

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinik der Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg**

**Die Rolle eosinophiler Granulozyten in der  
Entstehung atherosklerotischer Plaques –  
am Mausmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Danby Salbeck

aus Landshut

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Steffen Massberg
Mitberichterstatter:	Freiherr apl. Prof. Dr. Clemens von Schacky auf Schönfeld  Prof. Dr. rer. nat. Sabine Steffens
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof Dr. med. Konstantin Stark
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2022

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Atherosklerose.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Makroskopische Entwicklung.....	1
1.1.2	Entzündliche Prozesse .....	3
1.2	<b>Eosinophile.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Hämatologische Einordnung.....	4
1.2.2	Entwicklung der Eosinophilen.....	6
1.2.3	Physiologie und Pathophysiologie der Granulozyten.....	7
1.2.4	Eosinophile in Inflammation und Atherosklerose .....	9
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
3.1	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Mauslinien .....	12
3.1.1.1	$\Delta$ dbIGATA1 .....	12
3.1.1.2	ApoE <sup>-/-</sup> .....	12
3.1.1.3	ApoE <sup>-/-</sup> x $\Delta$ dbIGATA1.....	13
3.1.2	Haltung .....	13
3.1.3	Organentnahme und Fixierung .....	14
3.2	<b>Histopathologische Untersuchungen .....</b>	<b>15</b>
3.2.1	<i>En Face</i> Sudan-III-Färbung zur Quantifizierung atherosklerotischer Plaques in der Aorta.....	15
3.2.2	Anfertigung histologischer Schnitte.....	15
3.2.3	Oil-Red-O-Färbung zur Quantifizierung atherosklerotischer Plaques auf Ebene der Aortenklappe .....	16
3.2.4	Immunfluoreszenzfärbung .....	17
3.2.4.1	MPO-Färbung.....	17
3.2.4.2	LGAL-S3+ACTA-2-Doppelfärbung .....	18
3.2.4.3	Siglec-F-, vWF- und CCL11-Färbung .....	19
3.2.5	Auswertung.....	20

**Inhaltverzeichnis**

3.2.5.1	Relative Fläche der atherosklerotischen Plaques.....	20
3.2.5.1.1	En face Analyse der Aorta.....	20
3.2.5.1.2	Aortensinus.....	21
3.2.5.2	Auswertung der Immunhistologie .....	22
3.2.5.2.1	Relative Fläche an Neutrophilen, Makrophagen und glatter Muskulatur.....	22
<b>3.3</b>	<b>Blutanalyse.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>ELISA. ....</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Verminderung der Atherosklerose in Eosinophilen-defizienten Tieren.....</b>	<b>25</b>
4.1.1	Atherosklerotische Läsionsgröße in der Aorta .....	25
4.1.2	Zelluläre Analyse der atherosklerotischen Plaques .....	28
4.1.2.1	Verminderte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in Eosinophilen-defizienten Tieren.....	28
4.1.2.2	Verminderte Makrophageneinwanderung und glatte Muskelzellen in Eosinophilen-defizienten Tieren.....	29
4.1.3	Analyse des Körpergewichtes und des peripheren Blutes.....	32
4.1.4	Bedeutung des von-Willebrand-Faktors.....	33
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der Ernährung auf Eosinophile stimulierende Zytokine... ..</b>	<b>34</b>
4.2.1	Erhöhung der Eotaxin-1-Plasmakonzentration bei fettreicher Ernährung.....	34
4.2.2	Interleukin-5.....	35
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion der Versuchstiere.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
5.2.1	Eosinophile Granulozyten tragen zur Bildung atherosklerotischer Plaques bei.....	39
5.2.2	Analyse der atherosklerotischen Plaques – weniger inflammatorische Zellen ohne Eosinophile .....	40

**Inhaltverzeichnis**

---

5.2.3	Endotheliale Aktivierung durch Eosinophile verstärkt die Thrombozytenadhäsion in Atherosklerose .....	42
5.2.4	Erhöhung der Eotaxin-1 Expression durch fettreiche Ernährung .....	43
<b>5.3</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>62</b>
<b>12.</b>	<b>Eidesstaatliche Versicherung .....</b>	<b>63</b>

## **1. Einleitung**

Laut statistischen Bundesamtes verstarben 2018 in Deutschland 345.274 Menschen an Herz-/Kreislaufkrankungen (1). Zwar ist dieser Wert im Laufe der Jahre aufgrund der stetig besser werdenden Gesundheitsversorgung gesunken, dennoch waren ischämische Herzkrankheiten und Schlaganfälle im Jahr 2015 weltweit für nahezu 18 Millionen Todesfälle verantwortlich (2). Kardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen, sind weiterhin die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen und werden es aller Wahrscheinlichkeit nach auch in den nächsten Jahren bleiben (3–5). Aus diesem Grund ist der Bedarf an neuen therapeutischen Ansatzpunkten auf diesem Gebiet nach wie vor hoch.

Es wurde jedoch bereits in den 1990er Jahren erkannt, dass es sich bei der Atherosklerose um eine komplexe Erkrankung handelt, bei der entzündliche Prozesse eine wesentliche ätiologische Rolle spielen (6). Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Atherosklerose sind jedoch trotz Jahrzehnten intensiver Forschung nach wie vor nicht vollständig geklärt.

### **1.1 Atherosklerose**

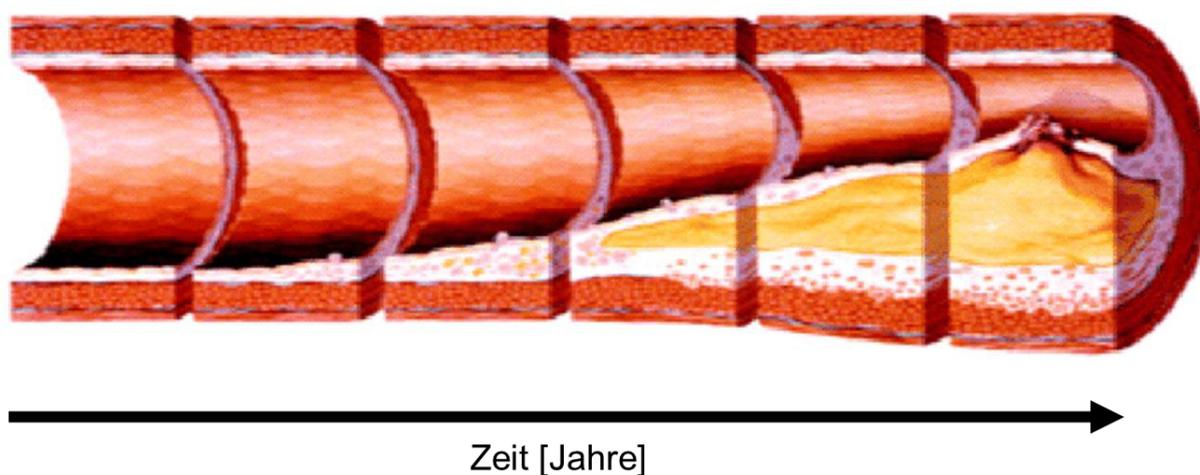
#### **1.1.1 Makroskopische Entwicklung**

Unter Atherosklerose versteht man einen pathologischen Prozess, bei dem sich in der Arterienwand Läsionen entwickeln, die im Laufe von Jahren das Lumen des Gefäßes bis zu einer vollkommenen Blockade reduzieren können. Diese Läsionen werden atherosklerotische Plaques genannt (Abbildung 1). In frühen Stadien finden sich in den Plaques unter dem Endothel hauptsächlich durch Fetteinlagerungen aufgetriebene Makrophagen, die Schaumzellen genannt werden. Solche frühen Läsionen können bei Menschen in den großen Gefäßen wie dem Aortenbogen bereits im ersten Lebensjahrzehnt nachgewiesen werden. Durch physikalische Unterschiede in der Dynamik des Blutflusses sind manche Stellen, wie der Aortenbogen besonders anfällig für solche Fetteinlagerungen. (5). Hohe Plasmakonzentrationen von Low Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin sind ein

## Einleitung

Risikofaktor für die Entwicklung dieser Plaques während erhöhte High Density-Lipoprotein (HDL)-Cholesterol-Serumspiegel protektiv wirken (7).

### Zeitlicher Verlauf der Atherosklerose



**Abbildung 1: Im Verlauf von mehreren Jahren kann eine atherosklerotische Plaque das arterielle Lumen vollständig blockieren**  
Modifiziert nach (8)

Hohe LDL-Cholesterol-Serumspiegel sind ein wesentlicher pathogenetischer Risikofaktor, sie können jedoch medikamentös z.B. mit Statinen kontrolliert werden. Unter guter Kontrolle lässt sich das Risiko von schweren kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Apoplex um deutlich reduzieren. (9).

Jedoch spielen auch andere Pathomechanismen eine ätiologische Rolle. Bereits frühzeitig wurde erkannt, dass in atherosklerotischen Plaques entzündliche Prozesse stattfinden (6,10). In Mausmodellen entstammen die ersten inflammatorischen Zellen, die in den Plaques nachweisbar sind, Monozyten, die sich erst am Endothel anlagern und anschließend extravasieren. Unter dem Endothel differenzieren sie zu Makrophagen, die Lipide aufnehmen und sich so zu Schaumzellen umbilden. Die Schaumzellen in der Mitte der Läsion sterben im Laufe der Zeit ab, wodurch sich ein nekrotisches Zentrum bildet. Zudem wird zunehmend extrazelluläre Matrix gebildet, wodurch sich die Fetteinlagerung allmählich fibrotisch umbaut. Das nekrotische Gewebe in den Plaques, das besonders bei koronaren Plaques häufig ist und bei

## Einleitung

---

peripheren Plaques weniger in Erscheinung tritt, kann die Plaques instabil und Ruptur-anfällig machen (11). Instabile Plaques sind durch eine bindegewebige Kappe und einen großen nekrotischen Kern charakterisiert. Durch die Kräfte, die auf die Arterienwand wirken, bilden sich am Rand der Läsion oft Risse aus, in denen sich vermehrt Leukozyten finden. Letztendlich können die Plaques aufbrechen und Teile davon stromab transportiert werden, wo sie ein Gefäß blockieren können und dadurch einen thromboembolischen Ereignis verursachen können. Es wird geschätzt, dass rupturierte Plaques bis zu 70 % aller Myokardinfarkte auslösen (12).

### 1.1.2 Entzündliche Prozesse

Die Schaumzellen produzieren eine Reihe von Zytokinen, die auf weitere Monozyten und zudem auf Lymphozyten chemotaktisch wirken. Die Endothelzellen in der Läsion produzieren ebenfalls chemotaktisch wirkende Faktoren wie macrophage-colony stimulation factor (M-CSF), der auch unter dem Namen colony-stimulating factor -1 (CSF-1) bekannt ist und Adhäsionsmoleküle wie intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular adhesion molecule (VCAM)-1 und platelet endothelial adhesion molecule (PECAM)-1, sowie P- und E-Selectin, die es verschiedenen Leukozyten erlauben, an das Endothel zu adhären und aus dem Blutgefäß in die Läsion zu extravasieren (5). Chemokine wie chemokine receptor (CCR)3, CCR5, chemokine ligand (CCL)2 und (CX3CL1)-CX3C-chemokine receptor 1(CX3CR1) spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten in die Läsion (13).

Die Bildung von Schaumzellen und damit der Beginn der Läsion schafft also einen positiven Feedbackloop, der das Einwandern weiterer immunologisch aktiver Zellen erleichtert (7). Obwohl Neutrophile die zahlenmäßig häufigsten Leukozyten darstellen, war bis vor wenigen Jahren nicht bekannt, dass sie zur Ätiologie der Atherosklerose wesentlich beitragen (5,7,10). Inzwischen konnte jedoch in Mausmodellen gezeigt, dass ein Funktionsverlust von bestimmten Neutrophilenfunktionen durch Knockout verschiedenen Proteine neutrophiler Granula zu einer Verminderung der Atherosklerose führt (7).

Dendritische Zellen (DC) erlauben möglicherweise die Aktivierung von B- und T-Zellen, die sich durch entsprechende Signale von DC in Effektorzellen differenzieren können. Dadurch nehmen die DC in der atherosklerotischen Plaque eine Stelle

## Einleitung

---

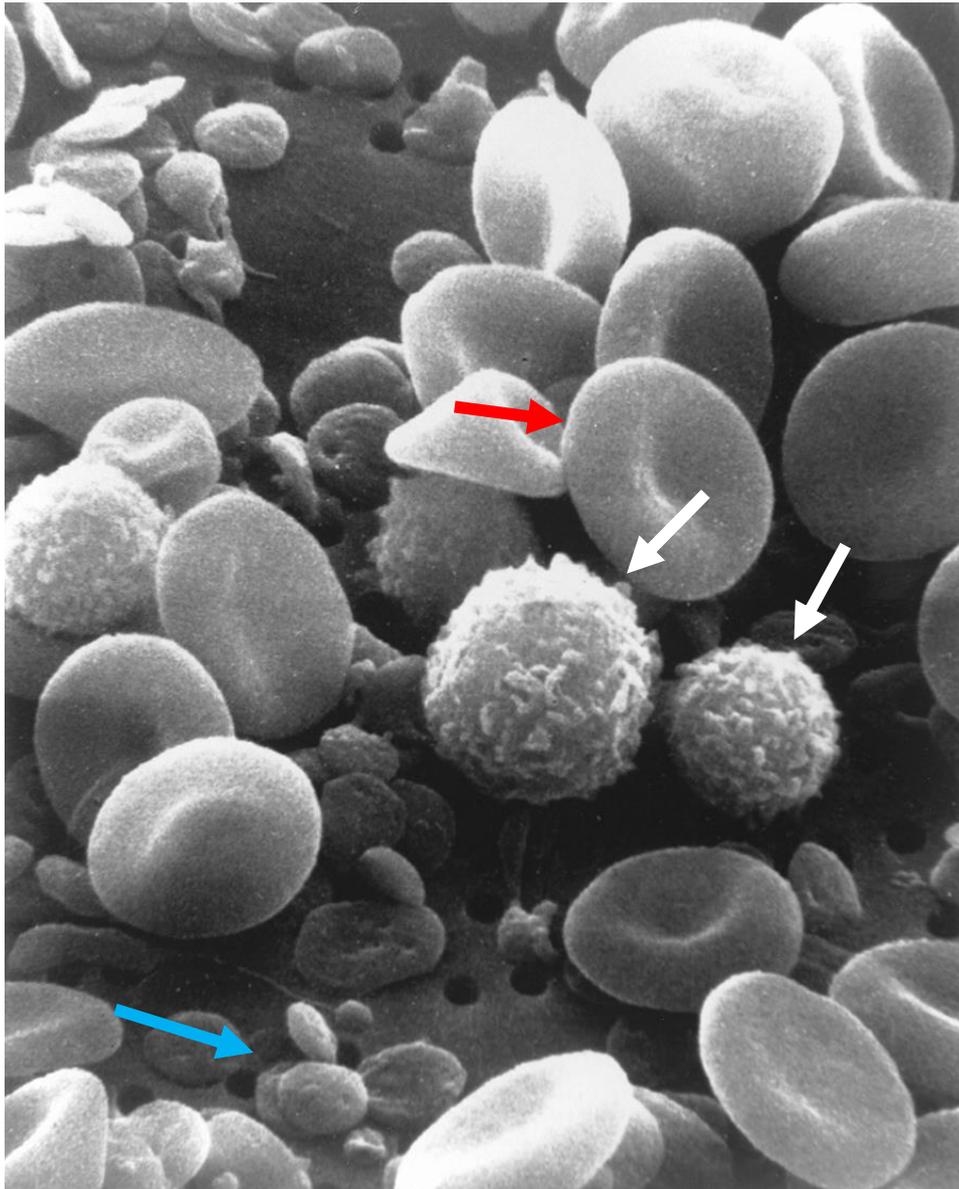
zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ein und verbinden diese beiden komplementären Teile des Immunsystems (13).

### 1.2 Eosinophile

#### 1.2.1 Hämatologische Einordnung

Blut von Säugetieren und damit des Menschen enthält neben dem Plasma zelluläre Bestandteile oder Zellfragmente, die aufgrund ihres Aussehens zunächst in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten aufgeteilt werden (Abbildung 2). Die ersten beiden Gruppen enthalten ganze Zellen, während es sich bei den Thrombozyten um Zellfragmente handelt. Die Gruppe der Leukozyten umfasst Lymphozyten (Abbildung 2, rechter weißer Pfeil) mit einem großen runden Nukleus und relativ kleinen, im Lichtmikroskop homogen erscheinenden Plasmaring. Unter ihnen unterscheidet man B- und T-Lymphozyten, oft auch einfach B- oder T-Zellen genannt. Die übrigen Leukozyten enthalten als größte Leukozytenpopulation die Monozyten (Abbildung 2, linker weißer Pfeil) und die Granulozyten, die sich durch ein im Lichtmikroskop granulär erscheinendes Zytoplasma auszeichnen. (14)

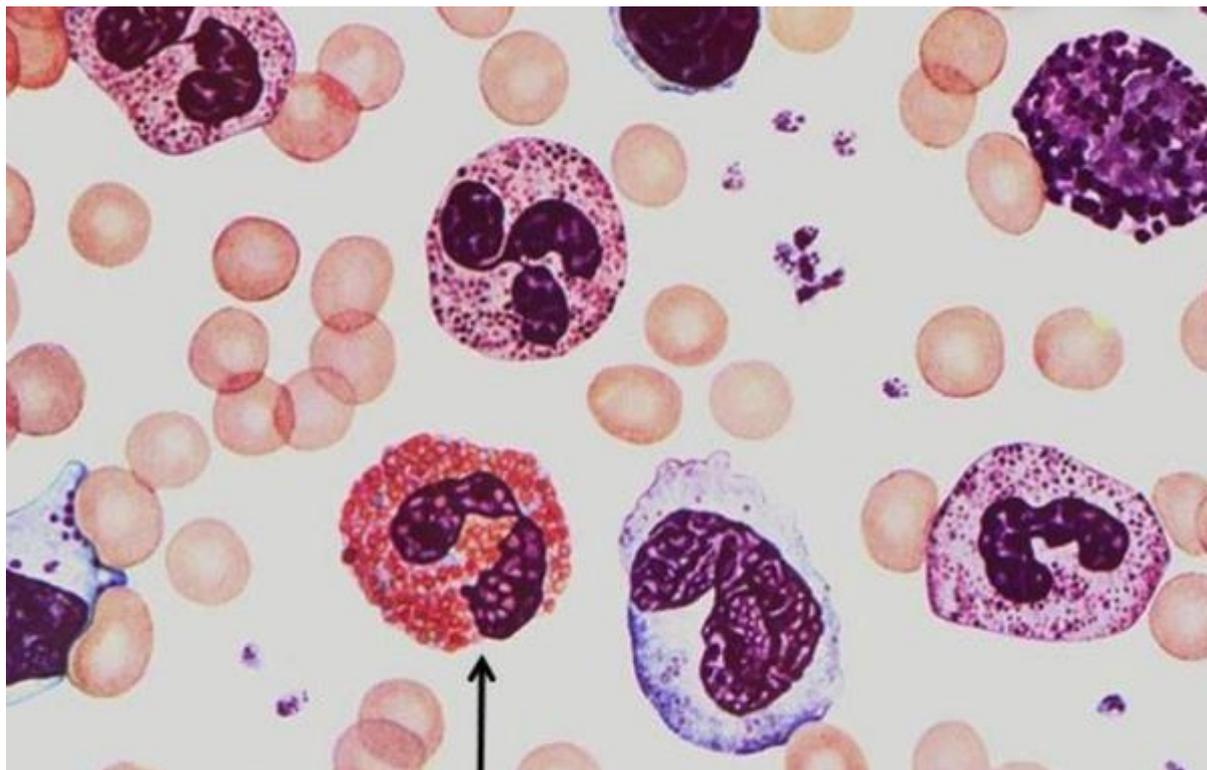
Die Granulozyten wiederum umfassen vier verschiedene Zellarten, nämlich Mastzellen, sowie basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten, die gemeinsam zuweilen wegen ihrer unregelmäßig geformten Zellkerne auch als Polymorphkernige bezeichnet werden (Abbildung 3). Die Differenzierung der ungefärbt identisch erscheinenden basophilen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten gelang Ende des 19. Jahrhunderts erstmals Paul Ehrlich, der mit verschiedenen Anilinfarben experimentierte. Er konnte dabei zeigen dass 3 verschiedene Sorten von Granulozyten existieren, die sich entweder mit basischen Farbstoffen färben lassen und daher Basophile genannte werden, mit sauren Farbstoffen wie beispielsweise Eosin (Eosinophile) oder die sich nur sehr schlecht anfärben lassen und Ehrlich als Neutrophile bezeichnete (15). Eosinophile machen dabei ca. 1-3 % aller peripheren Blutleukozyten aus und sind damit relativ selten (16).



**Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen in menschlichem Blut.**

**Roter Pfeil: Erythrozyt, weiße Pfeile: verschiedene Leukozyten, Blauer Pfeil, Thrombozyten**

Modifiziert nach (14)



**Abbildung 3: gezeichnete Darstellung eines blutausstrich mit verschiedenen Leukozyten**

**Schwarzer Pfeil: eosinophiler Granulozyt**

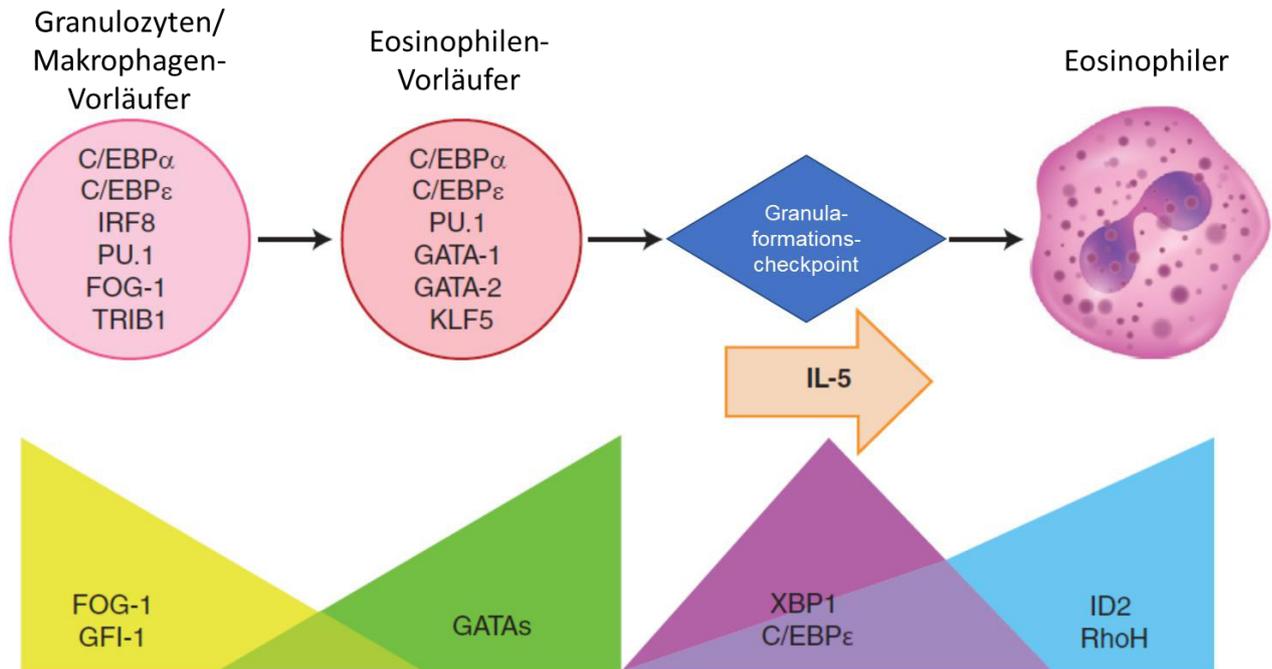
Modifiziert nach (17)

### 1.2.2 Entwicklung der Eosinophilen

Eosinophile entwickeln sich im Knochenmark aus Eosinophilen-Vorläuferzellen, die der Granulozyten/Makrophagen (G/M)-Linie entstammen (18). Bei Mäusen können diese durch die Expression von Cluster of Differentiation (CD) 34, IL-5 Rezeptor alpha (CD125) und eine geringe Menge des Proto-Onkogens c-KIT (CD117) identifiziert werden (19), während sie sich beim Menschen durch die Expression von CD34, CD38 und CD125 auszeichnen (20). Sie werden unter normalen Bedingungen nur in einer kleinen Anzahl produziert und wandern vom Knochenmark ins periphere Blut (20). Diese Entwicklung ist durch die sequentielle Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert (Abbildung 4). Die G/M-Vorläuferzellen exprimieren hierbei neben Friend of GATA-1 (FOG-1) vor allem CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha und epsilon, Interferon regulatory factor 8 (IRF8), den an eine Purinreiche Box bindenden Transkriptionsfaktor PU.1 und Tribbles homolog 1 (TRIB1). Die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-1 und/oder GATA-2, die wie PU.1 nach ihrem DNA-Bindungsmuster benannt sind, scheint hinreichend und notwendig zu

## Einleitung

sein, um die Entwicklung der G/M-Vorläuferzellen in Richtung Eosinophile festzulegen. Gleichzeitig wird nun auch Krüppel-like family of transcription factors (KLF)5 exprimiert. IL-5 ist notwendig für die Differenzierung des eosinophilen Vorläufers in einen reifen Eosinophilen (18).



**Abbildung 4: Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung der Eosinophilen.**  
Modifiziert nach (18)

### 1.2.3 Physiologie und Pathophysiologie der Granulozyten

Alle vier Zellarten der Granulozyten (Mastzellen, sowie Basophile, Neutrophile und Eosinophile) haben überlappende oder komplementäre Funktionen in der Abwehr von Parasiten oder pathophysiologisch bei der Entwicklung von Allergien (21). Neutrophile sind mit 40-70 % aller Leukozyten die häufigsten Granulozyten und spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. Dabei fungieren sie sowohl als wichtige Effektorzellen, durch die Expression von Zytokinen und Chemokinen, sowie Effektormolekülen des humoralen Anteils des angeborenen Immunsystems und als Initiatoren einer allgemeinen Entzündungsreaktion, die in einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems kulminiert (22,23). Sie haben mit einer Halbwertszeit von 6-8h die kürzeste Lebenserwartung aller Leukozyten und ihre Produktion im

## Einleitung

---

Knochenmark ist wegen ihres cytotoxischen Potentials, das zu Gewebeschäden führen kann, strikt reguliert (24). Neutropenie, d.h. pathologisch niedrige Neutrophilenzahlen im peripheren Blut wie sie z.B. nach Chemotherapie bei Tumorerkrankungen vorkommen kann, führt zu einer immens erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen aller Art und ist daher lebensbedrohend (25).

Basophile und Mastzellen sind sich sowohl in ihrer Morphologie als auch Funktion ähnlich. Basophile sind die größten und mit circa 1% aller peripheren Leukozyten, die seltensten der Granulozyten, während die noch größeren Mastzellen als gewebeständige Basophile beschrieben werden können (21,26,27). Obwohl seit langem bekannt ist, dass diese Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von atopischer Dermatitis und ähnlichen allergischen Erkrankungen haben, war ihre physiologische Funktion lange Zeit ein Rätsel (21,26–29). Neuere Forschung zeigt, dass sie sowohl als Sentinel fungieren können und damit einen der ersten Abwehrmechanismen des Immunsystems gegenüber Infektionen bilden, als auch immun regulatorisch wirken und damit eine Immunreaktion modulieren können (27).

Eosinophile galten langezeit als die Effektorzellen, die sowohl in der Mukosa als auch im Blutstrom oder soliden Geweben auf die Abwehr von mehrzelligen Parasiten spezialisiert sind (30). Ihre Zytotoxizität geht hierbei hauptsächlich auf ihre Fähigkeit zurück, durch Degranulation vorgeformte, kationische Proteine auszuschütten, die auf Helminthen toxisch wirken (31).

In Industrienationen, in denen Infektionen mit Helminthen inzwischen selten geworden sind, werden sie zudem mit pathophysiologischen Reaktionen wie Asthma, Allergien und Gewebeschäden bei chronisch entzündlichen Prozessen in Verbindung gebracht (18,31–36). Diese etwas simplifizierende Sichtweise der Eosinophilen hat sich in den letzten 30 Jahren stark geändert. Inzwischen ist bekannt, dass es eine Vielzahl unterschiedlicher eosinophile Subtypen gibt, die ein vielfältiges Arsenal verschiedener Effektormoleküle besitzen. Dazu gehören eine Reihe von Liganden, die eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Chemotaxis, Degranulation, Proliferation und bei Zell-Zell-Interaktion spielen (30,31,35). Eine spezielle Unterform von Asthma wird durch eosinophile Effektorzellen vermittelt. Eosinophilen-depletierende Behandlungen lindern die Symptome bei dieser Erkrankung, wobei sich jedoch auch zunehmend eine phänotypische Diversität der beteiligten Eosinophilen zeigt (33).

## Einleitung

---

Hypersensitive Hautreaktionen auf bestimmte Medikamente oder Insektenstiche werden oft von Eosinophilen vermittelt (32). In jüngerer Zeit zeigte sich zunehmend, dass Eosinophile auch wichtig sind für die Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen einschließlich HIV und SARS-CoV-2, dem Erreger von COVID-19, für deren Erkennung sie unter anderem Toll-like Rezeptoren (TLR) verwenden (37,38).

Neuere Forschungen konnten zudem eine neue Form des programmierten Zelltods, die sich von der klassischen Apoptose unterscheidet, neben Neutrophilen auch bei Eosinophilen zeigen. Dieser extracellular trap cell death (ETosis) genannte programmierte Zelltod setzt nicht nur den Inhalt der Eosinophilengranula frei, sondern auch die DNA, die als extracellular traps (ET) einen weiteren Abwehrmechanismus gegen Pathogene aller Art darstellt (39). DNA dient in diesen ET als Gerüstmaterial, das nicht nur Pathogene in einem molekularen Netz einfangen kann, sondern auch Bindungsstellen für verschiedene Effektormoleküle bietet, sodass deren lokale Konzentration entgegen einem Diffusionsgradienten erhöht bleiben kann (40). ET von Neutrophilen sind seit längerem bekannt und können in thrombotischen Plaques nachgewiesen werden. Eine kürzlich erschienene Publikation konnte nun auch ET von Eosinophilen in Thromben aus Myokardinfarkten nachweisen (41).

### 1.2.4 Eosinophile in Inflammation und Atherosklerose

Vor circa 20 Jahren wurde erstmal beschrieben, dass in menschlichen atherosklerotischen Plaques Eotaxin, ein Chemokin, das vor allem auf Eosinophile chemotaktisch wirkt, und sein Rezeptor CCR3 überexprimiert werden. In gesunden Blutgefäßen lassen sich diese beiden Moleküle aber nicht nachweisen (42). Diese Daten lassen darauf schließen, dass Eosinophile an der Initiierung und/oder der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung in atherosklerotischen Plaques beteiligt sind.

In einer Studie aus dem Jahr 2014 konnten Verdoia und Mitarbeiter nachweisen, dass eine höhere Eosinophilen-Zahl im peripheren Blut signifikant positiv mit männlichem Geschlecht, verschiedenen Risikofaktoren für chronische koronare Arterienkrankheit, vorangegangene Revaskularisierung, Hypertoniemedikation und Gebrauch von Plättchenaggregationshemmern assoziiert ist. Es bestand eine

## Einleitung

---

negative Korrelation zwischen Eosinophilen-Zahlen und akuten Symptomen (43). Kounis et al. bestätigten ein Jahr später, dass periphere Eosinophilen-Zahlen und das Verhältnis von Eosinophilen zu allen Leukozyten im Blut prognostischen Wert bei akuten Koronarkrankheiten haben (44). Dasselbe Ergebnis wurde auch in einer anderen Veröffentlichung aus dem Jahr 2019 berichtet (45). Zudem haben Patienten mit allergischen Asthma, an dem oft Eosinophile an der Pathogenese beteiligt sind, ein erhöhtes Atheroskleroserisiko (46).

Eosinophile haben eine zentrale Rolle in der Thrombose, indem sie frühzeitig über eine Integrin-abhängige Reaktion in die Läsionen rekrutiert werden und dort von Willebrand-Faktor (vWF) auf Endothelzellen besser zugänglich machen. Dabei werden zudem Eosinophile ET (EET) gebildet, die durch die dort gebundenen kationischen Granulaproteine Thrombozyten aktivieren können. Eine Inhibition der EET-Bildung inhibiert zudem die Bildung neuer Thromben *in vivo* (54).

## **2. Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob eosinophile Granulozyten zur Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques im Mausmodell der Atherosklerose beitragen. Da der Einfluss von Eosinophilen auf die Atherosklerose bisher noch nicht beschrieben wurde, ging es darum, Hinweise auf Effekte eosinophiler Granulozyten auf die Plaquebildung in der Arterienwand zu analysieren.

Die Fragestellung, ob eosinophile Granulozyten die Entstehung atherosklerotischer Plaques fördern, wurde am Mausmodell ermittelt. Hierfür wurden Knockout-Mäuse, die keine Eosinophilen entwickeln mit ihren Wildtypgeschwistern verglichen. Mit Hilfe verschiedener histologischer Färbungen wurde außerdem untersucht, ob und inwiefern eosinophile Granulozyten Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen nehmen.

Bei eindeutigen Anzeichen einer Mitwirkung der Eosinophilen sollte zusätzlich analysiert werden, welche Faktoren der Atherogenese spezifisch auf eosinophile Granulozyten wirken, um dadurch gegebenenfalls neue Therapieansätze der Atherosklerose zu identifizieren.

Folgende Hypothesen sollten dementsprechend untersucht werden:

1. Eosinophile Granulozyten begünstigen die Entstehung atherosklerotischer Plaques im Mausmodell.
2. Eosinophile Granulozyten beeinflussen die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen.
3. Eosinophile Granulozyten werden in der Atherogenese durch spezifische Mediatoren aktiviert.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

In den letzten 35-40 Jahren hat sich die Maus zum bei weitem am häufigsten verwendeten Tiermodell für die Atheroskleroseforschung entwickelt (47–49). Auch die vorliegende Studie griff auf ein Mausmodell zurück, da sich die Maus aufgrund ihrer kurzen Generationsdauer, problemlosen Aufzucht, sowie der einfachen und günstigen Haltung besonders gut als Versuchstier eignet.

Die Genehmigung aller Tierstudien wurde durch die Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes erteilt.

##### 3.1.1 Mauslinien

###### *3.1.1.1 $\Delta dbiGATA1$*

Die  $\Delta dbiGATA1$ -Mäuse basieren auf einem BalbC-Hintergrund. Das Gata1-Gen ist ein X-chromosomales Gen, das eine essentielle Rolle bei der Entstehung erythroider Zellen, Megakaryozyten und Eosinophilen aus unreifen myeloischen Zellen spielt (50–52), das durch Gen-Targeting bei Mäusen nachgewiesen wurde. Bei  $\Delta dbiGATA1$ -Knockout-Mäusen ( $\Delta dbiGATA1^{-/-}$ ) führt die Deletion einer hochaffinen GATA-Bindungsstelle im GATA-1-Promotor, einem Element, von dem angenommen wird, dass es eine positive Autoregulation der GATA-1-Expression vermittelt, zum selektiven Verlust der eosinophilen Abstammungslinie. Dadurch wird die Bildung eosinophiler Granulozyten gehemmt, während die Entwicklung der anderen GATA-1-exprimierenden Zelllinien, der Megakaryozyten, Erythroid- und Mastzellen, nicht oder nur gering gestört wird. Auf die Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit besteht ebenfalls kein Einfluss.

###### *3.1.1.2 $ApoE^{-/-}$*

Bei ApoE-Knockout-Mäusen wird durch genetische Veränderung die Bildung des Apolipoproteins E ausgeschaltet, welches für die Aufnahme von Lipidproteinen aus dem Blut in die Leber zuständig ist (53). Dadurch entwickeln diese Tiere vermehrt Arteriosklerose in den Gefäßen, was den Vorgängen in der Entwicklung der Arteriosklerose und koronaren Herzerkrankung beim Menschen ähnelt. Bereits nach 6 Wochen cholesterinreicher Nahrung werden Läsionen an der Aortenwurzel

## Material und Methoden

---

beschrieben, die mit zunehmendem Alter anwachsen und sich nach 15 Wochen zu arteriosklerotischen Plaques entwickeln (53). Die in dieser Studie eingesetzte Maus hat den C57Bl6/J-Hintergrund.

### 3.1.1.3 ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1

Um den Einfluss der eosinophilen Granulozyten auf die Plaqueentstehung untersuchen zu können, wurden die Eosinophilen-defizienten Gata1-Knockout-Mäuse mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verpaart und auf einen C57Bl6 Hintergrund zurückgezüchtet. Der Nachwuchs aus diesen Verpaarungen mit dem Genotyp (ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1) wurde mit ihren Geschwistertiere mit dem Genotyp (ApoE<sup>-/-</sup> x GATA1<sup>+/+</sup>), bei welchen das Gata1-Gen nicht ausgeschaltet wurde, verglichen.

### 3.1.2 Haltung

Die Versuchstiere wurden kommerziell von *The Jackson Laboratory* erworben. Bis zu 3 Mäuse wurden in Abhängigkeit von Größe und Geschlecht in einem Käfig (THKB-M2V-MPolysulfonkäfig TypMII) mit Anschluss an ein IVC-System (Individually Ventilated Cabinet) untergebracht. Die ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1-Mäuse erhielten 13 Wochen nach Absetzen von der Mutter eine cholesterinreiche Diät (Western Type Diet, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und hatten über Trinkflaschen freien Zugang zu Wasser. Außerdem wurde eine Gruppe von reinen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen 12 Wochen ebenfalls mit fettreichem (High Fat Diet, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und eine Vergleichsgruppe mit dem Genotyp ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1 12 Wochen mit Standardfutter (Chow Diet, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) angefüttert. Um einen Tag-Nacht-Rhythmus vorzugeben, wurde mittels Zeitschaltuhr automatisch eine Beleuchtung im 12-Stundenintervall gewährleistet. Die Raumtemperatur lag konstant bei 21°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%.

## Material und Methoden

**Tabelle 1 Versuchsgruppen**

Stamm	Genotyp	Fütterung	Alter	Anzahl
ApoE <sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1 <sup>-/-</sup>	ko/ko x ko/ko	13 Wochen Western Diet	17 Wochen	19
ApoE <sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1 <sup>+/+</sup>	ko/ko x wt/wt	13 Wochen Western Diet	17 Wochen	19
ApoE <sup>-/-</sup>	ko/ko	12 Wochen High Fat Diet	16 Wochen	5
ApoE <sup>-/-</sup>	ko/ko	12 Wochen Chow Diet	16 Wochen	5

### 3.1.3 Organentnahme und Fixierung

Zur Organentnahme wurden die Versuchsmäuse mittels eines Anästhetikums aus 90µl Fentanyl (Fentanyl HEXAL®, Hexa AG, Holzkirchen), 90µl Midazolam (Midazolam-hameln®, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln) und 15µl Medetomidin (Dorbene®, Pfizer GmbH, Berlin) narkotisiert. Es folgte ein medianer Hautschnitt von der Leistenregion bis kranial des Brustbeins und die Öffnung des Brustkorbes. Nach der Freilegung des Herzens wurde das Gefäßsystem mit 5ml NaCl:Heparin (100:0,5) perfundiert. Der Tod erfolgte durch kompletten Blutentzug und zusätzliche Durchtrennung des Genicks.

Die Aorta wurde vom Aortenbogen nach kaudal bis distal der Bifurtatio aortae grob freipräpariert und entnommen. Diese wurde für 12-24h in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) fixiert.

Das Herz wurde nach Entnahme aufrecht mit der Spitze nach unten senkrecht zum Boden in einem Einbettmedium (Tissue-Tek®, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) positioniert und mit Trockeneis schockgefroren. Für eine bessere Stabilität wurde der Apex cordis abgeschnitten. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Herzen bei -80°C eingelagert.

Zusätzlich wurde die rechte A. carotis communis entnommen und in Tissue-Tek eingebettet in einem -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt. Weitere Untersuchungen, die mit den Organen und Geweben der Tiere durchgeführt wurden, waren Gegenstand einer anderen Studie und werden im weiteren Verlauf nicht näher erläutert.

## **3.2 Histopathologische Untersuchungen**

### **3.2.1 *En Face* Sudan-III-Färbung zur Quantifizierung atherosklerotischer Plaques in der Aorta**

Die Sudan-III-Färbung ist eine physikalische Methode, bei der der Farbstoff im Konzentrationsgefälle aus dem Lösungsmittel hin zu Neutralfetten diffundiert, wodurch sich fetthaltige Gewebseinlagerungen rot anfärben (54–56). Da atherosklerotische Plaques zu einem großen Teil aus Cholesterin und anderen Lipiden, den sog. „*fatty streaks*“, bestehen, können diese mit Hilfe der Sudan-III-Färbung in der Aorta dargestellt und quantitativ erfasst werden (55,56).

Nach 12-24h in PFA wurde die Aorta nach einem feststehenden Protokoll gefärbt. Zuerst wurde das Gefäß 2 Minuten in Aqua bidest und anschließend circa 3 Minuten in 75%iges Ethanol (Emsure®, Ethanol absolute for analysis, Merck KGaA, Darmstadt) gelegt. Dann wurde die Probe für 25-30 Minuten in die Sudan-III-Färbelösung (Sudan III C.I. 26100, Merck, Darmstadt) inkubiert. Hierfür wurde 1g Sudan III in 200 ml 100 %igem Ethanol gelöst, filtriert und mit Aqua bidest im Verhältnis 3:2 (Stammlösung:Aqua bidest) verdünnt. Zuletzt wurde die Probe erneut 2 Minuten in Aqua bidest gewaschen.

Nach der Färbung wurde die Aorta unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille vorsichtig von restlichem periarteriellem Fett- und Bindegewebe, inklusive der Adventitia, befreit, um dem Risiko falsch-positiver Ergebnisse vorzubeugen. Daraufhin wurde das Gefäß auf einem Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, 25 x 75 x 1,0mm Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) ausgebreitet, mit Aqua bidest benetzt und durch das Abdecken mit einem Deckglas (MEDITE GmbH, Burgdorf) fixiert.

### **3.2.2 Anfertigung histologischer Schnitte**

Die gefrorenen Herzen wurden in einem Kryotom (Thermo Scientific™ CryoStar™ NX70) angetaut, aufrecht mit dem Apex nach unten auf einem Stempel fixiert und mit Tissue Tek bedeckt. Bei einer Gewebstemperatur von -23°C und einer Klingentemperatur von -15°C wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte erfolgten von kranial nach kaudal. Dabei wurde der Rest der Aorta ascendens zur Orientierung verwendet, wobei die Aorta möglichst quer geschnitten

## Material und Methoden

---

wurde, damit auch der Aortensinus im Querschnitt dargestellt werden konnte. Je 2-3 Schnitte wurden auf einen beschichteten Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, 25 x 75 x 1,0mm Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) gezogen und beschriftet. Die Carotiden wurden ebenfalls aufrecht auf dem Stempel, wie beschrieben, fixiert und bei gleicher Einstellung im Querschnitt geschnitten. Die Gewebsschnitte wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt.

### 3.2.3 Oil-Red-O-Färbung zur Quantifizierung atherosklerotischer Plaques auf Ebene der Aortenklappe

Wie die Sudan-III-Färbung dient auch die Oil-Red-O-Färbung der Darstellung von Lipideinlagerungen. Da die Lipidareale mit der Plaquegröße korreliert, ist die Oil-Red-O-Färbung ein häufig verwendetes Werkzeug zur Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen (57,58).

Die Färbung fand nach festem Protokoll bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurden die Gewebsschnitte für 5 Minuten in eine Glasküvette mit einfacher phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate buffered saline 1x, Gibco® by life technologies, Kalifornien, USA) gelegt. Die luftgetrockneten Objektträger wurden anschließend 10 Mal in 60%iges Isopropanol (EMSURE®, 2-Propanol zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt) getaucht und dann 15 Minuten lang in der Oil-Red-O-Lösung inkubiert. Für die Lösung wurde zuvor 180ml Stocklösung, 1g Oil-Red-O (O0625, Sigma-Aldrich®, Steinheim) in 200ml 99%igem Isopropanol gelöst, mit 120ml Reinstwasser (Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Frankfurt) unter einem Abzug vermischt und nach einer Stunde filtriert. Um die Überschüsse wegzuwaschen, wurden die Objektträger wiederholt 10 Mal in 60%igem Isopropanol gewaschen und 5 Minuten in der Küvette unter kaltes schwach fließendes Wasser gestellt. Zur Kerngegenfärbung wurden die Objektträger für 30 Sekunden in Häkalaunlösung, bestehend aus Mayers Häkalaunlösung (Mayers Häkalaunlösung für die Mikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt) und Reinstwasser im Verhältnis 1:1, gebläut und danach wieder 5 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die Gewebsschnitte mit je einem Tropfen

## Material und Methoden

---

Eindeckmedium (Dako Fluorescent mounting medium, Dako North America Incorporation, CA, USA) und einem Deckglas bedeckt.

### 3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Immunhistochemie beruht auf der Antigen-Antikörper-Reaktion und stellt eine Färbemethode dar, mit der Epitope in Gewebeschnitten spezifisch detektiert und durch die Bindung mit einem Fluorochrom konjugierten Antikörper Proteine und auch andere Strukturen im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Man unterscheidet zwei verschiedene Methoden der Detektion: zum einen gibt es die direkte Methode, bei der ein fluoreszenzmarkierter Primärantikörper direkt das Antigen bindet, und zum anderen die indirekte Methode, bei welcher ein unkonjugierter Primärantikörper das Antigen bindet, und von einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, der an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet, detektiert wird. Bei dieser Methode binden mehrere polyklonale Sekundärantikörper an einen Primärantikörper und verstärken somit das Signal. (59–61)

Die gekühlten Objektträger wurden zunächst in eine lichtundurchlässige Färbekammer gelegt und auf Raumtemperatur gebracht. Um die Gewebeproben vor Austrocknung zu schützen, wurde der Boden der Färbekammer mit Wasser bedeckt (62). Zuerst wurden alle Gewebsschnitte mehrfach mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) umrandet, um auf dem Objektträger eine Barriere zu schaffen und so die Färbelösung auf dem Präparat zu halten.

#### 3.2.4.1 MPO-Färbung

Myeloperoxidase (MPO) ist ein lysosomales Enzym aus der Gruppe der Peroxidasen, das hauptsächlich in Neutrophilen und zu einem geringeren Grad in Monozyten exprimiert wird (63) Zur Markierung neutrophiler Granulozyten wurde daher die MPO-Färbung nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Zunächst wurden die Proben 15 Minuten mit 4%igen PFA fixiert. Zur Entfernung des Formalins, wurden die Präparate dreimal je 5 Minuten mit frisch angesetztem PBS-Tween-Waschpuffer in Glasküvetten auf einem Linearschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gewaschen. Die Waschlösung enthielt 100 ml PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich®, Steinheim), das mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt und mit 1 ml Tween (Tween® 20,

## Material und Methoden

---

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gemischt wurde. Bevor der Antikörper zum Einsatz kam, wurde ein Goatserumgemisch aufgetragen, um mögliche unspezifische Bindungen am Fc-Rezeptor zu blockieren. Dies ermöglichte, dass der primäre Antikörper spezifisch band (59,60). Hierfür wurde eine Lösung auf einem Magnetrührer (RCT basic, IKA®, Staufen) mit Hilfe eines Rührfisches aus 50 ml PBS, 0,5 g Bovinem Kälberserum Albumin (BSA, Albumin Fraktion V,) und 0,25 g Saponin (Saponin rein, Carl Roth®, Karlsruhe) zusammengerührt und durch ein Spritzenfilter mit Polyethersulfon-Membran (Sterile Syringe Filter 0,2 µm PES, VWR™, Darmstadt) filtriert. 4,5 ml dieser Stocklösung wurden mit 500 µl Goatserum gemischt. Diese Blocklösung wurde für 60 Minuten auf die Gewebsschnitte pipettiert. Danach wurde die Lösung lediglich von den Objektträgern abgeklopft. Ohne weiteren Waschschrift wurde nun der gegen MPO gerichtete Primärantikörper (A0398, Polyclonal Rabbit anti-Human MPO, Dako North America Incorporation, CA, USA) mit der Blocklösung im Verhältnis 1:300 verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht in einem Kühlschrank bei 4° C. Am nächsten Tag wurden die nichtgebundenen Antikörper, wie bereits beschrieben, dreimal je 5 Minuten mit PBS-Tween-Waschpuffer heruntergewaschen. Anschließend wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper (Cy<sup>TM</sup>5-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA) in einer Verdünnung 1:200 und zur „blauen“ Kernfärbung Hoechst (Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) 1:1000 mit der Stocklösung gemischt und für weitere 60 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach einem letzten Waschschrift von dreimal 5 Minuten wurden die Objektträger abgeklopft, und mit je einem Tropfen Dako und einem Deckglas bedeckt. Bis zum Fotografieren wurden die gefärbten Gewebsschnitte bei 4°C in einer lichtgeschützten Mappe gekühlt aufbewahrt.

### *3.2.4.2 LGAL-S3+ACTA-2-Doppelfärbung*

Das Galectin-3 (LGAL-S3) ist ein Galaktose-bindendes Protein, das u.a. in Makrophagen in hohem Maße innerhalb menschlicher atherosklerotischer Plaques und im Atherom-Modell der Maus exprimiert wird (64,65). Als Reaktion auf Gefäßverletzungen werden außerdem die Differenzierung und Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) stimuliert (66). Die LGAL-S3+ACTA-2-Doppelfärbung

## Material und Methoden

---

erfolgte nach dem wie in 3.2.4.1 beschriebenen Standardprotokoll mit folgenden Antikörpern:

Als Primärantikörper wurden das gegen Galectin-3 gerichtete anti-LGAL-S3 (CL8942AP, Purified Rat anti-Mouse/Human Mac-2, Cedarlane, Burlington, Kanada) und gegen  $\alpha$ -Glattmuskelaktin gerichtete anti-ACTA-2 (F3777, Purified Mouse anti-Mouse  $\alpha$ -SMA, Sigma-Aldrich®, Steinheim), welches mit dem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Isomer I konjugiert ist, verwendet. Der anti-LGAL-S3-Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:200, der anti-ACTA-2-Antikörper 1:400 mit der Blocklösung gemischt und auf die Präparate pipettiert.

Als fluoreszierender Sekundärantikörper zur Detektion des Mac-2-Antikörpers kam Cy5 (Cy<sup>TM</sup>5-conjugated AffiniPure Goat anti-Rat IgG, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA) in der Verdünnung 1:200 zum Einsatz.

### *3.2.4.3 Siglec-F-, vWF- und CCL11-Färbung*

Zunächst wurden die Proben mit 4%igen PFA 10 Minuten fixiert. Zur Entfernung des Formalins, wurden die Präparate dreimal je 5 Minuten mit frisch angesetztem PBS-Tween-Waschpuffer in Glasküvetten gewaschen. Zum Blocken wurde vor dem Primärantikörper ein Goatserum (10% Normal Goat Serum, life technologies<sup>TM</sup>, Kalifornien, USA) aufgetragen und nach 30 Minuten Inkubation abgeklopft. Der Primärantikörper wurde jeweils ohne Zwischenwaschschritt direkt auf die Präparate pipettiert und für 1-1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Antikörper durch den dreimaligen Waschgang mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper, zum „grün Färben“ des ersten Antikörpers, für eine weitere Stunde aufgetragen. Nach der Inkubationszeit wurde zur Kernfärbung Hoechst 1:1000 mit PBS verdünnt und für 3 min auf die Präparate gegeben, bevor ein letzter Waschgang erfolgte. Zuletzt wurden die Objektträger abgeklopft, die Schnitte mit je einem Tropfen Dako und einem Deckglas bedeckt.

Die gefärbten Gewebsschnitte wurden bei 4°C in einer Mappe lichtgeschützt in einem Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 2 Für die immunhistologischen Färbungen Siglec-F, vWF, CCL11 verwendete Primärantikörper**

Antigen	1. AK	Klon	Hersteller	2. AK	Hersteller
Siglec-F	Ratte	E50-2440	BD Pharmigen	Goat anti-Rat AlexaFluor®488	Invitrogen
vWF	Mouse	F8/86	Dako	Goat anti-Mouse AlexaFluor®488	Invitrogen
CCL11	Ratte	42285	Invitrogen	Goat anti-Rat AlexaFluor®488	Invitrogen

### 3.2.5 Auswertung

#### 3.2.5.1 Relative Fläche der atherosklerotischen Plaques

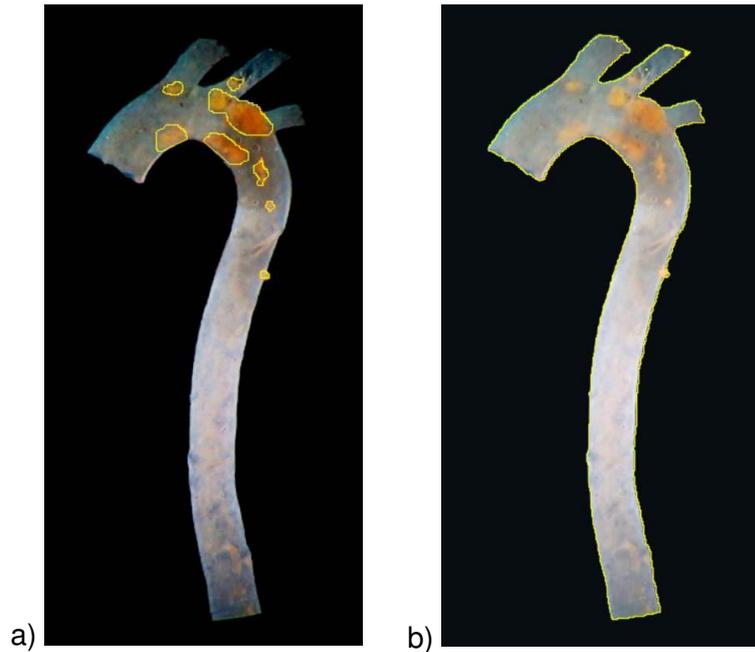
##### 3.2.5.1.1 En face Analyse der Aorta

Die Aorta wurde unter einem Hellfeldmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss AG, Jena) bei 0,65-, 1,25- und 1,6-facher Vergrößerung unter direkter Belichtung durch eine externe Lichtquelle in einem ansonsten dunklen Raum mit einer Digitalkamera über einen Tubus *en face* abfotografiert (Canon PowerShot G5, Canon Inc., Japan). Der Aortenbogen wurde zusätzlich unter dem 2,5- und 4,0-Objektiv aufgenommen.

Für die Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques wurden die Aufnahmen in 1,6-facher Vergrößerung herangezogen. Hierbei wurde die Fläche der rot angefärbten Läsionen unter Verwendung des Computerprogrammes Fiji (Fiji is Just, ImageJ 1.52n, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) manuell gemessen (Abbildung 5 a) und ins Verhältnis zur Gesamtfläche der Aorta ascendens, des Aortenbogens und der thorakalen Aorta (Abbildung 5 b) gesetzt.

Somit wurde die relative Plauefläche mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Relative Plauefläche} = \text{Plauefläche} / \text{Gefäßfläche}$$



**Abbildung 5: Ermittlung der relativen Plaqueläche im erweiterten Aortenbogen**

a) manuell bestimmte absolute Plaqueläche (gelb umrandete Flächen), b) automatisiert markierte Gefäßfläche (gelb umrandete Fläche)

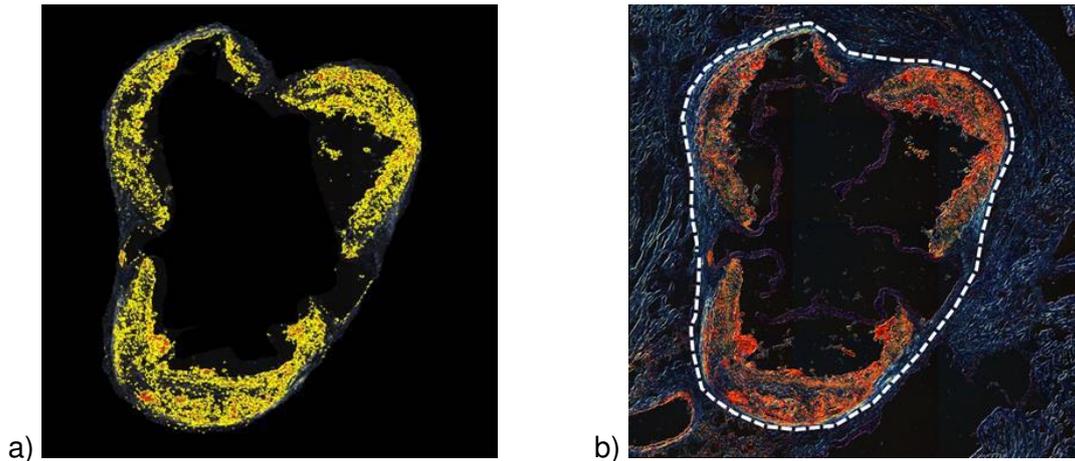
### 3.2.5.1.2 Aortensinus

Die Aortenklappen wurden unter einem Mikroskop (Leica DM6 B, Bensheim) mit einer Mikroskop-Kamera (Leica DMC4500, Bensheim) unter Verwendung einer entsprechenden Software (LAS X, Copyright© Leica Microsystems CMS GmbH) bei 20-facher Vergrößerung abfotografiert.

Um das Ausmaß der Atherosklerose zu bestimmen, wurde die Fläche der atherosklerotischen Läsionen in Querschnitten des Aortensinus, in denen die Aortenklappen satt getroffen waren, ermittelt. Das Ausmessen der Läsionen erfolgte mit Fiji, in dem die rotgefärbten Areale an allen drei Aortenklappen automatisiert markiert wurden (Abbildung 6 a) und die Gesamtgefäßfläche manuell bestimmt wurden ((Abbildung 6 b). Die Plaquelächen wurden addiert und ins Verhältnis zur „vessel area“ (von der Adventitia umgebene Fläche) gesetzt, um Unterschiede in der Gefäßgröße auszugleichen. So ergab sich für die Auswertung der Plaqueläche in Bezug auf die Gesamtgröße des Gefäßes folgende Formel:

$$\text{Relative Plaqueläche} = \text{Plaque area} / \text{Vessel area}$$

Für die Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung wurden je Versuchstier fünf Gewebsschnitte herangezogen und deren Mittel errechnet.



**Abbildung 6: Ermittlung der relativen Plaquefläche im Aortensinus**

a) absolute Plaque area (gelb markierte Fläche), b) Vessel area = Gesamtgefäßfläche (gestrichelte Linie)

### 3.2.5.2 Auswertung der Immunhistologie

Um eine optimale Bildqualität und Färbestoffintensität zu erzielen, wurden die Präparate innerhalb von 48 Stunden nach der Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) mithilfe einer Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und entsprechender Software (AxioVision) bei 20-facher Vergrößerung abfotografiert. Bei allen Aufnahmen wurden entsprechende Farbkanäle und standardisierte Belichtungszeiten verwendet.

#### 3.2.5.2.1 Relative Fläche an Neutrophilen, Makrophagen und glatter Muskulatur

Für die quantitative Auswertung der Farbsignale wurde das Computerprogramm Fiji verwendet, welches ermöglicht, die Färbungen in verschiedene Farbkanäle zu trennen und die einzelnen Farbsignale einzeln auszuwerten. Für die Fläche an positiv angefärbten Antigenen wurde die jeweilige Farbe automatisiert gefiltert und deren Fläche zur manuell bestimmten Plaquefläche ins Verhältnis gesetzt (Area fraction). Hierfür wurden je zwei Schnitte pro Versuchstier aus dem Bereich des Aortensinus, in der die Klappen gerade angeschnitten wurden, herangezogen und deren Durchschnitt errechnet.

**Tabelle 3 Farbsignale**

Neutrophile	MPO	grün
Makrophagen	LGAL-S3	grün
glatte Muskultur	ACTA-2	rot

### **3.3 Blutanalyse**

Für die Blutanalyse wurde den Mäusen unter Verwendung einer Citrat beschichteten 1 ml-Spritze (BD Discardit™ I, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) mit einer 26 G-Kanüle (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) intrakardiales Blut entnommen. 100 µl des gewonnenen Blutes wurden zur Erstellung eines Differentialblutbildes einem vollautomatischen Analysegerät (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysengerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) zugeführt.

### **3.4 ELISA.**

Um Plasma zu gewinnen, wurde das Blut in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes®, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) für 10 Minuten bei 15°C in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5424 R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) bei 2000g zentrifugiert und dessen Überstand ein weiteres Mal bei gleicher Einstellung. Der beim zweiten Zentrifugationsschritt entstandene Überstand wurde abpipettiert, schockgefrostet und in einem -80°C-Gefrierschrank gelagert.

Die Plasmakonzentrationen des Gesamtcholesterins wurden mit dem im Handel erhältlichen Cholesterin-Assay-Kit (Cholesterol/Cholesteryl Ester Assay Kit-Quantitation, Abcam®, Cambridge, UK) bestimmt. IL-5 (IL-5 Quantikine ELISA Kit, R&D System, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt), CCL11 (CCL11/Eotaxin Quantikine ELISA Kit, R&D System, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) und vWF (Mouse Von Willebrand Factor A2 ELISA Kit, Abcam®, Cambridge, UK) wurden ebenfalls mit Hilfe von ELISA-Kits nach Angaben des Herstellers quantifiziert

Die Auswertung der ELISAs wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (infintite F200, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) und der entsprechenden Software i-control 1.9 (2011, Tecan Austria GmbH) vorgenommen, welche die Absorption der sich entwickelten Farbe auslas. Diese konnten mit der Software ReaderFit (Hitachi Solutions America, Ltd.) gegen bekannte Standardkonzentrationen entsprechend interpretiert werden.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse dieser Arbeit erfolgte unter Anwendung des Programms IBM® SPSS® Statistics 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Deren graphische Darstellung wurde mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) realisiert.

Die Unabhängigkeit der Variablen und Messergebnisse wurde durch das Studiendesign sichergestellt. Zum Test, ob die Daten normalverteilt waren, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Beim Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte die Signifikanzprüfung für den Vergleich einer Gruppe zu ihrer Kontrollgruppe mittels T-Test. Sofern die Werte nicht normalverteilt waren, wurde der nichtparametrische, unabhängige Mann-Whitney-U-Test verwendet. P=Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

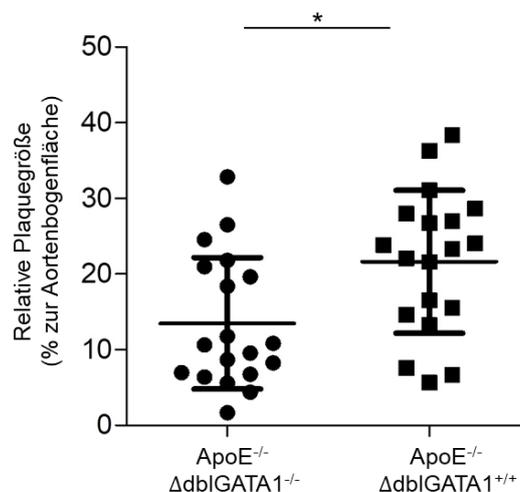
In den Graphen wurden die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) durch entsprechende Querbalken dargestellt

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Verminderung der Atherosklerose in Eosinophilen-defizienten Tieren

#### 4.1.1 Atherosklerotische Läsionsgröße in der Aorta

Um den Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques zu untersuchen, wurden ApoE<sup>-/-</sup> mit Eosinophilen defizienten  $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt und mit der Kontrollgruppe ApoE<sup>-/-</sup>x  $\Delta$ dblGATA1<sup>+/+</sup> verglichen. Nachdem die Versuchsmäuse 13 Wochen lang mit cholesterinreicher Nahrung angefüttert wurden, entwickelten die Knockout-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern signifikant vermindert atherosklerotische Läsionen (Abbildung 7 bis Abbildung 10), was sich sowohl in der *en face*-Analyse der Aorta (Abbildung 7 und Abbildung 8) als auch im Aortensinus auf Klappenebene (Abbildung 9 und Abbildung 10) zeigte.

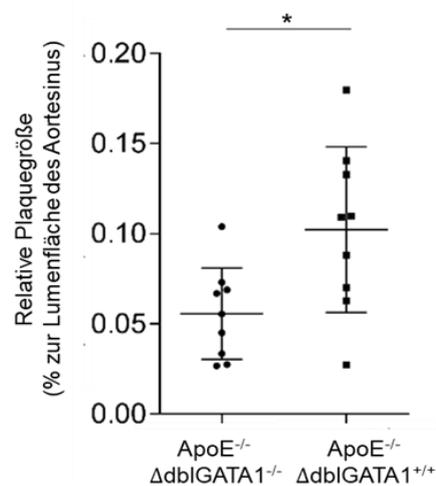


**Abbildung 7: Mittels *en face*-Technik ermittelte relative Plauefläche im Aortenbogen ApoE<sup>-/-</sup>x $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup> (n=19) vs. ApoE<sup>-/-</sup>x $\Delta$ dblGATA1<sup>+/+</sup> (n=19), \*p < 0,05**



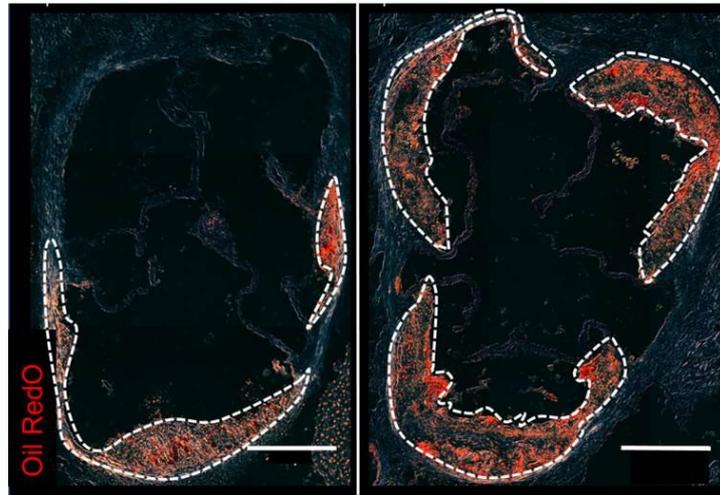
**Abbildung 8: En face Sudan-III-Färbung im Aortenbogen**

Atherosklerotische Läsion einer ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>-/-</sup>-Maus links im Vergleich zu einer der Kontrollgruppe (ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>+/+</sup>) rechts. Maßstab = 200 μm



**Abbildung 9: Mittels Oil-Red-O-Färbung ermittelte relative Plaquesfläche im Aortensinus**

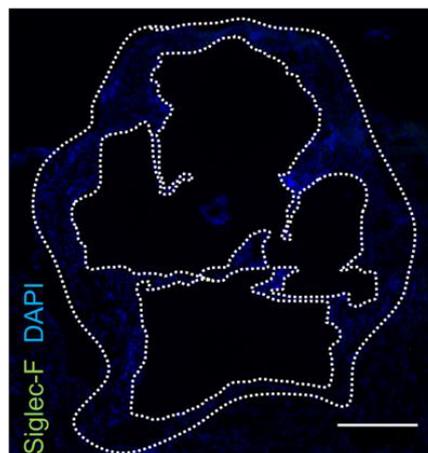
ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>-/-</sup> (n=14) vs. ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>+/+</sup> (n=13), \*p < 0,05



**Abbildung 10: Oil-Red-O-Färbung des Aortensinus**

Atherosklerotische Läsion (gestrichelte Linie) einer  $ApoE^{-/-}x\Delta dbIGATA1^{-/-}$ -Maus links im Vergleich zu einer der Kontrollgruppe ( $ApoE^{-/-}x\Delta dbIGATA^{+/+}$ ) rechts. Maßstab = 300  $\mu m$

Zusätzlich wurde mittels Siglec-F Färbung untersucht, ob in den atherosklerotischen Plaques der Eosinophilen-suffizienten Kontrollgruppe ( $ApoE^{-/-}x\Delta dbIGATA^{+/+}$ -Maus) auf Aortenklappenebene eosinophile Granulozyten nachweisbar waren. Doch wie bereits für stabile humane atherosklerotische Plaques berichtet, konnten auch in der  $ApoE^{-/-}x\Delta dbIGATA^{+/+}$ -Maus keine Eosinophilen innerhalb der Läsionen detektiert werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Siglec-F Färbung des Aortensinus einer Wiltyp-Maus ( $ApoE^{-/-}x\Delta dbIGATA^{+/+}$ )**

Abwesenheit von eosinophilen Granulozyten innerhalb der atherosklerotischen Läsion (gepunktete Linie) auf der Ebene der Valva aortae, Siglec-F: grün, Maßstab = 300  $\mu m$

## Ergebnisse

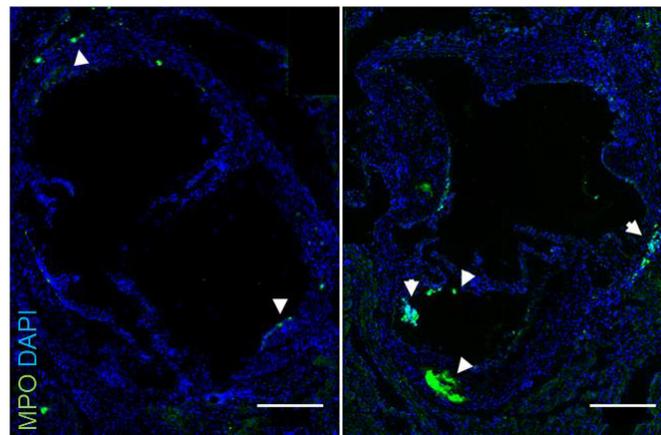
### 4.1.2 Zelluläre Analyse der atherosklerotischen Plaques

Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung anderer Leukozyten durch das Fehlen von Eosinophilen beeinträchtigt wird, wurde in einem nächsten Schritt die Infiltration entzündlicher Immunzellen in Läsionen der Aortenklappe analysiert.

#### 4.1.2.1 Verminderte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in Eosinophilen-defizienten Tieren

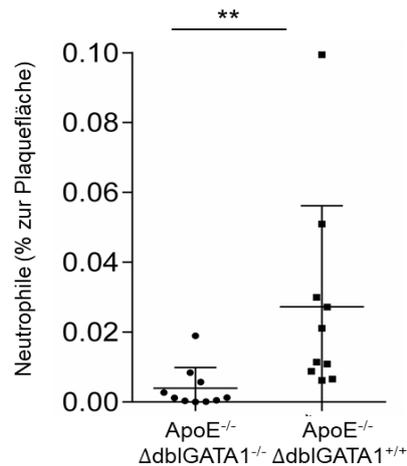
Granulozyten stellen 50 % der Leukozyten dar, wobei neutrophile Granulozyten den Hauptanteil ausmachen. Die Anwesenheit von Neutrophilen wurde mittels MPO-Färbung ermittelt. Die Auswertung dieser Färbung ergab, dass die Kontrollgruppe im Vergleich zur Eosinophilen-defizienten Gruppe eine deutlich stärkere Rekrutierung von Neutrophilen in Plaques aufweist. Der Prozentsatz der Fläche an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 12) in Bezug auf die Plaquesgesamtfläche war damit bei ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant geringer (Abbildung 13,

p<0,01).



#### Abbildung 12: MPO-Färbung des Aortensinus

Fläche an neutrophilen Granulozyten (Pfeil) bei einer ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA1<sup>-/-</sup>-Maus links im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup> rechts, MPO: grün, Maßstab = 300 µm



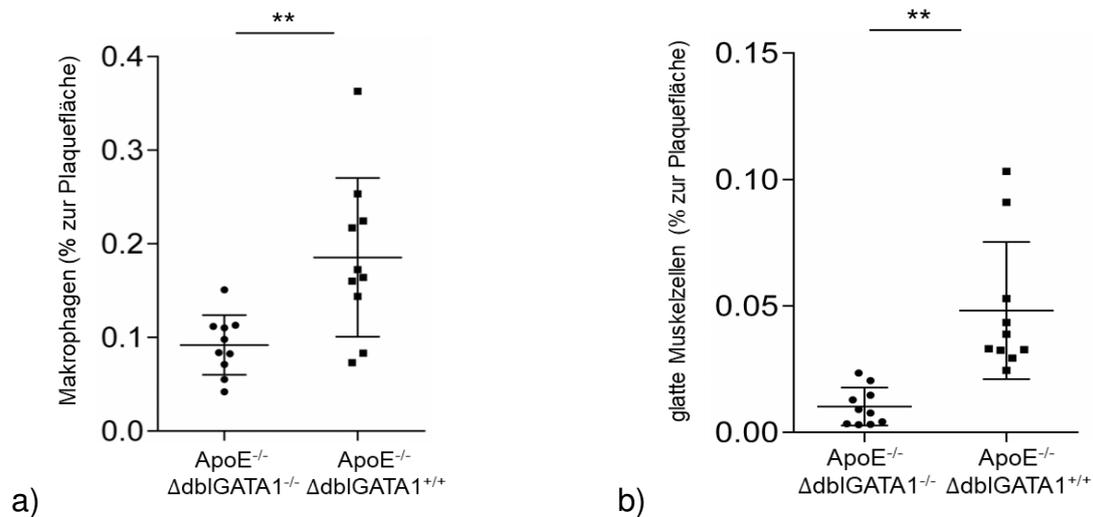
**Abbildung 13: Mittels MPO-Färbung ermittelte relative Fläche an Neutrophilen**

ApoE<sup>-/-</sup>ΔdblGATA1<sup>-/-</sup> (n=10) vs. ApoE<sup>-/-</sup>ΔdblGATA1<sup>+/+</sup> (n=10), \*\*p < 0,01

#### 4.1.2.2 Verminderte Makrophageneinwanderung und glatte Muskelzellen in Eosinophilen-defizienten Tieren

Neben der atherosklerotischen Plaquetfläche zeigten sich beim Vergleich Eosinophilen-suffizienter mit Eosinophilen-defizienten Mäusen erhebliche Unterschiede bezüglich der in den Plaques anwesenden Zellen. So war die relative Fläche, die in den Läsionen von Makrophagen und glatten Muskelzellen (SMC) eingenommen wurde, bestimmt. Es zeigte sich sowohl in Bezug auf SMC als auch Makrophagen signifikante Unterschiede (Abbildung 10), wobei die von diesen Zellen besetzten Flächenanteile bei den Eosinophil-suffizienten ApoE<sup>-/-</sup>ΔdblGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant grösser waren.

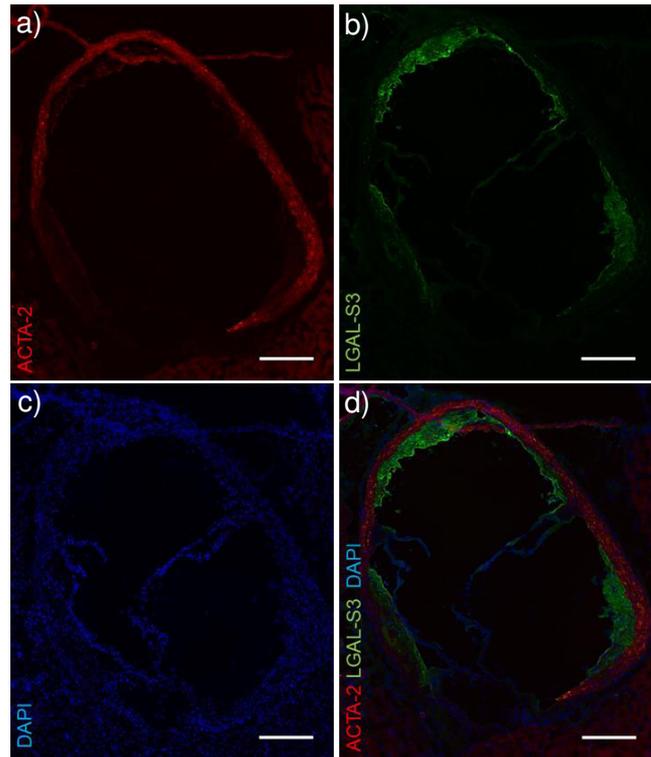
## Ergebnisse



**Abbildung 14: Mittels LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus ermittelte relative Flächen an a) Makrophagen b) glatter Muskulatur**

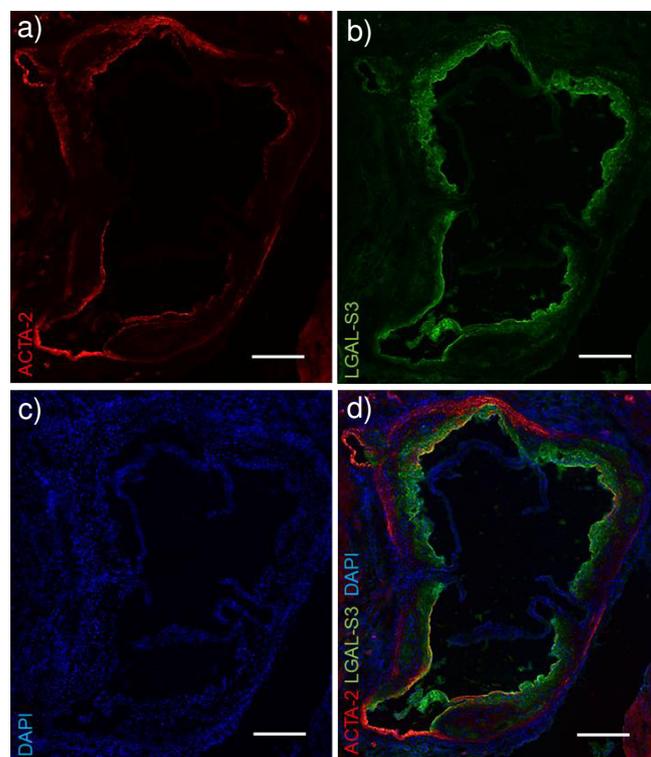
ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>-/-</sup> (n=10) vs. ApoE<sup>-/-</sup>xΔdblGATA1<sup>+/+</sup> (n=10), \*\*p < 0,01

Neben der atherosklerotischen Plaquetfläche weist auch deren Zusammensetzung im Vergleich erhebliche Unterschiede bezüglich der Immunzellen auf. Wie die Auswertung der LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung zeigte, waren bei den Knockout-Mäusen geringere Makrophagenansammlungen vor allem aber deutlich vermindert SMC-Präsenz im Verhältnis zur Gesamtfläche der Läsion zu messen (Abbildung 15). Die relativen Anteile der glatten Muskelzellen (rot) und der durch Makrophagen besiedelten Flächen (grün) bleiben bei der Kontrollgruppe, wie zuvor bei der Plaquetfläche beschrieben, stets auf einem höheren Niveau (Abbildung 16).



**Abbildung 15: LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus einer ApoE<sup>-/-</sup> xΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Maus**

a) SMC: rot, b) Makrophagen: grün, c) Zellkerne: blau, d) Overlay, Maßstab = 300 µm



**Abbildung 16: LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus einer ApoE<sup>-/-</sup> xΔdbIGATA<sup>+/-</sup>-Maus**

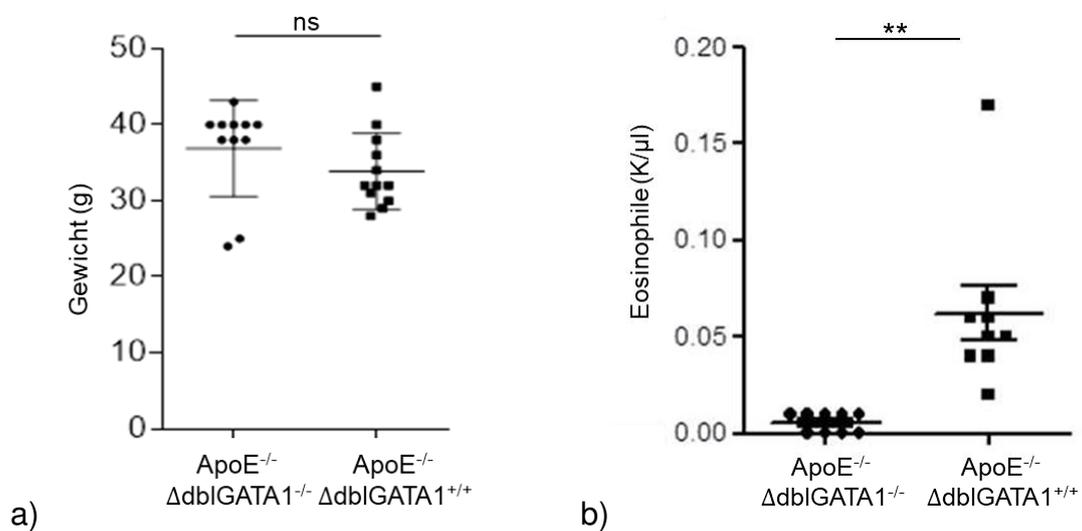
a) SMC: rot, b) Makrophagen: grün, c) Zellkerne: blau, d) Overlay, Maßstab = 300 µm

## Ergebnisse

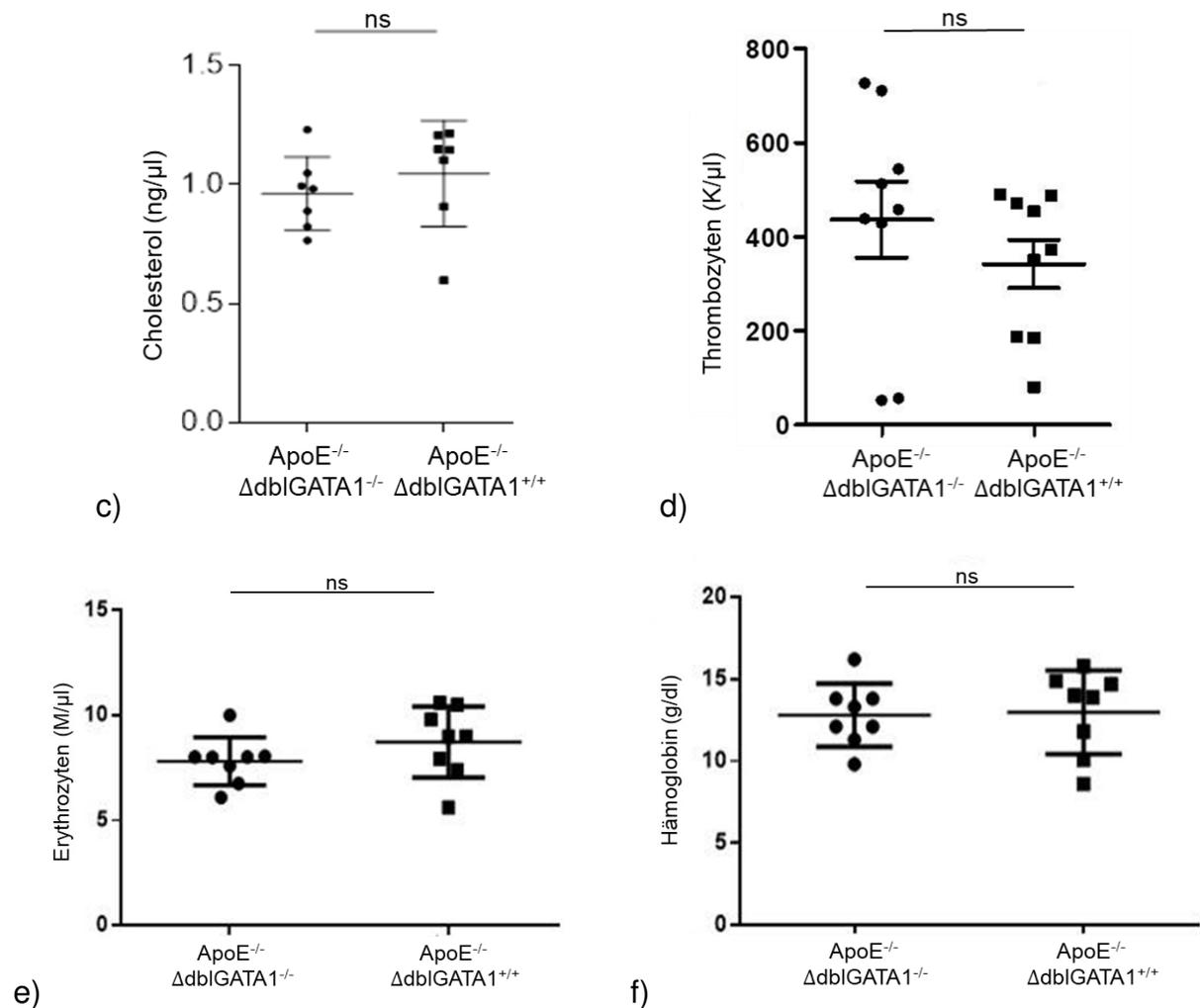
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Eosinophile die Entzündungsreaktion bei Atherosklerose fördern und die Plaquebildung begünstigen, die die Rekrutierung von Immunzellen unterstützt (67,68). Darüber hinaus weist deren Abwesenheit in den Läsionen eher auf eine systemische Wirkung von Eosinophilen als auf eine lokale innerhalb der Plaques selbst hin.

### 4.1.3 Analyse des Körpergewichtes und des peripheren Blutes

Nach 13 Wochen Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung wiesen Eosinophilen-defiziente ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe signifikant geringere Mengen an eosinophilen Granulozyten (Abbildung 17 b) im peripheren Blut auf, während bezüglich Körpergewicht (Abbildung 17 a), Plasma-Cholesterin (Abbildung 17 c), Thrombozyten (Abbildung 17 d), Erythrozyten (Abbildung 17 e) und Hämoglobin (Abbildung 17 f) keine signifikanten Unterschiede detektierbar waren.



## Ergebnisse



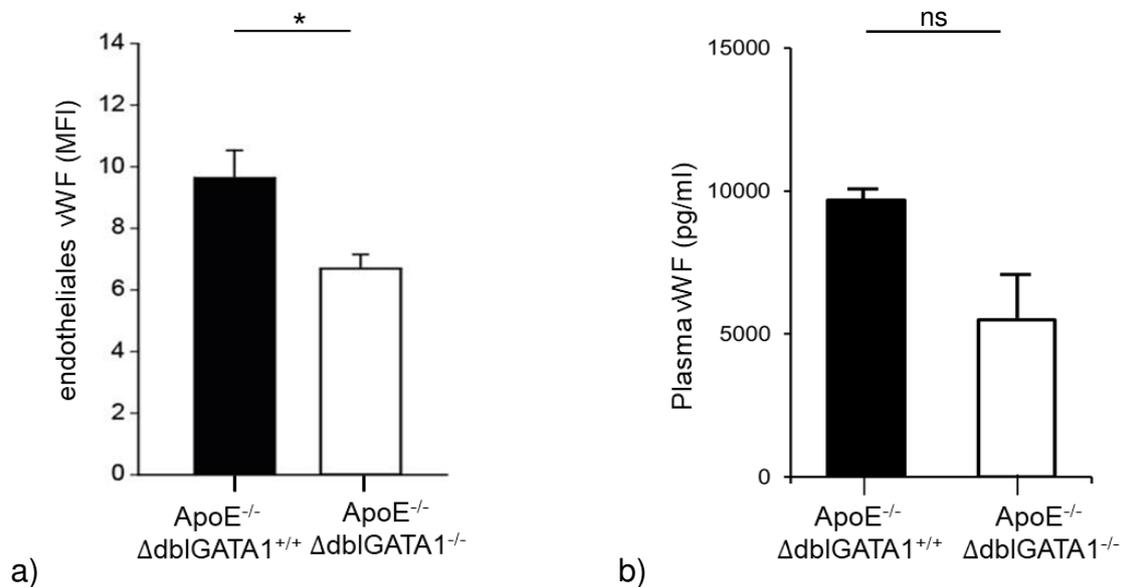
**Abbildung 17: Quantitative Analyse ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>-/-</sup> vs. ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>+/+</sup>**  
 a) Körpergewicht (beide Gruppen n=11), b) eosinophile Granulozyten (beide Gruppen n=9),  
 c) Cholesterin (beide Gruppen n=7), d) Thrombozyten (beide Gruppen n=9), e) Erythrozyten  
 (beide Gruppen n=8), f) Hämoglobin (beide Gruppen n=8), ns = nicht signifikant, \*\*p < 0,01

### 4.1.4 Bedeutung des von-Willebrand-Faktors

Zusätzlich wurde geprüft, inwiefern eosinophile Granulozyten Einfluss auf die Atherogenese nehmen könnten. Da Thrombozyten an der Atheroprogression beteiligt sind, wurde untersucht, ob Eosinophile die Atherosklerose durch eine Steigerung der Thrombozytenadhäsion verstärken können. Eine Determinante der Thrombozytenadhäsion ist die vWF-Exposition am Endothel, welche an der Carotis ermittelt wurde. Die Analyse ergab eine signifikant geringere endotheliale vWF-Exposition bei Eosinophilen-defizienten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 18 a), was sich auch in der Plasmakonzentration des vWFs widerspiegelte (Abbildung 18 b).

## Ergebnisse

Diese Resultate geben Hinweise darauf, dass Eosinophile Atherosklerose u.a. dadurch fördern, dass sie eine erhöhte vWF-Exposition auf Endothelzellen und somit eine verstärkte atherogene Thrombozytenadhäsion an der Gefäßwand bedingen.



### Abbildung 18: vWF-Exposition

a) mittels Immunhistologie ermittelte endothelialer vWF von ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>-/-</sup> (n=16) vs. ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>+/+</sup> (n=13), b) vWF-Plasmakonzentration in ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>-/-</sup> vs. ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdblGATA1<sup>+/+</sup> (beide Gruppen n=5), ns = nicht signifikant, \*p < 0,05

## 4.2 Einfluss der Ernährung auf Eosinophile stimulierende Zytokine

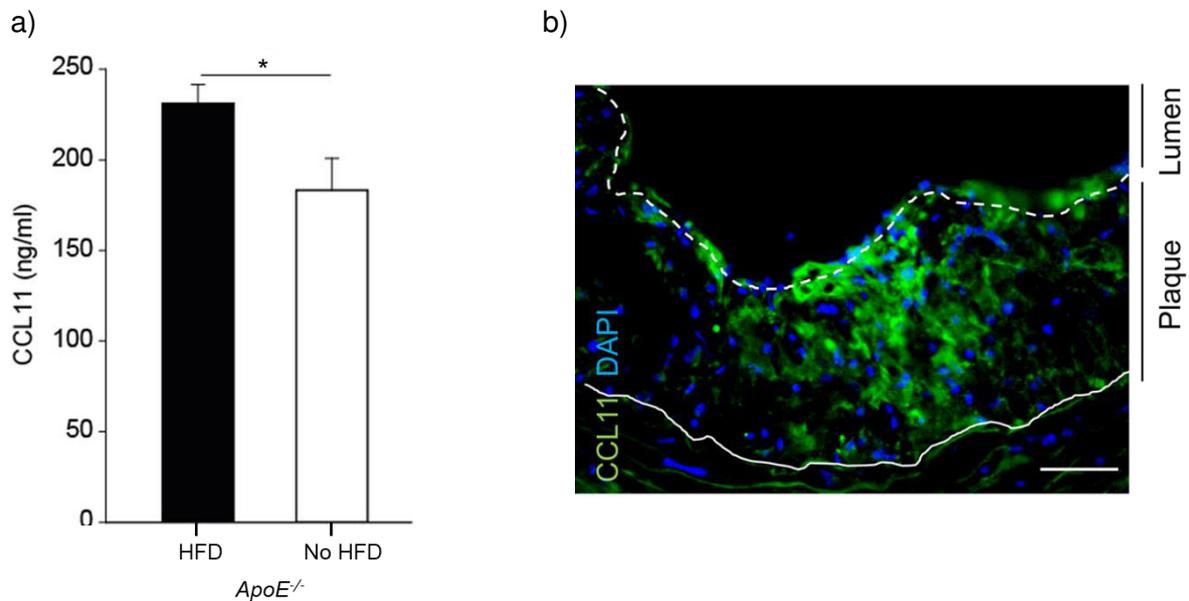
Um zu ermitteln, ob Eosinophile im Rahmen der Atherosklerose aktiviert werden, wurden Eosinophilen-stimulierende Faktoren analysiert. Hierfür wurde eine Gruppe von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen, die 12 Wochen lang mit fettreicher Nahrung gefüttert wurden, mit einer ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrollgruppe verglichen, die 12 Wochen Standardfutter erhielten.

### 4.2.1 Erhöhung der Eotaxin-1-Plasmakonzentration bei fettreicher Ernährung

Eotaxine sind die stärksten Chemoattraktanten eosinophiler Granulozyten (37,69). Als Reaktion auf fettreiche Nahrung resultierte eine signifikant höhere Plasmakonzentration an Eotaxin-1 (CCL11) im Vergleich zu den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Standardfutter (Abbildung 19 a). Zudem war Eotaxin-1 auch in den

## Ergebnisse

arteriosklerotischen Plaques und dem darunter liegenden Endothel nachweisbar (Abbildung 19 b).



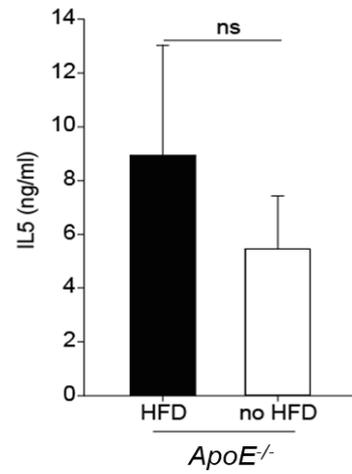
### Abbildung 19 Eotaxin-1

a) Plasmakonzentration *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit High Fat Diet (HFD) vs. Chow Diet (no HFD), beide Gruppen n=5, \*p < 0,05

b) mittels Immunhistologie Nachweis von CCL11: grün in atherosklerotischer Läsion der Aortenwurzel von *ApoE*<sup>-/-</sup>, Endothel (gestrichelte Linie), Lamina elastica interna (durchgezogene Linie), Maßstab = 50 µm

### 4.2.2 Interleukin-5

Interleukin 5 (IL-5) ist der Hauptfaktor, der die terminale Differenzierung eosinophiler Vorläuferzellen fördert (18,37,69). Dieser war in Eosinophilen-suffizienten Mäusen unter fettreicher Nahrung leicht, aber nicht statistisch signifikant erhöht (Abb. 16).

**Abbildung 20: Interleukin-5**

Plasmakonzentration *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit High Fat Diet (HFD) vs. Chow Diet (no HFD), beide Gruppen n=5, ns = nicht signifikant

## **5. Diskussion**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss eosinophile Granulozyten auf die Atheroskleroseentwicklung bei Mäusen hat, die genetisch prädisponiert sind Atherosklerose zu entwickeln. In Übereinstimmung mit der Situation bei Menschen bestimmen Umweltfaktoren wie fettreiches Futter, wie stark die Atherosklerose in einer bestimmten Zeitspanne bei diesen Mäusen ausgebildet ist. Hier konnte gezeigt werden, dass atheroskleroseanfällige Mäuse, die genetisch bedingt keine Eosinophilen produzieren, geringere atherosklerotische Plaques im Aortenbogen aufweisen. Die Plaques enthalten zudem weniger inflammatorische Zellen wie Neutrophile und Makrophagen und zudem weniger glatte Muskelzellen im Vergleich zu atheroskleroseanfällige Mäusen mit Eosinophilen. Die Konzentrationen von endothelialeem und Plasma-vWF waren zudem bei den Tieren ohne Eosinophile geringer als in den Eosinophilen-suffizienten Kontrollen.

### **5.1 Diskussion der Versuchstiere**

Zur Untersuchung der Rolle eosinophiler Granulozyten in der Atherogenese wurde das Versuchstier Maus ausgewählt, da sie sich aufgrund ihrer kurzen Generationsdauer, problemlosen Aufzucht, sowie ihrer einfachen und günstigen Haltung besonders gut eignet. Außerdem ist die Verfügbarkeit von Knockout- und Inzuchtlinien ein Vorteil. Dadurch reichen bereits geringe Gruppengrößen aus, um biologische Effekte ableiten zu können. Andererseits hat die geringe genetische Vielfalt den Nachteil, dass die beobachteten Effekte nicht automatisch auf andere genetische Hintergründe, Spezies oder gar den Menschen übertragen werden können (70–72).

GATA-1 wurde zuerst als ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Entwicklung von Erythrozyten beschrieben (52). Er ist aber auch notwendig, um die Differenzierung von G/M-Vorläuferzellen in Richtung Eosinophile festzulegen, was bedeutet, dass  $\Delta db|GATA1^{-/-}$  Mäuse, die eine Deletion in der für die Entwicklung der Eosinophilen genutzten Bindungsstelle im GATA-1-Promotor haben, selektiv keine Eosinophilen produzieren (18). Diese transgene Mauslinie ist sehr nützlich bei der Untersuchung des Effekts von Eosinophilen auf bestimmte Krankheitsbilder, wie beispielsweise die

## Diskussion

---

Atherosklerose, die im Zentrum der hier vorgestellten Arbeit stand. Genetisch veränderte Organismen haben auch immer die Gefahr der Beeinträchtigung anderer Strukturen als der gewünschten. Die verwendete  $\Delta$ dblGATA1-Linie ist allerdings eine etablierte Mauslinie, deren genetischer Knockout vollständig beschrieben ist (73). Da diese Linie in der Regel keine Atherosklerose entwickelt, wurde sie für die hier vorliegende Arbeit mit ApoE-Knock-out-Mäusen gekreuzt. Die resultierenden  $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden zudem mit einer fettreichen Diät gefüttert, um die Atherogenese zu maximieren.

ApoE-Knock-out-Mäuse exprimieren kein Apolipoprotein E, das normalerweise in der Leber exprimiert wird und dessen Funktion die Aufnahme von Lipidproteinen aus dem Blut ist (53). ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse haben daher eine Dyslipidämie und sind besonders anfällig für Atherosklerose, insbesondere, wenn sie fettreich ernährt werden. Erste Läsionen an der Aortenwurzel können bereits nach 6 Wochen cholesterinreicher Nahrung nachgewiesen werden und entwickeln sich im Verlauf von 15 Wochen zu reifen atherosklerotischen Plaques (53). Die in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzten  $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse haben zum einen die Anfälligkeit, atherosklerotische Plaques zu entwickeln, die durch den Knock-out des *ApoE*-Gens vermittelt wird. Zum anderen haben sie durch den  $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup> Genotyp keine Eosinophilen. Daher erlaubt der Vergleich zwischen  $\Delta$ dblGATA1<sup>+/+</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen und  $\Delta$ dblGATA1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen Rückschlüsse auf die Wirkung von Eosinophilen bei der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques im Mausmodell, was die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist.

$\Delta$ dblGATA1-Mäuse basieren auf einem BalbC-Hintergrund, während die ApoE-Tiere von Mäusen mit C57BL/6J-Hintergrund abstammen. Deren Verpaarung bedingt eine größere genetische Variabilität, wodurch auch die Inhomogenität innerhalb der Gruppe erhöht ist. Dies wurde bereits in einem Asthmodell beobachtet, in dem phänotypische Unterschiede zwischen C57BL/6- und BalbC-Mäusen mit unterschiedlicher Verteilung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Entzündungszellen resultierten (74).

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Eosinophile Granulozyten tragen zur Bildung atherosklerotischer Plaques bei. Arterielle Thrombosen sind eine lebensbedrohliche Komplikation der Atherosklerose (54). Beiden liegt eine sterile inflammatorische Komponente zugrunde, bei der auch Eosinophile eine Rolle spielen, die jedoch bisher nur unzureichend verstanden wird (75,76). Bei Menschen konnte beispielsweise in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass die Anzahl der Eosinophilen im peripheren Blut positiv mit dem Vorkommen der koronaren Herzerkrankung und von thrombotischen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt assoziiert ist (45,67,77). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass Eosinophile an der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques ursächlich beteiligt sind und daher Tiere ohne Eosinophile gegenüber der Entwicklung atherosklerotischer Plaques ganz oder teilweise resistent sind. Entsprechend dieser Erwartung hatten ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Mäuse nach 13 Wochen fettreicher Ernährung eine signifikant geringere Plaquesfläche im Aortenbogen im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen. Dass sie dennoch atherosklerotische Plaques entwickeln, zeigt allerdings, dass Eosinophile wohl bei der Entwicklung der Plaques eine Rolle spielen, jedoch auch andere komplementäre Faktoren daran beteiligt sind.

Interessanterweise zeigte die Siglec-F-Färbung, die spezifisch Eosinophile anfärbt, dass die Plaques keine Eosinophilen enthielten. Dieser überraschende Befund war bereits in der Vergangenheit für stabile humane atherosklerotische Plaques berichtet worden (41,78). Das Chemokin RANTES, von dem bekannt ist, dass es für eosinophile Granulozyten chemotaktisch wirkt, wird jedoch durch zirkulierende Thrombozyten auf der Plaquesoberfläche abgelagert, die durch Chemokinabgabe die Atherosklerose verschlimmern (80–82). Eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von Eosinophilen in den Plaques ist die relativ kurze Lebenszeit der Eosinophilen *in vivo*, die mit einer Halbwertszeit von 8–18 h angegeben wird (79). Es ist denkbar, dass Eosinophile an der ursprünglichen Formation der atherosklerotischen Plaques beteiligt sind, aber sobald die Plaques etabliert sind, absterben. Darüber hinaus ist Eotaxin, das ein bekanntes spezifisches Chemoattraktant und Aktivator von Eosinophilen ist, in atherosklerotischen Plaques stark überexprimiert (42), was in der vorliegenden Studie bestätigt wurde. Rupturierte, entzündete oder thrombotische

## Diskussion

---

Plaques enthalten dagegen Eosinophile (41). Dabei ist es möglich, dass Umweltfaktoren, wie fettreiche Ernährung, dazu beitragen, dass die Plaques von der stabilen in die instabile, rupturierte Form evolvieren. Auf der anderen Seite weist das Fehlen von Eosinophilen in stabilen atherosklerotischen Plaques möglicherweise auf eine systemische Wirkung hin (54).

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass in dieser Studie an einem etablierten Mausmodell der Atherosklerose ein atherogener Effekt von Eosinophilen nachgewiesen werden konnte. Dies wurde in dieser Arbeit aber nicht an anderen Eosinophilen-defizienten Stämmen wie der PHIL-Mäuse untersucht (83).

### 5.2.2 Analyse der atherosklerotischen Plaques – weniger inflammatorische Zellen ohne Eosinophile

Granulozyten stellen 50% der Leukozyten dar, wobei neutrophile Granulozyten den Hauptanteil ausmachen (44). Sie wurden in der Vergangenheit mit atherosklerotischen Plaques assoziiert (84–86), weswegen auch in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob sie in den Plaques vorkommen und ob die An- oder Abwesenheit von Eosinophilen im Tier einen Einfluss auf ihre Anzahl in den Plaques hat.

Sowohl in ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup> also auch in ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten in den Plaques neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden, allerdings war der prozentuale Anteil von Neutrophilen an der Gesamtfläche der Plaques bei eosinophil-suffizienten ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant höher. Eosinophile produzieren selbst eine Vielzahl chemotaktisch wirksamer Substanzen (30,35). Zudem produzieren Eosinophile ET (41), die als Gerüstmaterial möglicherweise chemotaktische Substanzen anderen Ursprungs binden und an atherosklerotischen Plaques halten können. Es ist daher denkbar, dass die Anwesenheit von Eosinophilen notwendig ist, um Neutrophile in die Plaques zu rekrutieren und dies zu einer Vergrößerung der Plaques führt. Eine andere Möglichkeit ist, dass Eosinophile eher systemisch wirken und so insgesamt ein systemisches inflammatorisches Milieu schaffen, das lokale Entzündungsreaktionen begünstigt, was die Abwesenheit von Eosinophilen selbst in den atherosklerotischen Plaques erklären würde.

## Diskussion

---

Andere Zellpopulationen konnten ebenfalls in verschiedenen publizierten Studien in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass Galectin-3-Expression in atherosklerotischen Plaques Monozyten und Makrophagen chemotaktisch in die Plaques rekrutiert, mit diesen Zellen co-lokalisiert und seine Inaktivierung sowohl zu einer Reduktion der Makrophagenzahlen in den Plaques als auch zu einer Verringerung der Plaquefläche führt (65,87,88). Ob die Anwesenheit von Eosinophilen die Rekrutierung von Makrophagen beeinflusst, ist jedoch nicht bekannt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Makrophageneinwanderung in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Eosinophilen in den Tieren untersucht. In GATA<sup>+/+</sup>-suffizienten Tieren, die Eosinophile besitzen, konnten dabei signifikant mehr Makrophagen nachgewiesen werden als in ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen. Auch hier stellt sich die Frage, ob Makrophagen direkt durch Faktoren rekrutiert werden, die von Eosinophilen produziert werden oder ob Eosinophile dagegen eher in der Erzeugung einer inflammatorischen Umgebung mitwirken, in der andere Zellen auf Makrophagen wirkende chemotaktische Substanzen produzieren.

Glatte Muskelzellen proliferieren in atherosklerotische Plaques und tragen zur Pathogenese bei. Dabei spielen Eotaxin und andere mit Eosinophilen assoziierte Substanzen eine wesentliche Rolle (42,66,89,90). So konnten beispielsweise Kodali et al (2004) zeigen, dass Eotaxin chemotaktisch auf glatte Muskelzellen wirkt und diesen dabei dieselben Rezeptoren (CCR3) verwenden, wie Eosinophile (90). Eotaxin ist in atherosklerotischen Plaques überexprimiert (42), wobei Makrophagen und Fibroblasten in den Plaques die Hauptproduzenten von Eotaxin sind (91). Das Major Basic Protein, das in den Granula der Eosinophile in hoher Konzentration vorkommt, erhöht die Reaktivität von glatte Muskelzellen, was beispielsweise bei Asthma mit zur Pathologie beiträgt (37,69). Effekte zwischen Eosinophilen und glatten Muskelzelle können also in den atherosklerotischen direkt durch von Eosinophilen produzierten Effektorstoffen oder indirekt durch von ihnen produzierte auf Makrophagen und andere Immunzellen und Fibroblasten chemotaktisch und aktivierende wirkende Botenstoffe hervorgerufen werden.

Es konnte daher erwartet werden, dass auch in Bezug auf den prozentualen Anteil der von glatten Muskelzellen bedeckten Fläche der atherosklerotischen Plaques ein

## Diskussion

---

signifikanter Unterschied zwischen Eosinophil-suffizienten und -defizienten Tieren besteht. Die experimentellen Daten der hier vorliegenden Arbeit bestätigten diese Annahme. Die von glatten Muskelzellen bedeckte Fläche in atherosklerotischen Plaques war in Eosinophil-suffizienten ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant größer als in Eosinophil-defizienten ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Eosinophile die Entzündungsreaktion bei Atherosklerose fördern und die Plaquebildung begünstigen, die die Rekrutierung von Immunzellen unterstützt (67,68).

### 5.2.3 Endotheliale Aktivierung durch Eosinophile verstärkt die Thrombozytenadhäsion in Atherosklerose

In atherosklerotischen Plaques kann exponierter endothelialer vWF Thrombozyten an die Plaqueoberfläche rekrutieren, die dann zu einer Vergrößerung der Plaques sorgen. vWF- defiziente Mäuse haben entsprechend eine gewisse Resistenz gegenüber Atherosklerose (92). Eosinophile können die Exposition von vWF verstärken. Auf der anderen Seite rekrutieren aktivierte an vWF-gebundene Thrombozyten Eosinophile, die dadurch wiederum aktiviert werden (54).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde daher erwartet, dass in ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Mäusen weniger endothelial exponierter vWF nachweisbar ist als in ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>+/+</sup>-Mäusen. Die Ergebnisse bestätigten diese Erwartung und zeigen gleichzeitig die Möglichkeit auf, dass die geringere Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten in den Plaques einer der Mechanismen ist, über die ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA<sup>-/-</sup>-Mäuse vor der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques zumindest teilweise geschützt sind.

Diese Resultate geben Hinweise darauf, dass Eosinophile Atherosklerose u.a. dadurch fördern, dass sie eine erhöhte vWF-Exposition auf Endothelzellen und somit eine verstärkte atherogene Thrombozytenadhäsion an der Gefäßwand bedingen. Der vWF vermittelt über GPIIb/IIIa auf Thrombozyten deren Adhäsion am Endothel. Aktivierte Thrombozyten rekrutieren zahlreiche Leukozyten, dabei hauptsächlich Makrophagen und Granulozyten, aber auch Lymphozyten in die Läsion (93). Auch Eosinophile werden von aktivierten Thrombozyten verstärkt rekrutiert(54).

Da Eosinophile-suffiziente Mäuse in der hier vorliegenden Arbeit auch erhöhte Plasmakonzentrationen von vWF im Vergleich zu den Eosinophil-defizienten Mäusen hatten, kann zudem von einer systemischen Aktivierung des Endothels ausgegangen werden. Diese erlaubt Thrombozyten, sich an atherosklerotischen Plaques anzulagern und nicht-aktivierte Thrombozyten zu rekrutieren, wodurch ein Teufelskreis entsteht. Zum anderen können aktivierte Thrombozyten im Blutstrom an Monozyten binden, sie aktivieren und mit ihnen Aggregate bilden, die ebenfalls zur Vergrößerung von atherosklerotischen Plaques beitragen können (82). Eosinophile können auch direkt über EET in den Plaques mit Thrombozyten interagieren und diese aktivieren.

#### 5.2.4 Erhöhung der Eotaxin-1 Expression durch fettreiche Ernährung

Das wichtigste Zytokin für Eosinophile ist Eotaxin (35). Es wirkt hauptsächlich chemotaktisch (37,69). Bei Eosinophil-suffizienten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren konnte eine signifikant höhere Plasmakonzentration festgestellt werden, wenn sie mit fettreicher Nahrung gefüttert wurden. Da dies nicht unbedingt bedeutet, dass Eotaxin auch in den atherosklerotischen Plaques vermehrt vorhanden ist, wurde auch dies untersucht und konnte dort sowohl in den Plaques selbst als auch im darunter liegenden Endothel nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass Eotaxin zumindest teilweise für Proliferation von glatten Muskelzellen in den atherosklerotischen Plaques verantwortlich ist, da in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass glatte Muskelzellen in Plaques zum einen den Eotaxin-Rezeptor CCR3 exprimieren und zum anderen Eotaxin auch auf diese Zellart chemotaktisch wirkt (90).

Das Eotaxin wird wahrscheinlich in den atherosklerotischen Plaques selbst von den dort anwesenden Makrophagen produziert. Diese sorgen zudem für ein entzündliches Milieu, in dem auch Fibroblasten Eotaxin produzieren (91). Fettreiche Nahrung wirkt also sowohl in diesem Tiermodell als auch in aller Wahrscheinlichkeit beim Menschen als erster Schritt in einem Teufelskreis, in dem in atherosklerotischen Plaques ein entzündlicher Prozess beginnt, der sich mittels positiver Rückkopplung selbst stetig steigert.

In der Differenzierung der Eosinophilen-Vorläuferzellen ist Interleukin 5 (IL-5) der Hauptfaktor, der die letzten Differenzierungsschritte induziert (18,37,69). Die

Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten nur eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung der Plasmakonzentration dieses Faktors bei Tieren, die mit fettreicher Nahrung gefüttert wurden. Dies könnte so interpretiert werden, dass die Differenzierung von neuen Eosinophilen eine geringere Rolle in der Atherosklerose spielt. Allerdings waren die Eosinophilenzahlen im peripheren Blut gegenüber Tieren unter Standardfutter signifikant erhöht. Um diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären, könnte vermutet werden, dass Atherosklerose die Lebensspanne der Eosinophilen verlängert. Dadurch würden sich die Eosinophilenzahlen im peripheren Blut bei gleichbleibenden Eosinophilenproduktion erhöhen. Dafür gibt es keine experimentellen Hinweise (16,24). Es ist daher eher wahrscheinlich, dass das Plasma wenig aufschlussreich ist für die Zytokinumgebung, die für die Differenzierung von Eosinophilen im Knochenmark wichtig ist. Eine Untersuchung der Zytokinexpression im Knochenmark, die aller Wahrscheinlichkeit nach eine signifikant erhöhte IL-5-Expression gezeigt hätte, ist allerdings methodisch sehr viel aufwendiger und diese Untersuchung wäre über den Rahmen der hier vorgestellten Arbeit hinausgegangen.

### **5.3 Fazit und Ausblick**

Über lange Zeit wurden Eosinophile als Effektorzellen betrachtet, die in der Entstehung von Asthma eine wichtige Rolle spielen. In neuerer Zeit wurde nicht nur eine Korrelation mit Eosinophilenzahlen, Asthma und Atherosklerose erkannt, sondern es wird auch immer klarer, dass Eosinophile nicht nur als Effektorzellen wirken, sondern andere Zellen aktivieren und durch die Produktion von chemotaktisch wirksamen Molekülen in die atherosklerotischen Läsionen bringen können. Die Daten in der hier vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass Eosinophile in der Entstehung und Weiterentwicklung von atherosklerotischen Plaques eine wichtige Rolle spielen. Die genauen molekularen Prozesse, die hierbei wichtig sind, sind aber noch immer ungeklärt. Wahrscheinlich wirken sich hier verschiedene von Eosinophilen produzierte Stoffe synergistisch aus. Diese verschiedenen Effektorwege genauer zu untersuchen sollte der Fokus zukünftiger Forschung sein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, dass keine

## Diskussion

---

Eosinophile produzieren kann. Für die zukünftige Forschung wäre es denkbar Mausmodelle zu verwenden, die zwar Eosinophile produzieren, die aber defizient für bestimmte Eosinophilenfunktionen sind und die Atheroskleroseentwicklung in diesen Tieren mit der in Tieren mit voll funktionsfähigen Eosinophilen vergleicht. Beispielsweise ist es bekannt, dass das Major Basic Protein aktivierend auf glatte Muskelzellen wirkt und glatte Muskelzellen die Weiterentwicklung von atherosklerotischen Plaques fördert. Atherosklerotische Plaques in Tieren mit Major Basic Protein-defizienten Eosinophilen könnten daher möglicherweise in einem früheren Stadium gestoppt bleiben. Eine weitere interessante Studie könnte untersuchen, ob sich extrazelluläre Traps durch intravenöse DNase-Gabe reduzieren lassen und ob sich dies auf die Atherosklerose auswirkt.

## 6. Zusammenfassung

Atherosklerose ist die Grunderkrankung, die zu einer Vielzahl verschiedener thromboembolischer Erkrankungen führen kann, die in der Form von Myokardinfarkten und Schlaganfällen die Haupttodesursache in Industrienationen darstellt. Während in der Vergangenheit die Einlagerung von Cholesterol aus der Nahrung und bei entsprechender genetischer Veranlagung als Hauptursache betrachtet wurde, was sicherlich immer noch eine Rolle spielt, ist heute bekannt, dass entzündliche Prozesse ebenso wesentlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind. Eosinophile, die früher lediglich als Effektorzellen bekannt waren, haben sich in letzter Zeit immer mehr als Zellen etabliert, die eine Entzündungsreaktion nicht nur fördern, sondern auch perpetuieren können.

Um den Einfluss von Eosinophilen auf die Atherosklerose zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse, die eine genetisch bedingte Atherosklerosesuszeptibilität besitzen, mit GATA1<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt, die keine Eosinophile produzieren können. Die resultierenden ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA1<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten nach Fütterung mit fettreicher Nahrung signifikant weniger atherosklerotische Plaques sowohl im Aortenbogen als auch auf Klappenebene als Eosinophil-suffiziente ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA1<sup>+/+</sup>-Kontrollmäuse, obwohl Faktoren wie Plasmacholesterol, Thrombozyten- und Erythrozytenzahlen sowie Hämoglobin zwischen den beiden Mäusestämmen gleich waren. Außerdem zeigten sie einen höheren Prozentsatz an Neutrophilen und Makrophagenfläche und der Fläche an glatten Muskelzellen im Vergleich zur atherosklerotischen Läsionsfläche. Bei ApoE<sup>-/-</sup>xΔdbIGATA1<sup>+/+</sup>-Mäusen konnte zudem mehr vWF in den atherosklerotischen Plaques und im Plasma detektiert werden, was auf eine vermehrte Thrombozyten-Rekrutierung und -Aktivierung hinweist, die ebenso in der Pathogenese der atherosklerotischen Plaques eine Rolle spielt.

Die Untersuchung von Eosinophil-suffizienten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, die entweder mit fettreicher Nahrung oder Standardnahrung gefüttert wurden, zeigt zudem, dass eines der wichtigsten Zytokine für Eosinophile durch fettreiche Nahrung induziert wird, was die Rolle von Eosinophilen bei der Atherosklerose weiter unterstreicht.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen - Statistisches Bundesamt [Internet]. Destatis. 2021 [cited 2021 Apr 19]. p. 1. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>
2. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017/05/22. 2017;70(1):1–25.
3. Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M, et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*. 2015/10/28. 2015;132(17):1667–78.
4. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov;3(11):e442.
5. Lusis AJ. Atherosclerosis. Vol. 407, *Nature*. 2000. p. 233–41.
6. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1999;340(2):115–26. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199901143400207>
7. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Mar;35(3):485–91.
8. Jodas DS, Pereira AS, Tavares JMRS. A review of computational methods applied for identification and quantification of atherosclerotic plaques in images. *Expert Syst Appl*. 2016 Mar;46:1–14.
9. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis a chronic inflammatory disease with an autoimmune component. *Circ Res*. 2018;123(10):1118–20.
10. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Vol. 420, *Nature*. 2002. p. 868–74.
11. Poredos P, Poredos P, Jezovnik MK. Structure of Atherosclerotic Plaques in

- Different Vascular Territories: Clinical Relevance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017 Feb;16(2):125–9.
12. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. Vol. 13, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 368–80.
  13. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011/11/09. 2011;17(11):1410–22.
  14. National Cancer Institute. Scanning Electron Microscope Image of Blood Cells: Image Details - NCI Visuals Online. Visuals online. 2001. p. 1.
  15. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. In: *Myeloid Cells in Health and Disease*. American Society of Microbiology; 2016. p. 3–15.
  16. Steinbach KH, Schick P, Trepel F, Raffler H, Döhrmann J, Heilgeist G, et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut*. 1979;39(1):27–38.
  17. Kristine Krafts. Blood . PPT-Video publication ion slide player.
  18. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Eosinophil Development, Disease Involvement, and Therapeutic Suppression. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2018. p. 1–34.
  19. Iwasaki H, Mizuno SI, Mayfield R, Shigematsu H, Arinobu Y, Seed B, et al. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med*. 2005 Jun;201(12):1891–7.
  20. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: Revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med*. 2009 Jan;206(1):183–93.
  21. Rigoni A, Colombo MP, Pucillo C. Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. Vol. 35, *Seminars in Immunology*. Academic Press; 2018. p. 29–34.
  22. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. Vol. 6,

- Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol*; 2006. p. 173–82.
23. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Vol. 11, *Nature Reviews Immunology*. 2011. p. 519–31.
  24. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. Vol. 31, *Trends in Immunology*. *Trends Immunol*; 2010. p. 318–24.
  25. Crawford J, Dale DC, Lyman GH. Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management. Vol. 100, *Cancer*. *Cancer*; 2004. p. 228–37.
  26. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
  27. Olivera A, Rivera J. Paradigm shifts in mast cell and basophil biology and function: An emerging view of immune regulation in health and disease. *Methods Mol Biol*. 2020;2163:3–31.
  28. Borriello F, Iannone R, Marone G. Histamine release from mast cells and basophils. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Science and Business Media, LLC; 2017. p. 121–39.
  29. Schwartz C, Eberle JU, Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2016 May;778:90–5.
  30. Ravin KA, Loy M. The eosinophil in infection. Vol. 50, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Humana Press Inc.; 2015. p. 214–27.
  31. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 746–60.
  32. Leiferman KM, Peters MS. Eosinophil-Related Disease and the Skin. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018 Sep;6(5):1462-1482.e6.
  33. Van Hulst G, Batugedara HM, Jorssen J, Louis R, Bureau F, Desmet CJ. Eosinophil diversity in asthma. Vol. 179, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier

- Inc.; 2020.
34. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of Eosinophils to Human Health and Disease. Vol. 15, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. Annual Reviews Inc.; 2020. p. 179–209.
  35. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. Vol. 24, Annual Review of Immunology. 2006. p. 147–74.
  36. Chusid MJ. Eosinophils: Friends or Foes? Vol. 6, Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; 2018. p. 1439–44.
  37. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. Vol. 2018, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2018.
  38. Rodrigo-Muñoz JM, Sastre B, Cañas JA, Gil-Martínez M, Redondo N, Del Pozo V. Eosinophil response against classical and emerging respiratory viruses: Covid-19. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2021;31(2):94–107.
  39. Ueki S, Tokunaga T, Fujieda S, Honda K, Hirokawa M, Spencer LA, et al. Eosinophil ETosis and DNA Traps: a New Look at Eosinophilic Inflammation. Vol. 16, Current Allergy and Asthma Reports. Current Medicine Group LLC 1; 2016.
  40. Mukherjee M, Lacy P, Ueki S. Eosinophil extracellular traps and inflammatory pathologies-untangling the web! *Front Immunol*. 2018 Nov;9(NOV).
  41. Pertiwi KR, de Boer OJ, Mackaaij C, Pabittei DR, de Winter RJ, Li X, et al. Extracellular traps derived from macrophages, mast cells, eosinophils and neutrophils are generated in a time-dependent manner during atherothrombosis. *J Pathol*. 2019 Apr;247(4):505–12.
  42. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG, et al. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation*. 2000/11/01. 2000;102(18):2185–9.

43. Verdoia M, Schaffer A, Casseti E, Di Giovine G, Marino P, Suryapranata H, et al. Absolute eosinophils count and the extent of coronary artery disease: a single centre cohort study. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;39(4):459–66.
44. Kounis NG, Soufras GD, Tsigkas G, Hahalis G. White blood cell counts, leukocyte ratios, and eosinophils as inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Clin Appl Thromb*. 2015;21(2):139–43.
45. Gao S, Deng Y, Wu J, Zhang L, Deng F, Zhou J, et al. Eosinophils count in peripheral circulation is associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2019 Jul;286:128–34.
46. Liu CL, Zhang JY, Shi GP. Interaction between allergic asthma and atherosclerosis. Vol. 174, *Translational Research*. Mosby Inc.; 2016. p. 5–22.
47. Getz GS, Reardon CA. Animal models of Atherosclerosis. Vol. 32, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012. p. 1104–15.
48. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017 Dec;816:3–13.
49. Lee YT, Lin HY, Chan YWF, Li KHC, To OTL, Yan BP, et al. Mouse models of atherosclerosis: A historical perspective and recent advances. Vol. 16, *Lipids in Health and Disease*. BioMed Central Ltd.; 2017.
50. Caiulo A, Nicolis S, Bianchi P, Zuffardi O, Bardoni B, Maraschio P, et al. Mapping the gene encoding the human erythroid transcriptional factor NFE1-GF1 to Xp11.23. *Hum Genet*. 1991;86(4):388–90.
51. Shimizu R, Yamamoto M. GATA-related hematologic disorders. Vol. 44, *Experimental Hematology*. Elsevier Inc.; 2016. p. 696–705.
52. Katsumura KR, DeVilbiss AW, Pope NJ, Johnson KD, Bresnick EH. Transcriptional mechanisms underlying hemoglobin synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(9).
53. Wang YX. Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice. In: *Neurobiology of Aging*.

- Neurobiol Aging; 2005. p. 309–16.
54. Marx C, Novotny J, Salbeck D, Zellner KR, Nicolai L, Pekayvaz K, et al. Eosinophil-platelet interactions promote atherosclerosis and stabilize thrombosis with eosinophil extracellular traps. *Blood* [Internet]. 2019;134(21):1859–72. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood.2019000518>
55. Centa M, Ketelhuth DFJ, Malin S, Gisterå A. Quantification of atherosclerosis in mice. *J Vis Exp*. 2019 Jun;2019(148):59828.
56. Fredrick Cornhill J, Roach MR. A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta. *Atherosclerosis*. 1976 May;23(3):489–501.
57. Nunnari JJ, Zand T, Joris I, Majno G. Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Exp Mol Pathol*. 1989/08/01. 1989;51(1):1–8.
58. Andres-Manzano MJ, Andres V, Dorado B. Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root. *Methods Mol Biol*. 2015/10/09. 2015;1339:85–99.
59. Duerr JS. Immunohistochemistry. *WormBook : the online review of C. elegans biology*. *WormBook*; 2006. p. 1–61.
60. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 289–98.
61. Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. Vol. 51, *Veterinary Pathology*. *Vet Pathol*; 2014. p. 42–87.
62. Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. *Histotechnik*. Springer Wien; 2013. 444 p.
63. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. Vol. 640, *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

- Academic Press Inc.; 2018. p. 47–52.
64. Arar C, Gaudin JC, Capron L, Legrand A. Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1998/08/04. 1998;430(3):307–11.
65. Nachtigal M, Al-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M. Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1998 May;152(5):1199–208.
66. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(9):3739–43.
67. Tenekecioglu E, Yilmaz M, Bekler A, Demir S. Eosinophil count is related with coronary thrombus in non ST-elevated acute coronary syndrome. *Biomed Pap.* 2015 Jul;159(2):266–71.
68. Kitano T, Nezu T, Shiromoto T, Kubo S, Uemura J, Wada Y, et al. Association between Absolute Eosinophil Count and Complex Aortic Arch Plaque in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2017 Apr;48(4):1074–6.
69. Wen T, Rothenberg ME. The Regulatory Function of Eosinophils. *Microbiol Spectr.* 2016 Oct;4(5):257–69.
70. Barnabei MS, Palpant NJ, Metzger JM. Influence of genetic background on ex vivo and in vivo cardiac function in several commonly used inbred mouse strains. *Physiol Genomics.* 2010/07/16. 2010;42a(2):103–13.
71. Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet.* 2006/12/19. 2007;8(1):58–69.
72. van den Borne SW, van de Schans VA, Strzelecka AE, Vervoort-Peters HT, Lijnen PM, Cleutjens JP, et al. Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009/06/23. 2009;84(2):273–82.
73. Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al. Targeted

- deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* [Internet]. 2002;195(11):1387–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045237>
74. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*. 2009/06/10. 2009;58(12):845–54.
75. P J, DZ W, YL R, JP C, BX C. Significance of eosinophil accumulation in the thrombus and decrease in peripheral blood in patients with acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis*. 2015 Mar;26(2):101–6.
76. Uderhardt S, Ackermann JA, Fillep T, Hammond VJ, Willeit J, Santer P, et al. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *J Exp Med*. 2017 Jul;214(7):2121–38.
77. DF G, US B, E H, A H, P S, GM J, et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet*. 2009 Mar;41(3):342–7.
78. Dijk RA van, Rijs K, Wezel A, Hamming JF, Kolodgie FD, Virmani R, et al. Systematic Evaluation of the Cellular Innate Immune Response During the Process of Human Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2016;5(6):e002860. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/JAHA.115.002860>
79. Park YM, Bochner BS. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010 Apr;2(2):87.
80. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*. 1993/04/15. 1993;150(8 Pt 1):3442–8.
81. Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*. 1992/08/01. 1992;176(2):587–92.

82. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2002/12/17. 2003;9(1):61–7.
83. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science (80- )*. 2004/09/18. 2004;305(5691):1773–6.
84. Megens RTA, Vijayan S, Lievens D, Döring Y, van Zandvoort MAMJ, Grommes J, et al. Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. *Vol. 107, Thrombosis and Haemostasis.* 2012. p. 597–8.
85. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Vol. 17, Nature Reviews Cardiology.* Nature Research; 2020. p. 327–40.
86. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2045–51.
87. Papaspyridonos M, McNeill E, De Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, et al. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):433–40.
88. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol.* 2008;172(1):247–55.
89. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995/11/01. 1995;96(5):2322–30.
90. Kodali RB, Kim WJH, Galaria II, Miller C, Schechter AD, Lira SA, et al. CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jul;24(7):1211–6.
91. Diny NL, Hou X, Barin JG, Chen G, Talor M V, Schaub J, et al. Macrophages

- and cardiac fibroblasts are the main producers of eotaxins and regulate eosinophil trafficking to the heart. *Eur J Immunol* [Internet]. 2016/10/25. 2016;46(12):2749–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27621211>
92. Methia N, André P, Denis C V, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood*. 2001/08/25. 2001;98(5):1424–8.
93. WC S, M M, M S, A A. Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis*. 2020 Aug;307:109–20.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Kälberserum Albumin
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CCL	Chemokine ligand
CCR	Chemokine receptor
CD	Cluster of Differentiation
CSF-1	Colony-stimulating factor -1
CX3CR1	(CX3CL1)-CX3C-chemokine receptor 1
DC	Dendritische Zellen
EET	Eosinophile ET
ET	extracellular traps
ETosis	extracellular trap cell death
FOG-1	Friend of GATA-1
G/M	Granulozyten/Makrophagen
HDL	High-Density-Lipoprotein
HFD	High fat diet
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IRF8	Interferon regulatory factor 8
KLF	Krüppel-like family of transcription factors
LDL	Low Density Lipoprotein
LGAL-S3	Galectin-3
M-CSF	Macrophage-colony stimulation factor
MPO	Myeloperoxidase
PECAM	Platelet endothelial adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
SD	Standard diet
SMC	Glatte Muskelzellen
TierSchG.	Deutsches Tierschutzgesetz
TLR	Toll-like Rezeptoren
TRIB1	Tribbles homolog 1
VCAM	Vascular adhesion molecule
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

$\Delta$ dbIGATA1<sup>-/-</sup> $\Delta$ dbIGATA1-Knock-out-Mäuse

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Im Verlauf von mehreren Jahren kann eine atherosklerotische Plaque das arterielle Lumen vollständig blockieren.....	2
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen in menschlichem Blut. ....	5
Abbildung 3: gezeichnete Darstellung eines blutausstrich mit verschiedenen Leukozyten .....	6
Abbildung 4: Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung der Eosinophilen.....	7
Abbildung 5: Ermittlung der relativen Plaquefläche im erweiterten Aortenbogen .....	21
Abbildung 6: Ermittlung der relativen Plaquefläche im Aortensinus.....	22
Abbildung 7: Mittels <i>en face</i> -Technik ermittelte relative Plaquefläche im Aortenbogen .....	25
Abbildung 8: <i>En face</i> Sudan-III-Färbung im Aortenbogen .....	26
Abbildung 9: Mittels Oil-Red-O-Färbung ermittelte relative Plaquefläche im Aortensinus .....	26
Abbildung 10: Oil-Red-O-Färbung des Aortensinus .....	27
Abbildung 11: Siglec-F Färbung des Aortensinus einer Wiltyp-Maus (ApoE <sup>-/-</sup> xΔdbIGATA <sup>+/+</sup> ) .....	27
Abbildung 12: MPO-Färbung des Aortensinus .....	28
Abbildung 13: Mittels MPO-Färbung ermittelte relative Fläche an Neutrophilen.....	29
Abbildung 14: Mittels LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus ermittelte relative Flächen an a) Makrophagen b) glatter Muskulatur.....	30
Abbildung 15: LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus einer ApoE <sup>-/-</sup> xΔdbIGATA <sup>-/-</sup> -Maus.....	31
Abbildung 16: LGAL-S3-ACTA-2-Doppelfärbung im Aortensinus einer ApoE <sup>-/-</sup> xΔdbIGATA <sup>+/+</sup> -Maus .....	31
Abbildung 17: Quantitative Analyse ApoE <sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1 <sup>-/-</sup> vs. ApoE <sup>-/-</sup> x ΔdbIGATA1 <sup>+/+</sup> .....	33

**Abbildungsverzeichnis**

---

Abbildung 18: vWF-Exposition .....	34
Abbildung 19 Eotaxin-1 .....	35
Abbildung 20: Interleukin-5 .....	36

**10. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Versuchsgruppen.....	14
Tabelle 2 Für die immunhistologischen Färbungen Siglec-F, vWF, CCL11 verwendete Primärantikörper .....	20
Tabelle 3 Farbsignale .....	22

## **11. Danksagung**

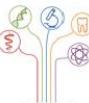
Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Besonders danke ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Konstantin Stark für die freundliche Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine hilfreiche Unterstützung, die konsequente Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der AG Massberg für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. med. vet. Charlotte Marx für die Hilfe bei den Versuchen und bei Dr. med. vet. Susanne Sauer für ihre Unterstützung bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre grenzenlose Unterstützung, Geduld und Liebe.

## 12. Eidesstaatliche Versicherung

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>				

Salbeck, Danby

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Die Rolle eosinophiler Granulozyten in der Entstehung atherosklerotischer Plaques – am Mausmodell**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 24.08.2022

Ort, Datum

Danby Salbeck

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand