

**Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck**

**Analyse der bakteriellen Besiedlung arteriosklerotischer
Läsionen bei Carotisstenose, abdominellem Aortenaneurysma
oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Lena Alexandra Strobel

aus Stuttgart

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Kleemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Reppel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2022

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 23.09.2022

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
I. Einleitung	1
I.1. Gefäßchirurgische Erkrankungen der Arterien	2
I.1.1. Periphere arterielle Verschlusskrankheit der unteren Extremität	2
I.1.2. Extrakranielle Carotisstenose	3
I.1.3. Abdominelles Bauchaortenaneurysma	4
I.2. Arteriosklerose	6
I.2.1. Ätiologie	6
I.2.2. Pathogenese	8
I.2.2.1. LDL-Modifikation	8
I.2.2.2. Endotheliale Aktivierung und Dysfunktion	8
I.2.2.3. Lokale und systemische Entzündungsreaktion	9
I.2.2.4. Ausbildung des stabilen Plaques	10
I.2.2.5. Plaqueinstabilität und –ruptur	11
I.2.3. Unvollständigkeit bisheriger pathogenetischer Erklärungsversuche	13
I.3. Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose	13
I.3.1. Indirekter und direkter Einfluss des Darmmetagenoms	13
I.3.2. Theorie der systemischen Entzündungsreaktion	14
I.3.3. Theorie der Gefäßinfektion	14
I.3.4. Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms und seine Auswirkung auf die Progression der Arteriosklerose	15
I.3.5. Pathogen Burden	17
I.4. Fragestellung	19

II. Material und Methoden	20
II.1. Material	20
II.1.1. Geräte	20
II.1.2. Verbrauchsmaterialien	20
II.1.3. Kits für DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung	21
II.1.4. Chemikalien	21
II.1.4.1. Chemikalien für Probeneinlagerung	21
II.1.4.2. Chemikalien für DNA-Extraktion	21
II.1.4.3. Chemikalien für PCR	22
II.1.4.3.1. PCR-Mix pro Probe	22
II.1.4.3.2. Gel, Marker und Laufpuffer	22
II.1.4.4. Chemikalien für Sequenzierung	22
II.1.5. Software	22
II.2. Methoden	23
II.2.1. Patientenkollektiv	23
II.2.2. Probengewinnung mittels Thrombendarteriektomie	24
II.2.3. Gewinnung und Lagerung von Serumproben	25
II.2.4. Kryokonservierung der TEA-Zylinder und Serumproben	26
II.2.5. Anlegung einer Datenbank	26
II.2.6. Aufarbeitung und Analyse der Proben	26
II.2.6.1. DNA-Isolation	27
II.2.6.2. DNA-Amplifikation und –Sequenzierung	27
II.2.6.3. Datenprozessierung	28
II.2.7. Biostatistische Datenanalyse	28
III. Ergebnisse	30
III.1. Mikrobiom der TEA-Zylinder in Abhängigkeit von der Herkunft	30

III.1.1. Diversität des Mikrobioms der TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Herkunft	35
III.2. Vergleich des Mikrobioms von TEA-Zylindern und Serum	37
III.3. Unbesiedelte TEA-Zylinder	39
IV. Diskussion	40
IV.1. Patientenkollektiv	40
IV.1.1. Alter- und Geschlechterverteilung	40
IV.1.2. Erkrankungsart	40
IV.2. Methodik	40
IV.3. Beurteilung der mikrobiellen Besiedlung der untersuchten Gefäßabschnitte	42
IV.3.1. Besiedlungsmuster in Abhängigkeit von der Herkunft	43
IV.3.2. Sterile arteriosklerotische Gefäßabschnitte	45
IV.3.3. Besiedlungsmuster in Serum und Gefäßabschnitten	46
IV.4. Limitationen	48
IV.5. Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse	49
IV.6. Ausblick	51
V. Zusammenfassung	52
VI. Literaturverzeichnis	53
VII. Anhang	81
VII.1. Positives Ethikvotum	81
VII.2. Optimierte Extraktionsprotokolle	82
VII.3. Primertabelle	83
VIII. Eidesstattliche Versicherung	84
IX. Danksagungen	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
Abb.	Abbildung
ACI	Arteria carotis interna
CCA	Canonical Correlation Analysis (kanonische Korrelationsanalyse)
CRP	C-reaktives Protein
CTA	computertomographische Angiographie
EVAR	endovaskuläre Aortenreperatur
HDL	High-density Lipoprotein
HSP	heat shock protein (Hitzeschutzprotein)
ICB-L	Interdisziplinäres Zentrum für Biobanking Lübeck
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
MRA	Magnetresonanztomographie
OTU	Operative Taxonomic Unit (taxonomische Arbeitseinheit)
oxLDL	oxidiertes LDL
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCoA	Principle Coordinates Analysis (Hauptkoordinatenanalyse)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SR	Scavenger-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TEA	Thrombendarteriektomie
TF	Tissue Faktor
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TMAO	Trimethylaminoxid
TLR	Toll-like Rezeptor

UKSH

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

WHO

Weltgesundheitsorganisation

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1: Pathogenese der Arteriosklerose (nach Lorowski und Cullen, 2007)	12
Abb. 2: Die Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose	18
Abb. 3: Übersicht Patientenstamm	23
Abb. 4: Durchführung einer TEA	24
Abb. 5: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Stämmen	29
Abb. 6: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Stämmen, dargestellt ohne die 3 häufigsten Taxa (a), sowie die Anzahl der Taxa auf Stammniveau als Boxplot ohne die drei häufigsten Taxa (b)	30
Abb. 7: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Gattungen	31
Abb. 8: Relative Abundanz (%) von Lactobacillen, Streptokokken und Acetobacterae in TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose als Boxplot	32
Abb. 9.: Shannon-Diversitätsindex (a), Pielou's evenness (b) und die Anzahl der Taxa (c) dargestellt als Boxplot als Maße der Alphadiversität in Abhängigkeit von der Herkunft auf Gattungsebene	34
Abb. 10: PCoA (a) und CCA (b) als Maße der Betadiversität der TEA-Zylinder in Abhängigkeit von der Herkunft	35
Abb. 11: PCoA als Maß der Betadiversität der bakteriellen Besiedlungen von Serum und Gewebe (TEA-Zylinder)	36
Abb. 12: Relative Abundanz (%) der bakteriellen Besiedlung von Serum- und Gewebeproben (a) sowie die Anzahl der Taxa dargestellt als Boxplot (b), beides auf Gattungsniveau	37
Abb. 13: Shannon-Diversitätsindex dargestellt als Boxplot als Maß der Alpha-diversität der bakteriellen Besiedlung von Serum und Gewebe (TEA-Zylinder)	38
Abb. 14: Fazit zur Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose	49
Tab. 1: Risikofaktoren für das Erkranken an Arteriosklerose	7
Tab. 2: Statistische Signifikanz der relativen Abundanz der Bakterienstämme bzw. -gattungen in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose	33

I. EINLEITUNG

Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche, langsam progrediente, systemische Erkrankung der großen Arterien. Sie ist die häufigste Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen und manifestiert sich daher mit einer Latenz mehrerer Jahre klinisch vielfältig: Durch Erkrankung der Koronarien entsteht die koronare Herzkrankheit (KHK). Zerebral kann die Stenosierung der A. carotis interna (ACI) eine transitorische ischämische Attacke (TIA) oder einen Apoplex verursachen. Sind periphere Gefäße betroffen, entsteht vor allem in den unteren Extremitäten das Krankheitsbild der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), die schlimmstenfalls zum Verlust der betroffenen Extremität führen kann. Im Bereich der Bauchaorta können sich durch die Veränderung der Gefäßstruktur rupturgefährdete Aneurysmen bilden. Sind die Mesenterial- oder Nierenarterien erkrankt, ist eine Funktionsminderung oder der Verlust des Endorgans zu erwarten. Selten sind Gefäßabschnitte isoliert betroffen, sodass Patienten mit einer manifesten Gefäßerkrankung ein erhöhtes Risiko für weitere zusätzliche kardiovaskuläre Erkrankungen haben.

Die KHK und der Apoplex sind die häufigsten Todesursachen weltweit. Obwohl vor allem in der westlichen Welt die Inzidenz aufgrund verbesserter primärer Präventionsprogramme und konsequenterer Therapie der Risikofaktoren sinkt, versterben jährlich 17,9 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, was 31% aller Tode weltweit ausmacht (WHO-Database 2021).

Die Ursachen und Genese der Arteriosklerose sind bis dato noch nicht hinreichend geklärt, auch wenn Risikofaktoren identifiziert werden konnten und eine Vielzahl an Aspekten der Pathogenese belegt wurden. So gibt es mehrere Ansatzpunkte zur Prophylaxe und Progressionshemmung der Arteriosklerose, eine kausale Therapie ist aber bis dato nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb neue Erkenntnisse über die Entstehung der Arteriosklerose zu gewinnen. Der Fokus liegt dabei explizit auf einer vermeintlichen Beteiligung von Bakterien, die seit mehreren Jahrzehnten aufgrund vielversprechender Ergebnisse an Tiermodellen immer wieder angenommen wird. Ob und wie diese Annahme auf den Menschen übertragbar ist, soll in dieser Arbeit nun weiter geprüft werden, um in Zukunft möglicherweise eine verbesserte Prophylaxe oder sogar eine Therapie oder Heilung der Arteriosklerose ermöglichen zu können.

I.1. Gefäßchirurgische Erkrankungen der Arterien

Aus gefäßchirurgischer Sicht sind vor allem die pAVK, die extrakranielle Carotisstenose und das abdominelle Aortenaneurysma (AAA) relevant, weshalb sie im Fokus dieser Arbeit stehen. Die Arteriosklerose ist bei allen Erkrankungen in über 90% der Fälle ursächlich. Weitere Ursachen sind degenerative Erkrankungen, Traumata oder genetische wie auch entzündliche Prozesse (Kogel, 2007). Betroffene Gefäße neigen zur Stenosierung, Aneurysmabildung oder dem Kinking / Coiling. Da die Gefäßveränderungen über Jahre progredient sind, ist ein in Stadien fortschreitendes Krankheitsbild mit zunehmender Mortalitätsrate die Folge. Die pAVK birgt im Vergleich zu koronaren oder zerebrovaskulären Gefäßerkrankungen mit 21,14% das höchste kardiovaskuläre 1-Jahres-Mortalitätsrisiko (Steg et al., 2007). Sind mehrere kardiovaskuläre Erkrankungen gleichzeitig vorhanden, verschlechtert sich ihre Prognose gegenseitig deutlich (Meves et al., 2010).

Allen Therapieoptionen liegt immer das Management der kardiovaskulären Risikofaktoren zugrunde (s. I.2.1). In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankungen wird aber meist eine invasive Therapie notwendig, die interventionell, endovaskulär oder offen operativ, bspw. als Thrombendarteriektomie (TEA), erfolgen kann. Damit wird jedoch nicht die Ursache der Erkrankung behandelt, sondern nur die Symptomatik gelindert und die Mortalität gesenkt.

I.1.1. Periphere arterielle Verschlusskrankheit der unteren Extremität

Die pAVK der unteren Extremität ist gekennzeichnet durch chronische femoropopliteale Verschlussprozesse, deren Folge eine Minderdurchblutung der weiter distal gelegenen Beinetaen ist. Die Verschlüsse treten selten isoliert auf, meist sind mehrere Arterien an einem Bein gleichzeitig betroffen (Hepp, 2007). Die Gesamtprävalenz der pAVK in der Bevölkerung liegt bei 3-10%, steigt aber ab dem 70. Lebensjahr auf 15-20%. Während im jüngeren Alter Männer häufiger betroffen sind als Frauen, kehrt sich diese Relation ab dem 75. Lebensjahr um (Criqui et al., 1985; Diehm et al., 2004).

Die Symptomatik kann nach Fontaine in die Stadien I-IV unterteilt werden. Patienten im Stadium I sind asymptomatisch, ab Stadium II treten erste Symptome in Form der „Claudicatio intermittens“ auf. Ihr Schweregrad wird anhand der noch möglichen Gehstrecke ermittelt. Ab Stadium III liegt eine extremitätenbedrohende Mangelversorgung vor, die

sich durch einen ischämischen Ruheschmerz (Stadium III) oder Nekrosen in Form von Ulzera oder Gangrän (Stadium IV) äußert (Fontaine et al., 1954).

Zur Diagnostik der pAVK werden die klinische Untersuchung, die Messung des Ankle-Brachial-Index, die Oszillographie, die transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung und bildgebende Verfahren wie die farbkodierte Duplexsonographie, Magnetresonanztomographie (MRA) oder computertomographische Angiographie (CTA) angewendet (Norgren et al., 2007; European Stroke Organisation et al., 2011; Rooke et al., 2011; Layden et al., 2012; Lawall, Huppert und Rümenapf, 2015). Wichtig für die Entscheidung der Therapiemodalität ist außerdem eine Gehstreckenmessung, bei der die Symptomatik des Patienten objektiviert wird.

Therapeutisch soll in frühen Stadien vor allem die schmerzfreie und maximale Gehstrecke und damit die Lebensqualität der Patienten verbessert werden. Therapie der Wahl ist deshalb ein strukturiertes Gehtraining, das allein oder im Anschluss an eine interventionelle Therapie durchgeführt werden kann (Greenhalgh et al., 2008; Lane et al., 2014).

In Stadium III und IV steht das amputationsfreie Überleben der Patienten im Vordergrund, sodass das Hauptziel die Beseitigung der kritischen Extremitätenischämie durch eine endovaskuläre oder offen chirurgische Revaskularisation ist. Auch Prostanoiden können zum Einsatz kommen. Erst bei intolerablen Schmerzen oder Infektionen der durch Ischämie entstandenen Nekrosen wird als ultima ratio eine Amputation durchgeführt (Debus und Grundmann, 2015; Lawall, Huppert und Rümenapf, 2015).

I.1.2. Extrakranielle Carotisstenose

Bei der extrakraniellen Carotisstenose handelt es sich um einen meist primär einseitigen Engstelle der Carotisstrombahn, die ab einem bestimmten Stenosegrad zu einer zerebralen Ischämie führen kann. Die gepoolte Prävalenz einer moderaten Stenose liegt bei 4,2%, die einer hochgradigen bei 1,7%. Am häufigsten betroffen sind Männer im 6.-7. Lebensjahrzehnt (de Weerd et al., 2009). Patienten mit vaskulären Risikofaktoren weisen eine auf 10-30% erhöhte Prävalenz auf (Eckstein et al., 2020). Eine Stenosierung des Gefäßlumens kann unter anderem eine ipsilaterale Ischämie in Form einer TIA oder eines Apoplex zur Folge haben. In den überwiegenden Fällen ist dafür eine arterio-arterielle Embolie ursächlich, in den übrigen 5-8% wird die Stenose hämodynamisch wirksam (Hennerici et al., 1998). Nach dem Auftreten erster Symptome steigt das Insultrisiko innerhalb von zwei

Wochen auf 26,1% (Tsantilas et al., 2015). Es wird angenommen, dass ungefähr 20% aller Apoplexe durch Carotisstenosen verursacht werden (Eckstein et al., 2020).

Der Stenosegrad kann doppler- und duplexsonographisch bestimmt und nach den NASCET-Kriterien eingeteilt werden. Zur diagnostischen Absicherung kann darüber hinaus eine digitale Subtraktionsangiographie, eine Kontrastmittel-verstärkte MRA oder eine CTA erfolgen (Eckstein et al., 2020). Ein Screening auf asymptomatische Carotisstenosen mittels Duplexsonographie ist nicht empfohlen (Jonas et al., 2014).

Operativ erfolgt als Standard meist eine Carotis-Endarteriektomie (CEA) in Form einer konventionellen TEA mit Patchplastik (s. Kapitel II.2.2) oder einer Eversions-TEA. Ebenso möglich ist eine Stentanlage oder in seltenen Fällen ein Bypass-Verfahren oder eine Kürzungsoperation bei Knickstenosen. Nach einem Schlaganfall sollte eine operative Therapie der betroffenen Seite nur noch eingeschränkt erfolgen, kann aber auf der kontralateralen Seite zur Prävention eines erneuten Apoplex indiziert sein (Hepp und Sigala, 2007).

I.1.3. Abdominelles Bauchaortenaneurysma

Das AAA ist definiert als eine >30mm große Aussackung der Aorta abdominalis, die am häufigsten infrarenal auftritt (Johnston et al., 1991; Erbel et al., 2015). Die Prävalenz des AAA beträgt in der männlichen Bevölkerung im Durchschnitt 1,3-1,7% und ist alters- und geschlechtsabhängig. Das größte Risiko für die Entwicklung eines AAA haben >75 Jahre alte, rauchende Männer (Guirguis-Blake et al., 2014).

Die Symptome eines Aneurysma sind mit Beschwerden wie Rückenschmerzen, Abwehrspannung bei der körperlichen Untersuchung oder dem Auftreten embolischer Ereignisse sehr unspezifisch. Daher wird eine Screening-Untersuchungen mittels abdomineller Duplexsonographie für Männer und rauchende Frauen ab dem 65. Lebensjahr empfohlen (Debus et al., 2018).

Risikofaktoren, die die Rupturgefahr eines Aneurysmas erhöhen, sind weibliches Geschlecht, gegenwärtiges Rauchen und ein zunehmender AAA-Durchmesser (Lederle, Wilson et al., 2002; Powell et al., 2002). Daher wird eine Nikotinkarenz sowie eine regelmäßige Wachstumskontrolle eines asymptomatischen Aneurysmas mittels Duplexsonographie oder CTA empfohlen (Pujades-Rodrigues et al., 2015; Debus et al., 2018).

Übersteigt der Durchmesser eines asymptomatischen AAA 5,5cm bei Männern oder 5,0cm bei Frauen bzw. nimmt >10mm/Jahr zu, liegt aufgrund des erhöhten Rupturrisiko die Indi-

kation zur elektiven Therapie vor. Hier kann unter Abwägung der Patientenkonstitution zwischen einer operativen prothetischen und einer endovaskulären Versorgung mittels endovaskulärer Aortenreperatur (EVAR) gewählt werden (Filardo et al., 2015; Debus et al., 2018). Symptomatische AAA sollten dringlich wenn möglich endovaskulär behandelt werden (Soden et al., 2016). Zur präoperativen Planung bei einem intakten AAA ist die CTA die bildgebende Methode der Wahl (Corriere et al., 2014).

Ein rupturiertes AAA stellt einen gefäßmedizinischen Notfall dar und muss sofort invasiv therapiert werden (Debus et al., 2018). Die Gesamtmortalität eines rupturierten AAA beträgt ca. 50% (Karthikesalingam et al., 2014).

I.2. Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist laut Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) „(...) eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“ Sie ist demnach im allgemeinen Verständnis keine einheitliche Entität, sondern kann in Aussehen und Lokalisation variieren. Meistens wird der Begriff Arteriosklerose äquivalent zur Beschreibung der aus einem Lipidkern und einer fibrinösen Kappe bestehenden Artherosklerose verwendet.

Viele der bereits postulierten Theorien zur Pathogenese, wie die von Anitschkow aufgestellte Cholesterinhypothese oder Virchows bereits in den 1850ern formulierte Entzündungshypothese, konnten in den letzten 40 Jahren in Teilen bestätigt werden (Virchow, 1856; Faber, 1912; Steinberg, 2013). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von Pathogenen immer wieder in Erwägung gezogen. Grundlage dafür waren die Entdeckungen, dass mit Staphylokokken infizierte Kaninchen und mit einem avianen Herpesvirus befallene Hühner arteriosklerotische Läsionen entwickeln (Saltykow, 1908; Minick et al., 1979; Fabricant et al., 1983). Die Weiterverfolgung jener Theorien ist Gegenstand dieser Arbeit. Vorerst soll jedoch im Folgenden ein Überblick über den Stand der Forschung zu den bisher geläufigsten Pathomechanismen und ihren Ursachen gegeben werden.

I.2.1. Ätiologie

Als Ursache für die Arteriosklerose wird ein komplexes, multifaktorielles Zusammenspiel aus den zugrundeliegenden Erkrankungen, genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren angenommen (s. Tab. 1). Man geht zudem von der Existenz weiterer, bisher nicht identifizierter Risikofaktoren aus, da nicht alle an Arteriosklerose erkrankten Patienten konventionelle Risikofaktoren aufweisen (Futerman und Lemberg, 1998). Die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen beginnt zum Teil schon in der Kindheit (Berenson et al., 1998; Berenson, 2002; Geerts et al., 2012; Sun et al., 2013). Je fortgeschrittener die als Risikofaktor zugrundeliegende Erkrankung ist, desto höher ist das Risiko an einer arteriosklerotischen Folgeerkrankung zu erkranken oder zu versterben (Herrington et al., 2016). Untereinander wirken zugrundeliegende Erkrankungen nicht nur additiv, sondern können sich auch gegenseitig in ihrer Wirkung potenzieren (Fernandez-Britto et al., 1991; Berenson et al.,

1998; Lüscher, 2003). Wie die Risikofaktoren jedoch die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen initiieren und im Einzelnen interagieren, ist noch nicht hinreichend geklärt und aufgrund der starken genetischen Komponenten schlecht vorhersehbar (Piper und Orrild, 1956).

Risikofaktoren mit genetischer Komponente	Umweltbedingte Risikofaktoren
Erhöhter Blutdruck oder Hypertonie ¹	Feinstaubbelastung ¹⁸
Metabolisches Syndrom ²	Pathogene ¹⁹
Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas ⁹	Rauchen ¹⁵
Cholesterol ↑ ³	Fetteiche Ernährung ¹⁶
High-density Lipoprotein (HDL) ↓ ⁴	Bewegungsmangel ¹⁷
Low-density Lipoprotein (LDL) ↑ sowie	
Very-low-density Lipoprotein (VLDL) ↑ ⁵	
Triglyceride ↑ ⁶	
Lipoprotein (a) ↑ ⁷	
Hämostatische Faktoren ↑ ⁸	
Depression ¹⁰	
Chronische Nierenerkrankung ¹¹	
Positive Familienanamnese ¹²	
Geschlecht in Abhängigkeit vom Alter ¹³	
Systemische Entzündung ¹⁴	

Tab. 1: Risikofaktoren für das Erkranken an Arteriosklerose

¹Levy et al., 1990; Neaton und Wentworth, 1992; Lewington et al., 2002; Lieb et al., 2013; ² van Kuik et al., 2010; ³Anderson et al., 1987; Levy et al., 1990; Neaton und Wentworth, 1992; ⁴Levy et al., 1990; ⁵Cullen et al., 1997; ⁶Nordestgaard und Varbo, 2014; ⁷Kronenberg et al., 1999; Laschkolnig et al., 2014; ⁸Thompson et al., 1995; ⁹Sarwar et al., 2010; Cavender et al., 2015; ¹⁰Glassman und Shapiro, 1998; ¹¹Schiffrin et al., 2007; Matsushita et al., 2010; Palmer et al., 2011; ¹²Goldbourt und Neufeld, 1986; Sun et al., 2013; Khaleghi et al., 2014; ¹³Levy et al., 1990; Nathan und Chaudhuri, 1997; Assmann et al., 1998; Lewington et al., 2007; ¹⁴s. Kapitel 1.2.2.3.; ¹⁵Levy et al., 1990; Lu et al., 2014; ¹⁶Kromhout et al., 1995; Burr et al., 1998; ¹⁷Künzli et al., 2005; ¹⁸Paffenberger et al., 1978; ¹⁹s. Kapitel 1.3.

I.2.2. Pathogenese

Basierend auf der Response-to-injury-Theorie nach Ross (Ross und Glomset, 1976a+b, Ross et al., 1977) wird in einem neuen Erklärungsmodell zur Entstehung arteriosklerotischer Läsionen davon ausgegangen, dass die oben genannten Risikofaktoren als metabolische, mechanische, chemische und physikalische Noxen eine endotheliale Aktivierung und Dysfunktion sowie eine folgende Entzündungsreaktion hervorrufen. Bei fehlender Eindämmung der Inflammation wird die Anatomie der Gefäßwand so verändert, dass das Endothel erodiert oder die Intima rupturiert. Der folgende Kontakt zwischen Blut und Gewebe führt zur Thrombenbildung und zur Freisetzung von Mediatoren, die die vorbestehende Läsion unterhalten. Durch die Thrombosierung entsteht lokal eine Stenose, die distal eine Mangelversorgung des Gewebes hervorruft. Des Weiteren können rupturierte Plaqueteile oder der Thrombus in die distal liegenden Gebiete abgeschwemmt werden und eine Embolie verursachen (s. Abb. 1).

I.2.2.1. LDL-Modifikation

Eine Schlüsselreaktion zur Formierung arteriosklerotischer Läsionen scheint die Modifikation von LDL-Partikeln in der Intima zu sein. Sie können bspw. oxidiert oder enzymatisch hydrolysiert werden. Durch die Modifikation der Partikeloberfläche kann LDL nicht mehr über den nativen LDL-Rezeptor durch Zellen internalisiert werden und reichert sich in der Intima an (Witztum und Steinberg, 1991; Torzewski, 2018). Die Modifikationen finden auch in gesundem intimalem Gewebe statt, bei einem normalen Blutcholesterinspiegel kann das Cholesterin aber durch Umbauprozesse wieder abtransportiert werden. Eine erhöhte Menge an LDL-Partikeln oder verstärkter oxidativer Stress übersteigt jedoch die Kapazität des Systems, sodass es aus dem Gleichgewicht gerät (Simionescu et al., 1986). Folglich verbleiben LDL-Partikel in der Intima, werden modifiziert und entfalten ihre Wirkung über sogenannte scavenger-Rezeptoren (SR) auf die umliegenden Zellen (Parthasarathy et al., 1986; Wang und Aikawa, 2015).

I.2.2.2. Endotheliale Aktivierung und Dysfunktion

Dabei leitet die Aktivierung der Endothelzellen durch oxidiertes LDL (oxLDL) und hämodynamischen Scherstress über die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion den Krankheitsprozess ein: Die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wird erhöht, wodurch Monozyten und T-Lymphozyten aus dem Blut in die Läsion rekrutiert werden.

OxLDL selbst wirkt ebenfalls chemotaktisch (Quinn et al., 1987; Davies et al., 1993; Nageh et al., 1997; Korenaga et al., 1997). Intrazellulär entstehen zudem vermehrt Sauerstoffradikale, die eine Verringerung des endothelial gebildeten Stickstoffmonoxids bewirken. Dadurch entfallen der antiinflammatorische Effekt, die antithrombotische Funktion und der positive Einfluss auf das Zellüberleben (Topper et al., 1996; Cominacini et al., 2001; Galle et al., 2006). Zusätzlich belastet der induzierte Stress auf das Endoplasmatische Reticulum die Funktionalität der Endothelzellen, sodass sie apoptotisch werden (Brophy et al., 2017). Durch den Verlust der Barrierefunktion gelangen folglich noch mehr LDL-Partikel in die Gefäßwand. Diese werden wiederum modifiziert und treiben die endotheliale Dysfunktion voran.

I.2.2.3. Lokale und systemische Entzündungsreaktion

Die eingewanderten Immunzellen werden in der Intima aktiviert. Während sich Monozyten zu Makrophagen differenzieren, werden CD4⁺-T-Lymphozyten durch Kontakt mit oxLDL und Heat-Shock-Proteinen (HSP) zu T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen aktiviert. Auch das Komplementsystem und Toll-Like-Rezeptoren (TLR) werden über die genannten Plaquebestandteile aktiviert. Folge ist eine schwelende Entzündungsreaktion. Sie ist geprägt durch gleichzeitig ablaufende pro- und antiinflammatorische Mechanismen. Je ausgeprägter die Entzündung ist, desto schneller wird die Progression der Läsion vorangetrieben (Stemme et al., 1995; Monaco et al., 2004; Ait-Oufella et al., 2006; Moore et al., 2013; Wick et al., 2014; Hovland et al., 2015; Taleb, 2016).

Obwohl sich die Läsionen nur lokal an bestimmten Prädilektionsorten bilden, ist die Entzündungsreaktion auch systemisch. Buffon et al. konnten zeigen, dass bei der KHK neben den eigentlichen Läsionen in der Gefäßwand aller Koronarien auch morphologisch unauffälliges Gewebe latent entzündet ist (Buffon et al., 2002). Zusätzlich sind im Blut Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6) und Antikörper gegen oxLDL erhöht. Eine Neutrophilie und Monozytose liegen bei arteriosklerotischen Patienten ebenfalls vor (Montecucco et al., 2010; Virani et al., 2011; Taleb, 2016). Die Schwere der Entzündungsreaktion korreliert dabei mit dem Outcome und dem Mortalitätsrisiko (Lindahl et al., 2000; Guasti et al., 2011). Ursächlich ist nicht nur die Entzündung der geschädigten Gefäßwände, sondern auch die durch Adipositas und das metabolische Syndrom verursachte systemische Entzündungsreaktion (Drechsler et al., 2010; Nagareddy et al., 2013; Al Rifai et al., 2015). Auch andere Ursachen für chronische systemische Ent-

zündungen wie die rheumatoide Arthritis oder der systemische Lupus erythematoses korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose (Haque und Bruce, 2005; Ambrosino et al., 2015).

Die entstandene lokale und systemische Entzündungsreaktion ist anfangs eine Schutzmaßnahme, die das Gewebe z.B. vor den schädlichen Wirkungen des modifizierten LDL schützen soll. Im Verlauf werden die antiinflammatorischen Mechanismen allerdings unterdrückt oder fallen aus, sodass es zu einer überschießenden und chronischen Entzündungsreaktion kommt (Mor et al., 2006). Der genaue Auslöser hierfür ist derzeit noch Grundlage weiterer Forschung.

I.2.2.4. Ausbildung des stabilen Plaques

Zum Schutz der Intima wird also zunächst LDL durch Makrophagen phagozytiert und intrazellulär zu Cholesterol hydrolysiert. Im Normalfall wird dieses Cholesterol in HDL-Partikel eingebaut, um über die Galle ausgeschieden werden zu können. Modifiziertes LDL inhibiert den Cholesterol efflux und steigert die LDL-Aufnahme, sodass sich Cholesterol in den Makrophagen anhäuft. Die so entstandenen Schaumzellen verbleiben in der Intima, da modifiziertes LDL zusätzlich ihre Mobilität inhibiert (Goldstein et al., 1979; Steinberg et al., 1989; Nagy et al., 1998; Park et al., 2012). Ein entzündliches Milieu und veränderte Fettstoffwechselfparameter wirken dabei begünstigend (Madonna et al., 2011; Kashyap et al., 2012). Auch glatte Muskelzellen, die stimuliert durch Makrophagen aus der Media in die Intima migrieren, können modifiziertes LDL aufnehmen und zu Schaumzellen mutieren (Aoyama et al., 2000; Yan et al., 2011). Auf diese Weise häufen sich im Zentrum des Plaques ununterbrochen inflammatorische Schaumzellen an.

Eine weitere Reaktion der Muskelzellen auf die Stimulation durch Makrophagen ist die erhöhte Bildung von Matrixkomponenten. Infolgedessen fibrosiert die extrazelluläre Matrix um den Lipidkern. Diese fibrinöse Kappe sorgt vorerst für die Stabilität der Läsion und schirmt den thrombogenen Lipidkern vom Blut ab (Amento et al., 1991; Lee und Libby, 1997).

Die Zellverteilung sowie die Dicke der fibrinösen Kappe und des Lipidkerns variieren von Läsion zu Läsion, sodass sich unterschiedliche Morphologien ergeben (van der Wal, 1994). Diese Art von Plaque wird als stabil und zunächst nicht rupturgefährdet angesehen.

I.2.2.5. Plaqueinstabilität und –ruptur

Symptome treten erst dann auf, wenn der Plaque rupturiert und es durch den Kontakt zwischen Blut und Intima zur Thrombenbildung kommt oder wenn das Gefäß durch übermäßiges Wachstum des Plaques stenosierte.

Die Gefahr einer Ruptur des Plaques steigt, sobald die proinflammatorisch wirkenden Mechanismen in der arteriosklerotischen Läsion überwiegen. Da sie die Proliferation und Kollagenproduktion der glatten Muskelzellen hemmen und den enzymatischen Abbau des Kollagens verursachen, wird der Plaque instabil (Amento et al., 1991; Lee et al., 1995; Shah et al., 1995). Gleichzeitig verstärken sie die exzessive Anreicherung von Cholesterol in Makrophagen und glatten Muskelzellen, wodurch diese apoptotisch werden. Aufgrund einer unzureichenden Efferozytose der apoptotischen Zellen werden modifiziertes LDL, Cholesterol, freie Radikale, proteolytische Enzyme sowie der Tissue Factor (TF) freigesetzt. Dadurch wird die Entzündung stimuliert und die Apoptose in weiteren Zellen induziert (Björkerud und Björkerud, 1996; Geng et al., 1996; Geng et al., 1997; Kataoka et al., 2001; van Vré et al., 2012). Eine Erweichung des Lipidkerns ist die Folge. Die Gefahr einer Ruptur ist demnach umso höher, je dünner die fibrinöse Kappe und je weicher der Lipidkern ist (Loree et al., 1992; Loree et al., 1994).

Unterstützt wird der Prozess der Destabilisierung durch eine monozytär getriggerte Angiogenese. Die neugebildeten Gefäße sind anfälliger für Hämorrhagien, weshalb intraläsional Thromben entstehen. Die dadurch aktivierten Plättchen verursachen eine Rekrutierung neuer glatter Muskelzellen und unterhalten den Fortschritt der Läsion (Ramos et al., 1998). Überwiegt die Destabilisierung die regenerativen Kräfte, wird der Plaque anfälliger für hämodynamischen Stress und reißt ein. Der Riss entsteht vor allem an der randständig, proximal liegenden Schulterregion, da der hämodynamische Stress hier am stärksten wirkt und gehäuft proinflammatorische Monozyten und T-Lymphozyten vorkommen (Richardson et al., 1989). An den Stellen, die dem größten hämodynamischen Stress ausgesetzt sind, wird außerdem vermehrt Kollagen zersetzt (Lee et al., 1996). Durch den Riss kommt das Blut in Kontakt mit dem thrombogenen Kern, woraufhin es zur Thrombozytenaggregation und damit zur Ausbildung eines Thrombus kommt. Wird das subendotheliale Kollagen zerstört, ist eine Ablösung des Endothels die Folge. Dadurch kann eine Thrombose auch ohne vorherige Plaqueruptur entstehen. Durch Apoptose der Endothelzellen ist die Erosion eines Plaques ebenfalls möglich (Farb et al., 1996, Durand et al., 2004, Valente et al., 2014).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass der Entzündungsreaktion im Zusammenspiel mit den modifizierten LDL-Partikeln eine zentrale Rolle zuzukommen scheint, da sie durch ihre Eskalation und Chronifizierung die Progression der arteriosklerotischen Läsion vorantreibt.

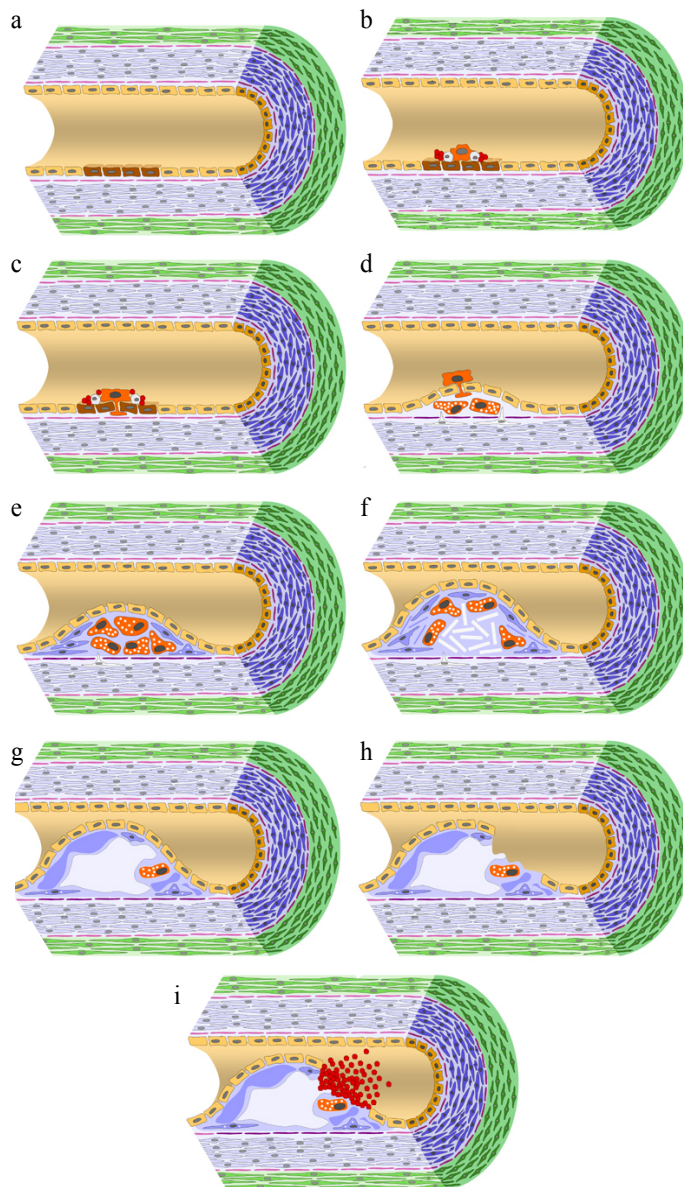


Abb. 1: Pathogenese der Arteriosklerose (nach Lorowski und Cullen, 2007)

Durch Stressoren wie bspw. oxLDL entsteht eine endotheliale Dysfunktion (a), die das Andocken (b) und die Migration (c) von Immunzellen, v.a. Makrophagen, in die Intima ermöglicht.

Dort rufen sie eine Entzündungsreaktion hervor.

Aktivierte Makrophagen phagozytieren oxLDL und mutieren zu Schaumzellen (d). Außerdem stimulieren sie die Migration glatter Muskelzellen in die Intima (e) und erhöhen deren Produktion von Matrixkomponenten (f). Dadurch bildet sich ein stabiler Plaque in der Gefäßwand (f).

Forciert sich die Entzündung, kommt es durch Apoptose der Schaumzellen und den Abbau der stabilisierenden Matrix zum Einschmelzen des Plaques (g) und schließlich zur Ruptur (h). Durch den Kontakt zwischen Blut und Intima entsteht ein Thrombus (i).

I.2.3. Unvollständigkeit bisheriger pathogenetischer Erklärungsversuche

Trotz der vielen belegten ätiologischen Zusammenhänge und einer zum Teil detailliert verstandenen Pathogenese sind noch immer einige essentielle Fragen zur Entstehung und Progression der Arteriosklerose offen: So konnten zum einen bisher lediglich Risikofaktoren durch rein epidemiologische Zusammenhänge identifiziert werden. Genaue Ursachen bzw. Erklärungen, wie die Risikofaktoren arteriosklerotische Veränderungen hervorrufen, fehlen jedoch. Zum anderen sind die als Risikofaktoren gewerteten Erkrankungen und Umweltfaktoren systemischer Natur, die Verteilung arteriosklerotischer Veränderungen lässt aber nicht auf eine ubiquitär wirkende Endothelnoxe schließen. So sind große Arterien wie bspw. die A. thoracica int. oder der intrakranielle Anteil der ACI seltenst befallen. Damit scheint auch die modifizierte Response-to-injury-Theorie unvollständig zu sein, da sie nicht erklären kann, warum manches Endothel besonders anfällig für arteriosklerotische Veränderungen ist. Auch andere Aspekte der Pathogenese sind ungeklärt: Den modifizierten LDL-Partikeln wird zwar eine Schlüsselrolle zugeschrieben, jedoch hat weder eine Statintherapie zur Elimination arteriosklerotischer Erkrankungen geführt, noch kann oxLDL in allen arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Di Pietro et al., 2016). Vor allem aber bedarf es noch Erklärungsansätzen für die Eskalation und Chronifizierung der Entzündungsreaktion.

I.3. Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose

Einen bislang in diesem Zusammenhang noch wenig beachteten Faktor stellen Infektionen mit einer Vielzahl an Bakterien und Viren da. Wie genau sie allerdings die Entstehung und Progression der arteriosklerotischen Läsionen beeinflussen, ist unbekannt. Vermutet wird, dass sie sowohl lokal durch die direkte Infektion des Gefäßes eine Akzeleration der Entzündung bewirken, als auch indirekt aus ferner gelegenen Foci die systemische Entzündungsreaktion verstärken oder mit arteriosklerotischen Risikofaktoren wechselwirken (s. Abb 2).

I.3.1. Indirekter und direkter Einfluss des Darmmetagenoms

Ein indirekter Einfluss auf die Entstehung und Progression der Arteriosklerose wird vor allem durch ein verändertes Darmmikrobiom ausgeübt. Eine Veränderung der Darmflora

kann dabei nicht nur durch eine orale Antibiotikatherapie begünstigt werden, sondern wird auch durch systemische Erkrankungen wie Adipositas und Diabetes mellitus verursacht (Ley et al., 2006; Wu et al., 2010; Winek et al., 2016). Die Folgen einer veränderten Darmflora sind vielfältig und können mit einer erhöhten Insulinresistenz, Verschlechterung eines Diabetes mellitus, Gewichtszunahme, Erhöhung des Blutdrucks, Verstärkung der körpereigenen Entzündungsreaktion und Modulation des Lipidmetabolismus einhergehen (Holmes et al., 2008; Schertzer et al., 2011; Karlsson et al., 2012; Barlow et al., 2015; Chen et al., 2016). Das Vorkommen von Erysipelotrichaceae oder Lachnospiraceae in der Darmflora ist beispielsweise mit einem erhöhten Cholesterol- und LDL-Blutspiegel assoziiert (Koren et al., 2011). Als Mediator zwischen dem Mikrobiom, den Risikofaktoren und der Progression arteriosklerotischer Läsion fungieren Stoffwechselprodukte bakteriellen Ursprungs wie Trimethylaminoxid (TMAO). Sie können die Genese arteriosklerotischer Läsionen fördern und den Glucose- und Lipidmetabolismus beeinflussen. Eine erhöhte Serumkonzentration an TMAO ist somit mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, größerer Plaqueinstabilität und –vulnerabilität und einer höheren Mortalitätsrate bei pAVK-Patienten assoziiert (Wang et al., 2011; Tang et al., 2013; Fu et al., 2016; Senthong et al., 2016).

I.3.2. Theorie der systemischen Entzündungsreaktion

Über eine systemische Entzündungsreaktion scheinen Inflammationen aus ferner gelegenen Foci die Progression der Arteriosklerose ebenfalls indirekt zu beeinflussen. Parodontale Infektionen sind sowohl mit einem erhöhten systemischen Entzündungsparametern als auch mit einer endothelialen Dysfunktion und einer zunehmender Dicke der Carotisplaques assoziiert (Amar et al., 2003; Slade et al., 2003; Desvarieux et al., 2005; Eberhard et al., 2013). Ein erhöhter Antikörpertiter gegen orale Pathogene wie *P. gingivalis* korreliert außerdem mit einer verstärkten Arterienkalzifikation (Mustapha et al., 2007; Colhoun et al., 2008). Demnach sind orale Infektionen mit einem allgemein erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und deren schlechterem Outcome vergesellschaftet (Humphrey et al., 2008). Das gleiche gilt für Infektionen mit *C. pneumoniae* (Filardo et al., 2015).

I.3.3. Theorie der Gefäßinfektion

Dem gegenüber steht die Theorie der lokalen Infektion, die durch den mehrfachen Nachweis eines in den arteriosklerotischen Plaques der ACI, Aorta, Koronar- und Femoralarte-

rien existenten Mikrobioms gestützt wird. Dabei ist zum einen eine direkte Infektion mit folgender Persistenz der Erreger möglich. Alternativ können aber auch vorher infizierte Immunzellen, die in die Läsion rekrutiert werden, Erreger indirekt auf die Intima übertragen. So können *C. pneumoniae*-haltige Monozyten im Blut von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen gehäuft nachgewiesen werden (Smieja et al., 2002). Speziell kommen Alveolarmakrophagen, die nach einer pulmonalen Infektion *C. pneumoniae* phagozytiert haben, als Vektor in Frage (Epstein et al., 1999). Auch Pathogene aus den epithelialen Oberflächen von Darm und Mundhöhle könnten so übertragen werden. Zusätzlich gelangen parodontale Erreger wie *P. gingivalis* durch Überschreiten der Epithelbarriere ins Blut, wo sie in Endothelzellen des Gefäßsystems eindringen (Forner et al., 2006; Assinger et al., 2011).

I.3.4. Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms und seine Auswirkung auf die Progression der Arteriosklerose

Generell ist das in den Plaques nachgewiesene Mikrobiom spezifisch für arteriosklerotische Läsionen, variiert aber individuell stark. Am häufigsten sind folgende Phyla vertreten: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria und Cyanobacteria. Diese sind auch an anderen Orten als Kommensale Teil der humanen Flora (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Lloyd-Price et al., 2017). Neben vielen noch unkultivierten Spezies sind mehrfach explizit nachgewiesene Vertreter dieser Stämme *C. pneumoniae*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *S. mutans* und andere Mitglieder der Streptokokkenfamilie, Pseudomonaden und Staphylokokken (Nakano et al., 2006; Ott et al., 2006; Koren et al., 2011; Rafferty et al., 2011; Mitra et al., 2015; Lindskog Jonsson et al., 2017).

Ein Bakterium, das konstant in allen Plaques vorkommt, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Vielmehr variieren in Abhängigkeit von der untersuchten Population und angewandten Methodik in jeder Studie das Vorkommen und die Häufigkeiten der Bakterienstämme bzw. -gattungen. Ob sich die Zusammensetzung der Bakterien mit der Entwicklung der Läsion und der Symptomatik der Patienten verändert, ist nicht eindeutig geklärt (Mitra et al., 2015; Lindskog Jonsson et al., 2017). Die Anhäufung einzelner Spezies steht jedoch oft im Zusammenhang mit einer gleichzeitig vorliegenden Anhäufung in Darm und Mundhöhle. Sind beispielsweise vermehrt Streptokokken und Veillonellen im Speichel

nachweisbar, kommen sie auch gehäuft in Plaques vor (Koren et al., 2011). Dies gilt auch für andere Kommensale der oralen Flora (Chhibber-Goel et al., 2016). Zudem lassen sich bei an Parodontitis Erkrankten in den arteriosklerotischen Läsionen gehäuft parodontale Pathogene nachweisen (Armingohar et al., 2014; Calandrini et al., 2014; Serra e Silva Filho et al., 2014). Somit scheinen ortsferne Infektionen die Zusammensetzung des Plaquemikrobioms mitzubestimmen und damit nicht nur über eine systemische Entzündungsreaktion indirekt für die Progression der Arteriosklerose verantwortlich zu sein.

Wie sich die Wirkung der polymikrobiellen Infektion auf die arteriosklerotische Läsion direkt entfaltet, ist im Detail bisher nur für einzelne Pathogene erforscht: *C. pneumoniae*, *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *A. actinomycetemcomitans*, *H. cinaedi* und *T. forsythia* zeigen im Tiermodell einen Einfluss auf die Progression der Läsion (Binder et al., 2003; Zhang et al., 2010; Kesavalu et al., 2012; Khan et al., 2014; Chukkapalli et al., 2015). Dieser Einfluss ist vor allem für *C. pneumoniae* und *P. gingivalis* genauer untersucht worden. *C. pneumoniae* fördert über die Bildung reaktiver T-Zellen, einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen die Generierung von oxLDL und die Wirkung des chlamydieneigenen HSP60 die Entzündungsreaktion (Kol et al., 1998; Kalayoglu et al., 1999; Kol et al., 1999; de Boer et al., 2000). Des Weiteren wird vermutet, dass durch molekulares Mimikry chlamydieneigenes HSP60/65 eine Autoimmunreaktion gegen körpereigene, im Plaque präsente HSP triggert. Die so entstandenen Autoimmunantikörper sind zytotoxisch für Endothelzellen und mit einer erhöhten Plaquedicke sowie einer verstärkten Kalzifizierung assoziiert (Xu et al., 1993; Mayr et al., 1999; Perschinka et al., 2003; Zhu et al., 2004; Benagiano et al., 2005). Die gesteigerte Freisetzung von TF und dem Plasmingen-Aktivator-Inhibitor erhöht zum anderen die Thrombogenität der Läsion (Dechend et al., 1999). Auch *P. gingivalis* zeigt eine ähnliche Wirkungsweise, kann aber zusätzlich noch proinflammatorische Gene hochregulieren, die glatte Muskelzellproliferation steigern und die Apoptose von Endothelzellen induzieren (Chou et al., 2005; Roth et al., 2007; Li et al., 2013; Yang et al., 2014; Jeong et al., 2015; Kim et al., 2018). Zusammengefasst könnten diese Mechanismen die Progression des Plaques vorantreiben, seine Stabilität gefährden und letztlich eine Ruptur begünstigen.

An dieser Stelle gilt es zu erwähnen, dass auch in nicht arteriosklerotischen Gefäßabschnitten bakterielle Signaturen gefunden werden konnten (Buffon et al., 2002; Reszka et al., 2008; Mougeot et al., 2017).

I.3.5. Pathogen Burden

Der Pathogen Burden ist eine Hypothese, die nicht ein einzelnes Bakterium für den Fortschritt der Läsion verantwortlich macht, sondern viel mehr das Zusammenkommen einer Vielzahl verschiedener Bakterien und Viren als Ursache für den chronisch entzündlichen Prozess sieht. Sie wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Menge an abgelaufenen Infektionen die Entwicklung der Arteriosklerose beeinflusst. Mit zunehmender Anzahl nimmt die endotheliale Dysfunktion, und die Leukozytenzahl in den Plaques sowie die Dicke des Plaques an sich zu. Unabhängig von anderen Risikofaktoren steigt das Risiko für die Entwicklung, Progression und Mortalität der KHK. Im Blut steigt das LDL-Level, während die HDL-Konzentration sinkt. Auch die Entzündungsreaktion scheint zu akzelerieren, da das CRP erhöht ist (Zhu et al., 2000; Zhu et al., 2001; Espinola-Klein et al., 2002; Prasad et al., 2002; Georges et al., 2003; Elkind et al., 2010; Koren et al., 2011). Das lässt vermuten, dass vor allem die kumulative Wirkung der Erreger für die Erkrankung relevant ist. Während dabei der virale Anteil eher für eine Plaqueruptur prädispositioniert, sind Bakterien für die Initiierung und Entwicklung der Läsion verantwortlich (Rupprecht et al., 2001; Espinola-Klein et al., 2002).

Dennoch ist die Auswirkung des Pathogen Burden von vielen weiteren Faktoren abhängig und damit individuell unterschiedlich. Relevant ist zum einen die auf eine Infektion folgende Stärke der Immun- und Autoimmunantwort: Je größer die Entzündungsreaktion ist, desto höher ist auch der Effekt auf die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen (Zhu et al., 1999; Zhu et al., 2000). Der Entzündungsreaktion liegt dabei eine variable genetische Determinante zugrunde, wie bspw. Polymorphismen im IL-1- oder TLR4-Gen, die die Ausprägung der Reaktion beeinflussen (Momiya et al., 2001; Candore et al., 2006; Balistreri et al., 2007). Zum anderen scheint die Ausprägung möglicher Schäden über die Zeit zuzunehmen. Denn obwohl schon Infektionen in der Kindheit zu endothelialer Dysfunktion, LDL-Oxidation und Intimaverdickung führen, zeigen sich Folgen der Arteriosklerose, wenn auch früher und mit erhöhtem Risiko als bei anderen, erst Jahrzehnte später (Liuba et al., 2003; Charakida et al., 2005; Burgner et al., 2015c; Dratva et al., 2015; Qanitha et al., 2016). Deshalb wird vermutet, dass sich die erregerbedingten Veränderungen einerseits mit zunehmender Infektionszahl langsam über Jahre hinweg bilden und dass andererseits zur Manifestation noch weitere Risikofaktoren koexistieren müssen (Engelmann et al., 2006).

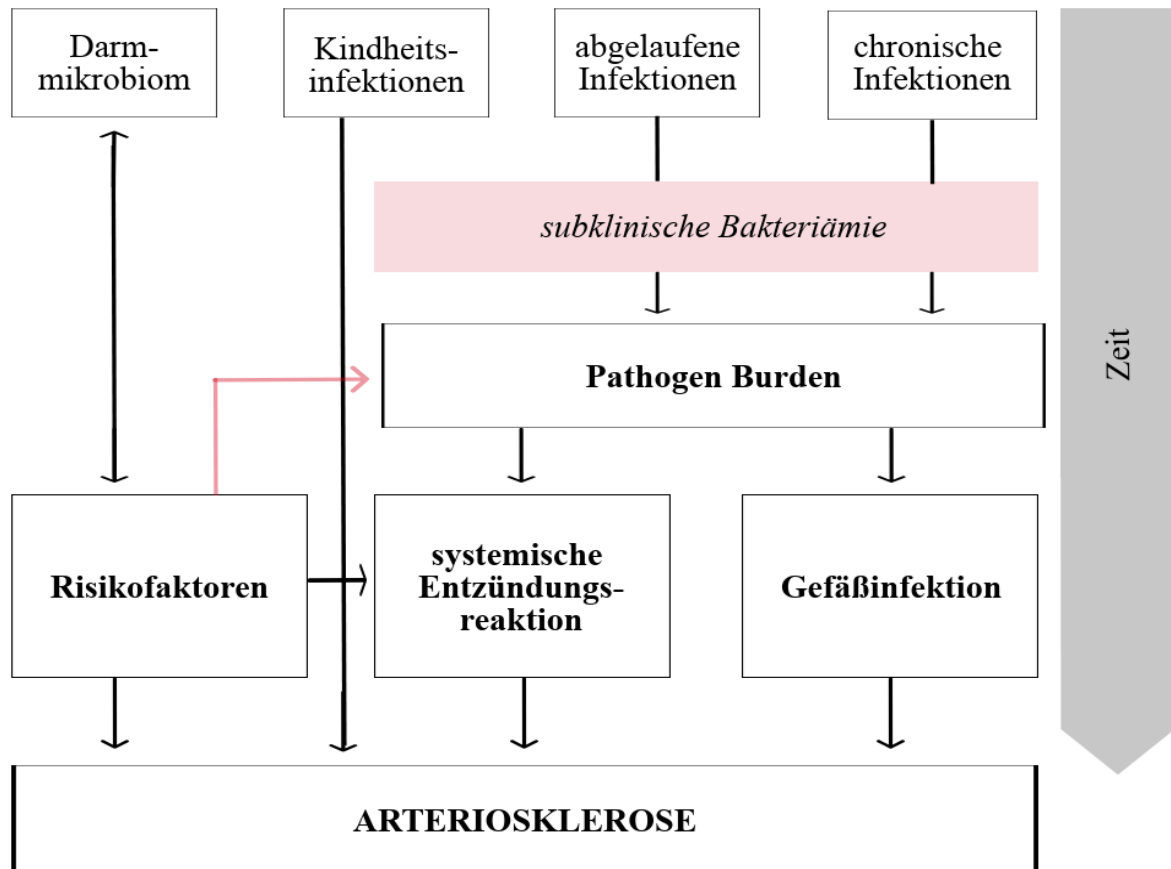


Abb. 2: Die Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose

Definierte Risikofaktoren, eine systemische Entzündungsreaktion sowie Gefäßinfektionen sind mit einer Progression arteriosklerotischer Läsionen assoziiert. Diese Faktoren werden wiederum durch Mikrobiome oder Infektionen beeinflusst: Während zwischen Darmmikrobiom und Risikofaktoren Arteriosklerose-begünstigende Wechselwirkungen existieren, führen abgelaufene und chronische Infektionen kumulativ über die Entwicklung eines Pathogen Burden zur Aggravierung von Gefäßinfektionen und der systemischen Entzündungsreaktion. Ob abgelaufene oder chronische Infektionen eine subklinische Bakteriämie verursachen, aus der sich letztendlich der Pathogen Burden ergibt bzw. über die er seine Wirkung entfaltet, soll in dieser Arbeit geprüft werden. Ebenso ist unklar, ob, und wenn ja wie, die Risikofaktoren den Pathogen Burden beeinflussen (rot unterlegte Icons).

I.4. Fragestellung

Folgeerkrankungen der Arteriosklerose sind weltweit die häufigsten Erkrankungen und an der Spitze der häufigsten Todesursachen. Dennoch existieren bisher keine kausalen Therapien, die ein Entstehen oder die Progression der Arteriosklerose verhindern. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Pathogenese der Arteriosklerose bis jetzt in ihrer Gesamtheit nur unvollständig verstanden ist. Da es sich um eine chronische Entzündung handelt, liegt eine Beteiligung von Pathogenen nahe. Diesbezüglich konnte bisher nachgewiesen werden, dass Bakterien mit den als Risikofaktoren zugrundeliegenden Erkrankungen interagieren, dass eine Vielzahl an Infektionen direkt und indirekt mit einer Progression der Arteriosklerose assoziiert ist und dass Bakterien sowohl eine lokale wie auch eine systemische Entzündungsreaktion hervorrufen. Trotzdem ist die Hypothese der bakteriell verursachten Arteriosklerose noch unausgereift. So sind Erklärungen für die Herkunft und Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms unvollständig. Während eine Mutmaßung ist, dass das Gefäßsystem über eine natürliche bakterielle Besiedlung verfügt, wird andererseits angenommen, dass eine Besiedlung mit vielen oder bestimmten Arten von Bakterien gemäß der Hypothese des Pathogen Burdens eine Akzeleration der Arteriosklerose bewirkt. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms anhand einer großen Kohorten von Patienten mit verschiedenen gefäßchirurgischen Erkrankungen (pAVK, extrakranielle Carotisstenose, AAA) genauer zu analysieren und das Besiedlungsmuster in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose zu vergleichen. Da zudem noch unklar ist, was die Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms beeinflusst, soll das Serum der Patienten auf eine subklinische Bakteriämie hin untersucht und mit den in den Gefäßwänden gefundenen bakteriellen Signaturen verglichen werden.

Folglich werden folgende Hypothesen geprüft:

H0-Hypothese: Die bakteriellen Signaturen im Plaque stehen nicht im Zusammenhang mit der Lokalisation und / oder den bakteriellen Signaturen im Blut.

H1-Hypothese: Die Zusammensetzung des intimalen Mikrobioms variiert abhängig von der Lokalisation und / oder den bakteriellen Signaturen im Blut.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Material

Folgende Materialien wurden für die Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit verwendet:

II.1.1. Geräte

Codescanner	FluidX Impression TM Whole Rack 2D Scanner, Brooks Life Science, Chelmsford, USA
Fluorometer	Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Gerät	C1000 Thermo Cycler, Bio-Rad, Hercules, USA
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenroboter	Freedom EVO® 150, TECAN, Männedorf, Schweiz
Sequenziergerät	MiSeq ® System, Illumina, San Diego, USA
Stickstofftanks	HS200, Askion, Gera, Deutschland
	Biostore III, Brooks Life Science, Chelmsford, USA
Thermoschüttler	Thermal Shake lite, VWR, Darmstadt, Deutschland
Transportbox	CryoPod TM Carrier, Brooks Life Science, Chelmsford, USA
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Werkbank	Thermo Scientific TM Safe 2020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Biofuge 22R, Amplicor (Roche), Rotkreuz, Schweiz
	Megafuge 1.OR, Heraeus, Hanau, Deutschland

II.1.2. Verbrauchsmaterialien

Adhäsionsobjektträger	SuperFrost Plus TM geschliffen 90° 25x75x1mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Handschuhe	Vinyl 2000 PF, Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	FluidX Cryotube 0,7ml 2D Barcode mit Jacket, Brooks Life Science, Chelmsford, USA

	Elution Tubes (1,5ml), Qiagen, Hilden, Deutschland
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland FluidX LiHa disposable Tips, Brooks Life Science, Chelmsford, USA
Röhren	Pipettenspitzen, GreinerBioOne, Kremsmünster, Österreich Röhre 50ml, DNA-, DNase-, RNase-free, non-pyrogenic, non-cytotoxic, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Röhre 15ml, DNA-, DNase-, RNase-free, non-pyrogenic, non-cytotoxic, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SBS-Rack	FluidX SBS-Rack, 96er und 48er, Brooks Life Science, Chelmsford, USA
Monovetten	Serum-Monovette 9ml Z-Gel, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

II.1.3. Kits für DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung

QIAamp DNA Microbiome Kits, Qiagen, Hilden, Deutschland

MinElute Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

MiSeq Reagent Kit v3, Illumina, San Diego, USA

II.1.4. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden zusätzlich zu den angegebenen Kits benötigt:

II.1.4.1. Chemikalien für Probeneinlagerung

EtOH 70%

Flüssigstickstoff

Formaldehydlösung 4,5%, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

MACS® Tissue Storage Solution, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

II.1.4.2. Chemikalien für DNA-Extraktion

EtOH 100%

Phosphat-basierte Salzlösung (PBS)

II.1.4.3. Chemikalien für PCR

II.1.4.3.1. PCR-Mix pro Probe

8,25µl Aqua dest

5,0µl Phusion™ HF Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

0,5µl dNTPs 10 mM (Verdünnung 1:10), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

5,0µl Primer f 2 µM, Metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland

5,0µl Primer r 2 µM, Metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland

0,25µl Phusion™ HF DNA-Polymerase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

1,0µl DNA

II.1.4.3.2. Gel, Marker und Laufpuffer

Agarose Gel 2%

Tris-Acetat-EDTA-Puffer

100ml Gene Ruler 100b, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

100µl DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

400µl Aqua dest

Puffer pro 3,5µl PCR-Produkt: 1,2µl blauer Ladepuffer + 2,3µl Wasser

II.1.4.4. Chemikalien für Sequenzierung

PhiX Control, Illumina, San Diego, USA

NaOH 0,1 mmol/l

Tris – Cl 10 mM, pH 8,5 mit 0,1% Tween 20

Tris – HCl, pH 7,0

II.1.5. Software

Bio-1D, Avantor, Radnor, USA

CentraXX Bio, Version 3.5.5.5, Kairos GmbH, Bochum, Deutschland

Excel®, Version 14.7.7, Microsoft, Seattle, USA

Mothur, Version 1.38.1

R, Version 3.2.2. und R package vegan

RDP Classifier, Version 2.11

SILVA database, Version 1.3.8.

II.2. Methoden

II.2.1. Patientenkollektiv

In dieser Studie eingeschlossene Patienten beider Geschlechter waren an asymptomatischen oder symptomatischen Stenosen der ACI, an einem asymptomatischen oder symptomatischen AAA oder an einer pAVK der unteren Extremitäten im Stadium IIb, III und IV nach Fontaine erkrankt und wurden elektiv zur TEA im Universitätsklinikum Schleswig Holstein (UKSH), Campus Lübeck aufgenommen. Weiterhin wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen eine präoperative CTA oder MRA der zu operierenden Gefäßregion nicht älter als acht Wochen vorlag, die schriftlich in die Studie einwilligten und Bürger eines EU-Mitgliedsstaates waren.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die einen Revisionseingriff an der ACI, der infrarenalen Aorta oder der Becken- und Beinarterien hatten, sowie Schwangere und stillende Patientinnen oder Patienten, die aufgrund einer Infektionskrankheit bis zum Zeitpunkt der Operation antibiotische, antimykotische oder antivirale Therapien erhielten.

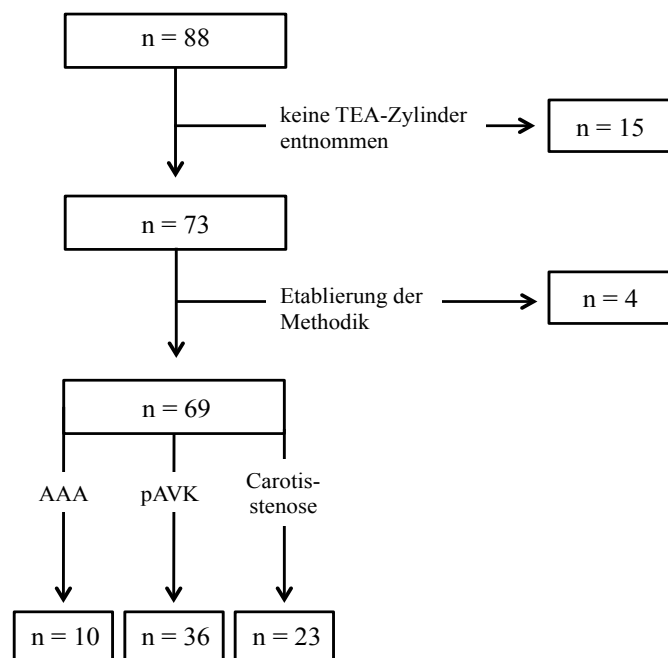


Abb. 3: Übersicht Patientenstamm

n = Patientenzahl

Weitere Ausschlusskriterien waren das Vorliegen jeglicher Faktoren, die die Fähigkeit des Patienten einschränken, während der Studie zu kooperieren (z. B. mentale Funktionsstörungen oder Drogenmissbrauch) und die gleichzeitige Teilnahme des Patienten an einer anderen Studie.

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte durch die Doktorandin mit Unterstützung der Assistenzärzte der Gefäßchirurgie des UKSH Lübeck nach Patientenaufkommen ohne Vorselektion bezüglich der Hauptdiagnose, des Alters, des Geschlechts oder der Risikofaktoren. Erfüllten die Patienten alle Ein- und Ausschlusskriterien, wurde ihre Einwilligung zur Studienteilnahme nach einer mündlichen und schriftlichen Aufklärung durch das Unterschreiben der Einverständniserklärung zur Einlagerung der entnommenen Proben in der Biobank (ICB-L) eingeholt. Mit einem erteilten Votum der Ethikkommission durften die in der Biobank eingelagerten Proben zum Zweck dieser Studie weiterverwendet werden (s. VII.1.). Die Rekrutierung der Patienten begann im April 2016 und endete im Mai 2018. Insgesamt wurden 88 Patienten in die Studie eingeschlossen. 15 Patienten wurden im Nachhinein ausgeschlossen, da keine Gefäßzyylinder entnommen worden waren. Entweder war dies während der Operation nicht möglich oder die Patienten wurden vor der Operation wieder entlassen. Bei weiteren 4 Patienten wurden die TEA-Zylinder zur Etablierung der Methodik benötigt. Demnach ergibt sich eine Fallzahl von $n = 69$. Von diesen 69 Patienten waren 23 an einer asymptomatischen oder symptomatischen Stenose der ACI, 10 an einem asymptomatischen oder symptomatischen AAA und 36 an einer pAVK im Stadium IIb, III oder IV nach Fontaine erkrankt (s. Abb. 3).

II.2.2. Probengewinnung mittels Thrombendarteriektomie

Alle eingeschlossenen Patienten erhielten aus therapeutischer Indikation eine TEA, die allein oder in Kombination mit anderen offen-chirurgischen oder endovaskulären Verfahren durch die gefäßchirurgischen Fach- und Oberärzte des UKSH Lübeck erfolgte.

Dazu wurde die betroffene Arterie auf Höhe des arteriosklerotischen Segments operativ freigelegt. Nach Ausklemmung des Gefäßes erfolgte die Inzision und Eröffnung. Eventuell im Gefäß vorhandene Thromben wurden entfernt. Um folgend den arteriosklerotischen Plaque auszuschälen, wurde zunächst mit Hilfe eines Dissektors ein Intimazyylinder abgeschoben und gemäß des individuellen Gefäßzyinders zirkulär nach zentral und/oder peripher für eine Distanz von mindestens 2cm weiter präpariert (s. Abb. 4). Die Ausschälung

erfolgte je nach Plaque initima- oder adventitianah. Die so entfernten Teile der arteriosklerotischen Gefäßwand wurden intraoperativ in ca. 5x5 mm große Zylinder zerlegt, unverzüglich in Kryoröhrchen gegeben und in die ICB-L transportiert (s. II.2.4.). Nach erfolgter Rekanalisierung wurde das Gefäß durch eine direkte Naht oder eine Erweiterungsplastik mit Kunststoff-, Perikard- oder Venenpatches rekonstruiert und das eröffnete Gebiet verschlossen.

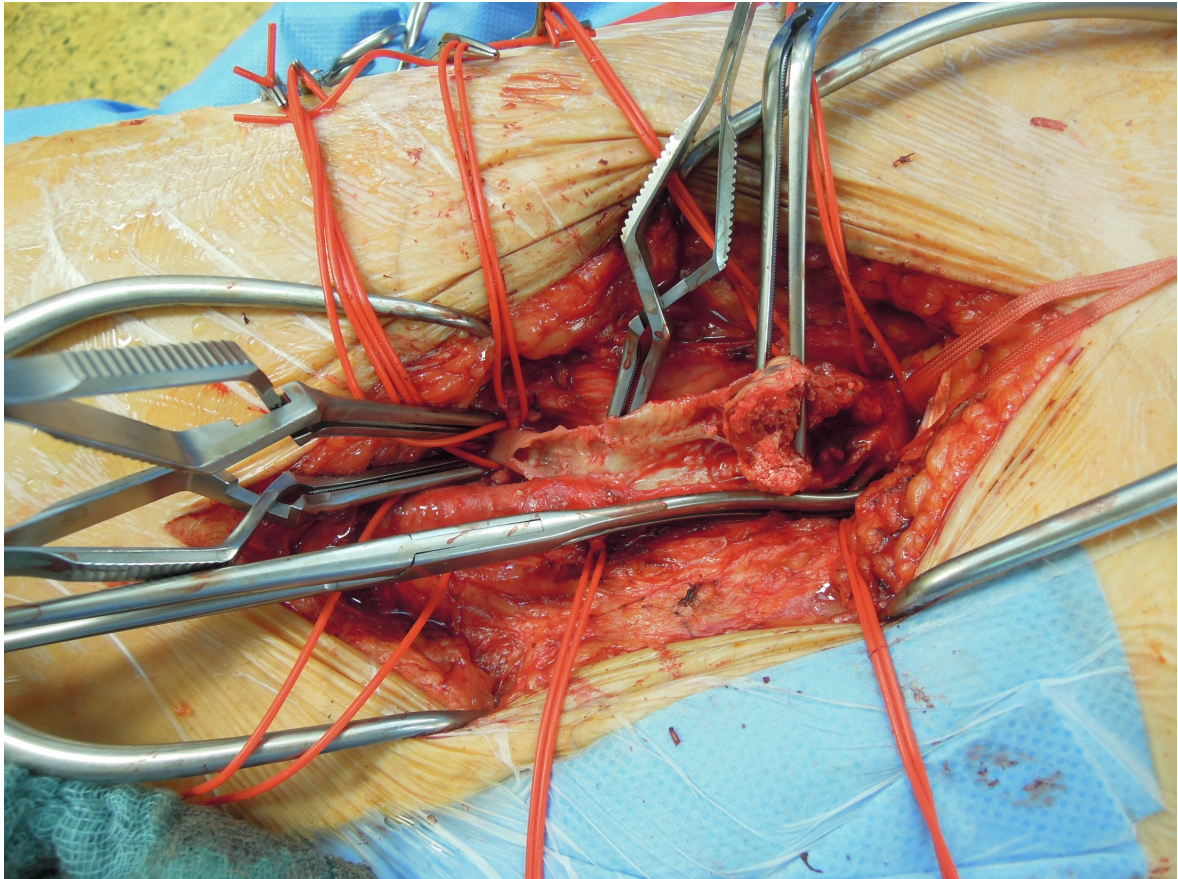


Abb. 4: Durchführung einer TEA

Hier dargestellt ist eine intraoperativ freigelegte und ausgeklemmte A. femoralis communis mit angeschlungenen Abgängen. Der arteriosklerotische Plaque, der nach einer Längsinzision herauspräpariert wird, ist mit einer Arterienklemme angeklemt.

II.2.3. Gewinnung und Lagerung von Serumproben

Eine Blutentnahme erfolgte präoperativ am Operationstag. Alle Blutentnahmen wurden von der Doktorandin mit Unterstützung der Assistenzärzte der Gefäßchirurgie des UKSH

Lübeck durchgeführt. Innerhalb von maximal 30min wurden die Serumröhrchen zur Aufarbeitung und Einlagerung in die ICB-L gebracht.

II.2.4. Kryokonservierung der TEA-Zylinder und Serumproben

Die Kryokonservierung der TEA-Zylinder und der Seren erfolgte durch medizinisch-technische Assistentinnen innerhalb von maximal 30min nach Entnahme der Proben in der ICB-L. Die Blutproben wurden dazu durch Zentrifugation in Plasma und Serum getrennt und das Serum in bis zu 6 Cryotubes aliquotiert. Die Aliquotierung der TEA-Zylinder wurde intraoperativ durchgeführt (s. II.2.2.). Die verarbeiteten Aliquots wurden bei -80°C in Stickstofftanks bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Um Patienten, Proben und Lagerungsort zuordnen zu können, wurde das Programm CentraXX Bio benutzt, in dem Patienten- und Proben-IDs sowie Barcodenummern für die Aliquots verwendet wurden.

II.2.5. Anlegung einer Datenbank

Um alle pro Patient entnommenen Proben und erhobenen Daten zu sammeln, wurde durch die Doktorandin eine Datenbank mit Excel® erstellt, in der die Patienten mit einer Nummer versehen mit Vor- und Nachnamen, Geschlecht, Geburtsdatum, Alter am Operationstag, Patienten-ID in Orbis und Telefonnummer aufgeführt wurden. Jedem Patienten wurden zudem die CentraXX Bio - ID und die im ICB-L eingelagerten Proben mit Entnahmedatum, Kennnummern und Extraktionsnummer zugeordnet. Zur Auswertung wurde die Datenbank anonymisiert, indem persönliche Daten gelöscht wurden, sodass die Zuordnung zwischen Patient und zusammengehörigen Proben nur über die jeweilige Extraktionsnummer erfolgte.

II.2.6. Aufarbeitung und Analyse der Proben

Im Anschluss an die Rekrutierung des Patientenkollektivs wurden die entnommenen Proben bis Juni 2021 aufgearbeitet und analysiert. Die Analyse der Proben erfolgte über die Detektion der hypervariablen V3/V4-Regionen der 16S rRNA (Frank et al., 2008; Kozich et al. 2013; Graspeuntner, Loeper et al., 2018). Hierzu wurden die Proben zunächst aufgeschlüsselt, mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert, sequenziert und dann anhand von taxonomischen Bibliotheken analysiert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte

durch die Doktorandin mit Unterstützung durch Anke Hellberg (Institut für Mikrobiologie, UKSH Lübeck) und Dr. Simon Graspeuntner (Institut für Mikrobiologie, UKSH Lübeck). Die Analyse der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Simon Graspeuntner.

II.2.6.1. DNA-Isolation

Um mit dem verwendeten QIAamp DN Microbiome Kit eine ausreichende DNA-Menge zu extrahieren, wurde zunächst anhand eines Testprotokolls mit vier Proben das von der Firma QIAamp vorgelegte Extraktionsprotokoll für die TEA-Zylinder optimiert (s. VII.2.). Die besten Extraktionsergebnisse ließen sich durch eine Aufreinigung der Proben ohne Benzonase erzielen. Bei den ausgewählten Proben handelte es sich um drei bei männlichen pAVK-Patienten und einen bei einem männlichen Carotisstenose-Patienten entnommenen TEA-Zylinder.

Zu Beginn der Extraktion wurden alle festen und flüssigen Proben in je 600µl PBS gegeben und die Abstriche darin ausgewrungen. Die DNA-Isolation erfolgte dann mit QIAamp DN Microbiome Kits nach dem optimierten Extraktionsprotokoll durch chemische und mechanische Lyse. Jede Extraktionsreihe wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Die aufgearbeiteten Proben wurden im Kit-eigenen AVE-Puffer bei –20°C in Mikroreaktionsgefäßen gelagert oder direkt amplifiziert.

II.2.6.2. DNA-Amplifikation und –Sequenzierung

Die Amplifikation partieller Sequenzen der bakteriellen 16S rRNA erfolgte mit Primern für die hypervariablen V3/4-Regionen mittels PCR (Klindworth et al., 2013, s. VII.3.). Gemäß des Cycler-Programms erfolgten insgesamt 5 Phasen, zunächst bei 98°C für 30s, gefolgt von 98°C für 9s, 55°C für 1min mit 30-35 Cyclen, 72°C für 1:30min und schließlich 72°C für 10min. Bis zur Weiterverwendung wurden die Ansätze bei -20°C gelagert.

Die Amplifikate wurden je Durchgang auf einem Agarosegel in Tris-Acetat-EDTA-Puffer mit Bezug auf die DNA-Leiter als Komigrationsstandard mit der Gel-Analyse-Software Bio-1D quantifiziert und die equimolaren Mengen vereint. Die vereinte Library wurde einem 2h und 15min dauernden Run auf einem Agarosegel unterzogen und anschließend mit dem Qiagen Min Elute Gel Extraction Kit eluiert. Die folgende Messung der DNA-Mengen erfolgte fluorometrisch.

Die Sequenzierung wurde mit dem Illumina MiSeq – Sequenzierer mit dem MiSeq Reagent Kit v3 unter Hinzunahme von PhiX Control v3 nach Empfehlung des Herstellers

durchgeführt. Die Zuordnung von Amplifikat, Probenmaterial und Patient erfolgte durch eine vorangegangene Markierung der Primer mit spezifischen Identifikationssequenzen (Kozich et al., 2013; Fadrosch et al., 2014). Zur Analyse der Qualität des Durchlaufs wurde der Illumina-eigene Q30-Score ermittelt, der bei 77,2% lag.

II.2.6.3. Datenprozessierung

Die Prozessierung der Rohdaten erfolge zunächst mit dem Programm mothur unter Anwendung eines optimierten Skripts (Schloss et al., 2009; Giles et al., 2017). Dabei wurden alle Sequenzen entfernt, die von der originalen Primer- und Identifikationssequenz abwichen, die Basenpaar-Länge des Contigs oder eine bestimmte Menge an ambiguous base calls überschritten. Die übrigen Sequenzen wurde mit der SILVA database abgeglichen und Chimere durch den uchime-Algorithmus entfernt (Pruesse et al., 2007; Edgar et al., 2011). Nach Sichtung der Daten wurde eine Sequenziertiefe von 2100 reads festgelegt. Die so bereinigten Sequenzen wurden dann in operative, taxonomische Einheiten (engl. Operative Taxonomic Units, OTU) eingeteilt und auf Grundlage der hypervariablen Regionen mit RDP Classifier bis zur Gattungsebene klassifiziert (Cole et al., 2014).

II.2.7. Biostatistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen und Graphiken wurden mit R sowie dem R package vegan erstellt (R Core Team, 2015; Oksanen et al., 2019). Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Die Ermittlung der Alphadiversität erfolgte distanzbasiert sowie auf taxonomischer Ebene durch Anwendung des Shannon-Index, Berechnung der Gleichheit (Pielou's evenness) sowie der Anzahl der OTUs. Zudem wurde die relative Abundanz der vorhandenen Stämme bzw. Gattungen bestimmt.

Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Daten von mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit einer Varianzanalyse (ANOVA), bei nur zwei zu vergleichenden Gruppen mittels T-Test. Bei nicht-normalverteilten Daten erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis-Test. Im Anschluss wurde bei signifikanten Ergebnissen für normalverteilte Daten ein pairwise-T-Test und bei nicht-normalverteilte Daten ein pairwise-Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit Korrektur für multiples Testen durchgeführt.

Die Ermittlung der interindividuellen Betadiversität erfolgte mit einer Hauptkoordinatenanalyse (engl. Principle Coordinates Analysis, PCoA) sowie mit einer kanonischen Korrelationsanalyse (engl. Canonical Correlation Analysis, CCA). Die statistische Signifikanz wurde mit der multivariaten Varianzanalyse Adonis geprüft.

III. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 69 TEA-Zylinder auf das Vorhandensein von bakteriellen Signaturen mit der oben genannten Methodik untersucht. Davon stammten 36 aus Femoralarterien von an einer pAVK Erkrankten, 23 aus der ACI von an einer Carotistenose Erkrankten und 10 aus der infrarenalen Aorta von Patienten mit einem AAA. Zusätzlich wurde das von jedem der genannten Patienten gewonnene Serum auf diesselbe Weise vergleichend analysiert.

III.1. Mikrobiom der TEA-Zylinder in Abhängigkeit von der Herkunft

In 59 der 69 untersuchten TEA-Zylinder gelang der Nachweis einer bakteriellen Besiedlung. Insgesamt konnten 350 Taxa gefunden werden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden für die Analysen die häufigsten 20 Taxa bzw. Gattungen einbezogen. Unabhängig von der Herkunft des Plaques machten Proteobacteriae, Firmicutes und Actinobacteriae über 90% der gefundenen Stämme aus (s. Abb 5).

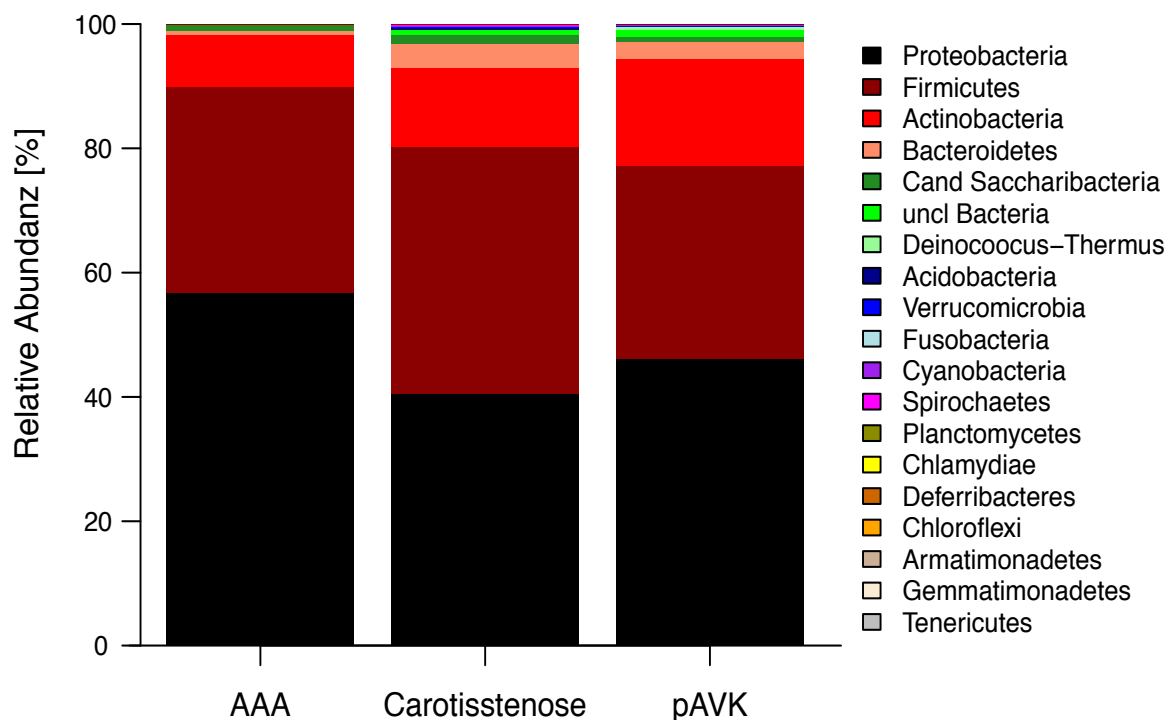


Abb. 5: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Stämmen

Neben Proteobacteria, Firmicutes und Actinobacteria fanden sich die in Abb. 6 a aufgeführten Stämme. Diese unterschieden sich sowohl in der Anzahl der Taxa ($p = 0,515$, s. Abb. 6 b) als auch in ihrer relativen Abundanz nicht signifikant in Abhängigkeit von der Herkunft des Plaques (s. Tab. 2).

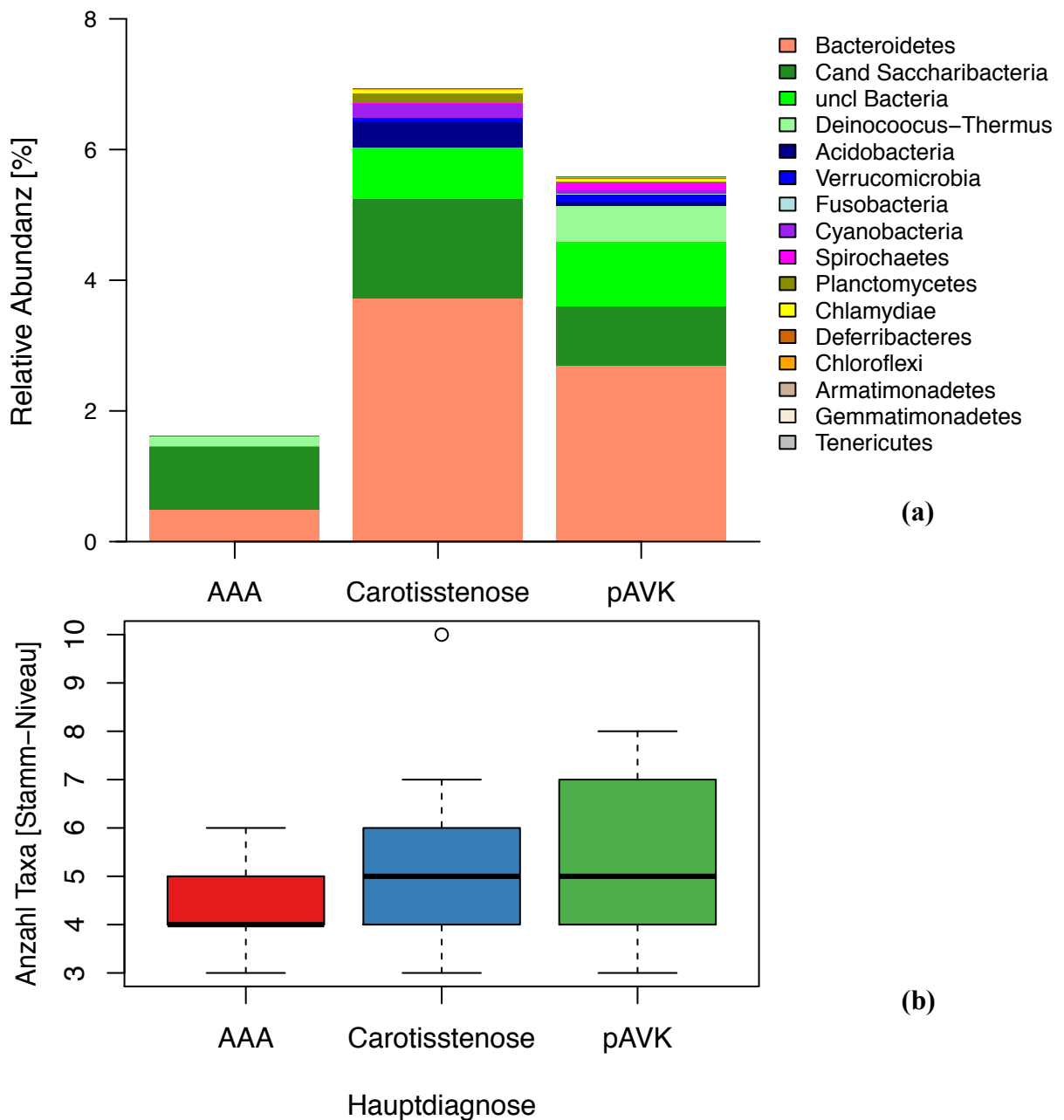


Abb. 6: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Stämmen, dargestellt ohne die 3 häufigsten Taxa (a), sowie die Anzahl der Taxa auf Stammniveau als Boxplot ohne die drei häufigsten Taxa (b) ° = Ausreißer

Dennoch können Unterschiede im Besiedlungsmuster beschrieben werden. So wurden Spirochätes und Fusobacteria nur in TEA-Zylindern von an einer pAVK Erkrankten gefunden. Cynobacteria und Acidobacteria fanden sich hauptsächlich in aus einer Carotisstenose stammenden TEA-Zylindern. In AAA-Plaques fanden sich neben Bacteroidetes, Cand Saccharibacteria und Deinococcus-Thermus keiner der Stämme, die in den Plaques der anderen Erkrankungen nachgewiesen werden konnten. (s. Abb. 6). Actinobacteria waren in größerer Zahl in TEA-Zylindern von an einer pAVK oder Carotisstenose Erkrankten als in AAA-Plaques zu finden (s. Abb. 5 und Tab. 2)

Auf Gattungsebene fanden sich am häufigsten Vertreter der Gattung Acetobacter, Streptococcus, Lactobacillus und Staphylococcus (s. Abb. 7). Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der relativen Abundanz von Streptokokken ($p = 0,044$) und Lactobacillen ($p = 0,029$) sowie tendenziell signifikante Unterschiede in der relativen Abundanz von Acetobacterae ($p = 0,062$), die statistisch nicht weiter spezifiziert werden konnten, jedoch für den Vergleich von TEA-Zylindern aus einer pAVK und Carotisstenose zu TEA-Zylindern aus AAA zu gelten scheinen (s. Abb. 8).

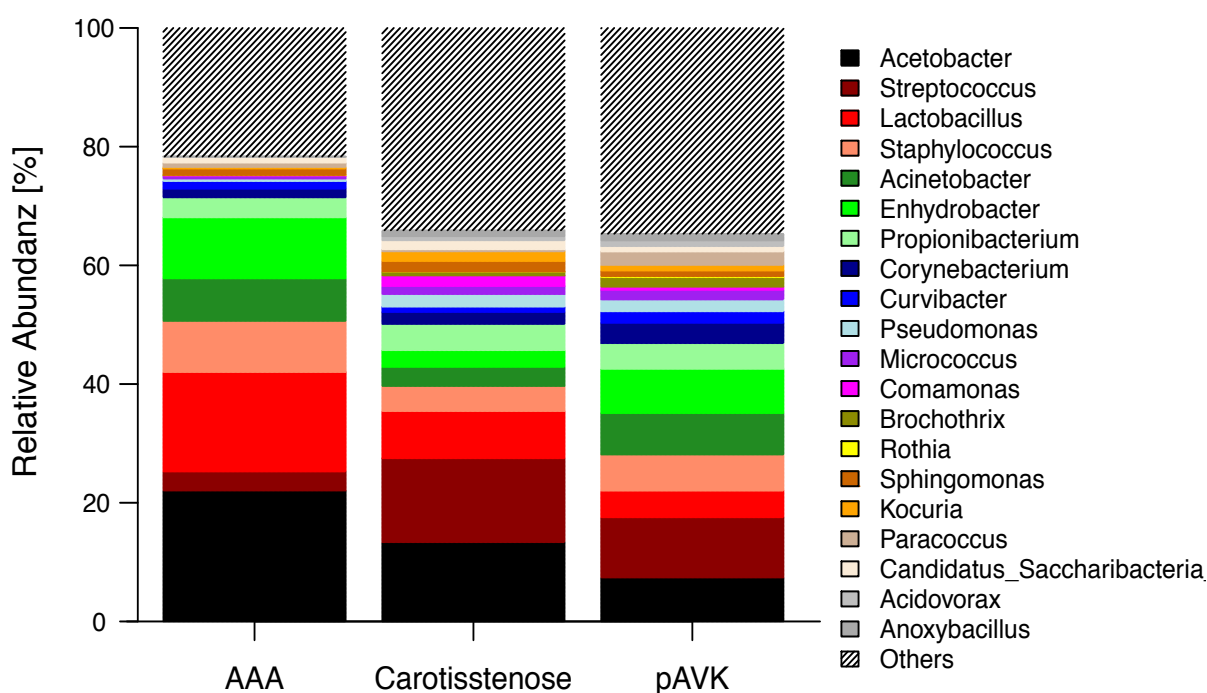


Abb. 7.: Relative Abundanz (%) der in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose vorkommenden Gattungen

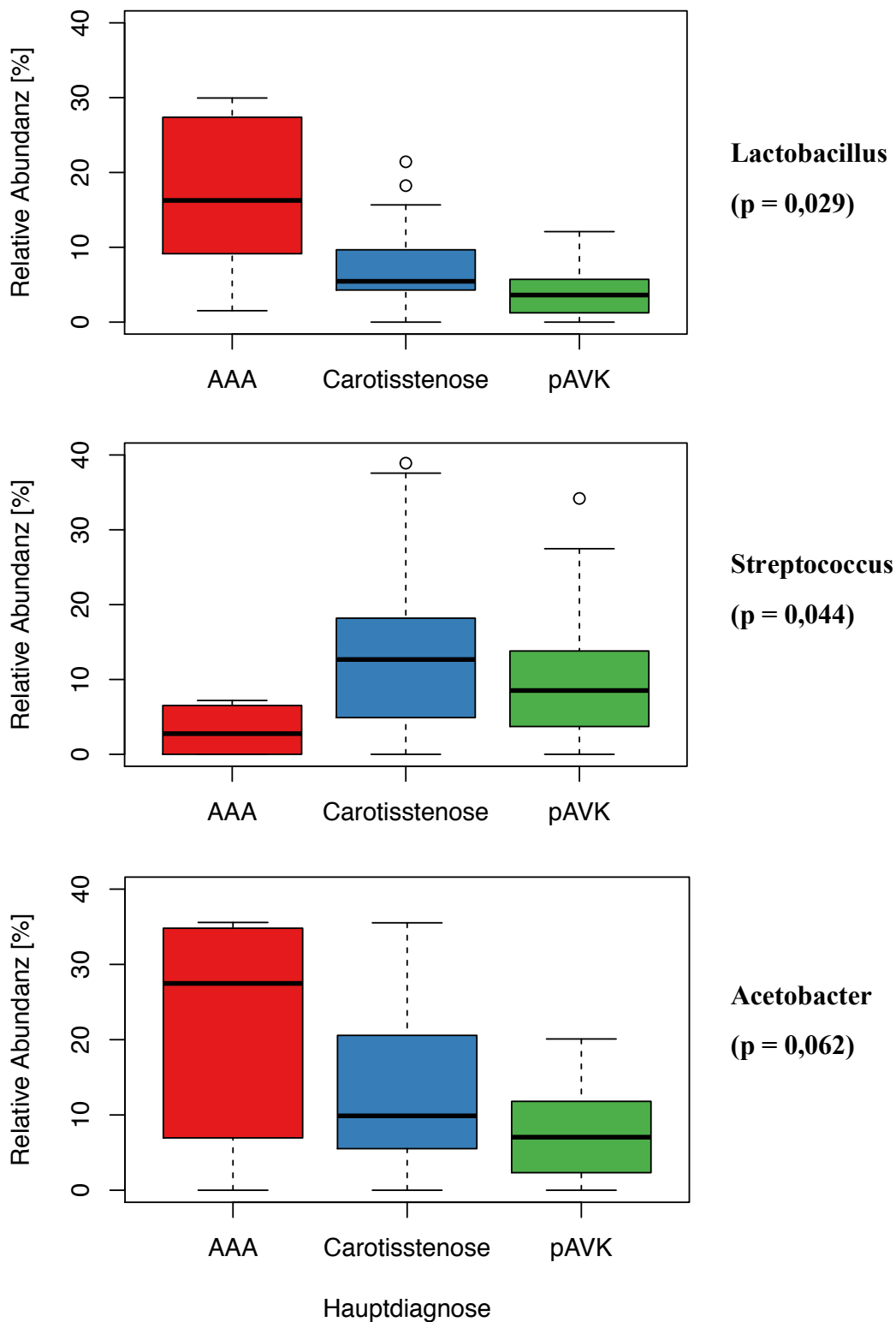


Abb. 8: Relative Abundanz (%) von Lactobacillen, Streptokokken und Acetobacteriae in TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose als Boxplot

° = Ausreißer

Alle anderen Gattungen zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer relativen Abundanz (s. Tab 2).

relative Abundanz

Stamm	in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose	Gattung	in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose
Proteobacteria	p = 0,119	Acetobacter	p = 0,062
Firmicutes	p = 0,421	Streptococcus	p = 0,044
Actinobacteria	p = 0,052	Lactobacillus	p = 0,029
Bacteoidetes	p = 0,108	Staphylococcus	p = 0,357
Cand Saccharibacteria	p = 0,259	Acinetobacter	p = 0,319
uncl Bacteria	p = 0,423	Enhydrobacter	p = 0,389
Deinococcus-Thermus	p = 0,234	Propionibacterium	p = 0,945
Acidobacteria	p = 0,616	Corynebacterium	p = 0,122
Verrucomicrobia	p = 0,556	Curvibacter	p = 0,361
Fusobacteria	p = 0,621	Pseudomonas	p = 0,183
Cyanobacteria	p = 0,442	Micrococcus	p = 0,335
Spirochaetes	p = 0,621	Comamonas	p = 0,659
Planctomycetes	p = 0,138	Brochothrix	p = 0,153
Chlamydiae	p = 0,556	Rothia	p = 0,524
Deferribacteres	p = 0,381	Shingomonas	p = 0,733
Chloroflexi	p = 0,807	Kocuria	p = 0,248
Armatimonadetes	p = 0,621	Paracoccus	p = 0,821
Gemmatimonadetes	p = 0,381	Candidatus	p = 0,259
Tenericutes	p = 0,381	Saccharibacterium	
		Acidovorax	p = 0,495
		Anoxybacillus	p = 0,219

Tab. 2: Statistische Signifikanz der relativen Abundanz der Bakterienstämme bzw. – gattungen in den TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Hauptdiagnose

III.1.1. Diversität des Mikrobioms der TEA-Zylindern in Abhängigkeit von der Herkunft

Während distanzbasiert nach Berechnung des Shannon-Index ($p = 0,804$), Pielou's evenness ($p = 0,803$) und der Anzahl der OTUs ($p = 0,452$) kein signifikanter Unterschied der Alphadiversität festgestellt werden konnte, zeigten aus AAA stammende TEA-Zylinder auf Gattungsniveau nach Bestimmung des Shannon-Index und Pielou's evenness eine signifikant geringere Alphadiversität als aus einer Carotisstenose oder pAVK stammenden TEA-Zylinder (s. Abb. 9). Die Anzahl der Taxa unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,188$).

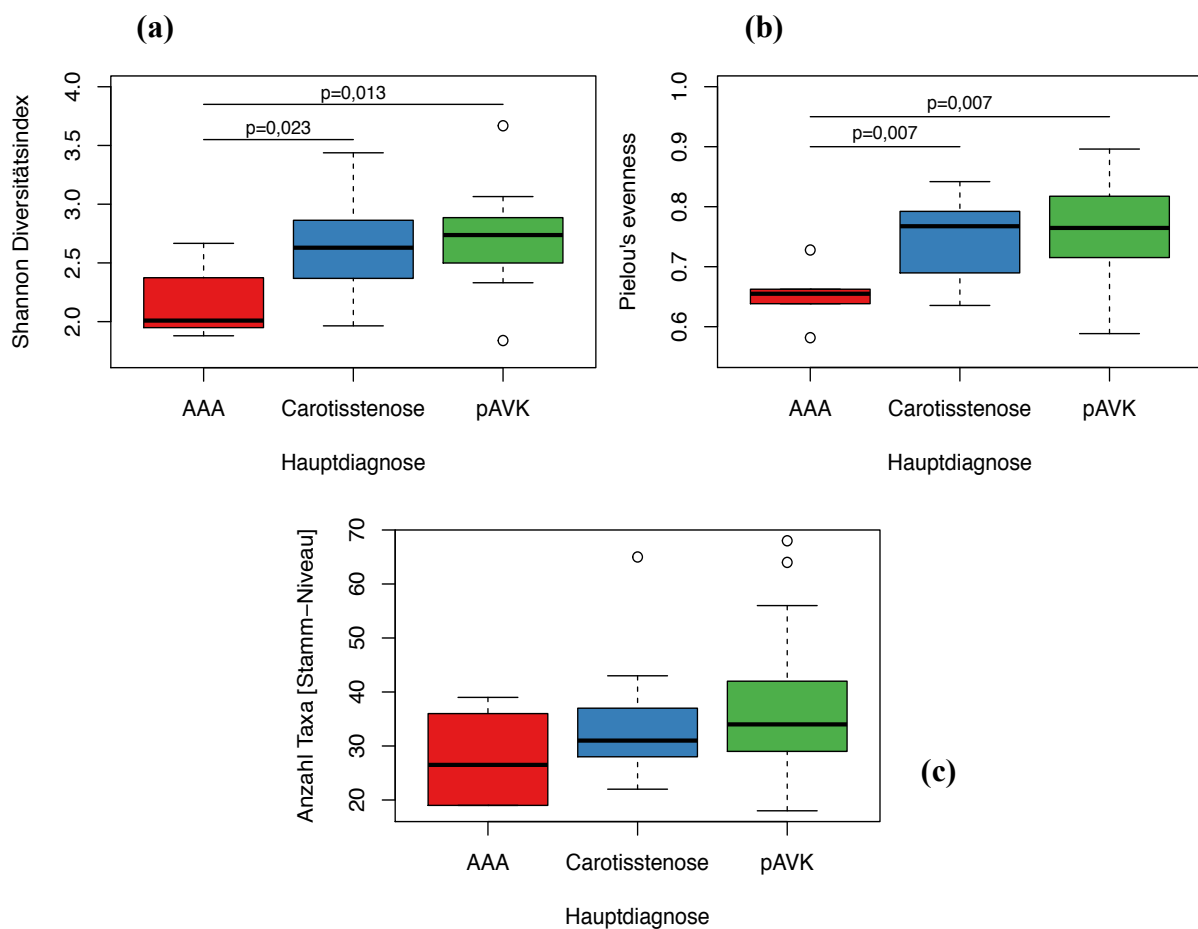


Abb. 9: Shannon-Diversitätsindex (a), Pielou's evenness (b) und die Anzahl der Taxa (c) dargestellt als Boxplot als Maße der Alphadiversität in Abhängigkeit von der Herkunft auf Gattungsebene

° = Ausreißer

In der Betadiversität ergab sich in Abhängigkeit von der Herkunft kein signifikanter Unterschied ($p = 0,857$, s. Abb. 10 a). Auch die Varianz der mikrobiellen Besiedelung erwies sich als gering und nicht signifikant ($p = 0,763$; s. Abb. 10 b).

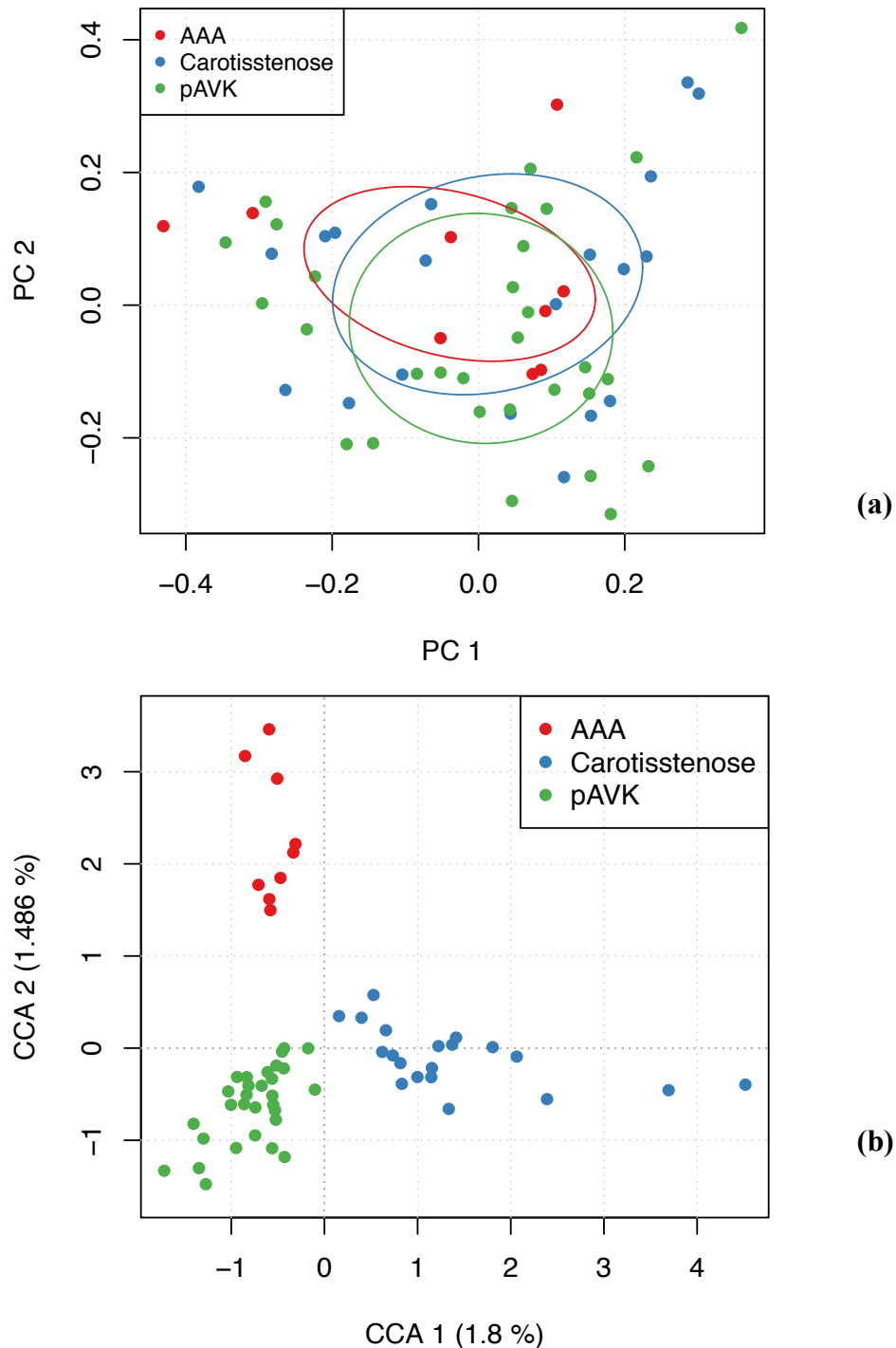


Abb. 10.: PCoA (a) und CCA (b) als Maße der Betadiversität der TEA-Zylinder in Abhängigkeit von der Herkunft

III.2. Vergleich des Mikrobioms von TEA-Zylindern und Serum

In 20 der 69 untersuchten Serumproben konnten bakterielle Signaturen gefunden werden. Dabei unterschied sich das Besiedlungsmuster signifikant von dem der zugehörigen TEA-Zylinder ($p < 0,001$, s. Abb. 11). Bei den im Serum am häufigsten nachgewiesenen Gattungen handelte es sich um Vertreter des Propionibacterium, Marinomonas, Bradyrhizobium und Psychoromonas, die gar nicht oder zu weitaus geringeren Anteilen in TEA-Zylindern gefunden werden konnten (s. Abb. 12 a). Dementsprechend zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied der Alpha Diversität (s. Abb. 13).

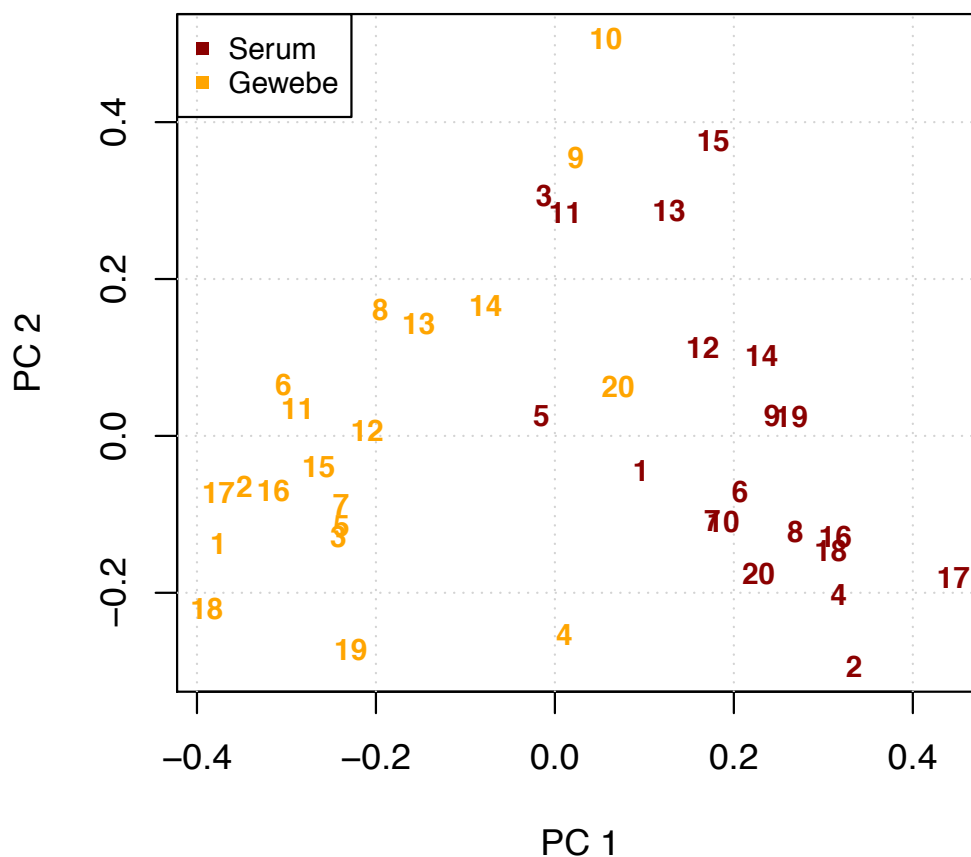


Abb. 11: PCoA als Maß der Betadiversität der bakteriellen Besiedlungen von Serum und Gewebe (TEA-Zylinder)

Mit Nummern dargestellt sind die einzelnen Patienten mit jeweils einer Serum- und einer Gewebeprobe.

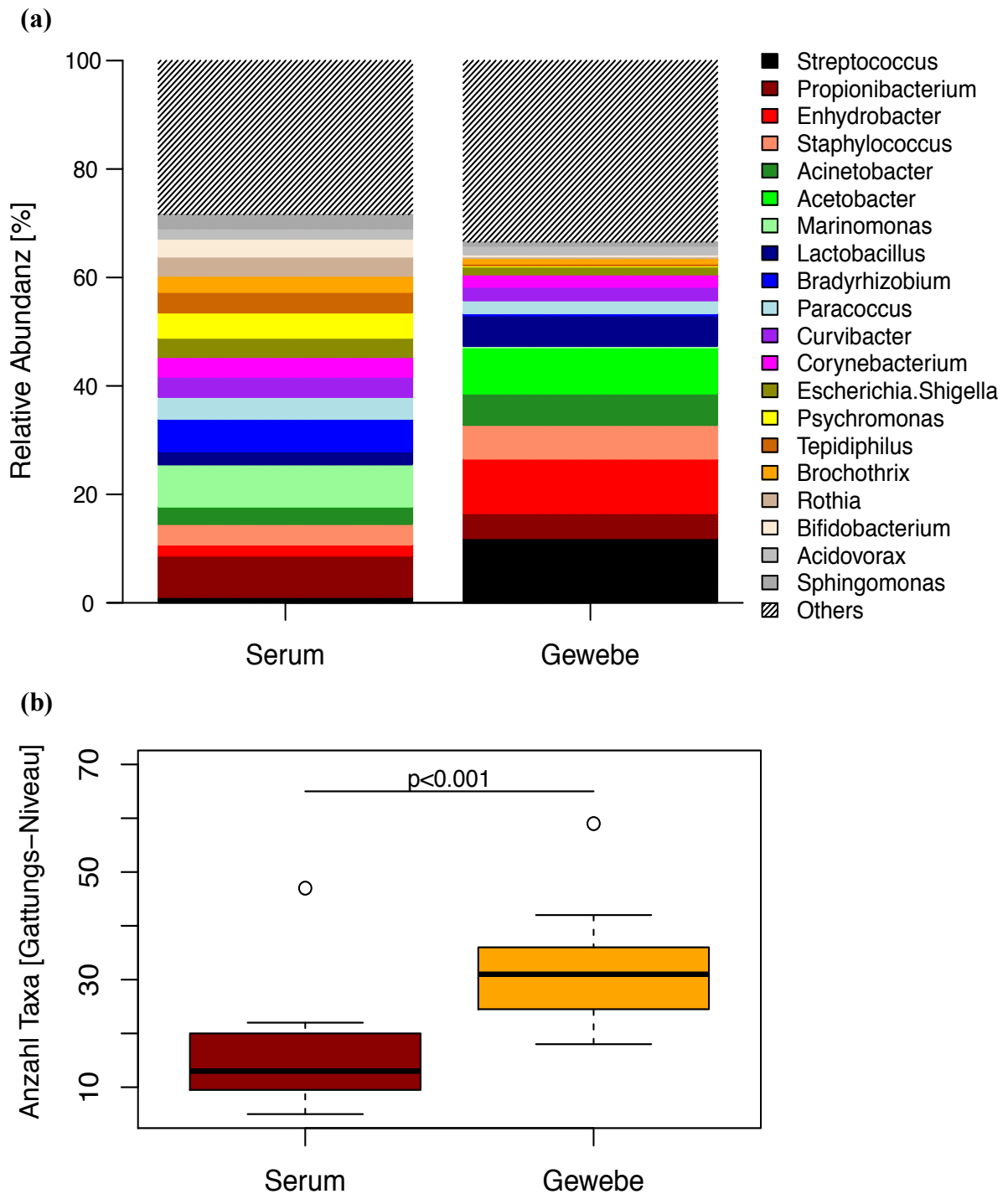


Abb. 12: Relative Abundanz (%) der bakteriellen Besiedlung von Serum- und Gewebeproben (a) sowie die Anzahl der Taxa dargestellt als Boxplot (b), beides auf Gattungsniveau

° = Ausreißer

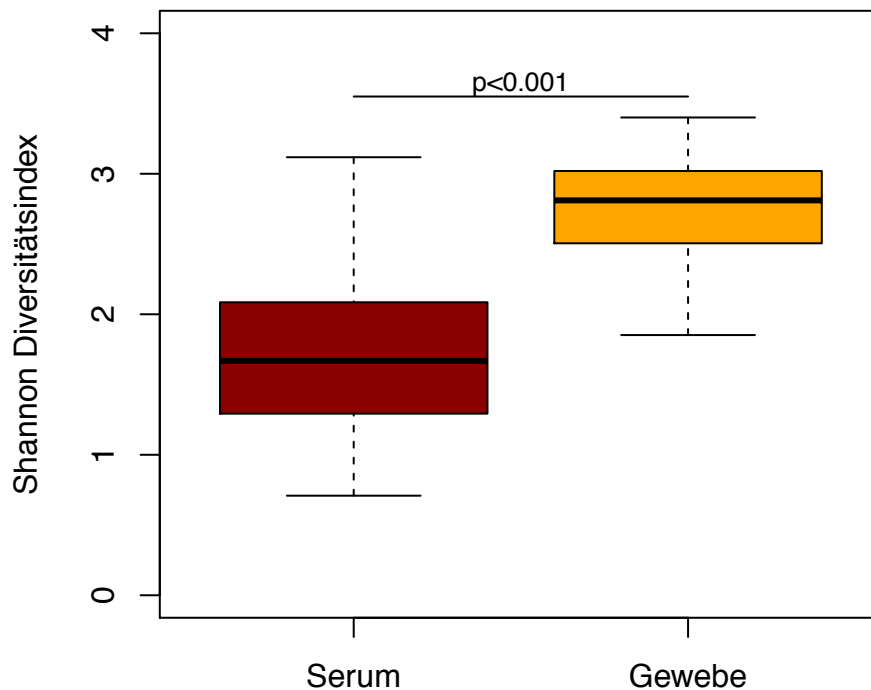


Abb. 13: Shannon-Diversitätsindex dargestellt als Boxplot als Maß der Alphadiversität der bakteriellen Besiedlung von Serum und Gewebe (TEA-Zylinder)

III.3. Unbesiedelte TEA-Zylinder

10 der untersuchten TEA-Zylinder wurden nach Festlegung der Sequenziertiefe als unbesiedelt angesehen. 6 dieser Zylinder stammten von pAVK-Patienten, 3 von Patienten mit einer Carotisstenose und 1 Zylinder von einem Patienten mit einem AAA. 5 der Patienten waren männlichen und 5 weiblichen Geschlechts. Die Altersverteilung lag zwischen 66 und 87 Jahren.

IV. DISKUSSION

IV.1. Patientenkollektiv

IV.1.1. Alter- und Geschlechterverteilung

Von den 69 eingeschlossenen Patienten mit entnommenen TEA-Zylindern waren 48 (69,6%) männlichen und 21 (30,4%) weiblichen Geschlechts. Innerhalb der an einer pAVK (69,4% männlich, 30,5% weiblich) und einem abdominellen Aortenaneurysma (70% männlich, 30% weiblich) erkrankten Patienten ergab sich ebenfalls eine der Gesamtheit entsprechende Geschlechterverteilung. Von einer extrakraniellen Carotisstenose waren in dieser Studie mehr Männer und weniger Frauen als bei den anderen Erkrankungen betroffen (73,9% männlich, 26,1% weiblich). Die Geschlechterverteilung in dieser Studie bezogen auf die einzelnen Erkrankungen entspricht somit in etwa der in der Gesamtbevölkerung (Vos et al., 2020). Das Alter der Patienten betrug am Tag der Operation im Schnitt 69,2 Jahre. Frauen waren mit durchschnittlich 69,7 Jahren älter als Männer mit 66,3 Jahren.

IV.1.2. Erkrankungsart

Von den 69 eingeschlossenen Patienten mit entnommenen TEA-Zylindern lautete die Hauptdiagnose bei 36 Patienten pAVK, bei 23 Patienten Carotisstenose und bei 10 Patienten AAA. Die unterschiedliche Häufigkeit ergibt sich aus dem Patientenaufkommen im UKSH Lübeck im Zeitraum von April 2016 bis Mai 2018 und kann nicht als repräsentativ bezüglich der Morbidität in der Bevölkerung angenommen werden. Dass die Patientenzahl mit AAA deutlich niedriger ist als bei der pAVK und der Carotisstenose, lässt sich zum einen auf die geringere Inzidenz zurückführen. Zum anderen kam es im Zeitraum der Patientenrekrutierung zu einer Zunahme der endovaskulären Operationstechnik bei elektiven Eingriffen, in der es technisch nicht möglich ist TEA-Zylinder zu entnehmen.

IV.2. Methodik

In Folge der Fragestellung wurde eine Amplicon-Sequenzierung gewählt. Die Bestimmung der Qualität und Quantität der bakteriellen Signaturen erfolgte dabei über die Analyse der

16S rRNA-Sequenz. Da über ihre hypervariablen Regionen Taxa sicher differenziert werden können und große Datenbanken zum Abgleich der OTUs existieren, kann ein weites Spektrum an Bakterien mit hoher Spezifität erfasst werden.

Die Aussagekraft der 16S rRNA - Analysen ist dabei maßgeblich von der Auswahl der Primer bzw. der hypervariablen Regionen abhängig. Da die Sequenzierung der gesamten hypervariablen Region aufgrund ihrer Länge von ca. 1550 Basenpaaren mit High Throughput Sequencing methodisch komplex ist, muss sich zuvor für eine bzw. eine Kombination aus den neun verfügbaren hypervariablen Regionen entschieden werden. Dies spielt insofern eine Rolle, als dass die Regionen unterschiedliche Rückschlüsse auf Speziesreichtum und die detektierten Spezies generell zulassen. Unter diesen Gesichtspunkten wurde sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die V3/V4-Regionen entschieden, da sie in der Lage sind, mit hoher Spezifität eine präzise Aussage über Phyla und Genus der vorliegenden Prokaryoten zu ermöglichen (Chakravorty et al., 2007; Frank et al., 2008; Yang et al., 2016; Graspeuntner et al., 2018).

Limitationen in der 16S rRNA – Sequenzierung sind zum einen biologischer Natur: Manche Bakterien verfügen über mehr als ein 16S rRNA-haltiges *rrn* – Operon, was irrtümlicherweise eine erhöhte Abundanz vortäuscht, oder sogar über verschiedene 16S rRNA-Sequenzen, was zur Annahme einer höheren Diversität führt. Des Weiteren ähneln sich manche Bakterienfamilien in Teilen der hypervariablen Regionen bis auf wenige Nukleotide, sodass eine Unterscheidung erschwert und die Diversität in Wahrheit höher ist als ermittelt (Acinas et al., 2004). Eine Alternative stellt z.B. eine Taxonomie auf Grundlage des *cpn60*-Gens dar, welches laut einiger Studien durch Umgehung der oben genannten Problematiken Spezies besser differenzieren und identifizieren kann (Schellenberg et al., 2009; Hill et al., 2010). An größeren Datenbanken mangelt es jedoch vorerst, weshalb sie für das Design dieser Arbeit wenig geeignet sind.

Zum anderen bestehen auch methodische Herausforderungen bei 16S rRNA – Analysen. Prinzipiell werden die hierfür verwendeten Primer als universal betrachtet, da die Genabschnitte vor den hypervariablen Regionen hochkonserviert sind. Manche Primer binden jedoch an verschiedene konservierte 16S rRNA-Sequenzen mit erhöhter Präferenz, wodurch die zugehörigen Taxa überrepräsentiert werden (Schloss et al., 2011).

Neben der Auswahl der richtigen Primer ist für eine valide Aussage der 16S rRNA - Analyse eine saubere DNA-Extraktion, Amplifikation, Sequenzierung und Datenprozessierung essentiell. Da aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten, besonderen Probenotypen wie der

TEA-Zylinder keine angepassten, standardisierten Protokolle zur Extraktion bekannt sind, war die Erarbeitung eines eigenen Protokolls anhand der Herstellerempfehlung notwendig. Es zeigte sich, dass durch die Hinzugabe von Benzonase, wie nach Herstellerempfehlungen vorgesehen, fast sämtliche DNA degradiert wurde. In Testreihen ohne Benzonase konnte schließlich bakterielle DNA isoliert werden. Zudem wurde, wie im optimierten Extraktionsprotokoll ersichtlich, weniger Probenmaterial verwendet als empfohlen (s. VII.2.).

Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch ein second generation sequencing, also ein sequencing by synthesis unter der Verwendung des Illumina MiSeq. Die Vorteile in der Sequenzierung mit Illumina liegen im Vergleich zu anderen second-generation-Sequenzierern in einem verbesserten read count und einer geringen Anfälligkeit für Indels. Die Fehlerrate kann somit niedrig gehalten werden (Luo et al., 2012). Als nachteilig ist eine kürzere read length zu sehen.

Da die Sequenzierung trotz allem nicht vollständig fehlerfrei abläuft, ist im Anschluss eine Datenprozessierung notwendig, in der die gewonnenen Rohdaten aufbereitet werden. Diese wurde nach allgemeinen Standards, wie in II.2.7.3. erläutert, durchgeführt.

Schlussendlich erfolgte die Klassifizierung der vorhandenen Phyla durch eine Gruppierung in OTUs. Eine sichere Differenzierbarkeit ist dabei bis zur Ebene der Gattung möglich. Tiefergreifende Differenzierungen wären bei zu erwartender hoher Fehlerrate nicht aussagekräftig genug.

Neben einer Amplicon-basierten Sequenzierung wäre auch eine Metagenom-Analyse denkbar, die für das Design dieser Arbeit aber zunächst weniger geeignet schien. Vorteile der Amplicon-Sequenzierung liegen darin, dass nur geringe DNA-Mengen benötigt werden und humanes Material nicht störend ist. Zudem kann eine große Probenzahl aufgeschlüsselt werden. Eine Metagenom-Analyse wäre im Anschluss für sich aus den Ergebnissen ergebende, tiefergreifende Fragestellungen denkbar.

IV.3. Beurteilung der mikrobiellen Besiedlung der untersuchten Gefäßabschnitte

Das in dieser Arbeit gefundene Besiedlungsmuster der arteriosklerotischen Plaques korreliert in großen Teilen mit den Ergebnissen anderer, auf Amplicon-Sequenzierung basierenden Studien. So waren Proteobactericea, Firmicutes und Actinobacteria unabhängig von

der Herkunft des Plaques die am häufigsten vorkommenden Stämme (Koren et al., 2011; Armingohar et al., 2014; Calandrini et al., 2014; Lindskog Jonsson et al., 2017). Ein vorherrschender Stamm bzw. eine Gattung konnte nicht gefunden werden. Vielmehr zeigte sich wie bereits bekannt eine große Diversität in der bakteriellen Besiedlung. Dennoch kann festgehalten werden, dass das Besiedlungsmuster spezifisch für Gefäße ist, indem es, zumindest im interindividuellen Vergleich, unabhängig von der Gefäßlokalisation annähernd gleich ist und sich von anderen, im Körper vorkommenden Mikrobiomen unterscheidet (Koren et al., 2011).

IV.3.1. Besiedlungsmuster in Abhängigkeit von der Herkunft

In einer umfangreichen Literaturrecherche konnten keine vergleichbaren Ergebnisse zur bakteriellen Besiedlung der arteriosklerotischen Plaques in Abhängigkeit von der Plaqueherkunft gefunden werden. Lediglich Armingohar et al., 2014 erwähnen, dass kein Unterschied in der Diversität zwischen aus einem AAA und aus einer Carotisstenose bzw. pAVK stammenden Plaques gefunden werden konnte. Bezogen auf die Betadiversität trifft dies auch für die Ergebnisse dieser Arbeit zu. Hier zeigte sich in Einklang mit dem oben genannten ein insgesamt ähnliches Mikrobiom mit nur geringer Varianz. Im Gegensatz dazu konnte nach Prüfung der Alphadiversität eine signifikant weniger diverse bakterielle Besiedlung in Plaques aus AAA gefunden werden. Im Einzelnen scheinen auch bestimmte Gattungen in abweichender Abundanz in AAA vorzukommen (s. Abb. 8). Die bakterielle Besiedlung von AAA unterscheidet sich somit von denen der anderen beiden Lokalisationen.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich die Pathomechanismen, die zur Ausbildung eines AAA führen, von denen in peripheren arteriellen Gefäßen unterscheiden. Klassischerweise wird das AAA als eine Folgeerkrankung der Arteriosklerose begriffen. Hierfür spricht zum einen, dass an einem Aneurysma erkrankte Patienten meistens arteriosklerotische Läsionen bzw. deren Folgeerkrankungen und die dazugehörigen Risikofaktoren aufweisen (Gianfagna et al., 2018). Zum anderen konnten in den aneurysmatisch veränderten Gefäßwänden der Aorta die für die Arteriosklerose typischen morphologisch entzündlichen Veränderungen gefunden werden. Da es aber auch Patienten mit einem Aortenaneurysma ohne Nachweis weiterer arteriosklerotischer Läsionen gibt, müssen noch weitere Faktoren existieren, die die Ausbildung eines Aneurysmas beeinflussen.

In Mausmodellen konnte eine Ausbildung von Aneurysmen durch die intraluminale bzw. – murale Gabe von Angiotensin II, Elastase oder Calciumchlorid bzw. -phosphat beobachtet werden. Als zugrundeliegender Pathomechanismus wurde in allen Fällen neben Thrombosen, Proteolysen, Angiogenesen und einem Abbau elastischer Fasern eine Entzündungsreaktion festgestellt. Des Weiteren sind bestimmte genetische Veränderungen mit der Ausbildung eines Aneurysmas assoziiert. Bei diesen genetischen Veränderungen handelt es sich u.a. um Einzelnukleotid-Polymorphismen, die für eine veränderte Expression von Metalloproteasen, eine veränderte IL-6-Rezeptorfunktion oder eine veränderte LDL-Rezeptorfunktion kodieren und damit ultimativ den Matrixumbau und die Entzündungsreaktion beeinflussen (Golledge, 2018).

Diese Pathomechanismen könnten spezielle Bedingungen schaffen, die eine Besiedlung mit bestimmten Bakterien bzw. deren Wachstum in der Gefäßwand begünstigen oder erschweren. Dass unterschiedliche Bedingungen tatsächlich zu verschiedenen Besiedlungsmustern im gleichen Gewebe führen, zeigt sich am Beispiel der oralen Flora. Diese variiert aufgrund des nach aboral abnehmenden Sauerstoffgehalts der Atemluft in Abhängigkeit von der Lokalisation (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Über variierende Nischenbedingungen kann somit die geringere bakterielle Diversität sowie das spezielle Besiedlungsmuster in AAA im Vergleich zu peripheren Gefäßen erklärt werden. Zudem ließe sich damit begründen, warum manche Gefäßabschnitte im menschlichen Körper so gut wie nie von Arteriosklerose befallen sind. Um diesbezüglich genauere Aussagen treffen zu können, bedarf es weiterer grundlegender Forschung in Bezug auf das Plaquemilieu sowie der Interaktion der Bakterien mit der entsprechenden Umgebung und untereinander.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass sich aneurysmatische Plaques gerade deshalb von den anderen in ihrer Morphologie und der daraus resultierenden Klinik unterscheiden, weil sie eine andere bakterielle Besiedlung aufweisen. Lactobacillen, die in AAA häufiger als anderswo vorzukommen scheinen, haben je nach Art bzw. Unterart pro- oder antiinflammatorische Effekte über die Stimulation von T-, B- und dendritischen Zellen sowie Makrophagen (Ding et al., 2017). Über eine Modulation der Entzündungsreaktion könnte somit die Pathogenese der arteriosklerotischen Läsion und folglich das Aneurysmawachstum beeinflusst werden.

IV.3.2. Sterile arteriosklerotische Gefäßabschnitte

Nach Festlegung der Sequenziertiefe fanden sich mehrere als unbesiedelt angesehene TEA-Zylinder, die keiner bestimmten Patientengruppe zugeordnet werden konnte. Ähnliches wurde auch in anderen auf Amplicon-Sequenzierung basierenden Studien berichtet (Calandrini et al., 2014). Somit ist klar, dass die Entwicklung der Arteriosklerose auch ohne lokale bakterielle Gefäßbesiedlung in behandlungsbedürftigen Folgeerkrankungen resultiert.

Zum einen wäre damit möglich, dass es sich bei den in den anderen Gefäßabschnitten nachgewiesenen bakteriellen Signaturen nicht um Pathogene, sondern um zufällig vorkommenden Debris handelt. Dieser könnte an anderer Stelle von Immunzellen phagozytiert und im Rahmen der Entzündungsreaktion in die Gefäßwand gelangt sein. Da auch makroskopisch unauffällige Gefäße in an Arteriosklerose Erkrankten bereits latent entzündet sind, könnte damit der Nachweis bakterieller DNA in nicht-arteriosklerotischen Gefäßabschnitten erklärt werden (Buffon et al., 2002; Reszka et al., 2008; Mougeot et al., 2017). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Gefäßsystem über ein natürliches Mikrobiom verfügt, das nicht als pathogen sondern als kommensal zu verstehen ist. Dagegen spricht jedoch, dass im Rahmen der durchgeführten Studie im Vergleich zu anderen, im Körper vorkommenden Floren kein ubiquitärer Keimnachweis gelungen ist und dass sich die Besiedlungsmuster von Blut und Gefäßwand kaum überschneiden. Auch hier könnten unterschiedliche Nischenbedingungen ursächlich sein. Ob dann aber von einem gefäßspezifischen Mikrobiom gesprochen werden kann, ist fraglich.

Das Fehlschlagen von in Studien durchgeführten Antibiotika-Trials spricht zunächst ebenfalls gegen eine Beteiligung bakterieller Infektionen an der Pathogenese der Arteriosklerose. So konnte durch die Behandlung mit Makroliden oder Doxycyclin weder eine Reduktion der Progression der Läsion erreicht noch das Outcome der Patienten positiv beeinflusst werden (O'Connor et al., 2003; Andraws et al., 2005; Grayston et al., 2005; Cannon et al., 2005; Jespersen et al., 2005; Meijer et al., 2013). Dies lässt einerseits die Schlussfolgerungen zu, dass bakterielle Infektionen generell keinen nennenswerten Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Die Ergebnisse einer Minderheit der Studien stützen diese Hypothese (Epstein und Zhu, 1999; Ridker et al., 1999; Zhu et al., 2002). Andererseits kann angeführt werden, dass die verwendeten Antibiotika das bekannte bakterielle Spektrum nicht

vollständig erfassen und dass die Therapie in einem zu späten, bereits irreversiblen Stadium der Erkrankung begonnen wurde (Gieffers et al., 2001).

Außerdem scheinen weitere Mechanismen die antibiotische Wirkung einzuschränken: Zum einen sind manche der gefundenen Bakterienspezies in der Lage einen Biofilm zu bilden, der vor antimikrobiellen Substanzen schützt (Lanter et al., 2014; Lanter und Davies, 2015; Snow et al., 2016). Zum anderen wird vermutet, dass der Fortschritt der Läsion weiter unterhalten wird, auch wenn die Pathogene gar nicht mehr präsent sind. Grundlage dieser Theorie ist, dass Erreger wie *C. pneumoniae*, *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* ihre entzündliche Wirkung durch die TLR-vermittelte Aktivierung des angeborenen Immunsystems entfalten. In Folge dieser Aktivierung wird die TLR-Expression erhöht. Allerdings sind nicht nur Pathogen-assoziierte molekulare Muster TLR-Liganden, sondern auch Plaquebestandteile wie z.B. HSP60 oder oxLDL. So schreitet die durch die Pathogene initiierte chronische Entzündungsreaktion auch in ihrer Abwesenheit fort. Dieser Mechanismus bietet eine Erklärung für die Chronifizierung der Entzündungsreaktion und für die Unwirksamkeit von Antibiotika gegen eine bakterielle Akzeleration arteriosklerotischer Läsionen (Yumoto et al., 2005; Naiki et al., 2008; Stassen et al., 2008; Pan et al., 2014; Wan et al., 2015). Zudem lässt sich so eine Beteiligung bakterieller Infektionen an der Pathogenese der Arteriosklerose trotz fehlender Gefäßinvasion nicht ausschließen.

IV.3.3. Besiedlungsmuster in Serum und Gefäßabschnitten

Abgelaufene Infektionen, wie beispielsweise eine Parodontitis, können arteriosklerotische Läsionen über eine Änderung des Besiedlungsmusters beeinflussen (Chhibber-Goel et al., 2016). Der Hypothese des Pathogen Burden folgend ist dabei vor allem die Kumulation der Infektionen wirksam. Naheliegender wäre, dass die abgelaufenen Infektionen in einer subklinischen Bakteriämie akkumulieren und hierüber ihre Wirkung auf die arteriosklerotischen Läsionen entfalten. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass mehrere Bakterien im Zustand der Infektion parallel auch im Blut nachgewiesen werden können. So zeigte sich bei einer Parodontitis durch Manipulationen am Zahnbett eine transiente Bakteriämie (Forner et al., 2006). Der Nachweis einer Bakteriämie gelang jedoch nicht nur bei primär klinisch nicht-septisch erkrankten, sondern auch bei diesbezüglich gesunden Individuen (McLaughlin et al., 2002; Grosiewski et al., 2017).

Auch in dieser Arbeit ließ sich bei 20 der 69 untersuchten Serumproben eine subklinische Bakteriämie finden. Im Vergleich mit den dazugehörigen Gefäßproben zeigte sich ein signifikant unterschiedliches Besiedlungsmuster. Folglich könnte man annehmen, dass die Auswirkung der Bakteriämie auf arteriosklerotische Läsionen begrenzt ist.

Dagegen sprechen jedoch mehrere Überlegungen. In der Annahme, dass die durch Infektionen verursachten Bakteriämien wie von Forner et al., 2006 beschrieben transient sind, liegt ein sich stetig wandelndes, intravasales Mikrobiom vor. Dessen Zusammensetzung wird nicht nur durch akute Infektionen beeinflusst, sondern kann auch andere Ursachen haben. Sato et al., konnten 2014 zeigen, dass bei Typ-2-Diabetikern ebenfalls eine Bakteriämie vorliegt, die der Zusammensetzung des bei diesen Patienten vorkommenden, dysbiotischen Darmmetagenoms entspricht und mit einem Progress der Erkrankung vergesellschaftet ist. Auch bei einer Vielzahl anderer, vornehmlich inflammatorischer Erkrankungen konnte eine Dysbiosis der Darmflora nachgewiesen werden (Potgieter et al., 2015). Selbst bei an Arteriosklerose Erkrankten ist das Vorliegen einer veränderten Darmflora bekannt (Koren et al., 2011; Karlsson et al., 2012).

Ob die gefundenen Bakterien im Blut als aktive Form vorliegen, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Bekannt ist, dass Bakterien intrazellulär persistieren können, in dormantem Zustand vorkommen oder dass in Teilen auch nur bakterielle Bestandteile wie bspw. 16S rDNA im Blut gefunden werden können (Nikkari et al., 2001; Potgieter et al., 2015). Die Pathogene bzw. ihre Bestandteile könnten zum einen über die in I.3.3. erläuterten Mechanismen in die arteriosklerotischen Läsionen translozieren und dort persistieren, während sie im Blut durch eine Immunreaktion eliminiert werden. Somit wäre im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit sowohl das Vorkommen eines unterschiedlichen Mikrobioms in Gefäß und Blut als auch das Vorkommen steriler Blutproben möglich. Zusätzlich ist unter Kenntnis der TLR-vermittelten Immunantwort das Vorhandensein der Bakterien in den Plaques nicht ausschlaggebend für ihre pathogenetische Wirkung. Des Weiteren kann durch die Bakteriämie eine systemische Entzündungsreaktion verursacht werden, die ohne das Vorhandensein des spezifischen Bakteriums im Plaque zu einer Progression der arteriosklerotischen Läsionen beiträgt. So waren Streptokokken in dieser Arbeit nur in geringem Maß in AAA-Plaques vorhanden. Dennoch ist das Vorkommen von gegen sie gebildeten Antikörpern positiv mit dem AAA-Wachstum korreliert (Wanhainen et al., 2008).

Somit scheint sowohl der subklinischen Bakteriämie als auch der lokalen bakteriellen Besiedelung der Gefäße über eine direkte und indirekte Wirkung eine tragende Rolle in der Entstehung der arteriosklerotischen Läsionen zuzukommen.

IV.4. Limitationen

Die Limitationen dieser Arbeit ergeben sich zum einen aus dem insgesamt kleinen Patientenkollektiv und im speziellen aus der geringen Zahl an aus einem AAA stammenden TEA-Zylindern. Hierdurch konnten für einige der Fragestellungen nur Trends beschrieben werden ohne eindeutig statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Des Weiteren wäre zur Validierung und Prüfung der Allgemeingültigkeit der getroffenen Aussagen ein diverseres Kollektiv mit Patienten jüngerer Altersklassen und anderer Ethnien hilfreich.

Da innerhalb des Patientenkollektivs nicht zwischen weniger oder weiter fortgeschrittenen Erkrankungen unterschieden wurde, läge hier ein Ansatzpunkt zur weiteren Beschreibung der bakteriellen Besiedlung arteriosklerotischer Läsionen. Dies ist im Rahmen anderer Studien bisher nur für die Carotisstenose erfolgt, wäre aber auch bspw. bei den verschiedenen Krankheitsstadien der pAVK mit Frage nach Änderung der Diversität und des Besiedlungsmusters von Relevanz (Mitra et al., 2015; Lindskog Jonsson et al., 2017). Auch unter Einbezug weiterer Metadaten, wie vorliegender Risikofaktoren, Geschlecht oder Alter kann eine genauere Beschreibung der bakteriellen Besiedlung und im Besonderen auch der subklinischen Bakteriämien erfolgen.

Weitere Limitationen sind methodischer Art. Um eine Verunreinigung der Proben auszuschließen, waren präoperativ Hautabstriche im OP-Gebiet erfolgt, die aufgrund der geringen Anzahl jedoch nicht ausgewertet wurden. Eine Verunreinigung der TEA-Zylinder ist aufgrund steriler Kautelen höchst unwahrscheinlich, aber nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Ähnliches gilt auch für die entnommenen Serumproben, die ebenfalls erst nach gründlicher Hautdesinfektion entnommen worden waren.

Des Weiteren ergab sich in der Sequenzierung ein Q30 von 77,2%, was für eine gute aber noch optimierbare Qualität der Daten spricht. Ein erneuter Durchlauf mit einem Q30 über 80% als Ziel würde mehr Sicherheit bei der Interpretation der Ergebnisse gewährleisten, besonders auch im Hinblick auf die bisher als unbesiedelt gewerteten TEA-Zylinder. Zudem würde eine erneute Sequenzierung eine Reevaluation der Ergebnisse ermöglichen. Ggf. kann es in diesem Zusammenhang sinnvoll sein, diese TEA-Zylinder zur weiteren Klärung mit einer anderen Methodik zu untersuchen.

Überdies wäre ein Vergleich des bakteriellen Besiedlungsmusters von arteriosklerotischen mit gesunden Gefäßabschnitten eines Patienten von Interesse, was sich jedoch aufgrund der fehlenden therapeutischen Indikation als ethisch schwierig darstellt.

IV.5. Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse

In dieser Arbeit konnte ein spezifisches Mikrobiom in arteriosklerotischen Gefäßabschnitten gefunden werden, das in seiner Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Lokalisation variiert. Insbesondere AAA wiesen dabei eine weniger diverse Besiedlung mit abweichender Abundanz bestimmter Gattungen auf, was auf andersartige Bedingungen in der aneurysmatischen Gefäßwand zurückzuführen bzw. selbst für die spezifische Morphologie der Aneurysmata verantwortlich sein könnte.

Obwohl mehrere unbesiedelte TEA-Zylinder gefunden wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bakterielle Infektionen einen Einfluss auf die Pathogenese haben. Dies hat neben den vielen belegten statistischen Korrelationen mehrere Gründe. Zum einen scheinen abgelaufene und chronische Infektionen in einer subklinischen Bakteriämie zum Pathogen Burden zu akkumulieren. Trotz fehlender Übereinstimmung der Besiedlungsmuster in Serum und arteriosklerotischen Gefäßabschnitten könnten die intravasalen Pathogene zu einer lokalen Gefäßinvasion führen. Zudem können sie ihre Wirkung über eine systemische Entzündungsreaktion entfalten. Zum anderen ist ein dauerhaftes Vorhandensein von Bakterien sowohl im Serum als auch in den Gefäßabschnitten für die Generierung und Chronifizierung der Entzündungsreaktionen in arteriosklerotischen Läsionen aufgrund der TLR-vermittelten Immunantwort nicht notwendig. Der Nachweis von sterilen Gefäßabschnitten und Serumproben schließt somit eine Rolle der Pathogene in der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen nicht aus (s. Abb. 14).

Dennoch muss der Vollständigkeit halber erwähnt werden, dass es sich bei den vermeintlich nachgewiesenen Pathogene in den TEA-Zylindern um durch Entzündungszellen eingebrachten, wirkungslosen Detritus handeln könnte und dass die subklinische Bakteriämie ein bei Gesunden beobachtetes Phänomen ohne jegliche pathologische Wirkung sein kann.

Genau so könnte der Nachweis von Bakterien im Blut und den Gefäßwänden bedeuten, dass entgegen bisheriger Annahmen ein Mikrobiom in Gefäßen existiert. Aufgrund der fehlenden Überschneidung der Besiedlungsmuster ist jedoch fraglich, ob von einem gefäßspezifischen Mikrobiom gesprochen werden kann.

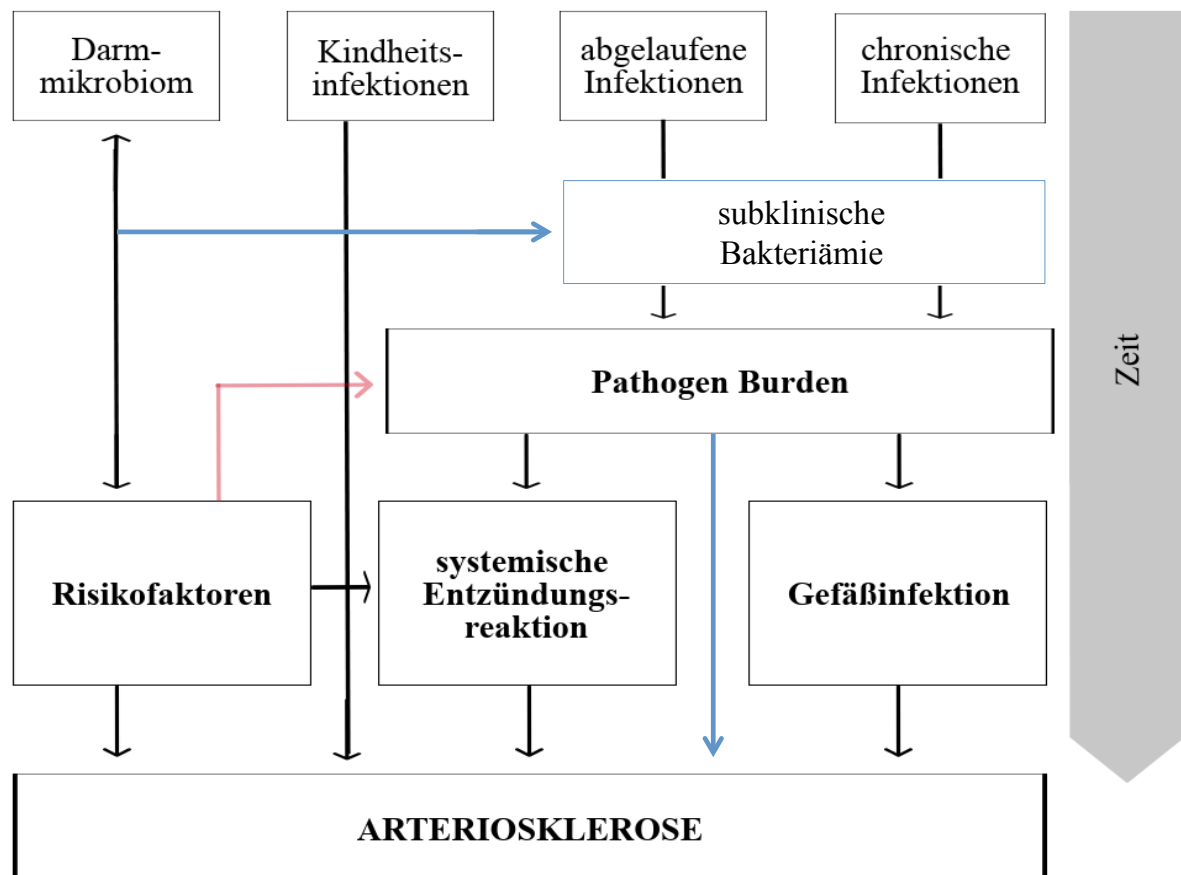


Abb. 14: Fazit zur Rolle des Mikrobioms bei der Entstehung der Arteriosklerose

Den Ergebnissen dieser Arbeit nach scheinen sich zusätzlich zu den eingangs erläuterten Mechanismen weitere Einflüsse von Pathogenen auf die Entstehung der Arteriosklerose zu ergeben (blau unterlegt): Infektionen sowie ins Blut translozierte Darmbakterien können über eine subklinische Bakteriämie zum Pathogen Burden akkumulieren. Dieser entfaltet seine Wirkung nicht nur über eine systemische Entzündungsreaktion und lokale Gefäßinvasion, sondern auch direkt auf arteriosklerotische Läsionen über die TLR-vermittelte Immunantwort.

Ob Risikofaktoren zusätzlich auch einen direkten Einfluss auf den Pathogen Burden ausüben, gilt es zu klären.

IV.6. Ausblick

Trotz der bisher vorliegenden Erkenntnisse über die Beteiligung bakterieller Infektionen an der Pathogenese der Arteriosklerose bedarf es noch weiterer, grundlegender Forschung. Dabei sind generell Studien mit größeren Patientenkollektiven, orientiert am Beispiel des Human Microbiome Project, notwendig, um das Besiedlungsmuster der Plaques sowohl in Abhängigkeit von der Lokalisation als auch bspw. des Plaque- oder Erkrankungsstadiums zu charakterisieren. Hierbei wären neben den bisher vielfältig durchgeführten Amplicon- auch Metagenom-Sequenzierungen oder andere methodische Herangehensweisen hilfreich. In der Folge müssen dann die Wechselwirkungen zwischen den gefundenen Pathogenen und dem menschlichen Organismus genauer untersucht werden, da die bisherigen Erkenntnisse vor allem aus Studien an Mausmodellen stammen. Dies bezieht sich nicht nur auf den direkten Einfluss der Bakterien auf die Pathogenese, sondern auch auf etwaige Wechselwirkungen mit bisher bekannten Risikofaktoren. Denkbar wäre in Kenntnis ihres Einflusses auf das Darmmikrobiom, dass bestimmte Risikofaktoren unterschiedliche Besiedlungsmuster begünstigen und hierüber ihre Wirkung entfalten. Auch die Wechselwirkung zwischen dem Darmmikrobiom und Arteriosklerose unterliegt der aktuellen Forschung. Des Weiteren sollte das Augenmerk nicht nur auf Bakterien, sondern auch auf eine Beteiligung anderer Pathogene und hier v.a. auf Viren gelegt werden (Vlieghe et al., 2005). Erst dann kann abschließend eine Aussage darüber getroffen werden, ob Pathogene bei der Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen eine Rolle spielen oder ob der Begriff eines Gefäß-eigenen Mikrobioms geprägt werden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Folgeerkrankungen der Arteriosklerose stellen weltweit die häufigsten Todesursachen dar. Der Gewinn neuer Kenntnisse über die zugrundeliegenden Pathomechanismen ist daher essentiell. Auch wenn die Pathogenese bereits detailliert verstanden ist, fehlt es an Erklärungen für die Chronifizierung der Entzündung, die letztlich ausschlaggebend für die klinische Manifestation der Arteriosklerose ist. Die bakterielle Besiedelung des Gefäßsystems steht hierbei im Verdacht, über eine systemische Entzündungsreaktion sowie eine lokale Gefäßinvasion die Entwicklung der arteriosklerotischen Läsionen voranzutreiben.

Zur weiteren Evaluierung dieser Hypothese wurden bei einem Patientenkollektiv mit arteriosklerotische Folgeerkrankungen (pAVK, Carotisstenose oder AAA) elektiv Gefäßzyylinder im Rahmen einer TEA sowie Serumproben entnommen. Diese wurden Ampliconbasiert mittels der V3/V4-Regionen der 16S rRNA auf ihre bakterielle Besiedlung mit der Frage nach Abhängigkeit des Besiedlungsmusters von der Lokalisation des Plaques und/oder einer subklinischen Bakteriämie analysiert.

In den meisten arteriosklerotischen Gefäßabschnitten konnte ein spezifisches Mikrobiom nachgewiesen werden, das in seiner Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Lokalisation variierte. Insbesondere AAA wiesen dabei eine weniger diverse Besiedlung mit abweichender Abundanz bestimmter Gattungen auf. Einige TEA-Zylinder zeigten keine bakterielle Besiedlung. Auch in mehreren Serumproben ließ sich eine subklinische Bakteriämie nachweisen, deren Zusammensetzung im Vergleich zum in den TEA-Zylindern gefundenen Mikrobiom signifikant unterschiedlich war.

Das Besiedlungsmuster der arteriosklerotischen Plaques ist somit zum einen abhängig von der Lokalisation, mutmaßlich aufgrund besonderer Bedingungen in der Gefäßwand. Obwohl auch unbesiedelte TEA-Zylinder gefunden wurden, ist eine Beteiligung bakterieller Infektionen an der Pathogenese der Arteriosklerose nicht auszuschließen, da sie ihre Wirkung auch über eine systemische Entzündungsreaktion oder direkt ohne Gefäßinvasion über eine TLR-vermittelte Immunantwort entfalten können. Dies scheint durch die Akkumulation eines Pathogen Burden in einer subklinischen Bakteriämie möglich zu sein. Das Vorliegen eines Gefäß-eigenen Mikrobioms ist aufgrund der fehlenden Überschneidung des in Serum und Gefäßwand gefundenen Besiedlungsmusters unwahrscheinlich. Der Einfluss bakterieller Infektionen auf die Pathogenese der Arteriosklerose scheint also von Relevanz zu sein und sollte in Zukunft Gegenstand weiterer Forschung bleiben.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J Bacteriol.* Mai 2004;186(9):2629–35.

Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson A-KL, Gourdy P, Zoll J, u. a. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* Februar 2006;12(2):178–80.

Al Rifai M, Silverman MG, Nasir K, Budoff MJ, Blankstein R, Szklo M, u. a. The association of nonalcoholic fatty liver disease, obesity, and metabolic syndrome, with systemic inflammation and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* April 2015;239(2):629–33.

Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1. Juli 2003;23(7):1245–9.

Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MND. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemost.* Mai 2015;113(5):916–30.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1. September 1991;11(5):1223–30.

Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA.* 24. April 1987;257(16):2176–80.

Andr ws R, Berger JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 1. Juni 2005;293(21):2641–7.

Aoyama T, Chen M, Fujiwara H, Masaki T, Sawamura T. LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 11. Februar 2000;467(2–3):217–20.

- Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Abesha-Belay E, Olsen I. Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2014;6.
- Assinger A, Buchberger E, Laky M, Esfandeyari A, Brostjan C, Volf I. Periodontopathogens induce soluble P-selectin release by endothelial cells and platelets. *Thromb Res.* Januar 2011;127(1):e20-26.
- Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J.* Februar 1998;19 Suppl A:A2-11.
- Balistreri CR, Candore G, Listì F, Fazio T, Gangi S, Incalcaterra E, u. a. Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging. *Ann N Y Acad Sci.* November 2007;1119:203–7.
- Barlow GM, Yu A, Mathur R. Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus. *Nutr Clin Pract.* Dezember 2015;30(6):787–97.
- Benagiano M, D’Elios MM, Amedei A, Azzurri A, van der Zee R, Ciervo A, u. a. Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. *J Immunol.* 15. Mai 2005;174(10):6509–17.
- Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 4. Juni 1998;338(23):1650–6.
- Berenson GS. Childhood risk factors predict adult risk associated with subclinical cardiovascular disease. The Bogalusa Heart Study. *Am J Cardiol.* 21. November 2002;90(10C):3L-7L.
- Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas J-L, u. a. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA.* 11. Januar 2006;295(2):180–9.
- Binder CJ, Hörkkö S, Dewan A, Chang M-K, Kieu EP, Goodyear CS, u. a. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med.* Juni 2003;9(6):736–43.

- Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol.* August 1996;149(2):367–80.
- Brophy ML, Dong Y, Wu H, Rahman HNA, Song K, Chen H. Eating the Dead to Keep Atherosclerosis at Bay. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:2.
- Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D’Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med.* 4. Juli 2002;347(1):5–12.
- Burgner DP, Sabin MA, Magnussen CG, Cheung M, Kähönen M, Lehtimäki T, u. a. Infection-Related Hospitalization in Childhood and Adult Metabolic Outcomes. *Pediatrics.* September 2015;136(3):e554–562.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, u. a. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet.* 30. September 1989;2(8666):757–61.
- Calandrini C, Ribeiro A, Gonnelli A, Ota-Tsuzuki C, Rangel L, Saba-Chujfi E, u. a. Microbial composition of atherosclerotic plaques. *Oral Dis.* 1. April 2014;20(3):e128–34.
- Candore G, Aquino A, Balistreri CR, Bulati M, Di Carlo D, Grimaldi MP, u. a. Inflammation, longevity, and cardiovascular diseases: role of polymorphisms of TLR4. *Ann N Y Acad Sci.* Mai 2006;1067:282–7.
- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Grayston JT, Muhlestein B, Giugliano RP, u. a. Antibiotic Treatment of Chlamydia pneumoniae after Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine.* 21. April 2005;352(16):1646–54.
- Cavender MA, Steg PG, Smith SC, Eagle K, Ohman EM, Goto S, u. a. Impact of Diabetes Mellitus on Hospitalization for Heart Failure, Cardiovascular Events, and Death: Outcomes at 4 Years From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Circulation.* 8. September 2015;132(10):923–31.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* Mai 2007;69(2):330–9.
- Charakida M, Donald AE, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, u. a. Endothelial dysfunction in childhood infection. *Circulation.* 5. April 2005;111(13):1660–5.

- Chen L, Ishigami T, Nakashima-Sasaki R, Kino T, Doi H, Minegishi S, u. a. Commensal Microbe-specific Activation of B2 Cell Subsets Contributes to Atherosclerosis Development Independently of Lipid Metabolism. *EBioMedicine*. November 2016;13:237–47.
- Chhibber-Goel J, Singhal V, Bhowmik D, Vivek R, Parakh N, Bhargava B, u. a. Linkages between oral commensal bacteria and atherosclerotic plaques in coronary artery disease patients. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:7.
- Chou H-H, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FC, u. a. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun*. September 2005;73(9):5367–78.
- Chukkapalli SS, Velsko IM, Rivera-Kweh MF, Zheng D, Lucas AR, Kesavalu L. Polymicrobial Oral Infection with Four Periodontal Bacteria Orchestrates a Distinct Inflammatory Response and Atherosclerosis in ApoE null Mice. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0143291.
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, u. a. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 1. Januar 2014;42(Database issue):D633–42.
- Colhoun HM, Slaney JM, Rubens MB, Fuller JH, Sheiham A, Curtis MA. Antibodies to periodontal pathogens and coronary artery calcification in type 1 diabetic and nondiabetic subjects. *J Periodont Res*. Februar 2008;43(1):103–10.
- Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, u. a. The Binding of Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL Receptor-1 Reduces the Intracellular Concentration of Nitric Oxide in Endothelial Cells through an Increased Production of Superoxide. *J Biol Chem*. 27. April 2001;276(17):13750–5.
- Corriere MA, Islam A, Craven TE, Conlee TD, Hurie JB, Edwards MS. Influence of computed tomography angiography reconstruction software on anatomic measurements and endograft component selection for endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*. Mai 2014;59(5):1224-1231.e1-3.
- Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. März 1985;71(3):510–5.

- Cullen P, Schulte H, Assmann G. The Münster Heart Study (PROCAM): Total Mortality in Middle-Aged Men Is Increased at Low Total and LDL Cholesterol Concentrations in Smokers but Not in Nonsmokers. *Circulation*. 7. Oktober 1997;96(7):2128–36.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, u. a. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. November 1993;171(3):223–9.
- de Boer OJ, van der Wal AC, Houtkamp MA, Ossewaarde JM, Teeling P, Becker AE. Unstable atherosclerotic plaques contain T-cells that respond to *Chlamydia pneumoniae*. *Cardiovasc Res*. Dezember 2000;48(3):402–8.
- de Weerd M, Greving JP, de Jong AWF, Buskens E, Bots ML. Prevalence of asymptomatic carotid artery stenosis according to age and sex: systematic review and metaregression analysis. *Stroke*. April 2009;40(4):1105–13.
- Debus E, Grundmann R. Kritische Extremitätenischämie. In: *Evidenzbasierte Gefäßchirurgie*. 1. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2015. S. 111–28.
- Debus ES. S3-Leitlinie zum Screening, Diagnostik Therapie und Nachsorge des Bauchaortenaneurysmas. *Gefäßchirurgie*. 1. Oktober 2018;23(6):402–3.
- Dechend R, Maass M, Gieffers J, Dietz R, Scheidereit C, Leutz A, u. a. *Chlamydia pneumoniae* Infection of Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells Activates NF- κ B and Induces Tissue Factor and PAI-1 Expression : A Potential Link to Accelerated Arteriosclerosis. *Circulation*. 28. September 1999;100(13):1369–73.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Sacco RL, u. a. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation*. 8. Februar 2005;111(5):576–82.
- Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*. 1. September 2016;84:1–7.
- Diehm C, Schuster A, Allenberg JR, Darius H, Haberl R, Lange S, u. a. High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study. *Atherosclerosis*. Januar 2004;172(1):95–105.

- Ding Y-H, Qian L-Y, Pang J, Lin J-Y, Xu Q, Wang L-H, u. a. The regulation of immune cells by Lactobacilli: a potential therapeutic target for anti-atherosclerosis therapy. *Oncotarget*. 29. August 2017;8(35):59915–28.
- Dratva J, Caviezel S, Schaffner E, Bettschart R, Kuenzli N, Schindler C, u. a. Infectious diseases are associated with carotid intima media thickness in adolescence. *Atherosclerosis*. Dezember 2015;243(2):609–15.
- Drechsler M, Megens RTA, Zandvoort M van, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis Clinical Perspective. *Circulation*. 2. November 2010;122(18):1837–45.
- Durand E, Scoazec A, Lafont A, Boddaert J, Al Hajzen A, Addad F, u. a. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation*. 1. Juni 2004;109(21):2503–6.
- Eberhard J, Grote K, Luchtefeld M, Heuer W, Schuett H, Divchev D, u. a. Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single-subject interventional study. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e55265.
- Eckstein HH, Kühnl, A. A, Berkefeld, J. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der extracraniellen Carotisstenose. Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin - Gesellschaft für operative, endovaskuläre und präventive Gefäßmedizin e.V. (DGG); 2020.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 15. August 2011;27(16):2194–200.
- Elkind MSV, Luna JM, Moon YP, Boden-Albala B, Liu KM, Spitalnik S, u. a. Infectious Burden and Carotid Plaque Thickness: The Northern Manhattan Study. *Stroke*. 1. März 2010;41(3):e117–22.
- Engelmann MG, Redl CV, Pelisek J, Barz C, Heesemann J, Nikol S. Chronic perivascular inoculation with *Chlamydomydia pneumoniae* results in plaque formation in vivo. *Lab Invest*. Mai 2006;86(5):467–76.
- Epstein SE, Zhou YF, Zhu J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. *Circulation*. 27. Juli 1999;100(4):e20-28.

- Epstein SE, Zhu J. Lack of Association of Infectious Agents With Risk of Future Myocardial Infarction and Stroke: Definitive Evidence Disproving the Infection/Coronary Artery Disease Hypothesis? *Circulation*. 28. September 1999;100(13):1366–8.
- Epstein SE, Zhu J, Najafi AH, Burnett MS. Insights Into the Role of Infection in Atherogenesis and in Plaque Rupture. *Circulation*. 23. Juni 2009;119(24):3133–41.
- Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Di Bartolomeo R, Eggebrecht H, u. a. Corrigendum to: 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. *Eur Heart J*. 1. November 2015;36(41):2779.
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, u. a. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation*. 1. Januar 2002;105(1):15–21.
- European Stroke Organisation, Tendera M, Aboyans V, Bartelink M-L, Baumgartner I, Clément D, u. a. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: the Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. November 2011;32(22):2851–906.
- Faber A. Die Arteriosklerose; ihre pathologische Anatomie, ihre Pathogenese und Ätiologie. Fischer; 1912. 232 S.
- Fabricant CG, Fabricant J, Minick CR, Litrenta MM. Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens. *Fed Proc*. 15. Mai 1983;42(8):2476–9.
- Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, u. a. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*. 24. Februar 2014;2(1):6.
- Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, u. a. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. 1. April 1996;93(7):1354–63.
- Fernández-Britto JE, Bacallao J, Castillo JA, Campos R, Wong R, Guski H. Atherosclerosis in diabetes and hypertension. A comparative morphometric study of their progression using an atherometric system. *Zentralbl Pathol*. 1991;137(6):487–91.

- Filardo S, Di Pietro M, Farcomeni A, Schiavoni G, Sessa R. Chlamydia pneumoniae-Mediated Inflammation in Atherosclerosis: A Meta-Analysis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:378658.
- Filardo G, Powell JT, Martinez MA-M, Ballard DJ. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev.* 8. Februar 2015;(2):CD001835.
- Fontaine R, Kim M, Kieny R. Die Chirurgische Behandlung der peripheren Durchblutungsstörungen. *Helv Chir Acta.* 1954;(21):499–533.
- Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol.* Juni 2006;33(6):401–7.
- Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol.* Juni 2006;33(6):401–7.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol.* 15. April 2008;74(8):2461–70.
- Fu Q, Zhao M, Wang D, Hu H, Guo C, Chen W, u. a. Coronary Plaque Characterization Assessed by Optical Coherence Tomography and Plasma Trimethylamine-N-oxide Levels in Patients With Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 1. November 2016;118(9):1311–5.
- Futerman LG, Lemberg L. Fifty percent of patients with coronary artery disease do not have any of the conventional risk factors. *Am J Crit Care.* 5. Januar 1998;7(3):240–4.
- Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis.* April 2006;185(2):219–26.
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 10. Januar 2015;385(9963):117–71.

- Geerts CC, Evelein AMV, Bots ML, van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CSPM. Body fat distribution and early arterial changes in healthy 5-year-old children. *Ann Med.* Juni 2012;44(4):350–9.
- Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oktober 1997;17(10):2200–8.
- Geng Y-J, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by In Vitro Stimulation With Interferon- γ , Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-1 β . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1. Januar 1996;16(1):19–27.
- Georges JL, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Poirier O, Bickel C, Hafner G, u. a. Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines. *Am J Cardiol.* 1. September 2003;92(5):515–21.
- Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* Oktober 1999;10(5):417–28.
- Gianfagna F, Veronesi G, Tozzi M, Tarallo A, Borchini R, Ferrario MM, u. a. Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysms in the General Population and in Subgroups at High Cardiovascular Risk in Italy. Results of the RoCAV Population Based Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* Mai 2018;55(5):633–9.
- Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, Klinger M, Dalhoff K, Katus HA, u. a. Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation.* 23. Januar 2001;103(3):351–6.
- Giles DA, Moreno-Fernandez ME, Stankiewicz TE, Graspeuntner S, Cappelletti M, Wu D, u. a. Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat Med.* Juli 2017;23(7):829–38.
- Glassman AH, Shapiro PA. Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry.* Januar 1998;155(1):4–11.
- Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* August 1986;6(4):357–77.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. Januar 1979;76(1):333–7.

Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nat Rev Cardiol*. April 2019;16(4):225–42.

Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, u. a. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Februar 2017;36(2):329–36.

Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, u. a. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*. 11. Juni 1997;277(22):1775–81.

Graspeuntner S, Loeper N, Künzel S, Baines JF, Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci Rep*. 26. Juni 2018;8(1):1–7.

Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, u. a. Azithromycin for the Secondary Prevention of Coronary Events. *New England Journal of Medicine*. 21. April 2005;352(16):1637–45.

Greenhalgh RM, Belch JFF, Brown LC, Gaines PA, Gao L, Reise JA, u. a. The adjuvant benefit of angioplasty in patients with mild to moderate intermittent claudication (MIMIC) managed by supervised exercise, smoking cessation advice and best medical therapy: results from two randomised trials for stenotic femoropopliteal and aortoiliac arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Dezember 2008;36(6):680–8.

Guasti L, Dentali F, Castiglioni L, Maroni L, Marino F, Squizzato A, u. a. Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A systematic review on more than 34,000 subjects. *Thromb Haemost*. Oktober 2011;106(4):591–9.

Guirguis-Blake JM, Beil TL, Senger CA, Whitlock EP. Ultrasonography screening for abdominal aortic aneurysms: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 4. März 2014;160(5):321–9.

- Haque S, Bruce IN. Therapy insight: systemic lupus erythematosus as a risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. August 2005;2(8):423–30.
- Hennerici M, Daffertshofer M, Jakobs L. Failure to identify cerebral infarct mechanisms from topography of vascular territory lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*. Juli 1998;19(6):1067–74.
- Hepp W. Chronische femoropopliteale Verschlussprozesse. In: *Gefäßchirurgie*. 2. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag; 2007. S. 449–66.
- Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circulation Research*. 19. Februar 2016;118(4):535–46.
- Hill JE, Fernando WMU, Zello GA, Tyler RT, Dahl WJ, Kessel AGV. Improvement of the Representation of Bifidobacteria in Fecal Microbiota Metagenomic Libraries by Application of the cpn60 Universal Primer Cocktail. *Appl Environ Microbiol*. 1. Juli 2010;76(13):4550–2.
- Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IKS, Chan Q, u. a. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*. 15. Mai 2008;453(7193):396–400.
- Hovland A, Jonasson L, Garred P, Yndestad A, Aukrust P, Lappegård KT, u. a. The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. August 2015;241(2):480–94.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 13. Juni 2012;486(7402):207–14.
- Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*. Dezember 2008;23(12):2079–86.
- Jeong E, Kim K, Kim JH, Cha GS, Kim S-J, Kang HS, u. a. Porphyromonas gingivalis HSP60 peptides have distinct roles in the development of atherosclerosis. *Mol Immunol*. Februar 2015;63(2):489–96.

Jespersen CM, Als-Nielsen B, Damgaard M, Hansen JF, Hansen S, Helø OH, u. a. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease: CLARICOR trial. *BMJ*. 5. Januar 2006;332(7532):22.

Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg*. März 1991;13(3):452–8.

Jonas DE, Feltner C, Amick HR, Sheridan S, Zheng Z-J, Watford DJ, u. a. Screening for Asymptomatic Carotid Artery Stenosis: A Systematic Review and Meta-Analysis for the U.S. Preventive Services Task Force [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2014

Kalayoglu MV, Hoerneman B, LaVerda D, Morrison SG, Morrison RP, Byrne GI. Cellular Oxidation of Low-Density Lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1. September 1999;180(3):780–90.

Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, u. a. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*. 4. Dezember 2012;3:1245.

Karthikesalingam A, Holt PJ, Vidal-Diez A, Ozdemir BA, Poloniecki JD, Hinchliffe RJ, u. a. Mortality from ruptured abdominal aortic aneurysms: clinical lessons from a comparison of outcomes in England and the USA. *Lancet*. 15. März 2014;383(9921):963–9.

Kashyap SR, Ioachimescu AG, Gornik HL, Gopan T, Davidson MB, Makdissi A, u. a. Lipid-induced insulin resistance is associated with increased monocyte expression of scavenger receptor CD36 and internalization of oxidized LDL. *Obesity (Silver Spring)*. Dezember 2009;17(12):2142–8.

Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Morimoto M, Hayashida K, u. a. Oxidized LDL Modulates Bax/Bcl-2 Through the Lectinlike Ox-LDL Receptor-1 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1. Juni 2001;21(6):955–60.

- Kesavalu L, Lucas AR, Verma RK, Liu L, Dai E, Sampson E, u. a. Increased atherogenesis during *Streptococcus mutans* infection in ApoE-null mice. *J Dent Res.* März 2012;91(3):255–60.
- Khaleghi M, Isseh IN, Bailey KR, Kullo IJ. Family history as a risk factor for peripheral arterial disease. *Am J Cardiol.* 15. September 2014;114(6):928–32.
- Khan S, Rahman HNA, Okamoto T, Matsunaga T, Fujiwara Y, Sawa T, u. a. Promotion of atherosclerosis by *Helicobacter cinaedi* infection that involves macrophage-driven proinflammatory responses. *Sci Rep.* 2014;4:4680.
- Kim H-J, Cha GS, Kim H-J, Kwon E-Y, Lee J-Y, Choi J, u. a. *Porphyromonas gingivalis* accelerates atherosclerosis through oxidation of high-density lipoprotein. *J Periodontal Implant Sci.* Februar 2018;48(1):60–8.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, u. a. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 7. Januar 2013;41(1):e1.
- Kogel H. Gefäßchirurgische Aspekte zu Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßsystems. In: *Gefäßchirurgie.* 2. Aufl. Urban & Fischer Verlag; 2007. S. 3–10.
- Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* Februar 1999;103(4):571–7.
- Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 28. Juli 1998;98(4):300–7.
- Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, u. a. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *PNAS.* 15. März 2011;108(Supplement 1):4592–8.
- Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A. Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol.* November 1997;273(5 Pt 1):C1506-1515.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data

- on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol.* 1. September 2013;79(17):5112–20.
- Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, u. a. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* Mai 1995;24(3):308–15.
- Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, u. a. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation.* 14. September 1999;100(11):1154–60.
- Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, u. a. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environmental Health Perspectives.* 2005;113(2):201–6.
- Lane R, Ellis B, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev.* 18. Juli 2014;(7):CD000990.
- Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria Present in Carotid Arterial Plaques Are Found as Biofilm Deposits Which May Contribute to Enhanced Risk of Plaque Rupture. *mBio.* 1. Juli 2014;5(3):e01206-14-e01206-14.
- Lanter BB, Davies DG. Propionibacterium acnes Recovered from Atherosclerotic Human Carotid Arteries Undergoes Biofilm Dispersion and Releases Lipolytic and Proteolytic Enzymes in Response to Norepinephrine Challenge *In Vitro*. Camilli A, Herausgeber. *Infection and Immunity.* Oktober 2015;83(10):3960–71.
- Laschkolnig A, Kollerits B, Lamina C, Meisinger C, Rantner B, Stadler M, u. a. Lipoprotein (a) concentrations, apolipoprotein (a) phenotypes, and peripheral arterial disease in three independent cohorts. *Cardiovasc Res.* 1. Juli 2014;103(1):28–36.
- Lawall H, Huppert P, Rümenapf G. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin und Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2015.
- Layden J, Michaels J, Bermingham S, Higgins B, Guideline Development Group. Diagnosis and management of lower limb peripheral arterial disease: summary of NICE guidance. *BMJ.* 8. August 2012;345:e4947.

Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, u. a. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 9. Mai 2002;346(19):1437–44.

Lee E, Grodzinsky AJ, Libby P, Clinton SK, Lark MW, Lee RT. Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Dezember 1995;15(12):2284–9.

Lee RT, Libby P. The Unstable Atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1. Oktober 1997;17(10):1859–67.

Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P. Circumferential Stress and Matrix Metalloproteinase 1 in Human Coronary Atherosclerosis: Implications for Plaque Rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1. August 1996;16(8):1070–3.

Levy D, Wilson PW, Anderson KM, Castelli WP. Stratifying the patient at risk from coronary disease: new insights from the Framingham Heart Study. *Am Heart J*. März 1990;119(3 Pt 2):712–7; discussion 717.

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*. 14. Dezember 2002;360(9349):1903–13.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 21. Dezember 2006;444(7122):1022–3.

Li X-Y, Wang C, Xiang X-R, Chen F-C, Yang C-M, Wu J. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide increases lipid accumulation by affecting CD36 and ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Oncol Rep*. September 2013;30(3):1329–36.

Lieb W, Jansen H, Loley C, Pencina MJ, Nelson CP, Newton-Cheh C, u. a. Genetic predisposition to higher blood pressure increases coronary artery disease risk. *Hypertension*. Mai 2013;61(5):995–1001.

Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of Myocardial Damage and Inflammation in Relation to Long-Term Mortality in Unstable Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 19. Oktober 2000;343(16):1139–47.

- Lindskog Jonsson A, Hållén FF, Akrami R, Johansson E, Wester P, Arnerlöv C, u. a. Bacterial profile in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. August 2017;263:177–83.
- Liuba P, Persson J, Luoma J, Ylä-Herttuala S, Pesonen E. Acute infections in children are accompanied by oxidative modification of LDL and decrease of HDL cholesterol, and are followed by thickening of carotid intima-media. *Eur Heart J*. März 2003;24(6):515–21.
- Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, u. a. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 5. Oktober 2017;550(7674):61–6.
- Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circulation Research*. 1. Oktober 1992;71(4):850–8.
- Loree HM, Tobias BJ, Gibson LJ, Kamm RD, Small DM, Lee RT. Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1. Februar 1994;14(2):230–4.
- Lorkowski S, Cullen P. Atherosclerosis: Pathogenesis, Clinical Features and Treatment. In: John Wiley & Sons, Ltd, Herausgeber. *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2007
- Lu L, Mackay DF, Pell JP. Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. *Heart*. März 2014;100(5):414–23.
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One*. 2012;7(2):e30087.
- Lusis AJ. Genetic Factors in Cardiovascular Disease: 10 Questions. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1. November 2003;13(8):309–16.
- Madonna R, Salerni S, Schiavone D, Glatz JF, Geng Y-J, Caterin RD. Omega-3 fatty acids attenuate constitutive and insulin-induced CD36 expression through a suppression of PPAR α/γ activity in microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost*. September 2011;106(03):500–10.

- Matsushita K, Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, u. a. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*. 12. Juni 2010;375(9731):2073–81.
- Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, u. a. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation*. 30. März 1999;99(12):1560–6.
- McLaughlin RW, Vali H, Lau PCK, Palfree RGE, De Ciccio A, Sirois M, u. a. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J Clin Microbiol*. Dezember 2002;40(12):4771–5.
- Meijer CA, Stijnen T, Wasser MNJM, Hamming JF, van Bockel JH, Lindeman JHN, u. a. Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 17. Dezember 2013;159(12):815–23.
- Meves SH, Diehm C, Berger K, Pittrow D, Trampisch H-J, Burghaus I, u. a. Peripheral arterial disease as an independent predictor for excess stroke morbidity and mortality in primary-care patients: 5-year results of the getABI study. *Cerebrovasc Dis*. 2010;29(6):546–54.
- Minick CR, Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM. Atheroarteriosclerosis induced by infection with a herpesvirus. *Am J Pathol*. September 1979;96(3):673–706.
- Mitra S, Drautz-Moses DI, Alhede M, Maw MT, Liu Y, Purbojati RW, u. a. In silico analyses of metagenomes from human atherosclerotic plaque samples. *Microbiome*. 3. September 2015;3:38.
- Momiyama Y, Hirano R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Effects of interleukin-1 gene polymorphisms on the development of coronary artery disease associated with *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Am Coll Cardiol*. September 2001;38(3):712–7.
- Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, u. a. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13. April 2004;101(15):5634–9.

Montecucco F, Lenglet S, Gayet-Ageron A, Bertolotto M, Pelli G, Palombo D, u. a. Systemic and intraplaque mediators of inflammation are increased in patients symptomatic for ischemic stroke. *Stroke*. Juli 2010;41(7):1394–404.

Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. Oktober 2013;13(10):709–21.

Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. November 2006;27(21):2530–7.

Mougeot J-LC, Stevens CB, Paster BJ, Brennan MT, Lockhart PB, Mougeot FKB. *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. *J Oral Microbiol*. 2017;9(1):1281562.

Mustapha IZ, Debrey S, Oladubu M, Ugarte R. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. Dezember 2007;78(12):2289–302.

Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, u. a. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab*. 7. Mai 2013;17(5):695–708.

Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, u. a. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. August 1997;17(8):1517–20.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 17. April 1998;93(2):229–40.

Naiki Y, Sorrentino R, Wong MH, Michelsen KS, Shimada K, Chen S, u. a. TLR/MyD88 and LXRα Signaling Pathways Reciprocally Control Chlamydia Pneumoniae-Induced Acceleration of Atherosclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 15. November 2008;181(10):7176.

Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, u. a. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol*. September 2006;44(9):3313–7.

Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:477–515.

Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med.* Januar 1992;152(1):56–64.

Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol.* Mai 2001;39(5):1956–9.

Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet.* 16. August 2014;384(9943):626–35.

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, u. a. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* Januar 2007;45 Suppl S:S5-67.

Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 24. Juli 1997;337(4):230–6.

O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, Muhlestein JB, Yao L, Gupta S, u. a. Azithromycin for the Secondary Prevention of Coronary Heart Disease Events: The WIZARD Study: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 17. September 2003;290(11):1459–66.

Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, u. a. *vegan: Community Ecology Package.* 2019 [Tag des Zugriffs: 29. Oktober 2019]

Ott SJ, Mokhtari NEE, Musfeldt M, Hellmig S, Freitag S, Rehman A, u. a. Detection of Diverse Bacterial Signatures in Atherosclerotic Lesions of Patients With Coronary Heart Disease. *Circulation.* 21. Februar 2006;113(7):929–37.

Paffenbarger RS, Wing AL, Hyde RT. Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. *Am J Epidemiol.* September 1978;108(3):161–75.

Palmer SC, Hayen A, Macaskill P, Pellegrini F, Craig JC, Elder GJ, u. a. Serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and risks of death and cardiovascular disease in individuals with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 16. März 2011;305(11):1119–27.

- Pan S, Lei L, Chen S, Li H, Yan F. Rosiglitazone impedes *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis by downregulating the TLR/NF- κ B signaling pathway in atherosclerotic mice. *Int Immunopharmacol*. Dezember 2014;23(2):701–8.
- Park YM, Drazba JA, Vasanji A, Egelhoff T, Febbraio M, Silverstein RL. Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion. *Mol Biol Cell*. August 2012;23(16):3057–68.
- Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*. Oktober 1986;6(5):505–10.
- Perschinka H, Mayr M, Millonig G, Mayerl C, van der Zee R, Morrison SG, u. a. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1. Juni 2003;23(6):1060–5.
- Piper J, Orrild L. Essential familial hypercholesterolemia and xanthomatosis; follow-up study of twelve Danish families. *Am J Med*. Juli 1956;21(1):34–46.
- Potgieter M, Bester J, Kell DB, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev*. Juli 2015;39(4):567–91.
- Powell JT, Brady AR, Brown LC, Fowkes FGR, Greenhalgh RM, Ruckley CV, u. a. Long-term outcomes of immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 09 2002;346(19):1445–52.
- Prasad A, Zhu J, Halcox JPJ, Wacławski MA, Epstein SE, Quyyumi AA. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation*. 9. Juli 2002;106(2):184–90.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, u. a. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(21):7188–96.
- Pujades-Rodriguez M, George J, Shah AD, Rapsomaniki E, Denaxas S, West R, u. a. Heterogeneous associations between smoking and a wide range of initial presentations of cardiovascular disease in 1937360 people in England: lifetime risks and implications for risk prediction. *Int J Epidemiol*. Februar 2015;44(1):129–41.

- Qanitha A, de Mol BA, Pabittei DR, Mappangara I, van der Graaf Y, Dalmeijer GW, u. a. Infections in early life and premature acute coronary syndrome: A case-control study. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(15):1640–8.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* Mai 1987;84(9):2995–8.
- Rafferty B, Jönsson D, Kalachikov S, Demmer RT, Nowygrod R, Elkind MSV, u. a. Impact of monocytic cells on recovery of uncultivable bacteria from atherosclerotic lesions. *J Intern Med.* September 2011;270(3):273–80.
- Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, u. a. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Juli 1998;18(7):1188–96.
- Reszka E, Jegier B, Wasowicz W, Lelonek M, Banach M, Jaszewski R. Detection of infectious agents by polymerase chain reaction in human aortic wall. *Cardiovasc Pathol.* Oktober 2008;17(5):297–302.
- Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 21. Oktober 1989;2(8669):941–4.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Kundsinn R, Shih J. Baseline IgG antibody titers to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, herpes simplex virus, and cytomegalovirus and the risk for cardiovascular disease in women. *Ann Intern Med.* 19. Oktober 1999;131(8):573–7.
- Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, u. a. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 1. November 2011;58(19):2020–45.
- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med.* 12. August 1976;295(7):369–77.

- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 19. August 1976;295(8):420–5.
- Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. März 1977;86(3):675–84.
- Roth GA, Ankersmit HJ, Brown VB, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. Porphyromonas gingivalis infection and cell death in human aortic endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett*. Juli 2007;272(1):106–13.
- Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Rippin G, Hafner G, Prellwitz W, u. a. Impact of viral and bacterial infectious burden on long-term prognosis in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 3. Juli 2001;104(1):25–31.
- Saltykow S. Arteriosklerose bei Kaninchen nach wiederholten Staphylokokkeninjektionen. *Ziegler's Beitr*. 1908;(43):147.
- Sarwar N, Emerging Risk Factors Collaboration, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, u. a. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 26. Juni 2010;375(9733):2215–22.
- Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, u. a. Gut dysbiosis and detection of „live gut bacteria“ in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. August 2014;37(8):2343–50.
- Schellenberg J, Links MG, Hill JE, Dumonceaux TJ, Peters GA, Tyler S, u. a. Pyrosequencing of the Chaperonin-60 Universal Target as a Tool for Determining Microbial Community Composition. *Appl Environ Microbiol*. 1. Mai 2009;75(9):2889–98.
- Schertzer JD, Tamrakar AK, Magalhães JG, Pereira S, Bilan PJ, Fullerton MD, u. a. NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes*. September 2011;60(9):2206–15.
- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 3. Juli 2007;116(1):85–97.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, u. a. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Descri-

- bing and Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 1. Dezember 2009;75(23):7537–41.
- Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLOS ONE.* 14. Dezember 2011;6(12):e27310.
- Senthong V, Wang Z, Fan Y, Wu Y, Hazen SL, Tang WHW. Trimethylamine N-Oxide and Mortality Risk in Patients With Peripheral Artery Disease. *J Am Heart Assoc.* 19. Oktober 2016;5(10).
- Serra e Silva Filho W, Casarin RCV, Nicoleta EL, Passos HM, Sallum AW, Gonçalves RB. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e109761.
- Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, u. a. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.* 15. September 1995;92(6):1565–9.
- Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol.* April 1986;123(1):109–25.
- Slade GD, Ghezzi EM, Heiss G, Beck JD, Riche E, Offenbacher S. Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Arch Intern Med.* 26. Mai 2003;163(10):1172–9.
- Smieja M, Mahony J, Petrich A, Boman J, Chernesky M. Association of circulating *Chlamydia pneumoniae* DNA with cardiovascular disease: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 1. Oktober 2002;2:21.
- Snow DE, Everett J, Mayer G, Cox SB, Miller B, Rumbaugh K, u. a. The presence of bio-film structures in atherosclerotic plaques of arteries from legs amputated as a complication of diabetic foot ulcers. *J Wound Care.* Februar 2016;25(2):S16-22.
- Soden PA, Zettervall SL, Ultee KHJ, Darling JD, Buck DB, Hile CN, u. a. Outcomes for symptomatic abdominal aortic aneurysms in the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program. *J Vasc Surg.* August 2016;64(2):297–305.

- Stassen FR, Vainas T, Bruggeman CA. Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep*. Februar 2008;60(1):85–92.
- Steg PG, Bhatt DL, Wilson PWF, D’Agostino R, Ohman EM, Röther J, u. a. One-Year Cardiovascular Event Rates in Outpatients With Atherothrombosis. *JAMA*. 21. März 2007;297(11):1197–206.
- Steinberg D. In celebration of the 100th anniversary of the lipid hypothesis of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 1. November 2013;54(11):2946–9.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. *New England Journal of Medicine*. 6. April 1989;320(14):915–24.
- 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 USA*. 25. April 1995;92(9):3893–7.
- Sun C, Burgner DP, Ponsonby A-L, Saffery R, Huang R-C, Vuillermin PJ, u. a. Effects of early-life environment and epigenetics on cardiovascular disease risk in children: highlighting the role of twin studies. *Pediatr Res*. April 2013;73(4 Pt 2):523–30.
- Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis*. Dezember 2016;109(12):708–15.
- Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, u. a. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 25. April 2013;368(17):1575–84.
- Team RC. R: A language and environment for statistical computing. 2013 (Tag des Zugriffs: 15.03.2021)
- Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med*. 9. März 1995;332(10):635–41.
- Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by

steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17. September 1996;93(19):10417–22.

Torzewski M. Enzymatically modified LDL, atherosclerosis and beyond: paving the way to acceptance. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 1. Januar 2018;23:1257–71.

Tsantilas P, Kühnl A, Kallmayer M, Knappich C, Schmid S, Kuetchou A, u. a. Stroke risk in the early period after carotid related symptoms: a systematic review. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. Dezember 2015;56(6):845–52.

Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med*. Mai 2014;70:117–28.

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Tigges AJ, Das PK. Fibrous and lipid-rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation: a concept. *Coron Artery Dis*. Juni 1994;5(6):463–9.

van Kuijk J-P, Flu W-J, Chonchol M, Bax JJ, Verhagen HJM, Poldermans D. Metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular events in high-risk patients with occlusive and aneurysmatic peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 1. Juni 2010;210(2):596–601.

Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. April 2012;32(4):887–93.

Virani SS, Nambi V, Hoogeveen R, Wasserman BA, Coresh J, Gonzalez F, u. a. Relationship between circulating levels of RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed, and secreted) and carotid plaque characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *Eur Heart J*. Februar 2011;32(4):459–68.

Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Meidinger; 1856. 1070 S.

Vliegenhart I, Hengstenberg SB, Gohlke GELM, Bruggeman CA, Stassen FRM. Mouse cytomegalovirus antigenic immune stimulation is sufficient to aggravate atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*. Juli 2005;181(1):39–44.

Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, u. a. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis

for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 17. Oktober 2020;396(10258):1204–22.

Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, u. a. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 17. Oktober 2020;396(10258):1204–22.

Wan M, Liu JR, Wu D, Chi XP, Ouyang XY. E-selectin expression induced by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells via nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and Toll-like receptors. *Mol Oral Microbiol*. Oktober 2015;30(5):399–410.

Wang J-G, Aikawa M. Toll-like receptors and Src-family kinases in atherosclerosis -- focus on macrophages. *Circ J*. 2015;79(11):2332–4.

Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, u. a. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 7. April 2011;472(7341):57–63.

Wanhainen A, Rasmussen M, Björck L, Björck M. Immune-response against *Streptococcus pyogenes* in the development of abdominal aortic aneurysm--a population-based case-control study. *Vasa*. Mai 2008;37(2):143–9.

Wick G, Jakic B, Buszko M, Wick MC, Grundtman C. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. September 2014;11(9):516–29.

Winek K, Engel O, Koduah P, Heimesaat MM, Fischer A, Bereswill S, u. a. Depletion of Cultivable Gut Microbiota by Broad-Spectrum Antibiotic Pretreatment Worsens Outcome After Murine Stroke. *Stroke*. 1. Mai 2016;47(5):1354–63.

Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. Dezember 1991;88(6):1785–92.

Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, u. a. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol*. Juli 2010;61(1):69–78.

Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, u. a. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 30. Januar 1993;341(8840):255–9.

- Yan P, Xia C, Duan C, Li S, Mei Z. Biological Characteristics of Foam Cell Formation in Smooth Muscle Cells Derived from Bone Marrow Stem Cells. *Int J Biol Sci*. 5. August 2011;7(7):937–46.
- Yang B, Wang Y, Qian P-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 22. März 2016
- Yang J, Wu J, Liu Y, Huang J, Lu Z, Xie L, u. a. Porphyromonas gingivalis infection reduces regulatory T cells in infected atherosclerosis patients. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86599.
- Yumoto H, Chou H-H, Takahashi Y, Davey M, Gibson FC, Genco CA. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infect Immun*. Dezember 2005;73(12):8050–9.
- Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T, Du Y, Oguchi S, Yamamoto M. Aggregatibacter actinomycetemcomitans accelerates atherosclerosis with an increase in atherogenic factors in spontaneously hyperlipidemic mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1. Juli 2010;59(2):143–51.
- Zhu J, Nieto FJ, Horne BD, Anderson JL, Muhlestein JB, Epstein SE. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation*. 2. Januar 2001;103(1):45–51.
- Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Epstein SE. Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation as reflected by elevated C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol*. 15. November 1999;34(6):1738–43.
- Zhu J, Shearer GM, Norman JE, Pinto LA, Marincola FM, Prasad A, u. a. Host response to cytomegalovirus infection as a determinant of susceptibility to coronary artery disease: sex-based differences in inflammation and type of immune response. *Circulation*. 14. November 2000;102(20):2491–6.
- Zhu J, Katz RJ, Quyyumi AA, Canos DA, Rott D, Csako G, u. a. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels: suggestion of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis. *Circulation*. 6. Januar 2004;109(1):36–41.
- Zhu J, Quyyumi AA, Muhlestein JB, Nieto FJ, Horne BD, Zalles-Ganley A, u. a. Lack of association of Helicobacter pylori infection with coronary artery disease and frequency of

acute myocardial infarction or death. American Journal of Cardiology. 15. Januar 2002;89(2):155–8.

Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Wacławski MA, Shearer GM, u. a. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. American Journal of Cardiology. 15. Januar 2000;85(2):140–6.

Ziganshina EE, Sharifullina DM, Lozhkin AP, Khayrullin RN, Ignatyev IM, Ziganshin AM. Bacterial Communities Associated with Atherosclerotic Plaques from Russian Individuals with Atherosclerosis. PLoS ONE. 2016;11(10):e0164836.

http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/. (Tag des Zugriffs: 07.05.2021)

VII. ANHANG

VII.1. Positives Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. Kleemann
Klinik für Chirurgie

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Keck
Direktor der Klinik für Chirurgie

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-174

Datum: 13. Juli 2017

Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Juli 2017

Antragsteller: Herr Prof. Kleemann

Titel: Mikrobiologische Untersuchung an gefäßchirurgisch entnommenen Gefäßzyklindern nach Thrombendarteriektomie bei Patienten mit Carotisstenose, infrarenalem Bauchaaortenaneurysma oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

Sehr geehrter Herr Prof. Kleemann,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.
Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.
Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.clinicaltrials.gov).
Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

☒ Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
☒ Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
Hr. Prof. Habermann (Chirurgie, Biobank)
Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
☒ Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
☒ Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
☒ Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

☒ Frau Martini (Caritas)
☒ Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
☒ Herr Prof. Obleser (Psychologie)
Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
☒ Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)
☒ Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
☒ Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)

VII.2. Optimiertes Extraktionsprotokoll

Extraktion ohne Benzonase

30 Cyclen Programm Illumina

QIAamp DN Mikrobiome Kit

Alle Reagenzien auf RT

Säulen aus Kühlschrank

AHL aus -20°C

Heizblöcke auf 37°C 56°C 70°C
mit Schüttelfunktion

AW1 und AW2 + EOH konz.

eventuelle Prezipitate in ATL oder APL2 in 56°C lösen

Vor Gebrauch 100 µl DX zu 15ml ATL

6 Monate bei RT haltbar

1ml Probe 600 µl	500µl AHL 300µl	30 min. RT end over end rotaion
		10 min 10.000 rcf
		Überstand verwerfen
		Pellet
		+190 µl RDD ohne Benz.
		30 min 37°C
	20µl Prot.K	30 min 56°C
		kurz langsam zentrifugieren, um alles vom Deckel zu lösen
		Überstand nicht verwerfen!
	200 µl ATL mit DX	mixen und in Lysistube
		10 min auf Kreisschüttler mit maximaler Geschwindigkeit
		1 min 10.000 rcf zentrifugieren
	Überstand	in neuem Eppi mit 40µl Prot. Vortex
		30 min. 56°C 600rpm
	200 µl APL2	Puls vortex 30 sec
		10 min. 70°C 600rpm
		kurz zentrifugieren
	Lysat +	200 µl EOH Puls vortex 15-30 sec
		Gemisch auf die Säule geben
		1 min. bei 6000 rcf zentrifugieren
		flowthrough verwerfen
	Säule + 500 µl AW1	1 min. bei 6000 rcf zentrifugieren
	Säule + 500 µl AW2	bei 20.000 rcf 3 min zentrifugieren
		flowthrough verwerfen
		Säule bei 20.000 rcf 1 min zentrifugieren
	Säule auf 1,5 ml Eppi setzen	mit 50µl AVE Puffer
		5 min. bei RT ruhen lassen
		1 min. bei 6000 rcf zentrifugieren

VII.3. Primertabelle

V3/V4 - Hetero-Primer für PCR

Nr.	Oligo Name	Sequenz 5' – 3'	P5/P7	Index	Reverse Complement
1	hV3F_MID1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ATCGTACG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	ATCGTACG	
2	hV3F_MID2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACTATCTG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT T CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	ACTATCTG	
3	hV3F_MID3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TAGCGAGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GT CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	TAGCGAGT	
4	hV3F_MID4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CTGCGTGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	CTGCGTGT	
5	hV3F_MID5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCATCGAG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT ATGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	TCATCGAG	
6	hV3F_MID6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTGAGTG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGGCA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	CGTGAGTG	
7	hV3F_MID7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GGATATCT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GAGTGG CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	GGATATCT	
8	hV3F_MID8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GACACCGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	GACACCGT	
9	hV3F_MID9	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CTACTATA ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT T CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	CTACTATA	
10	hV3F_MID10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTTACTA ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GT CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	CGTTACTA	
11	hV3F_MID11	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC AGAGTCAC ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	AGAGTCAC	
12	hV3F_MID12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TACGAGAC ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT ATGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	TACGAGAC	
13	hV3F_MID13	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACGTCTCG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGGCA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	ACGTCTCG	
14	hV3F_MID14	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCGACGAG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GAGTGG CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	TCGACGAG	
15	hV3F_MID15	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GATCGTGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	GATCGTGT	
16	hV3F_MID16	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GTACAGATA ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT T CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	GTACAGATA	
17	hV3F_MID17	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACGACGTG	i5	ACGACGTG	
18	hV3F_MID18	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GT CCTACGGGAGGCAGCAG AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTCGCTA ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	CGTCGCTA	
19	hV3F_MID19	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GCTCTAGT ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT ATGA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	GCTCTAGT	
20	hV3F_MID20	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TGGGTACG ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGGCA CCTACGGGAGGCAGCAG	i5	TGGGTACG	
1	hV4R_MID_A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AACTCTCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7	CGAGAGTT	
2	hV4R_MID_B	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ACTATGTC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT A GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		GACATAGT
3	hV4R_MID_C	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGTAGCGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TC GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		ACGCTACT
4	hV4R_MID_D	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CAGTGAGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CTA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		ACTCACTG
5	hV4R_MID_E	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTACTCA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GATA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TGAGTACG
6	hV4R_MID_F	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTACGCAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTCA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		CTGCGTAG
7	hV4R_MID_G	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGAGACTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TTCTCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TAGTCTCC
8	hV4R_MID_H	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGCTCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		CGAGCGAC
9	hV4R_MID_I	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGTAGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT A GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		ACTACGAC
10	hV4R_MID_J	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGCAGAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TC GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		GTCTGCTA
11	hV4R_MID_K	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCATAGAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CTA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		GTCTATGA
12	hV4R_MID_L	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTATA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GATA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TATAGCGA
13	hV4R_MID_M	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AAGTCGAG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTCA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		CTCGACTT
14	hV4R_MID_N	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATACTTCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TTCTCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		CGAAGTAT
15	hV4R_MID_O	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CATAGAGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TCTCTATG
16	hV4R_MID_P	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTAGATC	i7		GATCTACG
17	hV4R_MID_Q	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT A GGACTACHVGGGTWTCTAAT CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGCACGT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TC GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		ACGTGCGC
18	hV4R_MID_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGTACTAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT CTA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		ATAGTACC
19	hV4R_MID_S	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACGAGCA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GATA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TGCTCGTA
20	hV4R_MID_T	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCAGCGTT GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT ACTCA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		AACGCTGA
21	hV4R_MID_U	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGCTGCTA GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TTCTCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		TAGCAGCT
22	hV4R_MID_V	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTCGTTAC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		GTAACGAG
23	hV4R_MID_W	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTATACGC GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT A GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		GCGTATAC
24	hV4R_MID_X	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTACG GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TC GGACTACHVGGGTWTCTAAT	i7		CGTAGCGA

VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Analyse der bakteriellen Besiedlung arteriosklerotischer Läsionen bei Carotisstenose, abdominellem Aortenaneurysma oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer anderen Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorbestehenden Erklärung bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Lena Alexandra Strobel

Lübeck, den 22.09.2021

IX. DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Im Besonderen gilt mein Dank den folgenden Personen:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Kleemann danke ich für die Überlassung des Themas, der eine immer zu herzliche sowie stets sehr lehrreiche Zusammenarbeit mit regelmäßigem, konstruktivem Austausch und Unterstützung in jeglichen Belangen gefolgt ist. Auch dem gefäßchirurgischen Team des UKSH Lübeck gilt aufgrund ihres Einsatzes bei der Patientenrekrutierung und für die Entnahme der TEA-Zylinder mein Dank.

Herrn Prof. Dr. Jan Rupp möchte ich herzlich für die gelungene Kooperation sowie die Bereitstellung der Ressourcen danken. Neben Anke Hellberg, die mich gekonnt an das experimentelle Arbeiten herangeführt hat und mir bei der Aufarbeitung der Proben mit Rat und Tat zur Seite stand, möchte ich allen voran auch Dr. Simon Graspeuntner danken, der mich mit seinem wissenschaftlichen Know-How in vielerlei Hinsicht jenseits aller Erwartungen in allen Stadien dieser Arbeit unterstützt hat.

Auch Herrn Prof. Dr. Dr. Jens Habermann sowie allen Mitarbeitern des ICB-L möchte ich für die gelungene Kooperation und die herzliche Zusammenarbeit bei der Einlagerung und Auslieferung der Proben danken.

Nicht zuletzt gilt auch all den Patienten mein Dank, die sich bereit erklärt haben in dieser Studie mitzuwirken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die stetige, konstruktive Begleitung, ohne die diese Arbeit sicherlich nur schwerlich gelungen wäre.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, von ganzem Herzen für ihre immerwährende, grenzenlose Unterstützung, die mir diesen Weg erst bereitet hat und ohne die ich meine Ziele in dieser Form nicht hätte verwirklichen können.