

Die Interaktion von eosinophilen Granulozyten und
Thrombozyten in arterieller Thrombose

von Charlotte Marx

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Interaktion von eosinophilen Granulozyten und
Thrombozyten in arterieller Thrombose

von Charlotte Marx

aus Hermeskeil

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München in Großhadern

Mentor: Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Pathophysiologie der Thrombosen	2
1.1.	Die Bedeutung des Endothels	2
1.2.	Die Rolle der Thrombozyten.....	4
1.3.	Die Rolle angeborener Immunzellen in der Hämostase.....	7
1.4.	Gerinnungskaskade	8
1.4.1.	Initiation	8
1.4.2.	Amplifikation	8
1.4.3.	Stabilisierung.....	10
2.	Arterien	10
2.1.	Aufbau.....	10
2.2.	Die Pathogenese der Arteriosklerose	11
2.3.	Die Rolle des Immunsystems in der Entstehung der Arteriosklerose.....	13
3.	Störung der Gerinnung.....	15
3.1.	Arterielle Thrombose	15
3.1.1.	Arterielle Thrombose als Folge der Arteriosklerose.....	15
3.1.2.	Rolle angeborener Immunzellen bei der Entstehung arterieller Thrombosen.....	16
3.1.3.	Bedeutung der arteriellen Thrombosen in der Humanmedizin	18
3.1.3.1.	Medikamentöse Therapie	18
3.1.4.	Bedeutung von Thrombosen in der Veterinärmedizin	19
4.	Eosinophile Granulozyten	20
4.1.	Immunologische Bedeutung.....	20
4.2.	Sekretionsmechanismen	21
4.3.	Zytotoxische Proteine.....	22
4.3.1.	Major Basic Protein.....	23
4.3.2.	Eosinophil Peroxidase	24
4.3.3.	Eosinophil-derived Neurotoxin.....	24
4.3.4.	Eosinophil Cationic Protein	25
4.3.5.	Charcot-Leyden Christal Protein/Galectin-10.....	25

4.4.	Die Rolle der eosinophilen Granulozyten bei der Entstehung von arteriellen Thrombosen	25
4.5.	Der Oberflächenrezeptor Siglec-8.....	27
III.	ZIELSETZUNG	29
IV.	MATERIAL UND METHODEN	30
1.	Versuchstiere	30
1.1.	Mauslinien.....	30
1.1.1.	ApoE ^{-/-} x ΔdblGATA1-Verpaarung.....	31
1.1.2.	P-Selektin-defiziente Maus (Selp ^{-/-}).....	32
1.1.3.	C57BL/6J behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper.....	32
1.1.4.	C57BL/6J	32
1.1.5.	Major Basic Protein-defiziente Maus (MBP ^{-/-}).....	33
1.1.6.	Eosinophil Peroxidase-defiziente Maus (EPX ^{-/-})	33
1.1.7.	EoCre-Maus	34
1.1.8.	EoCre x PC-G5-tdTflox	34
1.2.	Das Cre-lox-System	35
1.3.	Tierhaltung	35
1.4.	Hygienemanagement.....	36
2.	Tieroperation	36
2.1.	Narkose.....	36
2.2.	Verabreichung der Antikörper	37
2.3.	Gewinnung und Isolation der Plättchen	38
2.4.	Farbstoffe	39
2.5.	Induktion der Thrombose	40
2.5.1.	Verletzung mit FeCl ₃	40
3.	Intravitalmikroskopie	41
3.1.	Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie	42
4.	Probengewinnung.....	42
4.1.	Entnahme der Thromben.....	42
4.2.	Kardiale Blutgewinnung	42
4.3.	Blutanalyse	43
4.4.	Plasmagewinnung.....	43

5.	Histologie.....	43
5.1.	Anfertigung der histologischen Schnitte	44
5.2.	Histologische Immunofluoreszenzfärbung der Gewebe	44
5.2.1.	Murine Thromben	44
5.2.2.	Humane Thromben.....	45
5.3.	Auswertung	46
6.	<i>In vitro</i>-Versuche	46
6.1.	Eosinophilen-Thrombozyten-Interaktion	46
6.1.1.	Isolation humaner eosinophiler Granulozyten	46
6.1.2.	Isolation humaner Thrombozyten	50
6.1.3.	Zellinkubation	51
6.2.	Evaluierung mit ELISA.....	52
6.2.1.	Prinzip des Enzyme-linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA).....	52
6.2.2.	Human IL-5-Immuno-Assay	52
6.2.2.1.	Durchführung	53
6.2.3.	Muriner APC-ELISA	54
6.2.3.1.	Durchführung	54
7.	Entstehung von Eosinophil Extracellurlar Traps (EETs).....	55
8.	Versuchsplanung und Durchführung	58
8.1.	<i>In vivo</i> -Versuche	58
8.1.1.	FeCl ₃ -Verletzung nach 13 Wochen Fütterung mit Cholesterolfutter.....	58
8.1.2.	FeCl ₃ -Verletzung.....	58
8.1.3.	FeCl ₃ -Verletzung und Behandlung mit anti-Siglec-F-Antikörper	59
8.1.4.	Anfärbung der eosinophilen Granulozyten im Thrombus.....	59
8.1.5.	APC-ELISA	59
8.2.	<i>In vitro</i> -Versuche.....	60
8.2.1.	Untersuchung auf IL-5-Konzentration mittels ELISA.....	60
8.2.2.	Untersuchung auf die Bildung der EETs.....	61
9.	Statistische Auswertung.....	63
V.	ERGEBNISSE	65
1.	Eosinophile Granulozyten stabilisieren den Thrombus im FeCl₃-Modell	65

1.1.	Rekrutierung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose	66
1.2.	Bedeutung der eosinophilen, zytotoxischen Proteine in der arteriellen Thrombose.....	72
1.3.	Inhibition der eosinophilen Granulozyten vermittelt durch den Rezeptor Siglec-F führt zu Reduktion der Thrombusstabilität.....	76
1.4.	Blutbilder der Mauslinien.....	79
1.4.1.	Anzahl der Leukozyten im Blut der Mauslinien	80
1.4.2.	Thrombozyten	81
1.4.3.	Granulozyten	83
1.4.4.	Eosinophile Granulozyten.....	84
2.	Aktivierte Thrombozyten aktivieren eosinophile Granulozyten <i>in vitro</i>	86
2.1.	Thrombozyten bewirken eine IL-5-Sekretion bei eosinophilen Granulozyten	86
2.2.	Thrombozyten regen bei eosinophilen Granulozyten die Bildung von Eosinophil Extracellular Traps an	88
2.3.	Wirkung inhibierender Faktoren auf die Eosinophilen-Thrombozyten-Interaktion	92
2.3.1.	Wirkung der Antikörper auf die IL-Sekretion.....	92
2.3.2.	Wirkung der Antikörper auf die EET-Bildung	94
VI.	DISKUSSION	96
1.	Diskussion der Methoden	96
2.	Diskussion der Ergebnisse	98
2.1.	Einfluss der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose.....	98
2.2.	Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose	99
2.3.	Aktivierung der eosinophilen Granulozyten während der arteriellen Thrombose.....	100
2.4.	Einfluss eosinophiler, zytotoxischer Proteine auf die arterielle Thrombose.....	105
3.	Ausblick.....	108
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	110

VIII.	SUMMARY.....	111
IX.	LITERATURVERZEICHNIS.....	112
X.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	132
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	135
XII.	TABELLENVERZEICHNIS.....	137
XIII.	DANKSAGUNG.....	139

I. EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Folgen sind die weltweit häufigsten Todesursachen. Obwohl viele Mechanismen der Entstehung dieser multifaktoriellen Krankheitsbilder aufgedeckt sind, bleiben noch viele Prozesse ungeklärt (1).

Im Krankheitsverlauf der Arteriosklerose kommt es zu Plaqueablagerungen, zum Beispiel in den Herzkranzgefäßen. Der Einriss eines solchen Plaques resultiert in der akuten Bildung eines Thrombus in der Herzkranzarterie und somit in einem Herzinfarkt, der für den Patienten immer noch mit einer hohen Letalität verbunden ist.

Der Goldstandard in der Behandlung von Patienten mit Herzinfarkt ist die perkutane transluminale koronare Angioplastie mit Stentimplantation. Hier kann sich auch viele Jahre nach dem Eingriff ebenfalls eine Thrombose, die sogenannte Stentthrombose entwickeln, die wiederum mit einer hohen Letalität verbunden ist (2).

Die inflammatorischen Prozesse, welche die Arteriosklerose und die arterielle Thrombose beeinflussen, rücken mittlerweile in den Fokus der Forschung. Die Beteiligung von Makrophagen und weiteren Leukozyten gilt als gesichert (3). Auch in der akuten Bildung von Blutgerinnseln üben Entzündungszellen wichtige Effekte aus. So wurde die Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs), prokoagulatorische, netzartige Chromatinstrukturen, bereits untersucht. Auch Monozyten verstärken die Thrombusentwicklung über Expression von Tissue Factor (4).

Es gibt Hinweise, dass eosinophile Granulozyten in der arteriellen Thrombose eine Rolle spielen. Eine positive Korrelation zwischen Eosinophilen im peripheren Blut und dem Risiko eine Thrombose zu entwickeln wurde festgestellt. Außerdem wurden eine Vielzahl von eosinophilen Granulozyten in humanen Thromben entdeckt und das Krankheitsbild der Hypereosinophilie ist mit arterieller Thrombose assoziiert (5-6). Trotzdem fehlen bisher Studien, welche die Vermutung belegen, dass Eosinophile die arterielle Thrombose begünstigen, und untersuchen, über welche Mechanismen diese Zellen beteiligt sein könnten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathophysiologie der Thrombosen

Die Möglichkeit unseres Körpers, auf eine Verletzung des Gefäßsystems mit Kontrolle des Blutflusses zu reagieren, ist ein für das Überleben notwendiger Mechanismus. Dieser Prozess aus Koagulation und späterer Auflösung des Koagels wird als Hämostase bezeichnet. Beteiligt an der Hämostase sind die Gefäßwand, zelluläre und lösliche Bestandteile des Blut, sowie die Blutströmung (7). Vereinfacht kann die Hämostase in vier Stadien eingeteilt werden. Zuerst bildet sich an der Läsion im Endothel ein loser Pfropf aus Thrombozyten. Dies wird auch als primäre Hämostase bezeichnet. Während der sekundären Hämostase wird anschließend durch Fibrin, welches als Endprodukt der Koagulationskaskade entsteht, der Pfropf stabilisiert (8). Nach dieser provisorischen Blutstillung, werden Leukozyten rekrutiert, die letztendlich eine sekundäre, vollständige Wundheilung begünstigen (9). Dieser Prozess wird veranschaulicht durch Abbildung 1 von Golebiewska et al (10).

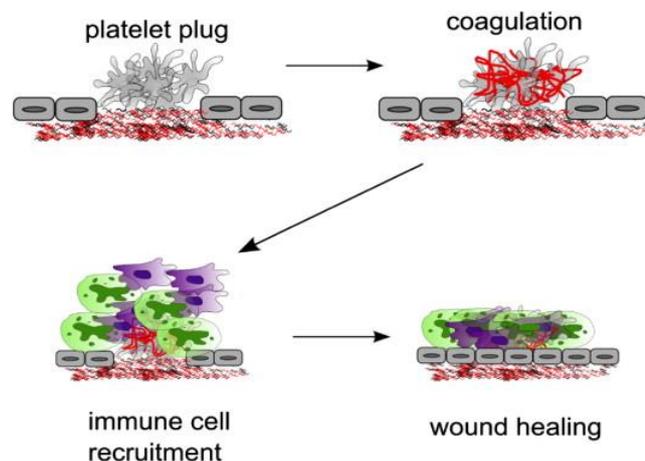


Abbildung 1: Schematischer Verlauf der Hämostase

Nach dem initialen Verschluss der Läsion durch Thrombozyten, wird der Thrombus durch Fibrin, welches als Folge der Aktivierung der Koagulationskaskade entsteht, verstärkt. Leukozytenrekrutierung führt zu einer entzündlichen und antimikrobiellen Antwort. Abschließende Prozesse der Wundheilung führen zur Wiederherstellung der Gefäßwand.

mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Centre Inc., Blood Reviews (10), Copyright © 2015

1.1. Die Bedeutung des Endothels

Das Endothel ist nicht nur eine strukturelle Barriere zwischen zirkulierendem Blut und umgebendem Gewebe, sondern Endothelzellen nehmen durch die

Ausschüttung von Mediatoren Einfluss auf die Hämodynamik. Der Blutdruck kann durch Vasodilatoren wie Prostazyklin (PGI_2) und Stickoxid (NO), sowie mit Vasokonstriktoren wie Endothelin (ET-1), Thromboxan und Platelet Activating Factor (PAF) reguliert werden (11).

Im unverletzten Endothel wirken NO und PGI_2 synergistisch hemmend auf die Blutgerinnung. So wirkt NO dilatierend auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand (12). Bei Plättchen inhibiert NO die Adhäsion, die Aktivierung, die Sekretion und die Aggregation. Der intrazelluläre Kalzium-Anstieg in den Thrombozyten wird durch NO unterdrückt und damit auch die Expression des Rezeptors P-Selektin auf der Zellmembran, welche die Bindung von Leukozyten an der Zelloberfläche mediiert. Ebenfalls kommt es nicht zur Konformationsänderung des heterodimären Glykoproteins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa), was Voraussetzung für die Bindung der Vorstufe von Fibrin, das Fibrinogen, ist (13-14). Durch die Unterdrückung von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Endothelzellen, wirkt auch NO hemmend auf die Leukozytenrekrutierung (15-16).

Das Eikosanoid PGI_2 verstärkt den Effekt von NO, allerdings über andere Wirkmechanismen. PGI_2 hat keinen Einfluss auf die Plättchenadhäsion, ganz im Gegensatz zur Aggregation und Deposition von Thrombozyten, welche es verzögert. Der Rezeptor, an den PGI_2 bindet, ist hauptsächlich auf glatten Muskelzellen und auf Plättchen zu finden. Es ist davon auszugehen, dass Eikosanoide die Eigenschaften dieser beiden Zellen modulieren (11).

Wie PGI_2 gehört PAF als Phospholipid zu Gruppe der Lipide, allerdings wirkt es antagonistisch zu NO und PGI_2 . Hauptsächlich vermittelt PAF eine Vasokonstriktion (17). Konzentrations- und zeitabhängig kann aber auch eine Vasodilatation durch PAF vermittelt werden. PAF, welches an der Oberfläche des Endothels exprimiert wurde, bleibt stationär dort. Durch Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der darauffolgend aktiviert wird, rekrutiert PAF zusammen mit P-Selektin Leukozyten (18).

ET-1 ist der, bis dato bekannte, potenteste Vasokonstriktor, dessen inaktiver Präkursor durch Stimuli, wie Hypoxie, Ischämie und starken Scherkräften zur aktiven Form umgewandelt wird. ET-1 wirkt über den G-Protein gekoppelten Rezeptor ET-A auf glatte Muskelzellen und führt zu

einem Kalzium-Einstrom (18-20). Durch die erhöhte Kalziumkonzentration in der Zelle wirkt der vasokonstriktorische Effekt auch noch, nachdem sich ET-1 vom Rezeptor gelöst hat. Ein wichtiger Gegenspieler an dieser Stelle ist NO, welches die Wiederherstellung des Kalzium-Basalleveaus beschleunigt (21).

Das Endothel bildet unter physiologischen Umständen eine antikoagulatorische Oberfläche, welche die Adhäsion von Blutzellen verhindert und so der Entstehung von Blutgerinnseln vorbeugt. Eine Schlüsselrolle im Wechsel vom antikoagulatorischen zum prokoagulatorischen Zustand spielt die Serinprotease Thrombin, weshalb es einige Mechanismen gibt, die die Aktivität von Thrombin regulieren. Auch das Endothel trägt zur Kontrolle von Thrombin bei. So enthält die Matrix, um das Endothel herum, Heparansulfate und verwandte Glykosaminoglykane, welche die Aktivität des Antagonisten Antithrombin III fördern (22-23). Auch subendothelial gelegenes Dermatansulfat wirkt der Bildung von Thrombin entgegen, indem es die Aktivität von Heparin Kofaktor II unterstützt (24). Die Endothelzellen exprimieren Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), welcher durch Bindung an den unaktivierten Gerinnungsfaktor Xa die Bildung des Komplexes Tissue-Factors/VIIa/Xa verhindert. Der Zusammenschluss aus diesen Faktoren stellt einen essentiellen Schritt in der Gerinnungskaskade dar (25). Desweiteren bilden Endothelzellen auch Thrombomodulin, das wiederum aktiviertes Protein C (APC) aktiviert. Thrombomodulin beeinflusst verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Inaktivierung von Prothrombinase, die Inaktivierung von Thrombin und die Förderung fibrinolytischer Eigenschaften der Endothelzellen (26). Zudem kann APC Faktor V und XIII inaktivieren (27).

Die Umstellung vom antikoagulatorischen Zustand des Endothels zu einem prokoagulatorischen Zustand kann verschiedene Auslöser haben. Unter anderem Endotoxine, oxidierte Lipoproteine, Scherkräfte, Hypoxie oder eine Verletzung des Endothels durch Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques (11).

1.2. Die Rolle der Thrombozyten

Unter physiologischen Umständen zirkulieren ruhende Plättchen in großer Nähe zum gesunden Endothel im Blutkreislauf. Erst nach einer Verletzung oder einer Entzündung des Endothels adhären und aggregieren die Thrombozyten und formen einen instabilen Thrombus. Das Plasmaprotein VWF bindet mit seiner

A3-Domäne subendothelial freigelegtes Kollagen und mit der A1-Domäne das thrombozytäre Glykoprotein GP Iba (28). Die dadurch eingeleitete Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix fördert die Interaktion von GP VI mit Kollagen. Dies löst eine Signalkaskade aus, die letztendlich über Aktivierung von Integrinen, in der Aktivierung der Thrombozyten und deren Anheftung an das geschädigte Endothel endet (29). Die Aktivierung erfolgt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und führt zu Ausschüttung zahlreicher löslicher Agonisten, welche wiederum, durch positive Rückkopplungen, stimulierende Effekte auf eine Vielzahl zirkulierender Thrombozyten haben. Letztendlich führt die Aktivierung zu einer Degranulation und Mediatoren der Plättchen gelangen ins Blut. Die Mediatoren befinden sich hauptsächlich in dichten Granula“, in α -Granula und in lysosomalen Granula.

Die dichten Granula speichern ADP, ATP, Polyphosphate, Magnesium- und Kalzium-Ionen sowie Serotonin (30). Durch die Aktivierung weiterer Plättchen mittels ADP und die Vasokonstriktion vermittelt durch Serotonin und Kalzium-Ionen haben sie eine wichtige Bedeutung zu Beginn der Thrombusbildung. Besonders die ADP-abhängige Aktivierung der Plättchen über den Rezeptor P2Y₁₂ nimmt eine zentrale Rolle ein (31). *In vivo*-Untersuchungen der arteriellen Thrombose an Mäusen, bei denen das Gen für diesen Rezeptor ausgeknockt war, zeigen, dass sich nur kleine, instabile Thromben formen, die die Arterie nicht vollständig verschließen. Obwohl ohne den Rezeptor die Adhäsion an Fibrinogen und Kollagen normal erscheint, sind die Thrombozyten im Thrombus weniger dicht angelagert und weniger stark aktiviert (32). Allerdings wirken dichte Granula auch später in der Koagulation. So sind Kalzium-Ionen essentiell für einige Schritte der Koagulationskaskade. Die Rolle der Polyphosphate ist zwar in weiten Teilen noch ungeklärt, allerdings scheinen diese Moleküle über die Bindung an Faktor XII einen Einfluss auf die Tissue Factor unabhängige, intrinsische Koagulation zu haben (33).

Die α -Granula sind in der Lage hunderte von bioaktiven Substanzen auszuschütten. Sie nehmen über Endozytose Substanzen aus dem Plasma auf, sind aber auch mit Stoffen beladen, die schon in den Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, synthetisiert wurden. Auch als Folge davon sind α -Granula nicht homogen beladen, sondern können mit unterschiedlichen Proteinen und Molekülen ausgestattet sein (34). In den α -Granula befinden sich

Platelet Factor 4 (PF-4), β -Thromboglobulin und Neutrophil-aktivierendes-Protein und sie sind somit bedeutend in der Rekrutierung von Leukozyten. PF-4 bewirkt zusätzlich eine Histaminausschüttung bei basophilen Granulozyten (35). Von Willebrand Faktor, Fibrinogen, sowie mehr als ein Drittel der Rezeptoren GPVI und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sind in den α -Granula gespeichert und werden bei Aktivierung an die Membranoberfläche gebracht. Zudem sind die Gerinnungsfaktoren V, VII und VIII in den α -Granula gespeichert, sowie Prothrombin, das während der Koagulation zu Thrombin umgewandelt wird (34). Das Oberflächenmolekül P-Selektin, welches die Bindung von Leukozyten an Plättchen über den Rezeptor PSGL-1 vermittelt, wird ebenfalls in den α -Granula gespeichert bis es durch Aktivierung an die Membran transportiert wird. Desweiteren befinden sich in den α -Granula viele verschiedene Chemokine, die in unterschiedlichen Pathologien wie Arteriosklerose, Entzündungen oder in mikrobiellen Abwehrmechanismen eine Rolle einnehmen (36-38). Trotzdem wird die primäre Funktion der Thrombozyten in der Hämostase gesehen. Allerdings nicht nur in der Verstärkung der Aggregation und der Koagulation, sondern auch in der Regulation dieses Prozesses. Es befinden sich in den α -Granula auch zahlreiche inhibierende Substanzen wie TFPI, Protein-S und Plasminogen, sowie dessen aktiviertes Produkt Plasmin.

Lange Zeit wurde angenommen, dass Monozyten die einzigen Blutzellen sind, die in der Lage sind Tissue Factor zu exprimieren, allerdings können auch Plättchen, die durch Kollagen stimuliert werden, in kurzer Zeit intrazellulären Tissue Factor zu Membranoberfläche befördern (39). Damit können Plättchen eine wichtige Rolle im Beginn und in der Verstärkung der Koagulationskaskade einnehmen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle in der Hämostase spielen. Sowohl die initiale Thrombusbildung, als auch die Koagulation verstärken sie auf verschiedenen Wegen. Außerdem sind aktivierte Plättchen die Voraussetzung, dass koagulatorische Prozesse überhaupt ablaufen können. Trotzdem haben sie auch einen hemmenden Einfluss und sind wichtig für die Balance zwischen Thrombusentstehung und Thrombuslyse. Durch die Teilnahme an Prozessen wie Wundheilung, Entzündung und

Arteriosklerose könnten sie schon im Vorfeld eine Auswirkung auf die Entstehung einer pathologischen Thrombose nehmen (10, 35).

1.3. Die Rolle angeborener Immunzellen in der Hämostase

Synergistisch zu Plättchen sorgen Leukozyten unter physiologischen Bedingungen für einen ungestörten Blutfluss. Zum Beispiel exprimieren Monozyten Endothelial Protein C Receptor (EPCR), Thrombomodulin und TFPI (40-42). Unter inflammatorischen oder apoptotischen Bedingungen unterliegen Leukozyten allerdings einem Wandel im Phänotyp, sezernieren und exprimieren prokoagulatorische Substanzen (43).

Sowohl Rezeptoren auf dem Endothel wie auch auf Thrombozyten sind in der Lage, Leukozyten zum verletzten Endothel zu rekrutieren. Leukozyten wiederum können die hämostatische Aktivität von Thrombozyten und Endothelzellen modulieren. So konnten Palabrica et al. zeigen, dass das Glykoprotein P-Selektin auf aktivierten Plättchen und Endothelzellen mit Leukozyten und Monozyten interagiert und dass durch Hemmung der Interaktion die Fibrinablagerung im Thrombus reduziert wird (44).

In der Gerinnungskaskade scheint es ebenfalls Mechanismen zu geben, die Leukozyten rekrutieren. So werden durch Faktor Xa und Thrombin die PARs aktiviert, die auf vielen Immunzellen zu finden sind (45). Säugetiere besitzen vier PARs, von denen PAR-1, PAR-3 und PAR-4 durch Thrombin aktiviert werden können. Auf Plättchen kommen PAR-1 und PAR-2 vor (46-47).

Tissue Factor wird sowohl von Endothelzellen als auch von Leukozyten gebildet und beeinflusst die Hämostase. Monozyten sind als großer Speicher von TF bekannt (48). In der Fraktion der Granulozyten ist es umstritten, ob Neutrophile auch TF exprimieren können. Es gibt jedoch Studien, die belegen, dass Eosinophile eine ähnlich große Menge, wenn nicht sogar eine größere Menge, an TF besitzen wie Monozyten (49-50).

Das Bild, dass die Mechanismen der Hämostase nur eine Funktion in der Heilung des verletzten Endothels haben, wird durch die Teilnahme von Leukozyten insofern revidiert, weil diese Abläufe auch in der Abwehr von Pathogenen große Bedeutung haben (4).

In der späteren Phase der Hämostase sind Leukozyten an der Fibrinolyse beteiligt. *in vitro* beschleunigen Neutrophile und Monozyten die Auflösung des Fibringerinnsels (51-52). Es gibt einige bereits bekannte Mechanismen, mit denen die Fibrinolyse unterstützt wird. Neben der Aktivierung von Plasmin durch die Elastase der Leukozyten, welche die Vorstufe Plasminogen an ihrer Oberfläche lokalisieren können, bilden Leukozyten auch Urokinase-like Plasminogen Activator (uPA) und dessen Rezeptor uPAR, die *in vivo* für eine adäquate Fibrinauflösung benötigt werden (53-54)

1.4. Gerinnungskaskade

Die Gerinnungskaskade wurde klassisch in ein extrinsisches System und in ein intrinsisches System unterteilt (55). Allerdings lassen sich einige Pathologien mit diesem Modell nicht adäquat erklären und neuere Modelle gehen davon aus, dass die intrinsische Gerinnung kein Parallelweg ist, sondern, initial durch die extrinsische Gerinnung gestartet, zur Steigerung der Thrombinproduktion beiträgt (56). Daher kann die Gerinnung in verschiedenen Stadien eingeteilt werden. Die Initiation, die Amplifikation, die Propagation und zum Schluss die Stabilisation.

1.4.1. Initiation

Die Gerinnungskaskade kann gestartet werden durch die Freilegung des integrierten Membranproteines Tissue Factor (TF), welches als Hauptstimulus der extrinsischen Gerinnung gilt (57). Tissue-Faktor dient Faktor VII als Kofaktor in der Katalysierung der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa und von Faktor IX zu Faktor IXa (58). Dies stellt eine Verbindung vom klassisch extrinsischem zum intrinsischem Weg dar. Als weitere Verbindung ist es auch möglich, dass Faktor VII durch Faktor Xa aktiviert wird. Faktor Xa aktiviert Faktor II zu Thrombin (IIa). Das auf diesem Weg generierte Thrombin ist wenig stabil und kann schnell durch TFPI inhibiert werden (59).

1.4.2. Amplifikation

Das Thrombin, welches in der Initiationsphase gebildet wurde, dient in den folgenden Schritten als Verstärker der Kaskade, indem es mit Plättchen und anderen Proteinen interagiert. Thrombin bindet über das Glykoprotein Ib an die

Oberfläche der Thrombozyten (60). Wenn zusätzlich ein Ligand des Protease-Activated-Rezeptors (PAR) an diesen bindet und ihn spaltet, werden die Thrombozyten aktiviert (61). Die Serin-Protease Thrombin ändert nach der Bindung ihre Konformität und ist danach vor Inhibition geschützt. Zusätzlich kann sie PAR-1, PAR-2 und PAR-4 spalten (62). Es gibt vier Mitglieder der PAR-Familie, PAR-1 bis PAR-4, die von Zellen des vaskulären Systems exprimiert werden, unter anderem von Plättchen, Leukozyten, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen (45).

Thrombin aktiviert neben den Thrombozyten auch andere Gerinnungsfaktoren. So spaltet es den Plasmafaktor V sowie den membranständigen Faktor V auf Plättchen. Nach Thrombin-vermittelter Freisetzung und Aktivierung des Faktors VIII, wird dieser von Von Willebrand Faktor (VWF) transportiert.

Folgend aus diesen Prozessen, resultiert die Amplifikation in aktivierten Plättchen, die Kofaktor Va und VIIIa auf der Oberfläche gebunden haben (28).

Faktor IXa, der in der Initiationphase entstanden ist, bindet neben Faktor VIIIa ebenfalls an die aktivierten Plättchen. Zusätzlich binden Ca^{2+} und Faktor X auf der Oberfläche von Plättchen, welche als Reaktion auf ihre Aktivierung Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol auf ihrer Oberfläche präsentieren (63). Diese Oberflächenmoleküle sind essentiell für die Bildung des Faktor IXa/VIIIa-Komplexes (64). Die Prozesse führen zu Aktivierung von Faktor X an der Thrombozytenoberfläche, an der direkt darauffolgend ein Faktor Xa/Va-Komplex entsteht. Der Komplex ist in der Anwesenheit von Prothrombin sehr stabil, da Faktor Xa geschützt ist vor der Inhibition durch Antithrombin oder TFPI. Faktor Xa führt in Anwesenheit von Phosphatidylserin zur Bildung von Thrombin aus Prothrombin, welches wiederum zu Ausbreitung der Koagulationskaskade führt. Der Unterschied von Faktor Xa, welcher plättchenständig ist, zu Faktor Xa, welcher in der Initiation von VIIa/Tissue Factor aktiviert wurde, ist die sehr schnelle Inhibition des gelösten Faktors Xa durch TFPI. Man vermutet, dass der gelöste Faktor Xa daher nicht die Thrombozytenoberfläche erreicht, weshalb es nicht an der massiven Thrombingenerierung beteiligt ist (65).

1.4.3. Stabilisierung

Die Hämostase ist ein Prozess, der sich unter physiologischen Bedingungen reguliert, wenn der primäre Verschluss eines Defektes im Endothel erreicht ist. Wenn diese Regulationsmechanismen nicht funktionieren, entsteht als Folge eine teilweise- oder komplette Okklusion des Gefäßes: der Thrombus. Daher haben Thrombin und Faktor Xa, die sich aus dem gebildeten Pfropf lösen, eine sehr geringe Halbwertszeit. Faktor Xa wird schnell von TFPI und Thrombin von Antithrombin III inaktiviert, sodass eine Ausbreitung der Koagulation unterbunden wird (66-67). Wie schon beschrieben (II.1.1) hat das Endothel einen bedeutenden Einfluss in der Hämostase. Thrombin wird an der Oberfläche des Endothels schnell inaktiviert. Thrombomodulin bindet Thrombin und die folgende Konformationsänderung verhindert die weitere Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin (68). Nach der Inaktivierung von Thrombin durch Protein C Inhibitor, löst sich der Thrombin/Thrombomodulin-Komplex wieder, sodass Thrombomodulin frei wird für die nächste Komplexbildung. Der Komplex aktiviert außerdem Protein C, das mit Protein S als Kofaktor, effizient Faktor Va und Faktor VIIIa inaktiviert (69). Dies führt letztendlich zu einer Eindämmung der Thrombingenerierung durch gesundes Endothel.

2. Arterien

2.1. Aufbau

Arterien sind die Gefäße, die vom Herzen ausgehend in die Peripherie führen. Im großen Körperkreislauf führen Arterien sauerstoffreiches Blut, im kleinen Lungenkreislauf führen sie sauerstoffarmes Blut (70).

Arterien zeigen den dreischichtigen Aufbau, den alle Blutgefäße haben, besonders ausgeprägt. Sie bestehen aus einer Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica adventitia (Adventitia). Die Intima besteht luminal aus flachen, spindelförmigen Endothelzellen. Subendotheliales Bindegewebe trennt die Endothelzellen von einer Membrana elastica interna. Das Vorhandensein dieser Membran stellt einen Unterschied zum Aufbau venöser Gefäße dar. Während die Zellen der Intima in Richtung des Blutverlaufes ausgerichtet sind, ist die außen anliegenden Media von zirkulärem

Verlauf. Im Anschluss an die Membrana elastica externa, ebenfalls nur in Arterien, findet sich mit longitudinalen und zirkulär gemischten Fasern die Adventitia. (71).

In der Nähe des Herzens befinden sich Arterien vom sogenannten elastischem Typ. Hier ist die Intima im Körper am stärksten ausgebildet. Im Vergleich zu den herzfernen Arterien vom muskulären Typ hat das Endothel eine höhere Beweglichkeit und ist durch die Membrana elastica interna deutlicher von der Media getrennt. Bei herznahen Gefäßen wird durch den Aufbau der Media die sogenannte Windkesselfunktion erzeugt. Dreißig bis fünfzig konzentrisch angeordnete, elastische Membranen, durchsetzt mit vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC), bilden ein muskulös-elastisches System, welches, das vom Herz ausgeworfene Blut, durch Ausdehnung gut aufnehmen kann und in der Diastole weiter in die Peripherie schieben kann. Die Elastizität dieses Systems ist Voraussetzung dafür, dass der hohe Druck, der in der Systole aufgebaut wird, nicht zu Verletzungen des Gefäßes führt. In der Peripherie besteht die Media hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und durch den dadurch erhöhten Widerstand des Gefäßes kann der Blutdruck erhalten werden. Die Adventitia ist, sowohl in den Arterien vom elastischem Typ als auch in den Arterien vom muskulärem Typ, schwach ausgebildet und besteht aus kollagenen Fasern vom Typ I (71).

2.2. Die Pathogenese der Arteriosklerose

Der häufigste und bekannteste Gefäßschaden ist die Arteriosklerose, die sich durch eine krankhafte Verhärtung der Arterien kennzeichnet. Dies geschieht vor allem als Folge von Kalkablagerung an der Intima (72). Der Begriff Arteriosklerose fasst pathologische Prozesse in der Aorta und in Koronargefäßen, in denen diese Prozesse „Atherosklerose“ genannt werden, zusammen.

Früher wurde die Arteriosklerose als eine altersbedingte, degenerative Erkrankung angesehen, doch heute weiß man, dass es zahlreiche Faktoren gibt, die die Pathogenese beeinflussen. Hypertonie, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Zigarettenkonsum und Diabetes mellitus gehören bis dato zu den Hauptrisikofaktoren, die die Entstehung der Arteriosklerose begünstigen (73-74).

Initial werden Lipoproteine in die Arterienwand aufgenommen, was grundsätzlich ein physiologischer Prozess ist, allerdings durch einen erhöhten Plasmaspiegel zu Ablagerungen von Lipoproteinen in der Intima führt (75). Besonders dem Low-density Lipoprotein (LDL) wird ein atherogener Effekt zugeschrieben. Es besteht aus dem Apolipoprotein B100, Cholesterinestern, freiem Cholesterin und Phospholipiden. Besonders die mehrfach ungesättigte Fettsäure Linoleat (18:2) kommt in LDL vor (76). Diese ist durch die Doppelbindungen in ihrer Struktur in der Lage, Sauerstoffmoleküle aufzunehmen.

Die Oxidation von LDL, welches in der subendothelialen, extrazellulären Matrix gefangen ist, ist der erste Schritt einer Entzündungsreaktion, die über die Aktivierung des Gens NF κ B und von ihm exprimierten Proteinen zu der Bildung von Schaumzellen führt (74). Nach einer ersten milden Oxidation der Lipide, werden Monozyten zur Läsion rekrutiert. Nach der Umwandlung zu Makrophagen entfalten diese ihre große oxidative Kapazität und sowohl die Lipide, als auch das Apolipoprotein erfahren eine fortgeschrittene Oxidation (77-78).

Nachdem der Prozess erst einmal in Gang gesetzt wurde, verstärkt er sich selbst. Oxidierte Lipide stimulieren bei Makrophagen die Sekretion von IL-1, was ein Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen ist und erklären würde, warum diese vermehrt in arteriosklerotischen Plaques zu finden sind (79). Außerdem hat Lysophosphatidylcholin, ein Produkt der Lipidoxidation, eine chemotaktische Wirkung auf T-Lymphozyten und Monozyten. Es induziert ebenfalls die Expression der Adhäsionsmoleküle V-CAM und I-CAM auf den Endothelzellen und erhöht das Plasmalevel des Platelet-derived growth-factors (80-83). Neben diesen Mechanismen spricht zusätzlich auch die in Endothelzellen erhöhte Expression des Moleküls P-Selektin, das neutrophile und eosinophile Granulozyten bindet, dafür, dass das Immunsystem eine wichtige Bedeutung in der Entstehung der Arteriosklerose hat (84).

Die Läsion wächst bis zu einem bestimmten Ausmaß in Richtung der Adventitia, bevor ein Wachstum in Richtung des Lumens einsetzt. Das Wachstum kommt vor allem durch ein ständiges Einwandern von Monozyten, durch die Proliferation von Makrophagen und glatten Muskelzellen, der Produktion von

extrazellulärer Matrix und die Anhäufung von Lipiden im nekrotischen Kern zustande (85-87).

Der Prozess der Kalzifikation ist immer noch nicht vollständig verstanden, aber es gibt einige Hinweise, dass glatte Muskelzellen im Rahmen eines Entzündungsprozesses in der Lage sind Alkalische Phosphatase (ALP) zu exprimieren (88). Das deutet darauf hin, dass das, durch die Reaktion des Enzyms ALP, gebildete Phosphat als Hydroxylapatit in der Läsion angereichert wird. Hydroxylapatit ist ein wichtiges, stabilisierendes Element im Knochenaufbau und ähnlich wie beim Knochenwachstum sind auch in der Pathogenese der Arteriosklerose Gene für Knochensynthese stark hochreguliert (89). Interessanterweise sind im Plaque alle Stadien der enchondralen Ossifikation zu finden (90). Dieser ektopische Knochen ist ein Beweis der Plastizität von mesenchymalen Zellen. So sind vaskuläre glatte Muskelzellen nicht vollständig ausdifferenziert und als Reaktion auf Einflüsse ihres Mikroumfeldes können sie ihren Phänotyp anpassen (91-92).

Ausgelöst wird die Kalzifikation durch eine Vielzahl von Stimuli. Eine der Hauptthesen besagt, dass die VSMCs apoptotisch werden und dass sich, von ihnen ausgehend, Matrixvesikel bilden, die kalzifizierendes Potential haben. Die Apoptose kann durch Interaktion der VSMCs mit Immunzellen und von ihnen sezernierten Zytokinen initiiert werden, aber auch durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), mechanischen Stress und oxidiertes LDL (91). Die progressive Verkalkung der Arterienwand führt zu einer Veränderung der mechanischen Reaktionsfähigkeit des Gewebes, wodurch Prädilektionsstellen für die Plaqueruptur geschaffen werden.

2.3. Die Rolle des Immunsystems in der Entstehung der Arteriosklerose

Das Immunsystem reagiert auf das oxidierte LDL in der Arterienwand mit einer sterilen Entzündung. Nicht nur von Monozyten abstammende Makrophagen, die mittlerweile als treibende Kraft in dem pathologischen Prozess identifiziert wurden, werden zu der Läsion rekrutiert. Das Endothel beginnt Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, die weitere Entzündungszellen binden können. Insgesamt gibt es vier Klassen von Adhäsionsmolekülen: 1. Die Selektine, 2. Muzinähnliche Glykoproteine, die Liganden der Selektine sind,

3. Integrine, vor allem β 1- und β 2-Integrine, 4. Moleküle aus der Familie der Immunglobuline (93).

P-Selektin wird in den Granula der Thrombozyten und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert und nach Reaktion auf Reize aus dem Mikroumfeld an die Membranoberfläche gebracht. Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten binden über das Glykoprotein PSGL-1 an P-Selektin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ohne Expression dieses Selektins die Entstehung der Arteriosklerose deutlich verzögert ist (94). P-Selektin wird durch oxidiertes LDL induziert und durch diesen initialen Schritt kann die Monozytenrekrutierung beginnen. Auch Thrombozyten besitzen P-Selektin und interagieren über diesen Rezeptor mit dem entzündeten Endothel.

Während dieses Prozesses lagern die rekrutierten Plättchen das Chemokin CCL5, auch bekannt als RANTES, im Plaque ab (94-95). CCL5 hat eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten, aber auch auf eosinophile Granulozyten, die somit zum Ort der Entzündung gelockt werden (96).

Integrine auf der Oberfläche der Immunzellen binden an die Rezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 aus der Klasse der Immunglobuline, die auf Endothelzellen in Erscheinung treten. ICAM-1 interagiert mit Integrinen, welche die β 2-Kette enthalten und nur auf Leukozyten zu finden sind, während VCAM-1 an Integrine mit β 1-Kette bindet, welche von Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten exprimiert werden (97-98). Das erhöhte Vorkommen von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen wird vermittelt durch die Cholesterolablagerungen und durch TNF- α , ein Zytokin, welches vorzugsweise von Makrophagen ausgeschüttet wird (99-100).

ICAM-1 vermittelt bei eosinophilen Granulozyten nicht nur die Adhäsion, sondern es kann auch zu einer Degranulation führen. Dieser Prozess kann wiederum VCAM-1 aktivieren (101). Desweiteren wurden in den glatten Muskelzellen arteriosklerotischer Gefäßen sehr hohe Konzentrationen von Eotaxin gefunden, welches neben CCL5 ein weiteres Chemokin ist, das stark chemotaktisch auf Eosinophile wirkt und sie aktiviert (102). Auch das Degranulationsprodukt Eosinophilic Cationic Protein wurde im gesteigerten Maße im Blut von Patienten mit Arteriosklerose gefunden und kann als Größe für das Ausmaß der Erkrankung herangezogen werden (103).

Sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 können an Granulozyten binden. Auch wenn VCAM-1 neutrophile Granulozyten nur in einem geringen Umfang binden kann, werden Basophile und Eosinophile von dem Adhäsionsmolekül rekrutiert. VCAM-1 ist ebenfalls in der Lage bei eosinophilen Granulozyten eine Degranulation zu bewirken (104-105).

3. Störung der Gerinnung

Die Mechanismen der Gerinnung können in zwei Richtungen entgleiten und zu pathologischen Zuständen führen. Entweder die Gerinnung läuft in einem zu geringen Maß ab, was zu erhöhter Blutungsneigung führt, oder sie läuft zu stark ab und führt zu Bildung von Blutgerinnseln in den Gefäßen. Die Entstehung von Thrombosen wird hauptsächlich durch drei Faktoren begünstigt, die nach dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow, als „Virchows Trias“ bezeichnet werden (106).

Virchow erkannte, dass ein veränderter Blutstrom, eine Verletzung des Endothels oder eine veränderte Zusammensetzung des Blutes das Risiko, eine Thrombose zu entwickeln, erhöht. Die tiefe Venenthrombose entsteht unter prokoagulatorischen Plasmabedingungen bei intaktem Endothel. Allerdings herrscht in den Venen, besonders hinter den Venenklappen, ein reduzierter oder statischer Blutfluss, sodass sich ein fibrinreiches Gerinnsel bilden kann. Die arterielle Thrombose ist durch ein plättchenreiches Gerinnsel gekennzeichnet, das sich nach Verletzung des Endothels unter oftmals turbulenten Strömungsbedingungen bildet (107).

3.1. Arterielle Thrombose

Die arterielle Thrombose ist ein pathologischer, intravasaler Prozess der Blutgerinnung, der zu Bildung eines Blutgerinnsels führt, welches das Lumen eines arteriellen Gefäßes partiell oder vollständig verlegt (70, 108).

3.1.1. Arterielle Thrombose als Folge der Arteriosklerose

Die arterielle Thrombose ist eine Folge der Arteriosklerose. Wie in Abschnitt II.2.2 beschrieben, ist die Konsequenz dieser Erkrankung eine zytologische und strukturelle Veränderung in der Arterienwand.

Oxidiertes LDL führt zu einer hohen Expression des stark prokoagulatorischen Tissue Factors. Dieser Gerinnungsfaktor ist zusätzlich in Endothelzellen, in Monozyten und in der Intima der arteriosklerotischen Läsionen zu finden (109-110). Das Resultat einer Plaqueruptur ist, dass eine hohe Mengen an Tissue Factor in Kontakt mit löslichen und zellulären Bestandteilen des Blutes kommt. Wie bereits beschrieben ist Tissue Factor ein sehr potenter Initiator der extrinsischen Koagulationskaskade.

Dass Immunzellen das Risiko für die Entstehung einer arteriellen Thrombose erhöhen, lassen Untersuchungen vermuten, die zeigen konnten, dass durch medikamentöse Behandlung der Entzündung das Thromboserisiko vermindert werden kann (111-112). Wie in Abschnitt II.2.2 beschrieben, haben Leukozyten in jeder Phase der Plaquebildung eine modulierende Funktion. Außerdem gibt es auch zahlreiche Studien, die belegen, dass Leukozyten auch eine wichtige Bedeutung in der Thrombusentwicklung haben (4, 43, 113-114).

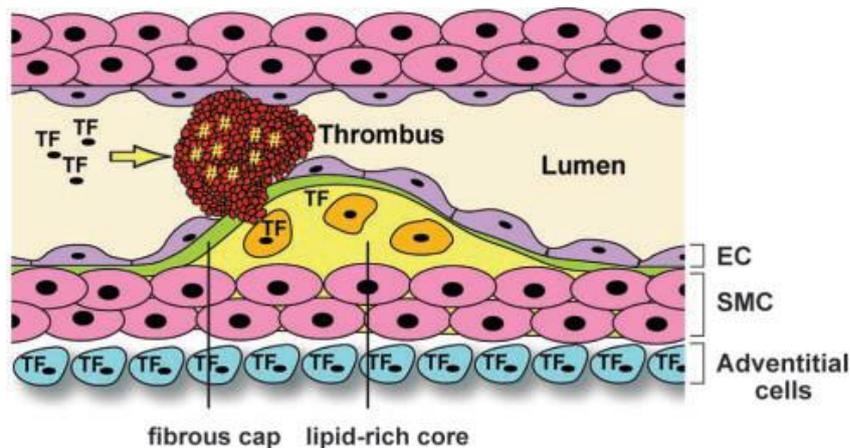


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozesse während einer arteriosklerotisch bedingter Endothelverletzung

Tissue Factor (TF), der von Schaumzellen (orange) im nekrotischen, lipidreichen Kern (lipid-rich core (gelb)) der Plaque exprimiert wird, kommt nach Ruptur der fibrösen Kappe (fibrous cap) mit Gerinnungsfaktoren im Blut in Kontakt. Zellen der Adventitia (blau), glatte Muskelzellen (SMC) und Endothelzellen (EC) tragen wesentlich zur Generierung von TF bei.

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., ATVB (115), Copyright © 2004

3.1.2. Rolle angeborener Immunzellen bei der Entstehung arterieller Thrombosen

Obwohl Leukozyten auch eine Bedeutung in der Hämostase haben, gibt es immer mehr Hinweise, dass sie ebenfalls wichtige Effekte in der Entwicklung

der Thrombose haben, die gesondert von der klassischen Blutgerinnung im Falle einer Verletzung zu betrachten ist (44, 115).

Durch die Läsionen der Arteriosklerose werden Leukozyten rekrutiert, die in der Lage sind mit Thrombozyten zu interagieren und diese über eine P-Selektin/PSGL-1-Interaktion zu binden (116). Diese Wechselwirkung von Leukozyten und Plättchen stellt eine Verbindung von Arteriosklerose zu Thrombose vermittelt durch Inflammation dar.

Durch die erhöhte Adhäsion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten können letztere aktiviert und die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) kann induziert werden. Im Blut von Patienten mit Koronarerkrankungen wurden Aggregate aus Plättchen und Neutrophilen, sowie Aggregate aus Monozyten und Plättchen gefunden (117-118). Da aktivierte Leukozyten wiederum in der Lage sind, die Aktivität der Endothelzellen und der Thrombozyten zu modulieren, entsteht ein Teufelskreis, der zu einem Verschluss der Arterie führen kann.

Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) sezernieren, die in Endothelzellen die Expression von Thrombomodulin und EPCR herunter regulieren. Dadurch verliert die Oberfläche des Endothels ihre antikoagulatorischen Eigenschaften (119).

Auch die von den Neutrophilen gebildeten, extrazellulären Chromatinstrukturen (NETs) verstärken die Thrombosebildung. Die in den NETs enthaltenen Histone haben eine zytotoxische Wirkung und schädigen zusätzlich die Endothelzellen. Das Histon H4 kann ohne Zwischenschritte Thrombin aus Prothrombin generieren, womit viele Regulationsmechanismen der Gerinnungskaskade umgangen werden. Besonders die von neutrophilen, aber auch von basophilen Granulozyten und Monozyten, ausgeschütteten Proteasen, wie Cathepsin G und Elastase, können direkt Gerinnungsfaktoren aktivieren, Antikoagulantien degradieren und Thrombozyten stimulieren (44, 110).

Zwar scheinen Leukozyten eine Funktion bei der Fibrinolyse inne zu haben, allerdings wurde gezeigt, dass unter pathologischen Bedingungen das Fibringerinnsel durch Leukozyten stabiler wird. Die NETs von aktivierten Leukozyten können die Stärke der Fibrinfasern beeinflussen, die durch die

Zugabe von CF-DNA und Histonen zum Thrombus eine stabilere und kräftigere Struktur erlangen (120). Monozyten inhibieren die Fibrinolyse über eine Tissue Factor-abhängige Aktivierung von Thrombin Activated Fibrinolysis Inhibitor (121).

3.1.3. Bedeutung der arteriellen Thrombosen in der Humanmedizin

Kardiovaskulärer Erkrankungen (CVDs) führen schon seit einigen Jahren die Liste der weltweiten Todesursachen an. CVDs umfassen eine Gruppe von Erkrankungen. Zu diesen gehören pathologische Prozesse in den Gefäßen, die das Herz (koronare Herzerkrankungen), das Hirn (zerebrovaskuläre Erkrankungen) oder die Extremitäten (periphere arterielle Verschlusskrankheit) versorgen. Auch die tiefe Venenthrombose und die daraus häufige entstehende Lungenembolie werden zu den CVDs gezählt (122).

Die hohe, weltweite Verbreitung dieser Erkrankungen kann man hauptsächlich auf den mittlerweile verbreiteten Lebensstil in Industrienationen zurückführen. Eine fett- und zuckerreiche Ernährung, Übergewicht, und Zigarettenkonsum zählen zu großen Risikofaktoren.

Arterielle Gefäßerkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen in diesem Krankheitskomplex. Bei frühzeitiger Erkennung kann durch medizinische Intervention der Thrombus, z.B. bei Apoplexpatienten oder Patienten mit Lungenarterienembolie, entweder medikamentös aufgelöst werden oder interventionell/chirurgisch entfernt werden. Der Goldstandard der Therapie des akuten Herzinfarktes auf dem Boden eines akuten thrombotischen Verschlusses einer Herzkranzarterie, ist die Herzkatheteruntersuchung mit Stentsetzung. Allerdings können Patienten nach Stentimplantation in manchen Fällen eine Stentthrombose entwickeln (123).

3.1.3.1. Medikamentöse Therapie

Für die Behandlung oder Prävention der Thrombose werden aktuell Medikamente eingesetzt, die entweder die Funktion der Thrombozyten hemmen - diese werden hauptsächlich nach Stentimplantation in die Koronarien oder zur Sekundärprophylaxe nach stattgehabtem Apoplex eingesetzt - oder hemmend in die Koagulationskaskade eingreifen. Diese Medikamente werden zur Behandlung nach stattgehabter Lungenarterienembolie/tiefer

Beinvenenthrombose oder zur Primär- oder Sekundärprophylaxe eines Schlaganfalls bei Patienten mit Vorhofflimmern eingesetzt.

Die Cyclooxygenase-Inhibitoren verhindern die Aktivierung der Plättchen, da Thromboxan A₂ durch die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase-1 nicht mehr synthetisiert werden kann. Neben dieser Medikamentenklasse gibt es noch die ADP-Rezeptor-Antagonisten, die PAR-1-Inhibitoren und die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptor-Antagonisten.

Die Antikoagulatorischen Medikamente werden in Vitamin K-Antagonisten, Heparine und direkte Thrombin- und Faktor Xa-Inhibitoren unterteilt.

Alle Therapien haben gemeinsam, dass auf der einen Seite die Thrombosen relativ gut behandelt werden, dass es auf der anderen Seite aber zu Blutungen, aufgrund der gestörten Hämostase, als Nebenwirkung der Therapie kommen kann (123).

3.1.4. Bedeutung von Thrombosen in der Veterinärmedizin

Hunde und Katzen, die als Haustiere gehalten, die Lebensumwelt des Menschen teilen und Übergewicht, ausgelöst durch ungesunde Ernährung und Bewegungsmangel, bei ihnen ein sehr weit verbreitetes Problem ist, wird eine klinisch manifeste Arteriosklerose bei Hunden und Katzen nicht diagnostiziert (124). Da Arteriosklerose im Hund experimentell ausgelöst werden kann, ist es fraglich, ob die Erkrankung im Haustier nicht vorkommt oder übersehen wird. Eventuell ist eine Kombination aus Hypothyroidismus und Hypercholesterinämie notwendig, damit sich Plaques in Arterien von Hunden bilden. Thrombosen oder Infarkte werden als Komplikation nicht gesehen (125-126). Sowohl bei Hunden als auch bei Katzen kommen thromboembolische Aortenerkrankungen vor. Der Feline Arterielle Thromboembolismus (ATE) ist ein akuter, lebensbedrohlicher Prozess, ausgelöst durch kardiale Erkrankungen wie die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Ein weiterer Risikofaktor sind Schilddrüsenerkrankungen (127-128). Bisher gibt es kaum Untersuchungen, ob das Immunsystem die Entstehung von HCM durch Beteiligung von Entzündungszellen beeinflusst, allerdings gibt es erste Hinweise, dass Plättchen aktiviert werden und dass sie P-Selektin exprimieren (129). Aortenthrombose (AT) bei Hunden wird wesentlich seltener diagnostiziert, auch weil sich die Symptome häufig als schleichende, chronische Lahmheit in der

Hüfte manifestieren (128). Eine Grunderkrankung, die eine Ursache für die Thrombose sein könnte, konnte beim Hund noch nicht eindeutig festgestellt werden (130). Es gibt Fallberichte mit primären Thrombosen, aber auch Fälle von sekundären Thrombosen, die unter anderem mit Neoplasien, renalen Erkrankungen aber auch strukturellen, kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose assoziiert wurden (130-131).

4. Eosinophile Granulozyten

4.1. Immunologische Bedeutung

Eosinophile Granulozyten gehören zur Familie der Leukozyten und machen im Blut ungefähr einen Anteil von 1-5% dieser Zellen aus. Lange Zeit wurde die Aufgabe der Eosinophilen hauptsächlich in der Verteidigung des Wirtes gegen Parasiten gesehen. Aber eine Vielzahl neuer Hinweise hat die Perspektive gewandelt. Eosinophile sind nach heutiger Sicht multifunktionelle Granulozyten, die bei Initiation und Verstärkung von unterschiedlichen entzündlichen Prozessen und bei der Modulation der angeborenen wie auch der erworbenen Immunreaktion eine Rolle spielen (132).

Als Antwort auf unterschiedliche Stimuli sezernieren Eosinophile Granulozyten Zytokine, Chemokine, Eikosanoide, Neurotransmitter und zytotoxische Granula (133).

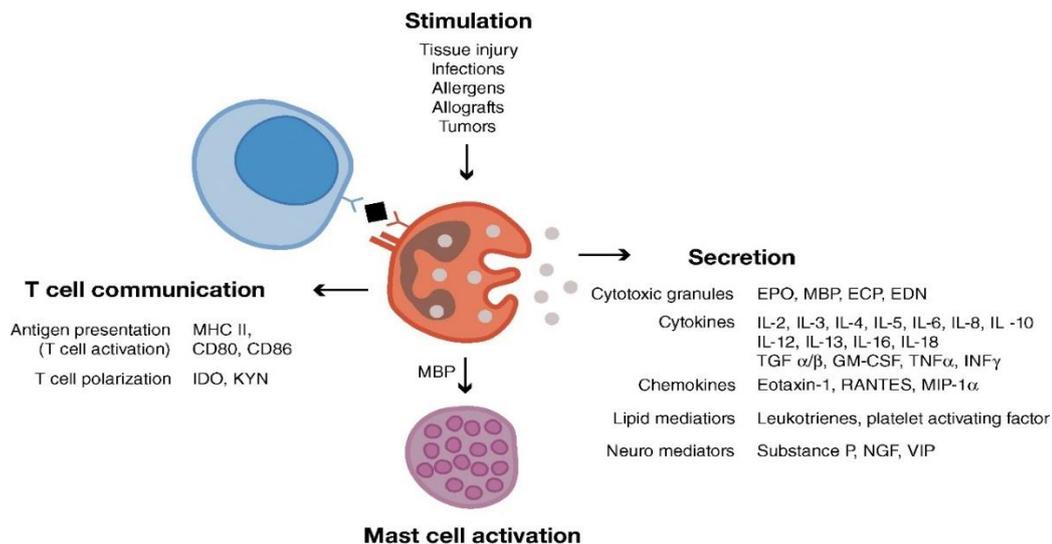


Abbildung 3: Schematische Darstellung der eosinophilen Granulozyten und ihrer multifunktionalen Effektormechanismen

Eosinophile sind Granulozyten mit Granula, die sich mit Eosin anfärben lassen. Die Granula enthalten vier kationische, zytotoxische Proteine: Eosinophil Peroxidase (EPO), Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil derived Neurotoxin (EDNT). Neben diesen Proteinen können Eosinophile als Antwort auf Stimuli, wie Gewebsverletzung, Infektionen, Allergene, Allotransplantaten und Tumoren, auch eine Vielzahl an Chemokinen, Lipidmediatoren und Neuromediatoren freisetzen. Eosinophile aktivieren T-Zellen, da sie als Antigen präsentierende Zelle agieren. Außerdem regulieren Eosinophile über die Synthese von Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), ein Enzym, das bei der Entstehung von Kynurenin (KYN) aus Tryptophan beteiligt ist, die T-Zell Polarisation. Mastzellen werden durch MBP angeregt.

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Centre, Inc., Annual Reviews of Immunology (132), Copyright © 2006

4.2. Sekretionsmechanismen

Die Sekretion der Entzündungsprodukte der eosinophilen Granulozyten kann über verschiedene Wege erfolgen. Man unterscheidet die Exozytose, die sogenannte Piecemeal-Degranulation und die Zytolyse (134).

Die Exozytose kann auf klassischem Weg verlaufen, bei dem die intrazellulären Granula mit der Zellmembran fusionieren und der Inhalt in die Umgebung abgegeben wird. Bei der zweiten Form der Exozytose verschmelzen die Granula noch innerhalb der Zellen miteinander und in einem folgenden Schritt wird der gesamte, kombinierte Inhalt durch Fusion mit der Membran aus der Zelle freigesetzt. Beide Formen der Exozytose werden in der Abwehr von pathogenen Erregern beobachtet. Die klassische Exozytose kommt häufig bei bakteriellen Infektionen vor und die gesammelte Exozytose bei Erkrankungen mit Helminthen.

Die Piecemeal-Degranulation wird bei Entzündungsreaktionen innerhalb von Geweben beobachtet. Dabei werden kleine Vesikel von den Granula abgeschnürt, die entweder Anteile von der Matrix und/oder Anteile des Kernes der Granula enthalten (135-137). Über mit der Membran verbundene, morphologisch unterschiedlich große, tubuläre Kompartimente, die Eosinophil Sombbrero Vesicle, werden die abgeschnürten Anteile der Granula aus den eosinophilen Granulozyten befördert. Die PMD ist ein sehr komplexer Prozess, der den Zellen ermöglicht, auf unterschiedliche Reize adäquat zu reagieren. Bei Stimulation kann eine Erhöhung der Anzahl der Eosinophil Sombbrero Vesicle und eine vermehrte Interaktion mit den Granula beobachtet werden (138).

Während der Zytolyse werden intakte Granula im Gewebe und in Körperflüssigkeiten freigesetzt, da sich die Zelle, die den Zelltod durchläuft, auflöst. Eine Art der Apoptose, die Eosinophile durchlaufen, geht mit der Bildung von extrazellulären Strukturen aus mitochondrialer DNA einher. Die sogenannten Eosinophil Extracellular Traps (EETs) wurden bisher mit bakteriellen Infektionen assoziiert. In den netzartigen Strukturen sind die zytotoxischen Proteine Major Basic Protein (MBP) und Eosinophilic Cationic Protein (ECP) enthalten. Die Vermutung liegt nahe, dass auch vitale, nicht apoptotische Zellen EETs bilden. Grund für diese Annahme ist die Tatsache, dass dieser aktive Prozess Energie erfordert und dass auch schon bei neutrophilen Granulozyten gezeigt wurde, dass diese Zellen bei Bildung der Strukturen vital sein können (139-140).

4.3. Zytotoxische Proteine

Zu den zytotoxischen Proteinen der eosinophilen Granulozyten gehören neben MBP-1 und -2 und ECP, auch die Eosinophil Peroxidase (EPX), das Eosinophil Derived Neurotoxin (EDNT) und das Charcot-Leyden Christal Protein/Galectin-10 (CLC/Gal10). Abgesehen von CLC/Gal10 sind die Proteine kationisch, wobei MBP die höchste Ladung an Protonen hat (135-136). Die starke Anfärbung mit dem sauren Eosin hat den eosinophilen Granulozyten ihren Namen eingetragen. MBP-1 und EPX sind spezifisch für Eosinophile. Die anderen Proteine kommen zwar hauptsächlich in den eosinophilen Granulozyten vor, man kann sie aber auch in anderen Granulozyten in sehr viel schwächerer Konzentration nachweisen. In Mäusen

kommen die zwei humanen Ribonukleasen EDNT und ECP nicht vor, dafür besitzen murine Eosinophile 15 orthologe Ribonukleasen, die Mouse Eosinophil Associated Ribonucleases (mEARs) genannt werden und ebenfalls eine zytotoxische Wirkung besitzen (140).

4.3.1. Major Basic Protein

Das spezifische MBP-1 ist *in vitro* stark toxisch für Zellen. Es ist in der Lage, die Lipid-Doppelmembranen von Säugetierzellen, Parasiten und Bakterien zu zerstören. Neben dem potentiellen Schaden, der im Gewebe angerichtet werden kann, wird auch die Histaminausschüttung von basophilen Granulozyten und von Mastzellen von MBP-1 stimuliert. Auch neutrophile Granulozyten und Alveolarmakrophagen werden angeregt. MBP-1 ist in der Lage Thrombozyten *in vitro* stark zu aktivieren (141-142). Die destruktive Wirkung von MBP-1 wurde bisher in einem Modell der dystrophischen Muskelerkrankung Duchenne gezeigt, in dem die Eosinophilen durch Ausschüttung von MBP-1 Muskelzellen auflösen konnten und zu einer Fibrose in Dystrophin-defizienten Muskelzellen führten. Auch im Asthma-Modell wurden schon Untersuchungen zu Wirkung von MBP-1 gemacht und es konnte beobachtet werden, dass MBP eine Bronchokonstriktion, eine subepitheliale Fibrose sowie eine Hyperreaktivität der Atemwege bewirkt (143-144). Ein bekannter Ligand von MBP-1 ist Heparansulfat, allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass das Protein noch andere Liganden hat. Interessanterweise konnte in unterschiedlichen Experimenten gezeigt werden, dass Heparin, sehr bekannt als Gerinnungshemmer, einen inhibierenden Effekt auf die Wirkung von MBP-1 hat (145). Eine Hypothese über die Wirkungsweise beschreibt ein Modell, welches in zwei Schritten abläuft: Zuerst wird MBP-1 von den eosinophilen Granulozyten ausgeschüttet und bindet an Proteoglykane, wie beispielsweise Heparansulfate, die sich auf Membranen befinden. Negativ geladene Membranen werden durch die stark basischen MBP-Proteine depolarisiert und zerstört. Dieses Modell würde die beobachteten Effekte, wie Zytotoxizität und Membranzerstörung erklären (146). Als weiterer wichtiger Effekt inhibiert MBP *in vitro* die Entstehung von APC über die Bindung und Hemmung von Thrombomodulin (147-148).

4.3.2. Eosinophil Peroxidase

Während der Aktivierung sind Eosinophile in der Lage, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden. Die membrangebundene NADPH-Oxidase produziert Superoxide. Da diese Radikale extrem reaktionsfreudig sind und zellschädigend wirken, werden sie sofort nach der Bildung durch das Enzym Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt.

EPX nutzt das gebildete Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel für verschiedene Substrate, die sich physiologisch in Körperflüssigkeiten befinden. Dies sind hauptsächlich Bromide, Nitrite und Thiocyanate. Die oxidierten Produkte wirken auf unterschiedliche Weise. Die hypobromige Säure und Stickstoffdioxid sind starke Oxidantien, die zur Lyse von Membranen führen. Das präferierte Substrat Thiocyanat bildet Hypothiocyansäure, welches als schwaches Oxidans über Sulfhydryl-Gruppen Zellmembranen penetriert, in Zellen eindringt und intrazellulär zu oxidativem Stress führt. Dies induziert die Expression von Tissue Factor auf Endothelzellen (149-150).

Bei einigen *in vivo*-Studien wurde vermutet, dass die kombinierte Wirkung von EPX und MBP-1 einen Effekt zeigen würde, den das Ausschalten nur eines dieser Gene nicht bewirkt. Allerdings wurde bei dem Versuch MBP-1-defiziente Mäuse mit EPX-defiziente Mäusen zu verpaaren festgestellt, dass bei diesen Mäusen die komplette eosinophile Zelllinie nicht ausgebildet wird (151). Auch bei EPX wurde eine hemmende Wirkung auf die APC-Generierung festgestellt (148).

4.3.3. Eosinophil-derived Neurotoxin

EDNT ist ein kleines, basisches Protein, das zur Familie der Ribonukleasen A gehört (RNase A). Es ist eine weit verbreitete RNase im menschlichen Körper und wurde aus vielen Quellen, unter anderem Eosinophilen isoliert. In Versuchen mit rekombinantem EDNT konnte gezeigt werden, dass das Protein einen antiviralen Effekt auf das Respiratorische Synzitial-Virus hat, der mit hoher Wahrscheinlichkeit unabhängig von der RNase-Aktivität ist (152). Zwar können auch EPX und ECP das Absterben von Purkinje-Fasern, das sogenannte Gordon-Phänomen, auslösen, bei EDNT wurde dieser Effekt jedoch als erstes

nachgewiesen (153). Es ist weiterhin bekannt, dass es die Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen bewirken kann (154).

4.3.4. Eosinophil Cationic Protein

Die zweite RNase in humanen Eosinophilen ist ECP. Dieses Protein ist im Vergleich zu EDNT wesentlich basischer. Es wurde eine toxische Wirkung gegenüber Helminthen, Bakterien und RNA-Viren sowie gegenüber Säugetierzellen festgestellt. So können zum Beispiel Zellen des Herzgewebes durch ECP geschädigt werden (155-157). Die Serumlevel von ECP können als diagnostisches Mittel herangezogen, um den Grad einer eosinophilen asthmatischen oder allergischen Erkrankung einschätzen zu können. Auch in der Eosinophilen Myokarditis ist ECP im Plasma erhöht (158). Neben MBP ist ECP das zweite Protein der Eosinophilen, welches Bestandteil der EETs ist und somit die Theorie unterstützt, dass EETs eine Aufgabe in der Abwehr von Mikroorganismen haben (138).

4.3.5. Charcot-Leyden Christal Protein/Galectin-10

CLC/Gal10 hat, im Gegensatz zu den anderen Proteinen, einen pH-Wert, der im leicht sauren Bereich liegt. Lange ordnete man das relativ kleine Lektin der Familie der Lysophospholipasen zu (159). Welche Funktionen CLC/Gal10 einnimmt, ist noch nicht besonders gut erforscht. Die ihm ehemals zugeschriebene Phospholipase-Aktivität kann man mittlerweile auf Verunreinigungen im Versuch zurückführen. Der natürliche Ligand von CLC/Gal10 ist noch nicht bekannt, allerdings zeigen *in vitro*-Versuche, dass es selektiv Mannose binden kann und mit den, in aktivierten Eosinophilen, glykosylierten Proteinen EDNT und ECP interagiert (160-161). Derzeitige Hypothesen legen nahe, dass die Lektine als Transporthilfe für die Proteine während der Granulogenese und der Piecemeal-Degranulation dienen könnten und dadurch eine gezielte Sekretion unterstützen (135).

4.4. Die Rolle der eosinophilen Granulozyten bei der Entstehung von arteriellen Thrombosen

In den letzten Jahren rückte die Bedeutung von Immunzellen in der Entstehung von Blutgerinnseln immer mehr in den Fokus der Thromboseforschung (4).

Während neutrophilen Granulozyten bereits eine wichtige Rolle zugeschrieben werden kann, gibt es zwar schon einige Indizien, die für eine Beteiligung der Eosinophilen sprechen, allerdings bleibt die genaue Rolle dieser Zellen bisher ungeklärt. Patienten mit Erkrankungen, die mit Hypereosinophilie einhergehen, haben ein erhöhtes Risiko zusätzlich eine Thrombose zu entwickeln (162-163). Klinische Studien zeigen in Thrombus-Aspiraten von Patienten mit Akuten Koronarsyndrom einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der eosinophilen Granulozyten und der Größe des Thrombus (5). Auch bei Patienten, die eine Thrombose nach dem Einsetzen eines Stents entwickelten, wurde im Thrombus eine erhöhte Zahl von Eosinophilen unabhängig von der Art des Stents festgestellt (2). Die Menge dieser Zellen im peripheren Blut vor Eingriffen am Herzen lassen Vorhersagen auf die Gefahr von tödlichen Komplikationen nach der Operation zu, wobei die Mortalität 6 Monate nach der Intervention größer ist, wenn der Patient eine hohe Anzahl Eosinophiler im Blut hat (6). In welcher Weise Eosinophile die Thrombose beeinflussen, ist allerdings noch nicht ausreichend untersucht.

Man weiß inzwischen, dass eosinophile Granulozyten ein großer, intravaskulärer Speicher von Tissue Factor sind, der einer der wichtigsten Initiatoren der Gerinnungskaskade ist (164-165). Weiterhin könnten die zytotoxischen Proteine die Thrombusentwicklung fördern. MBP hat *in vitro* eine stark aktivierende Wirkung auf Thrombozyten und wirkt indirekt, indem es Thrombomodulin inhibiert und damit auch die Bildung von APC, welches antikoagulatorisch wirkt (147). EPX ist ebenfalls *in vitro* in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren und könnte über die Auslösung von oxidativem Stress in Endothelzellen zu Expression von Tissue Factor und zur Zellschädigung beitragen (141, 149).

Obwohl auf der Zelloberfläche der Eosinophilen Granulozyten PAR-1 exprimiert wird und Thrombin über diesen Rezeptor eine Migration bei Eosinophilen auslöst, wurde bisher noch keine Aktivierung im Sinne einer Degranulation beschrieben (166). PAR-2, der wegen einer fehlenden Hirudin-Seitenkette nicht von Thrombin aktiviert wird, kommt hauptsächlich intrazellulär vor und übernimmt die übergeordnete Rolle in der von Proteasen vermittelte Aktivierung. Dieser Rezeptor kann durch Trypsin, Tryptase, Faktor Xa und VIIa stimuliert werden und führt zu einer Degranulation der Eosinophilen, die in diesem Fall mindestens EDNT ausschütten (167-168).

Interessant ist auch, dass Plättchen in der Lage sein könnten, Eosinophile zu aktivieren. Plättchen, die mit Thrombin stimuliert und somit aktiviert werden, setzen das Chemokin CCL5 frei, welches eosinophile Granulozyten anlockt und zusätzlich in der Lage ist, eine ECP-Ausschüttung bei den Eosinophilen zu bewirken (96). Außerdem reagieren sie *in vitro* sensitiv auf PAF, der ebenfalls von Plättchen freigesetzt wird (169).

Rohrbach et al. konnten schon 1990 zeigen, dass zwei der vier Hauptgranula der Eosinophilen Granulozyten, das MBP und EPX, starke Aktivatoren der Thrombozyten sind und somit die Thrombose verstärken könnten (170).

4.5. Der Oberflächenrezeptor Siglec-8

Humane eosinophile Granulozyten exprimieren einen Rezeptor an ihrer Oberfläche, der bei Aktivierung eine inhibierende Wirkung auf die Zellen hat und die Apoptose einleitet (171-172). Besonders an diesem Molekül ist, dass es nur auf Eosinophilen, Mastzellen und basophilen Granulozyten vorkommt. Es führt selektiv zu einer Apoptose der Eosinophilen und verhindert die Ausschüttung von Mediatoren der Mastzellen ohne die Überlebenszeit dieser Zellen zu beeinflussen (173). Aus diesem Grund erhofft man sich, dass man mit einer gezielten Bindung eines Antikörpers an Siglec-8, einen therapeutischen Einfluss auf Krankheiten, die durch Eosinophile oder Mastzellen bedingt werden, nehmen kann (173-174).

Mäuse exprimieren das Homolog Siglec-F auf eosinophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen (175-176). In Experimenten mit Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass spezifische monoklonale Antikörper zu einer Verminderung der Anzahl der Eosinophilen im Blut und im Gewebe führt. Außerdem zeigen Knockout-Mäuse, die keine Siglec-F besitzen, eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen im Gewebe. Mausmodelle, die allergisches Asthma simulieren, zeigen ebenfalls, dass man mit Antikörpern, die gegen Siglec-F gerichtet sind, die Anzahl der Eosinophilen in der Lunge verringern kann (172, 174, 177).

Die Apoptose, die durch Bindung eines Antikörpers an Siglec-8 ausgelöst wird, ist abhängig von der Spaltung der Cysteinproteasen Caspase-3, der Caspase-8 und der Caspase-9. Die Initiatorcaspasen 8 und 9 sind essentiell, um die Proformen von weiteren Effektorcaspasen (Caspase 3) zu spalten, die in Folge

zelluläre Proteine schneiden und so den Zelltod herbeiführen. Die Caspasenkaskade, die durch Siglec-8 ausgelöst wird, führt zu Generierung von ROS, welche die Zerstörung der mitochondrialen Membran und somit den Zelltod bedingen (178).

Interessanterweise, führt eine vorrausgehende Inkubation mit dem Zytokin IL-5 zu einem anderen Weg der Apoptose, der Caspasen-unabhängig ist. Obwohl die Anwesenheit von IL-5 normalerweise zu einer längeren Überlebenszeit der Eosinophilen und zu einer verstärkten Degranulation, kommt es durch die Bindung eines Antikörpers an Siglec-8 zu Apoptose, die vermehrt durch die Bildung von ROS und mitochondrialer Zerstörung angetrieben wird (179). Neue Studien legen nahe, dass Siglec-8 bei Eosinophilen, die mit IL-5 behandelt wurden, ein aktivierender Rezeptor ist, der einen Zelltod auslöst, der abhängig ist von β_2 -Integrin vermittelter Adhäsion, NADPH Oxidase und verschiedenen Kinasen (180).

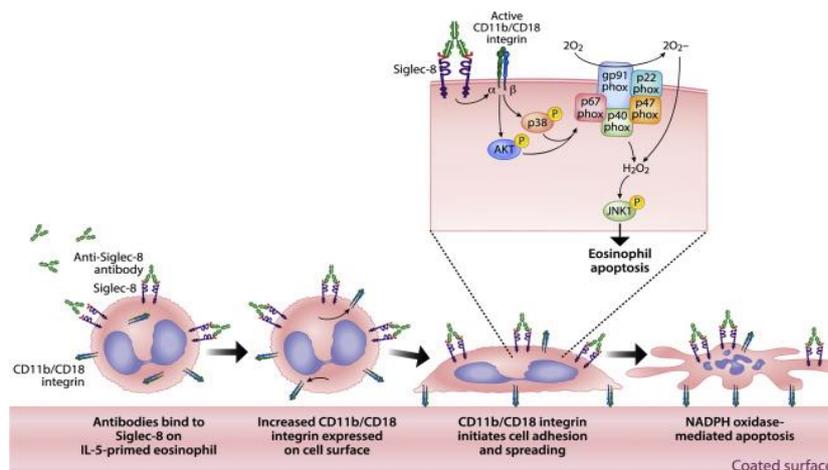


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Siglec-8 vermittelten Apoptose von IL-5 behandelten eosinophilen Granulozyten

Die Bindung eines Liganden an Siglec-8 führt bei Eosinophilen, die mit Interleukin-5 (IL-5) behandelt wurden, zur Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 an der Zelloberfläche. Diese β_2 -Integrine vermitteln die Adhäsion und die Ausbreitung der Zellen an beschichteten Oberflächen. Daraufhin werden, durch die Aktivierung von NADPH Oxidase, ROS produziert. Die Reaktionen führen letztendlich zum Zelltod. (CD=Cluster of differentiation)

Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier Inc., Journal of Allergy and Clinical Immunology (180), Copyright © 2017

III. ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie eosinophile Granulozyten die arterielle Thrombose beeinflussen und welche Rolle hierbei die Interaktion mit Thrombozyten spielt. Dafür werden Knockout-Stämme genutzt, bei denen Eosinophile entweder komplett fehlen, bestimmte Effektorproteine dieser Zellen oder Adhäsion-vermittelnde Rezeptoren nicht gebildet werden. *In vitro*-Experimente mit humanen Zellen sollen die Beobachtungen untermauern und zusätzlich Mechanismen aufdecken. Dadurch soll herausgefunden werden, wie die Rekrutierung, und Aktivierung der Eosinophilen im Verlauf der Thrombose abläuft und auf welchen Weg, die Eosinophilen im Zusammenspiel mit Thrombozyten eine Verstärkung der thrombotischen Prozesse bewirken.

Durch *in vivo* Experimenten soll bestimmt werden, ob eosinophile Granulozyten generell einen Einfluss auf die arterielle Thrombose haben, indem die Thromboseentwicklung in Eosinophilen-defizienten Mauslinien analysiert wird. Falls sich die Vermutungen bestätigen, dass die Zellen die Thrombose verstärken, sollen weitere intravitale Beobachtungen näher charakterisieren, ob und wann eosinophile Granulozyten zur Läsion rekrutiert werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, welche Faktoren während einer Thrombose in der Lage sein könnten, die Eosinophilen zu aktivieren. Auch hierfür werden intravitale Studien durchgeführt und zusätzlich eosinophile Granulozyten *in vitro* verschiedenen Stimuli aussetzen.

Bei eindeutigen Anzeichen einer Beteiligung der Eosinophilen in der arteriellen Thrombose sollen die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkung von Eosinophilen auf die Bildung eines Gerinnsels bestimmt werden. Dafür werden Mausstämme untersucht, bei denen Gene ausgeschaltet werden, die für die Bildung von eosinophilen Effektorproteinen verantwortlich sind.

Zusätzlich ist es Ziel dieser Arbeit, Faktoren der Eosinophilen zu identifizieren, die therapeutisch zur Hemmung der arteriellen Thrombose genutzt werden können.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für alle Versuche dieser Doktorarbeit wurde die Maus als Versuchstier genutzt. Die Maus eignet sich von den gängigen Labortieren sehr gut für diese immunologische Doktorarbeit, da das murine Immunsystem bestens erforscht ist. Auch das Modell der arteriellen Thrombose ist an der Maus schon häufig beschrieben worden und in unserer Arbeitsgruppe ist die Induktion durch FeCl₃, Ligatur und Drahtdenudation etabliert.

1.1. Mauslinien

Mauslinie	Kontrollgruppe	Ziel
ApoE ^{-/-} x ΔdblGata ^{-/-}	ApoE ^{-/-} x ΔdblGata ^{wt/wt}	Untersuchung der Thromboseentstehung bei vollständigem Fehlen eosinophiler Granulozyten im Kontext der Arteriosklerose
Selp ^{-/-}	C57BL/6J	Untersuchung der Wirkung des Oberflächenmoleküls P-Selektin
MBP ^{-/-}	MBP ^{wt/wt}	Untersuchung der Wirkung des zytotoxischen Effektorproteins Major Basic Protein
EPX ^{-/-}	EPX ^{wt/wt}	Untersuchung der Wirkung des zytotoxischen Effektorproteins Eosinophilen Peroxidase
EoCre ^{cre/wt} x PC-G5-tdTflox ^{fl/wt}		Visualisierung der Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten während der Thrombusentwicklung <i>in vivo</i>
C57BL/6J mit anti-Siglec-F-Antikörper behandelt	C57BL/6J mit Rat IgG behandelt	Untersuchung der Rolle, der durch Siglec-F mediierten, negativen Rückkopplung

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsgruppen

1.1.1. ApoE^{-/-} x Δ dblGATA1-Verpaarung

Die Δ dblGATA1^{tm6Sho}-Mäuse wurden von The Jackson Laboratory erworben. Das auf dem X-Chromosom vorkommende Gen Gata1 codiert das Gata binding Protein 1, welches als Transkriptionsfaktor verantwortlich ist für die Entwicklung unterschiedlicher Blutzellen aus ihren Progenitorzellen (181). So ist dieser Transkriptionsfaktor beteiligt an der Entwicklung der erythroiden Zelllinie und an der Entwicklung von Megakaryozyten, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten aus myeloiden Vorläuferzellen. Eine gezielte Deletion einer palindromisch aufgebauten, doppelten Bindungsstelle mit einer hohen Affinität zu dem Gata binding Protein 1 im Gata1-Promoter führt zu einem spezifischen Verlust der eosinophilen Zelllinie in der Maus (182). Diese Bindungsstelle führt vermutlich zu einer positiven Autoregulation, die durch die Deletion entfällt (183). Auch der Einfluss von Faktoren, welche die Bildung von eosinophilen Granulozyten stimulieren, haben in dieser Knockout-Maus keinen Effekt. Die Mäuse sind uneingeschränkt lebens- und fortpflanzungsfähig. Andere Zelllinien, die von Gata1 abhängig sind, werden durch die genetische Modifikation nicht betroffen. Die dazu gehörenden erythroiden Zellen, Megakaryozyten und Mastzellen entwickeln sich normal.

Um ein Modell zu kreieren, an dem die Beteiligung der eosinophilen Granulozyten bei der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques beziehungsweise bei der von Arteriosklerose bedingten arteriellen Thrombose, studiert werden kann, wurde die Δ dblGATA1-Linie mit Mäusen einer ApoE-Linie verpaart. Bei ApoE-knockout-Mäusen fehlt das normalerweise in der Leber gebildete Apolipoprotein E, welches eine wichtige Rolle in der Entfernung von Lipoproteinen aus dem Blut hat. Dadurch zeigen diese Tiere alters- und geschlechtsunabhängig einen erhöhten Cholesterolspiegel. Besonders Chylomikronen und VLDL kommen vergleichsweise gehäuft vor (184). Bei einer normalen Diät bilden sich ungefähr in einem Alter von drei Monaten Läsionen im proximalen Teil der Aorta. Die Läsionen werden mit zunehmendem Alter größer bis circa im Alter von acht Monaten arteriosklerotische Plaques zu finden sind (185). Die Pathogenese der Arteriosklerose wurde verstärkt und beschleunigt, indem die Versuchsgruppen, nach dem Absetzen von der Mutter im Alter von vier Wochen, mit einer cholesterolreichen Diät (Western Type Diet, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert wurden.

Dadurch war es möglich, die Thrombose und die Arteriosklerose der Mäuse, 90 Tage nach Beginn der Diät zu untersuchen. Als Kontrollgruppe dienten Geschwistertiere, bei denen das Gata1-Gen nicht ausgeschaltet war

Die Tiere sind phänotypisch unauffällig und fertil.

1.1.2. P-Selektin-defiziente Maus (*Selp*^{tm1Hyn}^{-/-})

Die homozygote Mutation des Gens *Selp*^{tm1Hyn} bewirkt einen Mangel des Oberflächenproteins P-Selektin, welches auf Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen zu finden ist (186). Die P-Selektin-defizienten Mäuse wurden durch eine Genmutation in embryonalen Stammzellen generiert und in Mäusen mit einem C57BL/6J und 129S2 Hintergrund übertragen. Die Tiere sind fertil und vital, allerdings zeigen die Leukozyten ein vermindertes Rollen am Endothel und neutrophile Granulozyten zeigen eine verminderte Extravasation (187). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ist kompensatorisch um das Zwei- bis Dreifache erhöht, während die Anzahl der Monozyten und Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht ist.

Die Linie eignet sich gut, um das Verhalten von Leukozyten bei der Bindung am Endothel und anderen Immunzellen zu studieren. Die Tiere zeigen keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten und sind fertil.

1.1.3. C57BL/6J behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper

Siglec-F ist ein Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten. Das Binden eines Antikörpers an diesen Rezeptor führt zur Apoptose der Zellen (172). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass eine eventuelle negative Rückkopplung die Eosinophilen hemmt (188). Mit diesem Modell soll untersucht werden, ob eine Bindung an Siglec-F die potentielle Wirkung der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose beeinflusst. Der Antikörper (Purified Rat anti-Mouse Siglec-F, BD PharmingenTM, Heidelberg) wurde den Mäusen 20 min vor der Induktion der Thrombose über einen Schwanzvenenkatheter verabreicht. Der Kontrollgruppe wurde die Isotypkontrolle Rat IgG ((Purified Rat IgG, BD PharmingenTM, Heidelberg)) injiziert.

1.1.4. C57BL/6J

Als Kontrollgruppe zur *Selp*^{-/-}-Gruppe und zur Versuchsgruppe, die mit anti-Siglec-F-Antikörper behandelt wurde, wurden Mäuse der

C57BL/6J-Linie (The Jackson Laboratory, Bar Harbor) verwendet. Mäuse dieser Inzuchtlinie sind die in der Grundlagenforschung meist verwendeten Versuchstiere. Sie werden hauptsächlich in der Herstellung transgener Mäuse verwendet, da der Hintergrund sehr gut geeignet ist, spontane oder induzierte Genmutationen maximal zu exprimieren. Trotzdem entwickeln C57BL/6J-Mäuse selten Tumore, eignen sich aber ansonsten gut zur Zucht und erreichen ein hohes Lebensalter.

1.1.5. Major Basic Protein-defiziente Maus (MBP^{-/-})

Das Protein Major Basic Protein, welches von eosinophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, könnte durch seine zytotoxischen Effektormechanismen dazu beitragen, dass eosinophile Granulozyten die arterielle Thrombose verstärken (135). Mit Hilfe eines Vektors, der die Exons 2,3 und 4 des mMBP-1 Gens ausschneidet und durch eine Neomycin resistente Kassetten ersetzt, kann die Expression des Genes verhindert werden. Der Verlust von MBP-1 hat keinen Einfluss auf die durch Allergene induzierte Rekrutierung der Eosinophilen (189), daher kann davon ausgegangen werden, dass die Rekrutierung normal verläuft.

Die Mäuse zeigen phänotypisch keine Auffälligkeiten und sind fertil. Als Kontrollgruppe wurden Geschwistertiere verwendet, die keinen Knockout hatten (MBP^{wt/wt}).

1.1.6. Eosinophil Peroxidase-defiziente Maus (EPX^{-/-})

Das EPX-Gen codiert ein Enzym aus der Gruppe der Peroxidasen, welches von eosinophilen Granulozyten produziert wird und eine wichtige Rolle in der Eliminierung von Gewebe-invasiven Parasiten spielt. Die Mäuse bilden aufgrund einer gezielten Deletion des EPX-Lokus das Effektorprotein Eosinophilen Peroxidase (EPX) nicht aus (190). Dies ermöglicht, dass die Wirkung der toxischen Proteine aus den Granula der eosinophilen Granulozyten *in vivo* in Abwesenheit von EPX untersucht werden können.

Die Mäuse zeigen im Phänotyp keine Auffälligkeiten und sind fertil. Als Kontrollgruppe wurden Geschwistertiere verwendet, die keinen Knockout hatten (EPX^{wt/wt}).

1.1.7. EoCre-Maus

Bei der EoCre-Maus ist am Start-Codon des EPX-Gens eine Cre Rekombinase eingefügt. Durch dieses Knock-in entsteht eine Linie, in der die Rekombination von geflochtenen Reporter-kassetten in über 95% der im peripheren Blut vorkommenden eosinophilen Granulozyten mediiert wird (191). Die Cre-Expression ist spezifisch für die Zelllinie der eosinophilen Granulozyten und es wurde kein toxischer Einfluss der Cre Rekombinase festgestellt, obwohl eine verminderte Anzahl von eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut festgestellt wurde. Andere Zellpopulation sind in normaler Anzahl vorhanden. Bei homozygotem Knock-in der Cre Rekombinase in das Genom der Maus kommt es zu einem kompletten Verlust von EPX, der bei heterozygotem Knock-in nicht zu beobachten ist (191).

Bei Verpaarung mit einer Flox-Mauslinie können spezifische Knockouts in den eosinophilen Granulozyten erzeugt werden.

Die Linie zeigt phänotypisch keine Besonderheiten und ist fertil.

1.1.8. EoCre x PC-G5-tdTflox

In Abhängigkeit von der Cre Rekombinase wird bei dieser Maus-Linie ein GCaMPG5 Calcium Indikator exprimiert. Der Indikator ist eine Variante des GCaMP3 Indikators, welcher aus einem grün fluoreszierenden Protein, aus einem Kalzium bindenden Protein Calmodulin (CaM) und einem Peptid M13 besteht. Das Peptid M13 interagiert mit CaM. Der Indikator ist zusätzlich mit einem rot fluoreszierenden Protein dtTomato als Negativkontrolle gekennzeichnet, um die Cre exprimierenden Zellen sicher zu finden. Bei steigendem Kalzium-Gehalt in der Zielzelle bindet Kalzium an CaM und so entsteht, neben dem dauerhaften roten Signal, ebenfalls ein grünes Signal. Dadurch können mit Hilfe dieser Linie Rückschlüsse auf die Kalzium-Dynamik im Zielgewebe gezogen werden (192-193). Durch die Verpaarung mit der EoCre Maus ist es möglich *in vivo* zu beobachten, wie sich speziell eosinophile Granulozyten während der arteriellen Thrombose verhalten. Durch das Anzeigen des Kalziums-Signals können Rückschlüsse gezogen werden, ob die Eosinophilen aktiviert werden.

Untersuchungen des Blutes mit dem Flow Cytometer zeigten, dass ausschließlich eosinophile Granulozyten das Signal exprimieren. Die

eosinophilen Granulozyten im Blut wurden dafür mit einem Antikörper (Anti-Siglec-F-APC-Vio® 770, mouse, Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) *ex vivo* doppelt markiert.

Auch in dieser Linie waren im Phänotyp und in der Fertilität keine Auffälligkeiten zu finden.

1.2. Das Cre-lox-System

Die Cre-lox-Rekombination ist eine bindungsspezifische Rekombinase-Technologie, die es erlaubt, DNA-Modifizierung an bestimmten Zelltypen vorzunehmen oder durch einen bestimmten Trigger auszulösen (194). Das System setzt sich zusammen aus loxP-Elementen, der Cre Rekombinase und der DNA-Zielsequenz. Die loxP-Elemente bestehen aus 34 Basenpaaren, genauer aus einer Kernregion mit acht Basenpaaren, die von zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen umgeben wird. Das Cre-Enzym führt eine Rekombinasereaktion zwischen zwei loxP-Elementen durch. Dabei lagern sich zwei Untereinheiten der Cre-Rekombinase um ein loxP-Element und schneiden es in der Kernregion. Außerdem werden die zu rekombinierenden DNA-Abschnitte in eine räumliche nahe Konstellation gebracht. Nun kann entweder eine Deletion oder eine Insertion oder sogar Translokation stattfinden. Welche Reaktion stattfindet, hängt von der Orientierung der zwei loxP-Elemente zueinander ab. Die loxP-Maus wird über homologe Rekombination hergestellt. Sie trägt loxP-Elemente in ihrem Genom, allerdings kommt die genetische Mutation phänotypisch erst zum Tragen, wenn die vollständige Funktionsfähigkeit des Gens, durch die von der Cre-Rekombinase vermittelte Reaktion, ausgeschaltet wird. Dies wird erreicht, indem die loxP-Maus mit einer Cre-Maus verpaart wird. Je nachdem, welcher Promotor für die Steuerung der Expression des Cre-Gens gewählt wird, wird die Cre-Rekombinase nur in bestimmten Geweben oder Zellen oder nur nach medikamentöser Induktion gebildet (195).

1.3. Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte im Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung (ZNP). Eine maximale Anzahl von drei Tieren wurde in Abhängigkeit von Körpergröße, Geschlecht und Verträglichkeit in einem Käfig (THKB-M2V-M Polysulfonkäfig Typ M II, verlängert) gehalten.

Die Käfige wurden an ein IVC-System (Individually Ventilated Cabinet) angeschlossen. Die Tiere bekamen ad libitum ein Standardfutter für Labornager (Standardfuttermittel, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Ebenso hatten sie freien Zugang zu Wasser, das in Tränkeflaschen angeboten wurde. Die 12 stündige Beleuchtung wurde automatisch durch einen Zeitschalter geregelt und somit ein Tag-Nacht-Rhythmus vorgegeben. Die Raumtemperatur betrug konstant 21°C und die Luftfeuchtigkeit 55% mit Schwankungen bis zu 5%.

1.4. Hygienemanagement

Die Tiere wurden unter Spezifisch Pathogenfreien-Bedingungen (SPF) gehalten. Durch eine Personal-, Material-, Wasserstoffperoxidschleuse, einen Durchreichautoklaven, sowie eine Überdruckbelüftung wurde eine geschlossene Barriere zwischen reinem und unreinem Bereich geschaffen. Das Umsetzen erfolgte einmal wöchentlich in Käfige, die zuvor mit 80°C warmem Wasser gereinigt und im Autoklaven bei 121°C desinfiziert wurden. Nach FELASA-Richtlinien (Federation of European Laboratory Animal Association) wurde der Status der Tierhaltung mit Sentinel-Mäusen überprüft.

2. Tieroperation

2.1. Narkose

Um die Tiere in Narkose zu legen, wurde eine sogenannte vollständige antagonisierbare Anästhesie (VAA) genutzt, die aus 90 µl Fentanyl (Fentanyl HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen), 90 µl Midazolam (Midazolam-hameln®, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln) und 15 µl Medetomidin (Dorbene®, Pfizer GmbH, Berlin) bestand. Die Dosis, die für eine 20-25 g schwere Maus berechnet ist, wurde intraperitoneal injiziert. Dies entspricht 0,05 mg Fentanyl und Medetomidin und 5mg Midazolam pro Kilogramm Körpergewicht der Maus. Falls die Tiere schwerer als das genannte Gewicht waren, wurde das Volumen der Narkose um das 1,5-fache erhöht. Zur Überprüfung, ob das Toleranzstadium der Narkose erreicht war, wurde der Zwischenzehenreflex überprüft. Sobald dieser ausgefallen war, wurde mit der Operation begonnen. Um die Narkose zu erhalten wurde nach 35-40 min erneut, die Hälfte der Dosis, intraperitoneal injiziert. Die VAA bewirkt eine Allgemeinanästhesie, die definiert wird über Hypnose, Analgesie und Relaxation.

Fentanyl ist ein sehr potentes Betäubungsmittel, welches als Agonist reversibel an den μ -Opioidrezeptor bindet und so zentral zu einer Schmerzausschaltung führt. Die Wirkung lässt sich mit Naloxon aufheben.

Der α_2 -Agonist Medetomidin aktiviert α_2 -Adrenorezeptoren am Hirnstamm und führt dadurch zu einer Sedation und Muskelrelaxation. Als Antagonist wird Atipamezol verwendet.

Midazolam, aus der Gruppe der Benzodiazepine, bindet an GABA_a-Rezeptoren im limbischen System und bewirkt Muskelrelaxation und eine Sedation, allerdings keine Schmerzausschaltung. Dem Effekt kann man mit Flumazenil entgegenwirken.

2.2. Verabreichung der Antikörper

Um die Reagenzien vor der Operation verabreichen zu können und falls nötig während der Operation nachdosieren zu können, wurde der Maus ein Schwanzvenenkatheter gelegt. Dieser wurde selbst hergestellt, indem zwei 30 G-Kanüle (BD MicrolaneTM 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) mit einem dünnen Schlauch (Fine Bore Polyethylene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mm OD, Smith Medical International Ltd., Hythe, UK) verbunden und mit 0,9%igen NaCl gespült werden.

Der Katheter wurde in das distale Drittel einer der lateral gelegenen Schwanzvenen eingeführt. Durch Zurückfließen des Blutes in den Katheter und überprüfen, ob sich die Flüssigkeiten aus der Spritze leicht in die Vene applizieren ließen, wurde überprüft, ob der Katheter korrekt lag. Anschließend wurde dieser mittels Gewebeklebstoff (Histoacryl[®], BRAUN, Rubi, Spain) fixiert und die benötigten Reagenzien injiziert.

Um die Thrombozyten visualisieren zu können, wurden 0,025 μ g/g Körpergewicht fluoreszenzmarkierter Antikörper (DyLight 488 mouse platelet labeling, Emfret ANALYTICS, Eibelstadt) mit 0,1 ml 0,9%igen NaCl verdünnt und in die Schwanzvene injiziert. Um eine Zell-zu-Zell-Interaktion beobachten zu können, wurden Plättchen einer Spendermaus isoliert und *ex vivo* mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert.

2.3. Gewinnung und Isolation der Plättchen

Da die Markierung mit dem Antikörper ungeeignet war, um einzelne Plättchen zu visualisieren, mussten Thrombozyten von einer Spendermaus gewonnen werden, um die Interaktionen zwischen Thrombozyten und eosinophilen Granulozyten beobachten zu können. Das Spendertier wurde so gewählt, dass es aus der gleichen Linie wie das Empfängertier stammte, um linienspezifische Unterschiede im Verhalten der Thrombozyten bei der Entwicklung des Thrombus auszuschließen. Das Spendertier wurde, wie beschrieben, in eine tiefe VAA-Narkose gelegt. Durch kardiale Blutentnahme konnte ungefähr 1 ml Blut gewonnen werden. (siehe Abschnitt:IV.4.2)

Vor der Isolation der Plättchen aus dem Vollblut wurde ein Puffer hergestellt, um den empfindlichen Thrombozyten ein physiologisches Medium bereitzustellen. Damit wurde einer Aktivierung oder dem Zelltod vorgebeugt. Tyrodes-Puffer wurde aus 9 ml steril filtriertem Tyrodes (10,15g NaHCO_3 (VWR International, Darmstadt), 1,95 g KCl (VWR International, Darmstadt), 80 g NaCl (VWR International, Darmstadt) gelöst in 1 L Aqua dest.), 1 ml HEPES (HEPES[®], Invitrogen, Darmstadt) 90 ml Nanopore-Wasser, 0,1 g bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V, fettsäurefrei, Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe) und 0,1 g D(+)-Glucose (Merck KGaA, Darmstadt) hergestellt. 50 ml des Puffers wurden auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt, die restlichen 50 ml auf eine pH-Wert von 7,4.

Das gewonnene Blut wurde zusammen mit 2 ml Tyrodes-Puffer in ein 5 ml Falcon (Falcon Round-Bottom Tube, Corning Incorporated Life Sciences, NY, USA) gefüllt und anschließend für 20 min bei 70 x g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5804, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling). Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit einer Pipette von den restlichen zellulären Bestandteilen, die sich am Boden als Pellet gesammelt hatten, abgehoben und zusammen mit 2 ml Tyrodes (pH 6,5) in ein Glasröhrchen gegeben. Durch Zugabe von 20 μl DCF, welches 1:10 verdünnt war, wurden die Thrombozyten in einer Inkubationszeit von 2 min grün fluoreszierend markiert. Im Falle der violetten Markierung werden 20 μl Farbstoff, 1:10 verdünnt, verwendet, welcher 5 min inkubierte. Der zweite 10-minütige Zentrifugationsschritt diente dazu, die Thrombozyten in einem Zellpellet zu sammeln und wurde deswegen mit Bremse bei 400 x g

durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 250 µl Tyrodes (pH 6,5) und 250 µl Tyrodes (pH 7,4) resuspendiert. Anschließend wurde mit einem Blutanalysegerät (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysegerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) die Zellzahl bestimmt, um zu berechnen, mit welcher Menge Tyrodes die Zellen verdünnt werden müssen. Ziel war eine Konzentration von 150 000 Thrombozyten/µl. Dem Empfängertier wurden 250 µl der Suspension per Schwanzveneninjektion verabreicht.

2.4. Farbstoffe

Um die Objekte von Interesse mit Mikroskopen sichtbar zu machen, wurden sie mit Fluorochromen markiert. Fluorochrome teilen sich die charakteristische Molekülstruktur von koplanar liegenden, konjugierten Doppelbindungen in Ringstruktur. Außerdem sind sie in der Lage, Licht in einem so langwelligen Spektralbereich zu absorbieren, dass die Emission für das menschliche Auge sichtbar ist. Fluoreszenzfarbstoffe haben den großen Vorteil, dass sie schon in sehr geringen Konzentrationen leuchten, sodass lebende Zellen dies tolerieren und Vitalfärbungen möglich sind (196).

Der Farbstoff 2,7 Dichlorfluoreszin (DCF) wird den Zellen als Diacetat angeboten, da es als Ester membranpermeabel ist und somit gut in die Zellen diffundieren kann. In der Zelle wird es zuerst durch unspezifische Esterasen deacetyliert und anschließend oxidiert. Nach diesen Modifikationen kann der Farbstoff die Zellmembran nicht mehr passieren. Die durch die Oxidation entstandene Doppelbindung ist eine Voraussetzung für die Fluoreszenz (197). Der Farbstoff kann mit einer Wellenlänge von 500 nm angeregt werden, woraufhin Licht mit einer Wellenlänge von 500 nm emittiert.

Da in der EoCre X PC-G5-tdTflox-Maus die Interaktion der Thrombozyten mit den Eosinophilen Granulozyten, die entweder rot im inaktivierten oder grün im aktivierten Zustand leuchten, beobachtet werden sollte, wurde für die Plättchen ein Farbstoff ausgewählt, der im violetten Spektrum emittiert (CellTrackerTM Violet BMQC Dye, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA). Auch dieser ist so konstruiert, dass er die Zellmembran passieren kann. Die ubiquitär vorkommende Glutathiontransferase katalysiert eine Reaktion, in der eine Thiolgruppe des Glutathions auf die Bromid-Gruppe des Farbstoffes übertragen wird. Das violett fluoreszierende, brommethylierte

Derivat von Kumarin wird sehr gut in der Zelle zurückgehalten und färbt das Zytoplasma gleichmäßig an. Bei starker Fluoreszenz hat der Farbstoff gleichzeitig eine geringe Toxizität (198).

Der fluoreszenzmarkierte Antikörper (DyLight 488 mouse platelet labeling, Emfret ANALYTICS, Eibelstadt) ist mit dem Fluorchrom AlexaFluor 488 markiert. Das Fluorchrom wird mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittiert in einer Wellenlänge von 525 nm. Der Antikörper bindet an die Glykoprotein GPIb-Untereinheit des murinen Thrombozyten- und Megakaryozyten-spezifischen GPIb-V-IX-Komplexes, während Von Willebrand-Faktor an GPI α bindet. Der Antikörper hat keinen Einfluss auf die Dynamik der Thrombusbildung (199-200).

2.5. Induktion der Thrombose

Zur Herstellung eines arteriellen Thrombus wurde die Maus zuerst, wie beschrieben, in Narkose gelegt und dann die linke Arteria carotis communis freipräpariert. Die rechte Arterie wurde ebenfalls freipräpariert, wurde aber nicht verletzt, da sie zur Kontrolle diente. Die Thrombusformation wurde mittels FeCl₃ induziert.

2.5.1. Verletzung mit FeCl₃

Ins Detail gehend wurde die Methode wie folgt ausgeführt: Bei der Maus wurde nach Desinfektion des Operationsfeldes paramedian im Halsbereich ein 1,5 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Im Anschluss wurden die A. carotis communis dextra und sinistra freigelegt, indem die ventral liegenden Fettschichten und Muskelfaszien entfernt und die Speicheldrüsen nach lateral verlagert wurden. Im Bereich kaudal der Bifurcatio carotidis wurde die A. carotis communis mit einem schwarzen Plastikstück unterlegt, um ein deutliches Hervortreten der Arterie aus dem Operationsfeld zu gewährleisten. Zusätzlich konnte so die FeCl₃-Lösung kontrolliert an der Arterie appliziert und sichergestellt werden, dass das umliegende Gewebe nicht verletzt wurde. Das Plastikstück führte ebenfalls in den späteren Immunfluoreszenz-Aufnahmen zu einer besseren Kontrastierung.

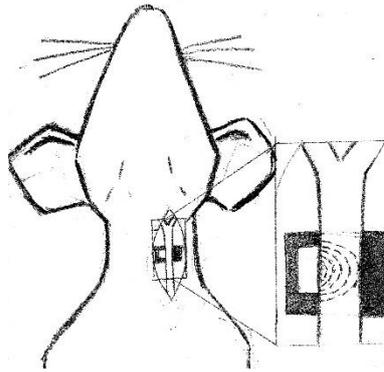


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FeCl₃-Modells

Nach dem die Arteria carotis communis freipräpariert wurde, wurde sie mit einem schwarzen Plastikstück unterlegt. Das mit FeCl₃ getränkte Filterpapier wurde seitlich an die Arterie gelegt, sodass sich der Thrombus von der Seite des Gefäßes zur kontralateralen Seite bildete. Die Dynamik der Ausbreitung des Thrombus ist durch die gestrichelten Linien eingezeichnet.

Das FeCl₃ wurde appliziert, indem ein 1x2 mm großes Stück Filterpapier mit 2 µl einer 10%igen FeCl₃-Lösung getränkt wurde und anschließend auf das Plastikstück seitlich an die Arterie gelegt wurde. Diese wurde zuvor getrocknet, damit die FeCl₃-Lösung nicht verdünnt wurde. Nach einer Einwirkzeit von 3 min wurde das Filterpapier entfernt und der Bereich der Arterie mit PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich[®], Steinheim) gespült.

Im Anschluss wurden die Vorgänge im Gefäß, während der Thrombusbildung mit einem Intravitalmikroskop beobachtet und aufgenommen (Siehe Abschnitt IV.3). Als Messgrößen wurden der Zeitpunkt herangezogen, an dem eine vollständige Okklusion des Gefäßes erreicht wurde, und der Zeitpunkt an dem der Thrombus rekanalisierte. Die aus diesen Größen errechnete Zeitspanne, in der eine vollständige Okklusion des Gefäßes besteht, wurde als Größe herangezogen, um die Stabilität des Thrombus zu bestimmen.

3. Intravitalmikroskopie

Die Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg, Germany) aufgenommen. Durch Anfärbung der Blutzellen mit Fluorochromen wurde mit der Methode der Intravitalmikroskopie eine *in vivo*-Beobachtung der Vorgänge im Gefäß möglich. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera (charged coupled device) (ORCA-ER, Hamatsu, Japan) angefertigt.

3.1. Prinzip der Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung der Fluorochrome wurde das Prinzip der Fluoreszenz genutzt. Fluoreszenz entsteht bei Wechselwirkung von Materie und Licht. Bei dem erstmals von G.G. Stokes untersuchtem Vorgang werden Elektronen durch Lichtenergie, genauer durch Absorption von Photonen angeregt. Dadurch wird das Elektronensystem auf einen höheren Energiezustand gehoben. Die Energiedifferenz zwischen erstem und zweitem Energiezustand entspricht genau der Energie des Photons, das absorbiert wurde. Elektronensysteme haben diskrete Energieniveaus. Der erste Energiezustand kann wieder erreicht werden, indem Energie in Form von weniger energetischem, langwelligem Licht abgeben wird. Dieses Licht fluoresziert und kann detektiert werden.

Das Anregungslicht liegt im hochenergetischen kurzwelligen Bereich und stammt bei dem genutzten Intravitalmikroskop von einer Xenonlampe. Das von ihr ausgestrahlte UV-Licht wird über einen Strahlungsteiler abgelenkt und durch das Objektiv auf das Objekt geleitet. Die Emission gelangt wieder durch das Objektiv zum Strahlungsteiler, der das langwelligere Licht passieren lässt. Daraufhin wird es zu Interferenzfiltern geleitet, die die Unterscheidung verschiedener Fluoreszenzen möglich machen (196, 201).

4. Probengewinnung

4.1. Entnahme der Thromben

Nach Abschluss der Intravitalaufnahmen wurde der Thrombus, der sich gebildet hatte, zu weiteren Untersuchungen entnommen. Dafür wurde die A. carotis communis oberhalb und unterhalb des Thrombus mit einem Faden (7-0 Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson and Johnson Medical GmbH, Norderstedt) ligiert. So wurde verhindert, dass der Thrombus weggespült wurde. Kaudal des ersten Fadens wurde ein zweites Mal ligiert. Der Scherenschlag erfolgt zwischen den beiden Ligationen, um eine massive Blutung nach Entnahme des Thrombus und der rechten A. carotis communis zu verhindern.

4.2. Kardiale Blutgewinnung

Die kardiale Blutentnahme eignet sich, um eine möglichst große Menge Blut von dem Versuchstier zu gewinnen. Dazu wurde die Haut über dem Brustkorb

durch einen Schnitt in der Medianen eröffnet und vom Brustkorb präpariert. Kaudal der zweiten Rippe auf der linken Seite wurde direkt seitlich vom Sternum in einem 90° Winkel eingestochen. Die 1 ml-Spritze (BD Discardit™ I, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) wurde mit einer 26 G-Kanüle (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) versehen und vor Entnahme mit Citrat beschichtet, um ein Koagulieren des Blutes zu verhindern. Unter leichter Aspiration wurde die Kanüle bis ins Herz vorgeschoben. Nach Gewinnung von ungefähr 1 ml Blut wurde das Tier durch Genickbruch getötet.

4.3. Blutanalyse

Jeweils 100 µl des gewonnenen Blutes wurden dazu verwendet, um zu überprüfen, ob die Knockouts in den Mausstämmen Einfluss auf das Blutbild haben. Dazu wurde ein Differentialblutbild mit einem Blutanalysegerät (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysengerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) angefertigt. Als für die arterielle Thrombose relevante Parameter wurden die Anzahl der Plättchen (PLT), die Gesamtzahl der Leukozyten (WBC), die Fraktion der Granulozyten und die Anzahl der eosinophilen Granulozyten bestimmt.

4.4. Plasmagewinnung

Aus dem restlichen Blut (circa 900 µl) wurde Plasma gewonnen. In einem ersten Schritt wurde das Blut in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes®, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) für 10 min bei 15°C bei 2000 RPM in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5424 R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und ein zweites Mal für 5 min bei ansonsten gleichen Einstellungen zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5. Histologie

Die nach der Operation gewonnenen Thromben wurden auf das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten untersucht. Der Fokus lag auf der Anzahl der Zellen im Verhältnis zur Fläche des Thrombus. Zusätzlich wurde die Lokalisation der eosinophilen Granulozyten angeschaut. Außerdem wurden humane, arterielle Thromben auf EETs untersucht.

5.1. Anfertigung der histologischen Schnitte

Die gefrorenen Gewebe wurden zum Schneiden auf einen Stempel eines Kryotoms (Cryostar NX70, Histo Service GmbH, Celle) gebracht und komplett mit einem Einbettmedium (Tissue Tec®O-C-T™ Compound, Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) bedeckt. Nachdem das Einbettmedium durch die kalten Temperaturen den Aggregatzustand von flüssig zu fest gewechselt hatte, wurde das Objekt in das Kryotom eingespannt. Bei einer Klingentemperatur von -13°C und einer Objektspitzentemperatur von -25°C wurden $8\ \mu\text{m}$ dicke Längsschnitte angefertigt und auf zuvor beschriftete, beschichtete Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) gezogen.

5.2. Histologische Immunofluoreszenzfärbung der Gewebe

5.2.1. Murine Thromben

Die Färbungen wurden stets in einer lichtundurchlässigen Färbewanne durchgeführt, deren Boden mit Wasser gefüllt wurde, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

Die Gewebe wurden zuerst mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) umrandet, um den zu färbenden Bereich einzugrenzen. Anschließend wurden die Schnitte mit 4%igen Formalin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) 3 min fixiert. Um das Formalin wieder zu entfernen, wurden die Präparate mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer bestand aus 100 ml PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich®, Steinheim), das mit 900 ml mikrofiltriertem Wasser verdünnt wurde. Zu dieser Mischung wurde 1 ml Tween (Tween® 20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hinzugefügt. Alle Waschschrte wurden wie folgt durchgeführt: Die Präparate wurden in Glasküvetten auf einen Linearschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gestellt. Dort wurden sie dreimal je fünf Minuten gewaschen, wobei nach Ablauf der Zeit jeweils den Puffer austauscht wurde.

Um unspezifische Bindungen zwischen Antikörper und Oberflächenproteinen zu minimieren, wurden die Präparate mit einem 10%igen Serum (Goat) geblockt und dieses 30 min einwirken gelassen bevor der erste Antikörper hinzugefügt.

Zur Markierung der eosinophilen Granulozyten nutze man einen Antikörper, gerichtet gegen das Oberflächenmolekül Siglec-F (Purified Rat anti-Mouse Siglec-F, BD Pharmingen™, Heidelberg), und ließ diesen über Nacht bei einer Temperatur von 4°C auf dem Präparat. Nach der Inkubationszeit wurden die Antikörper, die nicht an das Antigen gebunden hatten, durch einen dreimaligen Waschgang mit Waschpuffer entfernt.

Der zweite Antikörper (Goat-anti-mouse AlexaFluor®488, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois) zur Detektion des Primärantikörpers wurde ebenfalls mit Hilfe einer Pipette auf die Präparate gegeben. Bevor nach 60 min Inkubation der letzte Waschschritt folgte, wurde mit dem Farbstoff Hoechst (Hoechst®33342, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) der Kern der Zellen in den Schnitten angefärbt. Dazu wurde der Farbstoff 1:1000 mit PBS verdünnt und für 3 min auf die Präparate gegeben.

Nach dem letzten Waschschritt wurde ein Eindeckmedium (Dako Fluorescent mounting medium, Dako North America Incorporation, CA, USA) auf die fertig gefärbten Schnitte gegeben und diese mit einem Deckglas (MEDITE GmbH, Burgdorf) bedeckt. Zur Trocknung und Aufbewahrung bis zur Auswertung wurden die Objekte in einer Mappe in einen 4°C kalten Kühlschrank gestellt.

5.2.2. Humane Thromben

Die humanen Thromben waren von Patienten mit akutem Myokardinfarkt, bei denen im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung ein Thrombus aus der Koronararterie mittels Extraktionskatheter (Pronto™ Extraktionskatheter, Vascular Solutions, Minneapolis, USA) entfernt wurde. Es liegt ein positives Ethikvotum und eine vom Patienten unterzeichnete Einwilligungserklärung vor. Die Thromben wurden vor Ort in Eppendorfgefäßen (Eppendorf Tubes®, 5 ml) in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -80°C

Die Färbung verlief im Wesentlichen wie die Färbung der murinen Thromben. Allerdings war der genutzte Primärantikörper ein gegen humanes Major Basic Protein gerichteter Antikörper aus der Maus. Aufgrund des Wirtes des Primärantikörpers wurde der Sekundärantikörper daher so gewählt, dass er gegen Maus gerichtet und mit Alex Fluor 594-Fluorchrom markiert war (Goat-anti-mouse AlexaFluor®594, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois). Die Inkubationszeiten und Waschschrte waren identisch mit den Färbungen der murinen Thromben.

5.3. Auswertung

Die Thrombusschnitte wurden im Anschluss an das immunhistologische Färben unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) durch eine Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und einer entsprechenden Software (AxioVision) fotografiert. Dazu wurden Aufnahmen in der 20 x Vergrößerung von zehn Längsschnitten je Thrombus angefertigt.

Anschließend wurden die Eosinophilen Granulozyten mit der Software ImageJ2 gezählt und die Thrombusfläche ausgemessen (202). So wurde die Anzahl der Eosinophilen pro mm² Thrombusfläche als angegebene Größe ermittelt.

6. *In vitro*-Versuche

6.1. Eosinophilen-Thrombozyten-Interaktion

6.1.1. Isolation humaner eosinophiler Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten wurden mit Hilfe eines Kits (Eosinophil Isolation Kit human, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) isoliert. Eine Mischung aus Antikörpern, gerichtet gegen Oberflächenproteine von humanen, nicht-eosinophilen, hämatopoetischen Zellen, sekundär markiert mit magnetischen Partikeln aus Eisendextran, führte zu einer negativen Selektion von eosinophilen Granulozyten. Bei Durchlaufen einer Säule, die sich in einem magnetischen Feld befand, wurden die mit einem Antikörper markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten eosinophilen Granulozyten die Säule passierten. Dieses Verfahren verspricht eine hohe Reinheit (>98%) bei gleichzeitig hohem Erhalt der Vitalität (203).

Zur Gewinnung humaner, eosinophiler Granulozyten wurden 50 ml Blut von einem gesunden Spender mit einem Katheter aus der Vena cephalica in ein Zitrat-Röhrchen (S-Monovette® 10ml 9NC, SARSTEDT AG & CO, Nümbrecht) entnommen.

Sofort wurden 40 ml Blut mit 40 ml Puffer verdünnt. Der Puffer wurde hergestellt aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Phosphate buffered saline, GIBCO® by life technologies, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA), 0,5% bovines Serumalbumin (BSA, Albumin Fraktion V, Roth®, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 2 mM EDTA (EDTA, Sigma-Aldrich, Steinheim).

Je 20 ml der Verdünnung wurden direkt im Anschluss über 20 ml Ficoll-Paque (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) geschichtet, welches in 50 ml Röhrchen (Falcon Round-Bottom Tube, Corning Incorporated Life Sciences, NY, USA) vorgelegt wurde. Dabei war darauf zu achten, dass sich die Phasen nicht miteinander vermischten. Die Zellen durchliefen das Ficoll-Paque, welches eine Dichte von 1.077 g/ml aufwies. Dabei bildeten sie aufgrund ihrer eigenen Dichte einen Gradienten und wurden so voneinander separiert. Dieser Vorgang wurde durch einen Zentrifugationsschritt, bei 600 x g für 30 min ohne Bremse, beschleunigt. Die Granulozytenfraktion hat, abgesehen von den basophilen Granulozyten eine Dichte >1.08 g/ml und sammelte sich zusammen mit den Erythrozyten am Boden des Röhrchens in einem Pellet. Die Monozyten, Lymphozyten und Basophilen, die eine geringere Dichte als das Ficoll-Paque haben, konnte man daher vorsichtig mit einer Pipette entfernen. Um die Zellen, die eventuell noch an der Wand des Röhrchens adhärirten, zu entfernen, wischte man dieses mit einem sterilen Gaze-Tuch aus.

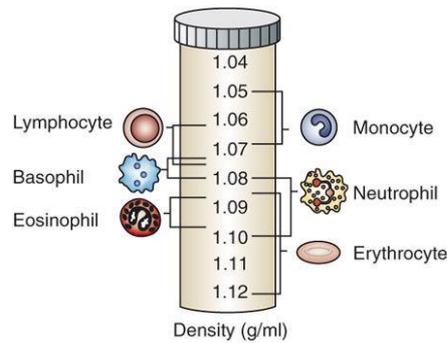


Abbildung 6: Dichte der menschlichen Blutzellen und Aufreinigung mittels Dichtegradienten

Das Medium Ficoll-Paque hat eine Dichte von 1.077 g/ml. Die Blutzellen durchlaufen dieses Medium und aufgrund ihrer eigenen Dichte bildeten sie einen Gradienten und wurden so voneinander separiert. Die Granulozytenfraktion hat, abgesehen von den basophilen Granulozyten eine Dichte >1.08 g/ml und sammelte sich zusammen mit den Erythrozyten am Boden des Röhrchens in einem Pellet. Die Monozyten, Lymphozyten und Basophilen, die eine geringere Dichte als das Ficoll-Paque blieben in der oberen Phase und konnten abpipettiert werden.

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Protocols (204), Copyright © 2007

Das unberührte, rote Zellpellet wurde in Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert. Dazu verdünnte man ein Konzentrat, das zuvor aus 0,1 M NaHCO_3 , 1,5 M NH_4Cl und 0,01 M EDTA gelöst in 250 ml destilliertem H_2O , hergestellt wurde, mit der zehnfachen Menge destilliertem Wasser (Aqua ad iniectabilia. B.BRAUN AG, Melsungen). Durch den osmotischen Schock zerplatzten die Erythrozyten. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte, durch einen Waschschrift in der Zentrifuge bei 300x g nach 8 min, ein erythrozytenfreies Zellpellet gewonnen werden. Falls dies beim ersten Waschschrift nicht gelingen konnte, wurde ein weiterer durchgeführt, ohne die Viabilität der Zellen zu verringern (205).

Nach Resuspensierung in 40 ml Puffer folgte ein weiterer Waschschrift, 300 x g für 5 min, um die osmotische Wirkung des destillierten Wassers zu neutralisieren und so eine Schädigung der Granulozyten zu verhindern. Um die Menge der Zellen bestimmen zu können, wurde das Zellpellet, was sich durch die Zentrifugation gebildet hatte, in 1 ml Puffer gelöst und in ein 5 ml Röhrchen (Falcon Round-Bottom Tube, Corning Incorporated Life Sciences, NY, USA) überführt. Nach Determination der Zellzahl mit dem Blutanalysegerät wurde durch einen weiteren Waschschrift für 10 min wieder ein Zellpellet gewonnen.

Dieses löste man in 40 μl Puffer je 10^7 Zellen und fügte noch 10 μl Biotin-Antibody-Cocktail je 10^7 Zellen hinzu. Nach 10 min Inkubation im Kühlschrank bei 4°C gab man 30 μl Puffer und 20 μl Micro Beads je 10^7 Zellen hinzu und ließ die Suspension für weitere 15 min im Kühlschrank ruhen. Anschließend wurde diese mit 2 ml Puffer verdünnt und ein Zellpellet wurde in einem zehnminütigen Waschriff gesammelt und in 500 μl Puffer je 10^8 Zellen gelöst.

Daraufhin konnte mit der magnetischen Separation begonnen werden. Dazu wurde eine mit magnetischen Kügelchen befüllte Säule (LSColumn, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) in das magnetische Feld eines Separators (MACS Separator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) gebracht. Indem man die Säule mit 3 ml Puffer spülte, wurde sie für die Separation vorbereitet. Bevor die Flüssigkeit die Säule komplett durchlaufen hatte und sie trocken lag, fügte man die Zellsuspension hinzu und fing den Efflux in einem 5 ml Röhrchen auf. Um alle eosinophilen Granulozyten aus der Säule zu lösen, wurde diese dreimal mit je 3 ml Puffer gewaschen. (205)

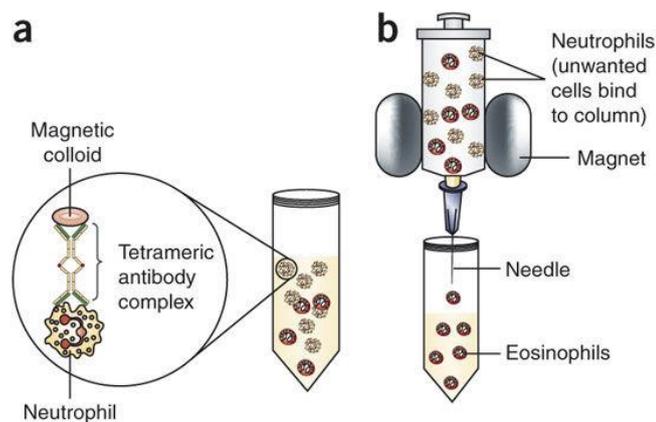


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Isolation der eosinophilen Granulozyten im magnetischen Feld

a) Magnetische Markierung der neutrophilen Granulozyten vermittelt über einen Antikörperkomplex, an dem magnetischen Partikel gebunden sind. Die Antikörper binden an neutrophile Granulozyten. b) Beladen der magnetischen Säule mit den Proben und Elution der eosinophilen Granulozyten. Die Neutrophilen, an die Antikörper gebunden sind, werden in der Säule zurückgehalten.

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Protocols (204), Copyright © 2007

Ob die Aufreinigung der Blutzellen mittels Isolationskit das gewünschte Ergebnis erbrachte, wurde mit dem CANTO Flow Cytometer überprüft. Es wurde sich dabei zunutze gemacht, dass eosinophile Granulozyten im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten Siglec-8 exprimieren (175). Die isolierten Zellen

wurden mit einem FITC gelabelten Antikörper, (Anti-Siglec-8-FITC, human (Clone: 7C9), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) der in einer 1:11 Verdünnung bis zu 10^7 Zellen/100 μ l Puffer vorlag, im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Nach 10 min wurde die Suspension mit 1-2 ml PBS verdünnt und in der Zentrifuge bei 300 x g für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in einer für das Flow Cytometer passenden Menge an Puffer resuspendiert. Als Kontrolle wurde eine ungefärbte Probe und eine Färbung mit dem Isotypen des Antikörpers (Mouse-IgG1, isotype control antibodies, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet.

6.1.2. Isolation humaner Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden aus dem Blut des gleichen Probanden isoliert, der auch die eosinophilen Granulozyten gespendet hatte. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass ein Effekt aufgrund von immunologischen Abwehrreaktionen erzeugt wurde.

Für die Isolation wurde humanes Vollblut zu dem zuvor angemischtem Tyrodes-Puffer in einem Verhältnis von 1:1 in ein 10ml Falcon (Falcon Round-Bottom Tube, Corning Incorporated Life Sciences, NY, USA) gegeben. Um eine Aktivierung der Plättchen zu verhindern, wurden 6 μ l Prostazyklin (Prostacyclin I2 dot Na, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) in der Konzentration 1 mg/ml hinzugefügt (206).

Die Röhre wurde auf 120 x g für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde das PRP abpipettiert und wieder mit dem Tyrodes-Puffer in einem Verhältnis 2:1 in einem 10ml Falcon vermischt.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 400 x g für 10 min bei Raumtemperatur waren die Plättchen, dadurch, dass bei diesem Schritt eine Bremse benutzt wurde, am Boden des Falcons gesammelt. Das Thrombozyten-Pellet konnte nach Abgießen des Überstandes mit 250 μ l Tyrodes (pH 6,5) und 250 μ l Tyrodes (pH 7,4) resuspendiert werden. Die Zellzahl wurde mit dem Analysegerät (ABX Micros ES60 Hämatologie Analysengerät, Horiba ABX, Montpellier, Frankreich) bestimmt und anschließend wurde die Konzentration so verdünnt, dass eine Konzentration von 600 000 000 Plättchen/ml vorlag.

6.1.3. Zellinkubation

Da es bereits Hinweise gibt, dass die zytotoxischen Proteine der eosinophilen Granulozyten in der Lage sind, Thrombozyten zu aktivieren (170), sollte nun untersucht werden, ob auch Plättchen Einfluss auf das Verhalten der Eosinophilen haben. Eine Adhäsion der Eosinophilen an die Plättchen wird über das Oberflächenprotein P-Selektin vermittelt (207). Ob es aber auch zu einer Aktivierung kommt und ob ein Anheften der Eosinophilen an die Plättchen dafür notwendig ist, ist bisher nicht beschrieben worden und sollte in verschiedenen Ansätzen untersucht werden.

Um herauszufinden, ob Thrombozyten die eosinophilen Granulozyten aktivieren können, wurden die Zellen nach der Isolation gemeinsam für 30 min in einen Inkubator (37°C) gebracht. Das Verhältnis von Plättchen zu Eosinophilen betrug 1000:1 und die Konzentration von 600 000 000 Plättchen beziehungsweise 600 000 Eosinophilen pro ml entspricht ungefähr physiologischen Verhältnissen im Blut. Pro 600 000 Thrombozyten wurden 0,001 U bovines Thrombin (Thrombin from bovine plasma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zur Aktivierung verwendet.

Als Kontrollen wurden Eosinophile in Abwesenheit von Thrombozyten mit Thrombin behandelt, um auszuschließen, dass Thrombin einen Effekt auf Eosinophile hat. Außerdem wurden als weitere Kontrolle die Granulozyten einmal ausschließlich in PBS und ein anderes Mal mit nicht aktivierten Thrombozyten inkubiert. Somit sollte kontrolliert werden, ob schon der Isolationsprozess einen Effekt bei den Eosinophilen bewirkt, beziehungsweise ob auch die ruhenden Plättchen eine Aktivierung hervorrufen.

Ob die Eosinophilen nicht allein durch ausgeschüttete Produkte der Thrombozyten angeregt werden können ist fraglich (35). Daher wurde die Thrombozyten in einem weiteren Ansatz separiert von den eosinophilen Granulozyten mit Thrombin behandelt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch eine Zentrifugation als Pellet am Boden des Gefäßes gesammelt. Der Überstand mit den ausgeschütteten Entzündungsmediatoren wurde abpipettiert und zu den Eosinophilen gegeben. Dieser Ansatz inkubierte ebenfalls 30 min bei 37°C und sollte zeigen, ob Mediatoren der Thrombozyten in der Lage sind, die eosinophilen Granulozyten zu aktivieren, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen den Zellen möglich ist.

Um die Rolle des anti-Siglec-8-Antikörpers (human Siglec-8 Antibody, R&D System, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) genauer zu verstehen wurde in einem Ansatz die Eosinophilen mit diesem vorinkubiert, bevor die Plättchen mit Thrombin aktiviert wurden.

Ebenso wurde mit einem P-Selektin-Antikörper (human P-Selectin-Antibody, R&D System, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) und einem CCL5-Antikörper (CCL5 (RANTES) Antibody, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) verfahren, da diese von Plättchen exprimierten Moleküle ebenfalls in der Lage sein könnten die Eosinophilen zu aktivieren. Kontrollansätze wurden mit dem jeweiligen Isotypen hergestellt.

6.2. Evaluierung mit ELISA

6.2.1. Prinzip des Enzyme-linked-Immunoabsorbent-Assay (ELISA)

Die Assays, die verwendet wurden, verwenden die Technik des quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay. Ein monoklonaler Antikörper, spezifisch für das Zielprotein, wird auf die polymere Matrix einer Mikrotiterplatte gebunden. Auf diese pipettiert man die Proben, woraufhin die Zielproteine an die immobilisierten Antikörper binden können. Nachdem man durch Waschen alle nicht gebundenen Substanzen entfernt hat, fügt man einen zweiten Antikörper hinzu, der mit einem Enzym verknüpft ist, welches ein farbloses Substrat umsetzt, sodass eine Farbentwicklung stattfindet. Je mehr Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe entstanden sind, umso stärker wird die Färbung. Die Reaktion wird nach einer bestimmten Zeit gestoppt und der Farbumsatz kann photometrisch gemessen werden.

6.2.2. Human IL-5-Immuno-Assay

Interleukin 5 (IL-5) ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich von CD4⁺TH2 Zellen, aber auch in einer geringeren Menge von aktivierten Eosinophilen Granulozyten ausgeschüttet wird (208). Durch den Nachweis von IL-5 kann man somit feststellen, ob die eosinophilen Granulozyten in den Ansätzen mit den Thrombozyten aktiviert wurden. Für die Detektion wurde ein kommerzielles ELISA-Kit genutzt (Human IL-5 Quantikine ELISA Kit, R&D System, Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt).

6.2.2.1. Durchführung

Die bei 4°C gelagerten Reagenzien wurden vor der Durchführung des Versuchs auf Raumtemperatur gebracht. Zur Erstellung einer Standardreihe wurde der Standard, der mitgeliefert wurde, mit 1 ml mikrofiltriertem Wasser verdünnt. Dadurch erhielt man eine Stammlösung. Vor weiterer Verdünnung wurde die Stammlösung für 15 min auf einem horizontalen Plattenschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gestellt. Aus dem Standard wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, an der man in Anschluss des ELISA die Konzentration an IL-5 in den Proben bestimmen konnte. Die Herstellung der Verdünnungsreihe ist in Abbildung 8 dargestellt.

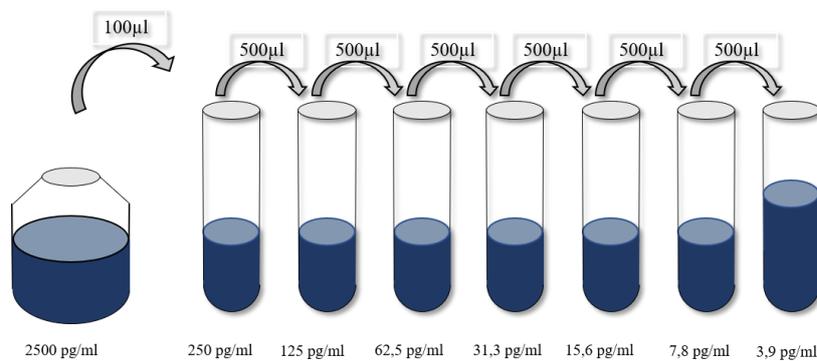


Abbildung 8: Herstellung der Standardreihe des IL-5-ELISAs

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde in das erste Eppendorf-Gefäß 900 µl der mitgelieferten Verdünnungslösung vorgelegt und mit 100 µl der Stammlösung vermischt. In sechs weiteren Eppendorf-Gefäßen wurden je 500 µl der mitgelieferten Verdünnungslösung vorgelegt. 500 µl der Verdünnung aus dem ersten Eppendorf-Gefäß wurden in das nächste Eppendorf-Gefäß gegeben und vermischt. So wurde fortgefahren, bis man beim siebten und letzten Eppendorf-Gefäß 1000 µl Flüssigkeit erhielt. Die 250 pg/ml Verdünnung diente als höchster Standard, während die entsprechende Menge Verdünnungs-Lösung als Null-Standard diente (0pg /ml).

Nach Zugabe von 100 µl der mitgelieferten Assay-Verdünnung auf jedes Well einer 96 Well-Platte, pipettierte man je 100 µl der zuvor hergestellten Proben, der Kontrollen und der sieben Verdünnungen der Standardreihe in je ein Well. Die Well-Platte wurde zur Inkubation, abgedeckt mit anhaftender Folie, für zwei Stunden auf einen horizontalen Plattenschüttler (Heidolph Duomax 1030, Heidolph Instruments, Schwabach) gestellt und geschüttelt.

Anschließend folgten vier Waschschrte mit je 400 µl des mitgelieferten Wasch-Puffers, den man mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in die Wells gab und wieder abpipettierte. Nach dem letzten Waschschrte wurde die Well-Platte

gegen ein sauberes Papier-Tuch gedrückt, wodurch ein vollständiges Entfernen der restlichen Flüssigkeit gewährleistet wurde.

Vom monoklonalen, spezifisch gegen IL-5 gerichteten Sekundärantikörper wurde je 200 µl zu jedem Well gegeben und weitere zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit einem Enzym konjugiert, das in der Lage ist, das später hinzugefügte Substrat umzusetzen. Damit nur in den Wells ein Substratumsatz stattfindet, in denen der Sekundärantikörper an IL-5 gebunden hatte, wurde durch weitere Waschschriffe der ungebundene Antikörper entfernt.

Die Substratlösung wurde kurz vor dem letzten Inkubationsschritt hergestellt, um eine frühzeitige Reaktion der Substrate zu verhindern. Dazu mischte man zwei mitgelieferte Reagenzien, die einmal Hydrogen-Peroxidase und einmal Tetramethylbenzidine enthielten, zu gleichen Teilen. Je 200 µl der Substratlösung pro Well wurden auf die Platte gegeben. Durch Aluminium-Folie wurden die entstehenden Farbstoffe vor Licht geschützt.

Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N Sulfursäure, die ebenfalls im Lieferumfang enthalten war, gestoppt. Innerhalb von 30 min wurde die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers bestimmt und mit der entsprechenden Software ausgelesen.

6.2.3. Muriner APC-ELISA

Es gibt Studien, die die Schlussfolgerung zulassen, dass Major Basic Protein verhindert, das während der Thrombose APC entsteht. Um herauszufinden, ob die APC-Konzentration in den MBP-knockout-Mäusen höher ist als in der Kontrollgruppe, wurde das Plasma dieser Tiere mit einem kommerziellen ELISA-Kit untersucht (ELISA Kit for Activated Protein C (APC), Cloud-Clone CORP., Katy, Texas, USA)

6.2.3.1. Durchführung

Der ACP-ELISA wurde ähnlich wie der IL-5-ELISA durchgeführt. Nachdem die Proben und Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht worden waren, wurde der im Lieferumfang enthaltene APC-Standard in 1 ml Standard-Verdünnungslösung aufgelöst und daraus wurde eine Verdünnungsreihe erstellt.

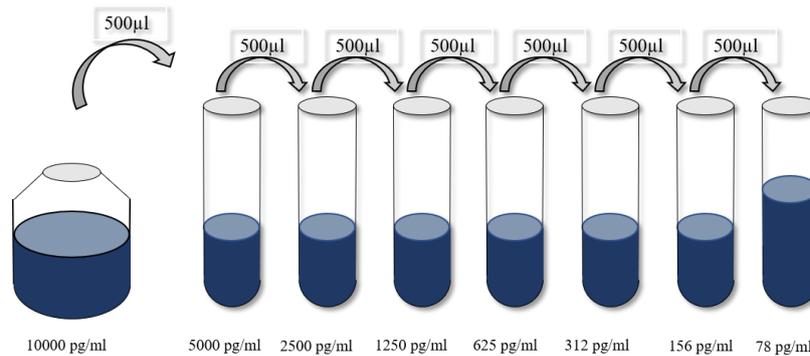


Abbildung 9: Herstellung der Standardreihe des APC-ELISAs

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde in sieben Eppendorf-Gefäße 500 µl der mitgelieferten Verdünnungslösung vorgelegt. In das erste Eppendorf-Gefäß wurden 500 µl des Standards überführt und vermischt. 500 µl der Verdünnung wurden in das nächste Gefäß überführt. So wurde fortgefahren, bis man beim siebten und letzten Eppendorf-Gefäß 1000 µl Flüssigkeit erhielt. So erhielt man sieben Verdünnungsstufen mit einer höchsten APC-Konzentration von 5000 pg/ml und der niedrigsten Verdünnung von 78 pg/ml. Außerdem diente die Verdünnungslösung als 0-Standard.

Nachdem man die Standards und die Proben auf die 96-Well-Platte, die mit einem APC spezifischen Antikörper beschichtet war, aufgetragen hatte, wurden die Proben für 60 min in einem 37°C warmen Inkubator gebracht. Anschließend entfernte man die Flüssigkeit aus den Wells und 100 µl Reagenz A, welches spezifisch gegen APC gerichtetete, mit Biotin konjugierte Antikörper enthielt, wurde mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well pipettiert. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C folgte ein Waschschrift analog zu den Waschschriften des IL5-ELISA. Die 100 µl Reagenz B, die man pro Well hinzugab, enthielten Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugate, die in der 20-minütigen Inkubationszeit an das Biotin banden. Mit einem letzten Waschschrift entfernte man alle nicht an APC gebundene Antikörper und fügte 100 µl pro Well von einer Lösung hinzu, die das Substrat enthielt, welches das Enzym Meerrettichperoxidase umsetzen konnte. Nach 3-5 min stoppte man die Reaktion mit einer Stopp-Lösung und maß den Umsatz des Substrats photometrisch.

7. Entstehung von Eosinophil Extracellurlar Traps (EETs)

Nachdem schon bei neutrophilen Granulozyten die Bildung von sogenannten „Extracellular Traps“ beobachtet wurde, ist mittlerweile bekannt, dass auch eosinophile Granulozyten ihre mitochondriale DNA zu netzartigen Strukturen

außerhalb der Zelle formen können, die zusätzlich zytotoxische Proteine wie MBP und EPC enthalten (138).

Um die Zellen auf den Objektträger zu ziehen, wurden 100 µl der Lösung, die die eosinophilen Granulozyten enthielt, parallel zum kurzen Rand des Objektträgers, in wenigen Millimeter Entfernung zu diesem, aufgetragen. Nun wurde die Flüssigkeit mit den Zellen mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen.

Sofort im Anschluss wurden die Zellen mit -20°C kaltem Aceton fixiert, welches man mit einer Einmalpipette auf die Objektträger tropfte. Danach ließ man die Schnitte eine Stunde trocknen, um sie anschließend zu waschen. Der Waschschritt erfolgte mit 1:10 verdünntem PBS. Um die Adhäsion der Zellen auf dem Objektträger nicht zu zerstören, wurden alle Waschschriffe ohne Tween und möglichst kurz, dreimal je eine Minute, durchgeführt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Goat-Serum für 30 min geblockt, bevor ein gegen MBP gerichteter Antikörper (Mouse Anti-Eosinophil Major Protein Antibody, Clone BMK13, Chemikon®, Merck Chemicals GmbH, Germany), 1:100 in PBS gelöst, aufgetragen wurde. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Ein weiterer Antikörper, der sich gegen das spezifisch auf Plättchen vorkommende Oberflächenmolekül CD41 (Rabbit anti-CD41-Antibody, Abcam PLC, Cambridge, UK) richtet, wurde ebenfalls in einem Verhältnis von 1:100 aufgetragen.

In einem zweiten Waschschritt wurde der nicht gebundene Antikörper vom Objektträger entfernt. Der Sekundärantikörper, der an anti-MBP-Antikörper band, war gegen Proteine der Maus gerichtet, da der MBP-Antikörper aus der Maus stammte. Der Sekundärantikörper war mit einem Alexa Fluor 488-Fluorochrom markiert. Der CD41-Antikörper wurde mit einem Alexa Fluor 594-Fluorochrom markiertem Sekundärantikörper detektiert. Drei Minuten vor Ende der 60-minütigen Inkubationszeit, wurde die Kernfärbung HOECHST aufgetragen.

Nach dem letzten Waschschritt wurde ein Eindeckmedium und anschließend ein Deckglas aufgetragen und die Objekte zur Trocknung und Lagerung in einen 4°C kalten Kühlschrank gelegt.

Die ausgestrichenen Zellen wurden, im Anschluss an das immunhistologische Färben, unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, Bensheim) durch eine Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Göttingen) und einer entsprechenden Software (AxioVision) fotografiert. Dazu wurden Aufnahmen in der 20 x Vergrößerung in 10 x 10 Positionen angefertigt

Anschließend wurden die eosinophilen Granulozyten und die EETs, die sich gebildet hatten, mit der Software ImageJ2 gezählt.

Um die Interaktionen zwischen Eosinophilen und Thrombozyten besser darstellen zu können, wurden zusätzlich Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop gemacht (Laser Scanning Microscop, LSM 880, Zeiss, Göttingen). Diese wurden mit einer Software angeschaut und ausgewertet (ZEN Imaging Software, Zeiss, Göttingen).

8. Versuchsplanung und Durchführung

8.1. *In vivo*-Versuche

8.1.1. FeCl₃-Verletzung nach 13 Wochen Fütterung mit Cholesterolfutter

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
ApoE x ΔdblGATA1	ko/ko x ko/ko	17 Wochen	18
ApoE x ΔdblGATA1	ko/ko x wt/wt	17 Wochen	18

Tabelle 2: ApoE x ΔdblGATA1-Tiere ohne Apolipoprotein E, sowie mit oder ohne eosinophile Granulozyten

8.1.2. FeCl₃-Verletzung

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
Selp	ko/ko	8-10 Wochen	7
C57BL/6J	wt/wt	8-10 Wochen	7

Tabelle 3: Mausgruppen mit oder ohne P-Selektin

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
MBP	ko/ko	8-10 Wochen	10
MBP	wt/wt	8-10 Wochen	10

Tabelle 4: MBP-Tiere mit oder ohne Major Basic Protein

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
EPX	ko/ko	8-10 Wochen	10
EPX	wt/wt	8-10 Wochen	10

Tabelle 5: EPX-Tiere mit oder ohne Eosinophil Peroxidase**8.1.3. FeCl₃-Verletzung und Behandlung mit anti-Siglec-F-Antikörper**

Stamm	Genotyp	Alter	Antikörper	Anzahl n
C57BL/6J	ko/ko	8-10 Wochen	anti-Siglec-F	7
C57BL/6J	wt/wt	8-10 Wochen	Rat IgG	7

Tabelle 6: C57BL/6J-Tiere behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper oder mit Rat IgG-Antikörper**8.1.4. Anfärbung der eosinophilen Granulozyten im Thrombus**

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
Selp	ko/ko	8-10 Wochen	4
C57BL/6J	wt/wt	8-10 Wochen	4

Tabelle 7: Mausgruppe mit oder ohne P-Selektin

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
C57BL/6J	wt/wt	8-10 Wochen	4
C57BL/6J	wt/wt	8-10 Wochen	4

Tabelle 8: C57BL/6J-Tiere behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper oder mit Rat IgG-Antikörper**8.1.5. APC-ELISA**

Stamm	Genotyp	Alter	Anzahl n
MBP	ko/ko	8-10 Wochen	8
MBP	wt/wt	8-10 Wochen	8

Tabelle 9: MBP-Tiere mit oder ohne Major Basic Protein**8.2. In vitro-Versuche****8.2.1. Untersuchung auf IL-5-Konzentration mittels ELISA**

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	8
inaktiv	inaktiv	8

Tabelle 10: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten oder mit ruhenden Plättchen

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	8
inaktiv	Thrombin	8

Tabelle 11: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Thrombin

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	8
inaktiv	Überstand aktiver Thrombozyten	8

Tabelle 12: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Überstand aktivierter Plättchen

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-P-Selektin	7
inaktiv	aktiviert	Mouse IgG1	7

Tabelle 13: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne P-Selektin-Antikörper

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-CCL5	3
inaktiv	aktiviert	Rabbit IgG	3

Tabelle 14: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne CCL5-Antikörper

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-Siglec-F	7
inaktiv	aktiviert	Mouse IgG1	7

Tabelle 15: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit und ohne Siglec-F-Antikörper

8.2.2. Untersuchung auf die Bildung der EETs

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	7
inaktiv	inaktiv	7

Tabelle 16: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten oder mit ruhenden Plättchen

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	7
inaktiv	Thrombin	7

Tabelle 17: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Thrombin

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Anzahl n
inaktiv	aktiviert mit Thrombin	9
inaktiv	Überstand aktiver Thrombozyten	9

Tabelle 18: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Überstand aktivierter Plättchen

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-P-Selektin	7
inaktiv	aktiviert	Mouse IgG1	7

Tabelle 19: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne P-Selektin-Antikörper

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-CCL5	6
inaktiv	aktiviert	Rabbit IgG	6

Tabelle 20: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne CCL5-Antikörper

Eosinophile Granulozyten	Plättchen	Antikörper	Anzahl n
inaktiv	aktiviert	anti-Siglec-F	7
inaktiv	aktiviert	Mouse IgG1	7

Tabelle 21: Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne Siglec-F-Antikörper

9. Statistische Auswertung

Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit wurden als Orientierungsstudien konzipiert. Da der Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die arterielle Thrombose in dieser Art bisher noch nicht beschrieben wurde, ging es in der Arbeit darum, Hinweise auf wichtige Effekte zu finden, auch wenn in den einzelnen Gruppen keine Signifikanz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe erreicht wurde. Auch aufgrund des Tierschutzes sind die Gruppengrößen mit relativ geringen Tierzahlen geplant, um einen unnötigen Verbrauch von Mäusen zu vermeiden.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programmes GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Ebenso wurden die Graphen mit diesem Programm erstellt. In den Graphen ist der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet.

Es wurden immer die Ergebnisse einer Gruppe mit einer Kontrollgruppe verglichen. In den *in vivo*-Versuchen, in denen die Thrombusentwicklung untersucht wurde, war die Messgröße die Zeitspanne von Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zur Rekanalisation des Thrombus. Vor dem eigentlichen Test auf Signifikanz wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test die Daten auf Normalverteilung überprüft. Waren Normalverteilung, eine gleichen Anzahl n und eine gleiche Varianz in Versuchs- und Kontrollgruppe gegeben, wurde der Students T-Test durchgeführt. Bei unterschiedlichen Anzahlen n und ungleicher Varianz wurde der T-Test mit Welchs Korrektur durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der Mann-Whitney-U-Rangsummentest gemacht, unter der Voraussetzung, dass damit eine größere Teststärke als beim T-Test erreicht wurde. Ein Ergebnis gilt als statistisch signifikant bei einem p -Wert $< 0,05$.

Wurden mehrere Gruppen gegen eine Kontrollgruppe verglichen, wurde nach dem Ermitteln des p -Wertes das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Holm-Methode adjustiert. Bei dieser Methode werden die ermittelten p -Werte ihrer Größe nach aufsteigend sortiert. Für jeden p -Wert wird ein eigenes Signifikanzniveau errechnet, welches er nicht überschreiten darf. Sobald ein p -Wert das errechnete Signifikanzniveau überschreitet sind alle größeren, ermittelten p -Werte automatisch statistisch nicht signifikant. Die

Signifikanzniveaus lassen sich wie folgt ermitteln: Der angenommene alpha-Fehler von 0,05 wird durch die Anzahl (k) der durchgeführten Tests geteilt.

$$k=1, 2, \dots, j$$

$$\alpha_1=0,05/j$$

Allgemein gilt die Formel: $\alpha_k=0,05/k-j+1$

Zusätzlich wurde zu jedem Versuch die Effektgröße Cohen's d berechnet. Das Erreichen einer Signifikanz ist stark von der Größe der Versuchsgruppe abhängig. Das heißt, dass man durch Erhöhen der Anzahl n immer $p<0,05$ erhält. Die Effektgröße sagt dagegen unabhängig vom Stichprobenumfang aus, wie stark der Effekt zwischen den Gruppen ist und man kann damit besonders in Orientierungsstudien Aussagen treffen, ob eine biologische Relevanz besteht, auch wenn aufgrund der kleinen Gruppengrößen noch keine Signifikanz erreicht ist. Werte $<0,3$ werden als vernachlässigbar eingestuft, Werte $>0,3>0,5$ werden als geringer Effekt gewertet. Als mittlere Effekte werden Werte von $>0,5$ angesehen und Werte $>0,8$ werden als starke Effekte angesehen (209).

Abgesehen vom p-Wert und Cohen's d wurden auch noch die Varianzen und die Relative Mittlere Differenz berechnet. Bei der Versuchsplanung legte man im Vorfeld fest, wie groß die relative mittlere Differenz sein muss, dass von einem Unterschied in den Gruppen ausgegangen werden kann.

Messgröße	Mindestabweichung
Zeit der Gefäßokklusion	25%
Anzahl der Eosinophilen im Thrombus	50%
Höhe der IL-5-Konzentration	50%
Anteil der EETs an den Gesamtzellen	50%

Tabelle 22: Geforderte Mindestabweichung

Die Mindestabweichungen zwischen den Messwerten der Versuchsgruppen, die die Effekte als relevant genug einstufen, um weitere Untersuchungen durchzuführen.

V. ERGEBNISSE

1. Eosinophile Granulozyten stabilisieren den Thrombus im FeCl₃-Modell

Um herauszufinden, ob eosinophile Granulozyten einen Einfluss auf die Thrombose haben, wurden verschiedene Mauslinien operiert, bei denen Gene ausgeschaltet wurden, die Einfluss auf die Funktion der Eosinophilen haben.

Da die Vermutung nachgewiesen werden sollte, dass Eosinophile einen verstärkenden Einfluss auf die Entwicklung der Thrombose haben, wurde zuerst eine Mausgruppe angeschaut, bei denen eosinophile Granulozyten nicht vorhanden sind (Δ dblGATA1), die zur Bildung arteriosklerotischer Plaques auf einen ApoE-Hintergrund gezüchtet wurden und dadurch, unter einer hochkalorischen und fettreichen Ernährung (90 Tage), arteriosklerotische Plaques in den Arterien bildeten.

Das Fehlen der Eosinophilen in den ApoE^{-/-}- Δ dblGATA1-Tieren führt nach Applikation von FeCl₃ zu einer reduzierten Stabilität des Thrombus und somit zu einer kürzeren Okklusionszeit der A. carotis verglichen mit den Kontrolltieren. In diesen Gruppen zeigte sich ein mittlerer Unterschied in der Okklusionszeit von 42% mit einem mittleren Effekt Cohen's d von 0,78. Dieser Effekt ist statistisch signifikant (p=0,027).

Dieser Versuch zeigte, dass die eosinophilen Granulozyten die Stabilität des Thrombus unterstützen. In Abwesenheit der Eosinophilen löst sich der Thrombus schneller auf.

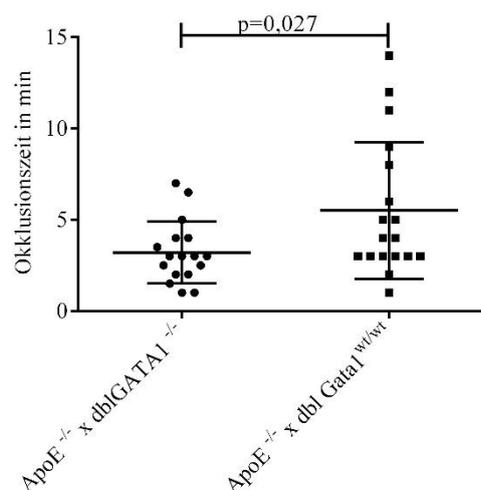


Abbildung 10: Okklusionszeit der ApoE^{-/-} x Δ dblGATA1- -Gruppe

Zeitspanne vom Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zu Rekanalisation des Thrombus in Minuten bei ApoE^{-/-} x ΔdblGATA1^{-/-}-Tieren (n=17) verglichen mit dem Wildtyp (n=18).

Stamm	ApoE ^{-/-} x ΔdblGATA1	
	ko (n=17)	wt (n=17)
Mittelwert (Standardabweichung)	3,2 min (1,7 min)	5,5 min (3,74 min)
P-Wert	0,027*	
Effektgröße	-0,78	
Relative mittlere Abweichung	-42%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 23: Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der ApoE^{-/-} x ΔdblGATA1-Gruppe)

1.1. Rekrutierung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose

Um den Effekt der durch Eosinophile vermittelten, erhöhten Thrombusstabilität zu untersuchen, wurde geschaut, ob eosinophile Granulozyten zur Verletzung rekrutiert werden und dort lokal im Thrombus wirken oder ob sie die Thrombusbildung über systemische Mediatoren beeinflussen. Mit Hilfe eines Intravitalmikroskops wurde die Dynamik der Eosinophilenrekrutierung während der Thrombose beobachtet.

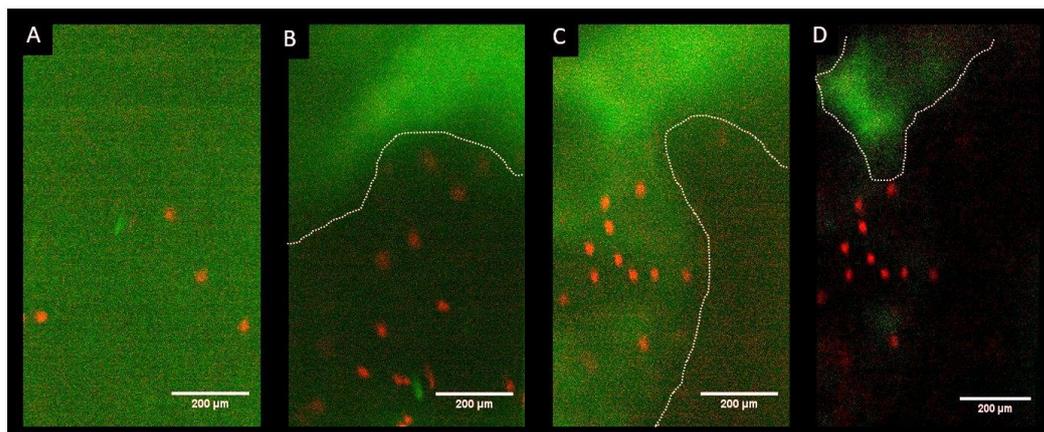


Abbildung 11: Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten im Zeitverlauf
A: 10 min nach Verletzung, B: 20 min nach Verletzung, C: 30min nach Verletzung, D: 40 min nach Verletzung. Die grüne Fläche ist der Thrombus, der durch die DCF-markierte Plättchen gebildet wird und dessen Rand durch die weiße Linie eingezeichnet ist. Die eosinophilen Granulozyten sind rot. Man kann in dieser Abbildung gut erkennen, dass der Thrombus sich aufbaut (B und C) und wieder abbaut (D). Die Eosinophilen sind sowohl vor der Thrombusentstehung (A) als auch noch nach

dessen Abbau (D) vorhanden. Die Aufnahmen wurden an einer EoCre x PC-G5-tdTflox-Maus gemacht.

Wie man in Abbildung 11 erkennen kann, werden schon zu Beginn der Thrombose die eosinophilen Granulozyten rekrutiert. Ihre Anzahl nimmt mit dem zeitlichen Verlauf kontinuierlich zu. Die Eosinophilen kommen sowohl im Bereich des Thrombus vor, als auch außerhalb des Bereiches. Sie verbleiben auch nach der Lyse des Thrombus an der Läsion.

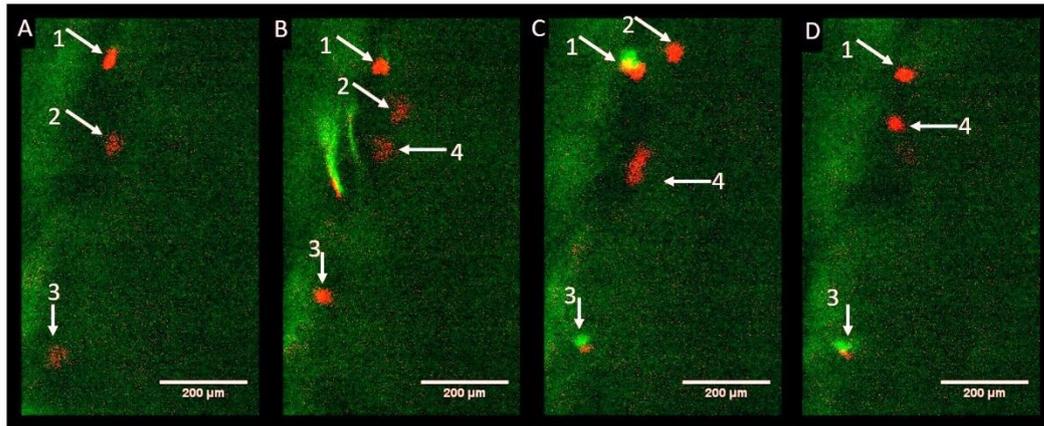


Abbildung 12: Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten 5 min nach FeCl₃-Verletzung

Die Pfeile markieren die Eosinophilen (rot) und die Nummerierung zeigt, welche Zelle man in der Bildabfolge betrachtet. Daran erkennt man, dass sich einige Zellen stationär an einem Ort aufhalten, während andere Zellen auftauchen und weiterwandern. Die grünen Zellen sind Thrombozyten (B, C, D). Man erkennt eine Kolokalisation zwischen Plättchen und Zelle 1 sowie Zelle 2 (C, D). Die Aufnahmen wurden an einer EoCre x PC-G5-tdTflox-Maus gemacht.

In der Bildabfolge der Abbildung 12 wird die Dynamik der Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten 5 min nach der FeCl₃-Verletzung dargestellt. Wie man erkennt, tauchen die Eosinophilen sehr schnell nach Setzen des Reizes auf. Das heißt, dass sie schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Thrombose vorhanden sind. Einige Eosinophile adhären fest am Endothel, während andere Zellen auftauchen und weiterwandern. Man erkennt zudem eine Kolokalisation zwischen Plättchen und Eosinophilen, welche teilweise nur ein kurzer Kontakt ist, jedoch auch zu dauerhaften Interaktionen führen kann.

Zwar wurde deutlich, dass die Eosinophilen sehr schnell an der Läsion auftauchen, allerdings konnte keine Aussage getroffen werden, ob sie dort auch aktiv wirken. Daher wurde in dieser Arbeit in einem nächsten Schritt geschaut, ob eosinophile Granulozyten in einer aktivierten Form vorkommen. Hier wurde wieder die

EoCre x β PC-G5-tdTflox-Maus genutzt. Wie in Kapitel 1.1.8 beschrieben, exprimieren die eosinophilen Granulozyten dieser Maus-Linie bei Aktivierung ein GFP-Signal, welches mit einem Kalzium-Indikator gekoppelt ist. Die folgende Abbildung 13 zeigt ein Kalziumsignal, das entsteht nachdem ein Thrombozyt mit einem eosinophilen Granulozyten interagiert. Die Plättchen wurden zusätzlich *ex vivo* mit einem violetten Farbstoff markiert und dem Versuchstier vor der Operation injiziert. In der Komposition der drei Farbkanäle sieht man eine Kolo-kalisation der Signale und kann daher davon ausgehen, dass ein Thrombozyt an einen eosinophilen Granulozyten, der dadurch aktiviert wird, gebunden hat. Die Intensität des Kalziumsignals im Zeitverlauf wurde gemessen, was in Abbildung 14 dargestellt wird. Das Kaliumsignal wird mit zunehmender Dauer stärker. Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass die Eosinophilen am Ort der Läsion aktiviert sind/werden und ihren Beitrag in der Thrombusentstehung leisten.

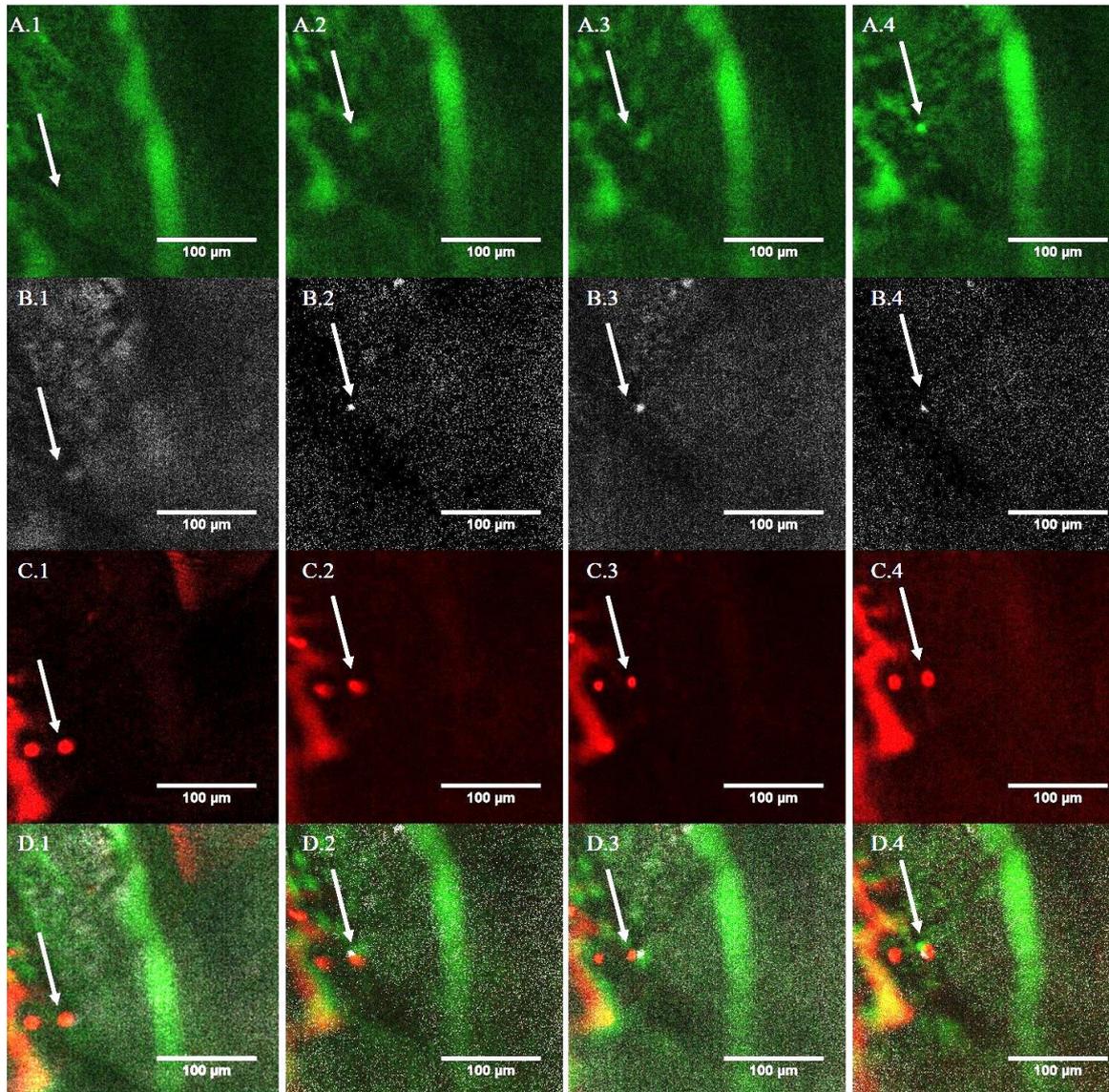


Abbildung 13: Aktivierung der eosinophilen Granulozyten *in vivo* durch einen Thrombozyten

In dieser Zeitreihe (1, 2, 3, 4) ist die Entstehung eines Kalziumsignals (grün), welches nach der Adhäsion eines Thrombozyten (grau) an einen eosinophilen Granulozyten (rot), gezeigt. Die Kanäle werden einzeln dargestellt (A, B, C). Zusätzlich wird eine Komposition der Kanäle gezeigt (D), sodass man erkennt, dass die Signale kolokalisieren. Die Pfeile zeigen auf die Stelle, an der sich der eosinophile Granulozyt befindet, sodass man in jedem Kanal nachvollziehen kann, ob ebenfalls das Signal des Thrombozyten beziehungsweise das Kalziumsignal zu sehen ist. Ein eosinophiler Granulozyt bindet an das Endothel der A. carotis (C.1). Anschließend adhärirt ein Thrombozyt an dem Eosinophilen (B.2, D.2). Ein Kalziumsignal entsteht und wird mit zunehmender Dauer stärker (A.2, A.3, A.4). Untersucht wurde eine EoCre x PC-G5-tdTflox-Maus.

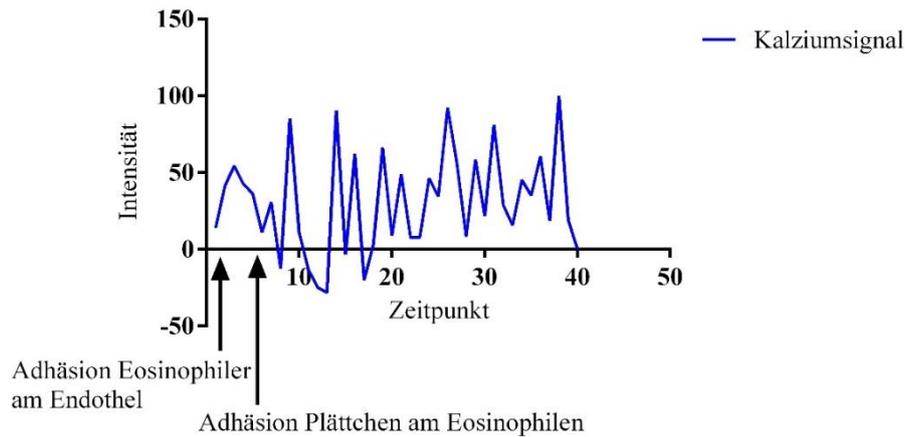


Abbildung 14: Stärke des Kalziumsignals im Zeitverlauf

Dargestellt ist die Intensität eines Kalziumsignals, das von einem eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Es entsteht, nachdem der Eosinophile am Endothel adhärirt. Dieser Zeitpunkt ist in der Abbildung durch den ersten Pfeil gekennzeichnet ist. Deutlich stärker wird das Kalziumsignal nachdem ein Thrombozyt am Eosinophilen adhärirt. Dieser Zeitpunkt ist ebenfalls durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die starken Ausschläge nach unten kommen durch die Pulsation des Gefäßes zustande, wodurch die Signale nicht immer im Fokus liegen. Die Kanäle des Kalziumsignals und des dtTomato-Signal, das als Negativkontrolle dient, wurden normalisiert. Untersucht wurde eine EoCre x PC-G5-tdTflox-Maus.

Ein wichtiges Oberflächenmolekül, das für die Rekrutierung zahlreicher Entzündungszellen verantwortlich ist, ist P-Selektin, welches von Thrombozyten, Endothelzellen und auch eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Der natürliche Ligand PSGL-1 kommt auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten vor (186). Um den Einfluss dieses Rezeptors auf die Thrombose zu verstehen, wurde eine P-Selektin-defiziente Mausgruppe ($Selp^{-/-}$) mit dem $FeCl_3$ -Modell untersucht.

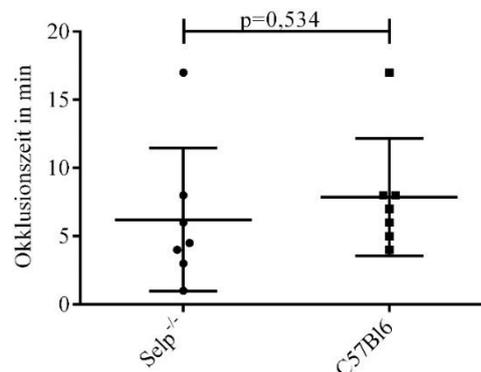


Abbildung 15: Okklusionszeit der Selp-Gruppe

Die Zeitspanne vom Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zu Rekanalisation des Thrombus in Minuten bei $Selp^{-/-}$ -Tieren (n=7) verglichen mit dem Wildtyp (n=7).

Die Okklusionszeit ist im Mittel in der Versuchsgruppe 22% kleiner als in der Kontrollgruppe bei einem mittleren Effekt Cohen's d von 0,5. Aufgrund der ungleichen

Standardabweichung wurde der T-Test mit Welchs Korrektur angewandt, der einen p-Wert von 0,534 ergab, was nicht statistisch signifikant ist. Diese Orientierungsstudie gibt Hinweise, dass ein Effekt vorliegen könnte, der durch einen größeren Stichprobenumfang belegt werden sollte.

Stamm	Selp	
	ko (n=7)	wt (n=7)
Mittelwert (Standardabweichung)	6,2 min (2 min)	7,9 min (4,3min)
P-Wert	0,534	
Effektgröße	-0,5	
Relative mittlere Abweichung	-22%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 24: Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der Selp-Gruppe)

Die Thromben der Tiere wurden im Anschluss an die Operation entnommen und histologisch untersucht. Je Gruppe konnten vier Thromben auf Eosinophile untersucht werden, da einige Thromben vor Abschluss der *in vivo*-Experimente abgespült wurden und daher nicht entnommen werden konnten.

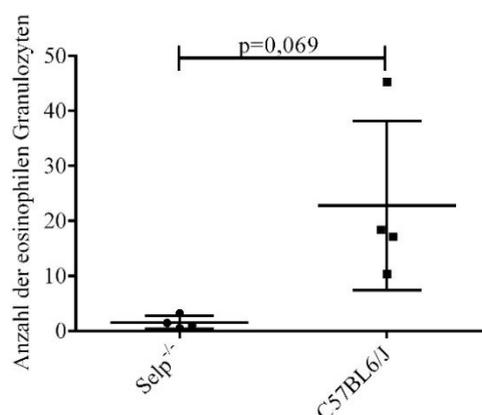


Abbildung 16: Histologische Untersuchung des Thrombus (Selp)

Durchschnittliche Anzahl der Eosinophilen/mm² Thrombusfläche der Selp^{-/-}-Tiere (n=4) verglichen mit dem Wildtyp (n=4).

Die mit einem Siglec-F-Antikörper detektierten eosinophilen Granulozyten wurden in zehn histologischen Längsschnitten eines Thrombus gezählt. Die Auswertung zeigte deutlich, dass bei den Wildtyptieren eine sehr viel höhere Anzahl von Eosinophilen zu finden ist. Der Mittelwert der Wildtypgruppe liegt bei 23 Zellen pro mm², während auf dieser Fläche bei den Knockout-Tieren nur 1,6 Zellen zu finden sind. Dadurch ist die Anzahl der Eosinophilen pro mm² bei den Knockout-Tieren im Mittel 93,18% kleiner

als in der Kontrollgruppe bei einem starken Effekt Cohen´s d von 1,9. Der Effekt ist statistisch signifikant ($p=0,033$)

Stamm	Selp	
	ko (n=4)	wt (n=4)
Mittelwert (Standardabweichung)	1,55* (1,2*)	23* (15,4*)
P-Wert	0,033*	
Effektgröße	-1,9	
Relative mittlere Abweichung	-93,18%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 25: Zusammenfassung der statistischen Größen (Thromben der Selp-Gruppe)

Histologische Untersuchung der Thromben der Selp-Gruppe (*=Zellen/mm²).

1.2. Bedeutung der eosinophilen, zytotoxischen Proteine in der arteriellen Thrombose

Da die ersten Untersuchungen Hinweise darauf gaben, dass die eosinophilen Granulozyten in der Thrombose zu einer längeren Okklusionszeit führen und an der Dynamik der Bildung eines Gerinnsels beteiligt sind, wurden weitere *in vivo*-Versuche durchgeführt, um Art und Weise der Beeinflussung besser zu verstehen.

Die Eosinophilen entfalten ihre Wirkung durch die Ausschüttung ihrer zytotoxischen Granula. Daher wurden zwei Mausmodelle untersucht, bei denen die Gene für jeweils ein zytotoxisches Protein ausgeschaltet war.

Bei der Mauslinie, die das Protein Eosinophilen Peroxidase nicht ausbildete, war in den *in vivo*-Versuchen die Okklusionszeit im 21,12% geringer als in der Vergleichsgruppe bei einer vernachlässigbaren Effektgröße Cohen´s d von 0,19. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in den Verschlusszeiten. Auch wenn die Gruppengröße relativ gering ist, zeigen die statistischen Werte zusammen, dass der Unterschied im Genotyp zwischen diesen Mausgruppen in dem FeCl₃-Modell sich nicht bedeutend auf die Okklusionszeit auswirkt.

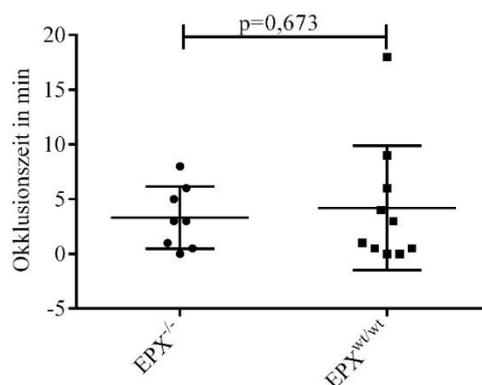


Abbildung 17: Okklusionszeit der EPX-Gruppe

Die Zeitspanne vom Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zu Rekanalisation des Thrombus in Minuten bei EPX^{-/-}-Tieren (n=8) verglichen mit dem Wildtyp (n=10).

Stamm	EPX	
	ko (n=8)	wt (n=10)
Mittelwert (Standardabweichung)	3,3 min (2,8 min)	4,2 min (5,7 min)
P-Wert	0,673	
Effektgröße	-0,19	
Relative mittlere Abweichung	-21,12%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 26: Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der EPX-Gruppe)

Im Gegensatz zu dem EPX-Modell zeigt sich in der Mauslinie, die kein MBP bildet, dass diese eine im Mittel 84,3%ig geringere Okklusionszeit hat mit einer starken Effektgröße Cohen's d von 2,4. Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0,001$. Bei der Knockout-Maus der MBP-Linie wurde in drei Fällen beobachtet, dass sich überhaupt kein okklusiver Thrombus bildete, sondern dass sich das Gerinnsel schon lange vor Verschluss des Gefäßes auflöste. In der Kontrollgruppe bildete sich bei jeder Maus ein gefäßverschließender Thrombus, wobei die kürzeste Verschlusszeit 2 min andauerte, was schon deutlich unter dem erreichten Mittelwert von 5,5 min lag.

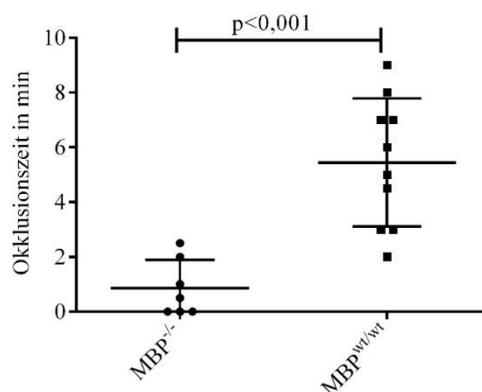


Abbildung 18: Okklusionszeit der MBP-Gruppe

Die Zeit vom Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zu Rekanalisation des Thrombus in Minuten bei MBP^{-/-}-Tieren (n=7) verglichen mit dem Wildtyp (n=10)

Stamm	MBP	
	ko (n=7)	wt (n=10)
Mittelwert (Standardabweichung)	0,86 min (1 min)	5,5 min (2,3 min)
P-Wert	p<0,001*	
Effektgröße	-2,4	
Relative mittlere Abweichung	-84,3%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 27: Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der MBP-Gruppe)

Die folgenden Abbildung 19 und Abbildung 20 veranschaulichen die in den obigen Graphen gezeigten Ergebnisse. Sie zeigen die Dynamik der Thrombusentstehung im Zeitverlauf. Hier dargestellt sind repräsentative Aufnahmen 10, 20, 30 und 40 min nach FeCl₃ Applikation. In Abbildung 19 ist das Beispiel einer Wildtyp-Maus dargestellt. Es ist der typische Verlauf einer durch die FeCl₃-Verletzung ausgelösten Thrombose. Da die Verletzung an der lateralen Seite gesetzt wurde, wächst der Thrombus von dort ausgehend zu kontralateral gelegenen Seite (A, B). In den meisten Fällen verschließt er die A. carotis bei Wildtyp-Mäusen ungefähr nach 20 min. Nun hält sich einige Minuten ein Gleichgewichtszustand, in dem das Gefäß durch den Thrombus verschlossen ist. Danach beginnt sich der Thrombus wieder aufzulösen (C). Häufig bildet sich ein Kanal, durch den das Blut wieder durch den Thrombus fließen kann. Je nach Stabilität des Thrombus löst er sich unterschiedlich schnell wieder auf.

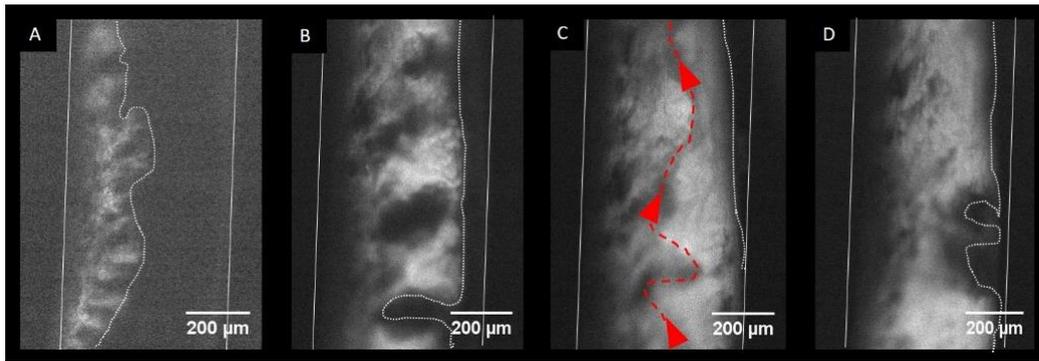


Abbildung 19: Thrombus im Zeitverlauf bei einer Wildtyp-Maus

Dargestellt ist der Thrombus in der A. carotis communis zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach FeCl_3 -Verletzung (A: 10min, B: 20 min, C: 30 min, D: 40 min). Die durchgezogenen weißen Linien markieren die Gefäßwand. Die gestrichelte weiße Linie verdeutlicht den Rand des Thrombus. Die roten Pfeile (C) zeigen einen Kanal, der sich innerhalb des Thrombus gebildet hat

Bei der Knockout-Maus der MBP-Linie ist dieser Verlauf nicht zu beobachten. Wie repräsentativ in Abbildung 20 gezeigt wird, baut sich der Thrombus sehr langsam auf, sodass er nach 20 min noch nicht einmal 50% des Durchmessers des Gefäßes erreicht hat (B). Auch nach 30 min ist noch kein Verschluss zu sehen (C) und nach 40 min kann man erkennen, dass das Gerinnsel bereits wieder kleiner wird (D).

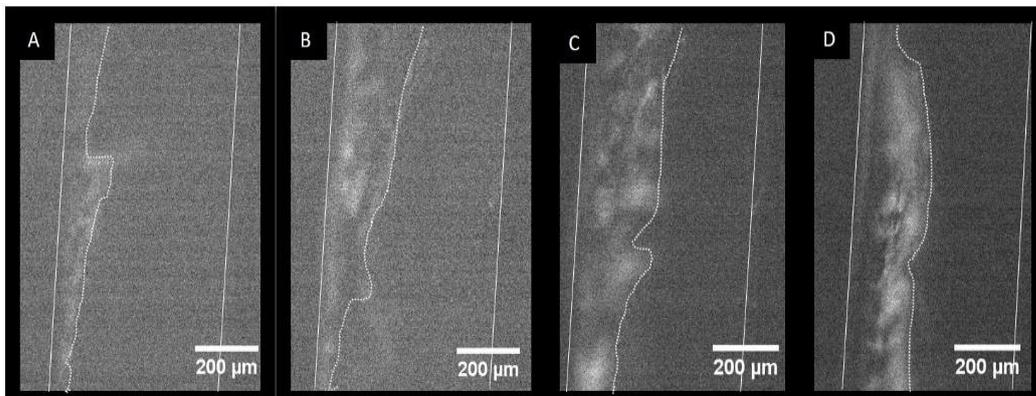


Abbildung 20: Thrombus im Zeitverlauf bei einer MBP^{-/-}-Maus

Dargestellt ist der Thrombus in der A. carotis communis zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach FeCl_3 -Verletzung (A: 10min, B: 20 min, C: 30 min, D: 40 min). Die durchgezogenen weißen Linien markieren die Gefäßwand. Die gestrichelte weiße Linie verdeutlicht den Rand des Thrombus.

Um herauszufinden, wie MBP diesen Effekt *in vivo* erzeugen kann, wurde den Tieren im Anschluss an die Operation kardial Blut entnommen und die zellulären Bestandteile abzentrifugiert, um Plasma für weitere Untersuchungen zu erhalten. Das Plasma wurde mit einem ELISA auf die Konzentration von APC untersucht, da MBP durch die Hemmung von Thrombomodulin die Entstehung von APC beeinflussen kann (147).

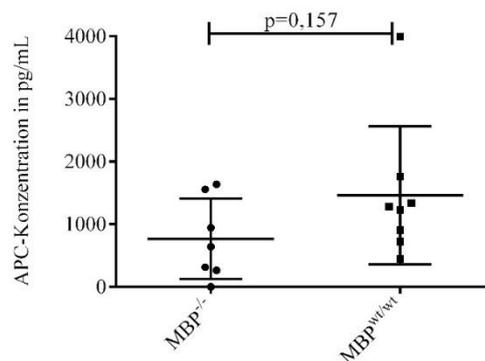


Abbildung 21: APC-Konzentration nach FeCl₃-Verletzung (MBP)

Untersucht wurde die APC-Konzentration im Plasma von MBP^{-/-}-Tiere (n=7) und Wildtypieren (n=7) 45 min nach FeCl₃-Verletzung

Stamm	MBP	
	ko (n=7)	wt (n=7)
Mittelwert (Standardabweichung)	766 pg/ml (642 pg/ml)	1461 pg/ml (1103 pg/ml)
P-Wert	0,157	
Effektgröße	-0,76	
Relative mittlere Abweichung	-48%	
Statistischer Test	Welchs T-Test	

Tabelle 28: Zusammenfassung der statistischen Größen (APC-ELISA)

APC-Konzentration im Plasma 45 min nach FeCl₃-Verletzung

Bei der gemessenen APC-Konzentration im Plasma sieht man im Mittelwert eine geringere Konzentration bei der MBP^{-/-}-Maus im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Dieser Unterschied beträgt im Mittel 48% bei einem mittelstarken Effekt Cohen's d von 0,76. Dieser Hinweis eines Einflusses von MBP auf die APC-Konzentration ist statistisch nicht signifikant und sollte mit einem größeren Stichprobenumfang verifiziert werden.

Die Untersuchungen des Einflusses der zytotoxischen Proteine MBP und EPX zeigen, dass Eosinophile die Thrombusstabilität über einen durch MBP vermittelten Mechanismus verstärken.

1.3. Inhibition der eosinophilen Granulozyten vermittelt durch den Rezeptor Siglec-F führt zu Reduktion der Thrombusstabilität

Es wurde schon in einigen Modellen gezeigt, dass eine Bindung eines Antikörpers an das Oberflächenmolekül Siglec-F eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der

eosinophilen Granulozyten hat (210-212). Ob diese Hemmung der Eosinophilen auch einen Einfluss auf die Entwicklung der Thrombose hat, wurde in einem Modell untersucht, in dem C57BL/6J-Mäusen ein anti-Siglec-F-Antikörper vor der Operation injiziert wurde. Der Kontrollgruppe wurde der Isotyp dieses Antikörpers verabreicht.

Die Mausgruppe, der der gegen Siglec-F gerichteten Antikörper verabreicht wurde, entwickelte keine stabilen Thromben. Schon nach einer durchschnittlichen Zeit von 1,9 min nach Verschluss des Gefäßes, begann sich der Thrombus wieder zu rekanalisieren. Bei der Kontrollgruppe, die wie die Versuchsgruppe aus sieben Tieren bestand, lag die durchschnittliche Okklusionszeit bei 11,4 min. Damit liegt die Okklusionszeit der Siglec-F-Gruppe im Mittel 83,3% unter der Okklusionszeit der Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen's d von 0,88. Dieser Effekt ist statistisch signifikant ($p=0,037$).

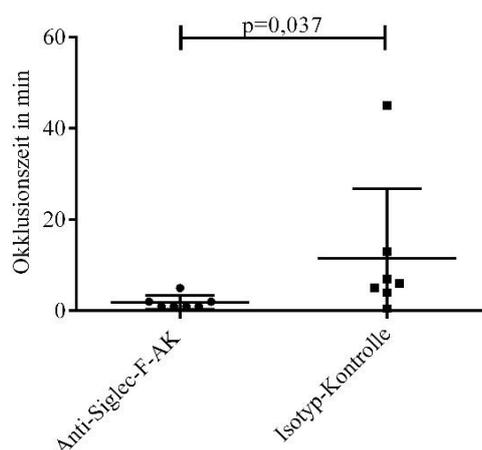


Abbildung 22: Okklusionszeit von Mäusen behandelt mit Siglec-F

Die Zeitspanne vom Verschluss des Gefäßes durch den Thrombus bis zur Rekanalisation des Thrombus bei Tieren, die mit einem Antikörper, gerichtet gegen Siglec-F, behandelt wurden ($n=7$) und Tieren, die mit der Isotypkontrolle des Antikörpers behandelt wurden ($n=7$).

Stamm	C57BL/6J	
	Siglec-F ($n=7$)	Rat IgG ($n=7$)
behandelt mit		
Mittelwert (Standardabweichung)	1,9 min (1,5 min)	11,4 min (15,3 min?)

P-Wert	0,037*
Effektgröße	-0,88
Relative mittlere Abweichung	-83,8%
Test	Mann-Whitney-U-Test

Tabelle 29: Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der Siglec-F-Gruppe)

Mäuse behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper und Kontrollgruppe mit dem Isotypen Rat IgG behandelt.

Die nach der Operation entnommenen Thromben wurden histologisch auf das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten untersucht. Dafür wurde die gezählte Anzahl der Eosinophilen auf die Fläche der ausgewerteten Thrombusschnitte berechnet, sodass man die durchschnittliche Anzahl an Zellen pro 1 mm² Fläche ermitteln konnte.

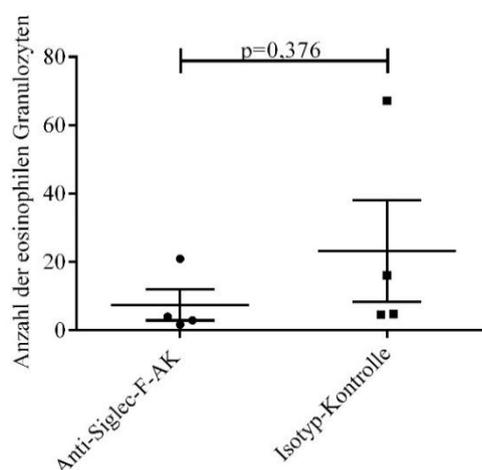


Abbildung 23: Histologische Untersuchung des Thrombus (Siglec-F)

Die durchschnittliche Anzahl der Eosinophilen auf 1mm² Thrombusfläche bei Tieren, die mit einem Antikörper, gerichtet gegen Siglec-F, behandelt wurden (n=4) und Tieren, die mit der Isotypkontrolle des Antikörpers behandelt wurden (n=4).

Stamm	C57BL/6J	
	Siglec-F (n=4)	Rat IgG (n=4)
behandelt mit		
Mittelwert	7,4	23
(Standardabweichung)	(9,1)	(28,8)

P-Wert	0,367
Effektgröße	-0,7
Relative mittlere Abweichung	-68%
Test	Welchs T-Test

Tabelle 30: Zusammenfassung der statistischen Größen (Thromben der Siglec-F-Gruppe)

Mausgruppe behandelt mit anti-Siglec-F Antikörper versus Mausgruppe behandelt mit Rat IgG.

In dieser Gruppe ist die Anzahl der Eosinophilen im Thrombus bei den Mäusen, die mit einem anti-Siglec-F-Antikörper behandelt wurden, im Mittel 68% geringer als bei den Mäusen, die den Isotyp injiziert bekamen, bei einem mittelstarken Effekt Cohen's d von 0,7. Dieser Effekt ist nicht statistisch signifikant ($p=0,367$). Zu beachten ist die sehr hohe Standardabweichung, die besonders in der Kontrollgruppe durch eine einzelne Maus verursacht wird, deren Anzahl an Eosinophilen stark von den anderen Werten abweicht. Der Hinweis auf einen Effekt auf die Anzahl der Eosinophilen durch die Antikörperbindung sollte durch einen größeren Stichprobenumfang verifiziert werden.

Die Ergebnisse geben den Hinweis, dass die Bindung eines Antikörpers an Siglec-F den verstärkenden Einfluss der Eosinophilen in der Thromboseentstehung hemmen, ohne die Anzahl der Eosinophilen in Thrombus zu reduzieren.

1.4. Blutbilder der Mauslinien

Im Anschluss an die *in vivo*-Versuche, in denen die arterielle Thrombose untersucht wurde, wurde den Mäusen intrakardial Blut abgenommen und von diesem wurden Blutbilder angefertigt. Diese wurden herangezogen, um zu überprüfen, ob es Unterschiede zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen in der Anzahl der Zellen gab, die einen Einfluss auf die Thrombose haben könnten. Untersucht wurde die Fraktion der Leukozyten (WBC), die Fraktion der Granulozyten und die Thrombozyten. Bei den Gruppen, die einen signifikanten Unterschied in der Okklusionszeit hatten und eine Genmutation, die die Eosinophilen beeinflussen könnte, wurde zusätzlich die Anzahl der Eosinophilen eruiert. Besonders in der Gruppe, die mit Siglec-F behandelt wurde, war die Anzahl der Eosinophilen von Interesse, da die Bindung an Siglec-F zur Apoptose der eosinophilen Granulozyten führt (213).

1.4.1. Anzahl der Leukozyten im Blut der Mauslinien

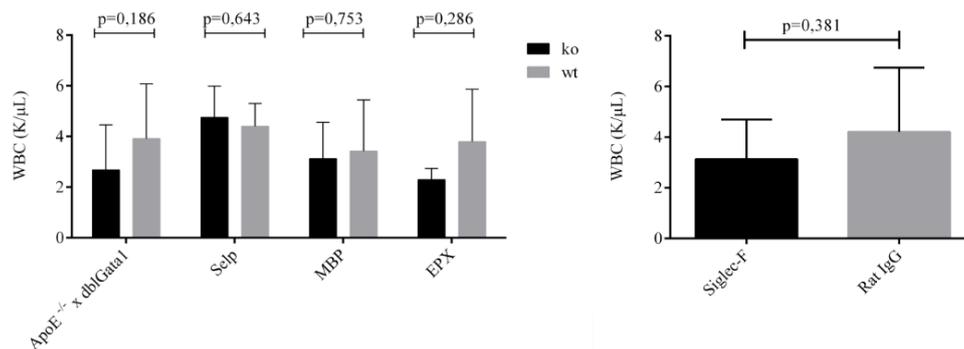


Abbildung 24: Anzahl der Leukozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien

Das Blut wurde im Anschluss an die Operation der Tiere intrakardial entnommen. Untersucht wurden Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{-/-}-Tiere (n=10) und Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{wt/wt}-Tiere (n=10), Selp^{-/-}-Tiere (n=6) verglichen mit C57BL/6J-Tieren (n=4), MBP^{-/-}-Tiere (n=7) verglichen mit MBP^{wt/wt}-Tieren (n=7), EPX^{-/-}-Tiere (n=3) verglichen mit EPX^{wt/wt}-Tieren (n=3) und Tiere, behandelt mit einem Siglec-F-Antikörper (n=7), verglichen mit Tieren, behandelt mit der Isotypkontrolle Rat IgG (n=6).

Bei der Messung der gesamten Fraktion der Leukozyten konnte in keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den Knockout-Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Am größten waren die Unterschiede in der Gruppe der ApoE^{-/-} x ΔdblGATA1-Tiere und in der Gruppe, die mit anti-Siglec-F behandelt wurden beziehungsweise mit der Isotypkontrolle. In diesen Gruppen hatte jeweils die Kontrollgruppe eine höhere Anzahl an Leukozyten, wobei die ApoE^{-/-} x ΔdblGATA1-Kontrollgruppe im Mittel 31,77% mehr Leukozyten im Vergleich zur Knockout-Gruppe hatte mit einem mittelstarken Effekt Cohen's d von 0,63. Der Hinweis auf einen Einfluss des Knockouts der Eosinophilen auf die Leukozytenanzahl ist nicht signifikant (p=0,186) und sollte durch einen größeren Stichprobenumfang überprüft werden.

Bei der Siglec-F-Gruppe haben die Tiere, die mit einem Siglec-F-blockierenden Antikörper behandelt wurden, im Mittel 21,31% weniger Leukozyten im Blut mit einem schwachen Effekt Cohen's d von 0,44. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (p=0,26).

Die Anzahl der Leukozyten liegt bei den Selp^{-/-}-Mäusen (n=6) in einem ähnlichen Bereich wie in der Gruppe der Wildtypen (relative mittlere Differenz=7,95%) bei einem nicht signifikanten (p=0,643) schwachen Effekt Cohen's d von 0,31.

Ebenso liegt die Anzahl der Leukozyten bei der MBP^{-/-}-Gruppe in einem ähnlichen Bereich wie bei der Kontrollgruppe (relative mittlere Differenz=8,8%) bei einem nicht signifikanten ($p=0,75$) vernachlässigbaren Effekt Cohen's d von 0,17.

Die Leukozytenanzahl der EPX^{-/-}-Tiere liegt im Mittel 39,49% unter der Anzahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe mit einem starken Effekt von Cohen's d von 1. Dieser deutliche Hinweis eines Einflusses des zytotoxischen Proteins EPX auf die Anzahl der Leukozyten sollte mit einem größeren Stichprobenumfang weiter untersucht werden.

Stamm	Apo ^{-/-} x ΔdblGATA1		Selp		MBP		EPX		Siglec-F	
	ko (10)	wt (10)	ko (6)	wt (4)	ko (7)	wt (7)	ko (3)	wt (3)	ko (7)	wt (6)
Mittelwert SD	2,6 1,8	3,9 2,2	4,75 1,2	4,4 0,9	3,1 0,4	3,8 2,0	2,3 0,4	3,8 2,03	3,1 1,5	4,2 2,5
p-Wert	0,19		0,64		0,75		0,29		0,26	
Effektgröße	-0,63		0,31		-0,17		-1		-0,44	
Relative mittlere Abweichung	-31,77%		7,95%		-8,80%		-39,49%		-21,31%	
Statistischer Test	Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test	

Tabelle 31: Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl der Leukozyten im Blut (K/μl))

1.4.2. Thrombozyten

Da die Thrombozyten essentiell in der Entstehung von arteriellen Thrombose sind, war es hier besonders wichtig, signifikante Unterschiede zwischen den Mauslinien auszuschließen, um nicht irrtümlich den entsprechenden Knockouts einen falschen Effekt zuzusprechen.

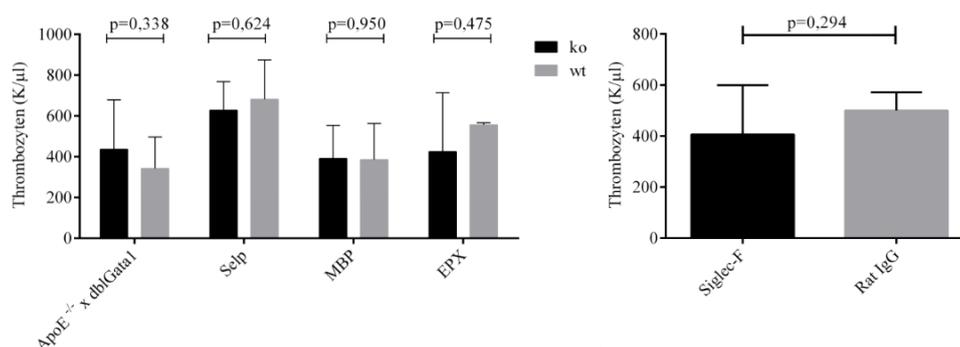


Abbildung 25: Thrombozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien

Das Blut wurde im Anschluss an die Operation der Tiere intrakardial entnommen. Untersucht wurden Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{-/-}-Tiere (n=10) und Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{wt/wt}-Tiere (n=10), Selp^{-/-}-Tiere (n=6) verglichen mit C57BL/6J-Tieren (n=4), MBP^{-/-}-Tiere (n=7) verglichen mit MBP^{wt/wt}-Tieren (n=7), EPX^{-/-}-Tiere (n=3) verglichen mit EPX^{wt/wt}-Tieren (n=3) und Tiere, behandelt mit einem Siglec-F-Antikörper (n=7), verglichen mit Tieren, behandelt mit der Isotypkontrolle Rat IgG (n=6).

Allerdings konnte auch bei der Anzahl der Thrombozyten zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Die Apo^{-/-} x ΔdblGATA1-Tiere haben in der Knockout-Gruppe im Mittel 27,76% weniger Thrombozyten als die Vergleichsgruppe mit einem schwachen Effekt Cohen's d von 0,47. Dieser Effekt ist nicht statistisch signifikant (p=0,338). Die Anzahl der Thrombozyten der EPX^{-/-}-Tiere liegt im Mittel in einem ähnlichen Bereich wie die Thrombozytenanzahl der Kontrollgruppe (relative mittlere Differenz=23,65%). Dieser nicht signifikante Unterschied (p=0,475) hat einen mittelstarken Effekt Cohen's d von 0,64. Die starke Standardabweichung in der Knockout-Gruppe wird von einer Maus verursacht, bei der nur 91 K/μl gemessen wurde. Bei der Selp-Linie und der MBP-Linie wurde nur ein sehr geringer Unterschied im Mittelwert der Versuchs- und Kontrollgruppen festgestellt. Die Selp^{-/-}-Tiere haben im Mittel 7,62% weniger Thrombozyten als die Kontrollgruppe mit einem schwachen Effekt Cohen's d von 0,33. Dieser Effekt ist statistisch nicht signifikant (p=0,624).

Vernachlässigbar ist der Effekt Cohen's d von 0,04 in der MBP-Gruppe, in der die Thrombozytenanzahl der Knockout-Tiere in einem ähnlichen Bereich wie in der Kontrollgruppe liegt (relative mittlere Differenz=1,65). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (p=0,95).

Stamm	Apo ^{-/-} x ΔdblGATA 1		Selp		MBP		EPX		Siglec-F	
	ko (10)	wt (10)	ko (6)	wt (4)	ko (7)	wt (7)	ko (3)	wt (3)	ko (7)	wt (6)
Mittelwert	437	342	62	68	39	38	42	55	40	50
SD	242	154	8	1	1	5	5	6	6	0
			13	19	16	17	28	9,8	19	72
			9	3	1	7	9		3	
p-Wert	0,338		0,624		0,950		0,475		0,294	
Effektgröße	0,47		-0,33		0,04		-0,64		-0,67	

Relative mittlere Abweichung	27,65%	-7,62%	1,56%	-23,62%	-18,80%
Statistischer Test	Welchs T-Test				

Tabelle 32: Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl der Thrombozyten im Blut (K/ μ l))

1.4.3. Granulozyten

Die Fraktion der Granulozyten besteht aus neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Die Neutrophilen stellen den größten Anteil der Granulozyten und aufgedeckte Unterschiede sind wahrscheinlich auf Verschiebungen in der Anzahl der Neutrophilen zurück zu führen. Die Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse, der Leukozyten-Auswertung wider, da Granulozyten 50% der Leukozyten ausmachen.

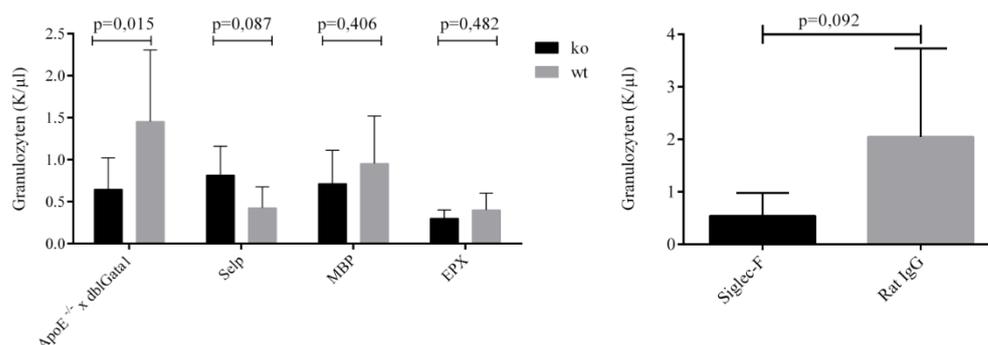


Abbildung 26: Anzahl der Granulozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien

Das Blut wurde im Anschluss an die Operation der Tiere intrakardial entnommen. Untersucht wurden *Apo^{-/-} x Δ dblGATA1^{-/-}*-Tiere (n=10) und *Apo^{-/-} x Δ dblGATA1^{wt/wt}*-Tiere (n=10), *Selp^{-/-}*-Tiere (n=6) verglichen mit C57BL/6J-Tieren (n=4), *MBP^{-/-}*-Tiere (n=7) verglichen mit *MBP^{wt/wt}*-Tieren (n=7), *EPX^{-/-}*-Tiere (n=3) verglichen mit *EPX^{wt/wt}*-Tieren (n=3) und Tiere, behandelt mit einem Siglec-F-Antikörper (n=7), verglichen mit Tieren, behandelt mit der Isotypkontrolle Rat IgG (n=6).

Interessant ist, dass in der *Apo^{-/-} x Δ dblGATA1*-Gruppe die Anzahl der Granulozyten in der Knockout-Gruppe im Mittel 55,45% geringer ist als in der Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,25. Dieser Effekt ist ein signifikanter Unterschied (p=0,015).

Auch in der Siglec-F-Gruppe haben die Tiere, die mit dem Siglec-F blockierenden Antikörper behandelt wurden, weniger Granulozyten im Blut als die Kontrollgruppe

(relative mittlere Differenz=73,66%) mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,28. Diese Effektgröße deutet klar darauf hin, dass ein Einfluss des Antikörpers auf die Anzahl der Granulozyten besteht und der nicht signifikante Unterschied ($p=0,09$) sollte durch einen größeren Stichprobenumfang weiter untersucht werden. Die Anzahl der Granulozyten der *Selp*^{-/-}-Tiere ist dagegen im Mittel 92,16% höher als in der Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,16. Dies ist ebenfalls ein deutlicher Hinweis, dass ein Einfluss auf die Anzahl der Granulozyten vorliegt und auch hier sollte der nicht signifikante Unterschied ($p=0,087$) durch eine größere Stichprobe verifiziert werden. Die MBP- und die EPX-Gruppe zeigen einen geringeren Unterschied zwischen den Mittelwerten. Bei Knockout- und Kontrollgruppen liegen die Granulozytenanzahlen in einem ähnlichen Bereich (relative mittlere Differenz (MBP)=25,14%, relative mittlere Differenz (EPX)=25%). Die mittelstarken Effekte Cohen's d von 0,5 (MBP) und 0,6 (EPX) sind statistisch nicht signifikant ($p=0,4$ (MBP) und $p=0,48$ (EPX)).

Stamm	Apo ^{-/-} x ΔdblGATA 1		Selp		MBP		EPX		Siglec-F	
	ko (10)	wt (10)	ko (6)	wt (4)	ko (7)	wt (7)	ko (3)	wt (3)	ko (7)	wt (6)
Mittelwert SD	0,65 0,37	1,45 0,85	0,8 2 0,3	0,4 3 0,2 5	0,7 1 0,3 7	0,9 5 0,5 6	0, 3 0, 1	0, 4 0, 2	0,5 4 0,4 3	2,0 5 1,6 8
p-Wert	0,015*		0,087		0,406		0,482		0,092	
Effektgröße	-1,25		1,26		-0,5		0,6		-1,28	
Relative mittlere Abweichun g	-55,45%		92,16%		-25,14%		25,00%		73,66%	
Statistische r Test	Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test	

Tabelle 23: Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl der Granulozyten im Blut (K/ μ l))

1.4.4. Eosinophile Granulozyten

Bei den Linien, bei denen ein Effekt in der Okklusionszeit festgestellt wurde, wurde zusätzlich noch die Anzahl der eosinophilen Granulozyten untersucht.

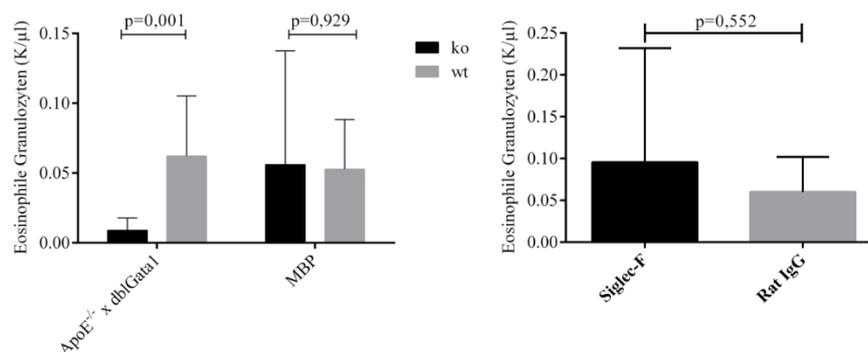


Abbildung 27: Eosinophile Granulozyten im Blutbild ausgewählter Mauslinien

Das Blut wurde im Anschluss an die Operation der Tiere intrakardial entnommen. Untersucht wurden Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{-/-}-Tiere (n=10) und Apo^{-/-} x ΔdblGATA1^{wt/wt}-Tiere (n=10), MBP^{-/-}-Tiere (n=5) verglichen mit MBP^{wt/wt}-Tieren (n=7) und Tiere, behandelt mit einem Siglec-F-Antikörper (n=7), verglichen mit Tieren, behandelt mit der Isotypkontrolle Rat IgG (n=6).

Bei der Apo^{-/-} x ΔdblGATA1-Linie wurde so zusätzlich kontrolliert, ob die Knockout-Maus, wie vorausgesetzt, keine eosinophilen Granulozyten hatte. Wie erwartet, hatte die Knockout-Maus im Mittel 83,93% weniger eosinophile Granulozyten im Blut als die Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,27. Dieser Effekt ist signifikant (p=0,001).

Im Gegensatz dazu zeigten die MBP-Mäuse sowohl in Knockout- als auch in Kontrollgruppe eine ähnliche Anzahl an Eosinophilen (relative mittlere Differenz=26,64%) mit einem vernachlässigbaren Effekt Cohen's d von 0,27.

Die Auswertung der Anzahl der Eosinophilen im Blut zeigte keine Verringerung der Anzahl der Zellen bei den Mäusen, die mit dem Anti-Siglec-F-Antikörper behandelt wurden. Im Mittel hatten diese Tiere sogar 59,59% mehr eosinophile Granulozyten im Blut als die sechs Tiere der Kontrollgruppe. Der schwache Effekt Cohen's d von 0,34 ist nicht statistisch signifikant (p=0,6). Zu beachten ist, dass es in der Versuchsgruppe einen Ausreißer gab, der die dreifache Anzahl an Eosinophilen hatte als die übrigen Tiere dieser Gruppe.

Stamm	Apo ^{-/-} x ΔdblGATA1		MBP		Siglec-F	
Genotyp	ko (10)	wt (10)	ko (5)	wt (7)	ko (7)	wt (6)

Mittelwert	0,01	0,06	0,07	0,05	0,1	0,06
SD	0,009	0,04	0,07	0,03	0,13	0,04
p-Wert	0,001*		0,929		0,552	
Effektgröße	-1,73		0,27		0,34	
Relative mittlere Abweichung	-83,93%		28,64%		59,52%	
Statistischer Test	Welchs T-Test		Welchs T-Test		Welchs T-Test	

Tabelle 33: Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut (K/ μ l))

Die Untersuchungen der Anzahl der Blutzellen zeigt, dass es in der wichtigen Fraktion der Thrombozyten und der eosinophilen Granulozyten keine Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe gibt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in der Okklusionszeit durch mechanistische Effekte der Eosinophilen zustande kommen. Die Unterschiede in der Anzahl der Granulozyten in der Apo^{-/-} x AdblGATA1-Gruppe könnte auf die chronische Entzündung, die durch die Arteriosklerose entsteht, zurück zu führen sein.

2. Aktivierte Thrombozyten aktivieren eosinophile Granulozyten *in vitro*

2.1. Thrombozyten bewirken eine IL-5-Sekretion bei eosinophilen Granulozyten

Es kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht, welche Faktoren die eosinophilen Granulozyten im Verlauf einer Thrombose aktivieren könnten. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten analysiert, da in den Intravital-Aufnahmen beobachten konnte, dass die Zellen miteinander Kontakt aufnehmen, woraufhin ein Kalzium-Signal entsteht (siehe Abbildung 14). Um nähere mechanistische Erkenntnisse zu erlangen, wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt, mit denen die Auswirkung von Thrombozyten auf die Eosinophilen untersucht wurde. Quantifiziert wurde die Aktivierung der Eosinophilen über einen IL-5-ELISA.

Um zu klären, ob die Vermutung stimmte, dass Thrombozyten die Eosinophilen aktivieren können, wurden die jeweils aus Humanblut isolierten Zellen miteinander inkubiert. In einem Ansatz wurden Thrombozyten mit Thrombin aktiviert. In der Kontrollgruppe wurden die Thrombozyten nicht aktiviert. Die eosinophilen Granulozyten, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden, entwickelten eine

IL-5-Konzentration, die im Mittel 74,4% größer war als die IL-5-Konzentration der eosinophilen Granulozyten, die mit ruhenden Thrombozyten inkubiert wurden. Der Effekt Cohen's d von 1,1 ist stark. Dieser Effekt ist mit $p=0,022$ statistisch signifikant. Da dies der größte p-Wert in der multiplen Testreihe war und dieser nach der Bonferroni-Holm-Korrektur $<0,05$ sein muss, um eine statistische Signifikanz zu erreichen, erfüllt der ermittelte Wert diese Voraussetzungen.

Die *in vivo*-Experimente zeigen, dass Thrombozyten direkt mit den Eosinophilen während der Thrombusbildung interagieren. Ob bei diesem Kontakt auch die beobachtete Aktivierung bewirkt wird oder lösliche Mediatoren der Plättchen eine Rolle spielen, ist unklar. Daher wurde in einem weiteren Experiment untersucht, welchen Effekt die direkte Interaktion eosinophiler Granulozyten mit aktivierten Thrombozyten hat, verglichen mit der Auswirkung des Überstandes aktivierter Thrombozyten, der sezernierte, lösliche Mediatoren enthielt.

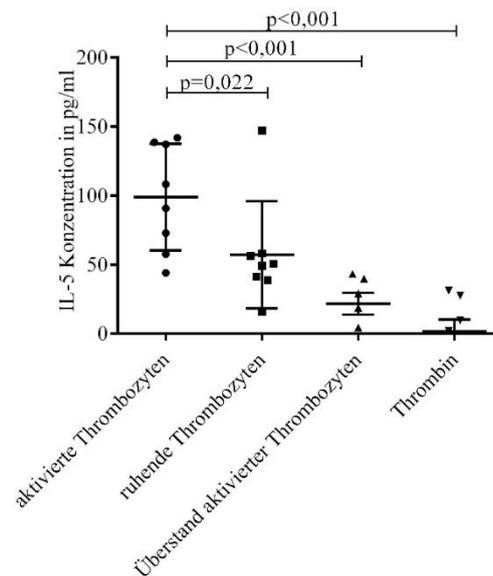


Abbildung 28: IL-5-Konzentration nach Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden mit Thrombin stimuliert. Die eosinophilen Granulozyten inkubierten einmal direkt mit den aktivierten Thrombozyten ($n=8$), einmal direkt mit ruhenden Thrombozyten ($n=8$) und mit dem Überstand aktivierter Thrombozyten ($n=6$). Als Negativkontrolle inkubierten die Eosinophilen ebenfalls nur mit Thrombin ($n=7$).

	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit		
	ruhenden Thrombozyten ($n=8$)	Überstand aktivierter Thrombozyten ($n=6$)	Thrombin ($n=7$)

Mittelwert (Standardabweichung)	57 pg/ml (39 pg/ml)	18,5 pg/ml (17,2 pg/ml)	2 pg/ml (22 pg/ml)
p-Wert	0,022*	<0,001*	<0,001*
Effektgröße	1,1	2,6	3,0
Relative mittlere Abweichung	74,4%	435%	4700%
Statistischer Test	Students T-Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test

Tabelle 34: Zusammenfassung der statistischen Größen (IL-5-ELISA)

Verschiedene Ansätze verglichen mit der Kontrollgruppe der aktivierten Thrombozyten (n=8, Mittelwert 99 pg/ml). Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni-Holm angepasst.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass die direkte Interaktion mit aktivierten Plättchen zu einer signifikant höheren IL-5-Konzentration führt. Die IL-5-Konzentration ist in der Gruppe mit direkter Interaktion im Mittel 435% signifikant ($p < 0,001$) größer als in der Gruppe mit indirekter Interaktion mit einem starken Effekt Cohen´s d von 2,6.

Zwar gibt es bisher in der Literatur keine Hinweise, dass der Plättchenstimulator Thrombin Eosinophile aktiviert, allerdings ist das Gegenteil auch noch nicht sicher belegt (166). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich Eosinophile verhalten, wenn sie mit Thrombin stimuliert werden im Vergleich mit einer Stimulation durch aktivierte Thrombozyten.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass die mit Thrombin stimulierten Eosinophilen deutlich weniger IL-5 (relative mittlere Differenz=4700%) sezernieren als Eosinophile, die durch aktivierte Thrombozyten stimuliert werden. Dieser sehr starke Effekt Cohen´s d von 3 ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

2.2. Thrombozyten regen bei eosinophilen Granulozyten die Bildung von Eosinophil Extracellular Traps an

Man weiß mittlerweile, dass eosinophile, ähnlich wie neutrophile Granulozyten, in der Lage sind ihre nukleäre DNA in netzartigen Strukturen extrazellulär gegen Pathogene einzusetzen. Da die EETs die Effektorproteine MBP und ECP enthalten, ist es interessant, ob diese Strukturen auch in Thromben zu finden sind (138). Wie in dieser Arbeit gezeigt, (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**2.) beeinflusst zumindest MBP die Thrombosebildung *in vivo*. Daher wurden humane eosinophile Granulozyten, die in unterschiedlichen Ansätzen mit Thrombozyten stimuliert wurden, anschließend mit einem Antikörper, der gegen MBP gerichtet war,

markiert und die Zellkerne wurden mit HOECHST gefärbt. Die Ansätze, in denen die Interaktion untersucht wurde, waren die gleichen, die schon mit dem IL-5-ELISA untersucht wurden (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Zusätzlich wurden humane Thromben auf das Vorkommen von EETs analysiert.

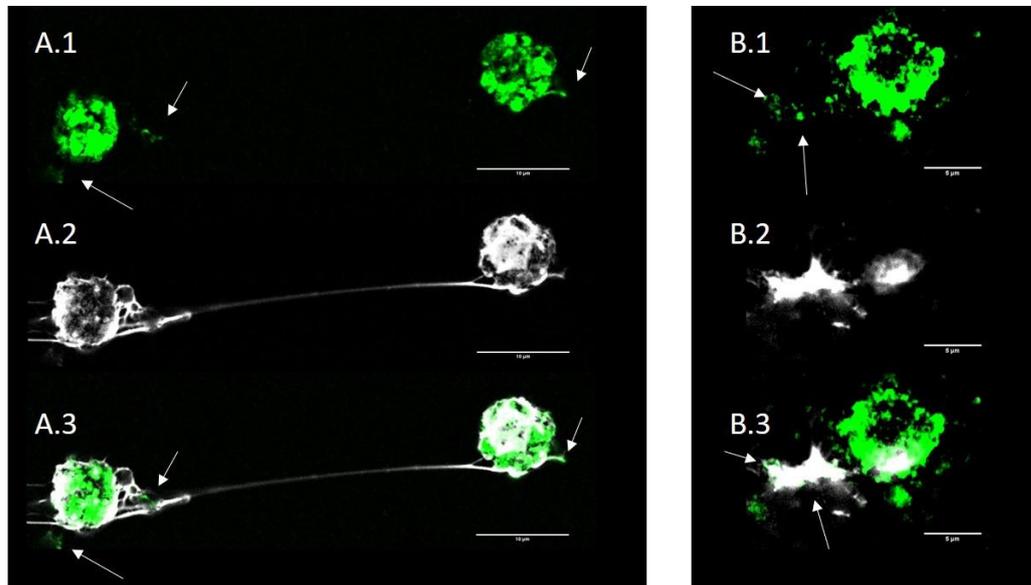


Abbildung 29: Eosinophile Granulozyten mit EETs

A: isolierte, humane eosinophile Granulozyten nach Interaktion mit stimulierten Thrombozyten, B: Eosinophiler Granulozyt im humanen Thrombus (Grün: MBP, Weiß: Nukleus). Zur besseren Darstellung wurden die Kanäle aufgetrennt, sodass man die Anfärbung von MBP und Zellkern einzeln betrachten kann (A.2, A.2, B.1, B.2). In A.3 und B.3 wurden die Kanäle kombiniert. Die Pfeile markieren die MBP-Granula, die sich in den EETs befinden.

In Abbildung 29 ist erkennbar, dass die eosinophilen Granulozyten nach Interaktion mit stimulierten Thrombozyten den Zellkern als EETs in die Umgebung aussenden. Diese Reaktion konnte *in vitro* ausgelöst werden (A), aber auch in humanen Thromben waren diese Strukturen zu finden (B). Das Major Basic Protein ist dabei der extrazellulären DNA angelagert.

Nach der Interaktion von eosinophilen Granulozyten mit aktivierten Plättchen, ruhenden Plättchen, Überstand aktivierter Plättchen und Thrombin wurde die Bildung von EETs quantifiziert.

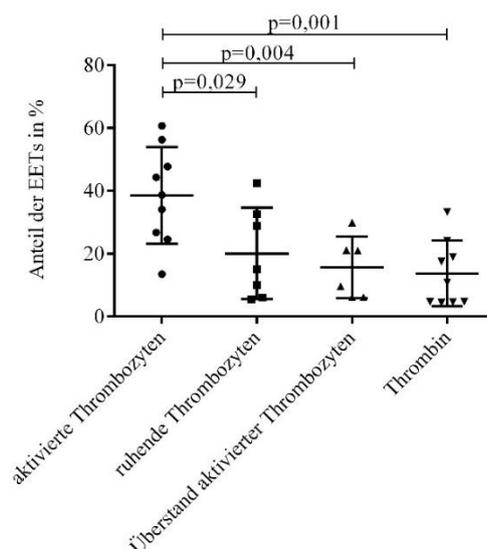


Abbildung 30: EET-Bildung nach Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden mit Thrombin stimuliert. Die eosinophilen Granulozyten inkubierten einmal direkt mit den aktivierten Thrombozyten (n=9), einmal direkt mit ruhenden Thrombozyten (n=7) und mit dem Überstand aktivierter Thrombozyten (n=6). Als Negativkontrolle inkubierten die Eosinophilen ebenfalls nur mit Thrombin (n=9).

In diesem Experiment bestätigte sich, was sich in der Messung der IL-5-Konzentration gezeigt hatte: Thrombozyten haben einen Einfluss auf die Aktivität der Eosinophilen. Auch hier wurden die verschiedenen Ansätze gegen die Gruppe der mit aktivierten Thrombozyten koinkubierten, eosinophilen Granulozyten verglichen.

	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit		
	ruhenden Thrombozyten (n=7)	Überstand aktivierter Thrombozyten (n=6)	Thrombin (n=9)
Mittelwert (Standardabweichung)	20,1% (14,6%)	15,7% (9,8%)	13,7% (10,5%)
P-Wert	0,029*	0,004*	0,001*
Effektgröße	1,3	1,76	1,88
Relative mittlere Abweichung	92%	146%	180%
Statistischer Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test

Tabelle 35: Zusammenfassung der statistischen Größen (EET-Bildung)

Verschiedene Ansätze verglichen mit der Kontrollgruppe der aktivierten Thrombozyten (n=9, Mittelwert 38,5%). Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni-Holm angepasst.

Die Gruppe der ruhenden Thrombozyten bildeten im Mittel 92% weniger EETs als die Gruppe mit den aktivierten Thrombozyten mit einem starken Effekt Cohen´s d von 1,3. Dieser Effekt ist statistisch signifikant (p=0,029).

Wieder wurde untersucht, ob Mediatoren im Überstand von aktivierten Thrombozyten die Eosinophilen beeinflussen und zu einer EET-Bildung führen. Aber wie auch schon bei der Messung der IL-5-Konzentration beobachtet, beeinflusst der Überstand die Aktivität in Form von der EET-Bildung sehr viel weniger als die direkte Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten. Bei der Gruppe der indirekten Interaktion entstanden im Mittel 146% weniger EETs mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,76.

Der Effekt von Thrombin auf die EET-Entstehung wurde ebenfalls untersucht. Auch hier konnte, im Vergleich zur Stimulation mit aktiven Plättchen, eine sehr viel geringere Menge an EETs detektiert werden. Die mit Thrombin behandelte Gruppe hat im Mittel 180% weniger EETs mit einem starken Effekt Cohen's d von 1,88. Damit zeigt der p-Wert von 0,001 einen signifikanten Unterschied.

Von Interesse war auch, ob die Interaktion zwischen Thrombozyten und Eosinophilen mikroskopisch zu sehen sind. Daher wurden die isolierten Zellen auf Objektträger ausgestrichen und angefärbt.

In der folgenden Abbildung 31, die mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen wurde, kann man eine Interaktion zwischen Thrombozyten, den EETs und Major Basic Protein erkennen. Die zu sehende Kolokalisation zwischen MBP und Thrombozyten, könnte ein Hinweis darauf sein, dass MBP die Plättchen aktiviert. Ebenfalls könnten die EETs eine aktivierende Wirkung haben, da die Plättchen zu diesen ebenfalls Kontakt aufnehmen.

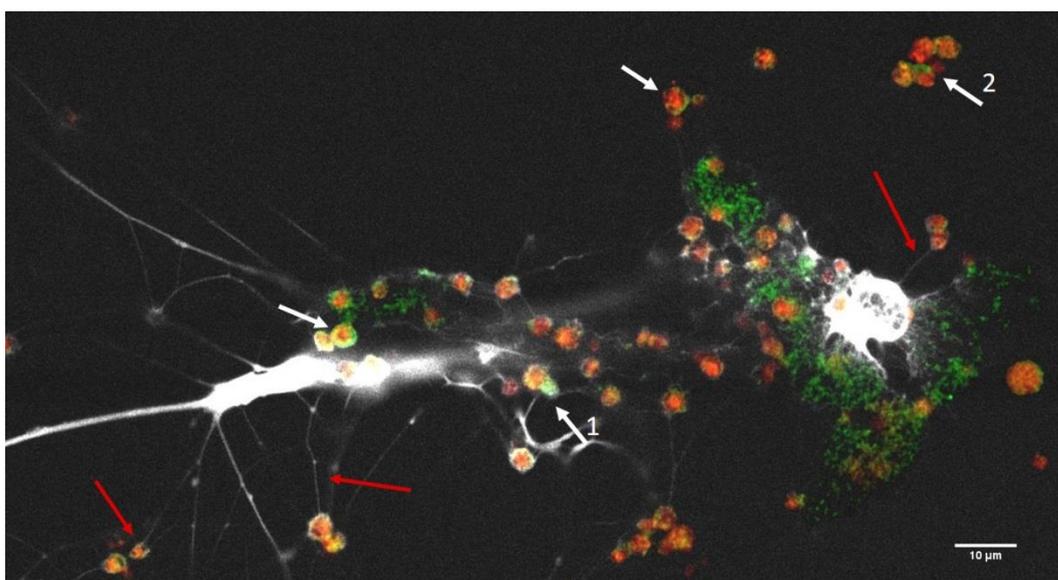


Abbildung 31: Interaktion zwischen humanen Thrombozyten, EETs und MBP

Die Thrombozyten (Rot) zum Teil in die EETs (weiß) eingebunden. Einzelne Teile der EETs nehmen durch seilartige Strukturen Verbindungen zu den Plättchen auf (rote Pfeile). Außerdem kann man eine Kolo-kalisation zwischen dem Major Basic Protein (grün) und den Thrombozyten erkennen (weiße Pfeile). Dabei scheint es egal zu sein, ob die Plättchen Kontakt zu den DNA-Strukturen der Eosinophilen (1) haben oder nicht (2).

2.3. Wirkung in-hibierender Faktoren auf die Eosinophilen-Thrombozyten-Interaktion

2.3.1. Wirkung der Antikörper auf die IL-Sekretion

Da sowohl die EET-Bildung als auch die IL-5-Konzentration nach direktem Kontakt der Eosinophilen mit aktivierten Plättchen signifikant größer war, als in den anderen untersuchten Ansätzen, stellte sich die Frage, ob diese Aktivierung mit Faktoren, die sich in-hibierend auf die Interaktion auswirken, beeinflussbar ist.

Ausgewählt wurde ein Antikörper, der sich gegen das Oberflächenmolekül P-Selektin richtet. P-Selektin vermittelt die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten durch PSGL-1 (214). Da in den vorrausgehenden Versuchen gezeigt werden konnte, dass ein direkter Kontakt zwischen Eosinophilen und Plättchen zu einem signifikanten Anstieg der IL-5-Konzentration und der EET-Bildung führt (siehe IV.8.2.1 und IV.8.2.2), war es von Interesse, ob eine Inhibition der Interaktion, vermittelt durch P-Selektin, auch einen Einfluss auf die Aktivität der Eosinophilen hat.

CCL5 ist ein Zytokin mit chemotaktischer Wirkung auf eosinophile Granulozyten. Es wird in den α -Granula der Plättchen gespeichert und bei Stimulation ausgeschüttet (96). Ob eine Aktivierung der Eosinophilen auch über diesen Mechanismus gehemmt werden kann, wurde ebenfalls getestet.

Zusätzlich wurde auch noch überprüft, ob *in vitro* der in-hibierende Effekt der Bindung eines Antikörpers gegen Siglec-F, der *in vivo* beobachtet wurde, bestätigt werden kann. Da es keinen signifikanten Unterschied der Anzahl der Eosinophilen, sowohl im Blut als auch im Thrombus bei den Tieren, die mit Siglec-F behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe gab, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt nicht durch Depletion erzeugt wird, sondern dass ein anderer, hemmender Mechanismus verantwortlich ist. Auf humanen Eosinophilen kommt Siglec-F nicht vor, dafür aber der homologe Rezeptor Siglec-8.

Neben der Messung der IL-5-Sekretion mittels ELISA wurde auch wieder untersucht, wie die EET-Entstehung sich unter dem Einfluss von blockierenden Antikörpern verhält.

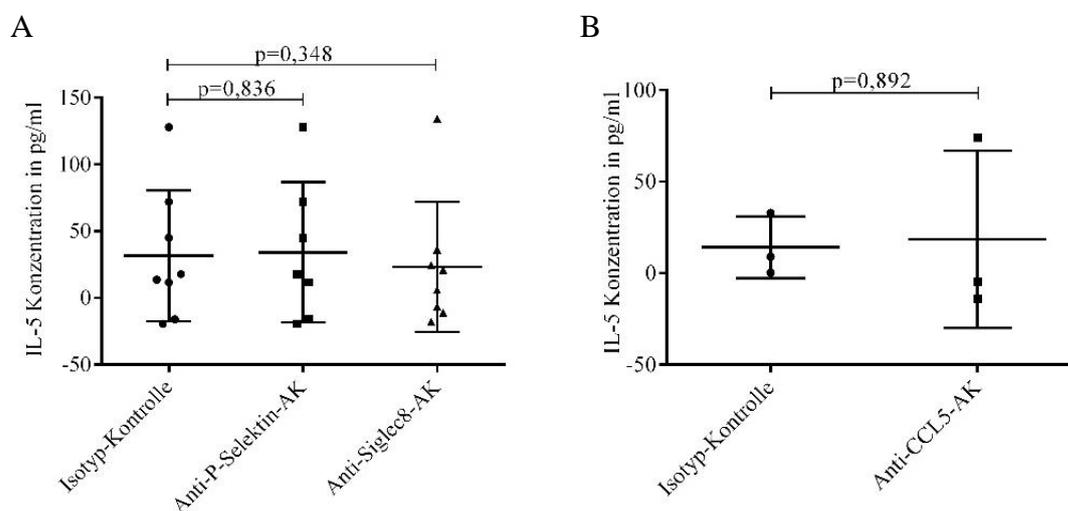


Abbildung 32: IL-5-Sekretion nach Inhibition mit Antikörpern

A: Inhibition mit anti-Siglec-8-Antikörper (n=7) und anti-P-Selektin-Antikörper (n=7) versus Isotyp-Kontrolle (n=7). B: Anti-CCL5-Antikörper (n=3) versus Isotyp-Kontrolle (n=3). Die Thrombozyten wurden in jedem Ansatz mit Thrombin stimuliert und mit eosinophilen Granulozyten inkubiert. Die Antikörper wurden jeweils 10 min vor Stimulation zu den Ansätzen hinzugefügt.

Die P-Selektin-Gruppe erreichte im Mittel eine IL-5-Konzentration, die in einem ähnlichen Bereich der IL-5-Konzentration der Kontrollgruppe liegt (relative mittlere Differenz=18,3%) mit einem vernachlässigbaren Effekt Cohen's d von 0,11. Dieser Effekt ist nicht statistisch signifikant (p=0,836).

Die Gruppe, die mit einem Antikörper gegen Siglec-8 behandelt wurde, hatte im Mittel 55,95% weniger IL-5-Sekretion als die Kontrollgruppe mit einem schwachen Effekt Cohen's d von 0,35. Auch dieser Effekt ist nicht statistisch signifikant (p=0,348).

Die IL-Konzentrationen der Gruppen, die mit einem anti-CCL5-Antikörper und der Isotypkontrolle behandelt wurden, waren in einem ähnlichen Bereich (relative mittlere Differenz=73,6%) mit einem schwachen Effekt Cohen's d von 0,32. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor (p=0,9).

	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Thrombozyten und inhibiert mit		
	P-Selectin-AK (n=7)	Siglec-8-AK (n=7)	CCL5-AK (n=3)
Mittelwert	40pg/μl	53pg/μl	24,7pg/μl

(Standardabweichung)	(60p/μl)	(52,53pg/μ)	42,8pg/μl
P-Wert	0,836	0,348	0,892
Effektgröße	0,11	0,36	0,32
Relative mittlere Abweichung	18,3%	55,95%	73,6%
Statistischer Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test

Tabelle 36: Zusammenfassung der statistischen Größen (IL-5-ELISA)

Verschiedene Inhibitoren verglichen mit Kontrollgruppen (n=7 (3), Mittelwert 32,2pg/μl (14,2pg/μl)). Das Signifikanzniveau wurde in der P-Selektin- und der Siglec-8-Gruppe nach Bonferroni-Holm angepasst.

2.3.2. Wirkung der Antikörper auf die EET-Bildung

Die Auswirkung der Antikörper wurde auch in Hinsicht auf die EET-Bildung untersucht. Der Versuchsaufbau war identisch dem Versuchsaufbau, der für die IL-5-Sekretion konzipiert worden war.

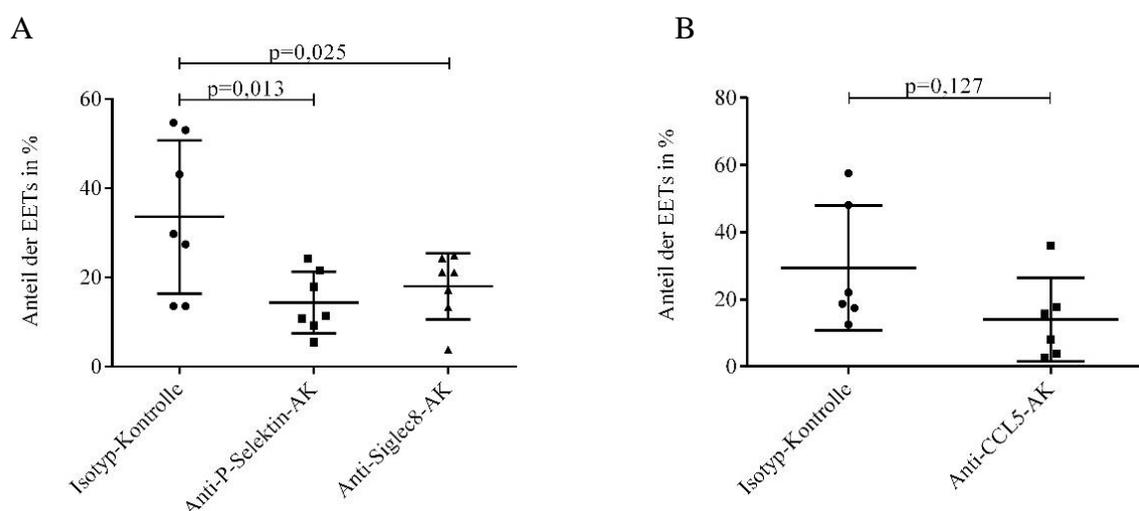


Abbildung 33: EET-Bildung nach Inhibition mit Antikörpern

A: Inhibition mit anti-Siglec-8-Antikörper (n=5) und anti-P-Selektin-Antikörper (n=7) versus Isotyp-Kontrolle (n=7). B: Anti-CCL5-Antikörper (n=5) versus Isotyp-Kontrolle (n=6). Die Thrombozyten wurden in jedem Ansatz mit Thrombin stimuliert und mit eosinophilen Granulozyten inkubiert. Die Antikörper wurden jeweils 10 min vor Stimulation zu den Ansätzen zugefügt.

Im Gegensatz zu der IL-5-Sekretion wurden signifikante Unterschiede bei den Gruppen, die mit anti-P-Selektin beziehungsweise mit Siglec-8-Antikörpern behandelt wurden, zu Vergleichsgruppe festgestellt. Der Unterschied der EET-Bildung im Mittel von 58,9% der P-Selektin-Gruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen´s d von 1,68 ist statistisch signifikant (p=0,013).

Auch die EET-Bildung in der Gruppe, die mit einem Siglec-8 blockierende Antikörper behandelt wurden, ist deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (relative mittlere Differenz=53,7%). Der starke Effekt Cohen's d von 1,41 ist statistisch signifikant ($p=0,025$).

Die EET-Bildung der Gruppe, die mit einem anti-CCL5-Antikörper behandelt wurde, lag im Mittel 52,5% unter der EET-Bildung der Kontrollgruppe mit einem starken Effekt Cohen's d von 0,97. Allerdings konnte zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,127$). Trotzdem sollte der deutliche Hinweis auf einen Einfluss, der durch die große Effektgröße gegeben wird, weiter untersucht werden, indem der Stichprobenumfang erhöht wird.

	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Thrombozyten und inhibiert mit		
	P-Selectin-AK (n=7)	Siglec-8-AK (n=5)	CCL5-AK (n=6)
Mittelwert (Standardabweichung)	14,3% (6,9%)	18% (7,4%)	14% (12,4)
P-Wert	0,013*	0,025*	0,125
Effektgröße	-1,68	-1,41	-0,97
Relative mittlere Abweichung	-58,9%	-53,7%	-52,5%
Statistischer Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test	Welchs T-Test

Tabelle 37 Zusammenfassung der statistischen Größen der (EET-Bildung)

Verschiedene Inhibitoren verglichen mit Kontrollgruppen inhibiert mit den Isotypen der Antikörper (n=7 (6), Mittelwert 34,9% (29,4%)). Das Signifikanzniveau wurde in der P-Selektin- und der Siglec-8-Gruppe nach Bonferroni-Holm angepasst.

VI. DISKUSSION

1. Diskussion der Methoden

Zur Untersuchung der arteriellen Thrombose wurde die Maus als Versuchstier ausgewählt. Die geringe Körpergröße der Maus lässt die Haltung einer großen Anzahl auf einer vergleichsweise geringen Fläche zu und bietet die Möglichkeit, durch gezielte Gestaltung des Käfigs, die Schmerzen, Leiden und Schäden der Tiere zu minimieren (215). Desweiteren kann durch den schnellen Reproduktionszyklus von durchschnittlich 20-21 Tagen und die hohe Anzahl an Nachkommen schnellstmöglich der geeignete Stichprobenumfang erreicht werden. Der breite Einsatz von Mäusen als Versuchstiere hat bereits zu Folge, dass viele genetisch veränderte Knockout-Stämme kommerziell zur Verfügung stehen. Auch Antikörper, die in der Forschung vielfach Einsatz finden, sind in großer Anzahl kommerziell zu erwerben. Außerdem wurde die genetische Vielfalt und dadurch die phänotypische Variabilität durch Erzeugen von Inzuchtlinien derart minimiert, dass sehr kleine Versuchsgruppen ausreichen, um eine statistische Aussage treffen zu können. Das murine Immunsystem ist sehr gut erforscht und daher war die Maus für diese Doktorarbeit, in der Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht wurden, geeignet. Für die Grundlagenforschung ist die Maus sehr nützlich und hat schon zu großen Fortschritten in der Medizin beigetragen. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass das Ziel, die ermittelten Ergebnisse auf den menschlichen Organismus zu übertragen, nicht automatisch gegeben ist (216).

Zur Untersuchung der Thrombose ohne den Einfluss der eosinophilen Granulozyten wurden Δ dblGATA1-Mäuse, die keine eosinophilen Granulozyten besitzen, mit einer ApoE-Linie verpaart. Der Knockout des Apolipoproteines E hat zwar keinen direkten Einfluss auf die arterielle Thrombose, allerdings könnte die dadurch induzierte Arteriosklerose indirekte Effekte auf die Thromboseentstehung haben. Da die arterielle Thrombose im akuten Versuch mit der Δ dblGATA1-Maus schon untersucht wurde, war das Ziel ein chronisches Modell zu entwickeln, welches die pathologischen Prozesse, die zur Entwicklung einer arteriellen Thrombose durch Plaqueruptur auf den Boden einer Arteriosklerose beitragen, besser simuliert (50).

Im Gegensatz zu den ApoE x Δ dblGATA1-Tieren wurde bei allen anderen Linien kein chronischer Versuch, im Sinne einer Plaque-Entwicklung, durchgeführt, sondern die arterielle Thrombose wurde bei gesunden Tieren akut induziert. Im Gegensatz zu den Δ dblGATA1-Tieren lagen bei den anderen Linien noch keine Daten zu den Einflüssen des jeweiligen Knockouts auf die arterielle Thrombose vor. Daher wurde aus Gründen des Tierschutzes kein chronisches Modell verwendet (215).

Es gibt zahlreiche Methoden eine arterielle Thrombose in der Arteria carotis communis von Versuchsmäusen zu induzieren. Eine mögliche klinische Relevanz kann nur vermutet werden, wenn das Versuchsmodell pathologische Zustände möglichst gut imitiert. Arterielle Thrombosen beim Menschen entstehen in der Regel durch arteriosklerotische Plaques, die rupturieren und so, durch die Verletzung des Endothels, ein prokoagulatorisches Milieu schafft. Es hat sich gezeigt, dass sich bei ApoE-knockout-Mäusen Plaques hauptsächlich distal der Bifurkation in die der A. carotis externa und interna bilden (217). Die Plaqueruptur zu simulieren ist möglich, allerdings nur auf einem ApoE-Hintergrund, wobei ein cholesterolreiches Futter zur Plaquebildung verabreicht werden muss. Es gibt bisher zwei beschriebene Methoden. Bei einer Methode, wird die Ruptur der Plaques durch Ultraschall induziert. Allerdings entstehen auf diese Weise keine okklusiven Thromben. Eine weitere Art, die Plaquesruptur zu simulieren besteht darin, diese mit einem Draht der in die A. carotis communis eingeführt wird auszulösen. Dadurch können allerdings leicht artifizielle Verletzungen des Endothels herbeigeführt werden. Beide Methoden sind schwer zu reproduzieren und haben eine geringe Vergleichbarkeit (218).

Bei der Verletzung mit FeCl₃ entsteht ein, verglichen mit der Ligatur oder Drahtdenudation, größerer Endothelschaden, der zu einer schnelleren Bildung und zu einem größeren Thrombus führt. Kurz et al haben als erstes im Modell an der Ratte gezeigt, dass eine direkte Applikation einer FeCl₃-Lösung auf die Tunica adventitia zu einer schnellen Bildung eines plättchenreichen Thrombus führt (219). Bei dieser Methode wird durch transmurale Zellnekrose und Zerstörung des Endothels eine vollständige Okklusion des Gefäßes erreicht (220). Durch das FeCl₃ werden in der sogenannten Fenton-Reaktion reaktive Sauerstoffspezies generiert, die über Kettenreaktionen zu einer Peroxidation der

Membranlipide führen, was in der Ruptur der Endothelzellen endet (221). Die Thromben, die bei dieser Methode entstehen, sind okklusiv und ähneln in ihrem Aufbau humanen Thromben (222-223)

Neben den *in vivo*-Versuchen, wurde mit *in vitro*-Modellen die Interaktion von eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten untersucht. Dazu wurden humane Zellen verwendet. Auf der einen Seite werden so im Sinne der 3 R die Anzahl der Versuchstiere reduziert und zusätzlich Daten über Mechanismen in menschlichen Zellen gewonnen. Aus diesen Vergleichen lassen sich Hinweise gewinnen, ob aus den Ergebnissen der Tierversuche auch Rückschlüsse auf den Menschen gezogen werden können.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Einfluss der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose

Nach Induktion der arteriellen Thrombose durch FeCl₃ in Ae. carotides der ApoE^{-/-} x ΔdblGATA1-Mauslinie, die keine Eosinophilen besitzen, zeigte sich eine deutlich verkürzte Verschlusszeit der Carotiden durch den Thrombus im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eosinophile Granulozyten die Entstehung einer Thrombose verstärken und zu einer höheren Stabilität des Gerinnsels führen. Es wurde kürzlich gezeigt, dass reine ΔdblGATA1-knockout-Tiere im Vergleich zu Kontrollgruppe ebenfalls verkürzte Okklusionszeiten haben, wenn sie mit dem FeCl₃-Modell untersucht wurden (50). In diesen Untersuchungen fiel der Unterschied in den Okklusionszeiten noch erheblich stärker aus als in der in dieser Arbeit untersuchten Gruppe. Für diese Beobachtung könnte es verschiedene Gründe geben.

Eine Erklärung könnte sein, dass die ΔdblGATA1-Tiere von Tieren mit einem Balb/C-Hintergrund abstammen, während die ApoE-Tiere auf C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet wurden. Durch die Verpaarung erhöhte sich in der Versuchsgruppe die genetische Variabilität und somit auch die Heterogenität der Gruppe. Es wurde schon festgestellt, dass die beiden Wildtyp-Linien im Asthmodell auf gleiche Stimuli unterschiedliche Reaktionen zeigen

hinsichtlich der Anzahl der rekrutierten Eosinophilen und der Sekretion relevanter Chemokine (224).

Desweiteren entwickelten die Tiere in den hier durchgeführten, chronischen Versuchen arteriosklerotische Plaques und nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Kontrollgruppe signifikant mehr Plaques bildete. Zwar konnte keine Korrelation zwischen Plaquegröße und Verschlusszeit festgestellt werden, trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die chronische Entzündung und die veränderte Dynamik des Blutstromes die Thrombose beeinflusst wird.

Interessanterweise haben die Tiere der Kontrollgruppe auch signifikant höhere Anzahlen an Granulozyten im Blut. Die Produktion der Granulozyten wird kontrolliert von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF), welcher wiederum von Endothelzellen, die durch die Arteriosklerose beeinflusst werden, exprimiert wird (225-226). Die Rolle des Chemokins CCL5 in der Arteriosklerose besteht darin, dass es Monozyten zum entzündeten Endothel rekrutiert (227). Abgesehen davon könnte es auch eosinophile Granulozyten anlocken, da es eine stark chemotaktische Wirkung auf diese hat (228). Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eosinophile Granulozyten die Entstehung der Arteriosklerose verstärken, ebenso wie die Inflammation. Ob die eosinophilen Granulozyten auf diese Prozesse einen direkten Effekt ausüben, oder ob sie als sekundäre Folgen von anderen Mechanismen auftreten, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass die Eosinophilen in der arteriellen Thrombose einen wichtigen Einfluss haben, da sie sowohl im Vorfeld der Plaqueruptur pathologische Prozesse verstärken, aber auch während der akuten Entwicklung eines Gerinnsels eine entscheidende Rolle spielen, was sowohl in den hier gezeigten Versuchen als auch in den Akutversuchen im Δ dblGATA1-Modell deutlich wird (50).

2.2. Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten in der arteriellen Thrombose

Die Frage sollte geklärt werden, ob Eosinophile lokal an der Läsion vorhanden sein müssen, um einen Einfluss auf die Thrombusentstehung zu haben, oder ob

es einen generalisierten, systemischen Mechanismus gibt, der über ausgeschüttete Mediatoren die Thrombose verstärkt.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, wie die Eosinophilen zur Läsion rekrutiert werden könnten. Aufgrund der Möglichkeit, dass die Eosinophilen an Oberflächenmoleküle des Endothels binden, ist die Rolle des Oberflächenmoleküls P-Selektin in der Rekrutierung von besonderem Interesse (186, 229).

Die Untersuchung der Thromben der *Selp^{-/-}*-Maus zeigte auch, dass zum Zeitpunkt der Thrombusentnahme kaum noch eosinophile Granulozyten vorhanden sind. Trotzdem gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Okklusionszeit der Mauslinie verglichen mit der Kontrollgruppe. Zu beachten ist, dass die Knockout-Maus mehr Granulozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten im Blut hat, was vermutlich auf eine verzögerte Entfernung der Zellen aus dem Kreislauf zurück zu führen ist (230). Da auch Neutrophile eine wichtige Rolle in der Thromboseentstehung einnehmen, besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte Anzahl den Effekt, der durch die Abwesenheit von P-Selektin verursacht wird, überdeckt (231). Durch die histologischen Untersuchungen des Thrombus, der 45 min nach Verletzung des Endothels entnommen wurde, wurde festgestellt, dass P-Selektin zumindest die Adhäsion der Eosinophilen zu einem späten Zeitpunkt der Thrombose vermittelt und dass dieser Mechanismus keinen wichtigen Effekt auf die Okklusionszeit und somit die Stabilität des Thrombus hat.

Bevor von einem generalisierten Effekt der Eosinophilen ausgegangen werden kann, müssten noch weitere Studien erfolgen, die untersuchen, ob nicht andere Oberflächenmoleküle eine Rekrutierung vermitteln, die nicht von Dauer ist. Interessant wären hier *in vivo*-Beobachtungen der Dynamik der Eosinophilen in Abwesenheit von P-Selektin, um zu sehen, ob Eosinophile zu einem frühen Zeitpunkt der Thrombose adhären und wieder verschwinden.

2.3. Aktivierung der eosinophilen Granulozyten während der arteriellen Thrombose

Die *in vivo*-Untersuchungen der *EoCre x PC-G5-tdTflox*-Maus zeigten, dass Eosinophile schon ganz zu Beginn der Thrombose erscheinen und sich in deren Verlauf akkumulieren. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der

Thrombose und der Anzahl der Eosinophilen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wäre aber eine Möglichkeit, um weiter einzugrenzen, ob die Eosinophilen lokal oder generalisiert wirken. Eine Korrelation zwischen Eosinophilenanzahl und Thrombusgröße würde gegen eine generalisierte Wirkung sprechen. Besonders da in den in dieser Arbeit angefertigten Aufnahmen beobachtet werden konnte, dass eosinophilen Granulozyten am Ort der Läsion Interaktionen mit Thrombozyten zeigen. Zusätzlich exprimierten sie vor Ort ein grün fluoreszierendes Kalzium-Signal, was auf eine Aktivierung der Zellen schließen lässt.

Diese vorher beschriebenen Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass Thrombozyten als Aktivatoren der Eosinophilen in der Thrombose auftreten könnten. Zumindest ist bekannt, dass Zytokine von Thrombozyten chemotaktisch auf Eosinophile wirken (35, 96). Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass Plättchen, die mit Thrombin stimuliert werden, in der Lage sind, bei den Eosinophilen eine IL-5-Sekretion zu bewirken und zu einer Bildung von EETs zu führen.

Diese Vorgänge können als Aktivierung der Eosinophilen interpretiert werden. Allerdings scheint es dafür nötig zu sein, dass Eosinophile und Plättchen eine direkte Interaktion aufbauen können. So hat der Ansatz, indem die Eosinophilen nur mit dem Überstand aktivierter Plättchen inkubierten, in beiden gemessenen Parametern ein deutlich geringerer Effekt auf die Aktivierung der Eosinophilen als bei einer direkten Interaktion der beiden Zelltypen.

Auch wenn die Plättchen inaktiv waren und mit den Eosinophilen interagierten, zeigte sich eine höhere Bildung an EETs und IL-5 als bei indirekter Kommunikation, wenn auch nicht signifikant. Erklären könnte man diesen Effekt mit der hohen Empfindlichkeit der Thrombozyten. Es besteht die Gefahr, dass die Plättchen bei der Isolation voraktiviert wurden. Die kritischen Punkte bei diesem Prozess liegen in der Blutabnahme, in der Zentrifugation und in der Temperatur (232-234). Da es unwahrscheinlich ist, dass bei der Isolation vollkommen ruhende Plättchen gewonnen werden, besteht die Möglichkeit, dass die beobachtete Reaktion der Eosinophilen auf eine Interaktion mit voraktivierten Thrombozyten zurückzuführen ist. Besonders, wenn die Überlegung mit einbezogen wird, dass durch diese Voraktivierung der Plättchen, einige wenige Eosinophile stimuliert werden, die dann wiederum mehr

Thrombozyten aktivieren (141). Auf diese Weise könnte ein Teufelskreis entstehen.

Es gibt Studien, die zeigen, dass Mediatoren von Plättchen chemotaktisch auf Eosinophile wirken, aber auch, dass sie eine aktivierende Funktion haben (235-236). Besonders RANTES/CCL5 scheint in dieser Hinsicht eine Doppelrolle einzunehmen (228, 237). Allerdings sprechen die hier gezeigten Versuche, in denen CCL5 mit einem Antikörper inhibiert wurde, gegen eine Aktivierung in dem hier genutzten Versuchsaufbau. Es muss berücksichtigt werden, dass in früheren Studien die Eosinophilen direkt mit rekombinantem CCL5 behandelt wurden und dass andere Parameter als Anzeichen einer Aktivierung herangezogen wurden. Gemessen wurden der Ausstoß von radikalen Sauerstoffspezies und der Anstieg von Ca^{2+} , sowie der ECP-Anstieg. Diese Studien zeigen zwar eine Aktivierung der Eosinophilen durch CCL5 im Kontext asthmatischer Erkrankungen, allerdings nur eine sehr schwache im Vergleich zu dem stärksten, bekannten Aktivator C5a.

Desweiteren hat sich eine gegenseitige Antagonisierung zwischen RANTES und anderen Chemokinen gezeigt. Da in dieser Arbeit CCL5 nicht isoliert verwendet wurde, bietet diese Beobachtung eine Erklärung, weshalb CCL5 keinen Effekt zu haben scheint (237).

Die Inhibition der P-Selektin-vermittelten Bindung von Eosinophilen und Thrombozyten führt hingegen zu einer verminderten Bildung von EETs, wenn auch in der IL-5-Ausschüttung kein signifikanter Unterschied zu Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Das von Plättchen und Endothelzellen exprimierte Oberflächenmolekül vermittelt die Bindung von Leukozyten an diese Zellen über den Liganden PSGL-1 (116, 238). Eine Aktivierung der Eosinophilen durch P-Selektin ist bisher nicht beschrieben, allerdings wird $\beta 1$ -Integrin auf Eosinophilen durch P-Selektin stimuliert und führt zu einer erhöhten Adhäsion an V-CAM (239).

Die Mechanismen der Aktivierung und der Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli der eosinophilen Granulozyten sind komplex. Die Zellen sind in der Lage, auf verschiedene Reize unterschiedlich zu reagieren, und somit gezielt auf Pathogene und pathologische Prozesse zu reagieren. So gibt es etwa verschiedene Arten der Sekretion (134). IL-5 bewirkt die Proliferation und

Differenzierung der Eosinophilen und nimmt eine einzigartige Stellung in der Regulation der eosinophilen Granulozyten ein. Dieses Zytokin kann zum Beispiel autokrin zu Verstärkung der Wirkung der Eosinophilen in einer Entzündung beitragen (240-241). Der Mechanismus, welcher der IL-5-Sekretion zugrunde liegt, bleibt bisher weitgehend ungeklärt (242). Die Hemmung der EET-Bildung durch die Inhibition von P-Selektin, im Gegensatz zur IL-5-Sekretion, spricht für unterschiedliche Mechanismen in der Aktivierung.

Den Effekt von P-Selektin, der *in vitro* zu sehen aber *in vivo* in der Okklusionszeit nicht nachzuvollziehen ist, spricht dafür, dass P-Selektin nicht der einzige Faktor ist, welcher einen Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivierung der Eosinophilen hat. Eventuell wird die Auswirkung des Fehlens von P-Selektin *in vivo* von anderen Mechanismen kompensiert.

Eine wichtige Rolle in der Aktivierung eosinophiler Granulozyten könnte das verletzte Endothel spielen. Die Adhäsion der Eosinophilen an das Endothel wird über die Rezeptoren ICAM und VCAM-1 vermittelt. Es wurde schon gezeigt, dass ICAM *in vitro* zu Ausschüttung der zytotoxischen Granula EPC und EDNT führt, welche wiederum die vermehrte Expression von ICAM und VCAM-1 bewirken. Daraus folgend kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen aber auch von anderen Leukozyten (243).

Außerdem schütten Eosinophile, als Reaktion auf die Aktivierung des Protease-activated Receptors 2 (PAR2), welche durch Serinproteasen vermittelt wird, Entzündungsmediatoren aus. Im Gegensatz zu PAR1, PAR3 und PAR4, die durch Thrombin stimuliert werden, wird PAR2 durch Trypsin aktiviert (244). Das erklärt auf der einen Seite, warum Thrombin in meinen *in vitro*-Versuchen keine Wirkung auf die Eosinophilen hat, bringt auf der anderen Seite aber andere Gerinnungsfaktoren ins Spiel, die eine ähnliche Struktur wie Trypsin haben und somit während der Thrombose einen aktivierenden Einfluss auf die Eosinophilen haben könnten. Es ist beispielsweise schon bekannt, dass Faktor Xa PAR2 aktivieren kann (168, 245).

Die Inhibition der Eosinophilen mit dem anti-Siglec-8-Antikörper bewirkt eine signifikant verminderte EET-Bildung nach Stimulation der Zellen durch aktivierte Thrombozyten *in vitro*. Bei der IL-5-Sekretion wiederum gibt es keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Es ist bekannt, dass die Bindung eines

Antikörpers an Siglec-8 zu einer Apoptose führt, die von Caspasen abhängig ist, solange die Eosinophilen nicht mit IL-5 vorbehandelt sind (237). In dem Fall, dass IL-5 vorhanden ist, führt die Bindung von Siglec-8 zu einer Apoptose, die unabhängig von Caspasen ist. Sie ist gekennzeichnet durch mitochondriale Zerstörung und der Bildung von ROS (179). Der letztgenannte Mechanismus der Apoptose kann auch durch IL-33 oder durch ein erhöhtes Vorkommen von ROS induziert werden. Bei der IL-5 assoziierten Apoptose wird, neben einer eher nekrotischen als apoptotischen Morphologie, auch die Ausschüttung von ECP diskutiert. Allerdings sind Meinungen hierzu in der Literatur kontrovers (180, 246).

In den *in vivo*-Versuchen hatten die Tiere, die mit Siglec-F behandelt wurden, eine geringere Okklusionszeit. Trotzdem waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Eosinophilen sowohl im Thrombus als auch im Blutbild zu verzeichnen. Somit ist davon auszugehen, dass die Behandlung mit Siglec-F nicht zu einer Depletion der Zellen führt. Auch die kurze Zeit zwischen Injektion des Antikörpers und Induktion der Thrombose spricht gegen einen Effekt, der durch die Depletion der Eosinophilen entsteht. In dem *in vivo*-Modell ist es sehr wahrscheinlich, dass die Eosinophilen mit IL-5 in Kontakt kommen, da sie bei Kontakt mit aktivierten Plättchen selbst IL-5 exprimieren, wie die *in vitro*-Versuche zeigen. Auch die ROS, die in der Fenton-Reaktion produziert werden, lassen es wahrscheinlicher erscheinen, dass in diesem Modell, durch den Siglec-F-Antikörper nicht die Caspase-abhängige Apoptose ausgelöst wird, sondern die ROS-assoziierte Apoptose.

Ein möglicher Mechanismus, wie der Siglec-8-Antikörper die Thrombose hemmen könnte, wäre die Ausschüttung von ECP, von dem schon gezeigt wurde, dass es die Plättchenaggregation inhibiert (247). Allerdings muss hier beachtet werden, dass die *in vivo*-Experimente an Mäusen durchgeführt wurden, die kein ECP bilden, sondern eine Vielzahl an anderer Ribonukleasen die sogenannten mEARS haben (140). Ob mEARS ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Plättchenaggregation haben ist bisher nicht untersucht.

Es kann nicht festgelegt werden, welche Art von Apoptose die isolierten humanen eosinophilen Granulozyten, die mit Siglec-8 behandelt wurden durchlaufen. Die einzige IL-5-Quelle in diesen Versuchen sind die Eosinophilen selbst, die nach Aktivierung dieses Zytokin ausschütten. Die IL-5-Sekretion

ändert sich *in vitro* durch die Zugabe von Siglec-8 nicht signifikant, allerdings wird eine Tendenz erkennbar, dass durch die Inhibition mit Siglec-8 weniger IL-5 ausgeschüttet wird. Die starke Effektgröße von 3,6 deutet darauf hin, dass ein Einfluss von Siglec-8 besteht und dass durch eine größere Anzahl an Probanden ein signifikanter Unterschied erreicht werden könnte.

Die verhinderte Generierung von EETs, vermittelt durch Siglec-8- als auch durch P-Selektin blockierende Antikörper, ist insofern interessant, da EETs im Rahmen dieser Arbeit in humanen Thromben detektiert wurden. Ähnliche Strukturen der Neutrophilen haben einen prothrombotischen Effekt und so wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob diese Beobachtung auch bei den EETs gemacht werden kann (114). Die Tatsache, dass EETs das prothrombotisch wirkende MBP enthalten, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Bildung dieser Strukturen, die Thrombose verstärkt. In diesem Falle könnte eine Hemmung der EET-Bildung durch Siglec-8, auch eine Erklärung für die Inhibierung der Thrombose in den hier durchgeführten *in vivo*-Studien sein.

2.4. Einfluss eosinophiler, zytotoxischer Proteine auf die arterielle Thrombose

Um die Interaktionen zwischen eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten besser zu verstehen, wurden mit einem konfokalen Mikroskop hochauflösende Aufnahmen der isolierten und aktivierten Zellen gemacht.

Diese Bilder zeigen, dass die Thrombozyten an den eosinophilen Granulozyten anhaften. Desweiteren konnte hier auch gezeigt werden, dass die gebildeten EETs Kontakt zu den Thrombozyten aufnehmen. Außerdem gibt es eine Kollokalisierung von MBP und den Thrombozyten, was darauf schließen lässt, dass MBP mit den Thrombozyten interagiert.

Diese Beobachtungen und der Grund, dass es bereits Studien gibt, welche MBP und EPX mit Aktivierung von Plättchen assoziieren, gaben Anlass die Rolle der zytotoxischen Proteine *in vivo* zu untersuchen (135, 141). Neben MBP ist noch das Protein ECP in den EETs zu finden. Allerdings exprimieren murine Eosinophile kein ECP, weshalb der Fokus dieser Arbeit auf dem Protein MBP lag.

Die Ergebnisse zeigten einen sehr deutlichen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe mit einem starken Effekt. Die Tiere, die kein MBP ausbildeten, entwickelten keinen stabilen Thrombus. In den meisten Fällen wurde der Thrombus abgespült, bevor sich das Gefäß komplett verschloss. Zwei Mechanismen, wie MBP die Thrombose so stark beeinflussen kann, sind in der Literatur bereits zu finden.

MBP ist *in vitro* in der Lage, an das von Endothelzellen exprimierte Molekül Thrombomodulin zu binden und dieses zu hemmen. Durch die Aktivierung von Thrombomodulin wird im Normalfall APC gebildet, welches eine antikoagulatorische, eine fibrinolytische und antiinflammatorische Wirkung hat (248). Folglich müsste, wenn MBP nicht vorhanden ist, mehr APC gebildet werden, was die geringere Thromboseneigung der Knockout-Maus erklären würde. Die Messung der APC-Level im Plasma der Versuchsgruppen, zeigte aber ein anderes Bild. Wider Erwarten hatte die Gruppe, die MBP bildeten, etwas höhere APC-Level, wenn auch nicht signifikant. In diesem Fall muss beachtet werden, dass das Blut, aus dem das Plasma gewonnen wurde, 45 min nach Induktion der Thrombose entnommen wurde. Dies ist in dem FeCl₃-Modell ein sehr später Zeitpunkt, an dem sich der Thrombus in fast allen Fällen wieder aufgelöst hatte. Da APC eine kurze Halbwertszeit hat und durch mindestens drei Inhibitoren im Plasma reguliert wird, PAI-3, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin, ist es durchaus möglich, dass zu diesem Zeitpunkt die APC-Spiegel bereits gesunken waren (249-250). Interessant wären Untersuchungen des Plasmas, das zu einem früheren Zeitpunkt, beispielsweise 20 min nach Induktion der Thrombose, abgenommen wird. Dies ist der Zeitpunkt, an dem es in der Regel zu einer Umkehr von Thrombusaufbau zu Thrombuslyse kommt. Die APC-Level müssten zu diesem Zeitpunkt sehr hoch sein.

Ein anderer Mechanismus, über den MBP wirken könnte, wäre eine direkte Aktivierung der Plättchen. *in vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass Plättchen, die mit MBP stimuliert werden, Serotonin, α -Granula und lysosomale Komponenten sezernieren (141). In den konfokalen Aufnahmen der isolierten, humanen Thrombozyten und Eosinophilen Granulozyten kann man eine Kollokalisierung von Plättchen und MBP erkennen. Dabei kann das MBP sowohl frei vorkommen, als auch in die EETs eingebunden sein. Fraglich ist, ob MBP

selbst die Thrombozyten stimulieren kann, oder ob es dafür in seiner prozessierten Form MBP-1 vorkommen muss. Zwar haben Rohrbach et al. die Wirkung von MBP beschrieben, allerdings haben sie dieses aus humanen Eosinophilen von Patienten mit Hypereosinophilie isoliert. Daher ist es durchaus möglich, dass dieses MBP bereits modifiziert vorlag. Neuere Studien gehen davon aus, dass hauptsächlich MBP-1 und die Isoform MBP-2 eine zytotoxische Wirkung haben (135). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass isoliertes MBP mit Lipiddoppelschichten interagiert und diese zerstört. Darüber könnte der zytotoxische Effekt und die Freisetzung der Granula aus den Plättchen erklärt werden (251).

Ein zusätzlicher, die Thrombose verstärkender Effekt von MBP könnte die Wirkung als allosterischer Antagonist vom muskarinen Rezeptor Typ 2 sein. Dieser wird hauptsächlich von glatten Muskelzellen des Herzens exprimiert und wirkt negativ dromotrop, chronotrop und inotrop (252). Die Hemmung dieses Rezeptors könnte durch die gesteigerte Aktion des Herzens zu Bluthochdruck führen und die arterielle Thrombose als Folge einer Plaqueruptur begünstigen.

Auch bei dem Protein EPX wurde bereits gezeigt, dass es Thrombozyten *in vitro* aktivieren kann, weshalb es in dieser Arbeit als zweiter möglicher prothrombotischer Effektor der Eosinophilen untersucht wurde (141). In dem untersuchten Modell wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der EPX^{-/-}-Maus und der Kontrollgruppe festgestellt. Im Gegenteil wurde sogar nur ein sehr kleiner Effekt von -0,19 festgestellt, was darauf schließen lässt, dass auch bei größeren Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann.

Hier stellt sich die Frage, ob EPX *in vivo* keinen Effekt hat oder ob er von anderen Effekten überlagert wird. Zum Beispiel könnte die Wirkung von MBP den Einfluss von EPX verdecken, da MBP einen sehr starken Effekt hat.

Was zusätzlich die Wirkung von EPX beeinflussen könnte, ist die Wahl der Methode, in der die Verletzung mit FeCl₃ gesetzt wurde. Dies führt zu der sogenannten Fenton-Reaktion in der ROS gebildet werden. Die ROS führen in einer Kettenreaktion zur Zerstörung der Zellmembranen (253). EPX wirkt auf ähnliche Weise: Es ist in der Lage ROS zu bilden, welche wiederum die Expression von Tissue Factor auf Endothelzellen induzieren und so zur

Thrombose beitragen können (135, 149). Dieser Mechanismus wird mit der Induktion der Thrombose durch FeCl₃ vorweggenommen. Eventuell wird in diesem Akutversuch dadurch eine so starke Kettenreaktion generiert, dass die Endothelverletzung, die zusätzlich durch das EPX verursacht wird, nicht stark ins Gewicht fällt.

Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass EPX in chronischen Krankheiten wie Arteriosklerose oder Hypereosinophilie maßgeblich dazu beiträgt, ein prothrombotisches Milieu aufzubauen. Interessant wäre, ob in anderen Thrombosemodellen, die ohne Fenton-Reaktion arbeiten, ein Effekt zu sehen ist. Möglich wäre eine Induktion über Ligatur der Arterie, über eine Endothelverletzung mittels Drahtdenudation oder über Simulation einer Plaqueruptur. Das Problem in diesen Modellen besteht darin, dass oftmals keine okklusiven Thromben entstehen, was es erschwert eine Vergleichbarkeit zu erlangen (221). Besonders in chronischen Modellen könnte die Rolle von EPX eine größere Bedeutung einnehmen. Ein möglicher Ansatz wäre hier, die EPX^{-/-}-Maus mit einer ApoE-Linie zu verpaaren, um die Rolle in der Arteriosklerose zu beobachten. Außerdem könnten die Mäuse mit dem Zytokin IL-5 behandelt werden, um eine Hypereosinophilie zu simulieren (241).

3. Ausblick

In dieser Arbeit konnten eindeutige Hinweise gewonnen werden, dass eosinophile Granulozyten in der arteriellen Thrombose im Mausmodell eine bedeutende Funktion einnehmen. Besonders die Hinweise, dass sie diese über einen MBP-vermittelten Mechanismus propagieren, macht sie zu einem interessanten Ansatzpunkt für potentielle zukünftige Therapien. Ebenso konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Eosinophilen *in vitro* durch Thrombozyten aktiviert werden und dass sich diese Aktivierung durch Hemmung der direkten Interaktion unterbinden lässt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um herauszufinden, wie Eosinophile rekrutiert und aktiviert werden. Zusätzlich ist ein tieferes Verständnis über welche Mechanismen sie die Thrombusentwicklung verstärken nötig, um mögliche Therapien gezielt entwickeln zu können.

Besonders eine Inhibition der Eosinophilen über Bindung von Siglec-8 könnte eine Möglichkeit sein, Einfluss auf die Aktivität der Eosinophilen zu nehmen,

ohne eine zusätzliche direkte Wirkung auf andere Entzündungszellen hervorzurufen. Die Auswirkung dieses Mechanismus ist jedoch noch unzureichend erforscht.

Auch die Anzeichen, dass die eosinophilen Granulozyten einen verstärkenden Einfluss auf die Plaquebildung und die Entzündung in der Arteriosklerose haben, macht sie zusätzlich zu einem therapeutischen Ziel. Falls sich die Ergebnisse durch weitere Untersuchungen verifizieren lassen, könnte mit einem Eingriff in die Mechanismen, die durch die Eosinophilen ausgelöst werden, der arteriellen Thrombose schon im Vorfeld vorgebeugt, aber auch der Verlauf einer akuten arteriellen Thrombose abgeschwächt werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Interaktion von eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten in arterieller Thrombose

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die arterielle Thrombose im Mausmodell und die zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht. Dafür wurden verschiedene Mauslinien untersucht, bei denen durch Ausschalten von Genen oder durch die Behandlung mit Antikörper Einfluss auf die Zelllinie der Eosinophilen genommen wurde. Die Entwicklung des Thrombus, ebenso wie die Dynamik der Rekrutierung und Aktivierung der Eosinophilen, wurde mit einem Intravitalmikroskop beobachtet. Zusätzlich wurde *in vitro* erforscht, welche Wirkung die Interaktion zwischen humanen eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten auf die Aktivität der Eosinophilen hat, um zu determinieren, ob diese Beziehung einen Einfluss auf die arterielle Thrombose hat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten die arterielle Thrombose verstärken, indem sie Effektorproteine sezernieren, von denen das zytotoxische Major Basic Protein die Thrombose stark beeinflusst. *In vitro*-Untersuchungen zeigen, dass Eosinophile durch aktive Thrombozyten aktiviert werden und DNA-Strukturen, die sogenannten EETs, formieren, wenn die Zellen die Möglichkeit haben, eine direkte Interaktion einzugehen. Die EETs wiederum enthalten das Effektorprotein MBP und sind in humanen Thromben zu finden. Desweiteren konnte ein hemmender Effekt, ausgelöst durch einen spezifisch an Siglec-F bindenden Antikörper, *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen konnten *in vitro* mit humanen Zellen bestätigt werden, da Antikörper, die spezifisch an das menschliche Homolog Siglec-8 binden oder das Adhäsionsmolekül P-Selektin blockieren, zu einer verminderten EET-Bildung führen.

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass Eosinophile eine bisher unterschätzte Rolle in der arteriellen Thrombose spielen. Thrombozyten aktivieren Eosinophile, die wiederum die Thrombose mit Hilfe von MBP verstärken. Die zu Grunde liegenden Mechanismen und insbesondere Siglec-8, als potentieller, neuer therapeutischer Ansatz, sollten in weiteren Studien näher untersucht werden.

VIII. SUMMARY

Interaction of eosinophilic granulocytes and thrombocytes in arterial thrombosis

This study investigates the impact of eosinophilic granulocytes in a mouse model of arterial thrombosis and its underlying mechanisms. Several mouse lines were studied, which had either knockouts or treatments which affected the eosinophil cell lineage. The thrombus development as well as recruitment and activation of eosinophils in thrombosis were studied by *in vivo*-imaging. Furthermore, *in vitro* experiments were performed to determine the effect of platelets on the activation status of eosinophils.

The results show that eosinophilic granulocytes promote arterial thrombosis in a MBP-dependent manner. MBPs are eosinophil cytotoxic effector proteins, which in this study led to effective thrombus growth and stability. Additional *in vitro* experiments showed that platelets can activate eosinophils. However, direct interaction was necessary for activation of eosinophil granulocytes, which then formed extracellular DNA-structures, called EETs. EETs contain MBP and are also found in human arterial thrombi. Specific antibody binding to eosinophil receptor molecule Siglec-F reduced thrombus stability due to an inhibitory - but not depleting - mechanism. These findings were confirmed by *in vitro* experiments which showed less EET development after antibody binding to Siglec-8, the human homologous of Siglec-F, or antibody mediated blocking of platelets' surface molecule p-selectin, which mediates adhesion between platelets and eosinophils.

The results of this study demonstrate that eosinophils play a previously unappreciated role in arterial thrombosis. Platelets activate eosinophils which in turn promote thrombus development in a MBP-dependent manner. The study suggests that siglec-8 on eosinophils may be a potential therapeutic target for the treatment of arterial thrombosis.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bansilal, S., Castellano, J.M., Fuster, V. Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 201 Suppl 1, S1-7 (2015).
2. Riegger, J., Byrne, R.A., Joner, M., Chandraratne, S., Gershlick, A.H., Ten Berg, J.M., Adriaenssens, T., Guagliumi, G., Godschalk, T.C., Neumann, F.J., Trenk, D., Feldman, L.J., Steg, P.G., Desmet, W., Alfonso, F., Goodall, A.H., Wojdyla, R., Dudek, D., Philippi, V., Opinaldo, S., Titova, A., Malik, N., Cotton, J., Jhagroe, D.A., Heestermans, A.A., Sinnaeve, P., Vermeersch, P., Valina, C., Schulz, C., Kastrati, A., Massberg, S., Prevention of Late Stent Thrombosis by an Interdisciplinary Global European Effort, I. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J* 37, 1538-1549 (2016).
3. Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143 (2002).
4. Engelmann, B., Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 34-45 (2013).
5. Sakai, T., Inoue, S., Matsuyama, T.-a., Takei, M., Ota, H., Katagiri, T., Koboyashi, Y. Eosinophils may be involved in thrombus growth in acute coronary syndrome histologic examination of aspiration samples. *International heart journal* 50, 267-277 (2009).
6. Toor, I.S., Jaumdally, R., Lip, G.Y., Millane, T., Varma, C. Eosinophil count predicts mortality following percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 130, 607-611 (2012).
7. Preissner, K.T. [Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis]. *Hamostaseologie* 24, 84-93 (2004).
8. Rasche, H. Haemostasis and thrombosis: an overview. *European Heart Journal Supplements* 3, Q3-Q7 (2001).
9. Monaco, J.L., Lawrence, W.T. Acute wound healing: An overview. *Clinics in Plastic Surgery* 30, 1-12 (2003).
10. Golebiewska, E.M., Poole, A.W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews* 29, 153-162 (2015).
11. Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561 (1998).

12. Loscalzo, J. Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 333, 251-253 (1995).
13. Mendelsohn, M.E., O'Neill, S., George, D., Loscalzo, J. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 265, 19028-19034 (1990).
14. Michelson, A.D., Benoit, S.E., Furman, M.I., Breckwoldt, W.L., Rohrer, M.J., Barnard, M.R., Loscalzo, J. Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 270, H1640-1648 (1996).
15. De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S., Liao, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96, 60-68 (1995).
16. Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 4651-4655 (1991).
17. Hu, W.M., Man, R.Y. Interaction of vasoactive substances released by platelet-activating factor in the rat perfused heart. *Br J Pharmacol* 104, 933-937 (1991).
18. Lorant, D.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Seminars in cell biology* 6, 295-303 (1995).
19. Morris, G.E., Nelson, C.P., Standen, N.B., Challiss, R.A., Willets, J.M. Endothelin signalling in arterial smooth muscle is tightly regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *Cardiovascular research* 85, 424-433 (2010).
20. Scherer, E.Q., Herzog, M., Wangemann, P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by rho-kinase-induced Ca(2+) sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. *Stroke* 33, 2965-2971 (2002).
21. Goligorsky, M.S., Tsukahara, H., Magazine, H., Andersen, T.T., Malik, A.B., Bahou, W.F. Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 158, 485-494 (1994).
22. Rosenberg, R.D., Rosenberg, J.S. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest* 74, 1-6 (1984).
23. Teien, A.N., Abildgaard, U., Höök, M. The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thrombosis Research* 8, 859-867 (1976).
24. He, L., Giri, T.K., Vicente, C.P., Tollefsen, D.M. Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II. *Blood* 111, 4118-4125 (2008).

25. Jesty, J., Lorenz, A., Rodriguez, J., Wun, T. Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 87, 2301-2307 (1996).
26. Thompson, E.A., Salem, H.H. Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J Clin Invest* 78, 13-17 (1986).
27. Esmon, C.T. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost* 70, 29-35 (1993).
28. Monroe, D.M. *Basic Principles Underlying Coagulation. Practical Hemostasis and Thrombosis: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 1-11.*
29. Watson, S.P., Herbert, J.M., Pollitt, A.Y. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost* 8, 1456-1467 (2010).
30. Meyers, K.M., Holmsen, H., Seachord, C.L. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* 243, R454-461 (1982).
31. Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207 (2001).
32. André, P., Delaney, S.M., LaRocca, T., Vincent, D., DeGuzman, F., Jurek, M., Koller, B., Phillips, D.R., Conley, P.B. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 398-406 (2003).
33. Renné, T., Schmaier, A.H., Nickel, K.F., Blombäck, M., Maas, C. In vivo roles of factor XII. *Blood* 120, 4296-4303 (2012).
34. Blair, P., Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23, 177-189 (2009).
35. Burgers, J.A., Schweizer, R.C., Koenderman, L., Bruijnzeel, P.L., Akkerman, J.W. Human platelets secrete chemotactic activity for eosinophils. *Blood* 81, 49-55 (1993).
36. Gleissner, C.A., von Hundelshausen, P., Ley, K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1920-1927 (2008).
37. May, A.E., Seizer, P., Gawaz, M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, s5-10 (2008).
38. Scheld, W.M., Valone, J.A., Sande, M.A. Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. *J Clin Invest* 61, 1394-1404 (1978).
39. Zillmann, A., Luther, T., Muller, I., Kotzsch, M., Spannagl, M., Kauke, T., Oelschlagel, U., Zahler, S., Engelmann, B. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 603-609 (2001).

40. Galligan, L., Livingstone, W., Volkov, Y., Hokamp, K., Murphy, C., Lawler, M., Fukudome, K., Smith, O. Characterization of protein C receptor expression in monocytes. *British journal of haematology* 115, 408-414 (2001).
41. McCachren, S.S., Diggs, J., Weinberg, J.B., Dittman, W.A. Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood* 78, 3128-3132 (1991).
42. McGee, M.P., Foster, S., Wang, X. Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1847-1854 (1994).
43. Swystun, L.L., Liaw, P.C. The role of leukocytes in thrombosis. *Blood* 128, 753-762 (2016).
44. Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.-M., Sajer, S.A., Furie, B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848-851 (1992).
45. Coughlin, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3, 1800-1814 (2005).
46. Kaufmann, R., Junker, U., Nuske, K., Westermann, M., Henklein, P., Scheele, J., Junker, K. PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 20, 177-180 (2002).
47. Owen, W.G. PAR-3 is a low-affinity substrate, high affinity effector of thrombin. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 166-168 (2003).
48. Shantsila, E., Lip, G. The role of monocytes in thrombotic disorders. *Thromb Haemost* 102, 916-924 (2009).
49. Osterud, B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 125 Suppl 1, S31-34 (2010).
50. Uderhardt, S., Ackermann, J.A., Fillep, T., Hammond, V.J., Willeit, J., Santer, P., Mayr, M., Biburger, M., Miller, M., Zellner, K.R. Enzymatic lipid oxidation by eosinophils propagates coagulation, hemostasis, and thrombotic disease. *Journal of Experimental Medicine*, jem. 20161070 (2017).
51. Adams, S., Kelly, S., Kirsch, R., Robson, S., Shephard, E. Role of neutrophil membrane proteases in fibrin degradation. *Blood coagulation & fibrinolysis* 6, 693-702 (1995).
52. Grau, E., Moroz, L.A. Fibrinolytic activity of normal human blood monocytes. *Thrombosis Research* 53, 145-162 (1989).
53. Singh, I., Burnand, K., Collins, M., Luttun, A., Collen, D., Boelhouwer, B., Smith, A. Failure of Thrombus to Resolve in Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene-Knockout Mice. *Circulation* 107, 869-875 (2003).
54. Machovich, R., Himer, A., Owen, W. Neutrophil proteases in plasminogen activation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1, 273-278 (1990).

55. Palta, S., Saroa, R., Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 58, 515-523 (2014).
56. Triplett, D.A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem* 46, 1260-1269 (2000).
57. Smith, S.A., Travers, R.J., Morrissey, J.H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50, 326-336 (2015).
58. Osterud, B., Rapaport, S.I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5260-5264 (1977).
59. Wood, J.P., Ellery, P.E.R., Maroney, S.A., Mast, A.E. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 123, 2934-2943 (2014).
60. De Marco, L., Mazzucato, M., Masotti, A., Ruggeri, Z.M. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem* 269, 6478-6484 (1994).
61. Estevez, B., Kim, K., Delaney, M.K., Stojanovic-Terpo, A., Shen, B., Ruan, C., Cho, J., Ruggeri, Z.M., Du, X. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood* 127, 626-636 (2016).
62. Landis, R.C. Protease Activated Receptors: Clinical Relevance to Hemostasis and Inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 21, 103-113 (2007).
63. Ramstrom, S., Ranby, M., Lindahl, T.L. Platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in clotting whole blood--different effects of collagen, TRAP and calcium ionophore A23187. *Thromb Haemost* 89, 132-141 (2003).
64. Majumder, R., Weinreb, G., Lentz, B.R. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry* 44, 16998-17006 (2005).
65. Orfeo, T., Brummel-Ziedins, K.E., Gissel, M., Butenas, S., Mann, K.G. The nature of the stable blood clot procoagulant activities. *J Biol Chem* 283, 9776-9786 (2008).
66. Borsodi, A., Machovich, R. Inhibition of esterase and amidase activities of alpha- and beta-thrombin in the presence of antithrombin III and heparin. *Biochim Biophys Acta* 566, 385-389 (1979).
67. Hackeng, T.M., Sere, K.M., Tans, G., Rosing, J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3106-3111 (2006).
68. Esmon, C.T., Esmon, N.L., Harris, K.W. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 257, 7944-7947 (1982).
69. Esmon, C.T. The protein C pathway. *Chest* 124, 26s-32s (2003).

70. Dudenredaktion(o.J.). "Schlagader" auf Duden online. Available from: <https://www.duden.de/node/737319/revisions/1294466/view>.
71. Leonhardt, H. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie: mit Schlüssel zum Gegenstandskatalog. Bd. 3 Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen; 13 Tabellen (Thieme, 1985).
72. Dudenredaktion(o.J.). "Arteriosklerose" auf Duden online [updated 06.12.2017]. Available from: <https://www.duden.de/node/704682/revisions/1383694/view>.
73. Heinzeller, T., Büsing, C.M. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg (Georg Thieme Verlag, 2001).
74. Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. Oxidation, Inflammation, and Genetics 91, 2488-2496 (1995).
75. Schwenke, D.C., Carew, T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 9, 895-907 (1989).
76. Young, S.G., Parthasarathy, S. Why are low-density lipoproteins atherogenic? *West J Med* 160, 153-164 (1994).
77. Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Fogelman, A.M. The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak. A Review Based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture 16, 831-842 (1996).
78. Berliner, J.A., Territo, M.C., Sevanian, A., Ramin, S., Kim, J.A., Bamshad, B., Esterson, M., Fogelman, A.M. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85, 1260-1266 (1990).
79. Ku, G., Thomas, C., Akeson, A., L Jackson, R. Induction of interleukin I β expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyocladocic acid (1992).
80. Kume, N., Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1138-1144 (1992).
81. Libby, P., Hansson, G. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 64, 5-15 (1991).
82. Navab, M., Liao, F., Hough, G.P., Ross, L.A., Van Lenten, B.J., Rajavashisth, T.B., Lusis, A.J., Laks, H., Drinkwater, D.C., Fogelman, A.M. Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin43 message. *J Clin Invest* 87, 1763-1772 (1991).

83. Quinn, M., Parthasarathy, S., Steinberg, D. Lysophosphatidylcholine: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis (1988).
84. Johnson-Tidey, R.R., McGregor, J.L., Taylor, P.R., Poston, R.N. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* 144, 952-961 (1994).
85. Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* 214, 33-50 (2015).
86. Rosenfeld, M.E., Tsukada, T., Chait, A., Bierman, E.L., Gown, A.M., Ross, R. Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 7, 24-34 (1987).
87. Guyton, J.R., Klemp, K.F. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 4-11 (1996).
88. Bailey, G., Meadows, J., Morrison, A.R. Imaging Atherosclerotic Plaque Calcification: Translating Biology. *Curr Atheroscler Rep* 18, 51 (2016).
89. Aikawa, E., Nahrendorf, M., Figueiredo, J.L., Swirski, F.K., Shtatland, T., Kohler, R.H., Jaffer, F.A., Aikawa, M., Weissleder, R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 116, 2841-2850 (2007).
90. Qiao, J.H., Mertens, R.B., Fishbein, M.C., Geller, S.A. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Human pathology* 34, 402-407 (2003).
91. Iyemere, V.P., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., Shanahan, C.M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* 260, 192-210 (2006).
92. Sage, A.P., Tintut, Y., Demer, L.L. Regulatory Mechanisms in Atherosclerotic Calcification. *Nature reviews Cardiology* 7, 528-536 (2010).
93. Dong, Z.M., Wagner, D.D. Leukocyte-endothelium adhesion molecules in atherosclerosis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 132, 369-375 (1998).
94. Dong, Z.M., Brown, A.A., Wagner, D.D. Prominent Role of P-Selectin in the Development of Advanced Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Circulation* 101, 2290-2295 (2000).
95. Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., Ley, K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature medicine* 9, (2003).
96. Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A.I., Christophers, E., Schroder, J.M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176, 587-592 (1992).

97. Michell, D.L., Andrews, K.L., Woollard, K.J., Chin-Dusting, J.P. Imaging leukocyte adhesion to the vascular endothelium at high intraluminal pressure. *J Vis Exp*, (2011).
98. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689 (2007).
99. Galkina, E., Ley, K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 2292-2301 (2007).
100. Fotis, L., Agrogiannis, G., Vlachos, I.S., Pantopoulou, A., Margoni, A., Kostaki, M., Verikokos, C., Tzivras, D., Mikhailidis, D.P., Perrea, D. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In Vivo* 26, 243-250 (2012).
101. Chihara, J., Yamamoto, T., Kayaba, H., Kakazu, T., Kurachi, D., Yamamoto, J., Iwasa, S., Iida, K., Urayama, O., Kobayashi, Y. Degranulation of eosinophils mediated by intercellular adhesion molecule-1 and its ligands is involved in adhesion molecule expression on endothelial cells-selective induction of VCAM-1. *J Allergy Clin Immunol* 103, S452-456 (1999).
102. Haley, K.J., Lilly, C.M., Yang, J.-H., Feng, Y., Kennedy, S.P., Turi, T.G., Thompson, J.F., Sukhova, G.H., Libby, P., Lee, R.T. Overexpression of Eotaxin and the CCR3 Receptor in Human Atherosclerosis. Using Genomic Technology to Identify a Potential Novel Pathway of Vascular Inflammation *102*, 2185-2189 (2000).
103. Niccoli, G., Ferrante, G., Cosentino, N., Conte, M., Belloni, F., Marino, M., Baca, M., Montone, R.A., Sabato, V., Schiavino, D., Patriarca, G., Crea, F. Eosinophil cationic protein: A new biomarker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 211, 606-611 (2010).
104. Nagata, M., Sedgwick, J.B., Kita, H., Busse, W.W. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 158-166 (1998).
105. Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Lusinskas, F.W., Gimbrone, M.A., McIntyre, B.W. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *The Journal of Immunology* 148, 1086-1092 (1992).
106. Bagot, C.N., Arya, R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol* 143, 180-190 (2008).
107. Wolberg, A.S., Aleman, M.M., Leiderman, K., Machlus, K.R. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg* 114, 275-285 (2012).
108. Dudenredaktion(o.J.). "Thrombose" auf Duden online: URL <https://www.duden.de/node/759906/revisions/1124211/view>. (2017).

109. Geddings, J.E., Mackman, N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 111, 570-574 (2014).
110. Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernández-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., Badimon, J.J. Tissue Factor Modulates the Thrombogenicity of Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 95, 594-599 (1997).
111. Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M., Gordon, D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 2839-2843 (1989).
112. Zhang, M.D., Zhao, X.C., Zhang, Y.H., Yan, Y.F., Wang, Z.M., Lv, S.Z., Zhao, Q.M. Plaque Thrombosis is Reduced by Attenuating Plaque Inflammation with Pioglitazone and is Evaluated by Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Cardiovascular therapeutics* 33, 118-126 (2015).
113. Cerletti, C., Tamburrelli, C., Izzi, B., Gianfagna, F., de Gaetano, G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res* 129, 263-266 (2012).
114. Martinod, K., Wagner, D.D. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123, 2768-2776 (2014).
115. Mackman, N. Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 1015-1022 (2004).
116. de Bruijne-Admiraal, L.G., Modderman, P.W., Von dem Borne, A.E., Sonnenberg, A. P-selectin mediates Ca²⁺-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* 80, 134-142 (1992).
117. Ott, I., Neumann, F.-J., Gawaz, M., Schmitt, M., Schömig, A. Increased Neutrophil-Platelet Adhesion in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 94, 1239-1246 (1996).
118. Furman, M.I., Benoit, S.E., Barnard, M.R., Valeri, C.R., Borbone, M.L., Becker, R.C., Hechtman, H.B., Michelson, A.D. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 31, 352-358 (1998).
119. MacGregor, I.R., Perrie, A.M., Donnelly, S.C., Haslett, C. Modulation of human endothelial thrombomodulin by neutrophils and their release products. *American journal of respiratory and critical care medicine* 155, 47-52 (1997).
120. Longstaff, C., Varjú, I., Sótonyi, P., Szabó, L., Krumrey, M., Hoell, A., Bóta, A., Varga, Z., Komorowicz, E., Kolev, K. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *Journal of Biological Chemistry* 288, 6946-6956 (2013).
121. Semeraro, F., Ammollo, C.T., Semeraro, N., Colucci, M. Tissue factor-expressing monocytes inhibit fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism, and make clots resistant to heparins. *Haematologica* 94, 819-826 (2009).

122. WHO, W.H.O. Cardiovascular Diseases CVD: World Health Organization; 2017 [updated May 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
123. Mackman, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 451, 914-918 (2008).
124. German, A.J. The growing problem of obesity in dogs and cats. *The Journal of Nutrition* 136, 1940S-1946S (2006).
125. Lazzarini Robertson, A., Butkus, A., Ehrhart, L.A., Lewis, L.A. Experimental arteriosclerosis in dogs: Evaluation of anatomopathological findings. *Atherosclerosis* 15, 307-325 (1972).
126. Steiner, A., Kendall, F.E., Bevans, M. Production of arteriosclerosis in dogs by cholesterol and thiouracil feeding. *American heart journal* 38, 34-42 (1949).
127. Smith, S.A., Tobias, A.H. Feline arterial thromboembolism: an update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34, 1245-1271 (2004).
128. Winter, R.L., Sedacca, C.D., Adams, A., Orton, E.C. Aortic thrombosis in dogs: presentation, therapy, and outcome in 26 cases. *J Vet Cardiol* 14, 333-342 (2012).
129. Tablin, F., Schumacher, T., Pombo, M., Marion, C., Huang, K., Norris, J., Jandrey, K., Kittleson, M. Platelet activation in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of veterinary internal medicine* 28, 411-418 (2014).
130. Winkle, T.J., Liu, S.M., Hackner, S.G. Clinical and pathological features of aortic thromboembolism in 36 dogs. *Journal of veterinary emergency and critical care* 3, 13-21 (1993).
131. Boswood, A., Lamb, C., White, R. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *Journal of small animal practice* 41, 109-114 (2000).
132. Rothenberg, M.E., Hogan, S.P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24, 147-174 (2006).
133. Kita, H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol* 97, 889-892 (1996).
134. Spencer, L.A., Bonjour, K., Melo, R.C.N., Weller, P.F. Eosinophil Secretion of Granule-Derived Cytokines. *Front Immunol* 5, (2014).
135. Acharya, K.R., Ackerman, S.J. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* 289, 17406-17415 (2014).
136. Melo, R.C., Perez, S.A., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., Weller, P.F. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 6, 866-879 (2005).
137. Melo, R.C., Weller, P.F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol* 25, 1341-1354 (2010).

138. Yousefi, S., Simon, D., Simon, H.-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Current Opinion in Immunology* 24, 736-739 (2012).
139. Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death And Differentiation* 16, 1438 (2009).
140. Attery, A., Batra, J.K. Mouse eosinophil associated ribonucleases: Mechanism of cytotoxic, antibacterial and antiparasitic activities. *Int J Biol Macromol* 94, 445-450 (2017).
141. Michael S. Rohrbach, C.L.W., Nancy R. Slifman, a.G.J.G. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *JExpMed*, (1990).
142. G J Gleich, C R Adolphson, a., Leiferman, K.M. The Biology of the Eosinophilic Leukocyte. *Annual Review of Medicine* 44, 85-101 (1993).
143. Pégorier, S., Wagner, L.A., Gleich, G.J., Pretolani, M. Eosinophil-Derived Cationic Proteins Activate the Synthesis of Remodeling Factors by Airway Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 177, 4861-4869 (2006).
144. Wehling-Henricks, M., Sokolow, S., Lee, J.J., Myung, K.H., Villalta, S.A., Tidball, J.G. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 17, 2280-2292 (2008).
145. Glerup, S., Kloverpris, S., Oxvig, C. The proform of the eosinophil major basic protein binds the cell surface through a site distinct from its C-type lectin ligand-binding region. *J Biol Chem* 281, 31509-31516 (2006).
146. Swaminathan, G.J., Myszka, D.G., Katsamba, P.S., Ohnuki, L.E., Gleich, G.J., Acharya, K.R. Eosinophil-Granule Major Basic Protein, a C-Type Lectin, Binds Heparin. *Biochemistry* 44, 14152-14158 (2005).
147. Mukai, H.Y., Ninomiya, H., Ohtani, K., Nagasawa, T., Abe, T. Major basic protein binding to thrombomodulin potentially contributes to the thrombosis in patients with eosinophilia. *Br J Haematol* 90, 892-899 (1995).
148. Slungaard, A., Vercellotti, G.M., Tran, T., Gleich, G.J., Key, N.S. Eosinophil cationic granule proteins impair thrombomodulin function. A potential mechanism for thromboembolism in hypereosinophilic heart disease. *J Clin Invest* 91, 1721-1730 (1993).
149. Wang, J.-G., Mahmud, S.A., Thompson, J.A., Geng, J.-G., Key, N.S., Slungaard, A. The principal eosinophil peroxidase product, HOSCN, is a uniquely potent phagocyte oxidant inducer of endothelial cell tissue factor activity: a potential mechanism for thrombosis in eosinophilic inflammatory states. *Blood* 107, 558-565 (2006).
150. Arlandson, M., Decker, T., Roongta, V.A., Bonilla, L., Mayo, K.H., MacPherson, J.C., Hazen, S.L., Slungaard, A. Eosinophil Peroxidase Oxidation of Thiocyanate CHARACTERIZATION OF MAJOR REACTION PRODUCTS AND A POTENTIAL SULFHYDRYL-TARGETED CYTOTOXICITY SYSTEM. *Journal of Biological Chemistry* 276, 215-224 (2001).

151. Doyle, A.D., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Shim, K.G., Nguyen, D.T., Protheroe, C., Colbert, D., Kloeber, J., Neely, J., Shim, K.P., Dyer, K.D., Rosenberg, H.F., Lee, J.J., Lee, N.A. Expression of the secondary granule proteins major basic protein 1 (MBP-1) and eosinophil peroxidase (EPX) is required for eosinophilopoiesis in mice. *Blood* 122, 781-790 (2013).
152. Domachowske, Joseph B., Dyer, K., Bonville, C., Rosenberg, H. Recombinant Human Eosinophil-Derived Neurotoxin/RNase 2 Functions as an Effective Antiviral Agent against Respiratory Syncytial Virus1998).
153. Fredens, K., Dahl, R., Venge, P. The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J Allergy Clin Immunol* 70, 361-366 (1982).
154. Yang, D., Chen, Q., Su, S.B., Zhang, P., Kurosaka, K., Caspi, R.R., Michalek, S.M., Rosenberg, H.F., Zhang, N., Oppenheim, J.J. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 79-90 (2008).
155. Lehrer, R.I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K.J., Gleich, G.J. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *The Journal of Immunology* 142, 4428-4434 (1989).
156. Tai, P.C., Ackerman, S.J., Spry, C.J., Dunnette, S., Olsen, E.G., Gleich, G.J. Deposits of eosinophil granule proteins in cardiac tissues of patients with eosinophilic endomyocardial disease. *Lancet* 1, 643-647 (1987).
157. Rosenberg, H. Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity1995).
158. Arima, M., Kanoh, T., Kawano, Y., Oigawa, T., Yamagami, S., Matsuda, S. Serum levels of eosinophil cationic protein in patients with eosinophilic myocarditis. *International Journal of Cardiology* 84, 97-99.
159. Ackerman, S.J., Corrette, S.E., Rosenberg, H.F., Bennett, J.C., Mastrianni, D.M., Nicholson-Weller, A., Weller, P.F., Chin, D.T., Tenen, D.G. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *The Journal of Immunology* 150, 456-468 (1993).
160. Ackerman, S.J., Liu, L., Kwatia, M.A., Savage, M.P., Leonidas, D.D., Swaminathan, G.J., Acharya, K.R. Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14859-14868 (2002).
161. Swaminathan, G.J., Leonidas, D.D., Savage, M.P., Ackerman, S.J., Acharya, K.R. Selective recognition of mannose by the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10): a crystallographic study at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 38, 13837-13843 (1999).
162. Ames, P.R., Aloj, G., Gentile, F. Eosinophilia and thrombosis in parasitic diseases: an overview. *Clin Appl Thromb Hemost* 17, 33-38 (2011).

163. Ames, P.R., Margaglione, M., Mackie, S., Alves, J.D. Eosinophilia and thrombophilia in churg strauss syndrome: a clinical and pathogenetic overview. *Clin Appl Thromb Hemost* 16, 628-636 (2010).
164. Engelmann, B. Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 36, 188-190 (2006).
165. Moosbauer, C., Morgenstern, E., Cuvelier, S.L., Manukyan, D., Bidzhekov, K., Albrecht, S., Lohse, P., Patel, K.D., Engelmann, B. Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 109, 995-1002 (2007).
166. Feistritz, C., Mosheimer, B.A., Kaneider, N.C., Riewald, M., Patsch, J.R., Wiedermann, C.J. Thrombin affects eosinophil migration via protease-activated receptor-1. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 12-16 (2004).
167. Bolton, S.J., McNulty, C.A., Thomas, R.J., Hewitt, C.R., Wardlaw, A.J. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *J Leukoc Biol* 74, 60-68 (2003).
168. Koo, B.H., Chung, K.H., Hwang, K.C., Kim, D.S. Factor Xa induces mitogenesis of coronary artery smooth muscle cell via activation of PAR-2. *FEBS Lett* 523, 85-89 (2002).
169. Morita, E., Schroder, J.M., Christophers, E. Differential sensitivities of purified human eosinophils and neutrophils to defined chemotaxins. *Scandinavian journal of immunology* 29, 709-716 (1989).
170. Rohrbach, M.S., Wheatley, C.L., Slifman, N.R., Gleich, G.J. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med* 172, 1271-1274 (1990).
171. Nutku, E., Aizawa, H., Hudson, S.A., Bochner, B.S. Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood* 101, 5014-5020 (2003).
172. Zimmermann, N., McBride, M.L., Yamada, Y., Hudson, S.A., Jones, C., Cromie, K.D., Crocker, P.R., Rothenberg, M.E., Bochner, B.S. Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy* 63, 1156-1163 (2008).
173. Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, J.C., Bochner, B.S. Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol Ther* 135, 327-336 (2012).
174. Ilmarinen, P., Kankaanranta, H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114, 109-117 (2014).
175. Bochner, B.S. Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clin Exp Allergy* 39, 317-324 (2009).
176. Feng, Y.H., Mao, H. Expression and preliminary functional analysis of Siglec-F on mouse macrophages. *J Zhejiang Univ Sci B* 13, 386-394 (2012).

177. McMillan, S.J., Richards, H.E., Crocker, P.R. Siglec-F-dependent negative regulation of allergen-induced eosinophilia depends critically on the experimental model. *Immunol Lett* 160, 11-16 (2014).
178. Nutku, E., Hudson, S.A., Bochner, B.S. Mechanism of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: Role of caspases and mitochondrial injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 918-924 (2005).
179. Nutku-Bilir, E., Hudson, S.A., Bochner, B.S. Interleukin-5 priming of human eosinophils alters siglec-8 mediated apoptosis pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 121-124 (2008).
180. Carroll, D.J., O'Sullivan, J.A., Nix, D.B., Cao, Y., Tiemeyer, M., Bochner, B.S. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 8 (Siglec-8) is an activating receptor mediating β 2-integrin-dependent function in human eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, (2017).
181. Yamaguchi, Y., Zon, L.I., Ackerman, S.J., Yamamoto, M., Suda, T. Forced GATA-1 expression in the murine myeloid cell line M1: induction of c-Mpl expression and megakaryocytic/erythroid differentiation. *Blood* 91, 450-457 (1998).
182. Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., Orkin, S.H. Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1387-1395 (2002).
183. Tsai, S.F., Strauss, E., Orkin, S.H. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev* 5, 919-931 (1991).
184. Breslow, J.L. Mouse Models of Atherosclerosis. *Science* 272, 685-688 (1996).
185. Nakashima, Y., Plump, A.S., Raines, E.W., Breslow, J.L., Ross, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 14, 133-140 (1994).
186. André, P. P-selectin in haemostasis. *British Journal of Haematology* 126, 298-306 (2004).
187. Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74, 541-554 (1993).
188. Zhang, M., Angata, T., Cho, J.Y., Miller, M., Broide, D.H., Varki, A. Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood* 109, 4280-4287 (2007).
189. Denzler, K.L., Farmer, S.C., Crosby, J.R., Borchers, M., Cieslewicz, G., Larson, K.A., Cormier-Regard, S., Lee, N.A., Lee, J.J. Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *J Immunol* 165, 5509-5517 (2000).

190. Denzler, K.L., Borchers, M.T., Crosby, J.R., Cieslewicz, G., Hines, E.M., Justice, J.P., Cormier, S.A., Lindenberger, K.A., Song, W., Wu, W., Hazen, S.L., Gleich, G.J., Lee, J.J., Lee, N.A. Extensive Eosinophil Degranulation and Peroxidase-Mediated Oxidation of Airway Proteins Do Not Occur in a Mouse Ovalbumin-Challenge Model of Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology* 167, 1672-1682 (2001).
191. Doyle, A.D., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., Willetts, L., Shim, K., Neely, J., Kloeber, J., Lesuer, W.E., Pero, R.S., Lacy, P., Moqbel, R., Lee, N.A., Lee, J.J. Homologous recombination into the eosinophil peroxidase locus generates a strain of mice expressing Cre recombinase exclusively in eosinophils. *J Leukoc Biol* 94, 17-24 (2013).
192. Gee, J.M., Smith, N.A., Fernandez, F.R., Economo, M.N., Brunert, D., Rothermel, M., Morris, S.C., Talbot, A., Palumbos, S., Ichida, J.M., Shepherd, J.D., West, P.J., Wachowiak, M., Capecchi, M.R., Wilcox, K.S., White, J.A., Tvrdek, P. Imaging activity in neurons and glia with a Polr2a-based and cre-dependent GCaMP5G-IRES-tdTomato reporter mouse. *Neuron* 83, 1058-1072 (2014).
193. Zariwala, H.A., Borghuis, B.G., Hoogland, T.M., Madisen, L., Tian, L., De Zeeuw, C.I., Zeng, H., Looger, L.L., Svoboda, K., Chen, T.W. A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging in vivo. *J Neurosci* 32, 3131-3141 (2012).
194. Olson, E., Graham, D. Chapter 5 - Animal Models in Pharmacogenomics A2 - Padmanabhan, Sandosh. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 73-87.
195. Carter, M., Shieh, J. Chapter 12 - Making and Using Transgenic Organisms. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 253-271.
196. Jameson, D.M., Croney, J.C., Moens, P.D.J. [1] Fluorescence: Basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods in enzymology*. Volume 360: Academic Press; 2003. p. 1-43.
197. Wang, X., Roper, M.G. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Analytical methods : advancing methods and applications* 6, 3019-3024 (2014).
198. Fisher, I.b.T. *Fluorescent Tracers of Cell Morphology and Fluid Flow* The Molecular Probes Handbook (online version) 2017.
199. Proulle, V., Furie, R.A., Merrill-Skoloff, G., Furie, B.C., Furie, B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood* 124, 611-622 (2014).
200. Falati, S., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Furie, B.C., Furie, B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 8, 1175-1181 (2002).
201. Lichtman, J.W., Conchello, J.-A. Fluorescence microscopy. *Nat Meth* 2, 910-919 (2005).

202. Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., Eliceiri, K.W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18, 529 (2017).
203. Sedgwick, J.B., Shikama, Y., Nagata, M., Brener, K., Busse, W.W. Effect of isolation protocol on eosinophil function: Percoll gradients versus immunomagnetic beads. *Journal of Immunological Methods* 198, 15-24 (1996).
204. Munoz, N.M., Leff, A.R. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nature protocols* 1, 2613-2620 (2006).
205. Munoz, N.M., Leff, A.R. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nat Protocols* 1, 2613-2620 (2007).
206. Menitove, J.E., Frenzke, M., Aster, R.H. Use of prostacyclin to inhibit activation of platelets during preparation of platelet concentrates. *Transfusion* 24, 528-531 (1984).
207. Jawień, J., Łomnicka, M., Korbut, R., Chłopicki, S. THE INVOLVEMENT OF ADHESION MOLECULES AND LIPID. *Journal of physiology and pharmacology* 56, 637-648 (2005).
208. Martinez-Moczygemba, M., Huston, D.P. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112, 653-665; quiz 666 (2003).
209. Nakagawa, S., Cuthill, I.C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biological reviews* 82, 591-605 (2007).
210. Farid, S., Mirshafiey, A., Razavi, A. Siglec-8 and Siglec-F, the new therapeutic targets in asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34, 721-726 (2012).
211. Kim, Y.H., Park, C.S., Lim, D.H., Son, B.K., Kim, J.H., Ahn, S.H., Bochner, B.S., Na, K., Jang, T.Y. Antiallergic effect of anti-Siglec-F through reduction of eosinophilic inflammation in murine allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy* 27, 187-191 (2013).
212. Rubinstein, E., Cho, J.Y., Rosenthal, P., Chao, J., Miller, M., Pham, A., Aceves, S.S., Varki, A., Broide, D.H. Siglec-F inhibition reduces esophageal eosinophilia and angiogenesis in a mouse model of eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 53, 409-416 (2011).
213. Mao, H., Kano, G., Hudson, S.A., Brummet, M., Zimmermann, N., Zhu, Z., Bochner, B.S. Mechanisms of Siglec-F-induced eosinophil apoptosis: a role for caspases but not for SHP-1, Src kinases, NADPH oxidase or reactive oxygen. *PLoS One* 8, e68143 (2013).
214. Edwards, B.S., Curry, M.S., Tsuji, H., Brown, D., Larson, R.S., Sklar, L.A. Expression of P-selectin at low site density promotes selective attachment of eosinophils over neutrophils. *J Immunol* 165, 404-410 (2000).

215. Guhad, F. Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 44, 58-59 (2005).
216. Peters, L.L., Robledo, R.F., Bult, C.J., Churchill, G.A., Paigen, B.J., Svenson, K.L. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics* 8, 58-69 (2007).
217. Cooley, B.C. Murine models of thrombosis. *Thromb Res* 129 Suppl 2, S62-64 (2012).
218. Hechler, B., Gachet, C. Comparison of two murine models of thrombosis induced by atherosclerotic plaque injury. *Thromb Haemost* 105 Suppl 1, S3-12 (2011).
219. Kurz, K.D., Main, B.W., Sandusky, G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 60, 269-280 (1990).
220. Day, S.M., Duquaine, D., Mundada, L.V., Menon, R.G., Khan, B.V., Rajagopalan, S., Fay, W.P. Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation* 107, 2601-2606 (2003).
221. Cooley, B.C. Murine arterial thrombus induction mechanism influences subsequent thrombodynamics. *Thromb Res* 135, 939-943 (2015).
222. Farrehi, P.M., Ozaki, C.K., Carmeliet, P., Fay, W.P. Regulation of Arterial Thrombolysis by Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Mice. *Circulation* 97, 1002-1008 (1998).
223. Novotny, J., Chandraratne, S., Weinberger, T., Philippi, V., Stark, K., Ehrlich, A., Pircher, J., Konrad, I., Oberdieck, P., Titova, A. Histological comparison of arterial thrombi in mice and men and the influence of Cl-amidine on thrombus formation. *PLoS one* 13, e0190728 (2018).
224. Gueders, M.M., Paulissen, G., Crahay, C., Quesada-Calvo, F., Hacha, J., Van Hove, C., Tournoy, K., Louis, R., Foidart, J.-M., Noël, A., Cataldo, D.D. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflammation Research* 58, 845 (2009).
225. Rajavashisth, T., Andalibi, A., Territo, M., Berliner, J., Navab, M., Fogelman, A., Lusis, A. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344, 254 (1990).
226. Kolaczkowska, E., Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 13, 159 (2013).
227. Koenen, R.R., Von Hundelshausen, P., Nesmelova, I.V., Zerneck, A., Liehn, E.A., Sarabi, A., Kramp, B.K., Piccinini, A.M., Paludan, S.R., Kowalska, M.A. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nature medicine* 15, 97 (2009).

228. Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett-Brown, M.A., Grant, J.A. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *The Journal of Immunology* 150, 3442-3448 (1993).
229. Sriramarao, P., DiScipio, R.G., Cobb, R.R., Cybulsky, M., Stachnick, G., Castaneda, D., Elices, M., Broide, D.H. VCAM-1 is more effective than MAdCAM-1 in supporting eosinophil rolling under conditions of shear flow. *Blood* 95, 592-601 (2000).
230. Johnson, R.C., Mayadas, T.N., Frenette, P.S., Mebius, R.E., Subramaniam, M., Lacasce, A., Hynes, R.O., Wagner, D.D. Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood* 86, 1106-1114 (1995).
231. von Bruhl, M.L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., Byrne, R.A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Echtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K.T., Wagner, D.D., Mackman, N., Engelmann, B., Massberg, S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 209, 819-835 (2012).
232. Soderstrom, A.C., Nybo, M., Nielsen, C., Vinholt, P.J. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 54, 1913-1920 (2016).
233. Hagberg, I.A., Akkok, C.A., Lyberg, T., Kjeldsen-Kragh, J. Apheresis-induced platelet activation: comparison of three types of cell separators. *Transfusion* 40, 182-192 (2000).
234. Nair, P.M., Pidcoke, H.F., Cap, A.P., Ramasubramanian, A.K. Effect of cold storage on shear-induced platelet aggregation and clot strength. *The journal of trauma and acute care surgery* 77, S88-93 (2014).
235. Schweizer, R., Welmers, B., Raaijmakers, J., Zanen, P., Lammers, J., Koenderman, L. RANTES- and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils: effects of priming with interleukin-5. *Blood* 83, 3697-3704 (1994).
236. Wardlaw, A.J., Moqbel, R., Cromwell, O., Kay, A.B. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *The Journal of Clinical Investigation* 78, 1701-1706 (1986).
237. Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., Schall, T.J., Dahinden, C.A. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med* 176, 1489-1495 (1992).
238. Jawien, J., Chlopicki, S., Gryglewski, R.J. Interactions between human platelets and eosinophils are mediated by selectin-P. *Pol J Pharmacol* 54, 157-160 (2002).
239. Johansson, M.W., Mosher, D.F. Activation of beta1 integrins on blood eosinophils by P-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 889-897 (2011).

240. Desreumaux, P., Janin, A., Dubucquoi, S., Copin, M.C., Torpier, G., Capron, A., Capron, M., Prin, L. Synthesis of interleukin-5 by activated eosinophils in patients with eosinophilic heart diseases. *Blood* 82, 1553-1560 (1993).
241. Sanderson, C. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109 (1992).
242. Dubucquoi, S., Desreumaux, P., Janin, A., Klein, O., Goldman, M., Tavernier, J., Capron, A., Capron, M. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *Journal of Experimental Medicine* 179, 703-708 (1994).
243. Sano, H., Nakagawa, N., Nakajima, H., Yoshida, S., Iwamoto, I. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in selective eosinophil migration across vascular endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 533-540 (1995).
244. Miike, S., McWilliam, A.S., Kita, H. Trypsin Induces Activation and Inflammatory Mediator Release from Human Eosinophils Through Protease-Activated Receptor-2. *The Journal of Immunology* 167, 6615-6622 (2001).
245. Kawabata, A., Kuroda, R., Nakaya, Y., Kawai, K., Nishikawa, H., Kawao, N. Factor Xa-evoked relaxation in rat aorta: involvement of PAR-2. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 432-435 (2001).
246. Kano, G., Almanan, M., Bochner, B.S., Zimmermann, N. Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation. *J Allergy Clin Immunol* 132, 437-445 (2013).
247. Maziero, A.M., Lorenzetti, R., Donato, J.L., Lilla, S., De Nucci, G. Inhibition of human platelet aggregation by eosinophils. *Life Sciences* 93, 416-422 (2013).
248. Esmon, C.T. The Protein C Pathway. *CHEST* 124, 26S-32S.
249. Heeb, M., Espana, F., Geiger, M., Collen, D., Stump, D.a., Griffin, J. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *Journal of Biological Chemistry* 262, 15813-15816 (1987).
250. Scully, M., Toh, C., Hoogendoorn, H., Manuel, R., Nesheim, M., Solymoss, S., Giles, A. Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis and haemostasis* 69, 448-453 (1993).
251. Abu-Ghazaleh, R.I., Gleich, G.J., Prendergast, F.G. Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: A mechanism for toxicity. *The Journal of Membrane Biology* 128, 153-164 (1992).
252. Jacoby, D.B., Gleich, G.J., Fryer, A.D. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *Journal of Clinical Investigation* 91, 1314-1318 (1993).

253. Merkofer, M., Kissner, R., Hider, R.C., Brunk, U.T., Koppenol, W.H. Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics. *Chem Res Toxicol* 19, 1263-1269 (2006).

X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

-/-	Heterozygoter Knockout
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
Ae.	Arteriae
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	aktiviertes Protein C
ATP	Adenosintriphosphat
CaM	Kalzium bindendes Protein Calmodulin
CCL	Chemokine (C-C-motif) ligand
CLC/GI-10	Charcot-Leyden Christal Protein/Galectin-10
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung
DCF	2,7 Dichlorfluoreszin
EC	Endothelzelle
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDNT	Eosinophil-derived Neurotoxin
EET	Eosinophil Extracellular Trap
ELISA	Enzyme-linked-Immunoabsorbent-Assay
EPRC	Endothelial Protein C Receptor
EPX	Eosinophil Peroxidase
ET-1	Endothelin
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
fl	flox
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	Green fluorescent protein
GP IIb-IIIa	Glykoproteins α _{IIb} β ₃
HCL	Salzsäure

ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
IVC	Individually Ventilated Cabinet
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
ko	Gen-Knockout
LDL	Low-density Lipoprotein
M	Molare Masse
MBP	Major Basic Protein
mEAR	Mouse Eosinophil Associated Ribonuclease
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NO	Stickoxid
PAR	Protease Activated Receptor
PBA	Phosphate buffered saline
PF-4	Platelet Factor 4
PFA	Paraformaldehyd
PGI ₂	Prostazyklin
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rounds per minute
SD	Standardabweichung
SMC	Glatte Muskelzelle

SPF	Spezifisch Pathogenfreie Bedingungen
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
uPA	Urokinase-like Plasminogen Activator
V.	Vena
VAA	Vollständige Antagonisierbare Anästhesie
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
VWF	Von Willebrand Faktor
wt	Wildtyp
x g	Vielfache der Normalfallbeschleunigung

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematischer Verlauf der Hämostase.....	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Prozesse während einer arteriosklerotisch bedingter Endothelverletzung.....	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der eosinophilen Granulozyten und ihrer multifunktionalen Effektormechanismen	21
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Siglec-8 vermittelten Apoptose von IL-5 behandelten eosinophilen Granulozyten	28
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des FeCl ₃ -Modells	41
Abbildung 6:	Dichte der menschlichen Blutzellen und Aufreinigung mittels Dichtegradienten	48
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Isolation der eosinophilen Granulozyten im magnetischen Feld.....	49
Abbildung 8:	Herstellung der Standardreihe des IL-5-ELISAs	53
Abbildung 9:	Herstellung der Standardreihe des APC-ELISAs	55
Abbildung 10:	Okklusionszeit der ApoE ^{-/-} x ΔdblGATA1- -Gruppe	65
Abbildung 11:	Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten im Zeitverlauf ...	66
Abbildung 12:	Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten 5 min nach FeCl ₃ -Verletzung.....	67
Abbildung 13:	Aktivierung der eosinophilen Granulozyten <i>in vivo</i> durch einen Thrombozyten.....	69
Abbildung 14:	Stärke des Kalziumsignals im Zeitverlauf	70
Abbildung 15:	Okklusionszeit der Selp-Gruppe	70
Abbildung 16:	Histologische Untersuchung des Thrombus (Selp).....	71
Abbildung 17:	Okklusionszeit der EPX-Gruppe	73
Abbildung 18:	Okklusionszeit der MBP-Gruppe	74
Abbildung 19:	Thrombus im Zeitverlauf bei einer Wildtyp-Maus	75
Abbildung 20:	Thrombus im Zeitverlauf bei einer MBP ^{-/-} -Maus	75
Abbildung 21:	APC-Konzentration nach FeCl ₃ -Verletzung (MBP)	76
Abbildung 22:	Okklusionszeit von Mäusen behandelt mit Siglec-F	77
Abbildung 23:	Histologische Untersuchung des Thrombus (Siglec-F)	78
Abbildung 24:	Anzahl der Leukozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien.....	80

Abbildung 25:	Thrombozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien.....	81
Abbildung 26:	Anzahl der Granulozyten im Blut der unterschiedlichen Mauslinien.....	83
Abbildung 27:	Eosinophile Granulozyten im Blutbild ausgewählter Mauslinien.....	85
Abbildung 28:	IL-5-Konzentration nach Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten	87
Abbildung 29:	Eosinophile Granulozyten mit EETs.....	89
Abbildung 30:	EET-Bildung nach Interaktion zwischen Eosinophilen und Thrombozyten	90
Abbildung 31:	Interaktion zwischen humanen Thrombozyten, EETs und MBP91	
Abbildung 32:	IL-5-Sekretion nach Inhibition mit Antikörpern.....	93
Abbildung 33:	EET-Bildung nach Inhibition mit Antikörpern	94

XII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Übersicht der Versuchsgruppen	30
Tabelle 2:	ApoE x Δ dblGATA1-Tiere ohne Apolipoprotein E, sowie mit oder ohne eosinophile Granulozyten	58
Tabelle 3:	Mausgruppen mit oder ohne P-Selektin	58
Tabelle 4:	MBP-Tiere mit oder ohne Major Basic Protein	58
Tabelle 5:	EPX-Tiere mit oder ohne Eosinophil Peroxidase	59
Tabelle 6:	C57BL/6J-Tiere behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper oder mit Rat IgG-Antikörper	59
Tabelle 7:	Mausgruppe mit oder ohne P-Selektin	59
Tabelle 8:	C57BL/6J-Tiere behandelt mit anti-Siglec-F-Antikörper oder mit Rat IgG-Antikörper	59
Tabelle 9:	MBP-Tiere mit oder ohne Major Basic Protein	60
Tabelle 10:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten oder mit ruhenden Plättchen	60
Tabelle 11:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Thrombin	60
Tabelle 12:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Überstand aktivierter Plättchen	60
Tabelle 13:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne P-Selektin-Antikörper	60
Tabelle 14:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne CCL5-Antikörper	61
Tabelle 15:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit und ohne Siglec-F-Antikörper	61
Tabelle 16:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten oder mit ruhenden Plättchen	61
Tabelle 17:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Thrombin	61
Tabelle 18:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen oder mit Überstand aktivierter Plättchen	62
Tabelle 19:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne P-Selektin-Antikörper	62

Tabelle 20:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne CCL5-Antikörper.....	62
Tabelle 21:	Eosinophile Granulozyten inkubiert mit aktivierten Plättchen mit oder ohne Siglec-F-Antikörper.....	62
Tabelle 22:	Geforderte Mindestabweichung.....	64
Tabelle 23:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der ApoE ^{-/-} x ΔdblGATA1-Gruppe).....	66
Tabelle 24:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der Selp-Gruppe)	71
Tabelle 25:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Thromben der Selp-Gruppe).....	72
Tabelle 26:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der EPX-Gruppe).....	73
Tabelle 27:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der MBP-Gruppe)	74
Tabelle 28:	Zusammenfassung der statistischen Größen (APC-ELISA).....	76
Tabelle 29:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Okklusionszeit der Siglec-F-Gruppe).....	78
Tabelle 30:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Thromben der Siglec-F-Gruppe).....	79
Tabelle 31:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl der Leukozyten im Blut (K/μl)).....	81
Tabelle 32:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl der Thrombozyten im Blut (K/μl)).....	83
Tabelle 33:	Zusammenfassung der statistischen Größen (Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut (K/μl)).....	86
Tabelle 34:	Zusammenfassung der statistischen Größen (IL-5-ELISA).....	88
Tabelle 35:	Zusammenfassung der statistischen Größen (EET-Bildung).....	90
Tabelle 36:	Zusammenfassung der statistischen Größen (IL-5-ELISA).....	94
Tabelle 37	Zusammenfassung der statistischen Größen der (EET-Bildung)..	95

XIII. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe in einem hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld anfertigen zu dürfen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für die Übernahmen, die Durchsicht und die Einreichung dieser Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät. Desweiteren möchte ich mich an dieser Stelle für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. med. Julia Novotny und Herrn Dr.med. Konstantin Stark bedanken. Besonders erwähnen möchte ich, dass Herr Dr. Stark durch seine umsichtige Führung und durch seinen eigenen Enthusiasmus für die Wissenschaft eine inspirierende und motivierende Atmosphäre schafft. Diese trug ebenso wie seine konstruktiven Ideen und Ratschläge zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Das freundschaftliche Klima in der Arbeitsgruppe Massberg hat mir während der gesamten Dauer dieser Arbeit sehr geholfen. Aus diesem Grund möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, für die Hilfe und Unterstützung in den verschiedensten Bereichen. An dieser Stelle möchte ich Dr. Meike Miller, Dr. Gerhild Rosenberger, Dr. Ronja Schuchert, Kami Pekayavaz, Sven Stockhausen, Michael Lorenz und Dr. Susanne Sauer hervorheben.

Dem SFB 914 sowie dem Graduiertenprogramm IRTG 914 gilt mein Dank zum einen für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums, zum anderen möchte ich mich für die wissenschaftliche Ausbildung und Austausch bedanken, die durch Vorträge, Konferenzen und Fortbildungen gewährleistet wurden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner gesamten Familie, deren Zusammenhalt und Unterstützung mir den Rückhalt geben, mich neuen Herausforderungen zu stellen.

Dieser Dank gilt ebenso meinen Freunden, besonders Isabella Lorenzini, Stefan Hörömpö, Angi Schug und Lena Pfaff, die mir in der Ferne eine Familie geworden sind.

Zuletzt möchte ich mich bei Simon Früh bedanken, der immer für mich da ist, egal wo er ist.