

Aus dem
CharitéCentrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie
Komm. Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Karl Stangl

Habilitationsschrift

**Monozyten und Makrophagen – Targets für eine
antiinflammatorische Therapie kardiovaskulärer
Erkrankungen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bernd Hewing

Eingereicht: November 2017

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stephan Felix

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Hauner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose	4
1.2 Monozyten und Makrophagen bei erworbener Aortenklappenstenose	7
1.3 Monozyten und Makrophagen als Targets zur Behandlung inflammatorischer kardiovaskulärer Erkrankungen	8
2 Ergebnisse	13
2.1 Die Korrektur der Hypercholesterinämie mittels eines MTP Inhibitors führt zur Regression von Atherosklerose mit Abnahme des Makrophagen- Gehalts und Zunahme von M2 Markern in atherosklerotischen Plaques	13
2.2 Natives Apolipoprotein A-I (ApoA-I), jedoch nicht modifiziertes ApoA-I reduziert den Gehalt an Makrophagen, sowie den inflammatorischen Status von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques	19
2.3 Rekonstituiertes HDL (rHDL) als Nanopartikel-Carrier für Simvastatin reduziert den Makrophagen-Gehalt und den inflammatorischen Status in atherosklerotischen Plaques	31
2.4 Das Fehlen der immunoproteasomalen Untereinheit $\beta 5i/LMP7$ hat keinen Einfluss auf die inflammatorischen Eigenschaften von Makrophagen und die proteolytische Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) in Makrophagen	44
2.5 Das neuronale Guidance-Molekül Semaphorin 3E wird in atherosklerotischen Plaques exprimiert und blockiert die Migration von Makrophagen	55
2.6 Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose (AS) weisen einen erhöhten Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten auf	64
2.7 Der Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten nimmt bei Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose (AS) nach einem Aortenklappenersatz ab	73
3 Diskussion	84
4 Zusammenfassung	91
5 Literaturverzeichnis	93
Danksagung	99
Erklärung	100

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aortenklappenstenose
Apo	Apolipoprotein
CCL	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
HDL	High-density Lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
(hs)CRP	(hochsensitives) C-reaktives Protein
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP	Immunoproteasom
LDL	Low-density Lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MPO	Myeloperoxidase
MTP	Mikrosomales Triglycerid-Transferprotein
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
RCT	Reverser Cholesterintransport
rHDL	Rekonstituiertes HDL
Sema3E	Semaphorin 3E
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VLDL	Very low-density Lipoprotein

1. Einleitung

1.1 Monozyten und Makrophagen in der Atherosklerose

Die Atherosklerose mit ihren Manifestationsformen wie dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall stellt weltweit die häufigste Todesursache dar. Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäße, die durch eine Akkumulation von Lipiden und Immunzellen in der Gefäßwand hervorgerufen wird.¹ Durch die Korrektur atherogener Risikofaktoren, insbesondere durch die Therapie der Hypercholesterinämie nach Einführung der Statine (Mitte der 1980er Jahre), konnte die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität deutlich gesenkt werden; dennoch verbleibt auch nach Korrektur der modifizierbaren Risikofaktoren ein substantielles residuales Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse.² Um dieses residuale Risiko zu senken, sind in den vergangenen Jahren vermehrt inflammatorische Prozesse der Atherosklerose in den Fokus der Therapieforschung gerückt.³

In der kürzlich publizierten CANTOS Studie (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study)⁴, einer Phase III Studie zur Wirkung des Interleukin-1 β (IL-1 β) bindenden, monoklonalen Antikörpers Canakinumab (ACZ855), konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine spezifische antiinflammatorische Therapie bei Patienten mit einem Myokardinfarkt in der Vorgeschichte und einem erhöhten Gehalt an hochsensitivem C-reaktiven Protein (hsCRP) im Blut das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (zusammengesetzter primärer Endpunkt: nicht-tödlicher Myokardinfarkt, nicht-tödlicher Schlaganfall oder kardiovaskulär bedingter Tod) senkt. Die Ergebnisse dieser „Landmark“-Studie bestätigen nicht nur die Hypothese der Atherosklerose als eine inflammatorische Erkrankung, sondern unterstreichen auch das große Potenzial von Therapieansätzen, die direkt gegen inflammatorische Prozesse in der Pathogenese der Atherosklerose gerichtet sind.

Die Pathogenese der Atherosklerose geht von einer Störung der endothelialen Funktion (hervorgerufen durch Noxen wie einem erhöhten Gehalt an nativem oder modifiziertem Low-density Lipoprotein [LDL], sowie freie Radikale) aus.¹ Durch die endotheliale Dysfunktion kommt es zum Einwandern und folglich zur Akkumulation von Lipiden (besonders von LDL-

Partikeln) in der Innenschicht der arteriellen Gefäßwand (Intima).¹ Die eingewanderten Lipide werden großenteils (oxidativ) modifiziert und führen zu einer vermehrten Infiltration von Immunzellen in die Gefäßwand. Die in atherosklerotischen Plaques vorherrschenden Immunzellen stellen die Makrophagen dar, welche als Monozyten aus dem Blut rekrutiert werden und in der Intima akkumulieren.⁵ Diese Rekrutierungs-Vorgänge werden über ein komplexes Wechselspiel von Mediatoren wie z.B. Adhäsionsmoleküle oder Chemokine reguliert.⁶ In den vergangenen Jahren wurde durch die Grundlagenwissenschaft viel zum besseren Verständnis der Mechanismen der Aktivierung von Monozyten und der Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand beigetragen.^{7, 8} Dabei liegt ein Fokus in der Erforschung der Rolle von funktionell heterogenen Monozyten-Subpopulationen bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose.^{9, 10} In der aktuellen Nomenklatur der Monozyten werden beim Menschen anhand von Oberflächenmarkern drei Monozyten-Subpopulationen unterschieden - klassische (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) und nicht-klassische (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten - die sich hinsichtlich ihrer Funktion und der Expression inflammatorischer Zytokine unterscheiden.¹¹ Intermediäre Monozyten gelten als besonders inflammatorische Subpopulation, da diese im Vergleich zu klassischen und nicht-klassischen Monozyten vermehrt inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sezernieren.^{12, 13} In vorausgegangenen Studien konnte eine Assoziation zwischen im Blut zirkulierenden intermediären Monozyten und der Atherosklerose, sowie den Manifestationsformen der Atherosklerose nachgewiesen werden.^{9, 10} Ein wesentlicher Teil der Erkenntnisse zu Monozyten-Makrophagen-Abstammungslinien in der Atherosklerose stammt jedoch aus Mausmodellen.¹⁴ Im Gegensatz zum Menschen werden bei der Maus allgemein zwei Monozyten-Subpopulationen – Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten – unterschieden, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus zum Menschen limitiert.¹¹ Ly6C^{high} Monozyten weisen Gemeinsamkeiten mit klassischen Monozyten auf, während Ly6C^{low} Monozyten eher humanen Monozyten mit niedriger CD14-Expression ähneln.¹⁵ Es gibt experimentelle

Hinweise, dass in der Atherogenese Ly6C^{high} Monozyten bevorzugt (gegenüber Ly6C^{low} Monozyten) in die Gefäßwand einwandern.⁷

In die Gefäßwand eingewanderte Monozyten differenzieren innerhalb des Gewebes zu Makrophagen.⁵ Makrophagen stellen hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Eigenschaften ebenfalls eine heterogene Zellpopulation dar.^{14, 16} In den atherosklerotischen Plaques nehmen Makrophagen z.B. über ihre Scavenger-Rezeptoren normale und modifizierte Lipoproteine (besonders oxidiertes LDL) auf und transformieren so zu Lipid-geladenen Schaumzellen.⁶ Nach einer vereinfachten Klassifikation werden Makrophagen anhand der vorrangig sezernierten Mediatoren in inflammatorische M1 und antiinflammatorische (regulatorische) M2 Makrophagen unterteilt.^{16, 17} In der Realität findet sich ein Kontinuum zwischen diesen beiden Phänotypen.^{16, 17} M1 Makrophagen sezernieren vermehrt inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6, zudem proteolytische Enzyme, sowie reaktive Sauerstoff-Spezies. Dadurch begünstigt dieser Makrophagen-Phänotyp inflammatorische Prozesse, Apoptose-Vorgänge, sowie die Degradation extrazellulärer Matrix, was zur vermehrten Destabilisierung atherosklerotischer Plaques und in der Folge zu einem erhöhten Risiko für eine Plaque-Ruptur führen kann.¹⁴ Im Gegensatz dazu wird den M2 Makrophagen eine antiinflammatorische, regulatorische Funktion, sowie eine Rolle bei der Wundheilung zugesprochen.^{17, 18} M2 Makrophagen sezernieren antiinflammatorische Faktoren wie Interleukin-10 (IL-10) oder Transforming growth factor- β (TGF- β) und sind in Prozesse involviert, die mit einer erhöhten Plaque-Stabilität assoziiert sind, wie z.B. die Kollagen-Synthese, das Abräumen apoptotischer Zellen und die Proliferation glatter Muskelzellen.¹⁴ Die phänotypischen Eigenschaften von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques werden maßgeblich durch das im Plaque lokal einwirkende Milieu beeinflusst.⁶ Insbesondere der Lipidstatus spielt dabei eine wichtige Rolle.⁶ In progredienten atherosklerotischen Plaques findet sich typischerweise eine vermehrte Anreicherung von Makrophagen des M1 Phänotyps.⁶

Neben den Makrophagen sind auch T- und B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen an der Atherogenese beteiligt, die über direkte und indirekte

Interaktionen mit den Makrophagen deren phänotypischen und funktionellen Eigenschaften in atherosklerotischen Plaques beeinflussen.^{5,8}

Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei der Plaque-Stabilität.¹⁹ Während der Atherogenese kommt es neben der Akkumulation von Makrophagen zum Einwandern von glatten Muskelzellen aus der Tunica media der Arterienwand in die Intima; dort proliferieren glatte Muskelzellen lokal und produzieren Extrazelluläre-Matrix-Makromoleküle wie z.B. Kollagen oder Elastin.⁵ So sind die glatten Muskelzellen an der Bildung einer fibrösen Kappe zur Seite des Gefäßlumens beteiligt, welche typischerweise Makrophagen-reiche Regionen im Plaque überdeckt.⁵ Durch die Akkumulation extrazellulärer Lipide (teilweise freigesetzt durch apoptotische Makrophagen und u.a. als Cholesterinkristalle auftretend), sowie vermehrte Zelluntergänge mit Ablagerung von Zelltrümmern in der Intima kann es zur Ausbildung eines sogenannten nekrotischen Kerns kommen.⁵ Instabile („vulnerable“) Plaques sind typischerweise durch eine dünne fibröse Kappe, einen hohen Gehalt an aktivierten Makrophagen (vorwiegend M1 Makrophagen), sowie einen großen nekrotischen Kern gekennzeichnet.^{19, 20} Im Bereich der fibrösen Kappe können aktivierte Makrophagen inflammatorische Mediatoren, sowie Extrazellulär-Matrix-verdauende Proteasen sezernieren, was zu einer Ruptur der fibrösen Kappe führen kann. Dadurch wird das thrombogene Material der Intima in das Gefäßlumen exponiert. Als Folge kommt es durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Thrombus-Bildung im Gefäßlumen mit einem teilweisen oder kompletten Verschluss des Gefäßes.²¹ Diese gefürchtete und potentiell lebensbedrohliche Komplikation der Atherosklerose bildet z.B. die Grundlage für einen Myokardinfarkt.²¹

1.2 Monozyten und Makrophagen bei erworbener Aortenklappenstenose

Monozyten und Makrophagen spielen auch bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Dabei weist besonders die Pathogenese der erworbenen, kalzifizierenden Aortenklappenstenose (AS) Parallelen zur Atherosklerose auf, wie z.B. die Infiltration des Klappengewebes mit Immunzellen.²² Die AS ist die häufigste Herzklappenerkrankung im höheren Alter und ist im fortgeschrittenen Stadium mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert.²³

Die einzig wirksame Therapieoption für eine AS stellt aktuell der kardiochirurgische oder der minimal-invasive, kathetergestützte Aortenklappenersatz dar.²⁴ Während die AS früher als eine passiv degenerative Veränderung des Klappengewebes angesehen wurde, wird die Pathogenese der AS heutzutage als ein aktiver, chronisch entzündlicher und kalzifizierender Prozess wahrgenommen.²³ Viele Vorgänge in der Pathogenese der AS, inklusive der genauen Rolle einzelner Monozyten-Subpopulationen und anderer Immunzellen in den verschiedenen Stadien der AS, sind jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Während die Prävalenz einer Aortenklappensklerose (d.h. einer Verdickung und Kalzifizierung des Klappengewebes ohne hämodynamisch relevante Stenose) im fortgeschrittenen Alter relativ hoch ist, entwickeln nur 5-10% der Patienten mit einer Aortenklappensklerose innerhalb der nächsten fünf Jahre eine AS.²³ Bisher ist nicht bekannt, welche Faktoren die Transformation von der Aortenklappensklerose zur AS triggern. Zudem fehlen prognostische Marker, die diese Transformation vorhersagen können. Aus diesen Gründen ist es besonders wichtig das Verständnis der inflammatorischen Prozesse bei der AS, insbesondere zur Rolle der Monozyten und Makrophagen, voranzubringen.

1.3 Monozyten und Makrophagen als Targets zur Behandlung inflammatorischer kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Modulation der Monozyten-/Makrophagen-Biologie stellt ein potentielles Therapiekonzept für die Atherosklerose und die AS dar. Zentrale Ziele sind dabei, den Gehalt an Makrophagen in atherosklerotischen Plaques oder im Klappengewebe zu reduzieren, die nachteiligen Effekte der M1 Makrophagen abzuschwächen, sowie eine Verschiebung des M1/M2-Verhältnisses in Richtung des M2 Makrophagen Phänotyps zu bewirken. In der vorliegenden Habilitationsschrift werden verschiedene experimentelle Ansätze beschrieben, um diese Ziele zu erreichen.

Korrektur der Hypercholesterinämie: Die Hypercholesterinämie ist ein zentraler Faktor für die Atherogenese und den inflammatorischen Status von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques.⁶ Durch einen erhöhten intrazellulären Cholesterin-Gehalt in Makrophagen kommt es zu einer inflammatorischen Aktivierung dieser Zellen.²⁵ Dagegen konnte in Studien zur

Regression der Atherosklerose gezeigt werden, dass eine Korrektur der Hypercholesterinämie nicht nur den Makrophagen-Gehalt in den Plaques vermindert, sondern die im Plaque verbleibenden Makrophagen vermehrt einen M2 Phänotyp aufweisen.^{26, 27} Das mikrosomale Triglycerid-Transferprotein (MTP) ist für die Bildung Apolipoprotein B (apoB)-haltiger Lipoproteine in der Leber (Very low-density Lipoprotein [VLDL]) und im Darm (Chylomikronen) notwendig. Durch die Inhibition von MTP kommt es zu einer effektiven Senkung der Konzentration von VLDL und in der Folge von LDL, sowie von Chylomikronen im Blut.^{26, 28} Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine genetische Inaktivierung von MTP zu atheroprotektiven Effekten führt.²⁶ In der vorliegenden Habilitationsschrift wird der Effekt einer pharmakologischen Inhibition von MTP auf den Makrophagen-Gehalt und den inflammatorischen Status von Plaques in der Atherosklerose beschrieben.

Erhöhung von High-density Lipoprotein (HDL)/Apolipoprotein A-I (ApoA-I): Epidemiologische Studien zeigen übereinstimmend eine inverse Assoziation zwischen der Konzentration von HDL-Cholesterin (HDL-C) im Blut und dem Risiko für eine Koronare Herzerkrankung, sowie kardiovaskuläre Ereignisse.^{29, 30} Die atheroprotektive Wirkung des HDL-Partikels (bzw. dessen Hauptprotein Apolipoprotein A-I [ApoA-I]) wird seiner zentralen Rolle beim reversen Cholesterintransport (RCT) zugeschrieben.³¹ Dabei vermitteln HDL und ApoA-I den Cholesterin-Efflux aus peripheren Zellen (insbesondere aus Makrophagen in atherosklerotischen Plaques) für den Rücktransport von überschüssigem Cholesterin zur Leber.³¹ Darüber hinaus werden HDL/ApoA-I eine Reihe weiterer atheroprotektiver Eigenschaften (wie z.B. antiinflammatorische, antioxidative oder antithrombotische Effekte) zugeschrieben.^{31, 32} Über die Infusion oder die genetische Überexpression von HDL/ApoA-I kann die Plaque-Größe und -Komposition, wie z.B. der Gehalt an Makrophagen in den Plaques und der inflammatorische Status von Makrophagen, günstig beeinflusst werden.³²⁻³⁵ Hingegen konnte in klinischen Studien bisher nicht überzeugend gezeigt werden, dass eine therapeutische Erhöhung von HDL bzw. ApoA-I kardiovaskuläre Ereignisse reduziert.^{2, 31, 32, 36} Ähnlich wie LDL wird HDL/ApoA-I oxidativ modifiziert und erhöhte Konzentrationen von

oxidativ veränderten HDL/ApoA-I finden sich im Blut und vor allem in der Gefäßwand von Patienten mit koronarer Herzerkrankung.^{31, 37} In *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Modifikation von HDL/ApoA-I durch Myeloperoxidasen (MPO) zu einem gestörten ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-vermittelten Cholesterin-Efflux aus Makrophagen führt.^{38, 39} Durch diesen Funktionsverlust könnte modifiziertes HDL/ApoA-I seine günstigen Effekte auf Makrophagen und die Atherogenese verlieren, so dass der Erhalt der Funktion von HDL/ApoA-I ein Ansatzpunkt zur Therapie der Atherosklerose darstellen könnte. In der vorliegenden Habilitationsschrift wird der Effekt von nativem und MPO-modifiziertem ApoA-I auf die Atherosklerose, sowie die Makrophagen-Biologie im Speziellen beschrieben.

Lokale antiinflammatorische Anwendung eines Statins: Neben der Cholesterin-senkenden Wirkung über die Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) in Hepatozyten werden Statine direkte antiinflammatorische Effekte zugeschrieben. Diese sind unabhängig von der Cholesterin-Senkung und werden auf modulatorische Effekte durch die Hemmung der HMG-CoA Reduktase in Immunzellen, wie Makrophagen, zurückgeführt.^{40, 41} Oral eingenommenes Statin wird in erster Linie hepatisch verstoffwechselt (hepatischer „first-pass“ Effekt), sodass (bei regulären Statin-Dosen) die Konzentration im Blut und in der Folge im atherosklerotischen Plaque eher gering ist (geringe systemische Bioverfügbarkeit von Statinen).⁴² Mittels eines Drug-Delivery Systems, wie einem injizierbaren Nanopartikel bestehend aus rekonstituiertem HDL (rHDL) und einem Statin, kann das Statin vor dem Abbau geschützt zum Plaque transportiert werden, um dort lokal antiinflammatorische Effekte hervorzurufen.⁴² Dieser Ansatz ermöglicht die Evaluation der direkten Statin-Effekte auf atherosklerotische Plaques und im Speziellen auf die Makrophagen *in vivo*. In der vorliegenden Habilitationsschrift wird der Effekt eines Statins auf Makrophagen in atherosklerotischen Plaques beschrieben.

Genetische Inaktivierung der immunoproteasomalen Untereinheit $\beta 5i/LMP7$: In eukaryotischen Zellen stellt das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zusammen mit dem Lysosom den Hauptabbaumechanismus für Proteine dar.^{43, 44} Damit ist das UPS in die

Regulation einer Reihe von Mediatoren involviert, die in Atherosklerose-assoziierten Prozessen eine entscheidende Rolle spielen wie z.B. die Inflammation (u.a. Aktivierung von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells [NF- κ B]), die Proliferation oder die Apoptose.^{44, 45} Die proteolytische Degradation von Proteinen erfolgt im 26S-Proteasom, wobei sich die proteolytische Aktivität auf die drei β -Untereinheiten: β 5 (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), β 2 (Trypsin-ähnliche Aktivität) und β 1 (Caspase-ähnliche Aktivität) verteilt.⁴⁴ Unter inflammatorischen Bedingungen werden diese drei konstitutiven β -Untereinheiten durch die Isoformen β 5i/LMP7, β 2i/MECL-1 und β 1i/LMP2 ersetzt, was zur Bildung des sogenannten Immunoproteasoms (IP) führt.⁴⁶ Das IP stellt das vorrangig exprimierte Proteasom in Immunzellen dar.⁴⁷ Der immunoproteasomalen Untereinheit β 5i/LMP7 wird eine besondere Rolle für den Erhalt der zellulären Protein-Homöostase unter inflammatorischem Stress zugeschrieben.⁴⁸⁻⁵⁰ Durch eine selektive Inhibition der β 5i/LMP7 Untereinheit konnten in inflammatorischen Erkrankungen wie der Kolitis oder Arthritis bereits antiinflammatorische Effekte erzielt werden.⁵¹⁻⁵³ Darüber hinaus konnte eine Rolle der β 5i/LMP7 Untereinheit bei der Makrophagen-Polarisation nachgewiesen werden. So wurde nach genetischer Inaktivierung der β 5i/LMP7 Untereinheit eine verstärkte M2 Polarisation von Alveolarmakrophagen beobachtet.⁵⁴ Bisher existierten keine Daten zum IP in der Atherosklerose. Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift wird der Effekt einer genetischen Inaktivierung der β 5i/LMP7 Untereinheit auf die Atherosklerose beschrieben. Der Gehalt an Makrophagen im Gewebe wird u.a. durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, sowie die Emigration von Makrophagen aus dem Gewebe beeinflusst. Ein genaues Verständnis dieser Prozesse ist wichtig für die Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte zur Behandlung der Atherosklerose und der AS.

Rolle der neuronalen Guidance-Moleküle bei der Retention von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques: Während der Resolutionsphase einer akuten Entzündung emigrieren aktivierte Makrophagen vom Ort des Entzündungsgeschehens in Richtung der drainierenden Lymphknoten.^{55, 56} In Studien zur Regression der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass Makrophagen unter Regressionsbedingungen vermehrt

Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren und über die Interaktion des CCR7-Rezeptors mit den beiden Chemokinen CCL19 und 21 aus atherosklerotischen Plaques emigrieren.^{27, 33} Im Gegensatz zu einer akuten Entzündung stellt die Atherosklerose eine chronisch progressive entzündliche Erkrankung dar, so dass die eingewanderten Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques verharren und akkumulieren.⁵⁶ In Vorarbeiten konnte das neuronale Guidance-Molekül Netrin-1 als ein verantwortlicher Mediator für die Retention von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques identifiziert werden.^{57, 58} In Expressionsanalysen von Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques zeigte sich ein weiteres neuronales Guidance-Molekül, Semaphorin 3, welches von Makrophagen bei der Regression der Atherosklerose deutlich schwächer exprimiert wird im Vergleich zu Makrophagen, die aus progredienten Plaques stammen.⁵⁶ Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wird der Effekt von Semaphorin 3 auf die migratorischen Eigenschaften von Makrophagen in der Atherosklerose beschrieben.

Evaluierung von Monozyten-Subpopulationen bei der AS: Während individuelle Monozyten-Subpopulationen mit der Atherosklerose und ihren Manifestationsformen assoziiert wurden^{9, 59}, fehlten bisher Daten zur Verteilung von klassischen, intermediären und nicht-klassischen Monozyten für die AS. Im Rahmen dieser Habilitationsschrift werden erste Daten zur Verteilung der individuellen Monozyten-Subpopulationen bei der AS und nach einem Aortenklappenersatz vorgestellt.

2. Ergebnisse

2.1 Die Korrektur der Hypercholesterinämie mittels eines MTP Inhibitors führt zur Regression von Atherosklerose mit Abnahme des Makrophagen-Gehalts und Zunahme von M2 Markern in atherosklerotischen Plaques

Hewing B, Parathath S, Mai CK, Fiel MI, Guo L, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis with MTP inhibitor treatment. *Atherosclerosis*. 2013 Mar;227(1):125-9.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.026>

Inhibitoren des mikrosomalen Triglycerid-Transferproteins (MTP) führen zu einer effektiven Senkung der Konzentration Apolipoprotein B (apoB)-haltiger Lipoproteine im Blut.²⁸ In dieser Studie wurde der Effekt einer Lipidsenkung mittels eines MTP Inhibitors auf die Makrophagen in der Atherosklerose untersucht. LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse wurden mit einer Hochfett-Diät über 16 Wochen zur Entwicklung fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques behandelt. Anschließend wurden die Mäuse auf eine Normal-Fett Diät mit Zusatz von MTP Inhibitor BMS 212122 (MTPi Gruppe) umgesetzt (Kontrollgruppe ohne Zusatz des MTP Inhibitors). In der MTPi Gruppe kam es zu einer raschen und ausgeprägten Abnahme der Plasma-Lipidkonzentrationen. Die atherosklerotischen Plaques der MTPi Gruppe wiesen einen signifikant reduzierten Gehalt an Makrophagen gegenüber der Kontrollgruppe auf; darüber hinaus zeigte sich in den Plaques eine Abnahme an inflammatorischen M1 Markern, sowie eine Zunahme an antiinflammatorischen M2 Markern. Die Plaques der MTPi Gruppe wiesen zudem Eigenschaften auf, die beim Menschen mit einer vermehrten Plaque-Stabilität assoziiert sind, wie ein erhöhter Gehalt an Kollagen.

Zusammenfassend konnte die Studie zeigen, dass die Korrektur der Hypercholesterinämie durch MTP Inhibition zu einer Regression der Atherosklerose führt.

2.2 Natives Apolipoprotein A-I (ApoA-I), jedoch nicht modifiziertes ApoA-I reduziert den Gehalt an Makrophagen, sowie den inflammatorischen Status von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques

Hewing B, Parathath S, Barrett T, Chung WK, Astudillo YM, Hamada T, Ramkhelawon B, Tallant TC, Yusufshaq MS, Didonato JA, Huang Y, Buffa J, Berisha SZ, Smith JD, Hazen SL, Fisher EA. Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein a-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014 Apr;34(4):779-89.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303044>

HDL und ApoA-I spielen eine zentrale Rolle beim Cholesterin-Efflux aus Makrophagen.³¹ Beiden Molekülen werden darüber hinaus eine Reihe weiterer atheroprotektiver Eigenschaften zugeschrieben.^{31, 32} In klinischen Studien konnte bisher jedoch nicht überzeugend gezeigt werden, dass eine therapeutische Erhöhung von HDL bzw. ApoA-I kardiovaskuläre Ereignisse reduziert.^{2, 31, 32, 36} HDL bzw. ApoA-I können ähnlich wie LDL oxidativ modifiziert werden, z.B. durch MPO.⁶⁰ Blut von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung, sowie humane atherosklerotische Plaques weisen einen erhöhten Gehalt an MPO-modifiziertem ApoA-I auf.³⁸ In *in vitro* Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass die Modifikation von ApoA-I durch MPO zu einem gestörten ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-vermittelten Cholesterin-Efflux führt.³⁹ Ziel dieser Studie war es daher die Auswirkungen der ApoA-I Modifikation durch MPO in der Atherosklerose zu untersuchen. ApoA-I-defiziente und hypercholesterinämische Apolipoprotein E-defiziente Mäuse wurden mittels Injektionen von humanem nativen ApoA-I oder MPO-modifizierten ApoA-I behandelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass ApoA-I durch die MPO-Modifikation dysfunktional wird hinsichtlich folgender Eigenschaften: 1.) den reversen Cholesterintransport (RCT) zu vermitteln, 2.) den Gehalt an Makrophagen in atherosklerotischen Plaques zu reduzieren und 3.) den inflammatorischen Status von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques abzuschwächen.

Diese Studie konnte somit zeigen, dass für die atheroprotektiven Effekte von ApoA-I auf Makrophagen der Erhalt der nativen, funktionalen Form von ApoA-I entscheidend ist.

2.3 Rekonstituiertes HDL (rHDL) als Nanopartikel-Carrier für Simvastatin reduziert den Makrophagen-Gehalt und den inflammatorischen Status in atherosklerotischen Plaques

Duivenvoorden R*, Tang J*, Cormode DP, Mieszawska AJ, Izquierdo-Garcia D, Ozcan C, Otten MJ, Zaidi N, Lobatto ME, van Rijs SM, Priem B, Kuan EL, Martel C, **Hewing B**, Sager H, Nahrendorf M, Randolph GJ, Stroes ES, Fuster V, Fisher EA, Fayad ZA, Mulder WJ. A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nature Communications*. 2014;5:3065.

*) geteilte Erstautorenschaft

<https://doi.org/10.1038/ncomms4065>

Wie in den beiden vorangegangenen Projekten gezeigt wurde, kann über eine Veränderung des Lipidstatus die Makrophagen-Biologie beeinflusst werden. Statine werden neben der Hemmung der Cholesterinsynthese direkte antiinflammatorische Effekte zugesprochen.⁴² Um den direkten Effekt eines Statins auf Makrophagen in der atherosklerotischen Gefäßwand zu untersuchen, wurde in dieser Studie rHDL (basierend auf humanem ApoA-I) als Nanopartikel-Carrier mit Simvastatin (Statin-rHDL) beladen und im Atherosklerose-Mausmodell (Infusion von Statin-rHDL in Apolipoprotein E-defiziente Mäuse), sowie *in vitro* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Statin-rHDL: 1.) die Mevalonat-vermittelte inflammatorische Antwort von Makrophagen *in vitro* vermindert, 2.) in atherosklerotischen Plaques akkumuliert und dort von Makrophagen aufgenommen wird, sowie 3.) den Gehalt an Makrophagen und deren inflammatorischen Status in atherosklerotischen Plaques deutlich reduziert.

Statin-rHDL stellt somit eine neuartige und vielversprechende Nanotherapie zur Behandlung der Inflammation in atherosklerotischen Plaques dar.

2.4 Das Fehlen der immunoproteasomalen Untereinheit $\beta 5i/LMP7$ hat keinen Einfluss auf die inflammatorischen Eigenschaften von Makrophagen und die proteolytische Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) in Makrophagen

Hewing B, Ludwig A, Dan C, Pötzsch M, Hannemann C, Petry A, Lauer D, Görlach A, Kaschina E, Müller DN, Baumann G, Stangl V, Stangl K, Wilck N. Immunoproteasome subunit $\beta 5i/LMP7$ -deficiency in atherosclerosis. *Scientific Reports*. 2017 Oct;7(1):13342.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13592-w>

In dieser Studie wurde untersucht, ob das Fehlen der immunoproteasomalen Untereinheit $\beta 5i/LMP7$ einen positiven Effekt auf die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Makrophagen in der Atherosklerose hat.

In vivo zeigte eine $\beta 5i/LMP7$ -Defizienz keine Auswirkung auf die Entwicklung früher oder fortgeschrittener Atherosklerose-Stadien (Atherosklerose-Mausmodell: LDL-Rezeptor-defiziente Maus mit zusätzlicher Defizienz der $\beta 5i/LMP7$ Untereinheit). Der Gehalt an Makrophagen, sowie die Akkumulation von Polyubiquitin-Konjugaten in atherosklerotischen Plaques waren durch die $\beta 5i/LMP7$ -Defizienz unbeeinflusst. In *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass in das 26S-Proteasom $\beta 5i/LMP7$ -defizienter Makrophagen konstitutive Proteasom-Untereinheiten zusammen mit IP-Untereinheiten inkorporiert werden, was auf die Bildung von sogenannten intermediären Proteasom-Subpopulationen schließen lässt. Die $\beta 5i/LMP7$ -Defizienz hatte keinen Einfluss auf die phänotypischen (M1 versus M2 Phänotyp), sowie funktionellen Eigenschaften von Makrophagen (wie z.B. die proteolytische Aktivität des UPS in den Makrophagen).

Wie in der Einleitung beschrieben, wird der Gehalt an Makrophagen im Gewebe u.a. durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, sowie die Emigration von Makrophagen aus dem Gewebe beeinflusst. Ein genaues Verständnis dieser Prozesse ist von wesentlicher Bedeutung für die Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte für die Atherosklerose und die erworbene Aortenklappenstenose (AS).

2.5 Das neuronale Guidance-Molekül Semaphorin 3E wird in atherosklerotischen Plaques exprimiert und blockiert die Migration von Makrophagen

Wanschel A*, Seibert T*, **Hewing B**, Ramkhelawon B, Ray TD, van Gils JM, Rayner KJ, Feig JE, O'Brien ER, Fisher EA, Moore KJ. Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013 May;33(5):886-93.

*) geteilte Erstautorenschaft

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300941>

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das neuronale Guidance-Molekül Netrin-1 die Retention von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques begünstigt.^{57, 58} Ziel dieser Studie war es die Expression eines weiteren Vertreters der neuronalen Guidance-Moleküle, Semaphorin 3E (Sema3E), in der Atherosklerose zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Sema3E von Makrophagen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques exprimiert wird. Hingegen wiesen Makrophagen der Regression der Atherosklerose eine deutlich verminderte Sema3E Expression auf. Passend dazu zeigte sich *in vitro*, dass Sema3E hauptsächlich von M1 Makrophagen, sowie unter Applikation atherogener Stimuli exprimiert wird und weniger durch M2 Makrophagen. In *in vitro* Experimenten blockierte Sema3E die Migration von Makrophagen zu Chemokinen, die mit der Emigration von Makrophagen aus Plaques assoziiert sind (wie z.B. CCL19). Dies impliziert, dass Sema3E, ähnlich wie Netrin-1, die Retention von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques begünstigt.

Diese Studie unterstreicht die Bedeutung von neuronalen Guidance-Molekülen für die Immunzellregulation, sowie für einen potentiellen therapeutischen Ansatz in der Atherosklerose.

2.6 Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose (AS) weisen einen erhöhten Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten auf

Hewing B, Au SC, Ludwig A, Ellerbroek R, van Dijck P, Hartmann L, Grubitzsch H, Giannini C, Laule M, Stangl V, Baumann G, Stangl K. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2017 Feb;10(1):27-34.

<https://doi.org/10.1007/s12265-016-9726-9>

In dieser Studie wurden erstmalig die individuellen Monozyten-Subpopulationen – klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten – im Blut von Patienten mit hochgradiger AS untersucht und mit einer Alters- und Geschlechts-angepassten Kontrollgruppe ohne AS verglichen. Dazu wurde den Patienten Blut aus einer peripheren Vene entnommen und die Monozyten-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit einer AS (n=100 Patienten) gegenüber der Kontrollgruppe (n=75 Patienten) einen signifikant höheren (relativen und absoluten) Gehalt an intermediären Monozyten im Blut aufweisen. Hingegen unterschied sich der Gehalt an zirkulierenden klassischen und nicht-klassischen Monozyten nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Die Ergebnisse dieser Beobachtungs-Studie weisen somit auf eine mögliche Rolle der zirkulierenden intermediären Monozyten in der Pathogenese der AS hin. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten nun individuelle Monozyten-Subpopulationen, insbesondere die intermediären Monozyten, in größer angelegten, prospektiven Studien hinsichtlich einer Bedeutung in der Pathogenese der AS, als Biomarker für die Progression der AS, sowie als potentielle therapeutische Targets evaluiert werden.

2.7 Der Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten nimmt bei Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose (AS) nach einem Aortenklappenersatz ab

Hewing B, Ellerbroek R, Au SC, Stangl V, Dreger H, Laule M, Grubitzsch H, Knebel F, Baumann G, Ludwig A, Stangl K. Levels of circulating intermediate monocytes decrease after aortic valve replacement in patients with severe aortic stenosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017 Dec;117(12):2346-55.

<https://doi.org/10.1160/TH17-05-0341>

Hämodynamische Veränderungen (z.B. durch Ausdauertraining) beeinflussen die Verteilung zirkulierender Monozyten-Subpopulationen.⁶¹⁻⁶³ Ausgehend von unserer Beobachtung, dass Patienten mit hochgradiger AS einen erhöhten Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten aufweisen, wurde in dieser Studie untersucht, inwiefern sich die Verteilung der Monozyten-Subpopulation nach einem kardiochirurgischen (SAVR) oder einem minimal-invasiven, kathetergestützten (TAVR) Aortenklappenersatz verändert. Dazu wurden die Monozyten-Subpopulationen im Blut von Patienten mit hochgradiger AS vor (Baseline), sowie 3- und 6-Monate nach SAVR (n=25 Patienten) und TAVR (n=44 Patienten) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach einem Aortenklappenersatz (SAVR und TAVR) kam es zu einer signifikanten Abnahme des (relativen und absoluten) Gehalts an zirkulierenden intermediären Monozyten. Diese Veränderung trat bei Patienten, die einen TAVR erhalten hatten frühzeitiger auf (zwischen dem Baseline-Zeitpunkt und 3-Monats Follow-up) als bei Patienten die einen SAVR erhalten hatten (zwischen dem 3- und 6-Monats Follow-up). Eine hämodynamische Verbesserung der Patienten nach SAVR und TAVR zeigte sich in der Änderung echokardiographischer Parameter, sowie in der Abnahme von NT-proBNP (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide). Hingegen blieb 6 Monate nach SAVR und TAVR die Konzentration inflammatorischer Marker wie z.B. CRP im Blut relativ unverändert im Vergleich zum Baseline-Zeitpunkt. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Verteilung zirkulierender Monozyten-Subpopulationen bei der AS durch die Hämodynamik beeinflusst wird.

3. Diskussion

Die Atherosklerose und die erworbene Aortenklappenstenose werden als chronisch inflammatorische Erkrankungen angesehen, dennoch beinhaltet die Standardtherapie beider Erkrankungen bisher keine direkten antiinflammatorischen Therapieansätze. In den letzten Jahren hat unser Wissen über inflammatorische Prozesse beider Erkrankungen deutlich zugenommen, sodass mittlerweile einzelne antiinflammatorische Therapieansätze (für die Atherosklerose) in klinischen Studien evaluiert werden.³ Mit der (in der Einleitung) bereits erwähnten CANTOS Studie konnte erstmalig in einer groß angelegten, randomisierten klinischen Studie eine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse für einen antiinflammatorischen Therapieansatz in der Atherosklerose gezeigt werden.⁴ In der Pathogenese der Atherosklerose und der AS spielen Monozyten und Makrophagen eine zentrale Rolle und stellen somit interessante Targets für antiinflammatorische Therapieansätze dar. Dabei sind die übergeordneten Ziele zum einen die Verzögerung der Progression der Erkrankung, sowie die Regression bereits bestehender atherosklerotischer Plaques oder Klappenveränderungen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Regression der Atherosklerose durch eine Abnahme des Gehalts an Makrophagen in atherosklerotischen Plaques, sowie eine Zunahme der Marker für einen M2 Phänotyp der Makrophagen charakterisiert ist.^{14, 64}

Der Gehalt an Makrophagen in Geweben wird im Wesentlichen durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, die lokale Proliferation und die Apoptose von Makrophagen im Gewebe, sowie die Emigration von Makrophagen aus dem Gewebe bestimmt.⁶ Bei der Regression der Atherosklerose ist die Expression von Chemokinen, die für die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut verantwortlich sind (wie z.B. MCP-1) in Makrophagen reduziert.^{33, 65} Während der Resolutionsphase einer akuten Entzündung emigrieren aktivierte Makrophagen vom Ort des Entzündungsgeschehens in Richtung der drainierenden Lymphknoten.^{55, 56} Bei der Regression der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass CD68-positive Plaque-Zellen (hauptsächlich Makrophagen) über eine vermehrte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 in Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques

emigrieren.²⁷ In der Atherogenese scheint aufgrund des chronischen Entzündungsprozesses diese Emigration von Makrophagen aus den atherosklerotischen Plaques jedoch gestört, so dass die Makrophagen in der Gefäßwand persistieren und folglich akkumulieren.⁵⁶

Die genauen Mechanismen der phänotypischen Veränderung von Makrophagen (vom M1 zum M2 Phänotyp) während der Regression der Atherosklerose sind nicht vollständig geklärt. Makrophagen besitzen eine gewisse Plastizität, sodass eine Verschiebung des Phänotyps vom M1 zum M2 Phänotyp innerhalb einer Zelle denkbar wäre.⁶ Zudem könnte eine lokale Proliferation von gewebeständigen M2 Makrophagen, sowie nach neueren experimentellen Daten auch eine Neurekrutierung von Monozyten aus dem Blut, welche zu M2 Makrophagen differenzieren, den Anteil an M2 Makrophagen in atherosklerotischen Plaques bei der Regression der Atherosklerose steigern.^{64, 66}

Der Lipidstatus hat einen wesentlichen Einfluss auf die Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques und die phänotypischen Eigenschaften der Makrophagen.²⁶ In Projekt 2.1 konnte über eine Behandlung der Hypercholesterinämie mit einem MTP Inhibitor im Mausmodell eine Regression der Atherosklerose erreicht werden.⁶⁵ Neben der Abnahme des Gehalts an Makrophagen, der Abnahme von M1 Markern, sowie der Zunahme von M2 Markern (wie z.B. Arginase 1) wiesen die Plaques einen vermehrten Kollagengehalt auf. Kollagen wird u.a. von M2 Makrophagen sezerniert – ein Prozess der mit der erhöhten Expression von Arginase 1 in M2 Makrophagen assoziiert ist.^{67, 68} Eine direkte Wirkung des MTP Inhibitors auf atherosklerotische Plaques und die Makrophagen scheint eher unwahrscheinlich²⁶, sodass die beobachteten Effekte auf die Korrektur der Hypercholesterinämie zurückzuführen sind. Trotz der effektiven Lipidsenkung unter einer Therapie mit einem MTP Inhibitor ist eine breite Anwendung durch die Nebenwirkungen der MTP Inhibitoren bei einer Dauertherapie begrenzt (häufig auftretende hepatische Nebenwirkungen, wie Leberverfettung und der Anstieg von Leberenzymen).⁶⁹ Aktuell ist der MTP Inhibitor Lomitapid als Teil der Behandlung erwachsener Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie (HoFH) in Europa zugelassen.⁷⁰ Statine sind das Mittel der ersten Wahl zur pharmakologischen Therapie der Hypercholesterinämie beim

Vorhandensein einer Atherosklerose.⁷¹ Neben der Cholesterin-Senkung über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in Hepatozyten bedingen Statine antiinflammatorische Effekte in Immunzellen.⁴² Die Konzentration der Statine im Blut und in atherosklerotischen Plaques ist jedoch bei oraler Einnahme (von regulären Statin-Dosen) aufgrund der ausgeprägten hepatischen Verstoffwechslung gering.⁴² Mittels eines Drug-Delivery Systems in Form eines injizierbaren Nanopartikels aus rHDL und Simvastatin (Statin-rHDL) gelang es im Mausmodell das Statin durch den HDL-Carrier vor dem Abbau zu schützen und zum Plaque zu transportieren, wo es von Makrophagen aufgenommen wurde (Projekt 2.3).⁴² In der Folge senkte Statin-rHDL den Gehalt an Makrophagen und deren inflammatorischen Status in den atherosklerotischen Plaques, was auf eine Inhibition des Mevalonat-Signalwegs in den Makrophagen zurückzuführen ist.⁴² Dieser Effekt war wesentlich ausgeprägter gegenüber einer alleinigen Behandlung mit Simvastatin oder rHDL. Bei einer klinischen Anwendung von Statin-rHDL wäre beim Menschen ein synergistischer Effekt in Form der Cholesterin-senkenden Wirkung durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in Hepatozyten, sowie des antiinflammatorischen Effekts in atherosklerotischen Plaques zu erwarten.⁴² Zudem wurde bereits für beide Komponenten dieses Nanopartikels – rHDL und insbesondere Simvastatin – eine gute Verträglichkeit beim Menschen in klinischen Studien gezeigt.⁷² Aus diesen Gründen stellt die Nanopartikel-Therapie mit Statin-rHDL einen vielversprechenden antiinflammatorischen Ansatz für die Therapie der Atherosklerose dar, der weiter verfolgt werden sollte.

Basierend auf der inversen Assoziation von HDL und dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse aus epidemiologischen Studien, sowie den beschriebenen atheroprotektiven Eigenschaften von HDL bzw. ApoA-I wurden große Hoffnungen auf HDL/ApoA-I-erhöhende Behandlungskonzepte (wie z.B. die Inhibition des Cholesterinester-Transferprotein [CETP]) in der Therapie der Atherosklerose gesetzt; diese konnten jedoch bisher (auch in groß angelegten klinischen Studien) hinsichtlich einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse nicht überzeugen.^{29, 30 36} Eine Erklärung dafür könnte in einer gestörten Funktionalität von HDL-Partikeln bzw. von ApoA-I bedingt durch oxidative Modifikationen liegen. In Projekt 2.2 wies

MPO-modifiziertes ApoA-I gegenüber nativem ApoA-I einen gestörten Cholesterin-Efflux aus Makrophagen, sowie folglich einen gestörten RCT auf. Insbesondere der Cholesterin-Efflux ist für die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Makrophagen von wesentlicher Bedeutung, da diese durch den Sterol-Gehalt in der Zelle beeinflusst werden.⁶⁰ MPO-modifiziertes ApoA-I war nicht in der Lage den Makrophagen-Gehalt in atherosklerotischen Plaques hyperlipidämischer Mäuse zu senken, sowie deren inflammatorische Aktivität abzuschwächen bzw. eine Zunahme der Expression von M2 Markern zu induzieren.⁶⁰ Zu den Mechanismen über die natives ApoA-I zu einem geringeren Gehalt an Makrophagen in atherosklerotischen Plaques führen kann, zählt zum einen die verminderte Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut aufgrund einer Regredienz der Leukozytose, sowie einer abgeschwächten Expression von Chemokinen wie z.B. MCP-1 durch die Makrophagen. Zum anderen induziert ApoA-I über die gesteigerte Expression von CCR7 in Makrophagen eine vermehrte Emigration von Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques.^{33, 60} In der Promoter-Region von CCR7 befinden sich sogenannte Sterol Regulatory Elements (SRE), sodass die Expression von CCR7 u.a. vom Sterol-Gehalt der Zelle beeinflusst wird.⁷³ Indikativ für eine Reduktion des zellulären Sterol-Gehalts in der mit nativem ApoA-I behandelten Gruppe in Projekt 2.2 waren dabei der geringere Gehalt an Cholesterinester in den atherosklerotischen Plaques, sowie die gesteigerte Expression von HMG-CoA-Reduktase in den Plaquemakrophagen.⁶⁰ Zu den möglichen Mechanismen über die natives ApoA-I zu einer Reduktion von M1 und Zunahme von M2 Markern der Makrophagen führt, zählt dessen Wirkung auf den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 Signalweg, sowie die Stimulation des STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6) Signalwegs (der eine wichtige Rolle bei der Polarisierung von Makrophagen zum M2 Phänotyp spielt).^{32, 74, 75} Diese Effekte könnten durch die Modifikation von ApoA-I abgeschwächt zu sein. Als Konsequenz für eine antiinflammatorische Therapie der Atherosklerose stellen daher die Prävention der Modifikation von HDL/ApoA-I (z.B. durch Inhibition von MPO) oder die Generierung von HDL/ApoA-I-Therapeutika, welche resistent gegenüber Modifikationen sind, Ansätze zur Weiterentwicklungen des HDL/ApoA-I

Behandlungskonzeptes dar. Genaue Kenntnisse über den heterogenen und komplexen HDL-Partikel, sowie dessen Modifikationen und funktionelle Eigenschaften (sowohl im Blut als auch in atherosklerotischen Plaques) sind dazu erforderlich.³² In klinischen Studien zu HDL/ApoA-I-erhöhenden Therapien wird als primärer Parameter die Konzentration von HDL-Cholesterin im Blut bestimmt, welches die Funktionalität der HDL-Partikel jedoch nicht abbildet. Hier wäre die Implementierung funktioneller Tests (wie z.B. in der Dallas-Heart-Studie⁷⁶ anhand der Cholesterin-Efflux Kapazität) notwendig, die jedoch mit einem deutlich höheren methodischen Aufwand verbunden wären.²⁹ Zudem gilt es zu berücksichtigen, dass der Anteil an modifiziertem HDL/ApoA-I in der Gefäßwand wesentlich höher ist als im Blut, sodass dieses durch im Plasma gewonnenes HDL/ApoA-I nicht ausreichend widerspiegelt wird.^{32, 37, 38}

In vorausgegangenen Studien hat unsere Arbeitsgruppe die Effekte einer Inhibition des Proteasoms auf die Atherogenese untersucht.^{77, 78} Diese Ergebnisse unterstützen die postulierte duale Rolle des Proteasoms in der Atherogenese⁴⁴ mit günstigen Effekten einer Proteasominhibition in frühen Stadien der Atherosklerose (Abschwächung der Atherogenese) und eher ungünstigen Effekten bei bereits bestehender fortgeschrittener Atherosklerose (Zunahme von Markern für instabile Plaque).^{77, 78} Die Modulation des IP wie in Projekt 2.4 stellt gegenüber dieser generellen (unselektiven) Proteasominhibition einen immunzellspezifischen Ansatz dar. In Projekt 2.4 zeigte sich jedoch, dass das Fehlen der immunoproteasomalen Untereinheit $\beta 5i/LMP7$ keinen Effekt auf den Gehalt der Makrophagen in atherosklerotischen Plaques (bei frühen und fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadien), sowie die phänotypischen (M1 versus M2 Phänotyp) und funktionellen (Abbau polyubiquitinerter Proteine, Zellüberleben unter oxidativem Stress) Eigenschaften der Makrophagen hat.⁴⁷ Dies ist darauf zurückzuführen, dass die fehlende IP Untereinheit durch die korrespondierende Standard-Untereinheit, $\beta 5$, ersetzt wird, was zur Formation von sogenannten intermediären Proteasomen (Mischproteasom) in den Makrophagen führt.⁴⁷ Dabei unterschied sich die proteolytische Aktivität zwischen Makrophagen mit und ohne $\beta 5i/LMP7$ -Defizienz nicht, so dass davon ausgegangen werden

kann, dass die fehlende $\beta 5i/LMP7$ Untereinheit funktionell vollständig kompensiert wird. Dieser experimentelle Ansatz liefert jedoch keine Aussage über die Auswirkungen einer selektiven, pharmakologischen Inhibition der $\beta 5i/LMP7$ Untereinheit. Interessant ist in diesem Zusammenhang die aktuelle Entwicklung selektiverer Proteasom-Inhibitoren, die gezielt am IP ansetzen wie z.B. der $\beta 5i/LMP7$ -selektive Inhibitor ONX0914 (PR-957) der bereits vielversprechende Effekte in experimentellen Modellen zur rheumatoiden Arthritis oder zur Kolitis gezeigt hat.^{44, 53} Daher ist es ein Schwerpunkt unserer weiteren Forschung die Wirkung einer selektiven pharmakologischen Inhibition der $\beta 5i/LMP7$ Untereinheit auf inflammatorische Eigenschaften von Makrophagen in der Atherogenese zu untersuchen.

Die Modulation der Zellmigration von Monozyten/Makrophagen stellt einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Atherosklerose dar.⁷⁹ Wie bereits weiter oben diskutiert, konnte gezeigt werden, dass während der Regression der Atherosklerose Makrophagen CCR7-abhängig aus atherosklerotischen Plaques emigrieren. In den Arbeiten zu Netrin-1^{57, 58} und Semaphorin 3E⁵⁶ (Projekt 2.5) konnte nun gezeigt werden, dass die Gruppe der neuronalen Guidance-Moleküle die Migration der Makrophagen beeinflussen und auf diese Weise die Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques über eine Retention der Zellen begünstigen können. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Emigration von Makrophagen aus atherosklerotischen Plaques durch ein sehr komplexes Wechselspiel bestehend aus begünstigenden Faktoren („gas pedals“) wie z.B. CCR7 und inhibitorischen Faktoren („brakes“) wie z.B. Netrin-1 oder Semaphorin 3E reguliert wird.^{56, 79}

Im Hinblick auf eine Manipulation der Zellmigration als therapeutischen Behandlungsansatz in der Atherosklerose besteht die Schwierigkeit nun in der Koordination dieser verschiedenen Signale mit dem Ziel einer gerichteten Migration aus atherosklerotischen Plaques.⁷⁹ Daher sind weitere grundlagenwissenschaftliche Studien erforderlich, um das Verständnis der Zellmigration-assoziierten Faktoren, deren Beeinflussbarkeit, sowie deren Wechselwirkungen voranzubringen.

Im Gegensatz zur Atherosklerose ist die Kenntnis über Monozyten-Makrophagen-Abstammungslinien bei der AS weitaus lückenhafter. Folglich sind zur Entwicklung möglicher

antiinflammatorischer Behandlungskonzepte ein besseres Verständnis der Rolle der individuellen Monozyten- und Makrophagen-Subpopulationen bei dieser Erkrankung erforderlich. In Projekt 2.6 konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Verteilung der Monozyten-Subpopulationen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) im Blut beim Vorliegen einer hochgradigen AS verändert ist.⁸⁰ Der Nachweis eines erhöhten Gehalts an zirkulierenden intermediären Monozyten bei hochgradiger AS ist hierbei interessant, da intermediäre Monozyten als besonders inflammatorische Monozyten-Subpopulation gelten und bereits mit der Atherosklerose und ihren Manifestationsformen assoziiert wurden.^{9, 10} In Projekt 2.7 konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an zirkulierenden intermediären Monozyten innerhalb eines Beobachtungszeitraums von sechs Monaten nach einem (chirurgischen und minimal-invasiven, kathetergestützten) Aortenklappenersatz bei Patienten mit hochgradiger AS abnimmt.⁸¹ Nach einem Aortenklappenersatz wiesen die Patienten verbesserte hämodynamische Parameter auf, während klassische inflammatorische Marker im Wesentlichen unverändert blieben. Daher ist anzunehmen, dass die beobachteten Veränderungen in der Verteilung der Monozyten-Subpopulationen nach einem Aortenklappenersatz unter anderem auf Änderungen in der Hämodynamik zurückzuführen sind. Interessanterweise waren Assoziationen zwischen der Hämodynamik und der Verteilung von individuellen Monozyten-Subpopulationen (insbesondere von CD16-positiven Monozyten) auch von weiteren Arbeitsgruppen in einem anderen Kontext beobachtet worden.⁶¹⁻⁶³ Unsere Ergebnisse dienen als Ausgangspunkte für die weiteren Forschungsvorhaben bei denen individuelle Monozyten-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Bedeutung in der Pathogenese der AS, als Biomarker für die Transformation von der Aortenklappensklerose zur AS, als Biomarker für das klinische Outcome nach einem Aortenklappenersatz, sowie als therapeutische Targets evaluiert werden.⁸⁰

4. Zusammenfassung

Die Atherosklerose und die erworbene Aortenklappenstenose (AS) werden als chronisch inflammatorische Erkrankungen der arteriellen Gefäßwand bzw. des Klappengewebes angesehen. In der Pathogenese beider Erkrankungen spielen Monozyten und Makrophagen eine bedeutende Rolle und stellen daher potentielle Targets für antiinflammatorische Therapieansätze dar. Ziel einer antiinflammatorischen Therapie in der Atherosklerose ist es, die Atherogenese abzuschwächen und darüberhinaus eine Regression bereits bestehender Plaques herbeizuführen. Dazu gilt es den Gehalt an Makrophagen in atherosklerotischen Plaques zu verringern, die nachteiligen Effekte der inflammatorischen M1 Makrophagen abzuschwächen, sowie eine Verschiebung des M1/M2-Verhältnisses in Richtung des antiinflammatorischen M2 Makrophagen Phänotyps zu bewirken. Diese Ziele konnten im Mausmodell durch eine Korrektur der Hypercholesterinämie mittels Erhöhung von funktionalem Apolipoprotein A-I, sowie durch eine lokale Anwendung eines Statins im atherosklerotischen Plaque erreicht werden.

Der Gehalt an Makrophagen im Gewebe wird u.a. durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, sowie die Emigration von Makrophagen aus dem Gewebe beeinflusst. Ein genaues Verständnis dieser Prozesse ist von wesentlicher Bedeutung für die Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte für die Atherosklerose und die AS. Es konnte gezeigt werden, dass neuronale Guidance-Moleküle (wie Netrin-1 und Semaphorin 3E) eine Retention von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques begünstigen können. Für die AS fehlen noch grundlegende Erkenntnisse zu Monozyten-Makrophagen-Abstammungslinien um geeignete Therapieansätze entwickeln zu können. Es werden daher erstmalig Daten zur Verteilung individueller Monozyten-Subpopulationen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) bei der AS und nach Behandlung der AS mittels eines Aortenklappenersatzes gezeigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Gehalt an intermediären Monozyten im Blut von Patienten mit hochgradiger AS erhöht ist und im Verlauf nach Beseitigung der AS mittels eines Aortenklappenersatzes abnimmt. Diese Ergebnisse dienen als Ausgangspunkt

für weitere Forschungsprojekte zur Rolle der Monozyten-Subpopulationen in der Pathogenese der AS.

Monozyten und Makrophagen stellen vielversprechende Targets für die antiinflammatorische Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Die weitere Vertiefung der Erkenntnisse zur Rolle der Monozyten und Makrophagen in der Pathogenese der Atherosklerose und der AS ist notwendig, um den Weg für neuartige Ansätze zur Modulation dieser Zellen und somit für zukünftige antiinflammatorische Therapiestrategien zu bahnen.

5. Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
2. Hewing B, Fisher EA. Rationale for cholesteryl ester transfer protein inhibition. *Curr Opin Lipidol* 2012;23:372-6.
3. Charo IF, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:365-76.
4. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017.
5. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;473:317-25.
6. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013;13:709-21.
7. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 2007;117:185-94.
8. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17:1410-22.
9. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106:757-62.
10. Weber C, Shantsila E, Hristov M, *et al.* Role and analysis of monocyte subsets in cardiovascular disease. Joint consensus document of the European Society of Cardiology (ESC) Working Groups "Atherosclerosis & Vascular Biology" and "Thrombosis". *Thromb Haemost* 2016;116:626-37.
11. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-80.
12. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med* 2015;4:5.
13. Yang J, Zhang L, Yu C, *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2014;2:1.
14. Hewing B, Fisher EA. Preclinical mouse models and methods for the discovery of the causes and treatments of atherosclerosis. *Expert Opin Drug Discov* 2012;7:207-16.
15. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* 2013;112:1624-33.
16. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-64.

17. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14-20.
18. Wilson HM. Macrophages heterogeneity in atherosclerosis - implications for therapy. *J Cell Mol Med* 2010;14:2055-65.
19. Medbury HJ, Williams H, Fletcher JP. Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease. *Clin Transl Med* 2014;3:63.
20. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, *et al.* Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1262-75.
21. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 2013;368:2004-13.
22. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005;111:3316-26.
23. Otto CM, Prendergast B. Aortic-valve stenosis--from patients at risk to severe valve obstruction. *N Engl J Med* 2014;371:744-56.
24. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, *et al.* 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: The Task Force for the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 2017.
25. Zhu X, Lee JY, Timmins JM, *et al.* Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific *Abca1* knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J Biol Chem* 2008;283:22930-41.
26. Feig JE, Parathath S, Rong JX, *et al.* Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* 2011;123:989-98.
27. Trogan E, Feig JE, Dogan S, *et al.* Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3781-6.
28. Brautbar A, Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. *Nature reviews. Cardiology* 2011;8:253-65.
29. Hewing B, Landmesser U. LDL, HDL, VLDL, and CVD Prevention: Lessons from Genetics? *Curr Cardiol Rep* 2015;17:610.
30. Hewing B, Moore KJ, Fisher EA. HDL and cardiovascular risk: time to call the plumber? *Circ Res* 2012;111:1117-20.
31. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, *et al.* High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2813-20.

32. Feig JE, Hewing B, Smith JD, *et al.* High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies. *Circ Res* 2014;114:205-13.
33. Feig JE, Rong JX, Shamir R, *et al.* HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:7166-71.
34. Shaw JA, Bobik A, Murphy A, *et al.* Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res* 2008;103:1084-91.
35. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, *et al.* Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:992-7.
36. Group HTRC, Bowman L, Hopewell JC, *et al.* Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med* 2017;377:1217-1227.
37. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, *et al.* An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat Med* 2014;20:193-203.
38. DiDonato JA, Huang Y, Aulak KS, *et al.* Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma. *Circulation* 2013;128:1644-55.
39. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, *et al.* Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529-41.
40. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, *et al.* Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6:1399-402.
41. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:482-6.
42. Duivenvoorden R, Tang J, Cormode DP, *et al.* A statin-loaded reconstituted high-density lipoprotein nanoparticle inhibits atherosclerotic plaque inflammation. *Nat Commun* 2014;5:3065.
43. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895-9.
44. Wilck N, Ludwig A. Targeting the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: status quo, challenges, and perspectives. *Antioxid Redox Signal* 2014;21:2344-63.
45. Meiners S, Laule M, Rother W, *et al.* Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation* 2002;105:483-9.
46. Dahlmann B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch Biochem Biophys* 2016;591:132-40.

47. Hewing B, Ludwig A, Dan C, *et al.* Immunoproteasome subunit $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis. *Sci Rep* 2017;7:13342.
48. Nathan JA, Spinnenhirn V, Schmidtke G, *et al.* Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell* 2013;152:1184-94.
49. Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613-24.
50. Ebstein F, Voigt A, Lange N, *et al.* Immunoproteasomes are important for proteostasis in immune responses. *Cell* 2013;152:935-7.
51. Basler M, Dajee M, Moll C, *et al.* Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J Immunol* 2010;185:634-41.
52. Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, *et al.* Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *J Immunol* 2012;189:4182-93.
53. Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 2009;15:781-7.
54. Chen S, Kammerl IE, Vosyka O, *et al.* Immunoproteasome dysfunction augments alternative polarization of alveolar macrophages. *Cell Death Differ* 2016;23:1026-37.
55. Bellingan GJ, Caldwell H, Howie SE, *et al.* In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol* 1996;157:2577-85.
56. Wanschel A, Seibert T, Hewing B, *et al.* Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:886-93.
57. van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, *et al.* The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* 2012.
58. Ramkhalawon B, Yang Y, van Gils JM, *et al.* Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1180-8.
59. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, *et al.* CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1512-20.
60. Hewing B, Parathath S, Barrett T, *et al.* Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein a-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:779-89.

61. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, *et al.* Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C578-86.
62. Hong S, Mills PJ. Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain Behav Immun* 2008;22:590-9.
63. Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, *et al.* Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. *Mediators Inflamm* 2014;2014:216534.
64. Rahman K, Vengrenyuk Y, Ramsey SA, *et al.* Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 2017;127:2904-2915.
65. Hewing B, Parathath S, Mai CK, *et al.* Rapid regression of atherosclerosis with MTP inhibitor treatment. *Atherosclerosis* 2013;227:125-9.
66. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 2011;332:1284-8.
67. Parathath S, Mick SL, Feig JE, *et al.* Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism. *Circ Res* 2011;109:1141-52.
68. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol* 2014;5:533.
69. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO, *et al.* Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2007;356:148-56.
70. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, *et al.* Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2014;35:2146-57.
71. Catapano AL, Graham I, De Backer G, *et al.* 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 2016;37:2999-3058.
72. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, *et al.* Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *Jama* 2007;297:1675-82.
73. Feig JE, Shang Y, Rotllan N, *et al.* Statins Promote the Regression of Atherosclerosis via Activation of the CCR7-Dependent Emigration Pathway in Macrophages. *PLoS One* 2011;6:e28534.

74. Sanson M, Distel E, Fisher EA. HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process. *PLoS One* 2013;8:e74676.
75. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, *et al.* Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2008;118:1837-47.
76. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, *et al.* HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med* 2014;371:2383-93.
77. Wilck N, Fechner M, Dan C, *et al.* The Effect of Low-Dose Proteasome Inhibition on Pre-Existing Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Int J Mol Sci* 2017;18.
78. Wilck N, Fechner M, Dreger H, *et al.* Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1418-26.
79. Gerszten RE, Tager AM. The monocyte in atherosclerosis--should I stay or should I go now? *N Engl J Med* 2012;366:1734-6.
80. Hewing B, Au SC, Ludwig A, *et al.* Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2017;10:27-34.
81. Hewing B, Ellerbroek R, Au SC, *et al.* Levels of Circulating Intermediate Monocytes Decrease after Aortic Valve Replacement in Patients with Severe Aortic Stenosis. *Thromb Haemost* 2017;117:2346-2355.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl, kommissarischer Klinikdirektor der Medizinischen Klinik m.S. Kardiologie und Angiologie am Campus Mitte der Charité-Universitätsmedizin Berlin, möchte ich für seine großzügige Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung danken.

Zudem möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Mentoren Herrn Prof. Edward A. Fisher und Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Antje Ludwig bedanken für die fortwährende und wertvolle Zusammenarbeit, sowie die herausragende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann für ihre exzellente Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit.

Für die gemeinsame Verwirklichung von Projekten und die vielen interessanten Diskussionen danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Henryk Dreger, Herrn Prof. Dr. med. Fabian Knebel, Herrn Dr. med. Wolfram Poller, Herrn Prof. Carl Blobel, Herrn Dr. med. Nicola Wilck, Herrn Dr. med. Fabian Halleck, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Spethmann, Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz, sowie den Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Für die großzügige Förderung bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem BIH Charité Clinician Scientist Programm (insbesondere Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun), der Friede-Springer-Herz-Stiftung, sowie dem DZHK (German Centre for Cardiovascular Research) partner site Berlin.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Nina, für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung danken.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, November 2017

Dr. med. Bernd Hewing