschenhagen T, Blankenberg S, Kiefmann R, Reichenspurner H, Velden J, Klein C, Yeung A, Robbins RC, Tsao PS, Schrepfer S. Dichloroacetate prevents restenosis in preclinical animal models of vessel injury. *Nature*. 2014 May 29;509(7502):641-4. doi: 10.1038/nature13232. Epub 2014 Apr 20. PMID: 24747400; PMCID: PMC4323184.
- ⁸⁹ Deutsche Stiftung Organtransplantation. Herztransplantation 2019. Grafiken zum Tätigkeitsbericht 2019 (zuletzt aufgerufen am 01.10.2020). Frankfurt/Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation; 2020. Abrufbar unter: <https://dso.de/Berichte-Transplantationszentren/Grafiken%20D%202019%20Herz.pdf>.
- ⁹⁰ Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1145-59. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.035. PMID: 22424226; PMCID: PMC5381524.

-
- ⁹¹ Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2019 Jul 5;8(7):680. doi: 10.3390/cells8070680. PMID: 31284394; PMCID: PMC6678092.
- ⁹² Kamer KJ, Mootha VK. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Sep;16(9):545-53. doi: 10.1038/nrm4039. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26285678.
- ⁹³ Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23770045.
- ⁹⁴ Rambold AS, Pearce EL. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. *Trends Immunol*. 2018 Jan;39(1):6-18. doi: 10.1016/j.it.2017.08.006. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28923365.
- ⁹⁵ Frederic J, Chevremont M. Investigations on the chondriosomes of living cells by phase contrast microscopy and microcinematography. *Arch. Biol. (Liege)* 1952;63:109-131.
- ⁹⁶ Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 2003 Jan 20;160(2):189-200. doi: 10.1083/jcb.200211046. Epub 2003 Jan 13. PMID: 12527753; PMCID: PMC2172648.
- ⁹⁷ Samant SA, Zhang HJ, Hong Z, Pillai VB, Sundaresan NR, Wolfgeher D, Archer SL, Chan DC, Gupta MP. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress. *Mol Cell Biol*. 2014 Mar;34(5):807-19. doi: 10.1128/MCB.01483-13. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24344202; PMCID: PMC4023816.
- ⁹⁸ Labbé K, Murley A, Nunnari J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:357-91. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155756. Epub 2014 Aug 15. PMID: 25288115.
- ⁹⁹ Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001 Aug;12(8):2245-56. doi: 10.1091/mbc.12.8.2245. PMID: 11514614; PMCID: PMC58592.
- ¹⁰⁰ Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*. 2009 Jul;89(3):799-845. doi: 10.1152/physrev.00030.2008. PMID: 19584314.
- ¹⁰¹ Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 13;19(2):564. doi: 10.3390/ijms19020564. PMID: 29438347; PMCID: PMC5855786.
- ¹⁰² Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 2015 Jan 21;85(2):257-73. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007. PMID: 25611507; PMCID: PMC4764997.
- ¹⁰³ Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol*. 2008 Aug;173(2):470-82. doi: 10.2353/ajpath.2008.071208. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18599615; PMCID: PMC2475784.

-
- ¹⁰⁴ Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacín M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes*. 2005 Sep;54(9):2685-93. doi: 10.2337/diabetes.54.9.2685. PMID: 16123358.
- ¹⁰⁵ Shemiakova T, Ivanova E, Grechko AV, Gerasimova EV, Sobenin IA, Orekhov AN. Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage in the Context of Pathogenesis of Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2020 Jun 18;8(6):166. doi: 10.3390/biomedicines8060166. PMID: 32570831; PMCID: PMC7344998.
- ¹⁰⁶ Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function. *Circ Res*. 2013 Apr 12;112(8):1171-88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300233. PMID: 23580773; PMCID: PMC3700369.
- ¹⁰⁷ Löffler G, Müller M. Allosterische Regulation der Glykolyse. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 210-212 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_14.
- ¹⁰⁸ Löffler G, Müller M. Transkriptionelle Regulation von Glykolyse und Gluconeogenese. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 208-210 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_14.
- ¹⁰⁹ Löffler G, Müller M. Glykolyse – Abbau von Glucose und Fructose zu Pyruvat und Lactat. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 183-189 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_14.
- ¹¹⁰ Löffler G. Die β -Oxidation von Fettsäuren. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 263-267 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_21.
- ¹¹¹ Brandt U. Stoffwechselbedeutung des Citratzyklus. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 227-228 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_18.
- ¹¹² Brandt U. Regulierte Schritte im Citratzyklus. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 231-232 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_18.
- ¹¹³ Brandt U. Enzymkomplexe der Atmungskette. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 235-239 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_19.
- ¹¹⁴ Brandt U. Elektronen- und Protonentransport entlang der Atmungskette. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 239-244 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_19.

-
- ¹¹⁵ Brandt U. F₁/F₀-ATP-Synthase. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 244-246 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_19.
- ¹¹⁶ Brandt U. Atmungskontrolle und Regulation der oxidativen Phosphorylierung. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 246-249 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_19.
- ¹¹⁷ Brand K. Aerobic Glycolysis by Proliferating Cells: Protection against Oxidative Stress at the Expense of Energy Yield. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29:355–364.
- ¹¹⁸ Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001. Epub 2016 Jan 5. Erratum in: *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):287. Erratum in: *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar;41(3):287. PMID: 26778478; PMCID: PMC4783224.
- ¹¹⁹ Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PMID: 19460998; PMCID: PMC2849637.
- ¹²⁰ Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, Bailey K, Balagurunathan Y, Rothberg JM, Sloane BF, Johnson J, Gatenby RA, Gillies RJ. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* 2013 Mar 1;73(5):1524-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23288510; PMCID: PMC3594450.
- ¹²¹ Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1229-41. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.016. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26321679; PMCID: PMC4864363.
- ¹²² Brand KA, Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 1997 Apr;11(5):388-95. doi: 10.1096/fasebj.11.5.9141507. PMID: 9141507.
- ¹²³ Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(2):71-103. doi: 10.1080/10409230091169186. PMID: 10821478.
- ¹²⁴ Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998 Jan 15;12(2):149-62. doi: 10.1101/gad.12.2.149. PMID: 9436976; PMCID: PMC316445.
- ¹²⁵ Chen Z, Liu M, Li L, Chen L. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2839-2849.
- ¹²⁶ Sarrazy V, Viaud M, Westerterp M, Ivanov S, Giorgetti-Peraldi S, Guinamard R, Gautier EL, Thorp EB, De Vivo DC, Yvan-Charvet L. Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. *Circ Res.* 2016 Apr 1;118(7):1062-77. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307599. Epub 2016 Feb 29. PMID: 26926469; PMCID: PMC4824305.

-
- ¹²⁷ Adhikari N, Basi DL, Carlson M, Mariash A, Hong Z, Lehman U, Mullegama S, Weir EK, Hall JL. Increase in GLUT1 in smooth muscle alters vascular contractility and increases inflammation in response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):86-94. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215004. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20947823; PMCID: PMC3014530.
- ¹²⁸ Werle M, Kreuzer J, Höfele J, Elsässer A, Ackermann C, Katus HA, Vogt AM. Metabolic control analysis of the Warburg-effect in proliferating vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci.* 2005 Oct;12(5):827-34. doi: 10.1007/s11373-005-9010-5. Epub 2005 Nov 9. PMID: 16205843.
- ¹²⁹ Xiao Y, Peng H, Hong C, Chen Z, Deng X, Wang A, Yang F, Yang L, Chen C, Qin X. PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(4):1603-1613. doi: 10.1159/000479401. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28738389.
- ¹³⁰ Sakakibara R, Kato M, Okamura N, Nakagawa T, Komada Y, Tominaga N, Shimojo M, Fukasawa M. Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biochem.* 1997 Jul;122(1):122-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021719. PMID: 9276680.
- ¹³¹ Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, Perales JC, Ventura F, Rosa JL, Bartrons R. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2004 Dec 17;279(51):53562-70. doi: 10.1074/jbc.M406096200. Epub 2004 Oct 5. PMID: 15466858.
- ¹³² Chesney J, Mitchell R, Benigni F, Bacher M, Spiegel L, Al-Abed Y, Han JH, Metz C, Bucala R. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3047-52. doi: 10.1073/pnas.96.6.3047. PMID: 10077634; PMCID: PMC15892.
- ¹³³ Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, Brock E, Siow D, Wattenberg B, Telang S, Chesney J. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 2009 Sep 4;284(36):24223-32. doi: 10.1074/jbc.M109.016816. Epub 2009 May 27. PMID: 19473963; PMCID: PMC2782016.
- ¹³⁴ Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y, Ozcan SC, Peker S, O'Neal J, Klarer AC, Clem AL, Telang S, Chesney J. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.* 2014 Jul 17;5(7):e1337. doi: 10.1038/cddis.2014.292. PMID: 25032860; PMCID: PMC4123086.
- ¹³⁵ De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuyser B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell.* 2013 Aug 1;154(3):651-63. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.037. PMID: 23911327.
- ¹³⁶ Goldman RD, Kaplan NO, Hall TC. Lactic dehydrogenase in human neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1964;24:389-399. PMID: 14147812.

-
- ¹³⁷Xie H, Valera VA, Merino MJ, Amato AM, Signoretti S, Linehan WM, Sukhatme VP, Seth P. LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009 Mar;8(3):626-35. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1049. Epub 2009 Mar 10. PMID: 19276158; PMCID: PMC2671637.
- ¹³⁸Cui XG, Han ZT, He SH, Wu XD, Chen TR, Shao CH, Chen DL, Su N, Chen YM, Wang T, Wang J, Song DW, Yan WJ, Yang XH, Liu T, Wei HF, Xiao J. HIF1/2 α mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15):24840-24852. doi: 10.18632/oncotarget.15266. PMID: 28193910; PMCID: PMC5421893.
- ¹³⁹Kim JH, Bae KH, Byun JK, Lee S, Kim JG, Lee IK, Jung GS, Lee YM, Park KG. Lactate dehydrogenase-A is indispensable for vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Oct 7;492(1):41-47. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.041. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28818664.
- ¹⁴⁰Graeve L, Müller M. Das Mitochondrium. In: Heinrich P, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 165-166 https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_12.
- ¹⁴¹Park JB, Nagar H, Choi S, Jung SB, Kim HW, Kang SK, Lee JW, Lee JH, Park JW, Irani K, Jeon BH, Song HJ, Kim CS. IDH2 deficiency impairs mitochondrial function in endothelial cells and endothelium-dependent vasomotor function. *Free Radic Biol Med.* 2016 May;94:36-46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.017. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26898144.
- ¹⁴²Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP, van Noorden CJ, Bleeker FE. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec;1846(2):326-41. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.05.004. Epub 2014 May 28. PMID: 24880135.
- ¹⁴³Wang Y, Agarwal E, Bertolini I, Ghosh JC, Seo JH, Altieri DC. IDH2 reprograms mitochondrial dynamics in cancer through a HIF-1 α -regulated pseudohypoxic state. *FASEB J.* 2019 Dec;33(12):13398-13411. doi: 10.1096/fj.201901366R. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31530011; PMCID: PMC6894043.
- ¹⁴⁴Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC, Thompson CB. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 6;108(49):19611-6. doi: 10.1073/pnas.1117773108. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106302; PMCID: PMC3241793.
- ¹⁴⁵Rak M, Bénit P, Chrétien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R, Tzagoloff A, Rustin P. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci (Lond).* 2016 Mar;130(6):393-407. doi: 10.1042/CS20150707. PMID: 26846578; PMCID: PMC4948581.
- ¹⁴⁶Wikström M, Sharma V. Proton pumping by cytochrome c oxidase - A 40 year anniversary. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):692-698. doi:10.1016/j.bbabbio.2018.03.009.
- ¹⁴⁷Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:237-264. doi:10.1007/978-1-4614-3573-0_10.

-
- ¹⁴⁸ Musatov A, Robinson NC. Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie*. 2014;105:159-164. doi:10.1016/j.biochi.2014.07.005.
- ¹⁴⁹ Arnold S, Kadenbach B. The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett*. 1999;443(2):105-108. doi:10.1016/s0014-5793(98)01694-9.
- ¹⁵⁰ Matsubara Y, Kraus JP, Yang-Feng TL, Francke U, Rosenberg LE, Tanaka K. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(17):6543-6547. doi:10.1073/pnas.83.17.6543.
- ¹⁵¹ Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, Wagner RA, Greaves DR, Murray PJ, Chawla A. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*. 2006 Jul;4(1):13-24. doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.011. Erratum in: *Cell Metab*. 2006 Sep;4(3):255. Wagner, Roger A [added]. PMID: 16814729; PMCID: PMC1904486.
- ¹⁵² Schuck PF, Ferreira Gda C, Tonin AM, Viegas CM, Busanello EN, Moura AP, Zanatta A, Klamt F, Wajner M. Evidence that the major metabolites accumulating in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency disturb mitochondrial energy homeostasis in rat brain. *Brain Res*. 2009;1296:117-26. doi: 10.1016/j.brainres.2009.08.053.
- ¹⁵³ Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES, Vockley J. Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem*. 2010;285(39):29834-29841. doi:10.1074/jbc.M110.139493.
- ¹⁵⁴ Sosnowska B, Mazidi M, Penson P, Gluba-Brzózka A, Rysz J, Banach M. The sirtuin family members SIRT1, SIRT3 and SIRT6: Their role in vascular biology and atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2017 Oct;265:275-282. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.027. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28870631.
- ¹⁵⁵ Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010 Dec;35(12):669-75. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.003. Epub 2010 Sep 20. PMID: 20863707; PMCID: PMC2992946.
- ¹⁵⁶ Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serrettiello E, Hailu GS, Jarho E, Lahtela-Kakkonen M, Mai A, Altucci L. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics*. 2016 May 25;8:61. doi: 10.1186/s13148-016-0224-3. PMID: 27226812; PMCID: PMC4879741.
- ¹⁵⁷ Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan KL, Zhao S, Xiong Y. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Rep*. 2011 Jun;12(6):534-41. doi: 10.1038/embor.2011.65.
- ¹⁵⁸ Zeng HT, Fu YC, Yu W, Lin JM, Zhou L, Liu L, Wang W. SIRT1 prevents atherosclerosis via liver-X-receptor and NF- κ B signaling in a U937 cell model. *Mol Med Rep*. 2013;8(1):23-8. doi: 10.3892/mmr.2013.1460.
- ¹⁵⁹ Roos CM, Hagler MA, Zhang B, Miller JD, Effect of SIRT3 deficiency on vasomotor function and atherosclerotic plaque composition in mice. *The FASEB Journal*. 2016;30(S1):722.7

-
- ¹⁶⁰ Liu Z, Wang J, Huang X, Li Z, Liu P. Deletion of sirtuin 6 accelerates endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Transl Res.* 2016 Jun;172:18-29.e2. doi: 10.1016/j.trsl.2016.02.005. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26924042.
- ¹⁶¹ Balestrieri ML, Rizzo MR, Barbieri M, Paolisso P, D'Onofrio N, Giovane A, Siniscalchi M, Minicucci F, Sardu C, D'Andrea D, Mauro C, Ferraraccio F, Servillo L, Chirico F, Caiazzo P, Paolisso G, Marfella R. Sirtuin 6 expression and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques: effects of incretin treatment. *Diabetes.* 2015 Apr;64(4):1395-406. doi: 10.2337/db14-1149. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25325735.
- ¹⁶² Xu S, Yin M, Koroleva M, Mastrangelo MA, Zhang W, Bai P, Little PJ, Jin ZG. SIRT6 protects against endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Aging.* 2016; 8:1064-1082. <https://doi.org/10.18632/aging.100975>.
- ¹⁶³ Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y, Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell.* 2010 Jan 22;140(2):280-93. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.041. PMID: 20141841; PMCID: PMC2821045.
- ¹⁶⁴ Garvey W, Fathi A, Bigelow F, Carpenter B, Jimenez C. Improved Movat pentachrome stain. *Stain Technol.* 1986 Jan;61(1):60-2. doi: 10.3109/10520298609110708. PMID: 2420041
- ¹⁶⁵ Michler GH. *Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) In: Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie.* pp 9-19. Wiesbaden: essentials. Springer Spektrum; 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-658-26688-2_1.
- ¹⁶⁶ Fong GH. Potential contributions of intimal and plaque hypoxia to atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2015 Jun;17(6):510. doi: 10.1007/s11883-015-0510-0. PMID: 25876920.
- ¹⁶⁷ Zhu W, Ye L, Zhang J, Yu P, Wang H, Ye Z, Tian J. PFK15, a Small Molecule Inhibitor of PFKFB3, Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Inhibits Invasion in Gastric Cancer. *PLoS One.* 2016 Sep 26;11(9):e0163768. doi: 10.1371/journal.pone.0163768. PMID: 27669567; PMCID: PMC5036843.
- ¹⁶⁸ Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol.* 2009 Jun;11(6):747-52. doi: 10.1038/ncb1881. Epub 2009 May 17. PMID: 19448625.
- ¹⁶⁹ De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuyser B, Brepoels K, Welti J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell.* 2013 Aug 1;154(3):651-63. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.037. PMID: 23911327.
- ¹⁷⁰ Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006

Jun;9(6):425-34. doi: 10.1016/j.ccr.2006.04.023. Erratum in: *Cancer Cell*. 2006 Aug;10(2):172. PMID: 16766262.

- ¹⁷¹ Liu W, Shen SM, Zhao XY, Chen GQ. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):165-78. Epub 2012 May 31. PMID: 22773957; PMCID: PMC3388736.
- ¹⁷² Christoph M, Ibrahim K, Hesse K, Augstein A, Schmeisser A, Braun-Dullaeus RC, Simonis G, Wunderlich C, Quick S, Strasser RH, Poitz DM. Local inhibition of hypoxia-inducible factor reduces neointima formation after arterial injury in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2014 Apr;233(2):641-647. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.048. Epub 2014 Feb 2. PMID: 24561491.
- ¹⁷³ Salabei JK, Hill BG. Mitochondrial fission induced by platelet-derived growth factor regulates vascular smooth muscle cell bioenergetics and cell proliferation. *Redox Biol*. 2013 Nov 7;1(1):542-51. doi: 10.1016/j.redox.2013.10.011. PMID: 24273737; PMCID: PMC3836280.
- ¹⁷⁴ DeBakey ME, Glaeser DH. Patterns of atherosclerosis: effect of risk factors on recurrence and survival-analysis of 11,890 cases with more than 25-year follow-up. *Am J Cardiol*. 2000 May 1;85(9):1045-53. doi: 10.1016/s0002-9149(00)00694-9. PMID: 10781750.
- ¹⁷⁵ Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol Cancer*. 2013 Dec 3;12:152. doi: 10.1186/1476-4598-12-152. PMID: 24298908; PMCID: PMC4223729.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laurina Bühner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Mitochondriale Repression in humanen glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Atherosklerose/Mitochondrial Repression in human vascular smooth muscle cells in atherosclerosis, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Unterschrift der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Dr. med. Till Althoff und Frau Kerstin Wöltje für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Benjamin Claus bedanken, der meine Begeisterung für die Medizin bereits in sehr jungen Jahren gefördert und mein Interesse für kardiovaskuläre Erkrankungen geweckt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen des Center For Cardiovascular Research und der Core Facility für Elektronenmikroskopie der Charité, insbesondere bei Johannes Schecker, Carmen Hannemann und Petra Schrade bedanken, die mir stets mit Geduld neue Labormethoden erklärt haben und mir viele gute Ratschläge zur Anfertigung meiner Arbeit gegeben haben. Auch danke ich allen OP-Mitarbeiter*innen des Deutschen Herzzentrums Berlin, die mich bei den Probenentnahmen immerzu unterstützt haben. Nicht zuletzt danke ich allen Patient*innen, die an dieser Studie teilgenommen haben – nur durch Sie war diese Arbeit möglich.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter, Petra Bühner, und meinen Großeltern Hans und Theresia Kosse. Sie haben mich mein gesamtes Leben bezüglich all meinen Interessen und Wünschen gefördert, unterstützt und motiviert und so mein Studium, sowie meine Promotion ermöglicht.