

**Der Effekt von thymic stromal lymphopoietin auf die
Atherogenese in Apolipoprotein E-defizienten
Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Lena Maria Schmitt, geb. Weiß

aus Plettenberg

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer
2. Gutachterin: Prof. Veronika Lukacz-Kornek

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.04.2023

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für Innere Medizin –
Kardiologie/Angiologie/Pneumologie/Internistische Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung	9
1.1 Einführung in die Thematik.....	9
1.2 Ein historischer Einblick in die Erforschung der Atherosklerose.....	10
1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Atherogenese	11
1.3.1 Monozyten und Makrophagen.....	13
1.3.2 T-Zellen.....	15
1.3.2.1 CD4 ⁺ T-Zellen	15
1.3.2.2 CD8 ⁺ T-Zellen	17
1.3.3 B-Zellen	17
1.4 Thymic stromal lymphopoietin.....	18
1.5 Aktueller Stand der Forschung in der Prävention der Atherosklerose.....	19
1.6 Eigenes Forschungsvorhaben.....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Versuchstiere.....	23
2.1.1 ApoE-defiziente Mäuse	23
2.1.2 TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse.....	23
2.1.3 Organentnahme.....	24
2.1.4 Histologie der atherosklerotischen Plaques	24
2.1.4.1 Ölrot-Färbung	24
2.1.4.2 Monozyten-Makrophagen-Färbung.....	25
2.1.5 Durchflusszytometrie	26
2.2 Statistik	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 TSLP-Behandlung bei älteren ApoE-defizienten Mäusen.....	28

3.2 TSLP-Behandlung bei jüngeren ApoE-defizienten Mäusen.....	36
3.3 TSLP-Behandlung bei TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen	44
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	60
6. Abbildungsverzeichnis.....	62
7. Tabellenverzeichnis.....	63
8. Literaturverzeichnis	64
9. Danksagung.....	85

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua dest.	Aqua destillata
Breg	Regulatorische B-Zelle
CD	Cluster of differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvant
E-Selektin	Endothel-Selektin
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HIV	Human immunodeficiency virus
hsCRP	Hoch-sensitives C-reaktives Protein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
ko	Knockout
LDL	Low density Lipoprotein
LDLR	Low density Lipoprotein Rezeptor
Lp-PLA2	Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor

MTX	Methotrexat
OSE	Oxygen specific epitope
oxLDL	Oxidiertes low density Lipoprotein
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Pattern recognition Receptor
P-Selektin	Platelet selectin, Thrombozyten-Selektin
P38 MAPK	P38-mitogenaktivierte Proteinkinase
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM	Standard error of mean
TCR	T Cell Receptor
Th 1/2	T-Helfer-Zelle 1/2
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like Receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
TSLPR	Thymic stromal lymphopietin Receptor
WHO	World Health Organization
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very low-density Lipoprotein

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Trotz jahrzehntelanger intensiver Bemühungen in der Erforschung, der Prävention und der Behandlung sind die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen unverändert die weltweit häufigste Todesursache (WHO, 2015). Bei den wesentlichen Folgeerkrankungen der Atherosklerose handelt es sich um Herzinfarkte, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Schlaganfälle (Kröger, 2016). Auch in Deutschland stellen atherosklerotische Folgeerkrankungen bei beiden Geschlechtern einen Großteil der Todesursachen dar. Zudem verursachten Erkrankungen des Herzkreislaufsystems in Deutschland im Jahr 2015 Kosten in Höhe von über 46 Milliarden Euro und waren ursächlich für rund 14 % der vollstationären Krankenhausentlassungen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019). Somit stellen die Atherosklerose und ihre Folgen nicht nur ein großes gesundheitliches Risiko für jedes einzelne betroffene Individuum dar, sondern auch einen erheblichen Belastungsfaktor für die Gesamtgesellschaft.

Während noch in der Mitte des 20. Jahrhunderts Herz-Kreislauserkrankungen als unvermeidliches Schicksal galten, sind heute die Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose gut erforscht (Mahmood et al., 2014). Einige Risikofaktoren wie Übergewicht, arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie (Dawber, 1957; Dawber TR, Moore FE, Mann GV, 1957; Yusuf et al., 2004) sowie Rauchen (Doll et al., 2004; Reid; Teo et al., 2006) sind mittlerweile gut belegt. Die primäre Prävention, also das Verhindern der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen, zielte bis vor wenigen Jahren auf die Reduktion der oben genannten Risikofaktoren ab (Arnett et al., 2019). In den letzten Jahren kristallisierte sich die Rolle der chronischen Entzündungsreaktion, die zur Entstehung der Atherosklerose beiträgt, immer mehr heraus, wie zum Beispiel Soehnlein und Libby in ihrem Review-Artikel aus dem Jahr 2021 darlegen (Soehnlein und Libby, 2021). Durch die neuen Erkenntnisse ergaben sich auch neue wegweisende Ansatzpunkte in der Prävention der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen. So konnte zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen erhöhten Werten des Entzündungsmarkers hoch-sensitives C-reaktives Protein (hsCRP) und dem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse gefunden werden (Ridker et al., 1997; Ridker et al., 2000).

Auch Behandlungsansätze bereits bestehender atherosklerotischer Veränderungen ergaben sich aus den Forschungsarbeiten der letzten Jahre. Mit Canakinumab, einem anti-IL-1 β -Antikörper, erforschten Ridker et al. 2017 einen Behandlungsansatz für Patienten mit Myokardinfarkt und erhöhtem hs-CRP (Ridker et al., 2017a). Hierdurch konnten erneute kardiovaskuläre Ereignisse bei den mit Canakinumab behandelten Patienten signifikant reduziert werden. Auch die Behandlung mit Colchicin, einem seit vielen Jahren bekannten Wirkstoff, zeigte in verschiedenen klinischen Studien einen positiven Effekt auf die Wiederholung kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten im Zustand nach Myokardinfarkt (Nidorf et al., 2020; Tardif et al., 2019). Durch diese und viele weitere Forschungsschwerpunkte der letzten Jahrzehnte zeigt sich, dass es sich bei der Atherosklerose um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt.

1.2 Ein historischer Einblick in die Erforschung der Atherosklerose

Bereits 1856 postulierte Rudolf Virchow einen Zusammenhang zwischen Verletzungen des Gefäßendothels und der Entstehung von „fettigen Metamorphosen“, Atheromen und Verkalkung der Gefäße (Virchow, 1856). Im Jahr 1973 beschrieb Russel Ross die Atherosklerose als fokale Verdickung der Arterienwände in Verbindung mit fettigen Ablagerungen. Vor allem die Aorta sowie die iliakalen, femoralen, koronaren und zerebralen Arterien seien von diesen Veränderungen betroffen, bei denen es im Bereich der Gefäßintima zunächst zur Entwicklung von sogenannten „fatty streaks“ komme. Im Verlauf käme es zur Ausbildung von fibrösen Plaques und schlussendlich zu komplizierten Läsionen, die durch Einblutungen, Kalzifikationen und Zellnekrosen gekennzeichnet seien (Ross und Glomset, 1973). Er prägt in der Beschreibung der Pathogenese die Theorie eines „response to injury“ als Ursache der atherosklerotischen Veränderungen. Durch eine Verletzung des Endothels der Arterien (zum Beispiel durch die Scherkräfte des Blutflusses) komme es zu Interaktionen zwischen Thrombozyten, Plasmabestandteilen und dem Endothel. Dies führe letztendlich zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen der Intima (Ross et al., 1977). In den folgenden Jahren konnten Monozyten als Grundlage der sogenannten Schaumzellen, mit Lipiden gefüllten Zellen innerhalb der atherosklerotischen Gefäßveränderungen, identifiziert werden (Gerrity et al., 1979; Gerrity, 1981a, 1981b). Hiermit wurde die Grundlage für das heutzutage gängige Verständnis der Atherosklerose als immunologische Erkrankung gelegt. In den folgenden Jahrzehnten gewann die Hypothese eines „response to retention“ an Bedeutung. Hierbei wird die Einlagerung von Lipoproteinen und ihre anschließende

Oxidation als Schlüsselereignis in der Atherogenese beschrieben (Lipton et al., 1995; Skålén et al., 2002). Durch die Einführung immunhistochemischer Methoden konnte die zelluläre Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen aufgeschlüsselt werden. Hierdurch wurde die führende Rolle von Immunzellen, vor allem T-Lymphozyten und Makrophagen, an der Atherogenese deutlich (Jonasson et al., 1986).

1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Atherogenese

Seit der Entdeckung der bedeutenden Rolle des Immunsystems in der Entstehung der Atherosklerose wurde das Wissen um die genauen zellulären Abläufe immer tiefergehend untersucht und aufgeschlüsselt. In frühen atherosklerotischen Läsionen stellt, wie bereits beschrieben, die Akkumulation von Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteinen (z.B. VLDL, LDL, Chylomikronen) im subendothelialen Bereich einen initialen Schritt in der Atherogenese dar (Williams und Tabas, 1995). Durch die Ansammlung von Lipiden werden vaskuläre glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen zur Produktion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen angeregt (Bochkov et al., 2002; Drake et al., 1991). Diese Veränderungen stimulieren Endothelzellen zur Expression leukozytärer Adhäsionsmoleküle, wie z.B. E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Bevilacqua et al., 1987; Cybulsky und Gimbrone, 1991; Nakashima et al., 1998). Auch wird die Produktion von Monozyten anlockenden Chemokinen (z.B. MCP-1) initiiert, so dass es zu einer zunehmenden Infiltration von Monozyten in die sich ausbildende Läsion kommt (Aiello et al., 1999; Cushing et al., 1990). Unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF reifen die eingewanderten Monozyten zu Makrophagen. Die eingelagerten Lipoproteine werden durch verschiedene Oxidationsprozesse modifiziert (Carbamylierung, Acetylierung, Methylierung), wodurch sogenannte sauerstoffspezifische Epitope (oxygen-specific epitopes, OSEs) auf den oxidierten Lipoproteinen (z.B. oxidiertes low-density Lipoprotein, oxLDL) entstehen (Hazen und Heinecke, 1997; Palinski et al., 1989; Podrez et al., 1999). Diese wirken als pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) und werden von „pattern recognition receptors“ (PRRs) erkannt (Chang et al., 1999; Gillotte-Taylor et al., 2001). Diese Rezeptorklasse gehört zum angeborenen Immunsystem und dient der unmittelbaren und unspezifischen Immunabwehr. Hierzu gehören zum Beispiel Scavenger-Rezeptoren, die sich vor allem auf Makrophagen finden, und Toll-like-Rezeptoren, die auf dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden sind (Matsumoto

et al., 1990; Medzhitov et al., 1997). OxLDL können besser als natives LDL von Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen erkannt und schneller aufgenommen werden (Goldstein et al., 1979; Kunjathoor et al., 2002; Palinski et al., 1989). Nach Erkennen und Internalisieren von oxLDL differenzieren die Makrophagen zu Schaumzellen (Henriksen et al., 1981; Quinn et al., 1987). Über eine Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen führen oxLDLs zu einer Zunahme der Immunreaktion (Miller et al., 2005; Stewart et al., 2010). Diese TLR befinden sich zum Beispiel auf dendritischen Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen, welche die OxLDLs prozessieren und präsentieren, sodass es zur Ansammlung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in den frühen atherosklerotischen Plaques kommt (Sun et al., 2010). Auch verschiedene Unterarten von B-Lymphozyten modifizieren die immunologische Reaktion in der atherosklerotischen Läsion (Hilgendorf et al., 2014). Nachdem sich durch die Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten sowie die Bildung von Schaumzellen eine frühe Läsion gebildet hat, kommt es zur Ausschüttung multipler Mediatoren und Zytokine, wodurch das Wachstum von glatten Muskelzellen und die Produktion von Kollagen und Matrix-Metalloproteinasen angeregt wird (Amento et al., 1991). Im Verlauf der Plaques-Entwicklung bildet sich ein nekrotischer Kern, der durch die Apoptose und Nekrose glatter Muskelzellen, Makrophagen und Schaumzellen entsteht (Hegyi et al., 1996). Hierdurch werden Makrophagen zur Sekretion weiterer Zytokine angeregt, es kommt durch proteolytische Aktivität der Makrophagen zur Destabilisierung der Plaque und im Verlauf zur Plaqueruptur mit den möglichen Folgen einer Ischämie und den bereits beschriebenen, daraus folgenden Komplikationen (Myokardinfarkt, Schlaganfall, etc.) (Shah et al., 1995).

Die große Rolle des Immunsystems in der Entstehung der Atherosklerose zeigt sich auch durch das erhöhte Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit Störungen des Immunsystems. Dies ist vor allem bei Infektionskrankheiten wie HIV oder Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis beschrieben (Bernatsky et al., 2006; Holmqvist et al., 2010)

1.3.1 Monozyten und Makrophagen

Makrophagen, eine zentrale Figur des angeborenen Immunsystems, spielen eine große Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und deren Fortschreiten zu komplexen Plaques (Smith et al., 1995). In den letzten Jahrzehnten gab es in der Erforschung der Monozyten und Makrophagen, sowie deren Subklassen, große Fortschritte und neue Erkenntnisse (Lin et al., 2021). Monozyten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen und entwickeln sich zunächst im Knochenmark und in der Milz. Bereits kurz nach der Geburt wandern im Blut zirkulierende Monozyten ins Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen. Im Laufe des Lebens werden durch Oberflächenmoleküle des Endothels weitere Monozyten in die Gefäßintima gelockt und siedeln sich dort ebenfalls an. In der entstehenden atherosklerotischen Läsion proliferieren die Makrophagen, sodass sie im Verlauf die Mehrzahl der Immunzellen darstellen. Dies scheint von lokalen Umgebungsfaktoren gesteuert zu werden (Ensan et al., 2016; Robbins et al., 2013; Swirski et al., 2006). Monozyten gehören zum angeborenen Immunsystem und sind durch die Oberflächenmarker CD115 und CD11b gekennzeichnet.

Beim Menschen werden klassische Monozyten, nicht-klassische Monozyten und intermediäre Monozyten beschrieben, welche über die Expression verschiedener Oberflächenproteine (CD14, CD 16, etc.) unterschieden werden können. Sowohl für klassische ($CD14^{++} CD16^{-}$) als auch für intermediäre Monozyten ($CD14^{++} CD16^{+}$) werden proinflammatorische Effekte beschrieben (Berg et al., 2012; Rogacev et al., 2012). Auch die T-Zell-Antwort kann durch Monozyten beeinflusst und gesteuert werden (Evans et al., 2009). Im Mausmodell werden verschiedene monozytäre Subklassen unterschieden: Zum einen den klassischen Monozyten entsprechende $Ly6C^{high}$ -Monozyten, zum anderen $Ly6C^{low}$ -Monozyten (entsprechen den nicht-klassischen Monozyten) (Geissmann et al., 2003). Ziel aktueller Forschung sind weitere Subklassen, so zum Beispiel segregated-nucleus-containing atypical monocytes (SatM), die eine Rolle in der Entstehung von Fibrosen zu spielen scheinen (Sato et al., 2017) .

Generell wurden bislang vereinfacht zwei Unterarten von Makrophagen unterschieden, M1 und M2, wobei die Differenzierung in die Subtypen von der Konzentration von Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF) abhängig ist (Verreck et al., 2004). M-CSF findet sich vornehmlich in gesunden Arterien und initiiert die Differenzierung von M2-Makrophagen, wohingegen GM-CSF vermehrt in atherosklerotischen Läsionen zu

finden ist und die Entwicklung von M1-Makrophagen begünstigt (Smith et al., 1998). M1-Makrophagen entwickeln sich aus klassischen Monozyten und werden als proinflammatorisch eingestuft. Sie entstehen unter dem Einfluss von Th1-assoziierten Zytokinen wie TNF α und IFN- γ (Dalton et al., 1993; Ohta et al., 2005). Sie produzieren die Entzündungsreaktion fördernde radikale Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) ebenso wie proinflammatorische Chemokine und Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-13, IL-18 IL-23 und TGF- β (Devlin et al., 2002; Mallat et al., 2001a; Whitman et al., 2000; Whitman et al., 2002). M2-Makrophagen wiederum werden durch Th2-assoziierte Zytokine wie IL-4 und IL-13 stimuliert (Stein et al., 1992). Sie werden nach der aktuell verbreiteten Nomenklatur in vier Subklassen eingeteilt, denen, mit einer Ausnahme, antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. M2a-Makrophagen differenzieren unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13, sie sezernieren Fibronectin, IGF und TGF- β und tragen so zur Gewebereparatur bei (Gratchev et al., 2001; Lee et al., 2001). M2b-Makrophagen werden von Immunkomplexen und TLR-Liganden oder IL-1-Rezeptoragonisten angeregt, sie produzieren IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 und IL-12 (Anderson und Mosser, 2002). Durch die Expression dieser Zytokine nehmen sie eine proinflammatorische Funktion ein (Sutterwala et al., 1998). Unter dem Einfluss von Glukokortikoiden und IL-10 entstehen M2c-Makrophagen. Sie sind an der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt (Zizzo et al., 2012). Zur Differenzierung von M2d-Makrophagen führt die Ko-Stimulation von TLR- und A_{2A}-Rezeptoragonisten. Sie sezernieren vermehrt IL-10 und VEGF (Ferrante et al., 2013; Grinberg et al., 2009). Die Differenzierung der Makrophagen aus Monozyten wird auch durch oxLDL beeinflusst. Hierbei scheint der Oxidationsgrad der Lipoproteine eine Rolle zu spielen. Wenig oxidiertes LDL führt eher zu einer Ausprägung von M1-Makrophagen, während stark oxidiertes LDL eher zur Differenzierung von M2-Makrophagen führt (Seo et al., 2015). Ein weiterer Phänotyp sind die sogenannten Mox-Makrophagen. Diese entstehen als Reaktion auf oxidativen Schaden des Gewebes und können sich sowohl aus M1- als auch aus M2-Makrophagen entwickeln (Kadl et al., 2010). M4-Makrophagen werden durch das Thrombozyten-Chemokin CXCL4 aktiviert und scheinen mit einer erhöhten Instabilität der atherosklerotischen Plaques assoziiert zu sein, sie werden als proatherogen eingestuft (Gleissner et al., 2010). Schlussendlich werden noch M(Hb)-Makrophagen beschrieben, welche durch Hämolyse in den Plaques freiwerdendes Hämoglobin aufnehmen und daraufhin differenzieren (Landis et al., 2013).

Bereits zu Schaumzellen differenzierte Makrophagen weisen ein eher antiinflammatorisches Profil auf (da Silva et al., 2016). Dendritische Zellen steuern durch die Präsentation von Antigenen die Reifung und Differenzierung der T-Zellen (Maldonado-López et al., 1999)- Eine ausschlaggebende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen scheint hierbei oxLDL zu spielen (Frostegård et al., 1992).

1.3.2 T-Zellen

T-Zellen sind wesentlicher Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Sie identifizieren Antigene durch spezifische Oberflächen-Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (T-cell receptor, TCR). Alle T-Zellen exprimieren außerdem das Oberflächenmolekül CD3, sowie entweder CD4 oder CD8 und werden hierdurch unterschieden. CD4⁺ T-Zellen können zu verschiedenen spezialisierten T-Helfer-Zellen (Th1, Th2, Th17) sowie zu regulatorischen T-Zellen (Tregs) differenzieren. CD8⁺ T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen.

1.3.2.1 CD4⁺ T-Zellen

Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen werden verschiedene Subtypen beschrieben, die sich in ihrer Funktion unterscheiden.

Th1-Zellen:

Th1-Zellen wird eine verstärkende Wirkung auf die Atherogenese zugeschrieben (Elhage et al., 2003). Die Differenzierung von Th1-Zellen wird durch den IL-12-IL-18-T-bet-IFN- γ -Signalweg angeregt, der wiederum durch oxLDL stimuliert wird (Afkarian et al., 2002; Newton und Benedict, 2014; Stemme et al., 1995). Durch Th1-Zellen werden Zytokine wie IFN- γ und IL-2 produziert, diese haben einen steuernden Effekt auf die Einwanderung von Immunzellen in die atherosklerotische Läsion, sowie auf die Entstehung von Schaumzellen (Frostegård et al., 1999; Look et al., 1994; Whitman et al., 2000). Th1-Zellen sind in menschlichen atherosklerotischen Plaques der häufigste Subtyp der T-Zellen, ihre proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 und IFN- γ scheinen einen wesentlichen Anteil an der Atherogenese zu haben (Frostegård et al., 1999).

Th2-Zellen:

Die Ausbildung von Th2-Zellen wird durch IL-4 gefördert (Wurtz et al., 2004). Sie produzieren unter anderem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, wobei ihr Einfluss auf die Atherogenese nicht eindeutig geklärt ist. Für die Zytokine IL-4 und IL-5 werden sowohl protektive als auch atherogene Effekte beschrieben. IL-4 werden eher proatherogene Effekte zugeschrieben (Feng et al., 2000; King et al., 2002), wohingegen für IL-5 vor allem durch seine Funktion als Stimulator der Produktion von natürlichen Antikörpern durch B-Zellen protektive Effekte vermutet werden (Binder et al., 2004; Hörkkö et al., 1999). Insgesamt gibt es Hinweise für eine eher protektive Rolle der Th2-Zellen in der Atherogenese (Engelbertsen et al., 2013).

Th17-Zellen:

Die Rolle der Th17-Zellen in der Entwicklung der Atherosklerose ist aktuell nicht vollständig verstanden, dieser Zellpopulation können sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte zugeschrieben werden. Ihre Differenzierung wird durch IL-6 und TGF- β hervorgerufen und sie sezernieren IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-23. IL-17A konnte eine proinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden. Es sorgt zudem für eine Zunahme der Instabilität der Plaques (Erbel et al., 2009; Jovanovic et al., 1998; Smith et al., 2010). Auch Wang et al. schreiben Th17-Zellen einen proinflammatorischen Effekt zu. Die Autoren vermuten, dass Th17-Zellen einen aktivierenden Effekt auf die Mobilisation proinflammatorischer Zellen im Rahmen der Atherogenese haben (Wang et al., 2021). Antiinflammatorische Effekte wurden jedoch ebenso von verschiedenen Autoren beschrieben (Danzaki et al., 2012; Taleb et al., 2009). Taleb et al. fassen in ihrem Review-Artikel zusammen, dass die Rolle von Th17-Zellen und IL-17 mutmaßlich stark von Umgebungsfaktoren und den Zytokinproduzierenden Zellen abhängt. Eine erhöhte Ausschüttung von IL-17 in Kombination mit einer Reduktion von IL-10 und IFN- γ scheint mit erhöhter Plaque-Stabilität und verminderter Atherogenese einherzugehen. Die gleichzeitige Produktion in IL-17 und IFN- γ hingegen scheint einen proatherogenen Effekt zu haben (Taleb et al., 2015)

Regulatorische T-Zellen (Tregs):

Regulatorische T-Zellen (Tregs) haben eine moderierende Funktion im Immunsystem und sind verantwortlich für die Unterdrückung der Immunantwort. Sie produzieren TGF- β , IL-10 und IL-35, welche einen antiinflammatorischen Effekt haben. Hierdurch zeigen Tregs eine eher protektive Wirkung auf die Atherosklerose (Mallat et al., 2003;

Tao et al., 2016). Mor et al. beschreiben bei menschlichen Probanden eine reduzierte Anzahl an Tregs und IL-10 im peripheren Blut bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit und zu gesunden Probanden (Mor et al., 2006). Sie können auch die Differenzierung von M2-Makrophagen fördern sowie die Entwicklung von M1-Makrophagen inhibieren (Liu et al., 2011).

1.3.2.2 CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen finden sich seltener in atherosklerotischen Plaques, ihre Anzahl kann in fortgeschrittenen Läsionen jedoch deutlich zunehmen. Ihre Rolle in der Atherogenese ist noch umstritten. Es werden sowohl protektive als auch proatherogene Einflüsse beschrieben (Kyaw et al., 2013; van Duijn et al., 2019).

1.3.3 B-Zellen

Im Allgemeinen sind B-Zellen durch membrangebundene B-Zell-Rezeptoren gekennzeichnet. Über diese B-Zell-Rezeptoren werden die B-Zellen aktiviert und zur Produktion von Immunglobulinen angeregt. Atherosklerotische Läsionen enthalten nur wenige B-Zellen (Canducci et al., 2012; Zhou und Hansson, 1999), vielmehr finden sich vermehrt B-Zellen in der Umgebung der atherosklerotischen Plaques, wo sie lymphoide Formationen bilden und eine große Rolle bei der lokalen humoralen Immunantwort zu spielen scheinen (Houtkamp et al., 2001). Es werden verschiedenen Klassen von B-Lymphozyten beschrieben, welchen unterschiedliche Einflüsse auf die Atherogenese zugeschrieben werden. B2 B-Lymphozyten zum Beispiel produzieren alle Arten von Antikörpern (IgM, IgG, IgE, IgA), unter anderem gegen sogenannte oxidation-specific epitopes (OSEs) (Ylä-Herttuala et al., 1994). Diese OSEs entstehen bei der Oxidation von LDL oder beim apoptotischen Zelltod (Chou et al., 2009). B2-Lymphozyten werden als proatherogen eingestuft (Kyaw et al., 2010). Daneben existiert eine weitere Form der B-Zellen, die B1-Zellen, welche unabhängig von T-Zellen agieren (Choi et al., 2012). Zu dieser Untergruppe gehören auch die B1a-Zellen, die unspezifische natürliche IgM Antikörper produzieren und als atheroprotektiv gelten (Kyaw et al., 2011). Auch diese unspezifischen IgM Antikörper richten sich teilweise gegen OSEs. Diese Anti-OSE-Antikörper werden für einen protektiven Effekt verantwortlich gemacht, indem sie die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen verringern und die Anhäufung apoptotischer Zellen limitieren (Hörkkö et al., 1999; Lewis et al., 2009). Zudem werden noch B1b-Zellen unterschieden, welche ebenfalls OSE-spezifische IgM-Antikörper produzieren können und sich ebenfalls

atheroprotektiv auswirken (Rosenfeld et al., 2015). Eine weitere Form der B-Zellen sind die sogenannten regulatorischen B-Zellen (Bregs). Diese wirken IL-10 vermittelt atheroprotektiv (Strom et al., 2015).

1.4 Thymic stromal lymphopoietin

Bei Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) handelt es sich um ein dem IL-7 strukturell ähnliches Zytokin. Gebildet wird TSLP unter anderem von Epithelzellen in Thymus, Lunge, Darm und Tonsillen, sowie von Stromazellen und Mastzellen (Rimoldi et al., 2005; Soumelis et al., 2002). Der TSLP-Rezeptor findet sich auf dendritischen Zellen, T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen, Natürlichen Killer-Zellen, Monozyten sowie in Herz, Skelettmuskulatur, Leber und Nieren (Park et al., 2000; Reche et al., 2001). Durch TSLP werden dendritische Zellen aktiviert und eine Th2-Zell-Antwort induziert (Ito et al., 2005; Reche et al., 2001; Soumelis et al., 2002). Durch die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 wird auf diesem Weg eine Makrophagen-Differenzierung in Richtung antiinflammatorischer, antiatherogener M2-Makrophagen initiiert (Han et al., 2013).

Auch eine direkte Wirkung von TSLP auf CD4⁺ T-Zellen konnte nachgewiesen werden. Sie differenzierten nach Stimulation mit TSLP in Abwesenheit von exogenem IL-4 oder Antigenpräsentierenden Zellen zu Th2-Zellen (Omori und Ziegler, 2007). TSLP nimmt auch Einfluss auf die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Lee et al., 2008). Bei den B-Lymphozyten scheint TSLP die Differenzierung zu IgM⁺ B-Zellen zu fördern (Levin et al., 1999).

Die Rolle von TSLP auf das Immunsystem wurde in den letzten Jahren vor allem im Zusammenhang mit Allergien und Erkrankungen des atopischen Formenkreises untersucht. Diesbezüglich wurden in der Vergangenheit auch Behandlungsansätze mit Hilfe von TSLP untersucht. Hierbei wurde TSLP als Adjuvans für nasale Impfungen eingesetzt (van Roey et al., 2012). Doch auch auf die Atherogenese scheint TSLP Einfluss zu nehmen. Yu et al. zeigten 2013, dass TSLP durch eine erhöhte immunologische Toleranz einen atheroprotektiven Effekt aufweist. In dieser Studie wurde sechs Wochen alten ApoE^{-/-}-Mäusen TSLP subkutan injiziert. Die so behandelten Mäuse wiesen in der Folge signifikant weniger atherosklerotische Plaques der Aortenwurzel auf als die Vergleichsgruppe. Der atheroprotektive Effekt wurde einer Herunterregulation des Immunsystems zugeschrieben (Yu et al., 2013). Jedoch wird auch ein gegenteiliger, proatherogener Effekt von TSLP beschrieben. So

erforschten Wu et al. 2014 die Entwicklung atherosklerotischer Plaques in TSLPR/ApoE Doppelknockout-Mäusen und fanden hierbei Hinweise auf eine Reduktion der Plaquelast bei diesen Tieren (Wu et al., 2014).

Der TSLP-Rezeptor findet sich auch auf menschlichen Thrombozyten, wodurch es durch TSLP zu einer Thrombozyten-Aktivierung kommen kann. Wang et al. fanden heraus, dass eine höhere Expression des TSLP-Rezeptors auf Thrombozyten bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms einhergehen könnte. Die Autoren schreiben TSLP und dem TSLPR/TSLP-Signalweg somit einen proatherogenen Effekt zu (Wang et al., 2013). Auch andere Studien schreiben TSLP einen atherogenen Effekt zu. So konnte nachgewiesen werden, dass TSLP durch Angiotensin II und somit durch Hypertonie induziert wird und seinerseits durch Aktivierung der Th17-Immunantwort die Atherogenese fördert (Zhao et al., 2012).

Untersucht wurde auch der Einfluss von TSLP auf Endothelzellen. Peng et al. zeigten, dass bei Patienten mit atherosklerotischen Läsionen weniger HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) in Endothelzellen exprimiert wird. HOTAIR wird eine protektive Wirkung für endotheliale Verletzungen, wie sie im Rahmen der Atherogenese eine Rolle spielen, zugeschrieben. Die Autoren fanden heraus, dass TSLP die Transkription von HOTAIR unterstützt. Zudem fanden sie einen erniedrigten TSLP-Spiegel bei Patienten mit Atherosklerose. Durch die Autoren wird TSLP daher eine protektive Wirkung vor Atherosklerose zugeschrieben (Peng et al., 2017).

1.5 Aktueller Stand der Forschung in der Prävention der Atherosklerose

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit verschiedenen immunmodulatorischen Ansätzen zur Prävention der Atherosklerose. Diese ergeben sich aus den Erkenntnissen der letzten Jahre, dass einige Immunzellen einen eher atheroprotektiven Effekt aufweisen (Tregs, Bregs, M2-Makrophagen, dendritische Zellen), wohingegen andere Gruppen von Immunzellen proatherogen wirken (einige Makrophagen-Subgruppen, Th1-Zellen, B2-Zellen). Für andere Zelltypen bleibt die wesentliche Funktion unklar und bietet Anlass für weitere Forschung (CD8⁺ T-Zellen, Th2-Zellen, Th17-Zellen, B1-Zellen). In der 2017 veröffentlichten CANTOS-Studie untersuchten Ridker et al. beispielsweise den Effekt von subkutan appliziertem Canakinumab, einem monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β , auf Patienten mit vorangegangenem Myokardinfarkt und erhöhten Blutwerten für hs-CRP. Hier zeigte

sich eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zur mit Placebo behandelten Gruppe. Jedoch konnte während der Behandlung mit Canakinumab auch eine höhere Inzidenz für Infektionen und Sepsen beobachtet werden (Ridker et al., 2017a). In verschiedenen Studien mit Antikörpern (Evolocumab, Bococizumab) gegen proprotein convertase subtilisin–kexin type 9 (PCSK9) ließen sich verringerte Spiegel von LDL-Cholesterol und ein reduziertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nachweisen (Ridker et al., 2017b; Sabatine et al., 2017). Für den Einsatz von niedrig-dosiertem Methotrexat (MTX) konnte in der CIRT-Studie kein Effekt gefunden werden (Ridker et al., 2019). Auch andere Therapieansätze konnten sich in klinischen Studien nicht beweisen. In der STABILITY-Studie wurde 2014 zum Beispiel der Effekt von Darapladip, einem spezifischen Inhibitor der Lipoprotein-assoziierten Phospholipase A2 (Lp-PLA2), auf Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit untersucht. Für diese Therapie ließ sich kein signifikanter Effekt nachweisen (White et al., 2014). Losmapimod, ein Inhibitor der p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), zeigte in einer klinischen Studie ebenfalls keinen Vorteil bezüglich der Reduktion kardiovaskulärer Risiken (O'Donoghue et al., 2016). Auf Grundlage der Idee der Reduktion chronisch entzündlicher Veränderungen im Rahmen der Atherosklerose erfolgte in den letzten Jahren auch die Erforschung des Effekts von Colchicin bei Patienten mit chronischer koronarer Herzkrankheit. Bei Colchicin handelt es sich um ein seit vielen Jahrhunderten medizinisch bekanntes Alkaloid der Herbstzeitlosen, welches in den letzten Jahren vor allem Einsatz in der Behandlung der Gicht fand. In verschiedenen Studien (LoDoCo, COLCOT, LoDoCo2) wurden Patienten nach einem Herzinfarkt mit niedrig dosiertem Colchicin behandelt. Hierbei konnten positive Effekte auf das erneute Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse nachgewiesen werden (Nidorf et al., 2020; Tardif et al., 2019).

Auch die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques war Ziel der Erforschung präventiver Behandlungsansätze. Zimmer et al. zeigten, dass eine Herabregulation der Bildung von ROS durch Inhibition von Rac1 GTPase zu einer Reduktion atherosklerotischer Plaques bei ApoE-defizienten Mäusen führte (Zimmer et al., 2021). Weitere Forschung auf diesem Gebiet könnte auch hier zu neuen Therapiemöglichkeiten führen.

Generell standen Immunisierungsstrategien in den letzten Jahren im Fokus der Forschung. Nettersheim et. al. beschreiben in Ihrem Review verschiedene Modelle von

Impfungen gegen Atherosklerose (Nettersheim et al., 2020). So befindet sich zum Beispiel zusätzlich zu den bereits beschriebenen Antikörpern gegen PCSK9 auch eine anti-PCSK9-Impfung in der Erprobung. PCSK9 bindet an den LDL-Rezeptor und führt zu dessen Abbau, sodass eine Hemmung von PCSK9 zu einer verbesserten Verfügbarkeit der LDL-Rezeptoren und zu einem vermehrten Abbau von LDL aus dem Blut führen soll. In tierexperimentellen Studien konnte eine langanhaltende Produktion von anti-PCSK9-Antikörpern, ein erhöhtes Maß an LDL-Rezeptoren und ein erniedrigter VLDL-Spiegel erreicht werden (Galabova et al., 2014; Kawakami et al., 2018). Landlinger et al. konnten zusätzlich auch eine Reduktion der Größe der atherosklerotischen Läsionen nachweisen (Landlinger et al., 2017). Ein weiterer, in tierexperimentellen Studien erforschter Ansatz waren Impfungen mit oxLDL bzw. oxLDL ausgesetzten dendritischen Zellen. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der atherosklerotischen Läsionen in LDLR^{-/-}-Mäusen (Habets et al., 2010). Hermansson et al. fanden ebenfalls einen atheroprotektiven Effekt für die Behandlung mit oxLDL (Hermansson et al., 2010). Im Rahmen der verschiedenen Studien zu Impfstrategien gegen Atherosklerose zeigte sich zudem, dass allein die Injektion von Adjuvantien, z.B. Freund's Adjuvans, bereits einen positiven Effekt auf die Atherogenese zu haben scheint und bereits zu einer Reduktion der Plaquelast führen kann. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur bei ApoE-defizienten Mäusen, nicht bei CD4⁺/ApoE-Doppelknockout-Tieren. Die Autoren schlossen daher darauf, dass der atheroprotektive Effekt der Injektion der Adjuvantien CD4⁺-vermittelt sein könnte (Zhou et al., 2005).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von TSLP bei der Injektion von Freund's Adjuvans auf die Atherogenese bei ApoE-defizienten Mäusen untersucht. Hierfür wurden ApoE-defiziente und TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse mit komplettem Freund's Adjuvans (CFA), inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) oder Placebo subkutan behandelt. Bei den mit CFA oder IFA behandelten, ApoE-defizienten Tieren konnte eine Reduktion der atherosklerotischen Plaques beobachtet werden, während sich bei den gleichsam behandelten TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen kein Effekt fand. Nach der subkutanen Injektion von CFA kam es zu einem raschen Anstieg von TSLP im umgebenden Gewebe. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Immunomodulation mittels Freund's Adjuvans TSLP eine Rolle spielen könnte sowie der TSLPR/TSLP-Signalweg von Bedeutung ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass der TSLPR/TSLP-Signalweg durch die Induktion einer Th2-

Immunantwort nach Injektion von Freund's Adjuvans einen atheroprotektiven Effekt aufweist (Steinmetz et al., 2020).

1.6 Eigenes Forschungsvorhaben

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkung von TSLP auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques prospektiv zu untersuchen. Vor dem Hintergrund der gesellschaftlichen und individualpersönlichen Relevanz atherosklerotischer Folgeerkrankungen soll diese Dissertation langfristig einen Beitrag zur Prävention der Atherosklerose leisten. Um dies zu erreichen, wurden tierexperimentelle Untersuchungen am Mausmodell durchgeführt. Diese zielten darauf, aufzuzeigen, inwiefern TSLP einen Einfluss auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques hat oder ob TSLP sogar einen Rückgang bereits bestehender atherosklerotischer Veränderungen bewirken kann. Hierfür wurden ApoE-defiziente und TSLPR/ApoE-defiziente männliche Mäuse verschiedener Altersstufen mit TSLP oder Placebo behandelt und der Effekt auf die Atherogenese beobachtet.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Mausexperimente wurden gemäß den EU-Richtlinien für Tierversuche durchgeführt (Tierversuchsnummer: 84–2.04.2013.A197). Es wurden maximal fünf Tiere pro Käfig bei 22 °C Raumtemperatur in einem 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum. Es erfolgten insgesamt drei mausexperimentelle Versuchsreihen mit unterschiedlichen Versuchsaufbauten.

2.1.1 ApoE-defiziente Mäuse

Bei sämtlichen Versuchstieren dieser Mausexperimente handelte es sich um ApoE-defiziente Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund (Charles River Laboratories, Wilmington, USA). In verschiedenen Versuchsaufbauten wurden die Mäuse unterschiedlichen Behandlungen unterzogen.

Eine Gruppe männlicher, ApoE-defizienter Mäuse wurde im Alter von sechs bis acht Wochen einer Injektionsbehandlung mit rekombinantem murinem TSLP (Mouse TSLP Recombinant Protein, affymetrix eBioscience, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unterzogen. Hierfür wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 300 ng TSLP in 200 µl PBS (Phosphate buffered Saline) i.p. (intraperitoneal) injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt im selben Zeitraum 200 µl PBS i.p. Die Organentnahme und Analyse erfolgten im Alter von sechs Monaten.

In einer weiteren Versuchsgruppe erhielten männliche, ApoE-defiziente Mäuse im Alter von sechs Monaten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine i.p. Injektion mit 300 ng rekombinantem murinen TSLP (s.o.) in 200 µl PBS, eine weitere Injektionsserie wurde nach demselben Schema im Alter von elf Monaten durchgeführt. Eine Kontrollgruppe erhielt im Alter von sechs und elf Monaten Injektionen mit PBS. Die Organentnahme und Analyse erfolgten hier im Alter von zwölf Monaten.

2.1.2 TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse

Bei den Tieren dieser Versuchsreihe handelte es sich um männliche TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse (C57BL/6-Hintergrund, Charles River Laboratories, Wilmington, USA), die freundlicherweise von Prof. Ziad Mallat, MD, Ph.D (PARCC (Paris-Centre de Recherche Cardiovasculaire) INSERM U970 in Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden. Die Versuchstiere erhielten analog zu den ApoE-defizienten Versuchstieren im Alter von sechs bis acht Wochen eine i.p. Injektion von 300 ng

rekombinantem murinen TSLP (s.o.) in 200 µl PBS. Zum Vergleich erfolgte die Behandlung einer weiteren Gruppe nach demselben Schema mit 200 µl PBS i.p. Im Alter von sechs Monaten erfolgte bei diesen Tieren die Organentnahme und Analyse.

2.1.3 Organentnahme

Für die Organentnahme erhielten alle Mäuse eine gewichtsadaptierte i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid und Xylazin im Verhältnis 2:1. Anschließend erfolgte nach Exitus letalis die Öffnung der Bauchdecke sowie die Blutentnahme aus der Vena cava inferior mit Hilfe einer Heparin-beschichteten Spritze. Das so gewonnene Vollblut wurde bei 7500 G für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und anschließend bei -20 °C eingefroren. Nach der Präparation der Rippen, der Lungen und der Bauchorgane erfolgte die Entnahme des Herzens und der Milz. Das Herz wurde mit einer Feinwaage gewogen und nach der Einbettung in Tissue Freezing Medium (Leica Biosystems, Sulzfeld, Deutschland) auf Trockeneis gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Milzen wurden ebenfalls mit einer Feinwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.1.4 Histologie der atherosklerotischen Plaques

Von den in Einbettmedium (s.o.) fixierten Herzen der Versuchstiere wurden bei -22 °C mittels eines Kryostaten (Leica CM3050 S) in 10 µm Schnittdicke serielle Schnitte auf Höhe der Aortenklappe angefertigt. Von jedem Herzen wurden je zehn Schnitte auf zehn Objektträger (Superfrost Plus Objektträger, Menzel Gläser bei Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgebracht.

2.1.4.1 Ölrot-Färbung

Zur Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques wurden histologische Schnitte der Herzen aller Versuchstiere mittels einer Ölrot-Färbung nach Standardprotokoll angefärbt. Hierfür wurden die histologischen Präparate aufgetaut und getrocknet, bevor sie für 45 Minuten in 4 % PFA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) fixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem aqua dest. und in 60 % Isopropanol gespült. Danach erfolgte eine 15-minütige Färbung mit 0,5 % Oil-Red-O-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 60 % Isopropanol, sowie ein weiteres Spülen in aqua dest. Die Gegenfärbung erfolgte für 20 Sekunden in Hämatoxylinlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), wonach eine weitere Spülung in aqua dest. und in lauwarmem Leitungswasser erfolgte. Abschließend wurden die gefärbten histologischen Präparate mit Aquatex (Merck

KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Die Untersuchung der Präparate wurde mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop und der AxioVision Rel. 4.8 Software durchgeführt. Mit Hilfe des Grafikprogramms ImageJ 1.51f wurde die Größe der atherosklerotischen Veränderungen aller Schnitte vermessen und ein Mittelwert aus allen Schnitten sowie aus fünf um die Mitte der Klappenebene liegenden Schnitten gebildet.

2.1.4.2 Monozyten-Makrophagen-Färbung

Zur Quantifizierung der in die atherosklerotischen Plaques infiltrierten Monozyten und Makrophagen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die histologischen Präparate der Aortenklappen der Versuchstiere nach dem Auftauen und Trocknen für 30 Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert und permeabilisiert. Nach erneutem Trocknen und Umranden der einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (Dako Agilent, Glostrup, Dänemark) wurden die Objektträger anschließend in PBST (PBS mit 0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) drei Mal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungen mit 10 % Normal Goat Serum (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, United Kingdom) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem primärem Anti-Makrophagen/Monozyten-Antikörper (Anti-Macrophages/Monocytes IgG2b Antibody (MOMA-2), intrazellulär, unkonjugiert, monoklonal, Ratte (Millipore, Temecula, USA)), der im Verhältnis 1:100 in 2 % Bovinem Serum Albumin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in PBS verdünnt wurde. Daraufhin wurden die Objektträger erneut für drei Mal fünf Minuten in PBST gewaschen, bevor der Sekundär-Antikörper (Goat anti Rat IgG (H+L), Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488, polyklonal, Ziege (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)) in einer 1:500 Verdünnung in PBS aufgebracht wurde. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur, die zur Vermeidung eines Ausbleichens des Fluorochroms im Dunkeln durchgeführt wurde, erfolgte ein weiteres Waschen in PBST für drei Mal fünf Minuten. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der Kerne und das Eindecken der Präparate mit ProLong Gold antifade performance Medium with DAPI (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, Eugene, USA). Zur Auswertung der in die Plaques eingewanderten Makrophagen und Monozyten wurden die immunfluoreszenzgefärbten Präparate mit dem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop und der AxioVision Rel.

4.8 Software mikroskopiert und anschließend die Flächen der Makrophagen- und Monozyten-Aggregate mittels des Grafikprogramms ImageJ 1.51f vermessen.

2.1.5 Durchflusszytometrie

Für die Analyse der genaueren Zusammensetzung der Immunzellen im Blut der untersuchten Mäuse wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 50 µl des Vollbluts der Versuchstiere auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Auf jede Probe wurde sodann zunächst ein µl F_c-Block (BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) in neun µl PBS hinzugefügt und anschließend bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe eines Antikörper-Gemisches aus jeweils 0,5 µl der folgenden Antikörper und 6,5 µl PBS pro Vollblut-Probe (Tab. 1).

Tab. 1: Zur Durchflusszytometrie verwendete Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller
CD11b	FITC	eBioscience, ThermoFisher Scientific, San Diego, USA
CD115	PE	eBioscience, ThermoFisher Scientific, San Diego, USA
B220/CD45R	V500	BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
CD4	eFluor450	eBioscience, ThermoFisher Scientific, San Diego, USA
CD8	APC	Biolegend, San Diego, USA
Ly6C	PerCP-Cytochrome 5.5	eBioscience, ThermoFisher Scientific, San Diego, USA
NK1.1	PE-Cy7	eBioscience, ThermoFisher Scientific, San Diego, USA

Der Ansatz wurde anschließend 25 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurde BD Pharm Lyse Lysing Buffer (BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) 1:10 mit Aqua dest. angesetzt und jeweils 200 µl pro Probe hinzugegeben. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation über zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte für zehn Minuten bei 400 G zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Dasselbe Procedere erfolgte jeweils ein zweites Mal auf dieselbe Weise. Im Anschluss wurden die Proben mit jeweils 200 µl PBS gewaschen, erneut für zehn Minuten bei 400 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Durchflusszytometrie wurden 250 µl PBS hinzugegeben und resuspendiert, bevor die Analyse mit dem BD FACSCanto II Cell Analyzer durchgeführt wurde.

2.2 Statistik

Die dargestellten Werte sind als Mittelwerte \pm „standard error of mean“ (SEM) angegeben. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel und Prism Version 6.02 (GraphPad Software Inc.) Zum Vergleich zweier Gruppen wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, wobei Ergebnisse mit $p < 0,05$ werden als signifikant (*), mit $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) und mit $p < 0,001$ als hochsignifikant (***) angenommen wurden.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die i.p. Injektion von TSLP bei ApoE-defizienten Mäusen einen Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques zeigt.

3.1 TSLP-Behandlung bei älteren ApoE-defizienten Mäusen

Für diesen Versuch erfolgte die i.p. Injektion von 300 ng TSLP oder 200 μ l PBS bei männlichen ApoE-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}) an jeweils fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils im Alter von sechs und elf Monaten. Im Alter von zwölf Monaten erfolgte die Organentnahme und Analyse. Hinsichtlich der Größe der Plaques auf Höhe der Aortenklappe, die mittels Ölrot-Färbung und quantitativer Analyse untersucht wurde, konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ApoE^{-/-} + PBS $0,35 \pm 0,03$ mm² vs ApoE^{-/-} + TSLP $0,36 \pm 0,02$ mm², $p = 0,9624$; Abb. 1).

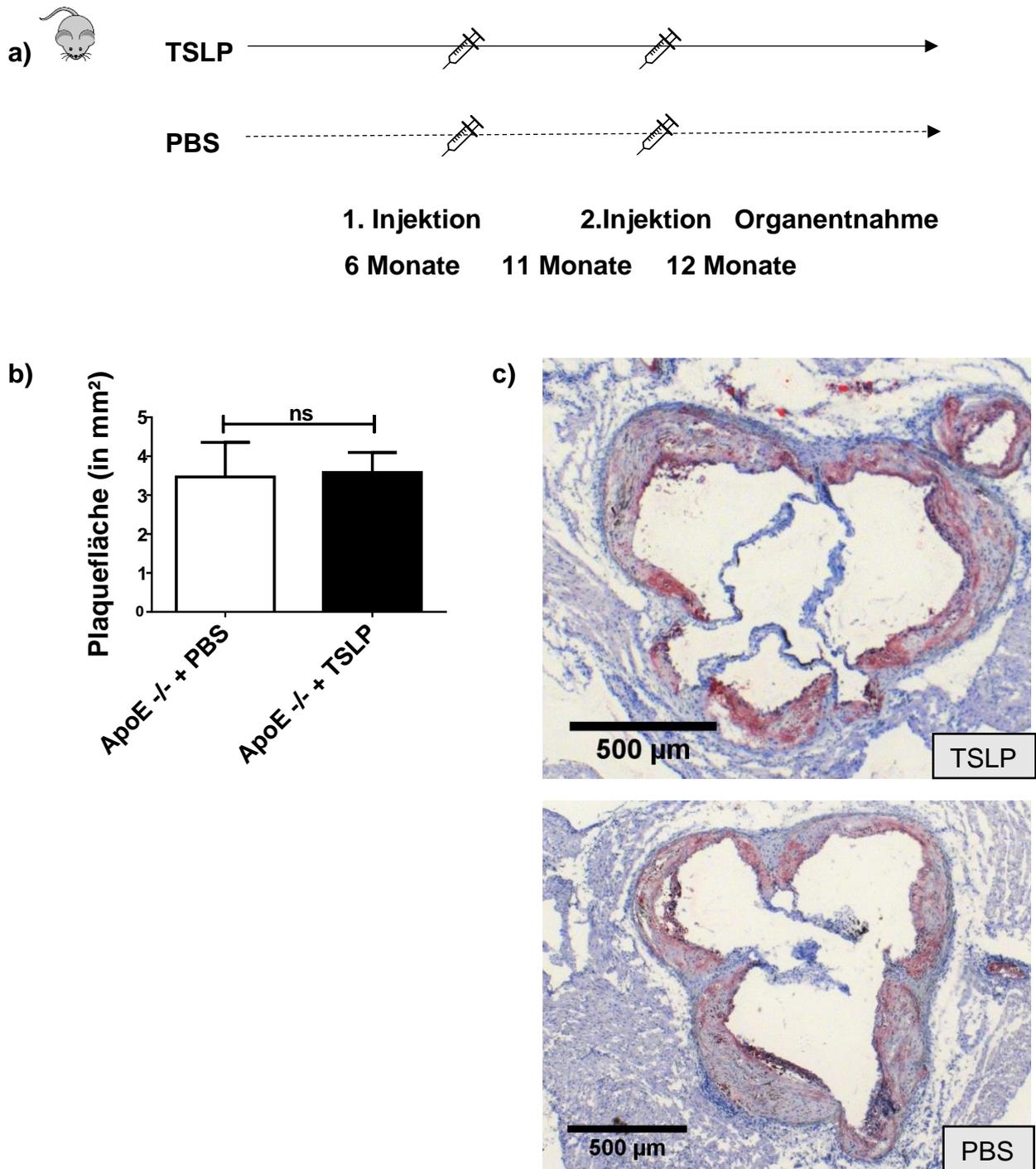


Abb. 1: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Plaqueentwicklung älterer ApoE^{-/-} Mäuse. a) Männliche ApoE-defiziente Mäuse wurden im Alter von sechs und elf Monaten an fünf aufeinander folgenden Tagen einer intraperitonealen Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 µl PBS (n = 9) unterzogen. b) Die Größe der Plaques, welche mittels Ölrot-Färbung serieller histologischer Schnitte in Höhe der Aortenklappe quantifiziert wurde, unterscheidet sich in beiden Gruppen nicht signifikant (ns = nicht signifikant, p > 0,05). c)

Repräsentative Ölrot-Färbungen der atherosklerotischen Plaques auf Höhe der Aortenklappe.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde zudem die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotische Läsion dargestellt und ebenfalls quantitativ untersucht. Dies sollte Aufschluss über die immunologische Aktivität im untersuchten Gewebe geben. Hierbei zeigte sich eine signifikante Zunahme der Infiltration von Monozyten und Makrophagen nach Injektion von TSLP im Vergleich zur Injektion von PBS (ApoE^{-/-} + PBS 11,08 ± 1,81 % vs Apo E^{-/-} + TSLP 21,31 ± 2,22 %, p = 0,0033; Abb. 2).

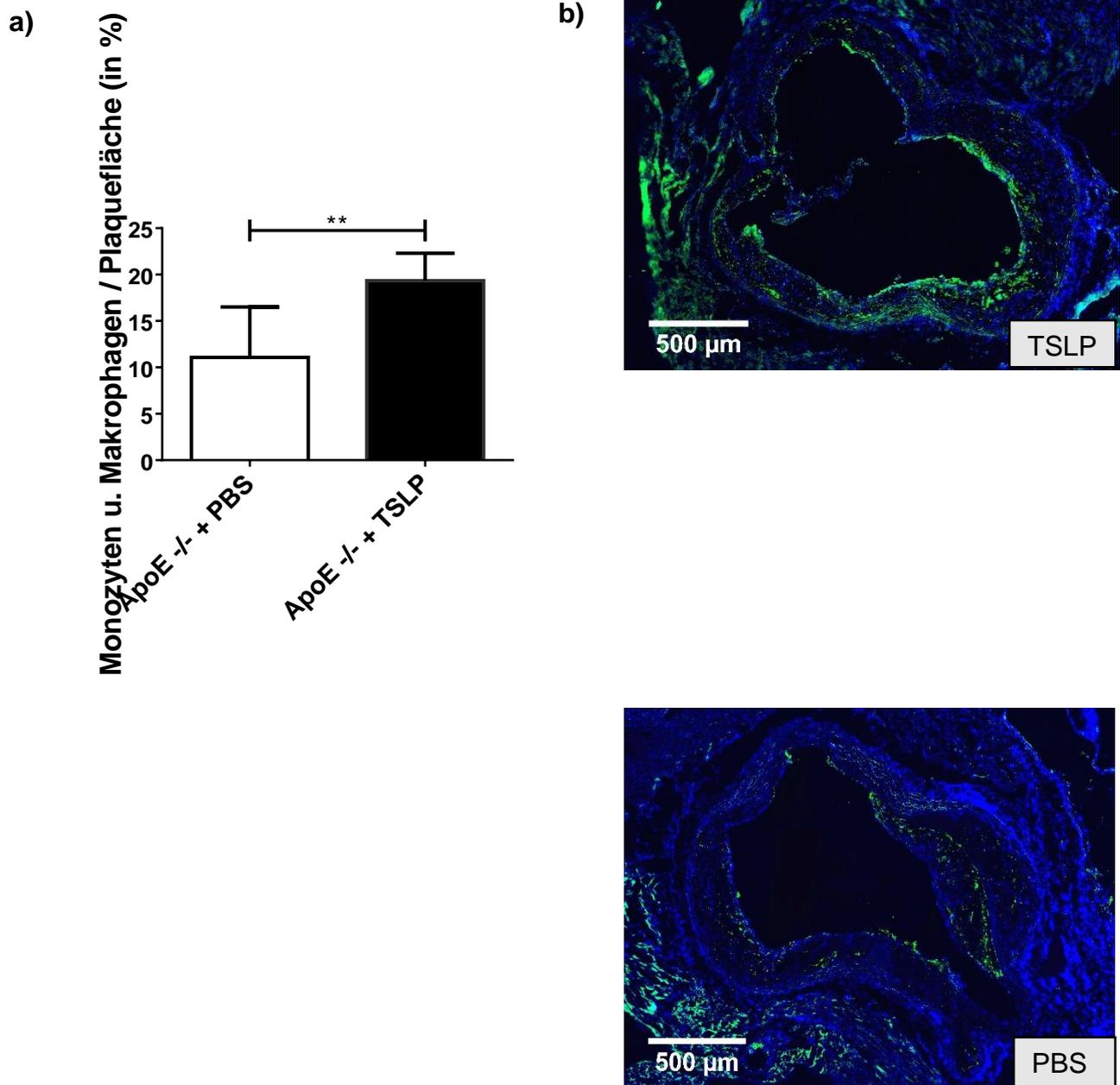


Abb. 2: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques älterer ApoE^{-/-} Mäuse (Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 μ l PBS (n = 9)). Die atherosklerotischen Plaques in Höhe der Aortenklappe wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung serieller histologischer Schnitte untersucht. a) Die Gabe von TSLP führte zu einer signifikanten Zunahme der Infiltration von Monozyten und Makrophagen ($p = 0,0033$). b) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen mit Darstellung der Zellkerne (blau) sowie der Monozyten und Makrophagen (grün).

Auch hinsichtlich der Gewichtsprofile der verschiedenen Versuchsgruppen wurden Untersuchungen angestellt. So wurden die Körpergewichte der Mäuse jeweils vor Beginn der Versuchsreihe und vor der Organentnahme gemessen. Zudem wurden die Gewichte der Herzen und die Gewichte der Milzen ermittelt und verglichen (Tab. 2, Tab. 3).

Tab. 2: Effekt von rekombinantem TSLP auf das Gewicht von älteren ApoE-defizienten Mäusen

Körpergewicht vor der Behandlung		Körpergewicht nach der Behandlung	
[g]		[g]	
PBS	TSLP	PBS	TSLP
34,79 ± 1,43	31,66 ± 0,75	36,68 ± 1,13	33,63 ± 0,97
p = 0,0894		p = 0,0899	

Tab. 3: Effekt von rekombinantem TSLP auf das Gewicht der Herzen und der Milzen von älteren ApoE-defizienten Mäusen

Herzgewicht nach der Behandlung		Milzgewicht nach der Behandlung	
[g]		[g]	
PBS	TSLP	PBS	TSLP
0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,006
p = 0,0950		p = 0,4525	

Bei den Körpergewichten der Tiere vor Beginn der Behandlung zeigte sich zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied (ApoE^{-/-} + PBS 34,79 ± 1,43 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 31,66 ± 0,75 g, p = 0,0894; Abb. 3). Auch bei den Körpergewichten unmittelbar vor der Organentnahme ergab sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (ApoE^{-/-} + PBS 36,68 ± 1,13 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 33,63 ± 0,98 g, p = 0,0899; Abb. 3). Das Gewicht der Herzen unterschied sich bei verschiedenen Behandlungen ebenfalls nicht signifikant (ApoE^{-/-} + PBS 0,24 ± 0,01 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 0,22 ± 0,01 g, p = 0,0950; Abb. 3), ebenso verhielt es sich bei den Milzgewichten (ApoE^{-/-} + PBS 0,12 ± 0,02 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 0,09 ± 0,006 g, p = 0,4525, Abb. 3).

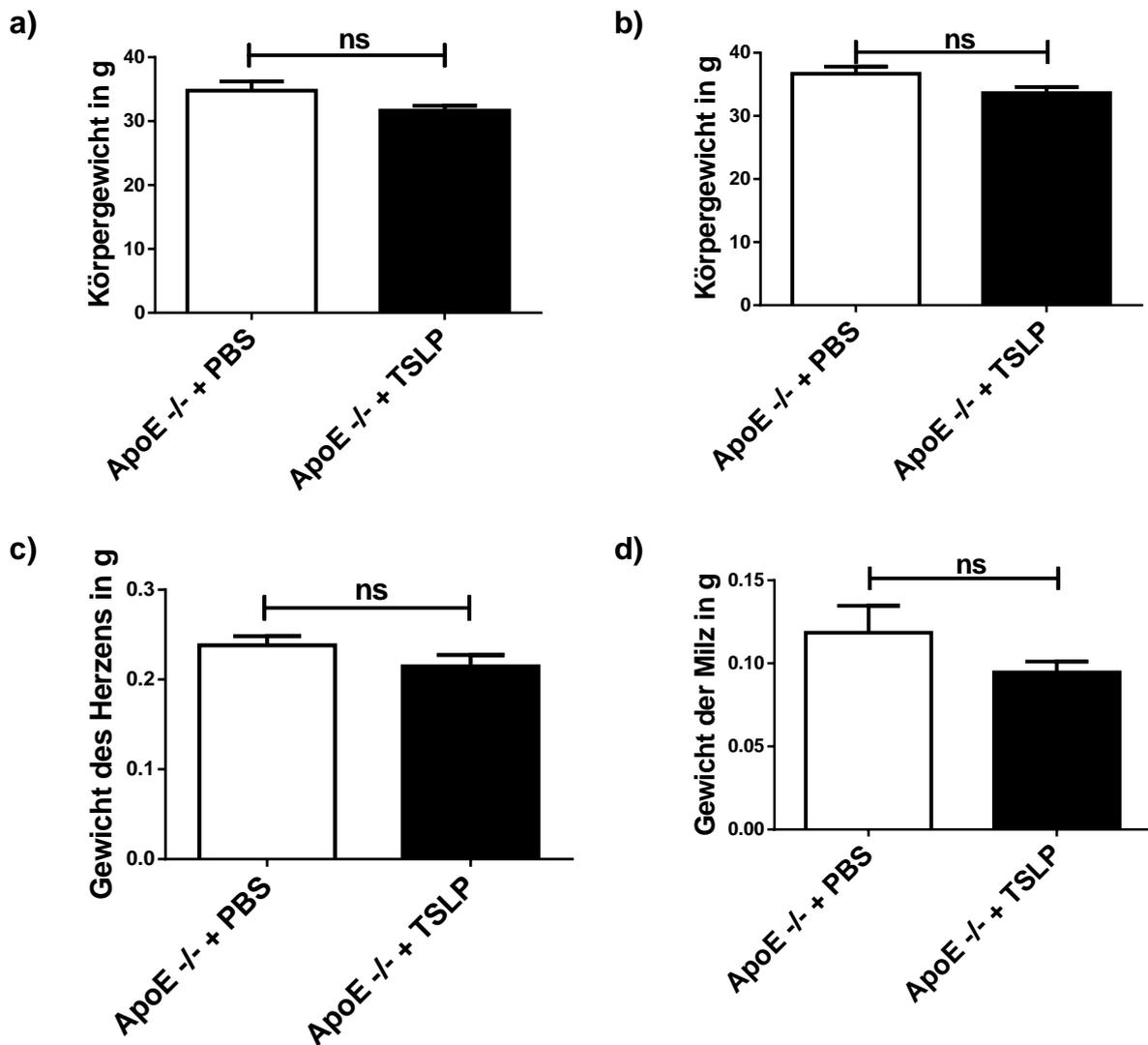


Abb. 3: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf die Gewichtsprofile älterer ApoE^{-/-} Mäuse (Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 µl PBS (n = 9)). a) – b) Weder beim Körpergewicht der Mäuse vor Beginn der Versuchsreihe noch beim Körpergewicht der Mäuse bei der Organentnahme war ein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (ns = nicht signifikant, p > 0,05). c) Das Gewicht der Herzen unterschied sich ebenfalls nicht. d) Die Behandlung mit rekombinantem TSLP brachte keinen Unterschied bezüglich des Gewichts der Milz.

Mittels FACS-Analyse erfolgte zudem die Untersuchung des peripheren Blutes der Mäuse auf die Subspezialisierung der Immunzellen in CD11b positive Zellen (ein Marker für murine Makrophagen), klassische Monozyten und Nicht-klassische Monozyten. Bei den CD11b positiven Zellen zeigte sich ein signifikanter Rückgang des prozentualen Anteils im peripheren Blut nach Behandlung mit TSLP (ApoE^{-/-} + PBS 29,91 ± 2,47 % vs ApoE^{-/-}

+ TSLP $19,67 \pm 3,61\%$, $p = 0,0164$; Abb. 4). Im Vergleich der absoluten Zahlen der CD11b positiven Zellen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied (ApoE^{-/-} + PBS 22725 ± 3355 Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP 13593 ± 1760 Zellen, $p = 0,0545$; Abb. 4).

Bei den klassischen Monozyten konnte weder für den prozentualen Anteil (ApoE^{-/-} + PBS $4,79 \pm 0,42\%$ vs ApoE^{-/-} + TSLP $2,86 \pm 0,57\%$, $p = 0,0511$; Abb. 4), noch für die absolute Anzahl (ApoE^{-/-} + PBS $3824 \pm 708,8$ Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP $1938 \pm 264,1$ Zellen, $p = 0,0706$; Abb. 4) ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Auch bei den Nicht-klassischen Monozyten gab es keine Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen (ApoE^{-/-} + PBS $2,92 \pm 0,4\%$ vs ApoE^{-/-} + TSLP $2,72 \pm 0,73\%$, $p = 0,6556$; Abb. 4) und den absoluten Zahlen (ApoE^{-/-} + PBS $1927 \pm 433,7$ Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP $1704 \pm 246,5$ Zellen, $p = 0,9305$; Abb. 4) zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

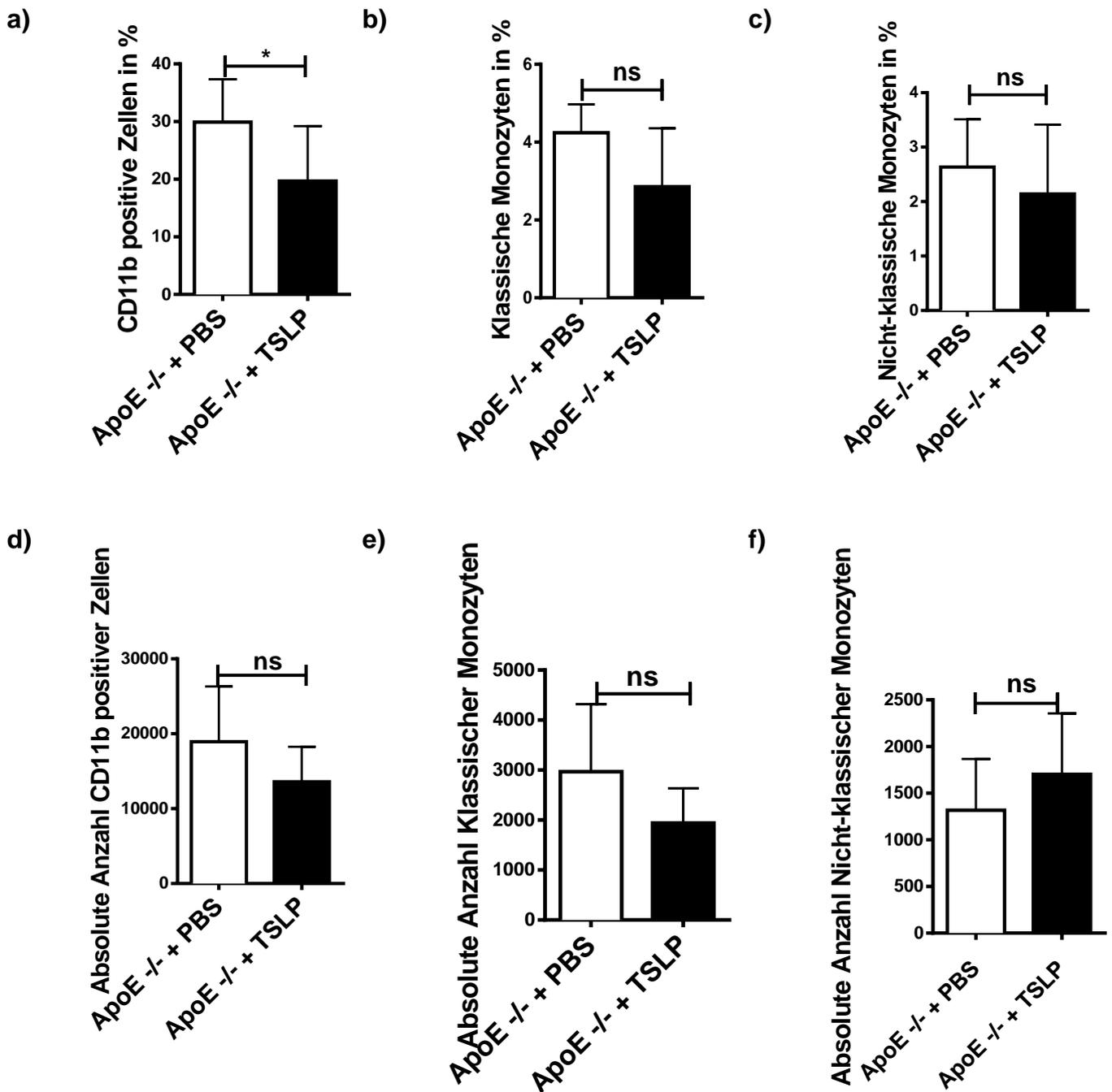


Abb. 4: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP-Behandlungsstudie bei älteren ApoE-defizienten Mäusen (Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 μ l PBS (n = 9)). **a)** Die Behandlung mit TSLP führte zu einem Rückgang des prozentualen Anteils der CD11b-positiven Zellen im peripheren Blut ($p = 0,0164$). **b) – c)** Der prozentuale Anteil der Klassischen und der Nicht-klassischen Monozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). **d)** Bei den mit PBS behandelten Mäusen fand sich eine höhere absolute Anzahl CD11b-positiver Zellen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. **e) – f)** Klassische und Nicht-klassische Monozyten unterschieden sich bezüglich der absoluten Anzahl nicht zwischen den Behandlungsgruppen.

3.2 TSLP-Behandlung bei jüngeren ApoE-defizienten Mäusen

Um den Effekt von TSLP auf die Atherogenese jüngerer Mäuse zu beobachten, wurden sechs bis acht Wochen alte, männliche, ApoE-defiziente Mäuse an fünf aufeinanderfolgenden Tagen einer intraperitonealen Injektion von 300 ng TSLP oder 200 μ l PBS unterzogen. Die Organentnahme erfolgte im Alter von sechs Monaten. Es erfolgte die Untersuchung der atherosklerotischen Läsionen in Höhe der Aortenklappe mittels Ölrot-Färbung und quantitativer Analyse. Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der atherosklerotischen Plaques bei den mit TSLP behandelten Tieren im Vergleich zu den mit PBS behandelten Mäusen (ApoE^{-/-} + PBS $0,15 \pm 0,03$ mm² vs ApoE^{-/-} + TSLP $0,07 \pm 0,01$ mm², $p = 0,0147$; Abb. 5).

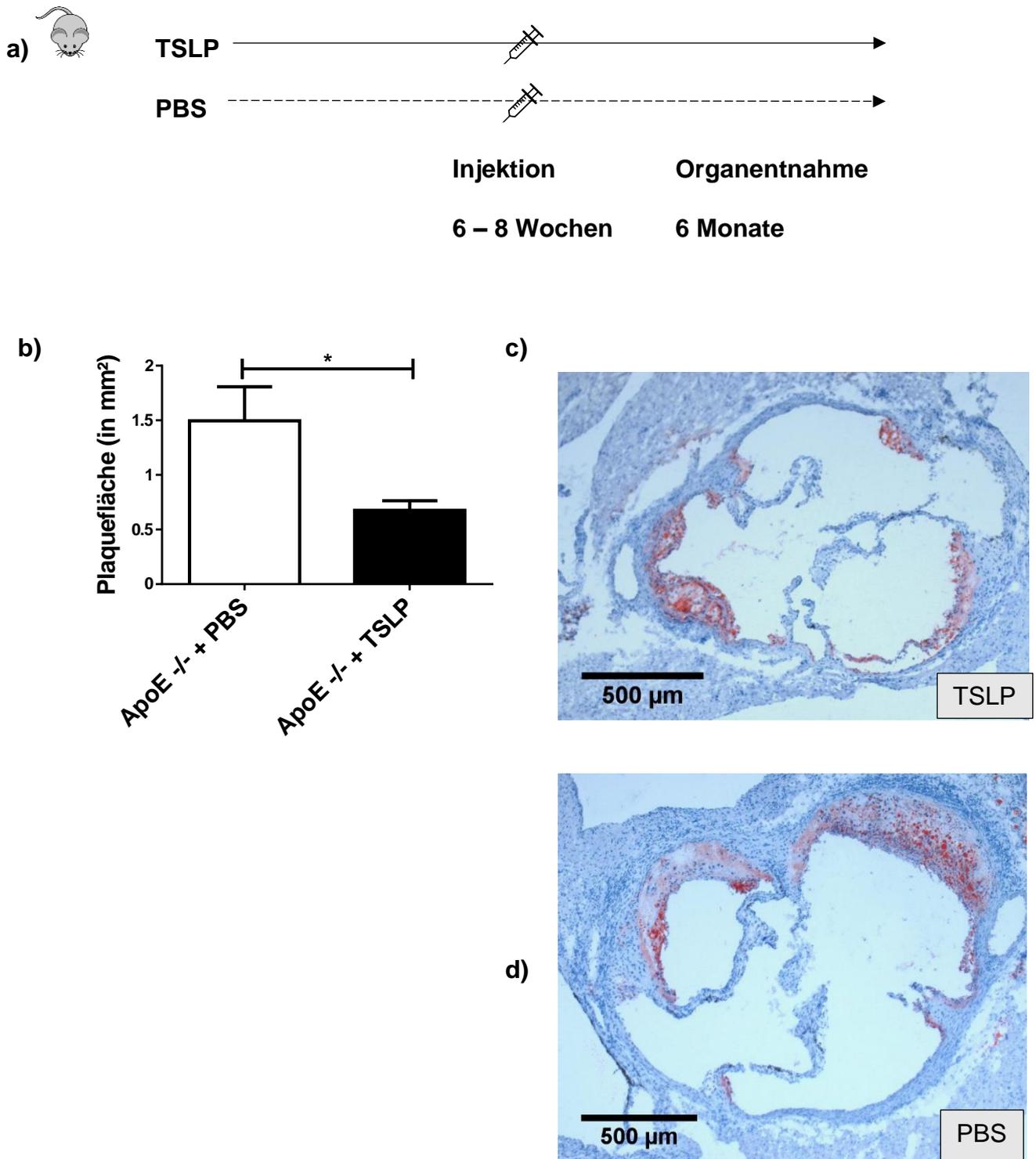


Abb. 5: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Plaquetentwicklung jüngerer ApoE^{-/-} Mäuse. a) Männliche ApoE-defiziente Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen einer intraperitonealen Injektion von 300 ng TSLP (n = 10)

oder 200 μ l PBS (n = 10) unterzogen. Die Größe der atherosklerotischen Läsionen wurde durch serielle histologische Schnitte in Höhe der Aortenklappe mittels Ölrot-Färbung quantifiziert. b) Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Größe der Plaques zwischen der mit TSLP und der mit PBS behandelten Gruppe ($p = 0,0356$). c) – d) Repräsentative Ölrot-Färbungen der atherosklerotischen Plaques auf Höhe der Aortenklappe.

Im Vergleich der Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques konnte kein Unterschied, zwischen den mit TSLP und den mit PBS behandelten Mäusen festgestellt werden (ApoE $^{-/-}$ + PBS $8,96 \pm 1,48$ % vs ApoE $^{-/-}$ + TSLP $9,85 \pm 1,89$ %, $p = 0,9017$; Abb. 6).

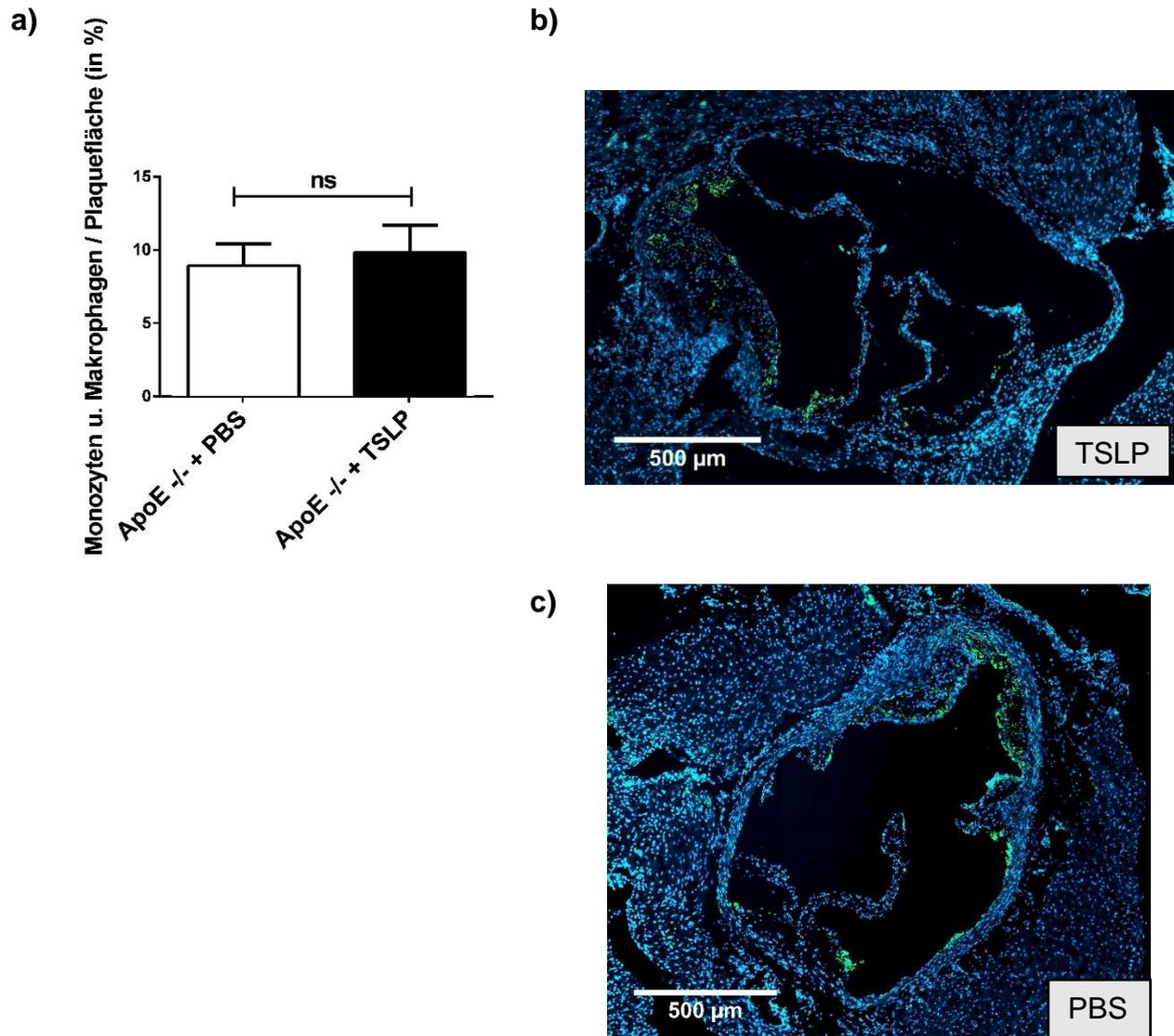


Abb. 6: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques jüngerer ApoE^{-/-} Mäuse (Injektion von 300 ng TSLP (n = 10) oder 200 μ l PBS (n = 10)). Die atherosklerotischen Plaques in Höhe der Aortenklappe wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung serieller histologischer Schnitte untersucht. a) Zwischen den mit TSLP und den mit PBS behandelten Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). b) – c) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen mit Darstellung der Nuklei (blau) und der Monozyten und Makrophagen (grün).

Auch in der Versuchsreihe der jüngeren ApoE-defizienten Mäuse wurden die Körpergewichte sowie die Gewichte der Herzen und Milzen ermittelt und verglichen (Tab. 4).

Tab. 4: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf das Körpergewicht, sowie das Gewicht der Herzen und der Milzen von jüngeren ApoE-defizienten Mäusen

Körpergewicht nach der Behandlung [g]		Herzgewicht nach der Behandlung [g]		Milzgewicht nach der Behandlung [g]	
PBS	TSLP	PBS	TSLP	PBS	TSLP
31,78 ± 1,43	32,63 ± 0,36	0,18 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,097 ± 0,004	0,13 ± 0,01
p = 0,5104		p = 0,2486		p = 0,1037	

Bezüglich des Körpergewichts zeigte sich kein Unterschied zwischen der mit rekombinantem TSLP und der mit PBS behandelten Gruppe (ApoE^{-/-} + PBS 31,78 ± 1,43 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 32,63 ± 0,36 g, p = 0,5104; Abb. 7).

Zwischen dem Herzgewicht der mit rekombinantem TSLP und der mit PBS behandelten Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied (ApoE^{-/-} + PBS 0,18 ± 0,01 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 0,2 ± 0,01 g, p = 0,2486; Abb. 7).

Die Milzgewichte in der mit TSLP behandelten Gruppe erschienen tendenziell höher als in der mit PBS behandelten Gruppe. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (ApoE^{-/-} + PBS 0,097 ± 0,004 g vs ApoE^{-/-} + TSLP 0,13 ± 0,01 g, p = 0,1037; Abb. 7).

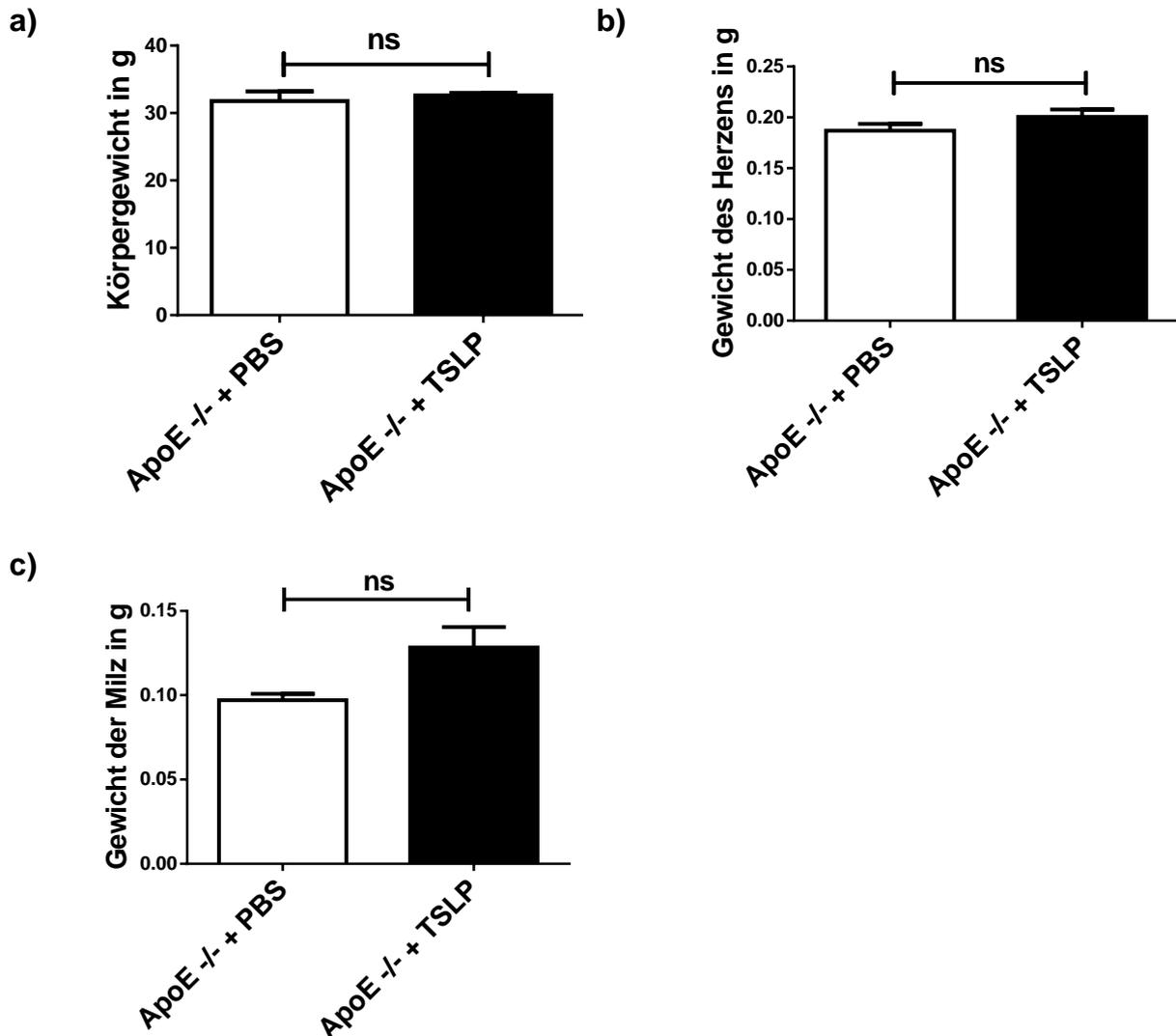
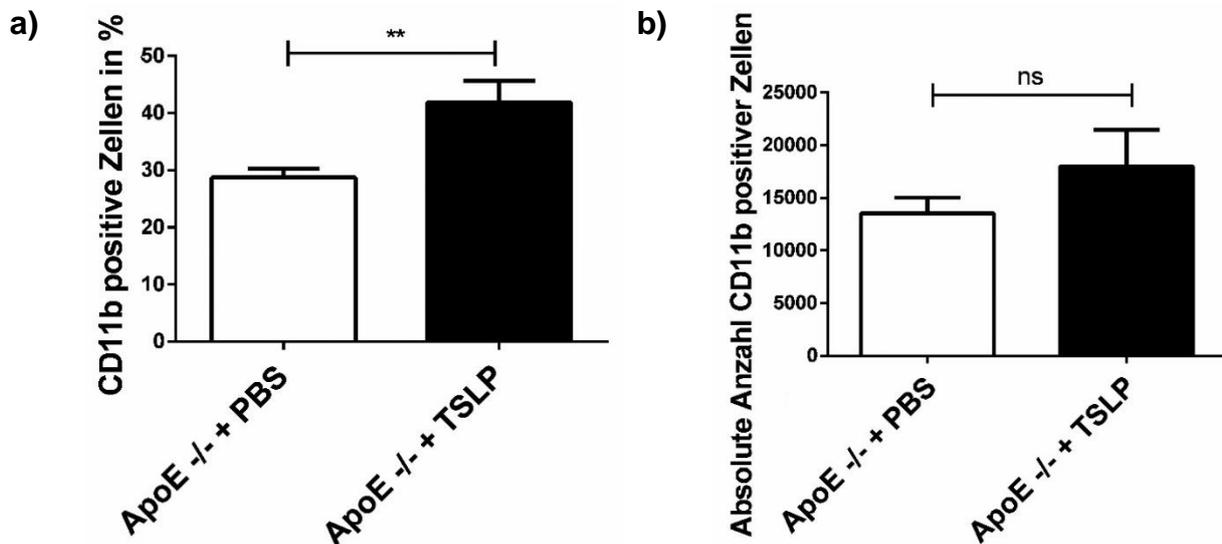


Abb. 7: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf die Gewichtsprofile jüngerer ApoE^{-/-} Mäuse (Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 µl PBS (n = 9)). a) Beim Körpergewicht weisen die beiden Behandlungsgruppen keinen Unterschied auf (ns = nicht signifikant, p > 0,05). b) Das Gewicht der Herzen unterscheidet sich zwischen den mit TSLP und mit PBS behandelten Tieren nicht. c) Die Gewichte der Milzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde die Zusammensetzung des peripheren Blutes der Mäuse hinsichtlich des Anteils und der absoluten Anzahl an CD11b positiven Zellen, klassischen Monozyten und Nicht-klassischen Monozyten mittels FACS-Analyse untersucht. Bei den CD11b positiven Zellen zeigte sich bei den mit TSLP behandelten Tieren ein erhöhter prozentualer Anteil der Zellen, der im Vergleich zur mit PBS behandelten

Gruppe signifikant war (ApoE^{-/-} + PBS 28,74 ± 1,51 % vs ApoE^{-/-} + TSLP 41,84 ± 3,78 %, $p = 0,0023$, Abb. 8). Bei der absoluten Anzahl Cd11b positiver Zellen im peripheren Blut ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen nachweisen (ApoE^{-/-} + PBS 13538 ± 1485 Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP 18004 ± 3472 Zellen, $p = 0,5935$, Abb. 8).

Bei den klassischen Monozyten zeigten die mit PBS behandelten Mäuse sowohl prozentual als auch absolut die geringsten Werte, es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zur mit rekombinantem TSLP behandelten Gruppe (ApoE^{-/-} + PBS 3,88 ± 0,7 % vs ApoE^{-/-} + TSLP 5,28 ± 1,08 %, $p = 0,4181$ bzw. ApoE^{-/-} + PBS 2227 ± 570,5 Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP 2504 ± 622 Zellen, $p = 0,8315$, Abb. 8). Bezüglich der Nicht-klassischen Monozyten wies die mit TSLP behandelte Gruppe prozentual und absolut den geringeren Anteil auf. Auch hier fand sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (ApoE^{-/-} + PBS 2,18 ± 0,35 % vs ApoE^{-/-} + TSLP 1,7 ± 0,24 %, $p = 0,4181$ bzw. ApoE^{-/-} + PBS 1240 ± 304 Zellen vs ApoE^{-/-} + TSLP 792 ± 155 Zellen, $p = 0,3599$, Abb. 8).



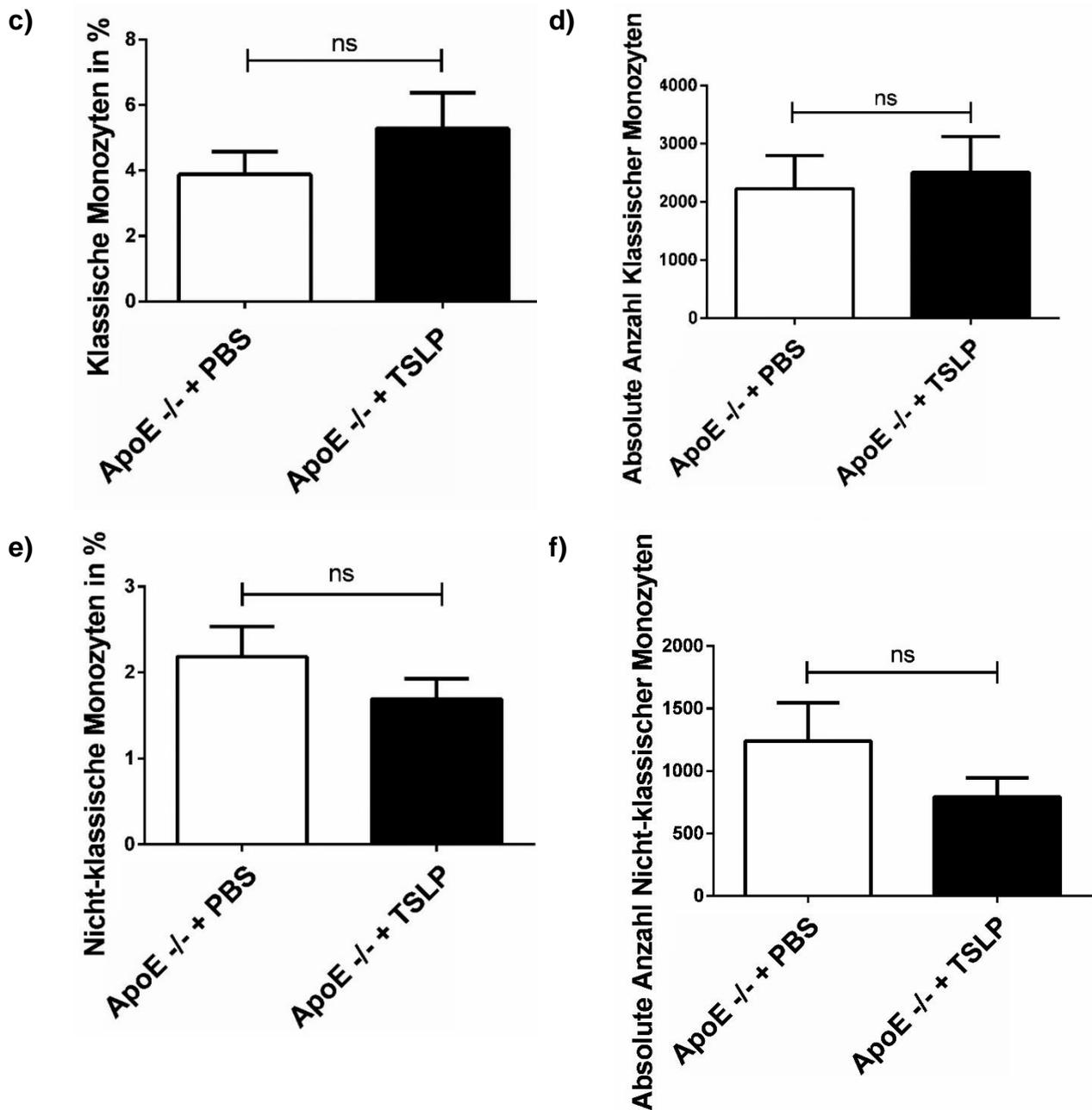


Abb. 8: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP-Behandlungsstudie bei jungen ApoE-defizienten Mäusen (Injektion mit 300 ng TSLP (n = 7) oder 200 μ l PBS (n = 9)). a) Die Injektion von TSLP führte im Vergleich zur PBS-Injektion zu einem signifikanten Rückgang des prozentualen Anteils der CD11b positiven Zellen ($p = 0,0023$). b) Die absolute Anzahl CD11b-positiver Zellen unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). c) - d) Auch beim Anteil sowie der absoluten Anzahl Klassischer Monozyten gab es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. e) - f) Beim Anteil und bei der absoluten Anzahl Nicht-klassischer Monozyten zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$).

3.3 TSLP-Behandlung bei TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen

Um den Einfluss des TSLP/TSLPR-unabhängigen TSLP-Signalwegs auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques weiter zu untersuchen, wurde außerdem eine Versuchsreihe mit TSLPR/ApoE-defizienten männlichen Mäusen durchgeführt. Hierbei erhielten die Tiere im Alter von sechs bis acht Wochen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Injektion mit 300 µg TSLP oder 200 µl PBS. Nach sechs Monaten erfolgte die Organentnahme, analog zu den vorher beschriebenen Versuchsreihen erfolgten Untersuchungen hinsichtlich der Plaque-Last, der Infiltration von Monozyten und Makrophagen, der Organ- und Körpergewichte sowie verschiedener Immunzellen im Blut.

Für die Analyse der atherosklerotischen Läsionen wurden erneut Ölrot-Färbungen der Aortenklappen durchgeführt und quantitativ ausgewertet. Zwischen der mit PBS und der mit TSLP behandelten Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 0,70 ± 0,01 mm² vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 0,72 ± 0,02 mm², p = > 0,9999; Abb. 9).

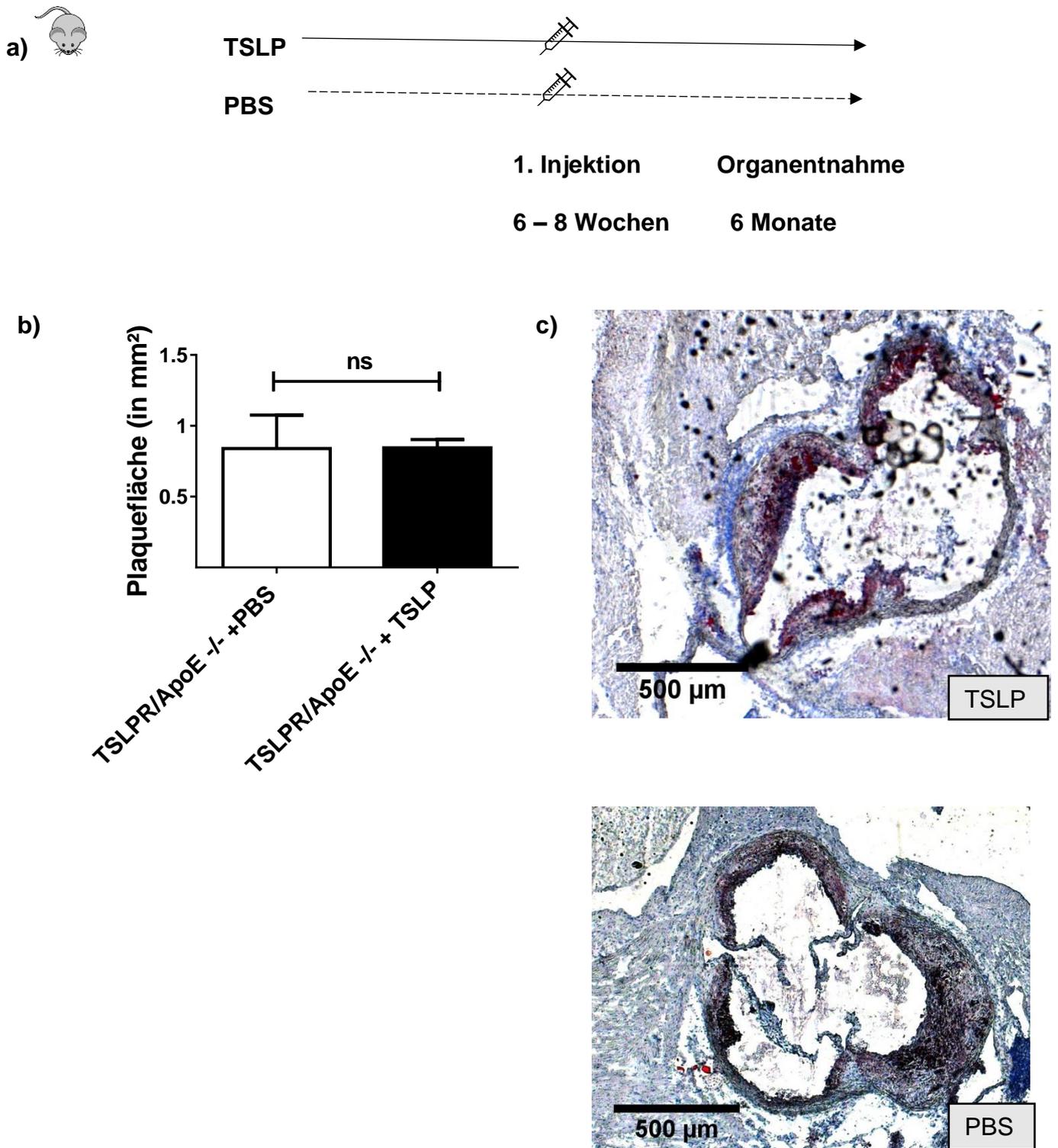


Abb. 9: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Plaqueentwicklung jüngerer TSLPR/ApoE^{-/-} Mäuse. a) Männliche TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen einer intraperitonealen Injektion von

300 ng TSLP (n = 3) oder 200 µl PBS (n = 6) unterzogen. Die Größe der atherosklerotischen Läsionen wurde durch serielle histologische Schnitte in Höhe der Aortenklappe mittels Ölrot-Färbung quantifiziert. b) Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). c) Repräsentative Ölrot-Färbungen der atherosklerotischen Plaques auf Höhe der Aortenklappe.

Um die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen, wurden erneut immunhistochemische Färbungen durchgeführt und anschließend quantitativ analysiert. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS $12,21 \pm 5,64$ % vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP $11,69 \pm 1,49$ %, $p = 0,6190$, Abb. 10).

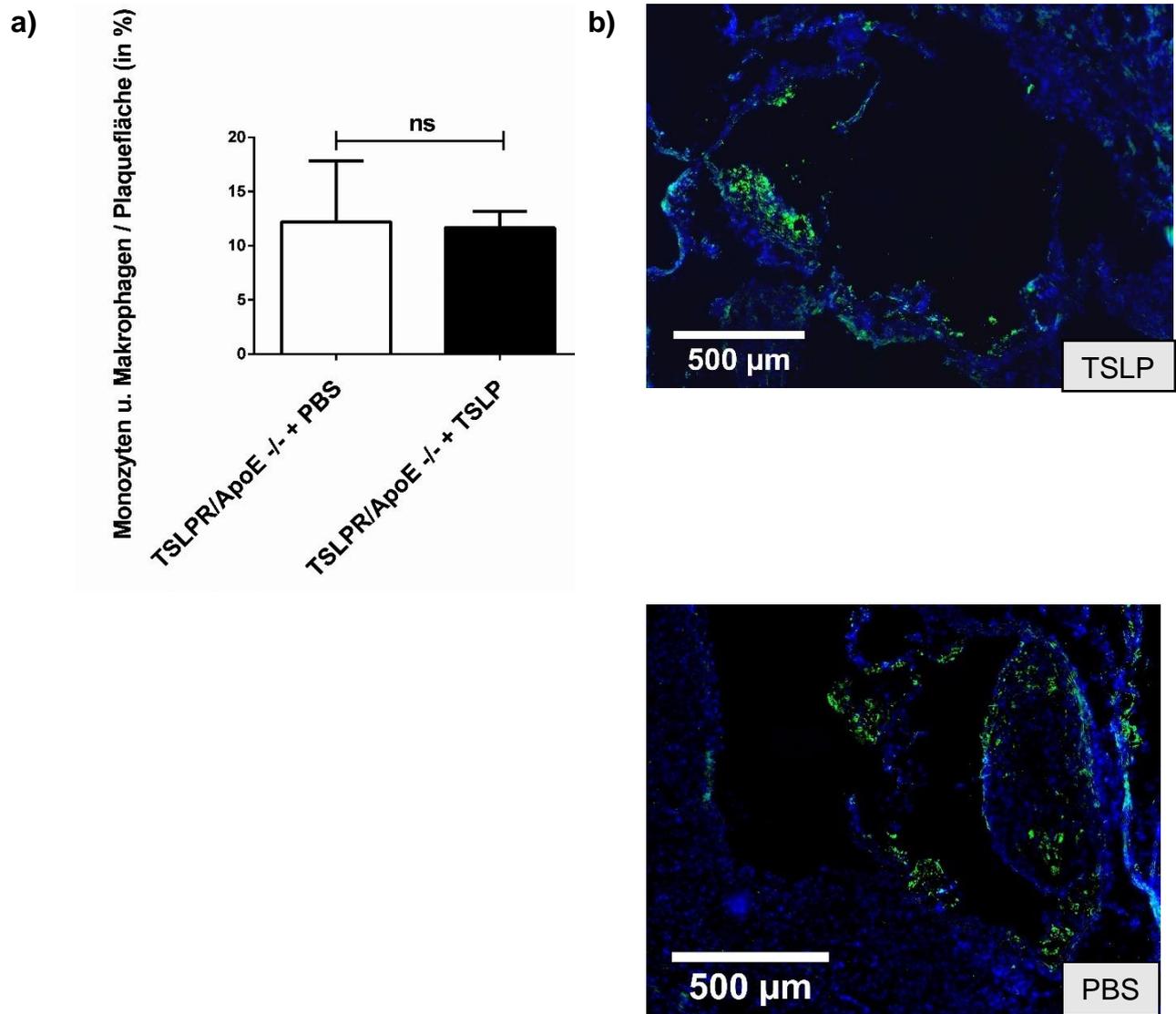


Abb. 10: Einfluss von rekombinantem TSLP auf die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques jüngerer TSLPR/ApoE^{-/-} Mäuse (Injektion von 300 ng TSLP (n = 3) oder 200 μ l PBS (n = 6)). Die atherosklerotischen Plaques in Höhe der Aortenklappe wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung serieller histologischer Schnitte untersucht. a) Zwischen den mit TSLP und den mit PBS behandelten Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). b) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen mit Darstellung der Nuclei (blau) und der Monozyten und Makrophagen (grün).

Auch in diesen Versuchsgruppen wurden die Körper-, Herz- und Milzgewichte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen (Tab. 5).

Tab. 5: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf das Körpergewicht, sowie das Gewicht der Herzen und der Milzen von jüngeren TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen

Körpergewicht nach der Behandlung [g]		Herzgewicht nach der Behandlung [g]		Milzgewicht nach der Behandlung [g]	
PBS	TSLP	PBS	TSLP	PBS	TSLP
34,79 ± 1,69	33,29 ± 0,69	0,21 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,02
p = 0,3290		p = 0,6494		p = 0,5152	

Hinsichtlich des Körpergewichts der Mäuse zeigte sich zwischen den Gruppen kein Unterschied (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 34,79 ± 1,69 g vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 33,29 ± 0,69 g, p = 0,3290, Abb. 11). Auch bezüglich des Gewichts der Herzen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 0,21 ± 0,01 g vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 0,2 ± 0,01 g, p = 0,6494, Abb. 11). Beim Milzgewicht zeigte sich tendenziell ein höherer Wert bei den mit TSLP behandelten Tieren, der Unterschied war statistisch nicht signifikant (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 0,11 ± 0,01 g vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 0,13 ± 0,02 g, p = 0,5152, Abb. 11).

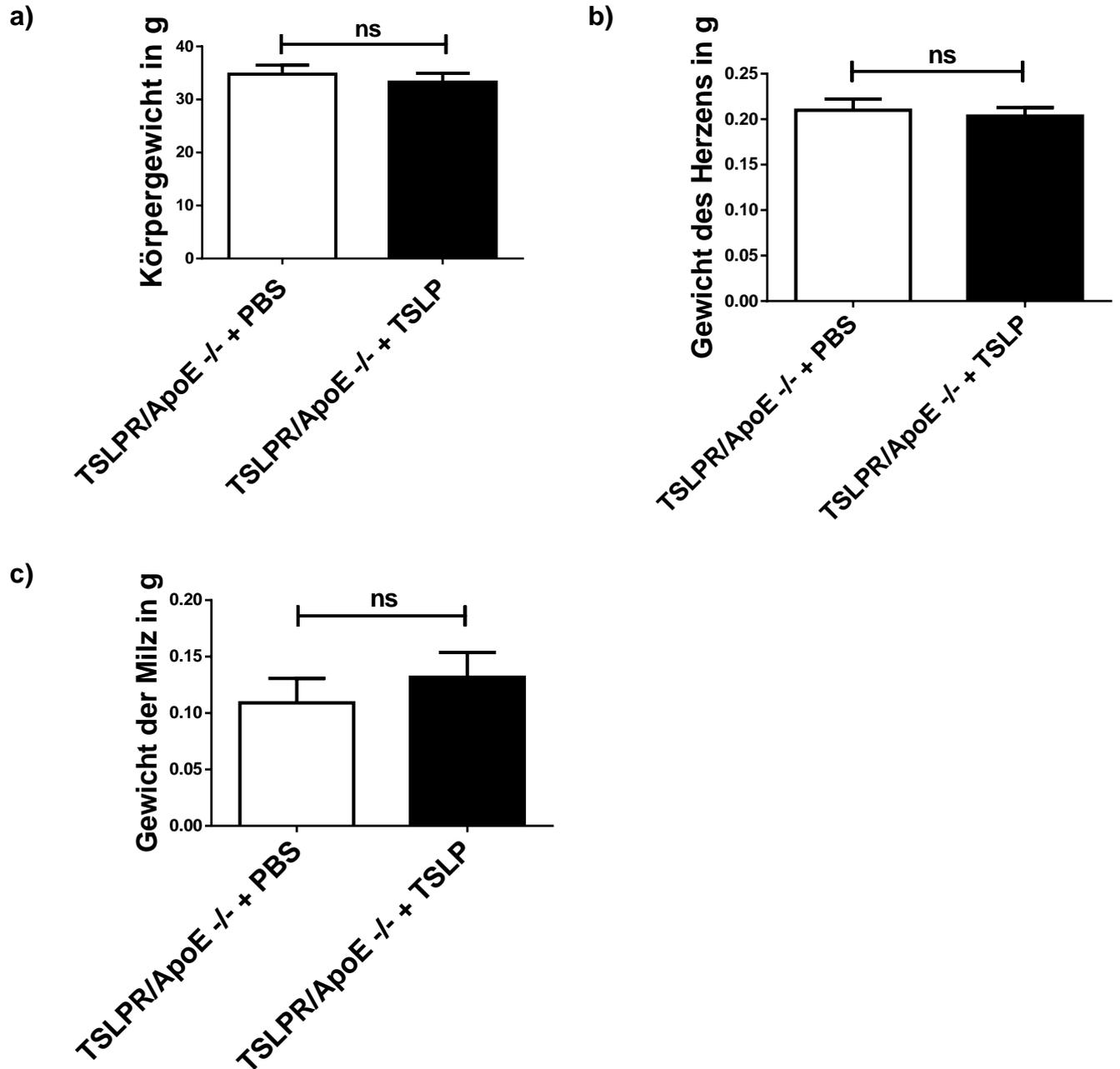


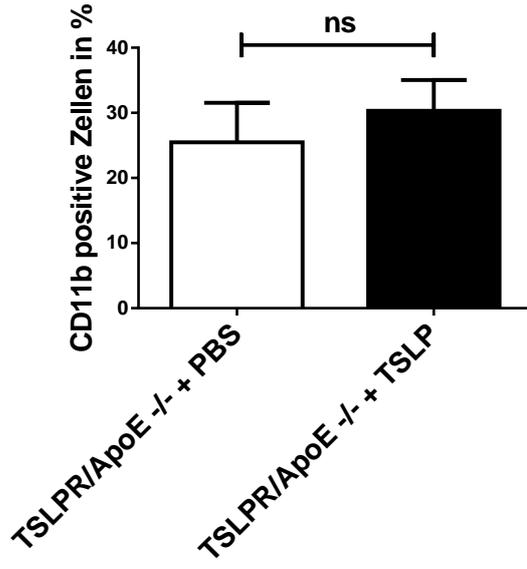
Abb. 11: Gewichtsprofile in der TSLP-Behandlungsstudie bei jungen TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen (Injektion von 300 ng TSLP (n = 3) oder 200 μ l PBS (n = 6)). a) Beim Körpergewicht weisen die verschiedenen Behandlungsgruppen keinen Unterschied auf (ns = nicht signifikant, $p > 0,05$). b) Das Gewicht der Herzen unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht. c) Die Gewichte der Milzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Behandlungsgruppen.

Erneut wurde eine FACS-Analyse des peripheren Blutes durchgeführt, um die Zusammensetzung der Immunzellen aufzuschlüsseln. Bezogen auf den prozentualen Anteil CD11b positiver Zellen zeigten die mit TSLP behandelten Tiere einen höheren Anteil als die mit PBS behandelten Tiere, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 25,48 ± 2,71 % vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 30,3 ± 2,12 %, $p = 0,2222$; Abb. 12). Der absolute Anteil CD11b positiver Zellen war ebenfalls bei der mit TSLP behandelten Gruppe größer als bei der mit PBS behandelten Gruppe, auch hier ohne signifikanten Unterschied (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 12638 ± 2882 Zellen vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 17088 ± 1895 Zellen, $p = 0,3095$; Abb. 12).

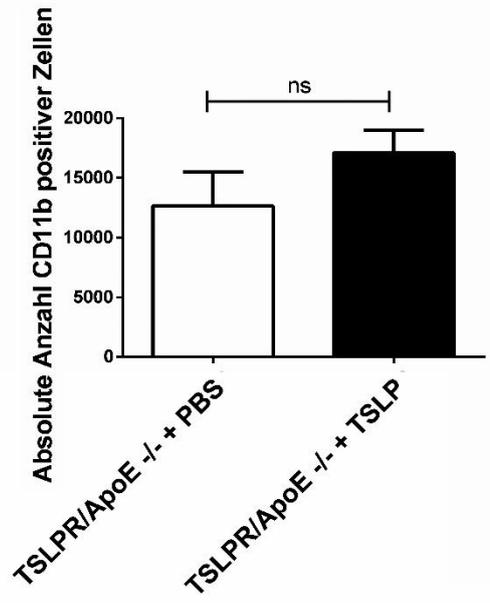
Beide Versuchsgruppen wiesen einen sehr ähnlichen prozentualen Anteil klassischer Monozyten auf, die Unterschiede waren nicht signifikant (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 4,85 ± 0,40 % vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 4,79 ± 0,59 %, $p = 0,7706$; Abb. 12). Bei der absoluten Anzahl klassischer Monozyten wiesen erneut die mit TSLP behandelten Tiere eine höhere Anzahl auf (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 1217 ± 341 Zellen vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 1238 ± 262 Zellen, $p = 0,5152$; Abb. 12).

Prozentual wiesen beide Gruppen einen ähnlichen Anteil Nicht-Klassischer Monozyten auf. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen waren jedoch nicht signifikant (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 2,37 ± 0,4 % vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 2,12 ± 0,31 %, $p = 0,6494$; Abb. 12). Auch bezüglich der absoluten Anzahl Nicht-klassischer Monozyten gab es zwischen den beiden untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied (TSLPR/ApoE^{-/-} + PBS 1217 ± 341 Zellen vs TSLPR/ApoE^{-/-} + TSLP 1238 ± 262 Zellen, $p = 0,9004$; Abb. 12).

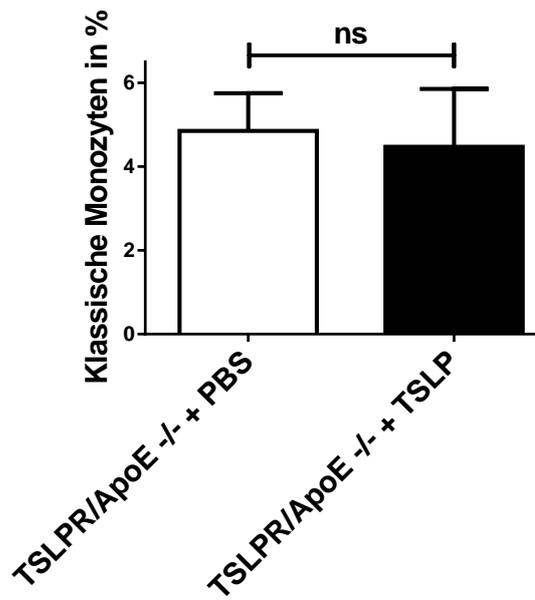
a)



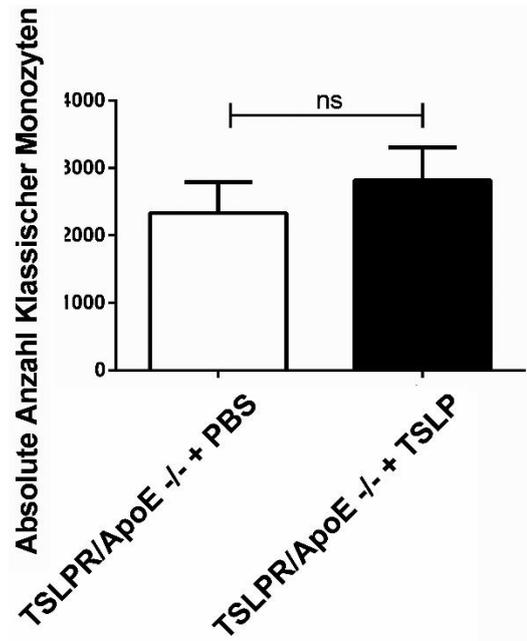
b)



c)



d)



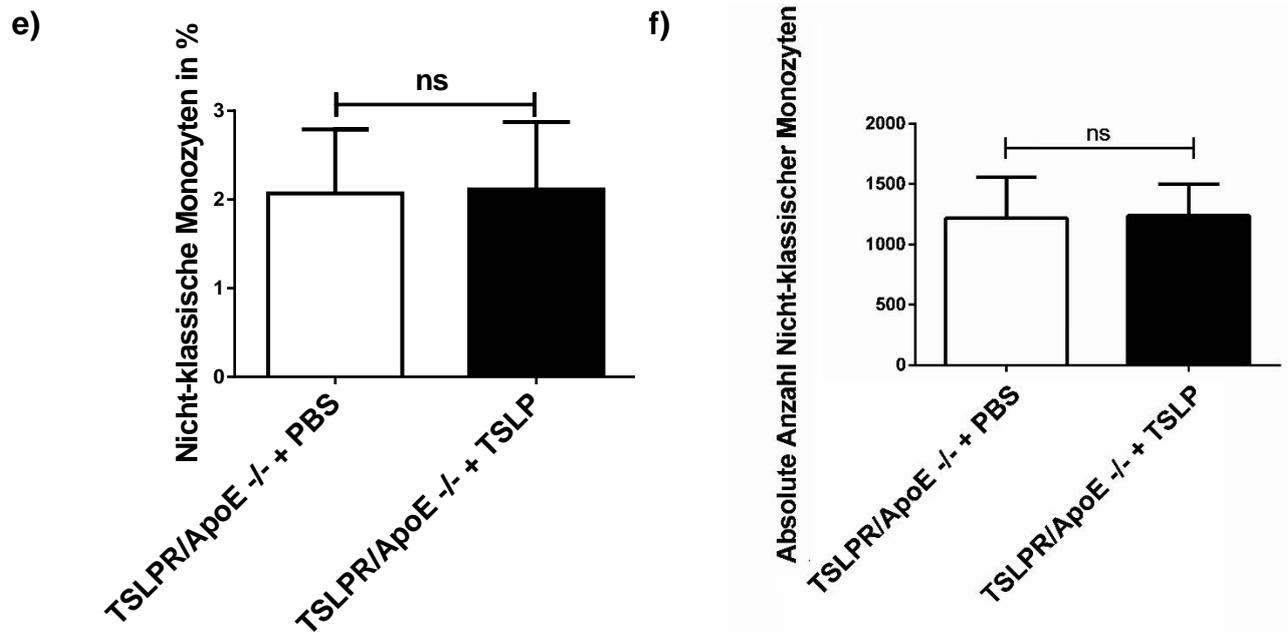


Abb. 12: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP-Behandlungsstudie bei jungen TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen (Injektion von 300 ng TSLP (n = 3) oder 200 μ l PBS (n = 6)). a – e) Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($p > 0,05$)

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die intraperitoneale Injektion von TSLP einen positiven Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei jüngeren, männlichen ApoE-defizienten Mäusen hat. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plaquegröße im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Yu et. al., die in ihrer Studie ebenfalls eine Reduktion der Größe atherosklerotischer Plaques bei ApoE-defizienten Mäusen nach Injektion von TSLP nachweisen konnten (Yu et al., 2013). Dieser Effekt wurde auf die TSLP-gestützte Induktion der Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu CD4⁺ LAP⁺-Tregs zurückgeführt. Diese Unterart regulatorischer T-Zellen reduziert die Th1- und Th2-Immunantwort durch die Produktion von TGFβ und scheint dadurch vor Atherosklerose zu schützen (Mallat et al., 2001b; Sasaki et al., 2009; Zhong et al., 2012). In der Arbeit von Yu et. al. erfolgte die Injektion im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit jedoch subkutan und nicht intraperitoneal. Insgesamt stehen die Ergebnisse der Studie jedoch im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine andere Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe zeigte, dass nach einer Injektion von Freund's Adjuvans bei TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen keine TSLP-vermittelte Wirkung nachweisbar ist. Bei ApoE-defizienten Mäusen führte die Injektion zu einer Reduktion der Plaquelast sowie zu einer Aktivierung der Th2-Immunantwort (Steinmetz et al., 2020).

Zu einem anderen Ergebnis kommen die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Wu et al. Hier wurden ApoE- und TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse hinsichtlich der Entwicklung der Atherosklerose beobachtet. Bei den älteren beobachteten TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen konnte dabei eine geringere Größe der atherosklerotischen Läsionen, sowie eine geringere Invasion von Monozyten und Makrophagen beobachtet werden. Zudem wurde bei den TSLPR/ApoE-Doppelknockout-Mäusen eine geringere Rate apoptotischer Zellen in den atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen, was als Anzeichen für eine stabilere Läsion gewertet wurde. Die Ergebnisse legten nahe, dass die Reduktion der Plaques nicht allein durch ein Th1/Th2-Ungleichgewicht zu erklären waren. Vielmehr wurde der Einfluss von TSLP auf das Gleichgewicht zwischen Th17- und Treg-Zellen für diesen Effekt verantwortlich gemacht. So wurden bei den TSLPR-defizienten Mäusen erniedrigte

Spiegel von Th17-Zellen und deren assoziierten Zytokinen gemessen. Die Autoren schreiben TSLP und dem TSLP/TSLPR-Signalweg einen proinflammatorischen und somit proatherogenen Effekt zu (Wu et al., 2014).

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse gilt jedoch zu berücksichtigen, dass in der Studie eine besonders fettreiche Ernährung verwendet wurde, die zu einer signifikanten Veränderung der Entzündungsreaktion im atherosklerotischen Mausmodell führt. Im Gegensatz hierzu spielen T- und B-Lymphozyten bei der Atherosklerose normal ernährter ApoE-defizienter Mäuse, sowie bei der menschlichen Atherogenese fast keine Rolle (Dansky et al., 1997). Damit ist die Aussagekraft dieser Studie gerade hinsichtlich des TSLP/TSLPR-Signalweges modellbedingt möglicherweise zu artifiziell und somit eingeschränkt. In den Untersuchungen dieser Arbeit sowie in der Mehrzahl der aufgeführten Studien, wurde daher eine Normaldiät verwendet, um das pro- und antiatherogene Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität inklusive der T- und B-Lymphozyten zu erhalten.

Der Einfluss von TSLP auf Th17-Zellen wurde auch von Lin et al. untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in gesunden menschlichen Gefäßen kein TSLP exprimiert wird, in atherosklerotischen Läsionen hingegen schon. Weiterhin wurde beschrieben, dass durch ox-LDL unter anderem menschliche glatte Muskelzellen in Gefäßen zur Expression von TSLP angeregt werden. TSLP induziert dann über die Aktivierung dendritischer Zellen die Th17-gesteuerte Entzündungsreaktion (Lin et al., 2013). Eine abschließende wissenschaftliche Bewertung des Effekts von Th17-Zellen auf die Atherogenese steht aktuell noch aus.

Um auszuschließen, dass abseits des TSLP/TSLPR-Signalwegs andere Effekte zur Reduzierung des Plaquelast nach TSLP-Injektion geführt haben, wurden in der vorliegenden Arbeit auch TSLPR/ApoE-defiziente Mäuse untersucht. Ein positiver Effekt von TSLP auf die Plaqueeentwicklung war bei diesen Tieren, die bei der Organentnahme ebenfalls 24 Wochen alt waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr nachweisbar. Durch diesen Versuchsaufbau wurde ein alternativer Wirkungsmechanismus der TSLP-Injektionen somit weitgehend ausgeschlossen. Der TSLP/TSLPR-Signalweg scheint daher vollständig verantwortlich für die beobachteten Effekte zu sein.

In der Behandlungsstudie mit älteren männlichen ApoE-defizienten Mäusen konnte kein Effekt der Injektion mit TSLP festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass TSLP an einem früheren Zeitpunkt der Atherogenese ansetzt und bereits vorhandene Läsionen nicht mehr beeinflusst werden. Weitere Forschungsergebnisse zu diesem Thema liegen bislang nicht vor, sind jedoch von großem Interesse, um die Möglichkeiten einer Immunmodulation durch TSLP als Präventionsmaßnahme weitergehend zu untersuchen.

Hinsichtlich der Invasion von Immunzellen in die Plaques zeigte sich bei den Injektionsversuchen mit jüngeren Tieren kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Jedoch konnte bei dieser Versuchsgruppe eine insgesamt geringere Plaquelast, und somit auch ein absolut geringerer Anteil von Monozyten und Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden. Ein interessanter Versuchsaufbau von Li et al. hatte im Gegensatz dazu eine Zunahme der aus Makrophagen entstandenen Schaumzellen nach Behandlung mit TSLP gezeigt. Dies wurde durch eine Stimulation der Expression des Scavenger Rezeptors sowie einer Herunterregulation der Ausbildung von ABCA1 auf den Makrophagen erklärt (Li et al., 2014). Passend zu diesen Ergebnissen war im Untersuchungsaufbau dieser Arbeit die Migration von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Plaques in der mit TSLP behandelten Gruppe älterer Mäuse signifikant erhöht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Immunzellen erst zu einem späteren Zeitpunkt der Atherosklerose in die Läsionen einwandern.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Methodik keine funktionelle Zuordnung der einzelnen Immunzellen erlaubt. Für zukünftige Studien könnte daher interessant sein, die genaue zelluläre Zusammensetzung von Monozyten und Makrophagen in atherosklerotischen Plaques unter dem Einfluss von TSLP zu untersuchen. Damit könnten weitere funktionelle Effekte untersucht werden. Des Weiteren scheint die Quantifizierung der Makrophagen und Monozyten in den atherosklerotischen Läsionen durch die hier angewandte Methodik fehleranfällig zu sein. So kann bereits ein kleiner Prozentsatz unspezifischer immun-histochemischer Reaktion zu einer signifikanten Veränderung des prozentualen Anteils

an Immunzellen in der vermessenen Läsion führen. Hierzu wären weiterführende Studien, eventuell unter Zuhilfenahme weiterer, genauerer Methoden, empfehlenswert.

Untersuchungen zur funktionellen Zusammensetzung von Makrophagen im Zusammenhang mit Atherosklerose und TSLP wurden in den letzten Jahren bereits durchgeführt. Liu et al. untersuchten z.B. den Effekt von rekombinantem TSLP bei Mäusen im Zustand nach Myokardinfarkt. Hierbei konnte die Arbeitsgruppe einen früheren Wechsel von M1- zu M2-Makrophagen, eine verbesserte myokardiale Heilung sowie eine Verbesserung der ventrikulären Pumpfunktion nachweisen (Liu et al., 2019). Dies unterstützt die Theorie, dass die Behandlung mit TSLP, mutmaßlich über eine Aktivierung der Th2-Antwort, zu einer erhöhten Konversion von M2-Makrophagen führt und somit einen atheroprotektiven Effekt aufweist.

In einer weiteren Arbeit untersuchten Deng et al. den Effekt des TSLPR/TSLP-Signalwegs auf die Differenzierung von Makrophagen im Rahmen einer allergischen Inflammation. Hierbei konnten sie den TSLP-Rezeptor auch auf Makrophagen nachweisen und zudem eine durch TSLP/TSLPR-getriggerte Differenzierung zu M2-Makrophagen aufzeigen (Deng et al., 2019). In dieser Studie wurden konjunktivale Zellen nach Behandlung mit allergenen Pollen beobachtet. Unklar ist, ob sich diese Ergebnisse auch bei Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen reproduzieren lassen würden.

Um den Einfluss von TSLP auf verschiedene Immunzellen im peripheren Blut der behandelten Mäuse zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit auch durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Bei der dieser Analyse des peripheren Blutes ließ sich Folgendes feststellen: bei den älteren, mit TSLP behandelten Tieren, war ein im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant geringerer Anteil an CD11b⁺ Zellen nachweisbar, wohingegen im Blut der jüngeren Tiere nach der Behandlung mit TSLP ein signifikanter Anstieg CD11b⁺ Zellen zu beobachten war. Bei CD11b handelt es sich um einen immunhistochemischen Marker für vor allem murine Monozyten und Makrophagen. Rombouts et al. beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Menge zirkulierender CD11b⁺ Zellen und der Größe der Plaques (Rombouts et al., 2016). Dies passt zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen der jüngeren Tiere, nicht jedoch zum Ergebnis der älteren Vergleichsgruppe. Hier ist zu diskutieren, ob nach Abschluss der Atherogenese die Injektion von TSLP überhaupt einen signifikanten Einfluss auf das

Verhalten verschiedener Immunzellen und ihren Einfluss auf die atherosklerotischen Plaques hat. Ebenfalls könnte durch weitere Forschung beleuchtet werden, ob das Alter der Mäuse überhaupt einen Einfluss auf die Anzahl der CD11b⁺-Zellen hat, und ob der gefundene Effekt auf die TSLP-Injektion oder auf andere Einflüsse zurückzuführen ist.

Im Fokus der aktuellen Forschung zum Thema TSLP steht neben dem Einfluss auf die Atherogenese vor allem der Einfluss des Zytokins auf Erkrankungen des allergischen Formenkreises.

Wie Liu et al. in ihrem Review darlegen, handelt es sich sowohl bei allergischem Asthma als auch bei der Atherosklerose um chronisch inflammatorische Erkrankungen. Beide Entitäten weisen ähnliche Subklassen von Entzündungszellen auf. Hieraus lässt sich die Frage ableiten, ob Patienten mit allergischem Asthma ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose und den bekannten kardiovaskulären Folgeerkrankungen aufweisen, oder ob es sich bei allergischem Asthma um einen Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose handeln könnte (Liu et al., 2016). Diese Fragestellung wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Bevölkerungsstudien untersucht, konnte bislang jedoch nicht abschließend beantwortet werden. So legen einige Studien nahe, dass das Vorliegen eines allergischen Asthmas das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse erhöht, bzw. diese Patienten vermehrt atherosklerotische Läsionen aufweisen (Knoflach et al., 2005; Vijayakumar et al., 2013; Yilmaz et al., 2018). Iribarren et al. konnten bspw. ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei an Asthma erkrankten Frauen nachweisen, wohingegen bei Männern kein signifikanter Zusammenhang erkennbar war (Iribarren et al., 2004). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Onufrak et al. In deren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen im Erwachsenenalter beginnendem Asthma und der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen der Carotiden bei Frauen festgestellt werden. Bei bereits seit der Kindheit bestehendem Asthma sowie männlichem Geschlecht zeigte sich auch in dieser Studie kein signifikanter Effekt (Onufrak et al., 2007). Schanen et al. dagegen konnten in ihrer Studie weder bei Männern noch bei Frauen einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Asthma und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse zeigen (Schanen et al., 2005).

Insgesamt scheinen - gemäß aktueller Datenlage - Patienten mit allergischem Asthma ein höheres Risiko für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen zu haben. Die genaue Ursache dieses möglichen Zusammenhangs bleibt bislang unklar. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang bspw. der Einfluss übereinstimmender Signalwege sowie verschiedener, proinflammatorischer Zytokine. So spielen sowohl Mastzellen als auch Leukotriene bei beiden Erkrankungen eine zentrale Rolle. Mastzellen finden sich unter anderem in der sogenannten Schulterregion atherosklerotischer Läsionen (Kaartinen et al., 1994). Eine systemische Aktivierung von Mastzellen führte in tierexperimentellen Studien an ApoE-defizienten Mäusen zu einer Zunahme der atherosklerotischen Plaques, eine lokale Aktivierung der Mastzellen zu einer Zunahme an Hämorrhagien innerhalb der Plaques (Bot et al., 2007). Bei humanmedizinischen Untersuchungen fanden sich bei Patienten nach einem Myokardinfarkt sehr hohe Anteile an Mastzellen in den Regionen der Arterien, in denen die zum Infarkt führende Ruptur stattgefunden hatte. Ebenso wurden die Enzyme Tryptase und Chymase gefunden (Laine et al., 1999). Für beide Enzyme, die auch in der Pathogenese des allergischen Asthmas eine große Rolle spielen, konnte ein proatherogener Effekt nachgewiesen werden (Bot et al., 2011; Zhi et al., 2013).

Es gibt jedoch auch unterschiedliche Effekte der bei beiden Erkrankungen beteiligten Signalwege. Im Gegensatz zur Atherosklerose, bei der ein protektiver Effekt von M2-Makrophagen sowie dem Th2-Signalweg vermutet wird, haben diese beim allergischen Asthma eine verstärkende Wirkung (Lee et al., 2021; Liu et al., 2016; Robbe et al., 2015). Daher wäre auch ein vermindertes Auftreten von atherosklerotischen Läsionen bei an allergischem Asthma erkrankten Personen zu erwarten gewesen. Möglicherweise übertrifft der Effekt anderer beteiligter Immunzellen sowie der anderen ausgeschütteten Zytokine und Enzyme den Effekt der Th2-Aktivierung, sodass es insgesamt zu einem vermehrten Auftreten von Atherosklerose kommt.

Die Rolle von TSLP und der dadurch hervorgerufenen Th2-Antwort beim allergischen Asthma ist in den letzten zwei Jahrzehnten gut erforscht worden. Dem Zytokin wird dabei eine verstärkende Wirkung auf die Erkrankung zugeschrieben. So konnte bei Patienten mit allergischem Asthma eine vermehrte Expression von TSLP nachgewiesen werden. Dies korreliert auch mit dem Schweregrad des Asthmas (Li et al., 2018; Shikotra et al., 2012). Aus diesem Grund ist aktuell ein anti-TSLP-Antikörper (Tezepelumab) als ein

möglicher Behandlungsansatz bei unkontrolliertem allergischem Asthma Ziel der Forschung (Corren et al., 2017) und scheint hierbei eine gute Wirkung zu zeigen. Daher könnten mögliche Interaktionen zwischen einer TSLP-basierter Immunisierung gegen Atherosklerose und zum Beispiel atopischen Erkrankungen interessante Ziele zukünftiger Forschungsvorhaben sein. Eine TSLP-basierte Impfung bspw. könnte bei Menschen mit atopischen Erkrankungen zum häufigeren Auftreten unerwünschter Wirkungen führen. Des Weiteren könnte eine Behandlung mit anti-TSLP-Antikörpern die Wirkung einer TSLP-basierter Impfung beeinträchtigen. Weitere Forschungen könnten ebenfalls untersuchen, ob eine Behandlung mit anti-TSLP-Antikörpern einen negativen Effekt auf die Atherosklerose der behandelten Personen zeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Injektion von TSLP bei ApoE-defizienten, männlichen Mäusen in sehr jungem Alter eine Reduktion der Plaquegröße in signifikantem Ausmaß beobachtet werden konnte. Dies lässt auf TSLP als präventiver, immunmodulierender Ansatz in der Bekämpfung der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen hoffen. Ergänzende Untersuchungen zur Wirkungsweise von TSLP auf die Atherogenese erscheinen dabei sinnvoll, auch weil in der hier vorliegenden Arbeit nur eine kleine Fallzahl betrachtet werden konnte. Zudem konnte eine große Streuung der Daten beobachtet werden. Eine Wiederholung der Versuchsaufbauten mit einer größeren Fallzahl erscheint daher sinnvoll, um die Relevanz der Ergebnisse zu bestätigen.

5. Zusammenfassung

Bei der Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen handelt es sich um weltweit sowohl für das Individuum als auch für die Gesamtgesellschaft relevante, potenziell tödliche Erkrankungen. Da es sich bei der Atherosklerose um eine immunologische, chronisch entzündliche Erkrankung handelt, stehen auch potenzielle immunmodulatorische Behandlungsansätze zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war es, die möglicherweise protektive Wirkung einer immunmodulierenden Behandlung mit dem Zytokin Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) auf die Atherogenese zu untersuchen. Hierfür wurden in verschiedenen tierexperimentellen Versuchsaufbauten ApoE-defiziente und TSLPR/ApoE-defiziente männliche Mäuse verschiedener Altersstufen einer intraperitonealen Behandlung mit TSLP oder mit Placebo unterzogen – zum einen im Alter von sechs bis acht Wochen zur Untersuchung der prospektiven Wirksamkeit von TSLP. Zum anderen nach sechs und elf Monaten, um eine mögliche Reduktion bereits bestehender atherosklerotischer Plaques zu untersuchen. Anschließend erfolgten Untersuchungen hinsichtlich der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen, der Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die Plaques, sowie zur Verteilung von Immunzellen im peripheren Blut.

Bei den älteren, mit sechs und elf Monaten mit TSLP behandelten ApoE-defizienten Mäusen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Invasion von Monozyten und Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen. Der Anteil CD11b⁺-Zellen war bei diesen Tieren erniedrigt. In dieser Altersgruppe konnte keine Reduktion der Plaquegröße nach Gabe von TSLP beobachtet werden.

Bei den jüngeren, im Alter von sechs bis acht Wochen behandelten ApoE-defizienten Tieren zeigte sich dagegen ein signifikanter Rückgang der atherosklerotischen Plaques bei den mit TSLP behandelten Tieren im Vergleich zu der Placebo-Gruppe. Dies impliziert eine protektive Wirksamkeit von TSLP, wenn es vor der Entstehung atherosklerotischer Läsionen zur Anwendung kommt. Zudem ließ sich bei dieser Behandlungsgruppe eine Zunahme von CD11b⁺-Zellen im peripheren Blut nachweisen.

In einer Versuchsreihe mit sechs bis acht Wochen alten, TSLPR/ApoE-defizienten männlichen Mäusen konnte kein Effekt von TSLP auf die Atherogenese festgestellt

werden, wodurch ein alternativer Wirkmechanismus von TSLP abseits des TSLP/TSLPR-Signalwegs weitestgehend ausgeschlossen wurde.

Auch wenn die genauen Mechanismen der atheroprotektiven Wirkung von TSLP aktuell noch nicht vollständig verstanden sind, stellt der in dieser Arbeit untersuchte Behandlungsansatz perspektivisch somit eine Möglichkeit zur primären Prävention der Atherosklerose dar. Hieraus entsteht ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschung, die dazu beitragen könnte, einer der größten „Volkskrankheiten“ neue Behandlungsoptionen entgegenzusetzen.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: TSLP-Behandlungsstudie bei älteren ApoE-defizienten Mäusen. 29
- Abbildung 2: Infiltration der atherosklerotischen Plaques in der TSLP- 31
Behandlungsstudie bei älteren ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 3: Gewichtsprofile in der TSLP-Behandlungsstudie bei älteren ApoE- 33
defizienten Mäusen.
- Abbildung 4: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP- 35
Behandlungsstudie bei älteren ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 5: TSLP-Behandlungsstudie bei jungen ApoE-defizienten Mäusen. 37
- Abbildung 6: Infiltration der atherosklerotischen Plaques in der TSLP- 39
Behandlungsstudie bei jungen ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 7: Gewichtsprofil in der TSLP-Behandlungsstudie bei jungen ApoE- 41
defizienten Mäusen.
- Abbildung 8: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP- 42
Behandlungsstudie bei jungen ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 9: TSLP-Behandlungsstudie bei jungen TSLPR/ApoE-defizienten 45
Mäusen.
- Abbildung 10: Infiltration der atherosklerotischen Plaques in der TSLP- 47
Behandlungsstudie bei jungen TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 11: Gewichtsprofile in der TSLP-Behandlungsstudie bei jungen 49
TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen.
- Abbildung 12: FACS-Analyse des peripheren Blutes in der TSLP- 51
Behandlungsstudie bei jungen TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Durchflusszytometrie verwendete Antikörper	26
Tabelle 2: Effekt von rekombinantem TSLP auf das Gewicht von älteren ApoE-defizienten Mäusen	32
Tabelle 3: Effekt von rekombinantem TSLP auf das Gewicht der Herzen und der Milzen von älteren ApoE-defizienten Mäusen	32
Tabelle 4: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf das Körpergewicht, sowie das Gewicht der Herzen und der Milzen von jüngeren ApoE-defizienten Mäusen	40
Tabelle 5: Der Effekt von rekombinantem TSLP auf das Körpergewicht, sowie das Gewicht der Herzen und der Milzen von jüngeren TSLPR/ApoE-defizienten Mäusen	49

8. Literaturverzeichnis

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002. 3: 549–557

Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. 19: 1518–1525

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991. 11: 1223–1230

Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Leukoc Biol.* 2002. 72: 101–106

Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC, Virani SS, Williams KA, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2019. 140: e596-e646

Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, Bryngelsson C, Hedblad B, Fredrikson GN, Nilsson J, Björkbacka H. Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet.* 2012. 5: 122–131

Bernatsky S, Boivin J-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S, Gordon C, Bae S-C, Isenberg D, Zoma A, Aranow C, Dooley M-A, Nived O, Sturfelt G, Steinsson K, Alarcón G, Senécal J-L, Zummer M, Hanly J, Ensworth S, Pope J, Edworthy S, Rahman A, Sibley J, El-Gabalawy H, McCarthy T, St Pierre Y, Clarke A, Ramsey-Goldman R. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006. 54: 2550–2557

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84: 9238–9242

Binder CJ, Hartvigsen K, Chang M-K, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2004. 114: 427–437

Bochkov VN, Mechtcheriakova D, Lucerna M, Huber J, Malli R, Graier WF, Hofer E, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood*. 2002. 99: 199–206

Bot I, Bot M, van Heiningen SH, van Santbrink PJ, Lankhuizen IM, Hartman P, Gruener S, Hilpert H, van Berkel TJC, Fingerle J, Biessen EAL. Mast cell chymase inhibition reduces atherosclerotic plaque progression and improves plaque stability in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res*. 2011. 89: 244–252

Bot I, Jager SCA de, Zerneck A, Lindstedt KA, van Berkel TJC, Weber C, Biessen EAL. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2007. 115: 2516–2525

Canducci F, Saita D, Foglieni C, Piscopiello MR, Chiesa R, Colombo A, Cianflone D, Maseri A, Clementi M, Burioni R. Cross-reacting antibacterial auto-antibodies are produced within coronary atherosclerotic plaques of acute coronary syndrome patients. *PloS one*. 2012. 7: e42283

Chang MK, Bergmark C, Laurila A, Hörkkö S, Han KH, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96: 6353–6358

Choi YS, Dieter JA, Rothausler K, Luo Z, Baumgarth N. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. *Eur. J. Immunol*. 2012. 42: 120–129

Chou M-Y, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, Choi J, Perkmann T, Bäckhed F, Miller YI, Hörkkö S, Corr M, Witztum JL, Binder CJ.

Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest.* 2009. 119: 1335–1349

Corren J, Parnes JR, Wang L, Mo M, Roseti SL, Griffiths JM, van der Merwe R. Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med.* 2017. 377: 936–946

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 5134–5138

Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991. 251: 788–791

da Silva RF, Lappalainen J, Lee-Rueckert M, Kovanen PT. Conversion of human M-CSF macrophages into foam cells reduces their proinflammatory responses to classical M1-polarizing activation. *Atherosclerosis.* 2016. 248: 170–178

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science.* 1993. 259: 1739–1742

Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94: 4642–4646

Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Iwakura Y, Yagita H, Tsutsui H, Uede T. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012. 32: 273–280

Dawber TR, Moore FE, Mann GV. Coronary heart disease in the Framingham study. *Am J Public Health Nations Health.* 1957. 47: 4–24

Deng R, Chen X, Zhang Y, Bian F, Gao N, Hu J, Wang C, Souza RG de, Lu F, Pflugfelder SC, Li D-Q. Short ragweed pollen promotes M2 macrophage polarization via TSLP/TSLPR/OX40L signaling in allergic inflammation. *Mucosal Immunol.* 2019. 12: 1141–1149

- Devlin CM, Kuriakose G, Hirsch E, Tabas I. Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99: 6280–6285
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004. 328: 1519
- Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991. 138: 601–607
- Elhage R, Jawien J, Rudling M, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2003. 59: 234–240
- Engelbertsen D, Andersson L, Ljungcrantz I, Wigren M, Hedblad B, Nilsson J, Björkbacka H. T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013. 33: 637–644
- Ensan S, Li A, Besla R, Degousee N, Cosme J, Roufaiel M, Shikatani EA, El-Maklizi M, Williams JW, Robins L, Li C, Lewis B, Yun TJ, Lee JS, Wieghofer P, Khattar R, Farrokhi K, Byrne J, Ouzounian M, Zavitz CCJ, Levy GA, Bauer CMT, Libby P, Husain M, Swirski FK, Cheong C, Prinz M, Hilgendorf I, Randolph GJ, Epelman S, Gramolini AO, Cybulsky MI, Rubin BB, Robbins CS. Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol*. 2016. 17: 159–168
- Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, Celik S, Lasitschka F, Wang Y, Böckler D, Katus HA, Dengler TJ. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol*. 2009. 183: 8167–8175
- Evans HG, Gullick NJ, Kelly S, Pitzalis C, Lord GM, Kirkham BW, Taams LS. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106: 6232–6237
- Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM, Hajjar DP, Nicholson AC. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res*. 2000. 41: 688–696

Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, Leibovich SJ. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation*. 2013. 36: 921–931

Frostegård J, Ulfgrén A-K, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999. 145: 33–43

Frostegård J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T-cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb*. 1992. 12: 461–467

Galabova G, Brunner S, Winsauer G, Juno C, Wanko B, Mairhofer A, Lührs P, Schneeberger A, Bonin A von, Mattner F, Schmidt W, Staffler G. Peptide-based anti-PCSK9 vaccines - an approach for long-term LDLc management. *PloS one*. 2014. 9: e114469

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 2003. 19: 71–82

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*. 1981a. 103: 181–190

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1981b. 103: 191–200

Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol*. 1979. 95: 775–792

Gillotte-Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2001. 42: 1474–1482

Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, Böckler D, Katus HA, Ley K. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res*. 2010. 106: 203–211

- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979. 76: 333–337
- Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerdts S. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol*. 2001. 53: 386–392
- Grinberg S, Hasko G, Wu D, Leibovich SJ. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am J Pathol*. 2009. 175: 2439–2453
- Habets KLL, van Puijvelde GHM, van Duivenvoorde LM, van Wanrooij EJA, Vos P de, Tervaert J-WC, van Berkel TJC, Toes REM, Kuiper J. Vaccination using oxidized low-density lipoprotein-pulsed dendritic cells reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2010. 85: 622–630
- Han H, Headley MB, Xu W, Comeau MR, Zhou B, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages. *J Immunol*. 2013. 190: 904–912
- Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest*. 1997. 99: 2075–2081
- Hegy L, Skepper JN, Cary NRB, Mitchinson MJ. Foam Cell Apoptosis and the Development of the lipid Core of human Atherosclerosis. *J. Pathol*. 1996. 180: 423–429
- Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981. 78: 6499–6503
- Hermansson A, Ketelhuth DFJ, Strodthoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, Paulsson-Berne G, Hansson GK. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med*. 2010. 207: 1081–1093

Hilgendorf I, Theurl I, Gerhardt LMS, Robbins CS, Weber GF, Gonen A, Iwamoto Y, Degousee N, Holderried TAW, Winter C, Zirlik A, Lin HY, Sukhova GK, Butany J, Rubin BB, Witztum JL, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation*. 2014. 129: 1677–1687

Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LTH, Klareskog L, Nyberg F, Rantapää-Dahlqvist S, Alfredsson L, Askling J. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med*. 2010. 268: 578–585

Hörkkö S, Bird DA, Miller E, Itabe H, Leitinger N, Subbanagounder G, Berliner JA, Friedman P, Dennis EA, Curtiss LK, Palinski W, Witztum JL. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin Invest*. 1999. 103: 117–128

Houtkamp MA, Boer OJ de, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. *J. Pathol*. 2001. 193: 263–269

Iribarren C, Tolstykh IV, Eisner MD. Are patients with asthma at increased risk of coronary heart disease? *Int J Epidemiol*. 2004. 33: 743–748

Ito T, Wang Y-H, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX-F, Yao Z, Cao W, Liu Y-J. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*. 2005. 202: 1213–1223

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1986: 131–138

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998. 160: 3513–3521

Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation*. 1994. 90: 1669–1678

Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res*. 2010. 107: 737–746

Kawakami R, Nozato Y, Nakagami H, Ikeda Y, Shimamura M, Yoshida S, Sun J, Kawano T, Takami Y, Noma T, Rakugi H, Minamino T, Morishita R. Development of vaccine for dyslipidemia targeted to a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) epitope in mice. *PloS one*. 2018. 13: e0191895

King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002. 22: 456–461

Knoflach M, Kiechl S, Mayr A, Willeit J, Poewe W, Wick G. Allergic rhinitis, asthma, and atherosclerosis in the Bruneck and ARMY studies. *Arch Intern Med*. 2005. 165: 2521–2526

Kröger K. 291e Pathogenese, Prävention und Behandlung der Atherosklerose. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*: ABW Verlag, 2016

Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002. 277: 49982–49988

Kyaw T, Tay C, Khan A, Dumouchel V, Cao A, To K, Kehry M, Dunn R, Agrotis A, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol*. 2010. 185: 4410–4419

Kyaw T, Tay C, Krishnamurthi S, Kanellakis P, Agrotis A, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases

IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2011. 109: 830–840

Kyaw T, Winship A, Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, Li P, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation.* 2013. 127: 1028–1039

Laine P, Kaartinen M, Penttilä A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation.* 1999. 99: 361–369

Landis RC, Philippidis P, Domin J, Boyle JJ, Haskard DO. Haptoglobin Genotype-Dependent Anti-Inflammatory Signaling in CD163(+) Macrophages. *Int J Inflam.* 2013. 2013: 980327

Landlinger C, Pouwer MG, Juno C, van der Hoorn JWA, Pieterman EJ, Jukema JW, Staffler G, Princen HMG, Galabova G. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden.CETP mice. *Eur Heart J.* 2017. 38: 2499–2507

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001. 194: 809–821

Lee J-W, Chun W, Lee HJ, Min J-H, Kim S-M, Seo J-Y, Ahn K-S, Oh S-R. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Cells.* 2021. 10

Lee J-Y, Lim Y-M, Park M-J, Min S-Y, Cho M-L, Sung Y-C, Park S-H, Kim H-Y, Cho Y-G. Murine thymic stromal lymphopoietin promotes the differentiation of regulatory T cells from thymic CD4(+)CD8(-)CD25(-) naïve cells in a dendritic cell-independent manner. *Immunol Cell Biol.* 2008. 86: 206–213

Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, Farr AG. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol.* 1999. 162: 677–683

- Lewis MJ, Malik TH, Ehrenstein MR, Boyle JJ, Botto M, Haskard DO. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2009. 120: 417–426
- Li D-Z, Wang B-Y, Yang B-J, He S-L, Lin J, Dong J-C, Wu C, Hu J. Thymic stromal lymphopoietin promotes macrophage-derived foam cell formation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014. 34: 23–28
- Li Y, Wang W, Lv Z, Li Y, Chen Y, Huang K, Corrigan CJ, Ying S. Elevated Expression of IL-33 and TSLP in the Airways of Human Asthmatics In Vivo: A Potential Biomarker of Severe Refractory Disease. *J Immunol*. 2018. 200: 2253–2262
- Lin J, Chang W, Dong J, Zhang F, Mohabeer N, Kushwaha KK, Wang L, Su Y, Fang H, Li D. Thymic stromal lymphopoietin over-expressed in human atherosclerosis: potential role in Th17 differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2013. 31: 305–318
- Lin P, Ji H-H, Li Y-J, Guo S-D. Macrophage Plasticity and Atherosclerosis Therapy. *Front Mol Biosci*. 2021. 8: 679797
- Lipton BA, Parthasarathy S, Ord VA, Clinton SK, Libby P, Rosenfeld ME. Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 alpha production by rabbit arterial macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res*. 1995. 36: 2232–2242
- Liu C-L, Zhang J-Y, Shi G-P. Interaction between allergic asthma and atherosclerosis. *Transl Res*. 2016. 174: 5–22
- Liu D, Guo M, Zhou P, Xiao J, Ji X. TSLP promote M2 macrophages polarization and cardiac healing after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019. 516: 437–444
- Liu G, Ma H, Qiu L, Li L, Cao Y, Ma J, Zhao Y. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in mice. *Immunol Cell Biol*. 2011. 89: 130–142
- Look DC, Pelletier MR, Holtzman MJ. Selective interaction of a subset of interferon-gamma response element-binding proteins with the intercellular adhesion molecule-1

(ICAM-1) gene promoter controls the pattern of expression on epithelial cells. *The J Biol Chem.* 1994. 269: 8952–8958

Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet.* 2014. 383: 999–1008

Maldonado-López R, Smedt T de, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med.* 1999. 189: 587–592

Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Lesèche G, Chvatchko Y, Tedgui A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation.* 2001a. 104: 1598–1603

Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2003. 108: 1232–1237

Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001b. 89: 930–934

Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa I, Kanamori H, Aburatani H, Takaku F, Suzuki H. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 9133–9137

McFadden ER, Gilbert IA. Asthma. *N Engl J Med.* 1992. 327: 1928–1937

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997. 388: 394–397

Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005. 25: 1213–1219

Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2006. 27: 2530–2537

Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998. 18: 842–851

Nettersheim FS, Vore L de, Winkels H. Vaccination in Atherosclerosis. *Cells.* 2020. 9

Newton AH, Benedict SH. Low density lipoprotein promotes human naive T cell differentiation to Th1 cells. *Hum Immunol.* 2014. 75: 621–628

Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW, Schut A, Opstal TSJ, The SHK, Xu X-F, Ireland MA, Lenderink T, Latchem D, Hoogslag P, Jerzewski A, Nierop P, Whelan A, Hendriks R, Swart H, Schaap J, Kuijper AFM, van Hessen MWJ, Saklani P, Tan I, Thompson AG, Morton A, Judkins C, Bax WA, Dirksen M, Alings M, Hankey GJ, Budgeon CA, Tijssen JGP, Cornel JH, Thompson PL. Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med.* 2020. 383: 1838–1847

O'Donoghue ML, Glaser R, Cavender MA, Aylward PE, Bonaca MP, Budaj A, Davies RY, Dellborg M, Fox KAA, Gutierrez JAT, Hamm C, Kiss RG, Kovar F, Kuder JF, Im KA, Lepore JJ, Lopez-Sendon JL, Ophuis TO, Parkhomenko A, Shannon JB, Spinar J, Tanguay J-F, Ruda M, Steg PG, Theroux P, Wiviott SD, Laws I, Sabatine MS, Morrow DA. Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *J Am Med Assoc.* 2016. 315: 1591–1599

Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2005. 180: 11–17

Omori M, Ziegler S. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*. 2007. 178: 1396–1404

Onufrak S, Abramson J, Vaccarino V. Adult-onset asthma is associated with increased carotid atherosclerosis among women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis*. 2007. 195: 129–137

Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. 86: 1372–1376

Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Farr AG, Ziegler SF, Morrissey PJ, Paxton R, Sims JE. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J Exp Med*. 2000. 192: 659–670

Peng Y, Meng K, Jiang L, Zhong Y, Yang Y, Lan Y, Zeng Q, Cheng L. Thymic stromal lymphopoietin-induced HOTAIR activation promotes endothelial cell proliferation and migration in atherosclerosis. *Biosci Rep*. 2017. 37

Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest*. 1999. 103: 1547–1560

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987. 84: 2995–2998

Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, Waal Malefyt R de, Kastelein RA, Bazan JF. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol*. 2001. 167: 336–343

Reid DD. Smoking and other risk factors for coronary heart disease in British civil servants. *Lancet*. 1976: pp. 979-984

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997. 336: 973–979

Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, MacFadyen JG, Solomon DH, Zaharris E, Mam V, Hasan A, Rosenberg Y, Iturriaga E, Gupta M, Tsigoulis M, Verma S, Clearfield M, Libby P, Goldhaber SZ, Seagle R, Ofori C, Saklayen M, Butman S, Singh N, Le May M, Bertrand O, Johnston J, Paynter NP, Glynn RJ. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med*. 2019. 380: 752–762

Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017a. 377: 1119–1131

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000. 342: 836–843

Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, Brunell R, Curto M, Civeira F, Flather M, Glynn RJ, Gregoire J, Jukema JW, Karpov Y, Kastelein JJP, Koenig W, Lorenzatti A, Manga P, Masiukiewicz U, Miller M, Mosterd A, Murin J, Nicolau JC, Nissen S, Ponikowski P, Santos RD, Schwartz PF, Soran H, White H, Wright RS, Vrablik M, Yunis C, Shear CL, Tardif J-C. Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients. *N Engl J Med*. 2017b. 376: 1527–1539

Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005. 6: 507–514

Robbe P, Draijer C, Borg TR, Luinge M, Timens W, Wouters IM, Melgert BN, Hylkema MN. Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015. 308: L358-67

Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo J-L, Gorbatov R, Sukhova GK, Gerhardt LMS, Smyth D, Zavitz CCJ, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK.

Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013. 19: 1166–1172

Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2012. 60: 1512–1520

Rombouts M, Ammi R, van Brussel I, Roth L, Winter BY de, Vercauteren SR, Hendriks JMH, Lauwers P, van Schil PE, Meyer GRY de, Franssen E, Cools N, Schrijvers DM. Linking CD11b (+) Dendritic Cells and Natural Killer T Cells to Plaque Inflammation in Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2016: 6467375

Rosenfeld SM, Perry HM, Gonen A, Prohaska TA, Srikakulapu P, Grewal S, Das D, McSkimming C, Taylor AM, Tsimikas S, Bender TP, Witztum JL, McNamara CA. B-1b Cells Secrete Atheroprotective IgM and Attenuate Atherosclerosis. *Circ Res.* 2015. 117: e28-39

Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977. 86: 675–684

Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973. 180: 1332–1339

Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JF, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017. 376: 1713–1722

Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, Shinohara M, Nakajima K, Tawa H, Usui T, Hirata K-I. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2009. 120: 1996–2005

Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. 2017. 541: 96–101

Schanen JG, Iribarren C, Shahar E, Punjabi NM, Rich SS, Sorlie PD, Folsom AR. Asthma and incident cardiovascular disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Thorax*. 2005. 60: 633–638

Seo J-W, Yang E-J, Yoo K-H, Choi I-H. Macrophage Differentiation from Monocytes Is Influenced by the Lipid Oxidation Degree of Low Density Lipoprotein. *Mediators Inflamm*. 2015. 2015: 235797

Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995. 92: 1565–1569

Shikotra A, Choy DF, Ohri CM, Doran E, Butler C, Hargadon B, Shelley M, Abbas AR, Austin CD, Jackman J, Wu LC, Heaney LG, Arron JR, Bradding P. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012. 129: 104-11.e1-9

Skålen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002. 417: 750–754

Smith E, Prasad K-MR, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, Galkina E. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2010. 121: 1746–1755

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92: 8264–8268

Smith W, Feldmann M, Londei M. Human macrophages induced in vitro by macrophage colony-stimulating factor are deficient in IL-12 production. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 2498–2507

Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic. *Nat Rev Drug Discov.* 2021

Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, Waal-Malefyt Rd R de, Bazan F, Kastelein RA, Liu Y-J. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 2002. 3: 673–680

Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistisches Jahrbuch 2019, Kapitel 4 - Gesundheit. 2019: 127–162

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992. 176: 287–292

Steinmetz M, Laurans L, Nordsiek S, Weiß L, van der Veken B, Ponnuswamy P, Esposito B, Vandestienne M, Giraud A, Göbbel C, Steffen E, Radecke T, Potteaux S, Nickenig G, Rassaf T, Tedgui A, Mallat Z. Thymic stromal lymphopoietin is a key cytokine for the immunomodulation of atherogenesis with Freund's adjuvant. *J Cell Mol Med.* 2020

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92: 3893–3897

Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2010. 11: 155–161

Strom AC, Cross AJ, Cole JE, Blair PA, Leib C, Goddard ME, Rosser EC, Park I, Hultgårdh Nilsson A, Nilsson J, Mauri C, Monaco C. B regulatory cells are increased

in hypercholesterolaemic mice and protect from lesion development via IL-10.

Thromb Haemost. 2015. 114: 835–847

Sun J, Hartvigsen K, Chou M-Y, Zhang Y, Sukhova GK, Zhang J, Lopez-Illasaca M, Diehl CJ, Yakov N, Harats D, George J, Witztum JL, Libby P, Ploegh H, Shi G-P. Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice. Circulation. 2010. 122: 808–820

Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. J Exp Med. 1998. 188: 217–222

Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103: 10340–10345

Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. J Exp Med. 2009. 206: 2067–2077

Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015. 35: 258–264

Tao L, Zhu J, Chen Y, Wang Q, Pan Y, Yu Q, Zhou B, Zhu H. IL-35 improves Treg-mediated immune suppression in atherosclerotic mice. Exp Ther Med. 2016. 12: 2469–2476

Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, López-Sendón J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Grégoire JC, Lavoie M-A, Dubé M-P, Rhoads D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin M-C, Roubille F. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. N Engl J Med. 2019. 381: 2497–2505

Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. Lancet. 2006. 368: 647–658

van Duijn J, Kritikou E, Benne N, van der Heijden T, van Puijvelde GH, Kröner MJ, Schaftenaar FH, Foks AC, Wezel A, Smeets H, Yagita H, Bot I, Jiskoot W, Kuiper J, Slütter B. CD8+ T-cells contribute to lesion stabilization in advanced atherosclerosis by limiting macrophage content and CD4+ T-cell responses. *Cardiovasc Res.* 2019. 115: 729–738

van Roey GA, Arias MA, Tregoning JS, Rowe G, Shattock RJ. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) acts as a potent mucosal adjuvant for HIV-1 gp140 vaccination in mice. *Eur J Immunol.* 2012. 42: 353–363

Verreck FAW, Boer T de, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, Waal-Malefyt R de, Ottenhoff THM. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101: 4560–4565

Vijayakumar J, Subramanian S, Singh P, Corsini E, Fontanez S, Lawler M, Kaplan R, Brady TJ, Hoffmann U, Tawakol A. Arterial inflammation in bronchial asthma. *J Nucl Cardiol.* 2013. 20: 385–395

Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefässsystem. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin.* 1856: 458pp

Wang B, Peng Y, Dong J, Lin J, Wu C, Su Y, Fang H, Wang L, Huang K, Li D. Human platelets express functional thymic stromal lymphopoietin receptors: a potential role in platelet activation in acute coronary syndrome. *Cell Physiol Biochem.* 2013. 32: 1741–1750

Wang Y, Li W, Zhao T, Zou Y, Deng T, Yang Z, Yuan Z, Ma L, Yu R, Wang T, Yu C. Interleukin-17-Producing CD4+ T Cells Promote Inflammatory Response and Foster Disease Progression in Hyperlipidemic Patients and Atherosclerotic Mice. *Front Cardiovasc Med.* 2021. 8: 667768

White HD, Held C, Stewart R, Tarka E, Brown R, Davies RY, Budaj A, Harrington RA, Steg PG, Ardissino D, Armstrong PW, Avezum A, Aylward PE, Bryce A, Chen H, Chen M-F, Corbalan R, Dalby AJ, Danchin N, Winter RJ de, Denchev S, Diaz R, Elisaf M, Flather MD, Goudev AR, Granger CB, Grinfeld L, Hochman JS, Husted S, Kim H-S, Koenig W, Linhart A, Lonn E, López-Sendón J, Manolis AJ, Mohler ER,

Nicolau JC, Pais P, Parkhomenko A, Pedersen TR, Pella D, Ramos-Corrales MA, Ruda M, Sereg M, Siddique S, Sinnaeve P, Smith P, Sritara P, Swart HP, Sy RG, Teramoto T, Tse H-F, Watson D, Weaver WD, Weiss R, Viigimaa M, Vinereanu D, Zhu J, Cannon CP, Wallentin L. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2014. 370: 1702–1711

Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ Res*. 2002. 90: E34-8

Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous Interferon- γ Enhances Atherosclerosis in Apolipoprotein E-/- Mice. *Am J Pathol*. 2000. 157: 1819–1824

WHO. Hearts technical package for cardiovascular disease management in primary health care. 2015

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995. 15: 551–561

Wu C, He S, Peng Y, Kushwaha KK, Lin J, Dong J, Wang B, Lin J, Shan S, Liu J, Huang K, Li D. TSLPR deficiency attenuates atherosclerotic lesion development associated with the inhibition of TH17 cells and the promotion of regulator T cells in ApoE-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2014. 76: 33–45

Wurtz O, Bajénoff M, Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int Immunol* 2004. 16: 501–508

Yılmaz M, Bozkurt Yılmaz HE, Şen N, Altın C, Tekin A, Müderrisoğlu H. Investigation of the relationship between asthma and subclinical atherosclerosis by carotid/femoral intima media and epicardial fat thickness measurement. *J Asthma*. 2018. 55: 50–56

Ylä-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*. 1994. 14: 32–40

Yu K, Zhu P, Dong Q, Zhong Y, Zhu Z, Lin Y, Huang Y, Meng K, Ji Q, Yi G, Zhang W, Wu B, Mao Y, Cheng P, Zhao X, Mao X, Zeng Q. Thymic stromal lymphopoietin

attenuates the development of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc.* 2013. 2: e000391

Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004. 364: 937–952

Zhao H, Li M, Wang L, Su Y, Fang H, Lin J, Mohabeer N, Li D. Angiotensin II induces TSLP via an AT1 receptor/NF-KappaB pathway, promoting Th17 differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2012. 30: 1383–1397

Zhi X, Xu C, Zhang H, Tian D, Li X, Ning Y, Yin L. Tryptase promotes atherosclerotic plaque haemorrhage in ApoE^{-/-} mice. *PloS one.* 2013. 8: e60960

Zhong Y, Wang X, Ji Q, Mao X, Tang H, Yi G, Meng K, Yang X, Zeng Q. CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induced by nasal oxidized low-density lipoprotein suppress effector T cells response and attenuate atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *J Clin Immunol.* 2012. 32: 1104–1117

Zhou X, Hansson GK. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scand J Immunol.* 1999. 50: 25–30

Zhou X, Robertson A-KL, Rudling M, Parini P, Hansson GK. Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis. *Circ Res.* 2005. 96: 427–434

Zimmer S, Goody PR, Oelze M, Ghanem A, Mueller CF, Laufs U, Daiber A, Jansen F, Nickenig G, Wassmann S. Inhibition of Rac1 GTPase Decreases Vascular Oxidative Stress, Improves Endothelial Function, and Attenuates Atherosclerosis Development in Mice. *Front Cardiovasc Med.* 2021. 8: 680775

Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol.* 2012. 189: 3508–3520

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Zimmer danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn PD Dr. med. Martin Steinmetz danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Frau Dr. med. Eva Steffen danke ich für die Unterstützung und Hilfe im Labor, vor allem beim FACS. Herrn Dr. med. Tobias Radeke danke ich für die Unterstützung bei der Entwicklung der immunhistochemischen Protokolle.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Klinik II, vor allem Frau Christina Goebbel und Frau Dr. med. Sarah Nordsiek, die durch Ihre Hilfe und Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Meinen Eltern möchte ich für die unermüdliche Unterstützung sowohl während des Verfassens dieser Arbeit als auch während des gesamten Studiums und darüber hinaus danken.

Stefan danke ich für die motivierenden und ermutigenden Gespräche, die mich während des Verfassens dieser Arbeit sehr unterstützt haben