

Aus dem Institut für Experimentelle Biomedizin Lehrstuhl II
der Universität Würzburg
Vorstand: Professorin Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

Die Rolle von HIF-1 α in T-Zellen bei kardiovaskulären Erkrankungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Tim Knochenhauer
aus Wiesbaden

Würzburg, April 2023

Referentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Korreferentin: Prof. Dr. Kristina Lorenz

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2023

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Klinische Relevanz	1
1.1.2	Pathogenese	1
1.1.3	Lymphozyten	4
1.2	Myokardinfarkt	5
1.2.1	Klinische Relevanz	5
1.2.2	Pathogenese	6
1.2.3	Lymphozyten	9
1.3	Hypoxie-induzierte Faktoren	12
1.3.1	Sauerstoffhomöostase und Stoffwechsel	12
1.3.2	Aufbau, Funktion und Regulation von HIF	13
1.3.3	HIF und Hypoxie in Inflammation und in kardiovaskulären Erkrankungen	16
1.3.4	HIF in der Atherosklerose	16
1.3.5	HIF im Myokardinfarkt	17
1.3.6	HIF in T-Zellen	18
1.4	Zielsetzung der Dissertationsarbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Tierversuchsvotum	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Tiere	21
2.2.1.1	Tierhaltung	21
2.2.1.2	Mauslinien	21
2.2.1.3	Induktion von Atherosklerose	23
2.2.1.4	Induktion von Myokardinfarkt	23
2.2.1.5	Tötung und Organprozessierung	23
2.2.1.6	Cholesterollmessung im Serum	25
2.2.2	Histologie	26
2.2.2.1	Gewebepräparation	26
2.2.2.2	Immunhistochemie	28
2.2.2.3	Anfärbung von Elastin der Aortenwurzeln	29
2.2.2.4	Oil-Red O Färbung	30
2.2.2.5	WGA Lektin Färbung der infarzierten Herzen	30
2.2.2.6	Analyse der Plaquesfläche der Aorten	31
2.2.2.7	Analyse der Plaquezusammensetzung	31
2.2.2.8	Analyse der Kardiomyozytenfläche im infarzierten Herz	32
2.2.2.9	Analyse der Kapillardichte im infarzierten Herzen	32
2.2.3	Zellkultur	33
2.2.3.1	Isolation von CD4 ⁺ T-Zellen aus der Milz	33
2.2.3.2	Isolation von CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz	34
2.2.3.3	In vitro T-Zell Aktivierung und Polarisation	34
2.2.3.4	Zugabe von CoCl ₂ zu T-Zellen	35
2.2.3.5	In vitro T-Zell Stimulation	35
2.2.4	Nukleinsäure Detektionstechniken	36
2.2.4.1	mRNA Isolation aus der Milz	36

2.2.4.2	mRNA Isolation aus Zellen	36
2.2.4.3	cDNA Synthese	36
2.2.4.4	Quantitative real time PCR	37
2.2.5	Durchflusszytometrie	38
2.2.5.1	Prinzip	38
2.2.5.2	Oberflächenfärbung	39
2.2.5.3	Intrazelluläre Färbung	39
2.3	Material	40
2.3.1	Verbrauchsmaterial	40
2.3.2	Instrumente und Geräte	41
2.3.3	Reaktionskits	43
2.3.4	Chemikalien und Reagenzien	43
2.3.5	Zytokine	45
2.3.6	Antikörper	46
2.3.6.1	Fluoreszierende Antikörperkonjugate	46
2.3.6.2	Primäre Antikörper	47
2.3.6.3	Sekundäre Antikörper	48
2.3.6.4	Isotyp-Kontrollen	48
2.3.7	Primer	48
2.3.8	Software	50
2.3.9	Puffer, Lösungen und Medien	50
2.3.10	Mausstämme	53
2.4	Statistische Auswertung	53
3	Ergebnisse	54
3.1	HIF-1α in T-Zellen - In vitro Daten	54
3.1.1	CD4cre ⁺ HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse exprimierten keine HIF-1 α mRNA	54
3.1.2	T _H 1-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1 α Defizienz keine Veränderung der Anzahl oder Produktion von IFN γ und TNF α	55
3.1.3	T _H 17-Zellen in vitro waren bei HIF-1 α Defizienz unter Hypoxiesimulation vermindert nachweisbar	57
3.1.4	T _{reg} -Zellen in vitro wurden bei HIF-1 α Defizienz vermehrt gebildet	58
3.1.5	CD8 ⁺ T-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1 α Defizienz eine verstärkte Produktion von mRNA des Proteins Perforin	59
3.2	HIF-1α in T-Zellen im Myokardinfarkt	62
3.2.1	Die Fläche der Kardiomyozyten im infarzierten Herzen wurde durch HIF-1 α Defizienz in T-Zellen nicht verändert	62
3.2.2	Die Dichte der Kapillaren im infarzierten Myokard wurde bei HIF-1 α Defizienz in T-Zellen nicht verändert	63
3.3	HIF-1α in T-Zellen in Atherosklerose nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät	65
3.3.1	Eine HIF-1 α Defizienz in T-Zellen aggravierte das Ausmaß atherosklerotischer Plaques in LDLR ^{-/-} Mäusen	66
3.3.2	Plaques von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen zeigten nach acht Wochen Western-Typ Diät einen verminderten Makrophagenanteil	68
3.3.3	T-Zell Phänotyp in Atherosklerose	70
3.3.3.1	Achtwöchige Western-Typ Diät induzierte eine Expansion von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen in peripheren Lymphknoten in LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen	70

3.3.3.2	Achtwöchige Western-Typ Diät in LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen führte zu keiner Veränderung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen in der Milz	72
3.3.3.3	Achtwöchige Western-Typ Diät induzierte in LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen eine Expansion von CD4 ⁺ T-Zellpopulationen im Blut	74
3.3.4	Im Blut von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen zeigte sich nach achtwöchiger Western-Typ Diät eine verminderte Aktivierung CD4 ⁺ T-Lymphozyten	75
3.3.5	T _H 1-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokin mRNA Expression in Milz und peripheren Lymphknoten	77
3.3.6	T _H 17-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokin mRNA Expression in Milz und peripheren Lymphknoten	78
3.3.7	T _{reg} -Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl in Milz und peripheren Lymphknoten	80
3.3.8	CD8 ⁺ T-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz eine vermehrte IFNγ Produktion in Milz und peripheren Lymphknoten	81
3.3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	83
4	Diskussion	84
4.1	Diskussion der Ergebnisse und Hypothesen	84
4.1.1	Einführung in die Diskussion	84
4.1.2	HIF-1α in T-Lymphozyten in der Atherosklerose	84
4.1.2.1	T-Zell Aktivierung	87
4.1.3	HIF-1α in T-Zellen im Myokardinfarkt	88
4.2	Limitationen der Studie	88
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	90
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	93
Anhang		
Abkürzungsverzeichnis		
Abbildungsverzeichnis		
Tabellenverzeichnis		
Danksagung		
Lebenslauf		
Eigene Veröffentlichungen/Kongressteilnahmen		

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Klinische Relevanz

Die Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung mittelgroßer und großer arterieller Gefäße [1]. Sie ist charakterisiert durch Einlagerungen von Lipiden in die Gefäßwand, welche zur Ausbildung von Plaques führen [2, 3]. Oftmals sind diese Plaques lange Zeit asymptomatisch und eine Entwicklung möglicher Folgeerkrankungen vollzieht sich über viele Jahre. Kommt es jedoch zur Manifestation der Folgeerkrankungen – hauptsächlich Myokardinfarkt und Schlaganfall [1, 4] – ist die Letalität hoch. Atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit, vor allem bei Personen über dem 50. Lebensjahr [5].

Durch die Vielzahl an experimentellen und klinischen Studien sind heute zahlreiche Risikofaktoren für die Ausbildung einer Atherosklerose bekannt. Diese werden in Haupt- und Nebenrisikofaktoren unterteilt. Die Hauptrisikofaktoren setzen sich aus Dyslipidämie, arterieller Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Adipositas zusammen [6]. Nebenrisikofaktoren sind unter anderem Bewegungsmangel, eine fettreiche Ernährung, eine genetische Vorbelastung bei positiver Familienanamnese, hohes Lebensalter und männliches Geschlecht [7].

Folgeerkrankungen der Atherosklerose werden als „atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen“ (*atherosclerotic cardiovascular disease*; ASCVD) bezeichnet. Sie können langsam durch eine zunehmende Stenosierung eines Gefäßes symptomatisch werden oder akut durch einen plötzlichen Gefäßverschluss als Folge einer Plaqueruptur oder -erosion. Die Symptome ergeben sich aus der jeweiligen Lokalisation der Atherosklerose. Pektanginöse Beschwerden sind typisch für Plaques der Koronargefäße, die Claudicatio intermittens zeigt sich als Korrelat der Gefäße der Extremitäten, transiente oder bleibende fokale-neurologische Defizite können als Folge von Atherosklerose der hirnversorgenden Gefäße auftreten [8].

1.1.2 Pathogenese

Das aktuell gängigste Erklärungsmodell der Entstehung der Atherosklerose ist die „*Response to injury*-Hypothese“ von Ross. Diese beschreibt die Atherosklerose als

chronische Entzündungsreaktion, die als Folge einer Schädigung des Gefäßendothels auftritt [1]. Ursächlich für die Gefäßschädigung kann chronischer Stress auf die Gefäßwände, beispielsweise durch arterielle Hypertonie, Entzündungsprozesse oder Scherkräfte sein. Besonders an Verzweigungen oder Krümmungen von Arterien kommt es zu einer Reduktion der Blutflussgeschwindigkeit und zur Entstehung oszillierender Scherspannungen. Hierdurch wird eine Endotheldysfunktion und damit die Ausbildung von Atherosklerose gefördert [9]. Daher sind atherosklerotische Plaques prädestiniert an Gefäßkrümmungen oder -abgängen ausgebildet.

Von der Atherosklerose betroffen ist die Intima, die innerste Schicht der Gefäße [10]. Wirkt chronischer Stress auf die Gefäßwände, resultiert eine Endotheldysfunktion mit folgender Infiltration und Akkumulation von Immunzellen und *low density* Lipoprotein (LDL) in die Intima [2, 6].

Das LDL wird durch Proteasen, Lipasen, Myeloperoxidasen und Lipoxygenasen zu oxidiertem LDL (oxLDL) umgewandelt und löst eine Immunantwort aus [11]. Als Folge der Lipideinlagerungen exprimieren Endothelzellen verschiedene Adhäsionsmoleküle wie das *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) [12, 13]. Über dieses werden Monozyten und Lymphozyten gebunden und in die Gefäßwand aufgenommen. Monozyten differenzieren unter Einfluss von Wachstumsfaktoren, vor allem dem *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zu Makrophagen, die die größte Zellpopulation in der Plaque bilden [14, 15]. Der Einschluss von oxLDL in die Makrophagen führt zur Ausbildung sogenannter Schaumzellen, welche proinflammatorische Zytokine sezernieren [16, 17]. Die vitalen Schaumzellen bilden in der Gefäßwand mikroskopisch den Fettstreifen (*fatty streak*). Schaumzellen sind zudem nicht mehr in der Lage, die Plaque zu verlassen, sterben ab und bilden damit neben weiteren apoptotischen Zellen, Cholesterin-Kristallen und Extrazellulärmatrix einen großen Anteil am nekrotischen Kern der Plaque [18].

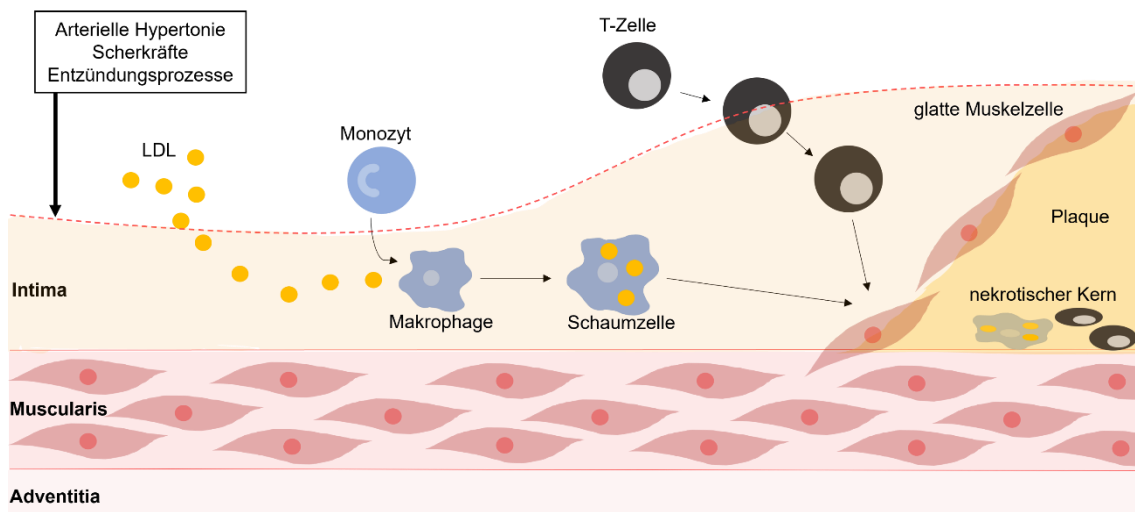


Abbildung 1 Pathogenese der Atherosklerose Auslösende Faktoren wie chronischer Stress auf die Gefäßwände durch arterielle Hypertonie, Entzündungsprozesse oder Scherkräfte führen zu Gefäßschädigungen. Von der Atherosklerose betroffen ist die innerste Gefäßwand, die Intima [10]. Die durch oben genannte Faktoren begünstigte Endotheldysfunktion zieht eine Infiltration und Akkumulation von Immunzellen und *low density* Lipoprotein (LDL) in die Intima nach sich [2, 6]. Das LDL wird durch Proteasen, Lipasen, Myeloperoxidasen und Lipoxygenasen zu oxidiertem LDL (oxLDL) umgewandelt und löst so eine Immunantwort aus [11]. Als Folge der Lipideinlagerungen exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle [12, 13]. Über diese werden Monozyten und Lymphozyten gebunden und in die Gefäßwand aufgenommen. Die Monozyten differenzieren unter Einfluss von Wachstumsfaktoren zu Makrophagen. Der Einschluss von oxLDL in die Makrophagen führt zur Ausbildung sogenannter Schaumzellen [16]. Schaumzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine [17]. Sie sind zudem nicht mehr in der Lage, die Plaque zu verlassen, sterben ab und bilden damit neben weiteren apoptotischen Zellen, Cholesterin-Kristallen und Extrazellulärmatrix einen großen Anteil am nekrotischen Kern der Plaque [18]. Die Abbildung wurde generiert in Anlehnung an [19].

Risikofaktoren für Plaqueruptur oder -erosion sind unter anderem eine dünne fibröse Kappe, ein großer nekrotischer Kern und eine ausgeprägte Entzündungsreaktion [20]. Plaques mit einem hohen Rupturrisiko werden als instabil bezeichnet. Dem wirken plaquestabilisierende Prozesse wie die Proliferation glatter Muskelzellen oder eine Ablagerung von Extrazellulärmatrix und Kollagen entgegen. Beeinflusst werden diese Prozesse unter anderem durch die Mediatoren *transforming growth factor β* (TGFβ), welches plaquestabilisierend wirkt, und Interferon γ (IFNγ), welches sich negativ auf die Stabilität auswirkt [21-23]. Eine akute Ruptur der Plaque, wie sie infolge eines verstärkten Matrixabbaus auftreten kann, kann innerhalb weniger Minuten zu einer Thrombusbildung oder Embolien führen und ist damit eine akut lebensbedrohliche Komplikation der Atherosklerose [20, 24]. Bei einer Plaqueruptur wird thrombogenes Material aus der Plaque freigesetzt und sorgt für die Ausbildung eines Thrombus, der zum Gefäßverschluss führen kann. Ein solcher Thrombus entsteht durch die Thrombin-

vermittelte Fibrinbildung aus Fibrinogen mit folgender Thrombozytenaggregation. Neben der Ruptur der Plaque wird auch die bisher weniger erforschte Plaqueerosion beschrieben. Hierbei zeigt die Plaquecharakterisierung meist eine ausgeprägte extrazelluläre Matrix sowie weniger Inflammation und Lipid, wobei der genaue Mechanismus der Erosion bisher noch nicht bekannt ist [19].

Bei zunehmendem Volumen der Plaque ohne Ruptur oder Erosion kommt es zu einer Obstruktion des Gefäßlumens und als Folge zu einer Verminderung des Blutflusses distal der Stenose.

1.1.3 Lymphozyten

Lymphozyten spielen in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Die Aorta drainierende Lymphknoten sind ein wichtiger Ort für die T-Zell Differenzierung und Aktivierung. Dort werden naiven T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APC), beispielsweise dendritische Zellen aus der Gefäßwand, plaquespezifische Antigene präsentiert [25, 26]. Folglich werden die T-Zell Differenzierung und Aktivierung initiiert. Die aktivierten Zellen bilden Antikörper gegen verschiedene Epitope des oxidierten LDL, unter anderem Apolipoprotein B100 (Apo B100) [27]. Die T-Lymphozyten migrieren dann in die atherosklerotisch veränderten Plaques und sind dort entscheidend an der inflammatorischen Reaktion beteiligt.

T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) stellen die größte T-Zell Population in der Plaque dar [28]. Sie sezernieren IFN γ und sorgen damit für eine Monozyteninfiltration in die Plaque und die darauffolgende Makrophagenaktivierung. Dadurch wirken T_H1 -Zellen vor allem pro-atherosklerotisch [28], zusätzlich erhöhen sie durch eine Inhibition glatter Muskelzellen die Plaquevulnerabilität und Rupturgefahr [23, 29].

T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2) sind quantitativ weniger in atherosklerotischen Plaques vorhanden [28]. Ihr Effekt auf die Atherosklerose ist gegensätzlich beschrieben: Sezerniertes Interleukin-4 (IL-4) wirkt pro-atherosklerotisch [30, 31], wohingegen Interleukin-5 (IL-5) eher als krankheitslimitierend angesehen werden kann [32].

Eine weitere große T-Zell Population in Plaques sind Interleukin-17A (IL-17A) sezernierende T-Helferzellen vom Typ 17 (T_H17). Untersuchungen zu IL-17A in atherosklerotischen Plaques zeigen sehr widersprüchliche Aussagen über die

Funktionen des Zytokins: einige beschreiben IL-17A als atheroprotektiv, andere als proatherogen. Weitere Studien gehen davon aus, dass IL-17A keinerlei Einfluss auf die Atherosklerose besitzt [33].

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bilden wie T_H2 -Lymphozyten eine eher kleine Population in menschlichen atherosklerotischen Plaques [34]. Eine Depletion dieser Subpopulation in Mausmodellen zeigte eine Progression der Atherosklerose [35, 36]. Eine experimentelle Expansion der T_{regs} , die zu einer Krankheitsregression und einer erhöhten Plaquestabilität führte, bestätigt die atheroprotektive Wirkung der regulatorischen T-Zellen [37].

$CD8^+$ T-Lymphozyten (CD: *cluster of differentiation*) können sowohl atheroprotektiv als auch pro-atherogen wirken. Durch ihre zytotoxische Aktivität führen sie zum Zelltod in der Plaque und zu einer Vergrößerung des nekrotischen Kerns. Eine Untergruppe regulatorischer $CD8^+$ T-Lymphozyten kann durch immunsuppressive Wirkung das Fortschreiten der Atherosklerose hemmen [38, 39]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass $CD8^+$ T-Lymphozyten durch Beeinflussung der Monopoese und der Anzahl zirkulierender Monozyten den Makrophagenanteil in Plaques erhöhen und damit die Atherosklerose fördern [40].

1.2 Myokardinfarkt

1.2.1 Klinische Relevanz

Ein Myokardinfarkt entsteht meist auf dem Boden einer atherosklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit. Er ist definiert als eine Ischämie der Kardiomyozyten aufgrund eines Missverhältnisses zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf mit einhergehender Gewebsnekrose [41]. Sowohl die chronisch ischämische Herzkrankheit als auch der akute Myokardinfarkt zählten zu den zehn häufigsten Todesursachen im Jahr 2020. Die Mortalitätsrate ischämischer Herzkrankheiten ist mit 132 je 100 000 EinwohnerInnen im Jahre 2020 in Deutschland im Vergleich zu den Vorjahren stetig fallend [42]. Durch heutzutage schnell zugängliche Reperfusionsmöglichkeiten konnte in den letzten Jahren die Mortalität im Krankenhaus nach einem akuten Myokardinfarkt um etwa die Hälfte gesenkt werden [43]. Simultan hat jedoch die Rate an Patientinnen und Patienten, die als Folge eines kardialen

Umbauprozesses nach einem Infarkt eine Herzinsuffizienz entwickeln, zugenommen [44].

1.2.2 Pathogenese

Anhand der zugrunde liegenden Ursache kann man Myokardinfarkte in fünf verschiedene Typen klassifizieren. Typ 1 ist definiert als akuter Myokardinfarkt mit Nachweis eines Koronarthrombus aufgrund einer atherosklerotischen Plaqueruptur und kann weiter unterteilt werden in einen okklusiven ST-Hebungsinfarkt (*ST-elevation myocardial infarction*; STEMI) und einen nicht-okklusiven Nicht-ST-Hebungsinfarkt (*non ST-elevation myocardial infarction*; NSTEMI). Typ 1 Infarkte bilden quantitativ die größte Untergruppe [45]. Typ 2 Myokardinfarkten liegt ein Sauerstoffdefizit zugrunde, Typ 3 ist definiert als plötzlicher Herztod, Typ 4 und 5 sind Interventions-beziehungsweise Bypass assoziiert auftretende Myokardinfarkte.

Rupturieren instabile atherosklerotische Plaques, kommt es zur Freisetzung inflammatorischer Zellen und thrombogener Faktoren, die eine thrombotische Auflagerung begünstigen [45]. Als Folge okkludiert das betroffene Koronargefäß meist komplett, was zu einem Sauerstoffdefizit im versorgten Gewebe führt. Die Innenschicht des Herzens ist am schlechtesten durchblutet, da die Kardiomyozyten von epikardial gelegenen Koronargefäßen versorgt werden und die Sauerstoffkonzentration durch Diffusion zum Endokard hin abnimmt [46]. Daher spricht man bei dieser von einer Ischämie als erste betroffene Innenschicht auch von der „letzten Wiese“.

Als Folge eines Myokardinfarkts können zelluläre und molekulare Umbauprozesse des infarzierten und nicht-infarzierten Myokards auftreten, welche man als kardiales Remodeling bezeichnet. Infolgedessen kann es zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommen [47, 48]. Als Prädiktoren für ein ausgeprägtes Remodeling werden vor allem große Infarktareale und lang anhaltende Entzündungsreaktionen oder sogar chronische Inflammation gesehen [49-51].

Im physiologischen Zustand enthält das Herzgewebe typischerweise nur wenige Immunzellen [52]. Die im Herz von Mäusen am meisten vorkommenden Zellen sind Makrophagen [53], des Weiteren sind dendritische Zellen vorhanden [54].

Kommt es durch den Verschluss einer Koronararterie zu einem Myokardinfarkt, folgt das Absterben vieler Kardiomyozyten im ischämischen Gebiet [55]. Nach einem

Myokardinfarkt kann man den Prozess vom Infarkt hin zur Narbenbildung in drei Phasen unterteilen: die inflammatorische Phase, die proliferative und die Maturationsphase [56]. Die inflammatorische Phase beginnt mit der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die für eine Einwanderung von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems ins Gewebe verantwortlich sind. In der proliferativen Phase dominieren Myofibroblasten, die die Extrazellulärmatrix aufbauen. Außerdem kommt es in dieser Phase zur Ausbildung neuer Blutgefäße [57]. Die letzte Phase ist wichtig für die Bildung einer stabilen kollagenen Narbe [58].

Für eine optimale Reparatur ist ein physiologisches Gleichgewicht zwischen den Phasen wichtig [59]. Eine übermäßig ausgeprägte oder verlängerte inflammatorische Phase führt zu anhaltender Gewebeschädigung, der Bildung einer instabilen Narbe und einer kontraktilen Dysfunktion des Herzens [60].

Die Entzündungsphase beginnt mit dem Absterben der Kardiomyozyten, gefolgt von einer sterilen Inflammation und einer Immunzellinfiltration. Dabei setzen die Myozyten Signale frei (*danger associated molecular pattern; DAMP*), zum Beispiel Zytokine wie Interleukin-1 α (IL-1 α), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6) oder Nukleinsäuren [61-63]. Diese Signale sind in der Lage über Rezeptoren wie die *toll like* Rezeptoren (TLR) Signalkaskaden in residenten kardialen Makrophagen, in Kardiomyozyten, Fibroblasten, Gefäßzellen und infiltrierenden Leukozyten zu aktivieren [64-66]. Über die lokale myokardiale Entzündungsreaktion hinaus wird durch den Infarkt eine systemische Reaktion hervorgerufen, durch die es zu einer zusätzlichen Leukozytenfreisetzung aus Knochenmark und Milz kommt [67, 68]. Die Leukozyten werden vor allem durch das typische proinflammatorische Zytokin IL-1 rekrutiert [69]. Wichtige zelluläre Quellen für die Zytokin- und Chemokinfreisetzung sind vor allem Fibroblasten, Kardiomyozyten, Monozyten und Makrophagen [70, 71].

Neutrophile stellen die erste Gruppe an Immunzellen dar, die in das infarzierte Areal einwandert [72]. Dort produzieren sie hauptsächlich proteolytische Enzyme und weisen eine hohe oxidative Aktivität auf, die die Beseitigung abgestorbener Zellen beschleunigt.

Ein akuter Myokardinfarkt führt zu einer raschen Apoptose residenter Makrophagen und einer Einwanderung von zirkulierenden Monozyten in das Infarktareal [73]. Zuerst werden Monozyten mit proinflammatorischen und phagozytotischen Funktionen in das Areal rekrutiert, später vermehrt Zellen mit reparativen Eigenschaften [74].

Verantwortlich für die initiale Monozytenmigration sind inflammatorische Signale, welche als Antwort auf den Zelltod der Kardiomyozyten ausgesandt werden [74].

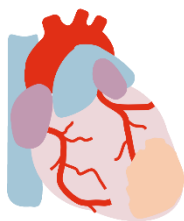
Mastzellen verstärken durch die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF α und Histamin die Leukozytenrekrutierung [75]. Ebenso sind Fibroblasten, wenn sie über oben genannte DAMPs aktiviert werden, bei der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine bedeutsam [76].

Zum Schutz vor einem ungünstigen Remodeling ist eine Eindämmung der Entzündungsreaktion wichtig [77]. Die kurze Lebensdauer von Neutrophilen sowie Makrophagen mit anti-inflammatorischem Genotyp sind hierfür entscheidend [78]. Dendritischen Zellen kann durch Regulierung der Monozyten/Makrophagen Homöostase eine immunoprotektive Wirkung zugeschrieben werden [79]. Auch einige Lymphozytensubtypen sorgen für eine Beendigung der Entzündungsphase, etwa kann regulatorischen T-Zellen eine vor Remodeling schützende Wirkung zugesprochen werden [80, 81]. Es gibt Hinweise darauf, dass auch die Sekretion inhibitorischer Mediatoren wie Interleukin-10 (IL-10) durch natürliche Killerzellen protektiv wirken kann [82].

Die zweite, proliferative Phase ist vor allem durch gesteigerte Aktivität von Fibroblasten und Gefäßneubildungen gekennzeichnet [83]. Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten können durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Aktivität der Fibroblasten modifizieren [84, 85].

Dabei führt eine Depletion von Makrophagen in experimentellen Modellen des Myokardinfarkts zu einer beeinträchtigten Fibroblastenaktivierung, die ausgeprägte reparative Defekte nach sich zieht [86, 87]. Außerdem zeigen sich die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie TGF β oder dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dadurch bedingt die Angiogenese eingeschränkt [88].

Die letzte Phase umfasst die Narbenbildung und -reifung. In dieser Phase wird die Fibroblastenaktivität gehemmt und reparative Zellen werden apoptotisch [58], wodurch es in Kombination mit einer Vernetzung der Extrazellulärmatrix zur Narbenbildung kommt. Die zellulären Einflüsse auf die Narbenreifung sind Gegenstand aktueller Forschung.



Inflammatorische Phase	Proliferationsphase	Maturationsphase
<ul style="list-style-type: none"> - Invasion von Immunzellen - Sterile Inflammation lokal und systemisch 	<ul style="list-style-type: none"> - Aufbau Extrazellulärmatix - Neovaskularisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Narbenbildung und -reifung - Zellverlust durch Apoptose
T-Zellen B-Zellen Mastzellen Makrophagen (M1) Ly6C ^{hi} Monozyten Neutrophile	T _{reg} Zellen Dendritische Zellen Makrophagen (M2) Ly6C ^{lo} Monozyten Apoptotische Neutrophile Myofibroblasten	T-Zellen Dendritische Zellen Makrophagen (M1) Ly6C ^{hi} Monozyten
Tag 0 - 4	Tag 4 - 14	Wochen bis Monate

Abbildung 2 Pathogenese und Phasen des Myokardinfarkts mit vorherrschenden Zelltypen
 Nach einem Myokardinfarkt kann man den Prozess vom Infarkt hin zur Narbenbildung in drei Phasen unterscheiden: die inflammatorische Phase, die proliferative und die Maturationsphase [56]. Die inflammatorische Phase beginnt mit der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die für eine Einwanderung von Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems ins Gewebe verantwortlich sind. In der proliferativen Phase dominieren Myofibroblasten, die die Extrazellulärmatix aufbauen. Außerdem kommt es zur Ausbildung neuer Blutgefäße [57]. Die letzte Phase ist wichtig für die Bildung einer stabilen kollagenen Narbe [58]. *Lymphocyte antigen 6C high* (Ly6C^{hi}), *Lymphocyte antigen 6C low* (Ly6C^{lo}). Die Abbildung wurde generiert in Anlehnung an [60].

1.2.3 Lymphozyten

Vor allem T_{H1}-Lymphozyten und T_{regs} infiltrieren das infarzierte Myokard wenige Tage nach dem Infarkt [89]. Die Rolle der Lymphozyten ist je nach Subpopulation unterschiedlich. Im Rattenmodell zeigen sich aktivierte zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die auch auf gesunde Kardiomyozyten wirken und diese schädigen [90]. Eine Untergruppe der CD8⁺ T-Zellen, welche einen Angiotensin-2-Rezeptor exprimiert und sich im Rattenmodell primär in der Peri-Infarktzone nachweisen lässt, sezerniert IL-10 und sorgt damit für eine deutliche Reduktion der Infarktgröße [91]. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass nach einem Myokardinfarkt eine Rekrutierung und Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten stattfindet, welche Granzym B freisetzen. Diese Sekretion hat die Apoptose von Kardiomyozyten, ein negatives Remodeling und damit eine Verschlechterung der Myokardfunktion als Folge [92].

T_{H17}-Lymphozyten produzieren unter anderem Interleukin-17 (IL-17), welches zur Apoptose von Kardiomyozyten führt und zusätzlich profibrotische und proliferative Wirkung auf Fibroblasten hat [93, 94]. T_{H1}-Zellen werden vor allem proinflammatorische und apoptotische Funktionen zugeschrieben, die das Ausmaß der myokardialen Schädigung verstärken. T_{H2}-Zellen wirken diesem Effekt der T_{H1}-Zellen entgegen [95]. Auch regulatorische T-Zellen wirken modulierend auf den Phänotyp und

die Funktion der Fibroblasten [96]. Zusätzlich kann T_{regs} in vivo eine Eindämmung proinflammatorischer Zytokine zugeschrieben werden [85]. Über eine Induktion des M2-Phänotyps der Makrophagen, die daraufhin Zytokine wie Interleukin-13 (IL-13), Arginase-1 und TGF β produzieren, wirken die T_{regs} auf die für die reparative Phase entscheidende Formation der Extrazellulärmatrix ein [80].

Darüber hinaus kann B-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade über die Mobilisierung proinflammatorischer Makrophagen nachgewiesen werden [97].

Zusammenfassend ziehen viele pathogene T-Lymphozyten Populationen eine Suppression der inflammatorischen Antwort und negative Folgen nach einem Myokardinfarkt nach sich.

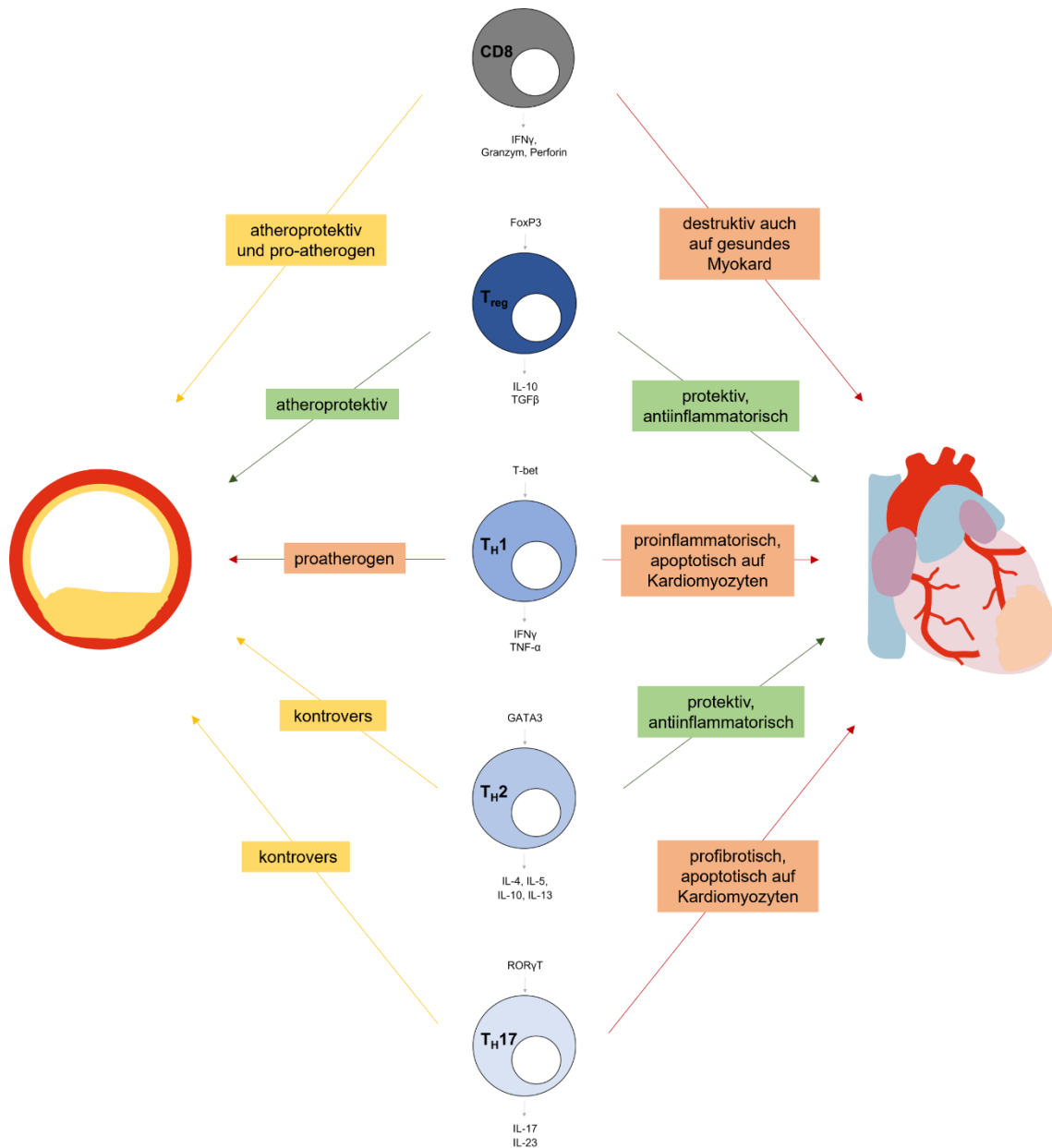


Abbildung 3 T-Zell Subtypen mit Effektorzytokinen, Transkriptionsfaktoren und ihrer Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen CD8⁺ T-Lymphozyten bilden beispielsweise IFN γ , Perforin und Granzym, ihnen wird sowohl eine atheroprotektive als auch pro-atherogene Wirkung zugeschrieben und sie wirken bei einem Myokardinfarkt destruktiv. Der Transkriptionsfaktor der T_{regs} ist *forkhead-box-protein P3* (FoxP3), ihre Effektorzytokine IL-10 und TGF β . T_{regs} haben sowohl auf die Atherosklerose als auch auf den Myokardinfarkt eine protektive Wirkung. T_{H1}-Lymphozyten mit dem zugehörigen Transkriptionsfaktor T-bet produzieren die Effektorzytokine IFN γ und TNF α . Sie haben vor allem proatherogene und proinflammatorische Eigenschaften. *GATA binding protein 3* (GATA3) ist der Transkriptionsfaktor der IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzierenden T_{H2}-Lymphozyten. Sie wirken antiinflammatorisch auf Kardiomyozyten, ihre Wirkung auf die Atherosklerose wird als gegensätzlich beschrieben. T_{H17} Lymphozyten mit dem Transkriptionsfaktor *ROR-related orphan receptor gamma t* (ROR γ T) produzieren IL-17 und Interleukin-23 (IL-23) und haben eine mit den T_{H2}-Zellen vergleichbare Wirkung auf die Atherosklerose sowie eine profibrotische Wirkung im Myokardinfarkt.

1.3 Hypoxie-induzierte Faktoren

1.3.1 Sauerstoffhomöostase und Stoffwechsel

Eine Umgebung, die Sauerstoff enthält, ist für aerobe Organismen essenziell. Sauerstoff ist als letzter Elektronenakzeptor in der Atmungskette für einen ausreichenden aeroben Stoffwechsel und die damit verbundene Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) notwendig. Unter normalen Bedingungen, das bedeutet bei einer Sauerstoffkonzentration von 21% in der Umgebungsluft, bewegen sich die Sauerstoffkonzentrationen in Körperzellen zwischen 2,5 und 9%.

Den Zustand reduzierter Sauerstoffkonzentrationen bezeichnet man als Hypoxie. Diese tritt physiologisch in der Embryonalentwicklung, in der Wundheilung oder bei Aufenthalt in großen Höhen auf. Pathologische Sauerstoffminderversorgung wird meist in Zusammenhang mit neoplastischen oder inflammatorischen Veränderungen beobachtet [98]. Folglich kann entzündetes Gewebe Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 1% aufweisen. Mögliche Gründe dafür sind Gefäßschäden mit folgender Minderdurchblutung, vermehrte Stoffwechselaktivität oder die Infiltration von Immunzellen in das Gewebe [99].

Jegliche Änderung der Sauerstoffkonzentration in den Zellen führt zu einer Anpassungsreaktion, sodass aerobe Stoffwechselvorgänge und eine adäquate ATP-Produktion sichergestellt werden [100].

In hypoxischem Milieu bestehen im menschlichen Organismus mehrere Wege zur Wiederherstellung der Sauerstoffhomöostase [101]. Systemisch kann dies durch eine erleichterte Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe realisiert werden, lokal durch Neovaskularisation zur Verbesserung der Gewebedurchblutung [102]. Auch zelluläre Mechanismen stehen zur Verfügung, beispielsweise die Veränderung der Stoffwechsellaage hin zu einer vermehrten Glykolyse und verminderten oxydativen Phosphorylierung [103]. Ein wichtiger Bestandteil dieser Anpassung sind die Hypoxie-induzierten Faktoren (*hypoxia inducible factor*, HIF). Diese sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktoren verstärken die Transkription bestimmter Zielgene, die den Zellen notwendige Adaptationen des Zellstoffwechsels an ein vermindertes Sauerstoffangebot ermöglichen [104, 105]. Hauptzielgene sind VEGF, Erythropoetin (EPO) sowie einige metabolische Gene. VEGF leitet die Angiogenese ein und sorgt damit für eine verbesserte Blutversorgung des hypoxischen Gebietes. Durch EPO wird

die Produktion von Erythrozyten erhöht, welche als Sauerstoffträger das Sauerstoffangebot verbessern. Durch veränderte Transkription einiger metabolischer Gene kann die Zelle den Stoffwechsel dem hypoxischen Milieu anpassen.

1.3.2 Aufbau, Funktion und Regulation von HIF

Aufgebaut sind die Transkriptionsfaktoren als heterodimeres Protein bestehend aus zwei Untereinheiten – alpha (120 kDa) und beta (91-94 kDa). Die α -Untereinheit wird sauerstoffreguliert exprimiert, die β -Untereinheit, auch *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), wird sauerstoffunabhängig und dauerhaft exprimiert [106]. Im Menschen sind drei α -Untereinheiten bekannt: HIF-1 α , -2 α und -3 α . Die Rolle von HIF-1 α ist jedoch im Gebiet der Tumore und Inflammation am bedeutsamsten [107, 108]. HIF-2 α ist in der Lage mit HIF-1 β einen Heterodimer zu bilden und die Expression von EPO zur Erythropoese zu steigern [109]. HIF-3 α wirkt als negativer Regulator der durch die anderen α -Untereinheiten aktivierten Transkriptionsaktivität, indem er um die Bindung an HIF-1 β konkurriert [110]. Die genauen Funktionen der verschiedenen Untereinheiten variieren je nach Zelltyp.

Am aminoterminalen Ende enthält HIF ein basisches Helix-Loop-Helix Motiv sowie eine Per-ARNT-Sim (PAS)-Domäne [111]. Am carboxyterminalen Ende weist die HIF-1 α Untereinheit zwei Transaktivierungsdomänen (TAD) auf, die für die Regulation der Zielgene wichtig sind [112].

Unter normoxischen Bedingungen sind die alpha-Untereinheiten durch Enzyme, die Prolylhydroxylase-Domänen-Proteine (PHD: *prolyl hydroxylase domain*), streng reguliert. Bei den PHD handelt es sich um Dioxygenasen, die die HIF- α Untereinheiten an zwei Prolinresten (P402 und P564) innerhalb einer sogenannten sauerstoff-abhängigen Abbaudomäne (ODD: *oxygen dependent degradation*) hydroxylieren. Als Kofaktoren benötigen die PHD für diese Reaktion Eisen und Sauerstoff. Die hydroxylierte HIF α Untereinheit wird durch einen von-Hippel-Lindau (VHL)-Tumorsuppressor-E3-Ligase-Komplex polyubiquitiniert und damit für den Abbau im 26S Proteasom markiert [113, 114].

Ein weiterer Weg der sauerstoffabhängigen Regulierung von HIF-1 α findet über bestimmte inhibierende Faktoren (*factor inhibiting HIF*, FIH) statt. Diese hydroxylieren einen Asparaginyrest im HIF und blockieren damit die notwendige Interaktion mit dem Kofaktor p300 zur Bindung an die Zielgen-Promotorsequenz [106].

Sauerstoffmangel vermindert die Aktivität der PHD und FIH, stabilisiert somit die HIF- α Untereinheiten, die dadurch akkumulieren und aufgrund zweier *nuclear localization signals* (NLS) in den Nukleus translozieren [115]. Dort verbindet sich eine alpha- mit der beta-Untereinheit zum heterodimeren HIF [113]. Der HIF- α/β Komplex bindet unter Einbezug der Kofaktoren p300/CBP an bestimmte sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HRE) in der Promotorregion der Zielgene und wirkt dort aktivierend [106]. Die Basenfolge, an die das HIF-Heterodimer an die Promotorregion der HRE bindet, entspricht 5'-RCGTG-3' (mit R = A/G) [113, 116]. HIF reguliert somit unter hypoxischen Bedingungen die physiologische Sauerstoffhomöostase transkriptionell.

Es sind mehr als 200 Zielgene für Hypoxie-induzierte Faktoren bekannt [114]. Darunter fallen etwa VEGF und EPO zur Verbesserung des Sauerstoffangebots durch Angiogenese und Erythropoese sowie Gene, die den Zellstoffwechsel beeinflussen und die Glykolyse anregen, so zum Beispiel den Glukosetransporter 1 (GLUT1) und die Laktat Dehydrogenase A [117-119]. Weitere Gene spielen in der Apoptose, dem Eisenstoffwechsel oder der Zellmigration eine Rolle [120-122].

HIF kann neben Sauerstoff auch durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren oder bakterielle Produkte beeinflusst werden. So führt eine Erhöhung des Zytokins TNF α zu einer Proteinstabilisierung und damit einer HIF- α Akkumulation [123].

Auch bakterielle Produkte wie das Lipopolysaccharid (LPS) erhöhen das Level der HIF Konzentration über unter anderem *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), *reactive oxygen species* (ROS), PHDs und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) [124-126]. Die Aktivierung von NF κ B führt auch zur Transkription nachgeschalteter HIF-Zielgene einschließlich inflammatorischer Zytokine [127].

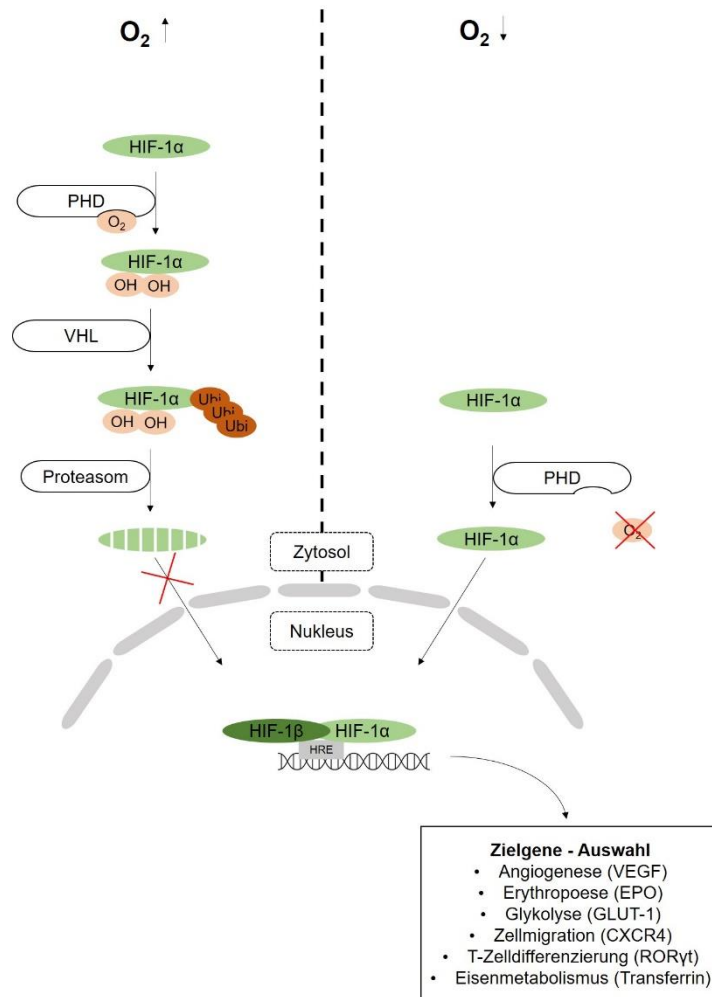


Abbildung 4 Funktion und Regulation von HIF-1 in normoxischem und hypoxischem Milieu Die α -Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors HIF wird sauerstoffreguliert exprimiert, die β -Untereinheit, auch *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT), wird sauerstoffunabhängig und dauerhaft exprimiert. Unter normoxischen Bedingungen sind die alpha-Untereinheiten durch Enzyme, die Prolylhydroxylase-Domänen-Proteine (PHD), streng reguliert. Bei den PHD handelt es sich um Dioxygenasen, die die HIF- α Untereinheiten an zwei Prolinresten (P402 und P564) innerhalb einer sogenannten sauerstoff-abhängigen Abbaudomäne (ODD) hydroxylieren. Die hydroxylierte HIF α Untereinheit wird durch einen von-Hippel-Lindau (VHL)-Tumorsuppressor-E3-Ligase-Komplex polyubiquitiniert und damit für den Abbau im 26S Proteasom markiert. Sauerstoffmangel vermindert die Aktivität der PHD und FIH, stabilisiert somit die HIF- α Untereinheiten, die dadurch akkumulieren und aufgrund zweier *nuclear localization signals* (NLS) in den Nucleus translozieren. Dort verbindet sich eine alpha- mit der beta-Untereinheit zum heterodimeren HIF. Der HIF- α/β Komplex bindet unter Einbezug der Kofaktoren p300/CBP an bestimmte sogenannte Hypoxie-responsive Elemente (HRE) in der Promotorregion der Zielgene und wirkt dort aktivierend. Es sind mehr als 200 Zielgene für Hypoxie-induzierte Faktoren bekannt. Eine Auswahl ist beispielhaft aufgeführt und umfasst VEGF und Erythropoetin (EPO) zur Verbesserung des Sauerstoffangebots durch Angiogenese und Erythropoese sowie Gene, die den Zellstoffwechsel beeinflussen und die Glykolyse anregen, so zum Beispiel den Glukosetransporter 1 (GLUT1). Weitere Gene spielen in der Apoptose, dem Eisenstoffwechsel oder der Zellmigration eine Rolle. Die Abbildung wurde generiert in Anlehnung an [106, 128].

1.3.3 HIF und Hypoxie in Inflammation und in kardiovaskulären Erkrankungen

HIF spielt bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle: Die Umgebung von Immunzellen in einem entzündeten Gewebe ist hypoxisch. Dies führt zu einer vermehrten Aktivität von HIF [107]. HIF ist verantwortlich für die Ausführung einer optimalen Entzündungsreaktion [107, 129-131].

In der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Sauerstoffhomöostase ein entscheidender Faktor, nicht nur für die Aufrechterhaltung aerober Stoffwechselfvorgänge, sondern auch für Zellmigration, Proliferation, Apoptose oder die Immunreaktionen [132, 133]. Die Funktion des Schlüsselregulators HIF bei kardiovaskulären Erkrankungen ist aufgrund der Vielzahl an beteiligten Zelltypen und Prozessen sehr komplex.

1.3.4 HIF in der Atherosklerose

Bei der Atherosklerose kann Hypoxie über mehrere Mechanismen auftreten. Einerseits führt die chronische Entzündungsreaktion zu einem hypoxischen Milieu. Die durch atherosklerotische Plaques entstehende Lumeneinengung des Gefäßes bewirkt außerdem eine nachgeschaltete Durchblutungsstörung des Gewebes [134]. Zuletzt existieren in dicken Plaques Hypoxiezonen, die auf eine unzureichende Sauerstoffdiffusion aufgrund der Überschreitung der maximalen Sauerstoffdiffusionsstrecke zurückzuführen sind [135].

Über die Bildung zahlreicher angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF oder Angiopoetin 1 und 2 (ANGPT1/2) [136], führt eine HIF-Aktivierung in Endothelzellen und glatten Muskelzellen zur Neubildung von Blutgefäßen in kardiovaskulären Erkrankungen [137, 138]. Dadurch soll eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff sichergestellt werden und es wird einem negativen kardialen Remodeling mit Ausbildung einer Herzinsuffizienz entgegengewirkt [139]. Generell wirkt HIF-1 α für die Angiogenese auf die drei wichtigsten Zelltypen, Endothelzellen, endotheliale Vorläuferzellen und glatte Muskelzellen, indem es Proliferation und Migration dieser erhöht und damit eine ausreichende Angiogenese sicherstellt [140, 141].

Auch in Immunzellen zeigt HIF bei Atherosklerose eine entscheidende Funktion. Die Migration und Proliferation von Immunzellen wird durch HIF essenziell beeinflusst [142]. Über die Steigerung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-33 und TNF α oder über die Aktivierung von HIF-1 α über NF- κ B werden atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwände gefördert [143, 144].

Die Regulierung der Makrophagen durch HIF-1 α führt zu einer vermehrten Expression des inflammatorischen M1-Phänotyps [145]. Zusätzlich wird das Überleben der Makrophagen durch den Transkriptionsfaktor verlängert [146]. Durch eine Reduktion der Effluxmechanismen von Cholesterin aus den Makrophagen und die genannte Änderung der Überlebenszeit wächst die Population von Schaumzellen in den Plaques unter Einfluss von HIF-1 α [147]. Zusammenfassend zeigt sich ein Progress der Erkrankung durch Änderung der Makrophagenproliferation, -migration und der inflammatorischen Wirkung unter hypoxischen Bedingungen.

Eine Untersuchung in CD11c positiven APCs, wozu Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten gezählt werden, zeigt, dass eine Deletion von HIF-1 α in ebendiesen Zelltypen die Bildung atherosklerotischer Plaques beschleunigt sowie die Anzahl an T-Zellen in den Plaques erhöht. Somit kann HIF-1 α in APCs auch eine regulatorische Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques zugeschrieben werden [148].

T-Lymphozyten kommt bei der Regulierung atherosklerotischer Plaques eine besondere Rolle zu, weshalb sie in einem gesonderten Kapitel besprochen werden.

1.3.5 HIF im Myokardinfarkt

Durch den verminderten Blutfluss, der bei einem Myokardinfarkt auftritt, entsteht ebenfalls eine Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff. Die dadurch entstehende Ischämie bildet ein hypoxisches Milieu aus, welches zu elektrischen, funktionellen, metabolischen und strukturellen Veränderungen des Myokards und der einzelnen Kardiomyozyten führt [149].

In Myokardinfarkt-Mausmodellen konnten eine Reduktion der Infarktfläche und ein Aufhalten der Funktionsverschlechterung des Herzens nach einem Infarkt durch HIF-1 α gezeigt werden [150]. Mögliche Erklärungen dafür sind eine geringere Fibroblastenapoptose sowie eine vermehrte Produktion bestimmter Enzyme und Zytokine [151-153]. Als weitere Komponente beeinflusst HIF auch im Myokardinfarkt den Stoffwechsel der Zellen und verschiebt ihn hin zur Glykolyse, um ein Überleben der Zellen zu gewährleisten [154]. Eine vermehrte Angiogenese durch die Produktion angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie VEGF kann positive Auswirkungen auf die postinfarzielle Phase haben [137]. Außerdem wird durch eine Reduktion der Apoptose, die Hochregulierung der Zellproliferation und die Verlängerung des Zellüberlebens einem überschießenden Zelluntergang entgegengewirkt [155].

Eine Untersuchung von HIF-1 α und HIF-2 α in Makrophagen im Myokardinfarkt Mausmodell zeigt eine proinflammatorische Wirkung der Transkriptionsfaktoren. HIF-2 α führt in dem Modell zur Unterdrückung des entzündungshemmenden mitochondrialen Stoffwechsels der Makrophagen, HIF-1 α zur glykolytischen Reprogrammierung in Makrophagen. Ein Ausschalten beider Faktoren HIF-1 α und HIF-2 α zieht jedoch eine gestörte Fibrogenese und Herzruptur nach sich [156].

Die aufgezeigten Funktionen von HIF-1 α bestätigen eine bedeutsame Funktion dieses Transkriptionsfaktors in kardiovaskulären Erkrankungen.

1.3.6 HIF in T-Zellen

Für HIF-1 α kann eine Einflussnahme auf die Differenzierung und die Funktion der T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zudem führt HIF-1 α in den unterschiedlichen T-Zell Subtypen zu einer verschieden hohen Induktion glykolytischer Stoffwechselaktivität. In T_H17-Zellen ist diese am stärksten ausgeprägt, in T_{regs} am geringsten [157, 158].

Außerdem begünstigt HIF-1 α eine Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen hin zu T_H17 Zellen und weg von T_{regs} [158]. So können Shehade et al. nachweisen, dass unter hypoxischen Bedingungen mehr IL-17 nachweisbar ist, FoxP3 positive Zellen hingegen signifikant weniger auftreten [159]. Die vermehrte Bildung von T_H17 findet durch transkriptionale Aktivierung von *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t) statt,

welcher mit HIF-1 α und p300 an die IL-17 Promotorregion bindet und diese aktiviert [131].

Die Rolle von HIF-1 α in der Differenzierung der T_{regs} zeigt sich komplex. HIF-1 α kann in hypoxischen Bedingungen über eine HRE-Bindestelle im FoxP3 Promotor direkt die T_{reg} Differenzierung vorantreiben und über eine Bindung an das FoxP3-Protein eine Degradation durch Ubiquitinierung herbeiführen, wodurch die T_{reg} Differenzierung gehemmt wird [131, 160].

In T_H1 Zellen ist die Wirkung von HIF-1 α ebenfalls komplex. In hypoxischem Milieu sind INF γ produzierende T_H1-Zellen vermindert vorhanden [159]. Eine hypoxieunabhängige Hochregulierung von HIF-1 α zeigt jedoch eine erhöhte INF γ Sekretion [161]. Ein experimenteller Knockout der PHDs, welcher zu einem verminderten HIF-1 α Abbau und damit zu dessen Akkumulation führt, hat den Effekt, dass mehr T_H1 Zellen gebildet werden und bestätigt erneut eine verminderte Differenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen [162].

In CD8⁺ T-Zellen erhöht HIF-1 α ebenfalls die Glykolyse [163]. Weiterhin ist HIF-1 α entscheidend für die Expression der Effektorzytokine INF γ und TNF α [164].

T-Zellen, in denen die beta-Untereinheit ausgeschaltet wird, zeigen eine geringere Produktion von Perforin und Granzym sowie veränderte T-Zell Migrationskapazitäten [165].

Zusammenfassend zeigt sich HIF-1 α durch die Induktion glykolytischer Stoffwechselforgänge in einigen T-Zell Subtypen als überlebenswichtig und funktionserhaltend für diese Zellen. Ein Ausschalten der Funktion von HIF hat eine Änderung des Zellbildes mit vor allem gesteigerter T_{reg} Differenzierung gezeigt. Insgesamt ist die Rolle von HIF-1 α in der T-Zell Differenzierung und Funktion komplex und abhängig von einigen äußeren Stimuli oder dem Milieu, in dem sich die Zellen befinden.

1.4 Zielsetzung der Dissertationsarbeit

T-Lymphozyten sind im Rahmen inflammatorischer Prozesse bei der Atherosklerose und im Myokardinfarkt beteiligt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α reguliert in T-Lymphozyten deren Differenzierung und Funktion. Die Rolle von HIF-1 α in T-Zellen in der Atherosklerose und im Myokardinfarkt soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin zu untersuchen, inwiefern sich ein Ausschalten des Transkriptionsfaktor HIF-1 α selektiv in T-Lymphozyten auf Atherosklerose und Myokardinfarkt auswirkt. Hierzu werden neben in vitro Daten auch in vivo Daten aus zwei kardiovaskulären Tiermodellen analysiert:

Atherosklerose: LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} vs. LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl}

Myokardinfarkt: CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} vs. CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl}

Im Myokardinfarkt-Modell soll geprüft werden, zu welchen histopathologischen Veränderungen eine HIF-1 α Defizienz in T-Zellen im Myokard führt. Dazu werden in der CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} - und der Kontrollgruppe die Kardiomyozytenfläche und die Kapillardichte in infarzierten Herzen bestimmt und verglichen.

Im Modell der Atherosklerose erfolgt eine Plaquecharakterisierung und eine Untersuchung von lokaler und systemischer Entzündungsreaktion mit besonderem Fokus auf Lymphozytendifferenzierung und -funktion. Dies soll auf zellulärer Ebene mittels durchflusszytometrischer Methoden und auf RNA-Ebene mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion erfolgen.

Auf Grundlage der Ergebnisse könnten in weiteren Experimenten die molekularen Ursachen der Wirkung von HIF-1 α auf T-Zellen untersucht werden und weiterführend HIF-1 α in T-Lymphozyten als möglicher Angriffspunkt zur Beeinflussung kardiovaskulärer Erkrankungen erforscht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsvotum

Alle Tierexperimente und die Anzahl dafür verwendeter Tiere wurden durch die zuständige behördliche Instanz, die Regierung von Unterfranken, Würzburg (Deutschland), genehmigt (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung: Akt.Z. 83/14 und 2-323) und die Einhaltung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments sichergestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

2.2.1.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden unter konstanten raumklimatischen, apathogenen Bedingungen im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Zinklesweg 10, 97078 Würzburg gezüchtet und gehalten. Es wurden maximal 5 Mäuse zusammen in einem transparenten Kunststoffkäfig mit Standard Einstreu gehalten. In den Käfigen waren ein Haus und Nestbaumaterial vorhanden. Alle Tiere hatten jederzeit Zugang zu Futter und Wasser. Ein standardisierter Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Hell- und 12 Stunden Dunkelphase wurde eingehalten. Tägliche optische Begutachtung des Gesundheitszustandes der Tiere fand gemäß gesetzlichen Vorgaben der Regierung von Unterfranken durch fachkundiges Personal statt.

2.2.1.2 Mauslinien

Die Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen. Der genetische Hintergrund aller Mäuse war C57BL6. Durch gezielte Ausschaltung von Genen und Verpaarung der Mäuse wurden die folgenden zwei Mausmodelle generiert:

Atherosklerose: $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ vs. $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$

Myokardinfarkt: $CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ vs. $CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$

Zur Untersuchung der Rolle von HIF-1 α in T-Zellen in kardiovaskulärer Inflammation wurde in allen Untersuchungsgruppen HIF-1 α speziell in T-Zellen mittels Cre/loxP (Cre: *cyclization recombination*; loxP: *locus of X-over P1*) System deletiert. Das Cre/loxP System ist ein sequenzspezifisches Rekombinationssystem, welches ermöglicht,

bestimmte Gene gezielt in einzelnen Geweben auszuschalten. Hierzu wird ein Zielgen, in diesem Fall HIF-1 α , mittels loxP Sequenzen markiert, die von der Cre-Rekombinase erkannt werden. Die Rekombinase entfernt das Gen zwischen den zwei loxP-Erkennungssequenzen [166]. Im Gegensatz zum Knockout kann somit eine gewebespezifische Genausschaltung stattfinden.

T-Lymphozyten durchlaufen in ihrer Entwicklung verschiedene Differenzierungsschritte, für die jeweils eine bestimmte Expression der Rezeptormoleküle CD4 und CD8 charakteristisch ist. Vor der Phase der einfachen Positivität reifer CD4⁺- bzw. CD8⁺-Lymphozyten exprimieren sie im Rahmen der positiven Selektion beide Korezeptormoleküle CD4 und CD8. Durch diese doppelte Positivität ist es möglich, mittels Cre/loxP System mit der Rekombinase für CD4cre⁺ sowohl in reifen CD4⁺ als auch in reifen CD8⁺ Zellen das Zielgen HIF-1 α auszuschalten [167].

Um die Rolle von HIF-1 α in T-Zellen im Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde ein Myokardinfarkt in Mäusen mit dem Genotyp CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} sowie der entsprechenden Kontrollgruppe mit dem Genotyp CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} induziert. Um Mäuse mit den genannten Genotypen zu erhalten, wurden HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse mit CD4cre⁺ Mäusen gekreuzt. Geeignete heterozygote Nachkommen wurden gekreuzt, bis Mäuse mit passendem Genotyp generiert wurden.

Zur Untersuchung von HIF-1 α in T-Zellen in Atherosklerose wurden bekannte atherosklerotische Mausmodelle verwendet, bei denen sowohl Untersuchungs- als auch Kontrollgruppe keinen LDL-Rezeptor (LDLR) exprimierten (Genotypen: LDLR^{-/-} CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} und LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl}). Zur Generierung dieser Mäuse wurden CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} respektive CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} mit LDLR^{-/-} Mäusen gekreuzt.

Genotypisierungen wurden in allen Linien standardmäßig mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR: *polymerase chain reaction*) durchgeführt.

Alle Experimente wurden - sofern nicht anders angegeben - parallel in Alter, Geschlecht und Anzahl abgestimmten Kontrollgruppen durchgeführt.

2.2.1.3 Induktion von Atherosklerose

Zur Induktion atherosklerotischer Plaques wurde allen LDL-Rezeptor defizienten Mäusen mit den Genotypen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} und LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} ab einem Alter von 8 Wochen eine achtwöchige fettreiche Western-Typ Diät (15% Milchfett, 1,25% Cholesterin) der Firma Altromin (Deutschland) bei darüber hinaus gleichbleibenden Haltungsbedingungen gefüttert. Die Darreichung erfolgte in Pellet-Form.

2.2.1.4 Induktion von Myokardinfarkt

Zur Induktion eines Myokardinfarkts wurden 8 bis 10 Wochen alte CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} und CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäuse einer permanenten Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) unterzogen. Analgesie wurde präoperativ durch eine intraperitoneale Injektion von Buprenorphin (1 mg/kg) gewährleistet. Als Anästhetikum wurde eine Isofluran Inhalation (4 %) verwendet. In tiefer Anästhesie, geprüft durch Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes, wurden die Mäuse mit einer Plastikkanüle endotracheal intubiert. Zur Sicherstellung einer ausreichenden Oxygenierung der Mäuse während des Eingriffs wurden sie mechanisch beatmet (130 Atemzügen pro Minute und Maximaldruck von 18 cm H₂O). Um einer Auskühlung vorzubeugen, wurden die Tiere auf Wärmeplatten liegend operiert. Eine Thorakotomie wurde im 4. Interkostalraum durchgeführt, um das Herz freizulegen. Der RIVA wurde nach Darstellung mit einem 7/0 nicht-resorbierbaren Nylon Faden dauerhaft ligiert. Der Thorax wurde anschließend mit einer kontinuierlichen Naht mit 6/0 nicht-resorbierbarem Faden verschlossen. Zur Sicherstellung der postoperativen Analgesie wurde den Tieren 6 Stunden nach der Operation sowie zwei Mal täglich in den nächsten 2 Tagen Buprenorphin (1 mg/kg) intraperitoneal injiziert.

2.2.1.5 Tötung und Organprozessierung

Die Mäuse wurden mit Isofluran tief anästhesiert und durch eine zervikale Dislokation getötet. Vor Organentnahme wurde das Gewicht der Tiere aufgenommen. Bei den in Rückenlage fixierten Tieren wurden eine mediane Thorako- und Laparotomie durchgeführt. Blut wurde durch Punktion des linken Ventrikels entnommen. Anschließend wurden die Mäuse intrakardial mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS: *phosphate buffered saline*) gespült, um Herz und Gefäße von verbleibendem

Blut zu reinigen. Herz, Aorta, Milz, mediastinale und inguinale Lymphknoten wurden gemäß allgemeiner Dissektionstechniken entnommen.

Ein Teil des gewonnenen Blutes wurde in EDTA Röhren (EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure) gesammelt. Die Röhren wurden auf Eis gelagert und stetig geschwenkt, um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden. 150 µl des Blutes wurden in 850 µl Erythrozyten Lysepuffer für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 400 G für 10 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml PBS+1 % *fetal calf serum* (FCS) resuspendiert.

Ein weiterer Teil des gewonnenen Blutes wurde zur Serumgewinnung in Serumröhren gesammelt. Die Proben wurden mindestens 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 10 000 G für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das dadurch erhaltene Serum wurde aliquotiert und bei -80 °C bis zur späteren Verwendung gelagert.

Die Herzen wurden über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Folgend wurden aus den fixierten Herzen Paraffinschnitte der Aortenwurzel hergestellt.

In früher durchgeführten Myokardinfarkt-Versuchen wurden die Mäuse 6-8 Wochen nach Infarktinduktion getötet und die Herzen entnommen. Der linke Ventrikel wurde von Vorhöfen und dem rechten Ventrikel getrennt, in TissueTek eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur histologischen Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Aorten wurden über Nacht in 4 % PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden die Aorten der Länge nach aufgeschnitten. Externes Fett und die Adventitia wurden mittels Pinzette und Federschere entfernt. Die gereinigten Aorten wurden mit Nadeln auf gummierten Objektträgern fixiert und wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben eingefärbt.

Abhängig von der dafür vorgesehenen Methode wurden die Milzen auf drei verschiedene Arten bearbeitet:

- 1) Für eine anschließende messenger Ribonucleinsäure (mRNA: *messenger ribonucleic acid*) Isolation aus den Milzen wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2) Für anschließende durchflusszytometrische Analysen wurden die Milzen durch ein 70 µm Zellsieb gestrichen. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 400 G 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem entstandenen Pellet wurden 3 ml Erythrozyten Lysepuffer gegeben. Das Gemisch wurde 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 400 G für 5 Minuten bei 4 °C wurden die Zellen in 10 ml PBS mit 1 % FCS resuspendiert und durch das 70 µm Zellsieb gefiltert. Nach einer Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer wurden die Zellen auf 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden für anschließende durchflusszytometrische Analyse verwendet.

3) Für anschließende T-Zell Isolation wurden die Milzen durch ein 70 µm Zellsieb gestrichen und die entstandene Suspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Inguinale Lymphknoten wurden durch ein 70 µm Zellsieb gestrichen. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 400 G für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml PBS mit 1 % FCS resuspendiert. 200 µl der Zellen wurden für eine anschließende durchflusszytometrische Analyse verwendet.

2.2.1.6 Cholesterol Messung im Serum

Der Cholesterolspiegel in den Serumproben wurde mit dem Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Life Technologies Darmstadt, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben bestimmt. Nach Ansetzen des Reaktionspuffers wurden mit dem Cholesterol Referenzstandard 9 Lösungen unterschiedlicher Referenzstandard-Konzentrationen zur späteren Erstellung der Standardkurve gemischt.

Die Serumproben wurden 1:3000 in Reaktionspuffer verdünnt. Jeweils 50 µl der verdünnten Proben wurden in eine schwarze flachbodige Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 50 µl Reaktionspuffer, als Positivkontrolle 50 µl 10 µM H_2O_2 verwendet. Zu jeder Probe und den Kontrollen wurden 50 µl Mastermix entsprechend folgender Zusammensetzung hinzugefügt:

Tabelle 1 Cholesterol-Assay Mastermix

Reagenz	Volumen [μl] für 1 Assay
Amplex Red 20 mM	0,75
HRP 200 U/ml	0,5
Cholesterol Oxidase 200 U/ml	0,5
Cholesterol Esterase 200 U/ml	0,05
1x Reaktionspuffer	48,5

Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Fluoreszenz der Proben bei einer Exzitation von 530-560 nm und einer Detektionswellenlänge von 590 nm mittels Lesegerät infinite M200 pro0000 (TECAN, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Auswertung erfolgte nach Subtraktion des Negativkontroll-Wertes anhand der Standardkurve.

2.2.2 Histologie

2.2.2.1 Gewebepräparation

Aus den gefrorenen infarzierten Herzen der CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} und CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse wurden mit dem Leica CM3050 S Cryostat (Wetzlar, Deutschland) 10 μ m dicke Herzschnitte hergestellt. Alle infarzierten Ebenen eines Herzens, jeweils 5 Schnitte, wurden auf einen Objektträger platziert.

Die in 4 % PFA fixierten Herzen der LDL-Rezeptor defizienten Mäuse wurden gemäß folgendem Protokoll paraffiniert und in 5 μ m dicke Schichten geschnitten. Die Schnitte wurden über Nacht bei 56 °C getrocknet und für weitere Analysen bei Raumtemperatur (RT) gelagert:

Tabelle 2 Protokoll Paraffinierung

Reagenz	Dauer	Temperatur
70 % Ethanol	1 Stunde	RT
70 % Ethanol	1 Stunde	RT
96 % Ethanol	1 Stunde	RT
96 % Ethanol	1 Stunde	RT
100 % Ethanol	1 Stunde	RT
100 % Ethanol	1 Stunde	RT
100 % Ethanol	1 Stunde	RT
Xylol	1 Stunde	45 °C
Xylol	1 Stunde	45 °C
Xylol	1 Stunde	45 °C
Paraffin	1 Stunde	62 °C
Paraffin	1 Stunde	62 °C
Paraffin	über Nacht	62 °C

Die aufgeschnittenen, aufgespannten Aorten wurden wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben eingefärbt.

Zur weiteren histologischen Verarbeitung wurden die Paraffinschnitte gemäß der folgenden Tabelle bei Raumtemperatur entparaffiniert und rehydriert:

Tabelle 3 Protokoll Entparaffinierung

Reagenz	Dauer
Xylol	15 Minuten
Xylol	15 Minuten
Xylol	15 Minuten
100 % Ethanol	1 Minute
100 % Ethanol	1 Minute
90 % Ethanol	1 Minute
70 % Ethanol	1 Minute
70 % Ethanol	10 Minuten
Destilliertes Wasser	10 Minuten

Zur Antigendemaskierung vor immunhistochemischer Färbung wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte der Aortenwurzel in einem wärmostabilen Behältnis in der Mikrowelle bei 600 Watt für 5 Minuten in 150 ml folgender Lösung erhitzt:

Tabelle 4 Protokoll Antigendemaskierung

Reagenz	Menge für 150 ml Endvolumen
Antigendemaskierung Lösung A	2,7 ml
Antigendemaskierung Lösung B	12,3 ml
Destilliertes Wasser	135 ml
Tween-20	75 µl

Die Lösung wurde ausgetauscht und der Vorgang einmalig wiederholt. Nach 30-minütigem Abkühlen der Schnitte in der Lösung wurden diese zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Kryoschnitte wurden vor immunhistochemischer Färbung allein für 5 Minuten in PBS rehydriert.

2.2.2.2 Immunhistochemie

Zum Schutz vor Austrocknung fanden alle folgenden Inkubationsschritte in einer Feuchtkammer statt. Mit einem PAP Pen wurde eine hydrophobe Barriere eng um die Schnitte gezogen, um die Färbelösung präziser und effizienter auf die Gewebeschnitte anwenden zu können. Um nicht-spezifische Antikörperbindung zu blockieren, wurden die Schnitte für 30 Minuten Blockmedium bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurde die Primärantikörperverdünnung (Konzentrationen gemäß Tabelle 5) auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Sekundärantikörperverdünnung (Konzentrationen gemäß Tabelle 5) auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur für 1 Stunde in Dunkelheit inkubiert. Eine Gegenfärbung der Nuklei mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) oder der Zellmembran mit *wheat germ agglutinin/fluorescein isothiocyanate* (WGA/FITC) wurde durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte mit Vectashield und Deckgläschen bedeckt, mit Nagellack umrandet und bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Zur Optimierung des Ergebnisses der Färbung wurden je nach Zielgewebe folgende Anpassungen vorgenommen:

Tabelle 5 Immunhistochemische Färbungen

	Kapillaren	Makrophagen	Glatte Muskelzellen	T-Zellen
Menge Lösung	je 125 µl	je 50 µl	je 50 µl	je 50 µl
Blockmedium	PBS + 10 % Ziegen Serum	Mac Färbelösung	Mac Färbelösung	PBS + 1 % BSA
Primär-antikörper gegen	CD31	Mac2	α-SM Aktin	CD3
Sekundär-antikörper	Anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 555	Anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 488	keiner, Primärantikörper Cy3 Konjugat	Anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 488
Waschung	3x 5 Min. in Waschpuffer	15 und 5 Min. in PBS	15 und 5 Min. in PBS	15 und 5 Min. in PBS
Gegenfärbung	WGA/FITC	DAPI	DAPI	DAPI

2.2.2.3 Anfärbung von Elastin der Aortenwurzeln

Die Schnitte der Aortenwurzel wurden wie bereits beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Schnitte wurden zur Elastinfärbung 15 Minuten in Aldehyd-Fuchsin Lösung inkubiert und anschließend fünfmal in 70 % Ethanol getaucht und für 5 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert.

Die gefärbten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol bis Xylol) dehydriert und mit Vectashield Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckelt.

Tabelle 6 Protokoll Dehydrierung

Reagenz	Dauer
70 % Ethanol	2 Minuten
96 % Ethanol	1 Minute
96 % Ethanol	1 Minute
96 % Ethanol	1 Minute
100 % Ethanol	1 Minute
100 % Ethanol	1 Minute
100 % Ethanol	1 Minute
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten

2.2.2.4 Oil-Red O Färbung

Die Oil-Red O Färbung wurde zum Nachweis von Triglyceriden im Aortengewebe angewendet. Die längs aufgeschnittenen und aufgespannten Aorten wurden zehnmal in 60%iges Isopropanol eingetaucht. Anschließend wurden sie 15 Minuten in Oil-Red O Arbeitslösung inkubiert. Die gefärbten Aorten wurden erneut zehnmal in 60%iges Isopropanol eingetaucht und danach 5 Minuten auf dem Horizontalschüttler in PBS gewaschen. Die Aorten wurden mit Kaiser's Glyceringelatine und einem Deckglas eingedeckelt.

2.2.2.5 WGA Lektin Färbung der infarzierten Herzen

Die Kryoschnitte wurden 10 Minuten in PBS rehydriert. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurde mit einem PAP Pen eine hydrophobe Barriere eng um die Schnitte gezogen, um die Färbelösung präziser und effizienter auf die Gewebeschnitte anwenden zu können. 125 µl der Färbelösung bestehend aus einem WGA-Rhodamin Konjugat in PBS (1:200) wurde auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde in einer Feuchtkammer in Dunkelheit inkubiert. Nach Abklopfen der Färbelösung wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten auf einem Horizontalschüttler vor Licht geschützt in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Vectashield Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt. Die Schnitte wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.2.6 Analyse der Plauefläche der Aorten

Die lichtmikroskopische Analyse der Plauefläche der Aorten wurde mit einem Leica Mikroskop DM4000 B (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. In zehnfacher Objektivvergrößerung wurden Bilder der gesamten Aorten vom Bogen bis zum Ende des abdominellen Anteils mit einer HV-F202 UXGA 3CCD Kamera von Hitachi (Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. Mit der Flächenausmessung der DISKUS Bildanalyse Software (Hilgers Technisches Büro Königswinter, Deutschland) wurde einerseits die Gesamtfläche der Aorta, andererseits die durch die Oil-Red O Färbung rötlich angefärbten Plaques markiert. Dieses Vorgehen wurde für alle drei anatomischen Aortenabschnitte separat durchgeführt (Aortenbogen, thorakale Aorta, abdominelle Aorta) und analysiert. Die prozentuale Plauefläche wurde mittels Quotienten aus der Fläche angefärbter Lipidablagerungen und der Gesamtfläche der aufgespannten Aorta bestimmt. Analog wurde in den mit Aldehyd-Fuchsin angefärbten Schnitten der Aortenwurzel die Plauefläche bestimmt.

2.2.2.7 Analyse der Plauezusammensetzung

Die immunhistologischen Färbungen wurden mittels Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 B (Wetzlar, Deutschland) dargestellt. In 20-facher Objektivvergrößerung wurden pro Maus drei Bereiche aus der gesamten Aorta für jede Färbung mit einer HV-F202 UXGA 3CCD Kamera von Hitachi (Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. Zur Bestimmung der zellulären Zusammensetzung bezüglich Makrophagen, glatten Muskelzellen und T-Zellen wurde die für den jeweiligen Zelltyp positiv gefärbte Fläche bestimmt und mit der Gesamtplauefläche ins Verhältnis gesetzt. Die DAPI Gegenfärbung diente als Nachweis von Zellen in den positiv gefärbten Flächen. Die Flächenausmessung erfolgte mit der DISKUS Bildanalyse Software (Hilgers Technisches Büro Königswinter, Deutschland).

Die Bestimmung des Ausmaßes des nekrotischen Kerns wurde in den für Mac/αSMA gefärbten Schnitten mit DAPI Gegenfärbung vorgenommen. Die azelluläre Plauefläche ohne Anfärbung von Nuklei wurde mittels DISKUS Bildanalyse Software ausgemessen und mit der Gesamtplauefläche ins Verhältnis gesetzt.

2.2.2.8 Analyse der Kardiomyozytenfläche im infarzierten Herz

Die Analyse der Kardiomyozytenfläche der eingefärbten Herz-Kryoschnitte wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie mit einem Leica Mikroskop DM4000 B (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt und mit einer HV-F202 UXGA 3CCD Kamera von Hitachi (Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. Zur Ausmessung wurde die DISKUS Bildanalyse Software (Hilgers Technisches Büro Königswinter, Deutschland) verwendet. Die Vermessung fand verblindet gegenüber der Gruppenzuordnung statt.

Kardiomyozyten von 15 Mäusen – acht $CD4cre^+HIF-1\alpha^{+/+}$ und sieben $CD4cre^+HIF-1\alpha^{fl/fl}$ – wurden analysiert. In jedem Herzen wurden die direkt an die Infarkt Narbe angrenzende Infarkttrandzone und die infarktfernen endokardnahen Zonen des *Remote* Myokard definiert. Von jedem Herzen wurden fünf 10 μm dicke Schnitte zur Analyse herangezogen. Gemessen wurden jeweils 75 Kardiomyozyten im Zellverbund in zwei Infarkttrandzonen und zwei Zonen aus dem endokardnahen *Remote* Myokard pro Schnitt. Dafür wurde jede einzelne Zelle händisch mit der Flächenausmessung der DISKUS-Software umkreist. Für die Auswertung wurde aus allen gemessenen Zellen pro Herz ein Durchschnittswert für die Kardiomyozytenfläche in der Infarkttrandzone und ein Durchschnittswert aus dem *Remote* Myokard gebildet.

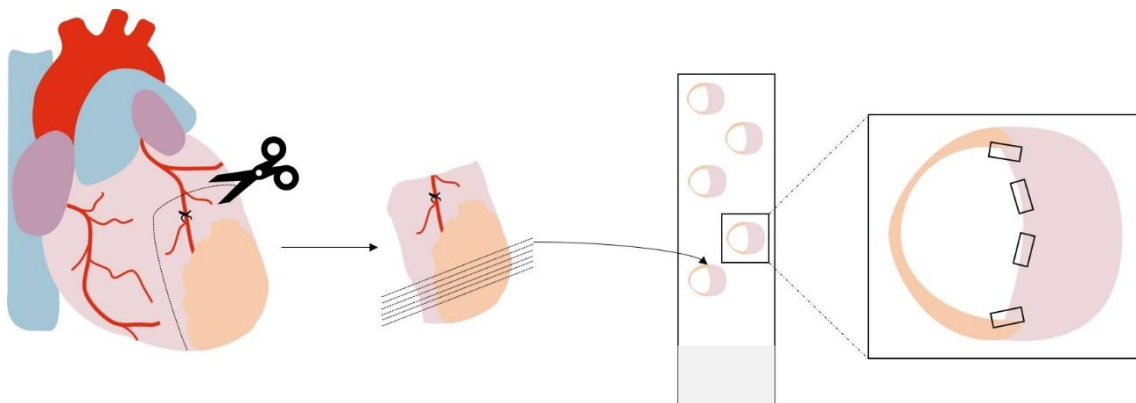


Abbildung 5 Analyse der Kardiomyozytenfläche in infarzierten Herzen: Herstellung der Schnitte und Auswahl der zu analysierenden Regionen.

2.2.2.9 Analyse der Kapillardichte im infarzierten Herzen

Die Analyse der Kardiomyozytenfläche der eingefärbten Herz-Kryoschnitte wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie mit einem Leica Mikroskop DM4000 B (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt und mit einer HV-F202 UXGA 3CCD Kamera von Hitachi (Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. Zur Ausmessung wurde die ImageJ

Software (Wayne Rasband, NIH Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Die Vermessung fand verblindet gegenüber der Gruppenzuordnung statt.

Analog zu Kapitel 2.2.2.8 wurde die Definition der Infarkttrandzone und des *Remote* Myokard vorgenommen. Von jedem Herzen wurden fünf 10 µm dicke Schnitte zur Analyse herangezogen. Pro Schnitt wurden jeweils zwei Sektionen definierter Größe (325 x 185 µm) aus Infarkttrandzone und dem endokardnahen *Remote* Myokard aufgenommen. In diesen Ausschnitten wurde die Anzahl der Kapillaren als rot angefärbte Strukturen bestimmt. Die Daten wurden auf eine Fläche von 1 mm² berechnet und ergeben so die Kapillardichte pro mm². Zusätzlich wurden die jeden einzelnen Kardiomyozyten (grüne Färbung) umgebenden Kapillaren ausgezählt. Daraus ergibt sich die Kapillardichte pro Zelle. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Gruppen wurde zusätzlich die Anzahl vollständiger Kardiomyozyten in den Sektionen bestimmt. Für die Auswertung wurde pro Herz ein Durchschnittswert aus allen gemessenen Sektionen der Infarkttrandzone und aus denen des *Remote* Myokard gebildet und die Gruppen verglichen.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Isolation von CD4⁺ T-Zellen aus der Milz

Milzen von CD4^{cre}HIF-1α^{+/+} und CD4^{cre}HIF-1α^{fl/fl} Mäusen wurden durch ein 70 µm Zellsiebs gestrichen und die entstandene Zellsuspension auf Eis gelagert. Die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus der Zellsuspension wurde mit dem CD4⁺CD62L⁺ T cell isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden nicht-CD4⁺ Zellen durch Zugabe von 100 µl CD4⁺ T cell Biotin-Antibody Cocktails aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD25, CD45R, CD49b, CD105, Ter-119, *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II und *T-cell receptor* (TCR)γ/δ und 200 µl Anti-Biotin MicroBeads pro 10⁸ initial gezählter Zellen indirekt markiert. Nach Isolierung mittels MACS LS Säulen im magnetischen Feld eines MACS Separators wurde der Durchfluss (unmarkierte CD4⁺ Zellen) aufgefangen; mit MicroBeads markierte Zellen wurden verworfen. Anschließend wurden naive CD4⁺ Zellen aus dem Durchfluss durch Zugabe von 200 µl CD62L (L-selectin) MicroBeads pro 10⁸ initial gezählter Zellen direkt markiert. CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen wurden mittels MACS MS Säule im MACS Separator

isoliert. Im Anschluss wurden durchflusszytometrische Reinheitskontrollen durchgeführt, die Reinheiten von 94-98% ergaben.

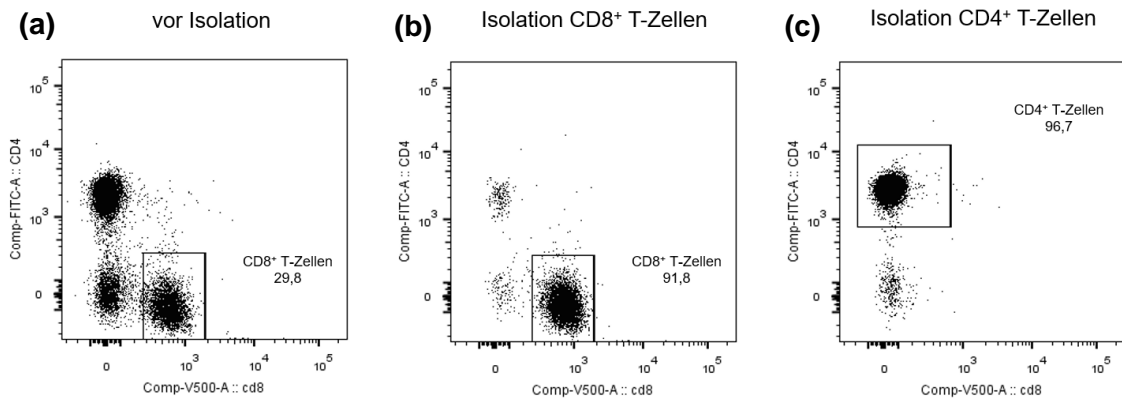


Abbildung 6 Exemplarische Reinheitskontrolle nach Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz mittels Isolations Kit der Firma Miltenyi Biotec.
(a) Durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspension aus der Milz.
(b) Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Isolation der CD8⁺ T-Zellen mittels Miltenyi Isolations Kit mit einem Anteil von 91,8 % CD8⁺ T-Zellen.
(c) Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach Isolation der CD4⁺ T-Zellen mittels Miltenyi Isolations Kit mit einem Anteil von 96,7 % CD4⁺ T-Zellen.

2.2.3.2 Isolation von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz

Die Milzen von CD4^{cre}HIF-1 α ^{+/+} und CD4^{cre}HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen wurden durch ein 70 μ m Zellsieb gestrichen und die entstandene Zellsuspension auf Eis gelagert. Die Isolierung von CD8⁺ T-Zellen aus dieser Zellsuspension wurde mit dem MACS CD8 (Ly-2) Micro Beads isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

CD8⁺ T-Zellen wurden durch Zugabe von 10 μ l CD8a (Ly-2) MicroBeads pro 10⁷ initial gezählter Zellen markiert. Anschließend wurden die markierten CD8⁺ T-Zellen mittels MACS MS Säulen im magnetischen Feld eines MACS Separators isoliert. Im Anschluss wurden durchflusszytometrische Reinheitskontrollen durchgeführt, die Reinheiten von 91-96 % ergaben (exemplarisch siehe Abbildung 6).

2.2.3.3 In vitro T-Zell Aktivierung und Polarisierung

Isolierte naive CD4⁺CD62L⁺ T-Zellen wurden in T-Zell Polarisationsmedium auf 2x10⁶ Zellen/ml verdünnt. Je 2x10⁵ Zellen wurden in einer mit Anti-CD3 (5 μ g/ml) vorbeschichteten flachbodigen 96-Well Platte kultiviert. Zu den Zellen wurden 100 μ l zweifach konzentriertes T-Zell-Polarisationsmedium gegeben. Für die T-Zell

Polarisation enthielt das Medium zusätzlich folgende Zytokine, um naive T-Zellen zu T_{reg} , T_H1 oder T_H17 Zellen zu polarisieren:

Tabelle 7 Zusammensetzung Zytokine T-Zell Polarisationsmedium

Unpolarisierte Kontrolle	T_{reg}	T_H1	T_H17
Anti-CD28 (1 μ g/ml)	TGF β 1 (4 ng/ml)	IL-2 (50 U/ml)	TGF β 1 (4 ng/ml)
		IL-12 (3 ng/ml)	IFN γ (10 μ g/ml)
		Anti-CD28 (1 μ g/ml)	IL-6 (20 ng/ml)
			Anti-CD28 (1 μ g/ml)

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Zellsuspension erneut gemischt. Nach einer Gesamtzeit von 96 Stunden Inkubation wurden die Zellen wie im Verlauf beschrieben stimuliert, um eine Produktion von zellspezifischen Zytokinen zu induzieren.

2.2.3.4 Zugabe von CoCl₂ zu T-Zellen

Um hypoxische Bedingungen in vitro zu simulieren, wurden die Zellen während der Polarisation für 24 Stunden mit 150 μ M Cobalt(II)-Chlorid (CoCl₂) inkubiert. CoCl₂ ist in der Erforschung von HIF-1 α eine etablierte Chemikalie, die zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α führt [168, 169]. Im Anschluss wurden die Zellen wie im Folgenden beschrieben stimuliert.

2.2.3.5 In vitro T-Zell Stimulation

Zur Stimulation wurden die polarisierten T-Zellen im Polarisationsmedium (2x10⁵ Zellen in 200 μ l Volumen) in eine rundbodige 96-Well Platte übertragen. Die Zellen wurden bei 350 G für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 200 μ l Stimulationsmedium resuspendiert. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde eine intrazelluläre Färbung für durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

2.2.4 Nukleinsäure Detektionstechniken

2.2.4.1 mRNA Isolation aus der Milz

Die mRNA Isolation aus Milzen wurde mit der TRIzol Reagenz durchgeführt. Die gefrorenen Milzen wurden mit einem Metallmörser und -pistill zerkleinert, in mit 1 ml TRIzol befüllte Eppendorf-Röhrchen überführt und gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 Minuten bei 12 000 G und 4 °C zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen im Eppendorf-Tube, unten eine rot gefärbte Phenol-Chloroform, eine Interphase und eine farblose wässrige obere Phase. Die obere wässrige Phase wurde in ein Röhrchen überführt und für 10 Minuten mit 0,5 ml Isopropanol inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12 000 G für 10 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 7 500 G für 5 Minuten bei 4 °C wurde das entstandene RNA-Pellet 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 40 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Quantifizierung wurde mittels Spectrophotometer NANODROP 2000c (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm durchgeführt.

2.2.4.2 mRNA Isolation aus Zellen

Die mRNA Isolation aus Zellen wurde mit dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und mittels Spectrophotometer NANODROP 2000c (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm quantifiziert. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) betrug in allen Fällen etwa 2 und bestätigte die Reinheit der RNA-Proben.

2.2.4.3 cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA (cDNA: *complementary desoxyribonucleic acid*) aus der isolierten mRNA erfolgte mit dem First Strand cDNA synthesis Kit der Firma Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland) mittels M-MuLV Reverser Transkriptase. Für die

Synthese wurde die mRNA mit RNase-freiem Wasser auf 10 ng/μl verdünnt. Zu 10 μl verdünnter mRNA wurden 5 μl Mastermix folgender Zusammensetzung hinzugegeben:

Tabelle 8 Zusammensetzung Mastermix cDNA Synthese

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [μl]
Random Primer	0,5
5x Reaction Buffer	2
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μl)	0,5
10 mM dNTP Mix	1
M-MuLV RT (200 U/μl)	1

Zur Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure mittels Genetouch Thermal cDNA Cycler (BIOER GeneTouch, Hangzou, China) wurde folgendes Programm genutzt:

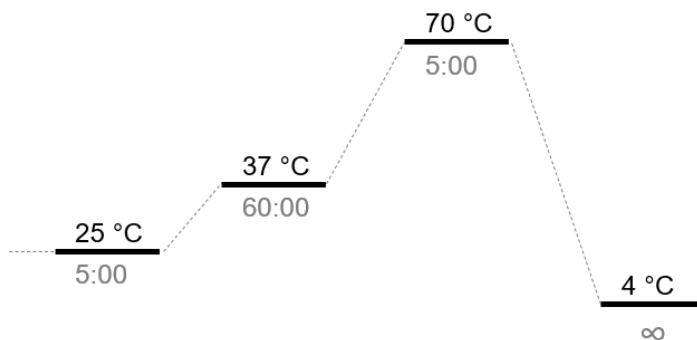


Abbildung 7 Cycler-Programm zur cDNA-Synthese

2.2.4.4 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time Polymerasekettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von Genen und quantitativer Analyse der Genexpression.

Für die qPCR wurden in einer 384-Well Platte zu 2 μl cDNA (10 ng/μl) 8 μl Mastermix gegeben. Negativkontrollen zum Ausschluss von Primer- oder Pufferkontamination enthielten 2 μl nukleasefreies Wasser und 8 μl Mastermix. Die Amplifikationsprodukte konnten durch Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR green) detektiert und quantifiziert werden.

Mastermix:

Tabelle 9 Zusammensetzung Mastermix qPCR

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [μ l]
genspezifischer <i>forward</i> Primer 10 μ M	0,8
genspezifischer <i>reverse</i> Primer 10 μ M	0,8
2x SYBR green	5
nukleasefreies Wasser	1,4

Die Durchführung der qPCR erfolgte mittels QuantiStudio 6 Flex Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland). Zur Denaturierung (95 °C), zum Annealing (60 °C) und zur DNA-Synthese (72 °C) wurde folgendes Programm genutzt:

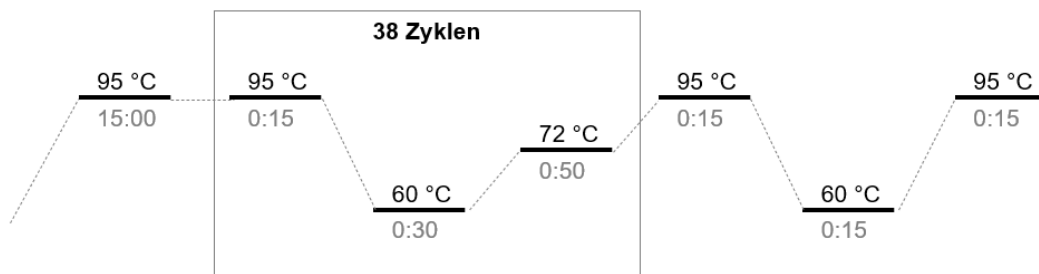


Abbildung 8 qPCR Programm

Die auch unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen konstant exprimierte Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) diene als *housekeeping* Gen bei den Berechnungen zur Normalisierung. Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ CT Methode analysiert.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Prinzip

Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) ist eine fluoreszenz-basierte Methode, mit der Zellpopulationen anhand physikalischer Eigenschaften (Zellgröße und Granularität) und Oberflächen- sowie intrazellulären Antigenen identifiziert werden können. Um Informationen über exprimierte Antigene zu erlangen, werden sie mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. In der Flusskammer des Durchflusszytometers werden Zellen einzeln mit einem LASER bestrahlt. Die Emission

der an die gebundenen Antikörper konjugierten Fluorochrome ermöglicht einen Rückschluss auf die Antigenexpression der bestrahlten Zelle.

Die Methode wurde zur Analyse von Zellen aus Milz, Blut und peripheren Lymphknoten angewendet. Die Daten der beschriebenen Versuche wurden mit FACS Celesta erhoben und mit der FlowJo Software analysiert.

2.2.5.2 Oberflächenfärbung

Die Zellen wurden in eine 96-Well Platte überführt und bei 400 G, 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 50 µl einer 1:1-Verdünnung von PBS mit 1 % FCS und FACS-Färbepuffer, der das Antikörpermisch enthält, gefärbt und für 30 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Das Gemisch wurde mit 150 µl PBS mit 1 % FCS gewaschen und bei 400 G 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl PBS mit 1 % FCS resuspendiert. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben auf Eis im Dunkeln gelagert.

2.2.5.3 Intrazelluläre Färbung

Für die Analyse des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurde das eBiosciences™ FoxP3/Transcription Factor Staining Kit von eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Für die Analyse intrazellulärer Zytokine wie IFN γ , IL17, Granzym B oder Perforin wurde das BD Cytfix/Cytoperm Kit von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Nach Anfärbung der Oberflächenantigene wurden die Zellen mit 100 µl des entsprechenden Puffers für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal mit 150 µl bzw. 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit der intrazellulären Antikörpermischung in einem Endvolumen von 50 µl Waschpuffer für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS mit 1 % FCS resuspendiert und auf Eis im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Analyse aufbewahrt.

2.3 Material

2.3.1 Verbrauchsmaterial

384-well Platten	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
6-/12-/24-well Platten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
96-well Platten flachbodig	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
96-well Platten rundbodig	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Bemis Parafilm Labor-Verpackungsfolie	Fisher-Scientific (Hampton, New Hampshire, USA)
Combitips advanced 0,5 ml, 0,1 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Deckglas	VWR (Ismaning, Deutschland)
EASYstrainer™ 70 µm - steriles Zellsieb	greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
EDTA-Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Eppendorf SafeLock Reaktionsgefäß 1,5	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Filter Pipettenspitzen 10/20/200/1000 µl	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Glaspipetten 5/10/25 ml	greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Injektionsnadeln (26 gauge)	Dispomed (Gelnhausen, Deutschland)
Liquid Blocker PAP-Pen Mini	Science Services (München, Deutschland)
LS-Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Mikrotestplatte 96 Well (FACS Platten)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
MS-Säulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Multiply® -µStrip 0.2 mL chain (cDNA tubes klein 8er)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Nitrilhandschuhe SensiCare Ice	Medline Industries (Kleve, Deutschland)
Pipetten Spitzen (10/200/1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pre-separation Filter	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Rundbodenröhrchen, Polystyrol 12x75 mm, 5 ml (FACS Röhrchen)	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexico)
Serum Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht Deutschland)
Spritzen 1/10/20 ml	BD (Heidelberg, Deutschland)
Starfrost Mikroskop-Objekträger	Knittel (Braunschweig, Deutschland)
Röhrchen konischer Boden 15 ml/50 ml	greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Vitro-Clud	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Western type Hochfettdiät (21 % Milchfett, 0,15 % Cholesterol, 19,5 % Casein)	Altromin (Lage, Deutschland)

2.3.2 Instrumente und Geräte

Analog Vortex Schüttler	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Cyrostat CM3050 S	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Dissektionswerkzeug	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Durchflusszytometrie FACSCelesta™	BD (Heidelberg, Deutschland)
Eclipse T5100 Mikroskop	Nikon (Minato, Japan)
Elektronische Pipette Eppendorf Easypet 3	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
ELISA Lesegerät infinite M200 pro0000	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Gefrierer -80 °C HERAFreeze HLE	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Genetouch Thermal cDNA Cyclor	BIOER GeneTouch (Hangzou, China)
Horizontalschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Kamera Mikroskop HV-F202 UXGA 3CCD	HITACHI Europe (Düsseldorf, Deutschland)

Kühlschränke, Gefrierschränke	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 B	Leica (Wetzlar, Deutschland)
MACS Multi Stand	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Manuelle Mehrkanalpipette Eppendorf Research plus (8 Kanal 100, 12 Kanal 300)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikrowelle	Privileg (Stuttgart, Deutschland)
Mikrozentrifuge MiniStar Silverline	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Mikrozentrifuge PlateFuge™	Benchmark Scientific (Sayreville, New Jersey, USA)
Multipipette Xstream	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipetten Pipetman (1/10/20/100/1000 µl)	Gilson (Limburg, Deutschland)
QuantiStudio 6 Flex Thermal Cycler (PCR Maschine)	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Rotationsmikrotom RM 2255 (Cryoschnitte)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Schüttler I 296-003 DELFIA Plateshake	PerkinElmer (Rodgau, Deutschland)
Spectrophotometer NANODROP 2000c	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Sterile bench für Zellkultur SK-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Deutschland)
Thermoschüttler TS PRO	Cell Media (Elsteraue, Deutschland)
Tissue embedding Leica EG1150C	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Vortex Schüttler LMS Uzusio VTX-3000L	Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH (Dresden, Deutschland)
Zellkultur Inkubator	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge HERAEUS FRESCO 17	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 40R	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

Zentrifuge HERAEUS MULTIFUGE X3R	Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
----------------------------------	--

2.3.3 Reaktionskits

Amplex red Cholesterol Assay Kit	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
CD4+CD62L+ T Zell Isolations Kit II	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CD8a (Ly-2) Microbeads Maus	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Cytofix/Cytoperm staining Kit	BD (Heidelberg, Deutschland)
First strand cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
FoxP3 Transkription Puffer staining Set	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
Nucleo spin RNA II Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RNeasy micro/mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.3.4 Chemikalien und Reagenzien

0,05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Acetaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Basis Fuchsin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Brefeldin A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Cobalt(II)-Chlorid (CoCl ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol 100 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol 75 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol absolut p.A.	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Kalbserum (FCS)	PAA (Pasching, Österreich)
Gelatine (aus Rinderhaut – Typ B)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Hanks balanced salt solution (HBSS)	Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
Hasenserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HEPES	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isofluran	CD Pharma (Burgdorf, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
KCl (PBS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
KH ₂ PO ₄ (PBS)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KHCO ₃ (Ery lysis)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Konzentrierte Salzsäure HCl	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lectin von Triticum vulgaris /FITC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamin 2 mM	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Mausserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ (PBS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl (PBS)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NEAA	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pferdeserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PMA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Rhodamin Wheat Germ Agglutinin	VectorLaboratories (Burlingam, Kanada)
RNase freies Wasser	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Sodiumcitrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sodiumpyruvat	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol (50 mM)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Streptavidin-HPR	BD (Heidelberg, Deutschland)
SYBR Green Mix (2x)	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Tissue Tek OCT compound	Sakura Finetek (Staufen, Deutschland)
TRIS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris (TBS)	AppliChem (Carmstadt, Deutschland) Roth
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIzol	Ambion Life technologies
Tween-20	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Vectashield ohne DAPI	VectorLaboratories (Burlingam, Kanada)
Xylene	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ziegenserum	Vector Laboratories (Buringam, Kanda)
Zitronensäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.3.5 Zytokine

Zytokin	Stamm-Konzentration	Finale Konzentration	Hersteller
rh-TGF-beta1	1 μ g/ml	4 ng/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
rm IL-12	10 μ g/ml	3 ng/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
rm IL-2		50 U/ml	Peptotech (Hamburg, Deutschland)
rm IL-4	10 μ g/ml	20 ng/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
rm IL-6	10 μ g/ml	20 ng/ml	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)

2.3.6 Antikörper

2.3.6.1 Fluoreszierende Antikörperkonjugate

Epitop	Fluorochrom	Wirt	anti-	Verdünnung	Klon	Hersteller
CD25	APC	Ratte monoklonal	Maus	1/300	PC61.5	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD3e	V450	Hamster monoklonal	Maus	1/300	500A2	BD (Heidelberg, Deutschland)
CD3e	PE	Ratte monoklonal	Maus	1/300	145- 2C11	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD4	FITC	Ratte monoklonal	Maus	1/300	GK1.5	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD44	PerCP- Cyanine5.5	Ratte monoklonal	Maus/ Mensch	1/300	IM7	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD45	APC-Cy7	Ratte monoklonal	Maus	1/300	30-F11	BD (Heidelberg, Deutschland)
CD45	APC	Ratte monoklonal	Maus	1/300	30-F11	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD62L	FITC	Ratte monoklonal	Maus	1/300	MEL-14	BD (Heidelberg, Deutschland)
CD8a	V500	Ratte monoklonal	Maus	1/300	53-6.7	BD (Heidelberg, Deutschland)
CD8a	PE-Cy7	Ratte monoklonal	Maus	1/300	53-6.7	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
CD8a	V500	Ratte monoklonal	Maus	1/300	53-6.7	BD (Heidelberg, Deutschland)
FOXP3	PE	Ratte monoklonal	Maus/ Ratte	1/100	FJK-16s	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
Granzym B	FITC	Ratte monoklonal	Maus	1/100	NGZB	eBioscience (Frankfurt

						a.M., Deutschland)
IFN γ	APC	Ratte monoklonal	Maus	1/100	XMG1.2	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
IL-17A	PE	Ratte monoklonal	Maus/ Ratte	1/300	eBio17B7	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
Isotyp Ratten IgG, CD16/32	(FC block)	Ratte monoklonal	Maus	1/300	93	BioLegend (San Diego, California)
TCR	FITC	Hamster monoklonal	Maus	1/300	eBioGL3	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
TCR β	PerCP- Cyanine5.5	Hamster monoklonal	Maus	1/300	H57-597	eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
Fixable Viability Dye	eFluor450			1/1000		eBioscience (Frankfurt a.M., Deutschland)
α -SM Aktin	Cy3	Maus monoklonal	Maus		1A4	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2.3.6.2 Primäre Antikörper

Epitop	Wirt	anti-	Klon	Hersteller
CD3	Ratte monoklonal	Mensch , Maus	CD3-12	BioRad (Hercules, California, USA)
Mac2	Maus monoklonal	Ratte	CL8942AP	BioLegend (San Diego, California, USA)
CD31	Ratte monoklonal	Maus	390	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

Epitop	Wirt	anti-	Klon	Hersteller
anti-IFN γ	Ratte monoklonal	Maus	XM6.1.2	BioXcell (Lebanon, New Hampshire, USA)
anti-TNF α	Ratte monoklonal	Maus	MP6-XT3	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
anti-CD3e	Hamster monoklonal	Maus	145-2C11	BioLegend (San Diego, California, USA)
anti-CD28	Hamster monoklonal	Maus	37.51	BioLegend (San Diego, California, USA)

2.3.6.3 Sekundäre Antikörper

Epitop	Wirt	anti-	Hersteller
anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 555	Ziege	Ratte	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 488	Ziege	Ratte	invitrogen Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.3.6.4 Isotyp-Kontrollen

Goat IgG Isotyp Kontrolle	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
Rabbit IgG Isotyp Kontrolle	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)

2.3.7 Primer

Polymerase-Kettenreaktion

Hersteller Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland)

Primer	Orientierung	Sequenz (5' nach 3')
HIF1 α exon2	<i>reverse</i>	GGT GAG CCT CAT AAC AGA AGC TTT
	<i>forward</i>	CAA GAT CTC GGC GAA GCA A
IFN γ	<i>reverse</i>	TCA CCA TCC TTT TGC CAG TTC C
	<i>forward</i>	GCT GTT TCT GGC TGT TAC TGC
mFoxP3	<i>reverse</i>	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG
	<i>forward</i>	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT

mGranzym	<i>reverse</i>	GGC CCC CAA AGT GAC ATT TAT T
	<i>forward</i>	CCA CTC TCG ACC CTA CAT GG
mHPRT	<i>reverse</i>	CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC
	<i>forward</i>	TCC TCC TCA GAC CGC TTT T
mIL-10	<i>reverse</i>	CAC AGG GGA GAA ATC GAT GAC A
	<i>forward</i>	ATT TGA ATT CCC TGC GTG AGA AG
mIL17A	<i>reverse</i>	GGG TCT TCA TTG CGG TGG AGA G
	<i>forward</i>	ATC CCT CAA AGC TCA GCG TGT C
mPerforin	<i>reverse</i>	GCG TCT CTC ATT AGG GAG TTT TT
	<i>forward</i>	AGC ACA AGT TCG TGC CAG G
mRORyt	<i>reverse</i>	CTT CCA TTG CTC CTG CTT TC
	<i>forward</i>	TGA GGC CAT TCA GTA TGT GG
mVEGF α	<i>reverse</i>	GCA TTC ACA TCT GCT GTG CT
	<i>forward</i>	ATC TTC AAG CCG TCC TGT GT
TGFb	<i>reverse</i>	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
	<i>forward</i>	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G
TNF- α	<i>reverse</i>	GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC
	<i>forward</i>	CTG TAG CCC ACG TCG TAG C

Genotypisierung

Hersteller: Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland)

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
HIF1 α -flox	oIMR 7068	TGC TCA TCA GTT GCC ACT T
	oIMR 7069	GTT GGG GCA GTA TGG AAA G
LDLR	oIMR 0092	AAT CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT C
	oIMR 3349	CCA TAT GCA TCC CCA GTC TT
	oIMR 3350	GCG ATG GAT ACA CTC ACT GC
CD4	CRE1	CGA GTG ATG AGG TTC GCA AG
	CRE2	TGA GTG AAC GAA CCT GGT CG
	oIMR 8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	oIMR 8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

2.3.8 Software

BD FACS Diva Software v8.0.1.1	BD (Heidelberg, Deutschland)
DISKUS Analyse Software Version 4.81.1638	Hilgers Technisches Büro (Königswinter, Deutschland)
DISKUS Aufnahme Software Version 5.0.6331	Hilgers Technisches Büro (Königswinter, Deutschland)
FlowJo 10.6.1 Software	Tree Star (Ashland, Oregon, USA)
i-control 1.10 Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
ImageJ Software	Wayne Rasband, NIH (Bethesda, Maryland, USA)
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Office Word 2016	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
Prism Graph Pad 7 Software	Graph Pad (La Jolla, California, USA)
QuantStudio Real-Time PCR Software	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.3.9 Puffer, Lösungen und Medien

Dulbecco's phosohatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland)
RPMI-1640	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Puffer

Erythrozyten Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • DDW • 155 mM NH₄Cl • 10 mM KHCO₃ • 0,1 mM EDTA
FACS Färbepuffer Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Anteil HBSS • 1 Anteil FACS Färbepuffer Stammlösung
FACS Färbepuffer Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x PBS • 2 % Mausserum • 2 % Hasenserum • 1 % BSA
Immunhistochemie Blockpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x Immunhistochemie Waschpuffer • 10 % Ziegenserum
Immunhistochemie Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x PBS • 5 % FCS • 0,1 % Tween-20
MACS Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x D-PBS • 0,5 % BSA • 2 mM EDTA
Makrophagen Färbepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x PBS • 2 % Mausserum • 2 % Hasenserum • 2 % Pferdeserum • 1 % BSA • 0,1 % Triton X-100
Phosphate buffered saline (PBS)	<ul style="list-style-type: none"> • Deuteriumarmes Wasser (DDW) • 137 mM NaCl • 2,7 mM KCl • 18,61 mM Na₂HPO₄ • 1,8 mM KH₂PO₄ • pH auf 7,4 eingestellt

Lösungen

Aldehyd Fuchsin Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • Aldehyd Fuchsin Stammlösung • 5 % Acetaldehyd • Inkubation über Nacht bei RT
Aldehyd Fuchsin Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 70 % Ethanol • 5 g/l Basic Fuchsin
Antigendemaskierung Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • 90 ml DDW • 1,8 ml Antigendemaskierung Stammlösung A • 8,2 ml Antigendemaskierung Stammlösung B • 50 µl Tween-20
Antigendemaskierung Stammlösung A	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter DDW • 21,01 g Zitronensäure
Antigendemaskierung Stammlösung B	<ul style="list-style-type: none"> • 1 Liter DDW • 29,41 g Natriumcitrat
Kaiser's Glycerin Gelatine Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • 3 Anteile Kaiser's Glycerin Gelatine Stammlösung • 7 Anteile DDW
Kaiser's Glycerin Gelatine Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 4 g Gelatine • 21 ml DDW • 25 ml Glycerin
Oil-Red O Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • 3 Anteile Oil-Red O Stammlösung • 2 Anteile DDW • Inkubation für eine Stunde bei RT
Oil-Red O Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 99 % Isopropanol • 5 mg/ml Oil-Red O

Medium

DC Medium	<ul style="list-style-type: none">• RPMI-1640 (mit 2 mM L-Glutamin)• 10 % FBS (hitzeinaktiviert)• 100 U/ml Penicillin-Streptomycin• 50 μM β-Mercaptoethanol
Zytokin Stimulationsmedium (für intrazelluläre Färbung FACS)	<ul style="list-style-type: none">• DC Medium• 50 ng/ml PMA• 750 ng/ml Ionomycin• 2.5 μg/ml Brefeldin A
T-Zell Polarisationsmedium	<ul style="list-style-type: none">• DC Medium• 1 mM Natriumpyruvat• 1 mM NEAA• 10 mM HEPES

2.3.10 Mausstämme

C57BL6/J (B16)	Jackson Laboratories (Maine, USA)
B6.129S7-Ldlr ^{tm1Her} /J (LDLR ^{-/-})	Jackson Laboratories (Maine, USA)
B6.129-Hif1a ^{tm3Rsjc} /J (HIF-1 α ^{fl/fl})	Jackson Laboratories (Maine, USA)
B6.Cg-Tg(Cd4-cre)1Cwi/BfluJ (CD4cre)	Jackson Laboratories (Maine, USA)

2.4 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 7 (Graph Pad, La Jolla, California, USA) durchgeführt. Dabei sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) angegeben.

Mittelwertunterschiede zweier Gruppen wurden mit dem Students-t-Test, multiple Mittelwertvergleiche mit ANOVA (*analysis of variance*) und Bonferroni post-hoc Test durchgeführt. Zur Identifizierung von statistischen Ausreißern (*Outlier*) wurde der Grubbs' test for outliers verwendet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 HIF-1 α in T-Zellen - In vitro Daten

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in T-Lymphozyten in vitro zu untersuchen, wurden aus Mäusen mit den Genotypen CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} und CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aus den Milzen isoliert. Nach der Aktivierung beider Zellpopulationen erfolgte zusätzlich die Polarisation der CD4⁺ Zellen in die T-Zell Subtypen T_H1, T_H17 und T_{reg}. Die Analysen der Subtypen erfolgten anhand der spezifischen Effektorzytokine und Transkriptionsfaktoren (siehe Abbildung 3). Methodisch wurden die Durchflusszytometrie und die qPCR verwendet.

3.1.1 CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse exprimierten keine HIF-1 α mRNA

Vor Durchführung der in vitro Experimente wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf die Expression von HIF-1 α mRNA untersucht. Dazu wurden die isolierten T-Zellen aktiviert und polarisiert. Anschließend wurde mittels qPCR die Analyse der mRNA Expression durchgeführt. In den Mäusen mit dem Genotyp CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe (CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+}) in keiner Zellpopulation eine Expression von HIF-1 α mRNA festgestellt werden. Einige der CD8⁺ T-Zellen wurden zusätzlich für 24 Stunden mit Cobalt-Chlorid zur HIF-Stabilisierung behandelt. Auch hier zeigte die CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl}-Gruppe keine HIF-1 α mRNA-Expression.

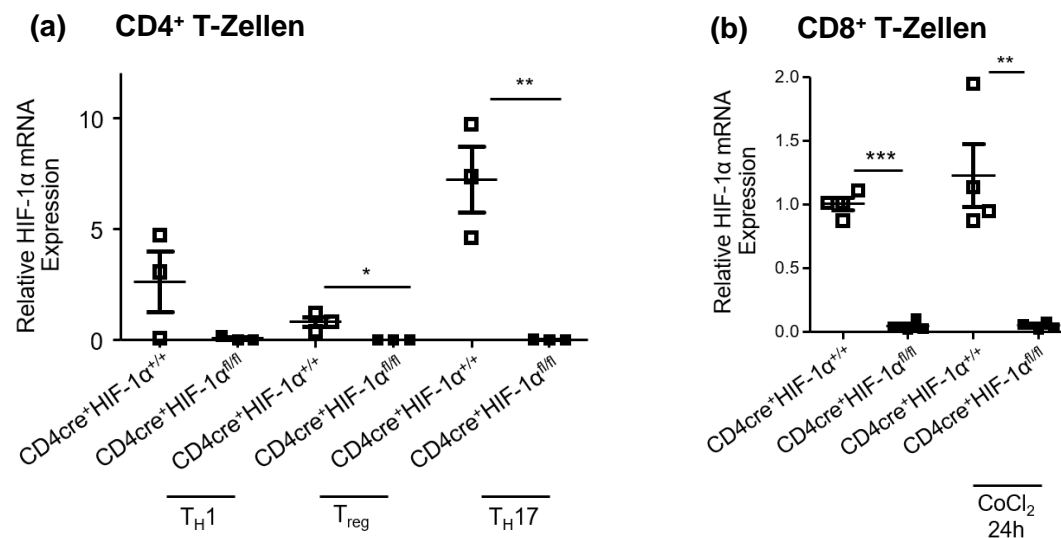


Abbildung 9 **CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigten in CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen keine Expression von HIF-1α mRNA.** Isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus der Milz von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 3-4) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 3-4) wurden durch Zugabe von anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert und die CD4⁺ T-Zellen zusätzlich zu T_{H1}-, T_{H17}- und T_{reg}-Zellen polarisiert. Ein Teil der CD8⁺ T-Zellen wurde anschließend für 24 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Es erfolgte eine Analyse mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). **(a)** HIF-1α mRNA Nachweis in Subtypen CD4 positiver T-Zellen mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. **(b)** HIF-1α mRNA Nachweis in CD8 positiven T-Zellen mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test (a) und ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test (b), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.1.2 T_{H1}-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1α Defizienz keine Veränderung der Anzahl oder Produktion von IFN γ und TNF α

In der Durchflusszytometrie wurden anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) Zelltrümmer, die durch eine geringe Streuung in beiden Streulichtern charakterisiert sind, aus den aus der Milz isolierten CD4⁺ Zellen exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Der für T-Zellen charakteristische T-Zellrezeptor β wurde genutzt, um diese Population zu erkennen. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt. T_{H1}-Zellen wurden anhand der Expression des Effektorzytokins IFN γ durchflusszytometrisch identifiziert.

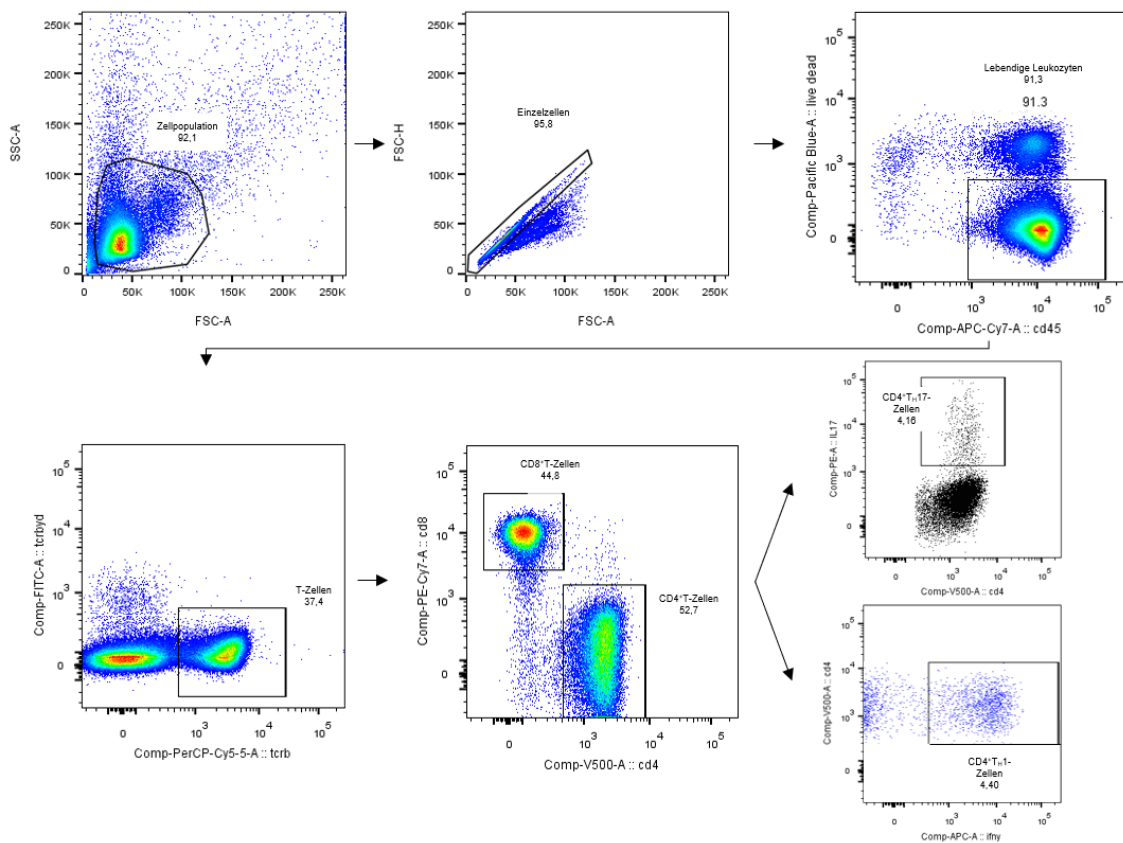


Abbildung 10 Gating Strategie IFN γ -Produktion in T_H1-Zellen exemplarisch. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Der für T-Zellen charakteristische T-Zellrezeptor β wurde genutzt, um diese Population zu erkennen. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt. T_H1-Zellen wurden anhand der Expression des Effektorzytokins IFN γ durchflusszytometrisch identifiziert.

T_H1-Zellen zeigten auch nach 24-stündiger Inkubation mit Cobalt(II)-chlorid zur HIF-1 α Stabilisierung keine Änderung am Anteil T_H1-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD4⁺ Lymphozyten. Auch bei den für IFN γ und TNF α codierenden Genen *Irfng* und *Tnfa* konnte auf mRNA-Ebene kein Unterschied der CD4^{cre}HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse zur Kontrollgruppe gezeigt werden.

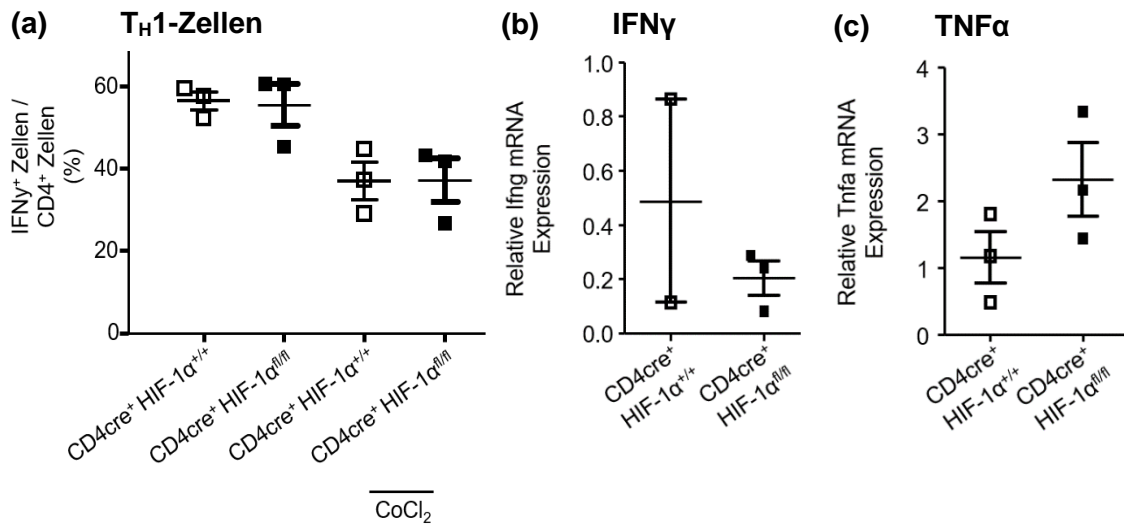


Abbildung 11 TH1-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1α Defizienz keine Veränderung von Anzahl oder Produktion der *Ifng*- und *Tnfa*-mRNA. Isolierte CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 3) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 3) wurden durch Zugabe von anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert und mittels IL2 und rmIL12 zu TH1-Zellen polarisiert. Ein Teil wurde anschließend für 24 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Es erfolgte eine Analyse mit Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). **(a)** Durchflusszytometrische Analyse IFNγ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen. Das Gating wurde nach Gating Abbildung 10 durchgeführt. **(b)** Analyse der *Ifng* mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten *Hprt*-Gen. **(c)** Analyse der *Tnfa* mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten *Hprt*-Gen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels ANOVA (a) und t-Test (b, c).

3.1.3 TH17-Zellen in vitro waren bei HIF-1α Defizienz unter Hypoxiesimulation vermindert nachweisbar

TH17-Zellen wurden durchflusszytometrisch als IL17⁺-Zellen anteilig an allen CD4⁺ Zellen identifiziert, nachdem Zellrückstände, -doubletten und tote Zellen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, exkludiert wurden.

TH17-Zellen zeigten bei Defizienz von HIF-1α im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zugabe von Cobalt(II)-chlorid keine Unterschiede in ihrer Anzahl. Eine Änderung der Expression des *Rorc* Gens und des *IL17* Gens konnte auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit Cobalt(II)-chlorid zur HIF-1α Stabilisierung konnte jedoch ein signifikanter Abfall des Anteils der TH17-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ Lymphozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Vergleicht man beide CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Gruppen, so führte die Inkubation mit Cobalt(II)-Chlorid ebenfalls zu einem signifikanten Unterschied des TH17-Zell Anteils.

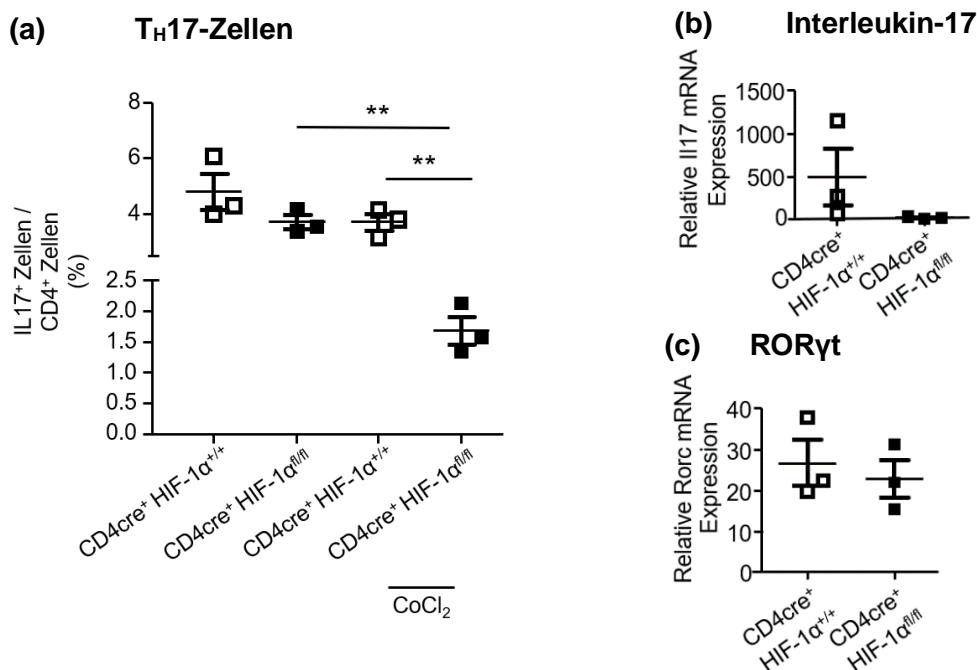


Abbildung 12 TH17-Zellen in vitro waren bei HIF-1α Defizienz unter Hypoxiesimulation mittels CoCl₂ vermindert nachweisbar. Isolierte T-Zellen aus der Milz von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 3) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 3) wurden durch Zugabe von anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert und mittels rhTGFβ und rIL6 zu TH17-Zellen polarisiert. Ein Teil wurde anschließend für 24 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Es erfolgte eine Analyse mit Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). **(a)** Durchflusszytometrische Analyse IL17⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen. Das Gating wurde nach Gating Abbildung 10 durchgeführt. **(b)** Analyse der Effektorzytokin IL17 mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. **(c)** Analyse der Rorc mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test (a) und t-Test (b, c), ** p < 0,01.

3.1.4 T_{reg}-Zellen in vitro wurden bei HIF-1α Defizienz vermehrt gebildet

Die Bildung von T_{reg}-Zellen wurde mittels qPCR auf die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 und des Effektorzytokins IL-10 untersucht. In den T-Zellen mit HIF-1α Defizienz zeigte sich eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Foxp3). Wie in der Literatur beschrieben deutet dies darauf hin, dass durch HIF-1α die T-Zell Differenzierung hin zu TH17-Zellen und zu Ungunsten der T_{regs} stattfindet. Die mRNA des Effektorzytokins zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei geringer Gruppengröße ohne signifikanten Unterschied.

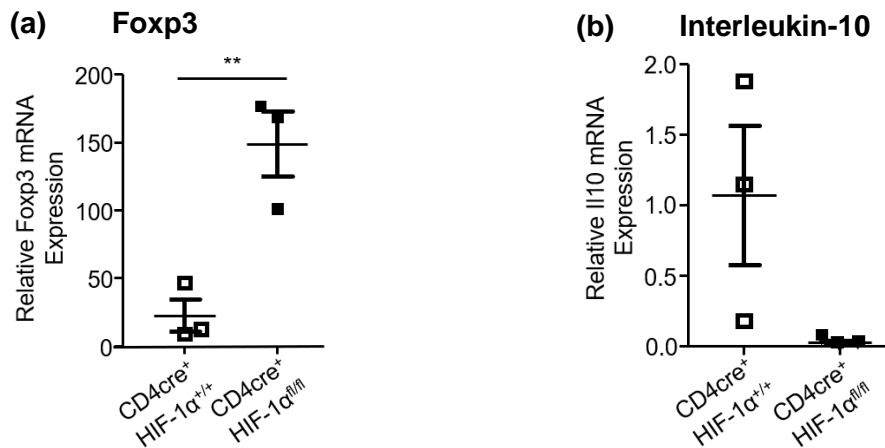


Abbildung 13 Vermehrte Expression von in T_{reg}-Zellen exprimiertem Foxp3 bei Defizienz von HIF-1α. Isolierte T-Zellen aus der Milz von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 3) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 3) wurden durch Zugabe von anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert und mittels rhTGFβ T_{reg}-Zellen polarisiert. Es erfolgte eine Analyse mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). **(a)** Analyse der Transkriptionsfaktor Foxp3 mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen.. **(b)** Analyse der Effektorzytokin Il10 mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, ** p < 0,01.

3.1.5 CD8⁺ T-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1α Defizienz eine verstärkte Produktion von mRNA des Proteins Perforin

CD8⁺ T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und qPCR bezüglich ihres Vorkommens und der Produktion zytotoxischer Substanzen untersucht. Granzym B ist eine Serinprotease, die zur Einleitung der Apoptose in Zielzellen führt. Perforin ist ein Protein, welches zur Porenbildung in den Zielzellen und damit ebenfalls zur Apoptose führt.

Anhand dieser Eigenschaften wurde in CD8⁺ T-Zellen als CD8⁺-Zellen die Expression von Granzym und IFNγ bestimmt, nachdem Zellrückstände, -doubletten und tote Zellen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, exkludiert wurden.

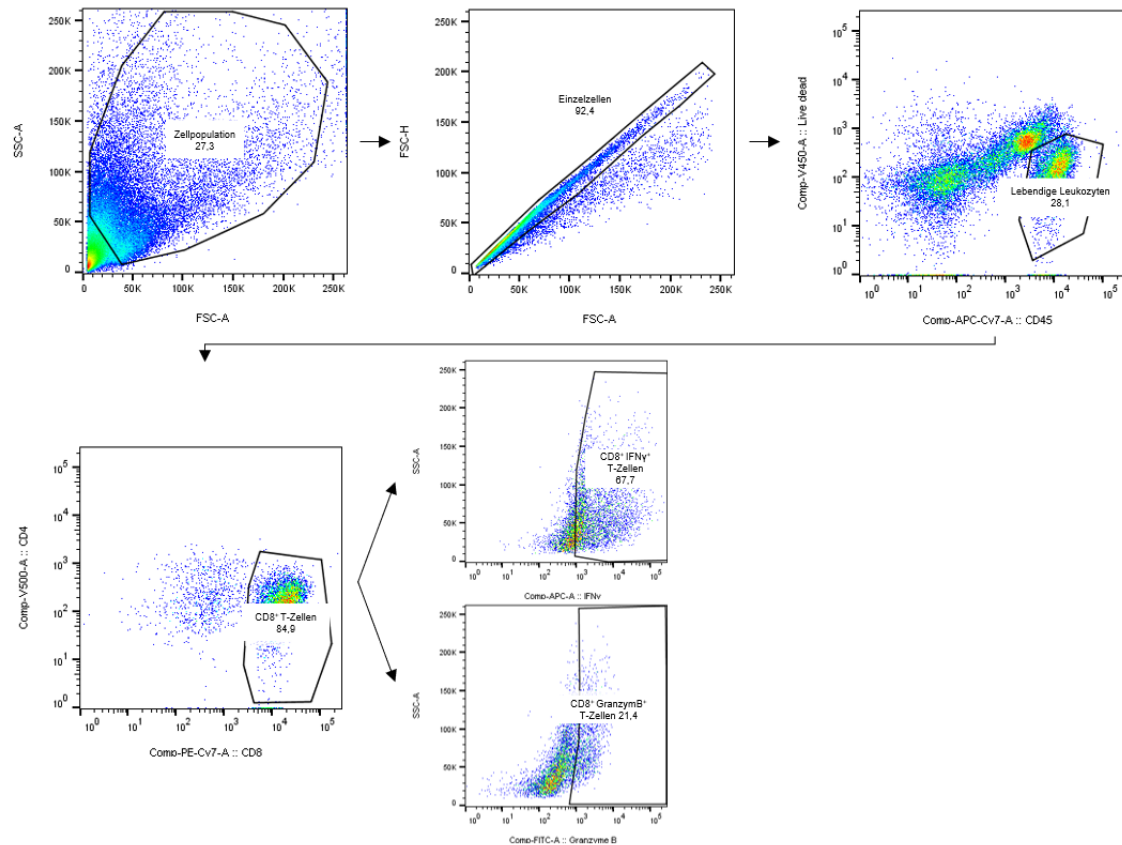


Abbildung 14 Gating Strategie zytotoxische Zytokine in CD8⁺ T-Zellen exemplarisch. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen wurden auf die Expression von IFN γ und Granzym untersucht.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten auch unter Einfluss von Cobalt(II)-Chlorid zur Stabilisierung von HIF-1 α keine Unterschiede im Anteil von Granzym⁺ Zellen und IFN γ ⁺ Zellen an CD8⁺ T-Zellen zwischen CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe. Auch in der Granzym mRNA (*Gzmb*) Expression zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Allerdings konnte in der CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Gruppe eine signifikant höhere Perforin mRNA (*Prf1*) Expression nachgewiesen werden.

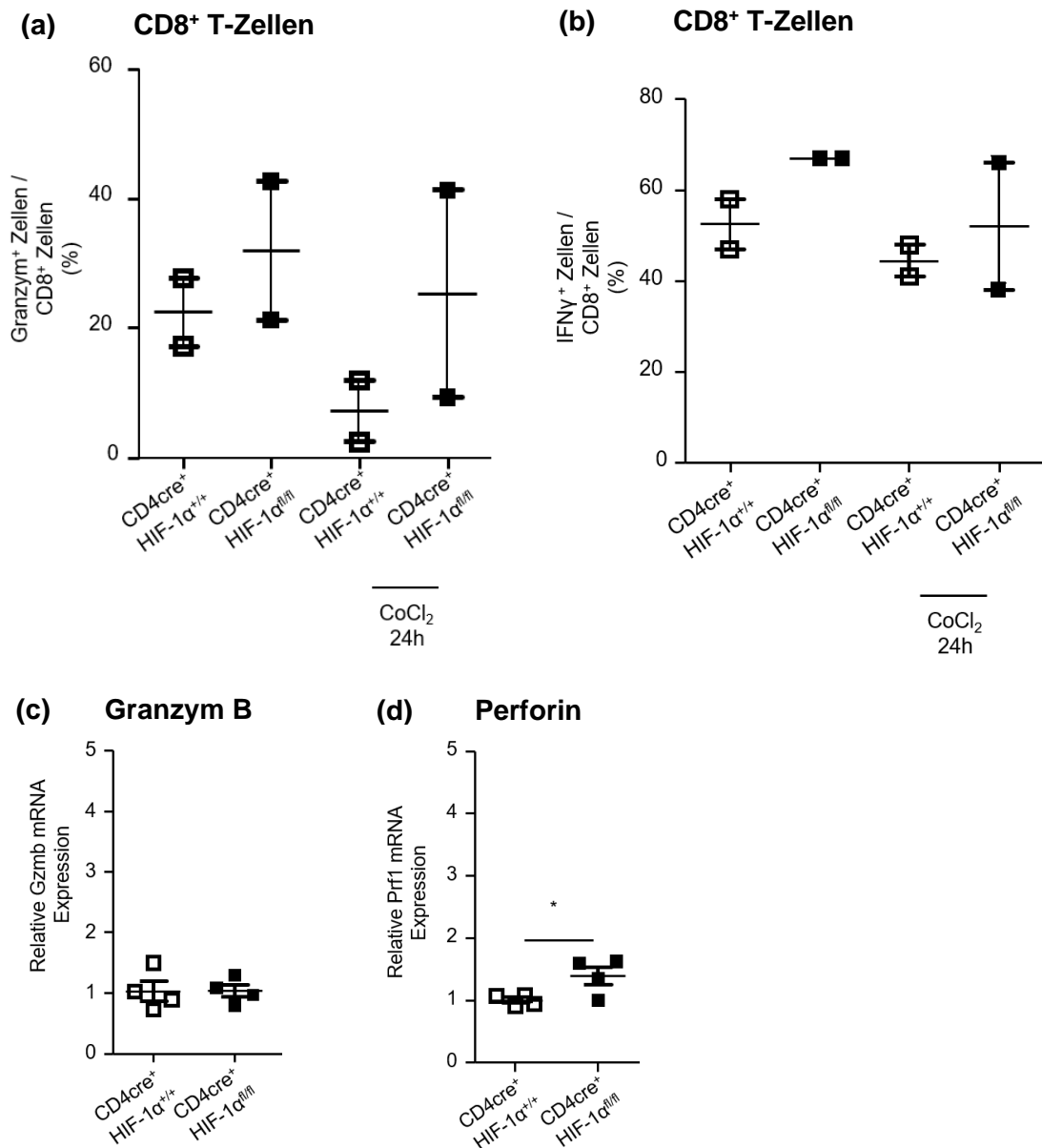


Abbildung 15 CD8⁺ T-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1α Defizienz auf mRNA Ebene eine verstärkte Produktion des Proteins Perforin. CD8⁺ T-Zellen wurden aus der Milz von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 3) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 3) isoliert und mit anti-CD3 und anti-CD28 aktiviert. Ein Teil wurde anschließend für 24 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Es erfolgte eine Analyse mit Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR). **(a)** Durchflusszytometrische Analyse Granzym⁺ T-Zellen anteilig an allen CD8⁺ T-Zellen. Das Gating wurde nach Gating Strategie 6 (s. Anhang) durchgeführt. **(b)** Durchflusszytometrische Analyse IFNγ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD8⁺ T-Zellen. Das Gating wurde nach Abbildung 14 durchgeführt. **(c)** Analyse der Gzmb mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. **(d)** Analyse der Prf1 mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels ANOVA (a, b) und t-Test (c, d), *p<0.05.

3.2 HIF-1 α in T-Zellen im Myokardinfarkt

Vorherige histologische und echokardiographische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten nach HIF-1 α Ausschalten in T-Lymphozyten im Myokardinfarktmodell größere Infarktzone und eine eingeschränkte kardiale Funktion 28 Tage nach Infarktinduktion zeigen.

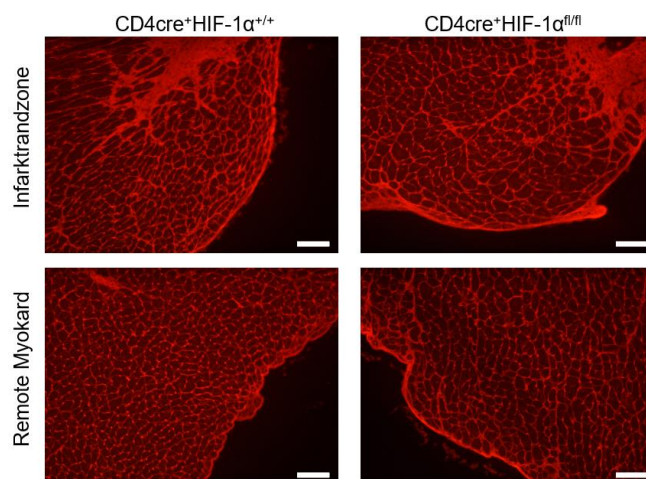
Um histopathologische Veränderungen der Kardiomyozytengröße und der Kapillardichte in der Infarkttrandzone und im nicht infarzierten Myokard (*Remote* Myokard) zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Untersucht wurden Kryoschnitte infarzierter Mäuserzen von CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäusen (n = 8) und CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen (n = 7) vier bis acht Wochen nach Myokardinfarkt.

3.2.1 Die Fläche der Kardiomyozyten im infarzierten Herzen wurde durch HIF-1 α Defizienz in T-Zellen nicht verändert

Es wurde untersucht, ob sich die Kardiomyozytenfläche in den Kryoschnitten der infarzierten Herzen von CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe unterscheidet. Dazu wurde die Zellmembran der Myozyten mit einem WGA-Rhodamin Konjugat gefärbt und folgend die Fläche der Zellen ausgemessen. Betrachtet wurden für diese Analyse verschiedene Areale der Herzen: die Infarkttrandzonen und nicht-infarzierte Zonen, das sogenannte *Remote* Myokard.

In den Infarkttrandzonen konnte kein Unterschied zwischen der Fläche der Kardiomyozyten von CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch in dem *Remote* Myokard zeigte sich keine signifikante Differenz. Vergleicht man die kombinierten Daten aus den CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe aus der Infarkttrandzone mit denen aus dem *Remote* Myokard, kann kein Unterschied in der Kardiomyozytenfläche festgestellt werden.

(a) Repräsentative Kardiomyozyten



(b) Fläche Kardiomyozyten

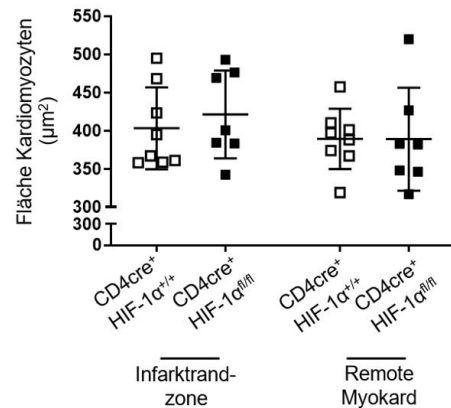


Abbildung 16 Die Fläche der Kardiomyozyten im infarzierten Herzen wurde durch Ausschalten der Funktion von HIF-1α in T-Zellen nicht verändert. Kryoschnitte infarzierter Herzen 4-8 Wochen nach Myokardinfarkt von CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 8) und CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 7) wurden mit einem *wheat germ agglutinin*-Rhodamin Konjugat (WGA) angefärbt und anschließend die mittlere Kardiomyozytenfläche aus Infarkttrandzone und nicht infarziertem *Remote* Myokard bestimmt und verglichen. **(a)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Infarkttrandzone und *Remote* Myokard nach Anfärbung der Zellmembran mit WGA/Rhodamin (rot). Skalierungsbalken 100μm. **(b)** Kardiomyozytenfläche in μm² in Infarkttrandzone und *Remote* Myokard beider Gruppen.

Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels ANOVA.

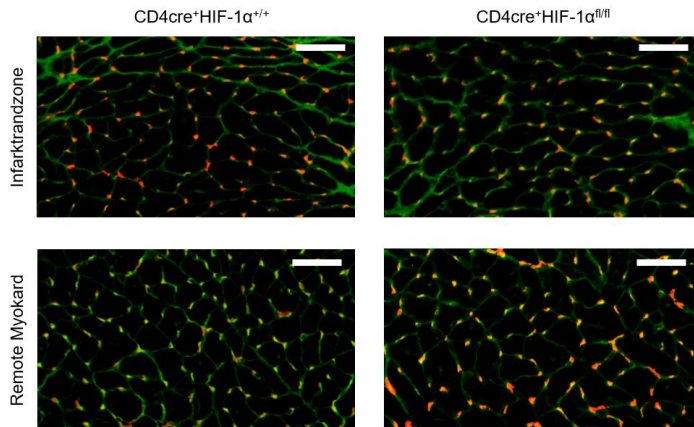
Gewebeschnitte erstellt von Melanie Rösch, histologische Färbungen und Analysen durchgeführt von Tim Knochenhauer.

3.2.2 Die Dichte der Kapillaren im infarzierten Myokard wurde bei HIF-1α Defizienz in T-Zellen nicht verändert

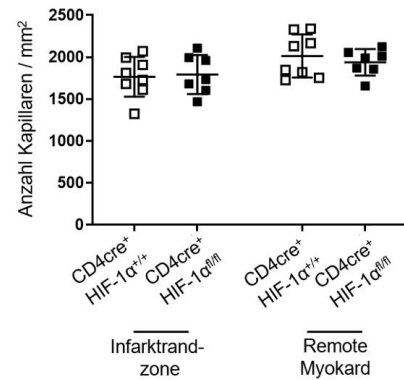
Weitere Untersuchungen möglicher histopathologischer Veränderungen des Myokards der CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäuse umfassten die Messung der Kapillardichte in den infarzierten Herzen. Dazu wurden die Kapillaren gegen CD31 gefärbt. Weiterhin erfolgte die Gegenfärbung der Zellmembran mit WGA. Es erfolgte die Analyse der Anzahl der Kapillaren pro mm² Myokard und pro Kardiomyozyt. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Daten zur Kapillaranzahl pro mm² zwischen beiden Gruppen wurde zusätzlich zu den Daten aus Kapitel 3.2.1 die Anzahl der Kardiomyozyten pro mm² Myokard verglichen. Diese zeigte sich bestätigend zu den Ergebnissen der Analyse der Kardiomyozytenfläche ohne Unterschied zwischen CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe.

In allen der genannten Analysen zeigten sich zwischen den Mausgruppen und zwischen Infarkttrandzone und *Remote* Myokard keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Kapillaren.

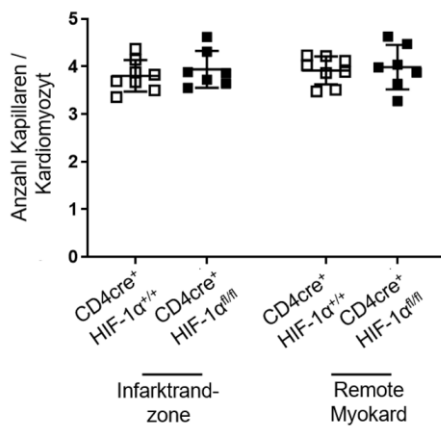
(a) Repräsentative Kapillardichte



(b) Anzahl Kapillaren



(c) Kapillaren pro Kardiomyozyt



(d) Kardiomyozyten pro mm²

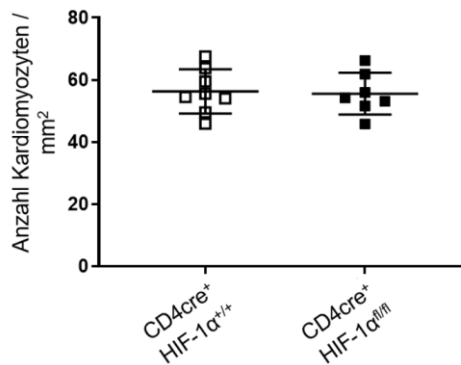


Abbildung 17 Die Dichte der Kapillaren im infarzierten Myokard wurde durch Ausschalten der Funktion von HIF-1 α in T-Zellen nicht verändert. Kryoschnitte infarzierter Herzen 4-8 Wochen nach Myokardinfarkt von CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäusen (n = 8) und CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen (n = 7) wurden mit WGA und einem Primärantikörper gegen CD31 angefärbt und anschließend die Anzahl der Kapillaren pro mm² und pro Kardiomyozyt aus Infarkttrandzone und nicht infarziertem *Remote* Myokard bestimmt und verglichen. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit dieser Daten wurde in beiden Mausgruppen die Anzahl der Kardiomyozyten pro mm² bestimmt. **(a)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus Infarkttrandzone und *Remote* Myokard nach Anfärbung der Kapillaren mit einem Primärantikörper gegen CD31 (rot fluoreszierender Sekundärantikörper) und Gegenfärbung der Zellmembran mit WGA (an grün fluoreszierendes FITC gekoppelt). Skalierungsbalken 50 μ m. **(b)** Anzahl der Kapillaren pro mm² in Infarkttrandzone und *Remote* Myokard beider Gruppen. **(c)** Anzahl der Kapillaren pro Kardiomyozyt in Infarkttrandzone und *Remote* Myokard beider Gruppen. **(d)** Anzahl der Kardiomyozyten pro mm² in beiden Gruppen. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels ANOVA (b,c) und t-Test (d).

Gewebeschnitte erstellt von Melanie Rösch, histologische Färbungen und Analysen durchgeführt von Tim Knochenhauer.

3.3 HIF-1 α in T-Zellen in Atherosklerose nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät

Zur Erforschung der Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α in T-Zellen in Atherosklerose wurden sieben weibliche LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäuse und zehn weibliche LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse für acht Wochen mit einer fettreiche Western-Typ Diät gefüttert. Untersucht wurden anschließend die Plaqueausprägung, die Charakterisierung der Plaques sowie der lokale und systemische T-Zell-Phänotyp. Nach acht Wochen Diät zeigten sich die Cholesterinspiegel der Mäuse beider Gruppen nicht unterschiedlich. Körper- und Milzgewicht der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse war signifikant höher als das der Kontrollgruppe.

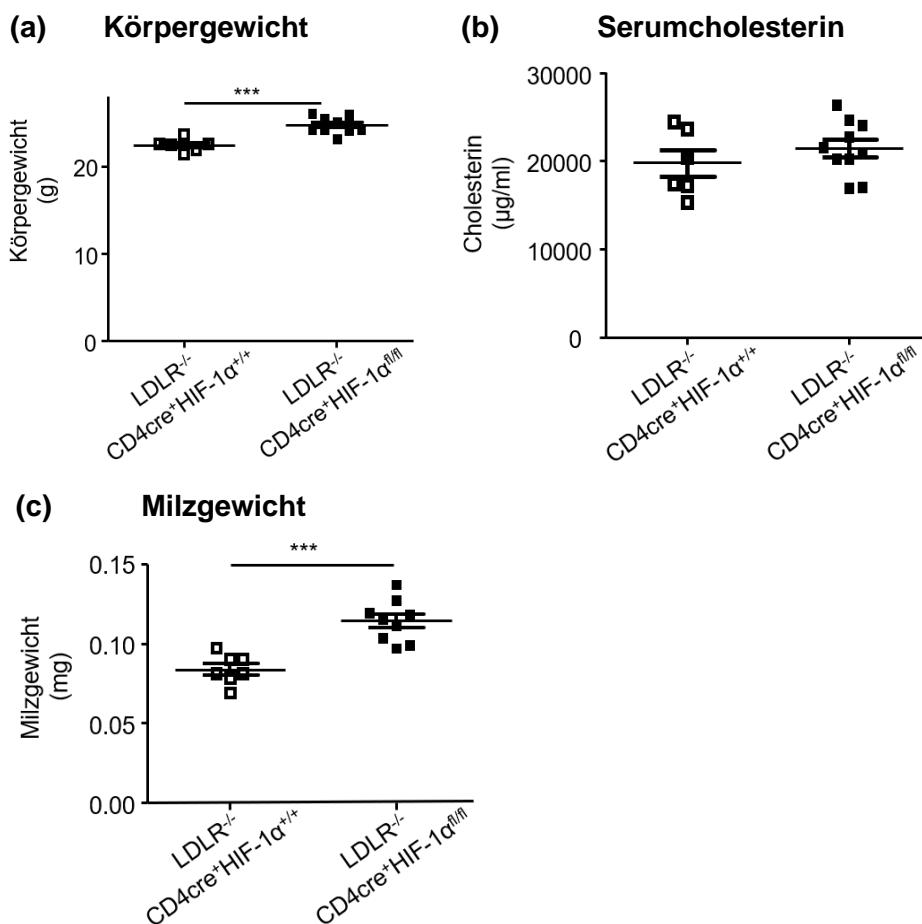


Abbildung 18 Körpergewicht, Serumcholesterin und Milzgewicht der weiblichen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäuse (n = 7) und der weiblichen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse (n = 10) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät. (a) Körpergewicht der Mäuse beider Gruppen. (b) Cholesterin im Serum. (c) Milzgewicht der Mäuse beider Gruppen. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, *** p < 0,001.

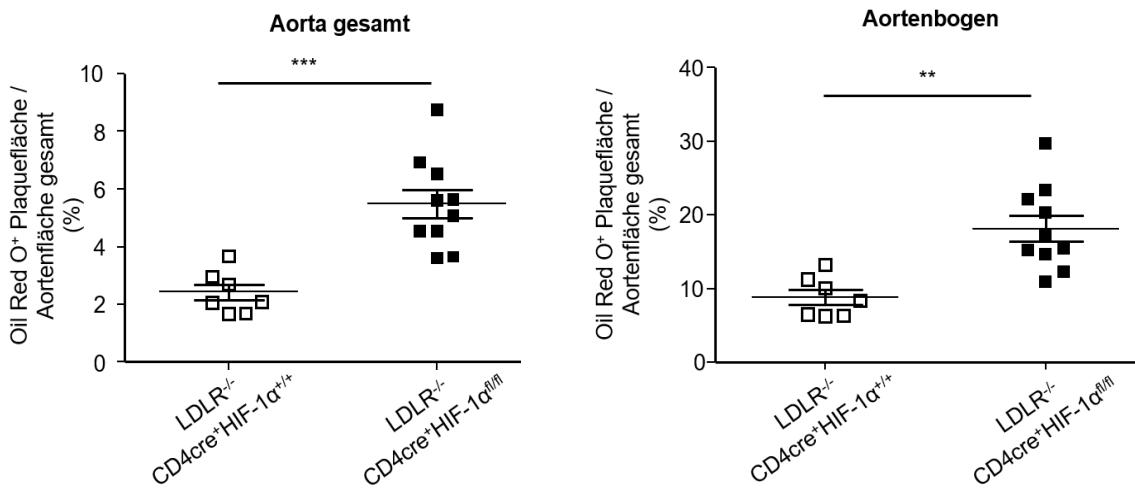
3.3.1 Eine HIF-1 α Defizienz in T-Zellen aggravierte das Ausmaß atherosklerotischer Plaques in LDLR^{-/-} Mäusen

Die mit Oil Red O angefärbten Plaques wurden lichtmikroskopisch ausgemessen und mit der Gesamtfläche der Aorten verglichen. Dabei wurden zusätzlich zur gesamten Plaqueausprägung Daten aus jedem anatomischen Anteil der Aorta generiert: der Aortenbogen, die thorakale Aorta bis zum Abgang der Nierenarterien und der abdominelle Anteil. Zusätzlich erfolgte die Quantifizierung der Plaquegröße der Aortenwurzel mit Aldehyd Fuchsin-Färbung.

Alle Untersuchungen zeigten in der Gruppe der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse signifikant größere Plaques als in der Kontrollgruppe. Es konnte auch in der Aufteilung in die anatomischen Abschnitte in jedem einzelnen Abschnitt eine Zunahme der Plaquegröße festgestellt werden. Die meiste Plaquefläche anteilig an der gesamten Aortenfläche zeigte sich im Aortenbogen.

Die Ausmessung der Plaquefläche wurde zur Erhaltung der Vergleichbarkeit weiterer ähnlicher Versuche in der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit von Petra Hönig-Liedl und Tim Knochenhauer durchgeführt.

(a) Plaquefläche



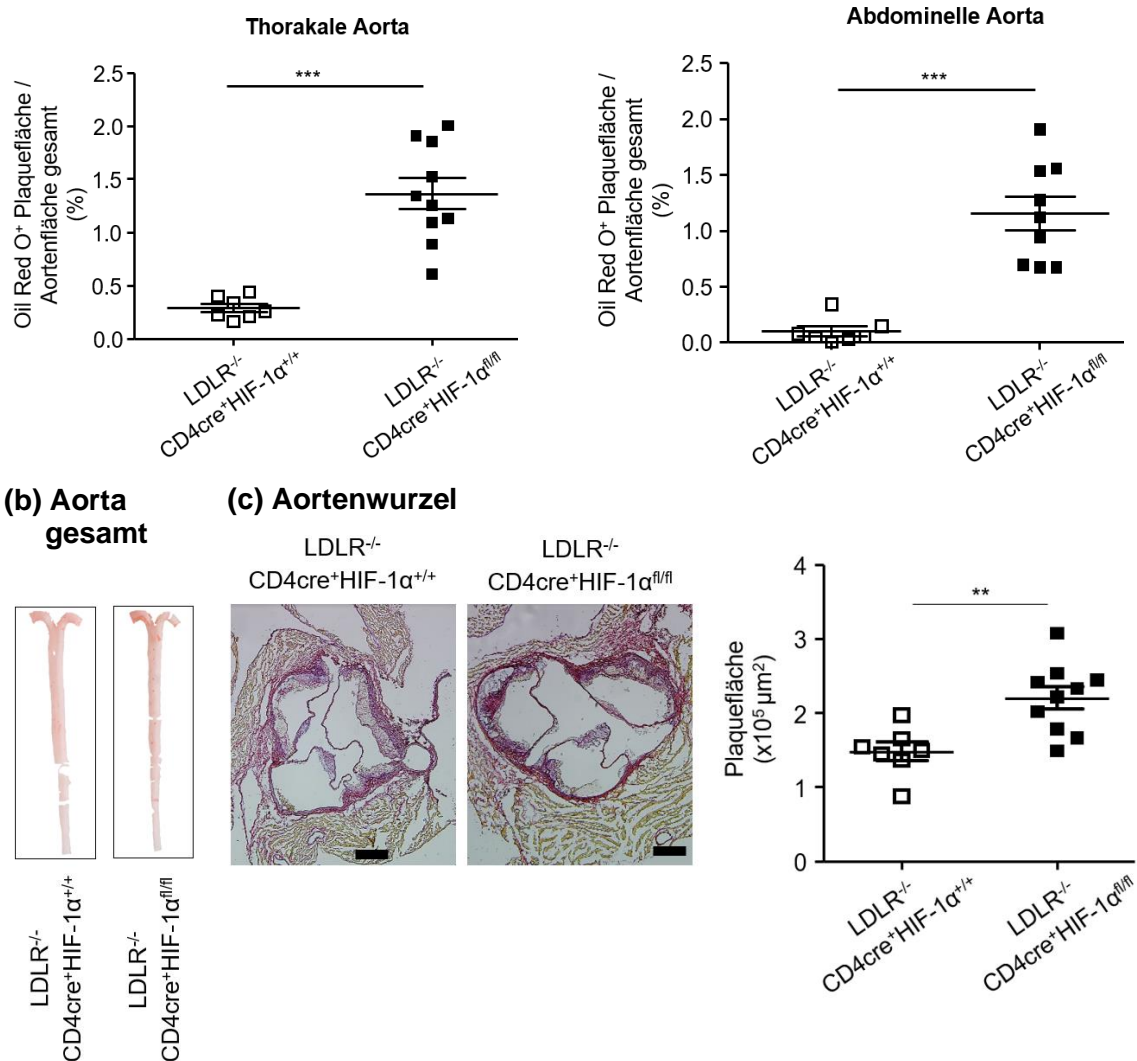


Abbildung 19 Eine HIF-1α Defizienz in T-Zellen aggravierte das Ausmaß atherosklerotischer Plaques in LDLR^{-/-} Mäusen. Analyse der Plaqueläche in weiblichen LDLR^{-/-} CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 7) und in weiblichen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 10) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät. **(a)** Anfärbung der Plaques mittels Oil Red O Färbung, Quantifizierung des Plaqueanteils relativ zur gesamten Aortenfläche. Ergebnisse aufgeteilt in anatomische Abschnitte der Aorta (Aorta gesamt, Aortenbogen, thorakale Aorta, abdominelle Aorta). **(b)** Repräsentative Schnitte zweier thorakoabdomineller Aorten gefärbt mit Oil Red O Färbung. **(c)** Quantifizierung der Aortenwurzel mit Aldehyd Fuchsin-Färbung. Skalierungsbalken 200μm. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Aortenschnitte erstellt von Melanie Rösch, Färbungen von Petra Hönig-Liedl durchgeführt, Ausmessen der Plaqueläche von Petra Hönig-Liedl und Tim Knochenhauer.

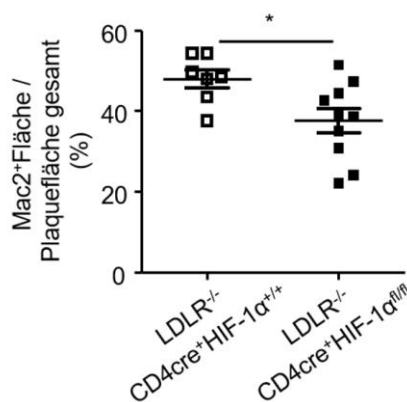
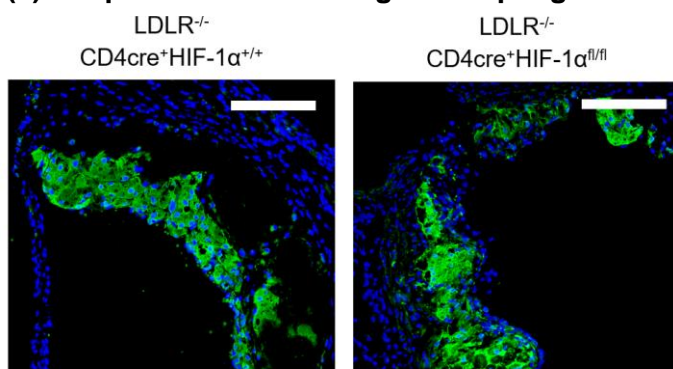
3.3.2 Plaques von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen zeigten nach acht Wochen Western-Typ Diät einen verminderten Makrophagenanteil

Die vergrößerten Plaques in den LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen wurden histologisch weiter auf Unterschiede in der Zusammensetzung mit denen der Kontrollgruppe untersucht. Es wurden die Anteile von Makrophagen, T-Zellen, nekrotischem Kern und glatten Muskelzellen an der gesamten Plauefläche beurteilt.

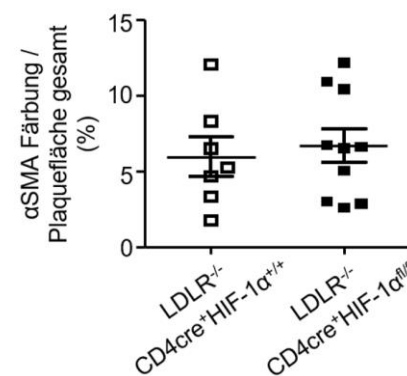
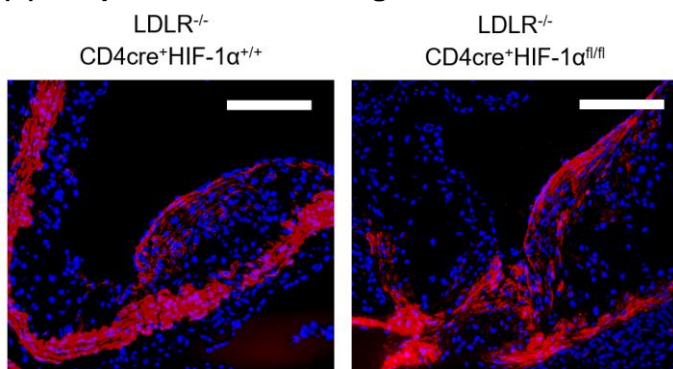
Die Auswertung zeigte einen signifikant geringeren Makrophagenanteil in den Plaques der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäuse. In der weiteren untersuchten Zusammensetzung der Plaques bezüglich Anzahl von T-Zellen und glatten Muskelzellen sowie der Größe des nekrotischen Kerns konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Die Analyse wurde zur Erhaltung der Vergleichbarkeit weiterer ähnlicher Versuche in der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit von Petra Hönig-Liedl und Tim Knochenhauer durchgeführt.

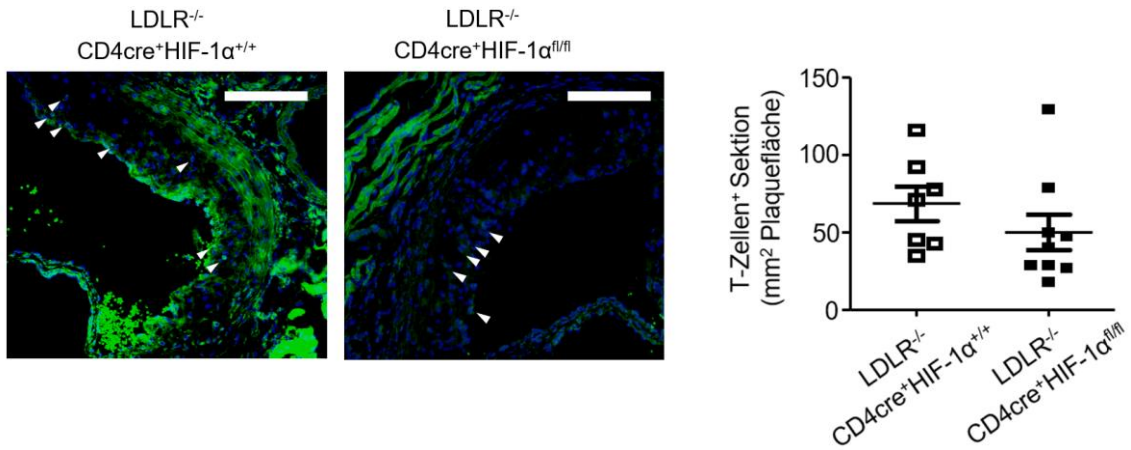
(a) Plaquecharakterisierung: Makrophagen



(b) Plaquecharakterisierung: Glatte Muskelzellen



(c) Plaquecharakterisierung: T-Zellen



(d) Plaquecharakterisierung: Nekrotischer Kern

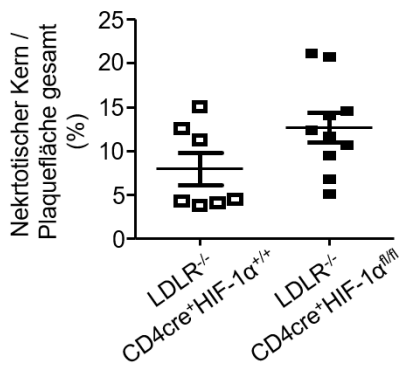


Abbildung 20 Die histologische Zusammensetzung der Plaques von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 10) zeigte nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät einen verminderten Makrophagenanteil, weiter aber keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (n = 7). (a) Anfärbung der Makrophagen mittels Mac2 Immunhistochemie und Analyse der für Mac2 positiven Fläche anteilig an der gesamten Plaquefläche. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Mac2 Färbung (grün fluoreszierender Sekundärantikörper) und mit DAPI gegengefärbten Zellkernen (blau). Skalierungsbalken 100µm. (b) Anfärbung der glatten Muskelzellen mittels α-SM Aktin Immunhistochemie und Analyse der für α-SM Aktin positiven Fläche anteilig an der gesamten Plaquefläche. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit α-SM Aktin Färbung (rot fluoreszierendes Antikörperkonjugat) und mit DAPI gegengefärbten Zellkernen (blau). Skalierungsbalken 100µm. (c) Anfärbung der T-Zellen mittels CD3 Immunhistochemie und Analyse der für T-Zellen positiven Fläche. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit CD3 Färbung (grün fluoreszierender Sekundärantikörper) und mit DAPI gegengefärbten Zellkernen (blau). Weiße Pfeile kennzeichnen T-Zellen in den Sektionen. Skalierungsbalken 100µm. (d) Analyse der Fläche des nekrotischen Kerns anteilig an der gesamten Plaquefläche. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, * p < 0,05.

Schnitte erstellt von Melanie Rösch, Färbungen von Petra Hönig-Liedl durchgeführt, Analyse durch Petra Hönig-Liedl und Tim Knochenhauer.

3.3.3 T-Zell Phänotyp in Atherosklerose

Es erfolgte eine T-Zell Phänotypisierung aus den LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen und den LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen aus peripheren Lymphknoten, Milz und Blut.

3.3.3.1 Achtwöchige Western-Typ Diät induzierte eine Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen in peripheren Lymphknoten in LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen

T-Zellen wurden aus inguinalen Lymphknoten isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer, die durch eine geringe Streuung in beiden Streulichtern charakterisiert sind, ausgeschlossen. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten exkludiert und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Der für T-Zellen charakteristische T-Zellrezeptor β wurde genutzt, um diese Population zu erkennen. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt.

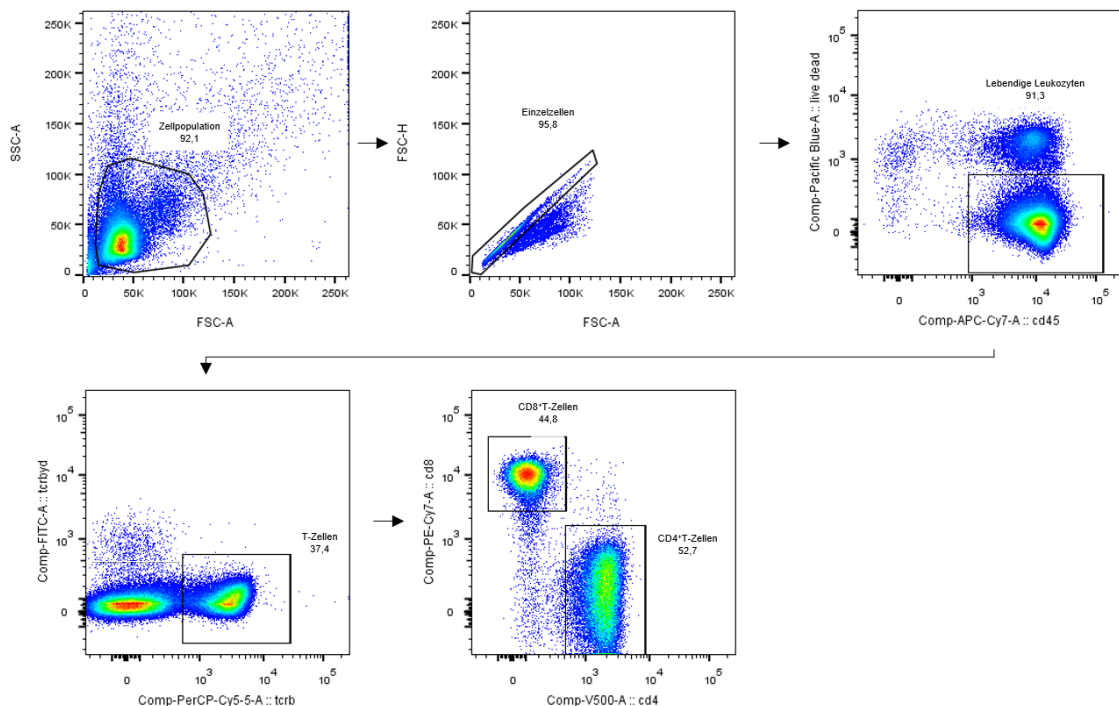
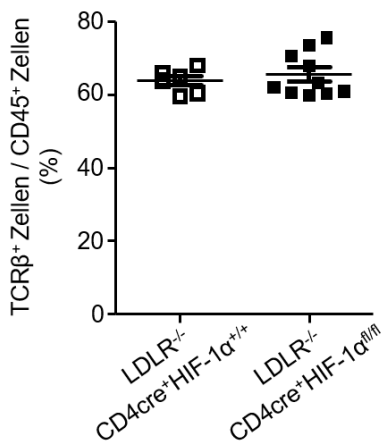


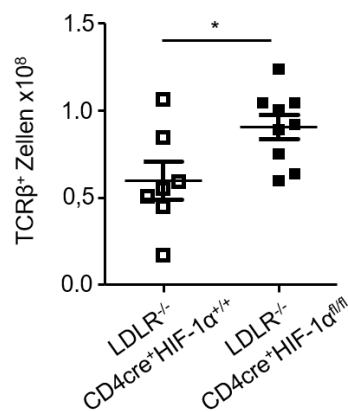
Abbildung 21 Gating Strategie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Der für T-Zellen charakteristische T-Zellrezeptor β wurde genutzt, um diese Population zu erkennen. Die T-Zell-Population wurde anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterteilt.

Der Anteil von T-Zellen an der Gesamtheit Leukozyten war in beiden Gruppen ohne Unterschied. Allerdings war die absolute Anzahl der T-Zellen in den LDLR^{-/-} CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Die Untersuchung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigte anteilig an den durch positiven T-Zell-Rezeptor β identifizierten T-Zellen auch keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die absolute Anzahl beider T-Zell Subtypen war jedoch ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

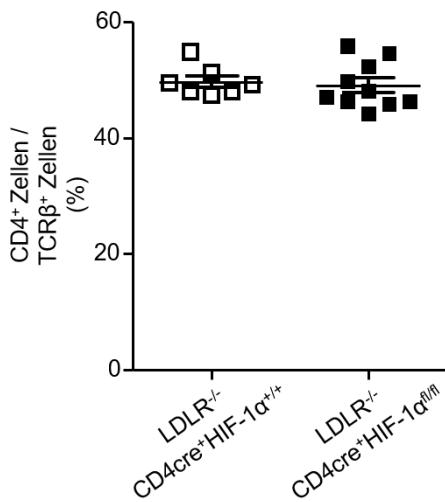
(a) pLK T-Zellen gesamt



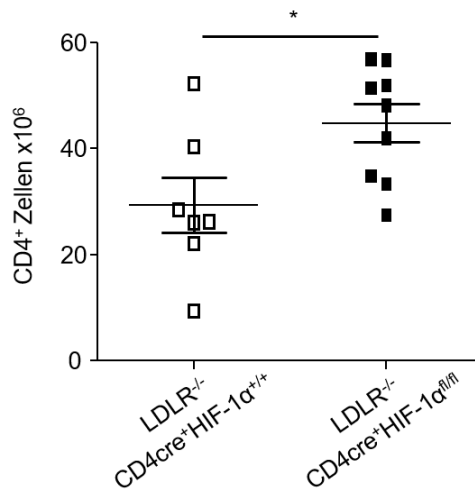
(b) pLK T-Zellen gesamt



(c) pLK CD4⁺-Zellen



(d) pLK CD4⁺-Zellen



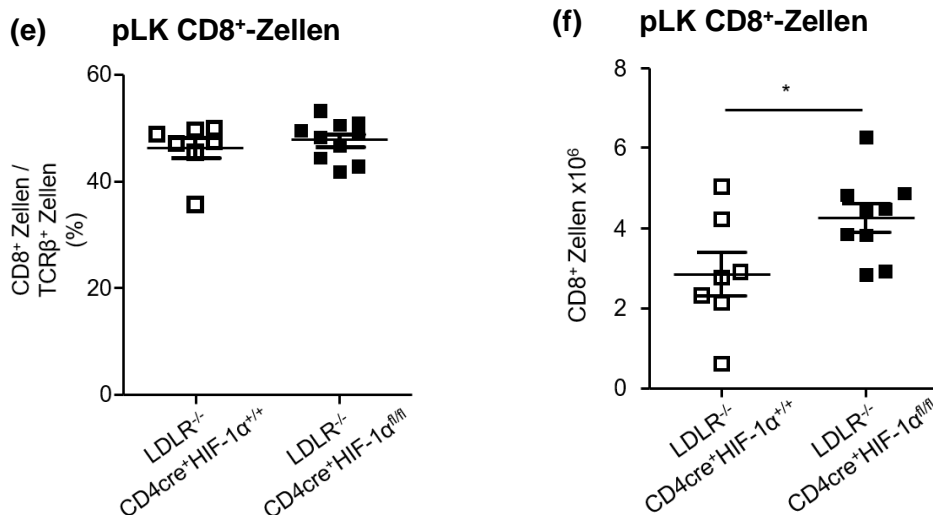


Abbildung 22 T-Zellphänotypisierung in peripheren Lymphknoten von $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen ($n = 9$) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse ($n = 7$) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät ein vermehrtes absolutes Auftreten von $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellpopulationen. Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellpopulationen in peripheren Lymphknoten von $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen ($n = 9$) im Vergleich zu $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen ($n = 7$). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 21 durchgeführt. **(a)** TCR β^{+} Zellen (T-Zellen) anteilig an $CD45^{+}$ Zellen (Leukozyten). **(b)** Absolute Zahl TCR β^{+} Zellen (T-Zellen). **(c)** $CD4^{+}$ T-Zellen anteilig an TCR β^{+} Zellen (T-Zellen). **(d)** Absolute Zahl $CD4^{+}$ T-Zellen. **(e)** $CD8^{+}$ T-Zellen anteilig an TCR β^{+} Zellen (T-Zellen). **(f)** Absolute Zahl $CD8^{+}$ T-Zellen. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, * $p < 0,05$.

3.3.3.2 Achtwöchige Western-Typ Diät in $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen führte zu keiner Veränderung der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellpopulationen in der Milz

T-Zellen wurden aus der Milz isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Nach der Auswahl einzelner lebendiger Leukozyten wie in Kapitel 3.3.3.1 bereits beschrieben, wurden T-Zellen als der Anteil TCR β^{+} Zellen an allen $CD45^{+}$ Zellen, also Leukozyten, identifiziert. Weiterhin wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker $CD4$ und $CD8$ in $CD4^{+}$ T-Zellen und $CD8^{+}$ zytotoxische T-Zellen unterteilt (exemplarisch s. Abbildung 21).

Der Anteil von T-Zellen an der Gesamtheit Leukozyten war in beiden untersuchten Gruppen ohne Unterschied. Auch die absolute Anzahl der T-Zellen in den $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen war nicht unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Die Untersuchung der $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$ T-Zellen zeigte anteilig sowie absolut ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ und $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen.

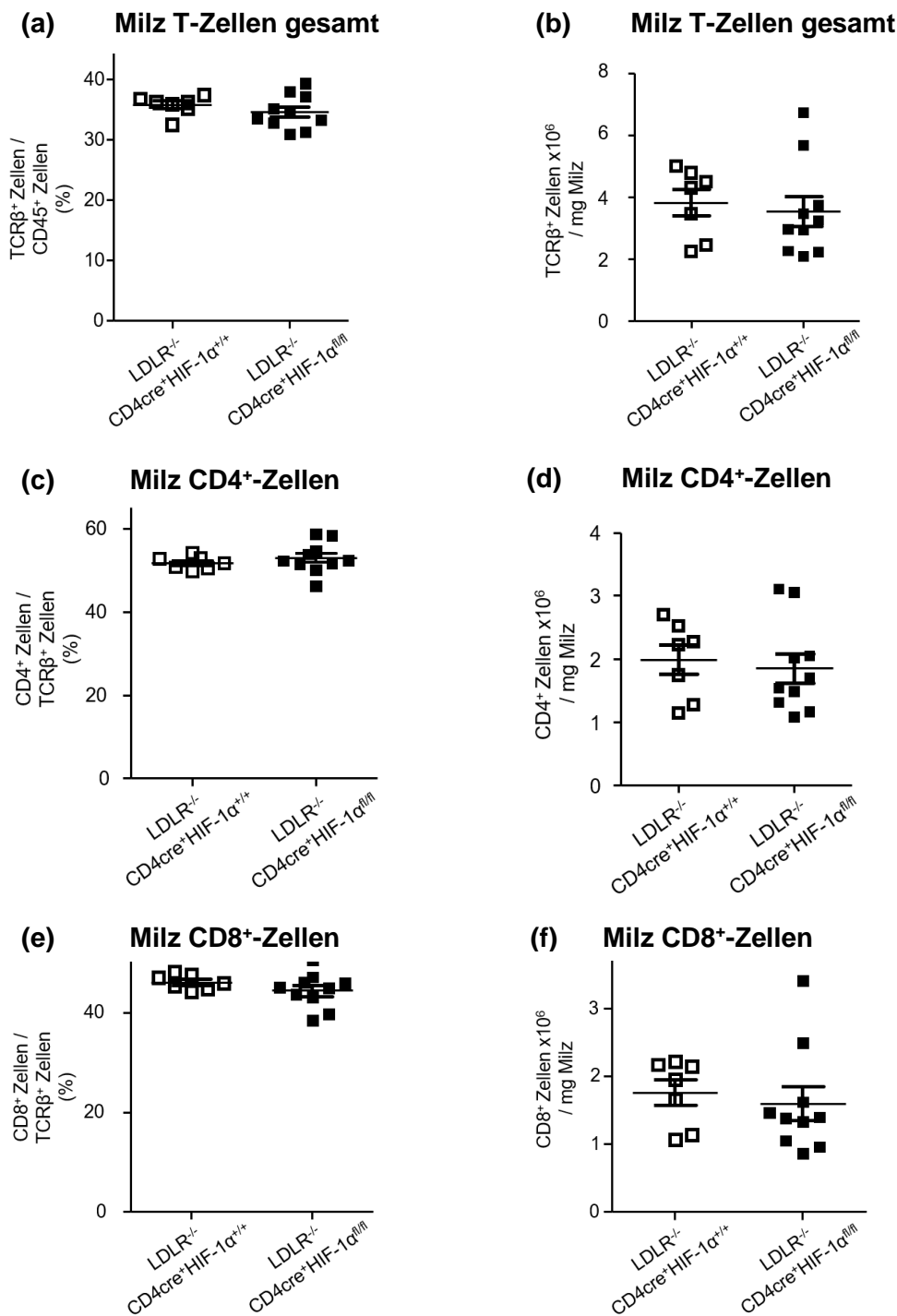


Abbildung 23 T-Zellphänotypisierung in der Milz von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 9) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäuse (n = 7) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät keine signifikanten Unterschiede. Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellpopulationen in der Milz von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 9) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 7). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 21 durchgeführt. **(a)** TCRβ⁺Zellen (T-Zellen) anteilig an CD45⁺ Zellen (Leukozyten). **(b)** Absolute Zahl TCRβ⁺Zellen (T-Zellen) pro mg Milzgewebe. **(c)** CD4⁺ T-Zellen anteilig an TCRβ⁺Zellen (T-Zellen). **(d)** Absolute Zahl CD4⁺ T-Zellen pro mg Milzgewebe. **(e)** CD8⁺ T-Zellen anteilig an TCRβ⁺Zellen (T-Zellen). **(f)** Absolute Zahl CD8⁺ T-Zellen pro mg Milzgewebe. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test.

3.3.3.3 Achtwöchige Western-Typ Diät induzierte in LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen eine Expansion von CD4⁺ T-Zellpopulationen im Blut

T-Zellen wurden aus dem Blut isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde das Gating CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wie in Kapitel 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschrieben durchgeführt (exemplarisch s. Abbildung 24).

Der Anteil von CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtheit CD45⁺ Leukozyten war in der Gruppe der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäuse signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Auch die absolute Zahl CD4⁺ T-Zellen pro µl Blut war in der Kontrollgruppe signifikant geringer. Die Untersuchung der CD8⁺ T-Zellen ergab anteilig an allen Leukozyten sowie absolut keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

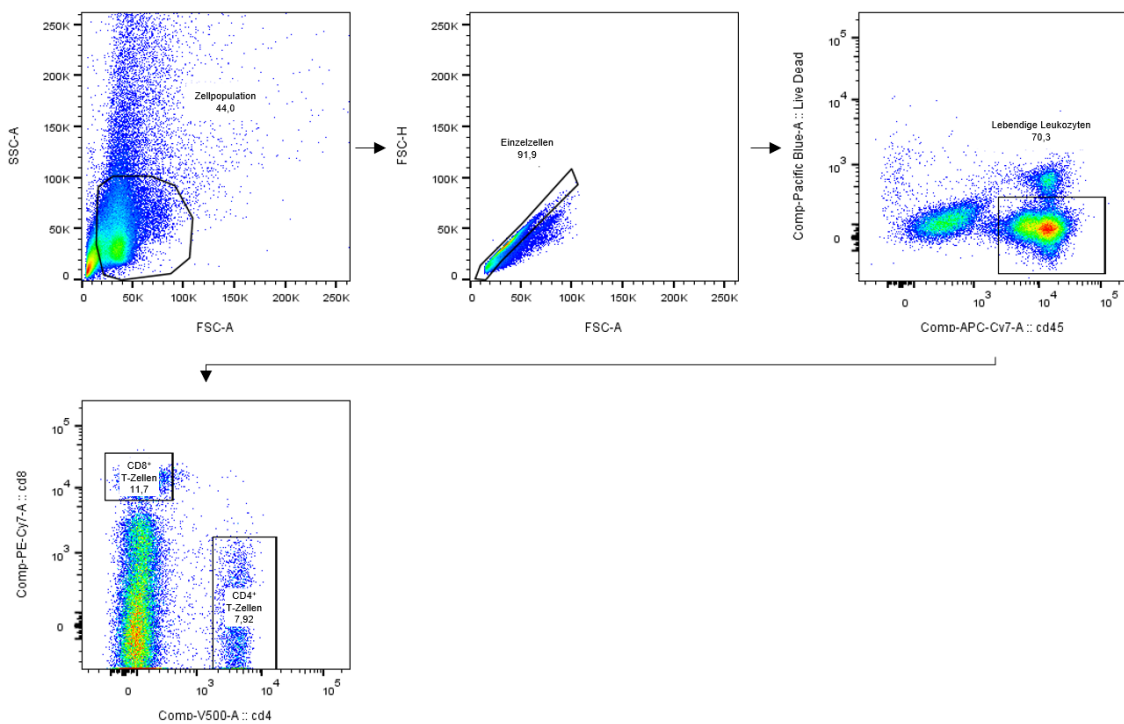


Abbildung 24 Gating Strategie CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt.

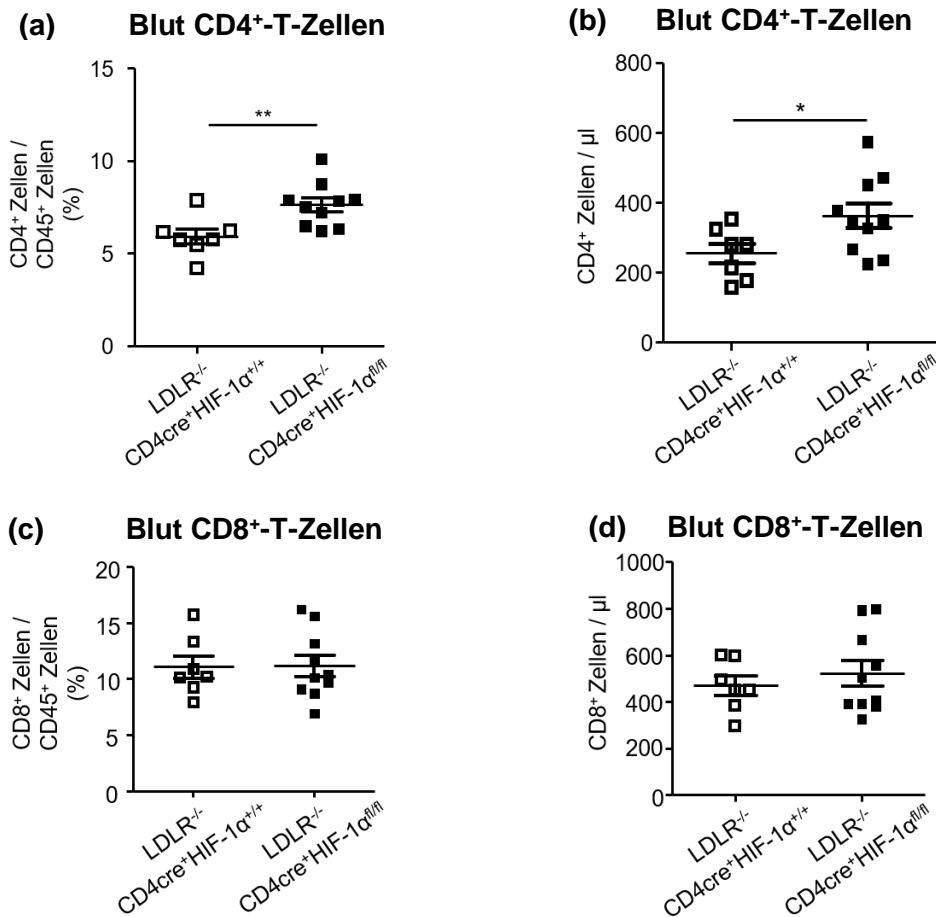


Abbildung 25 T-Zellphänotypisierung im Blut von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 9) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäuse (n = 7) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät eine signifikant erhöhte CD4⁺ T-Zellpopulation. Durchflusszytometrische Analyse der T-Zellpopulationen im Blut von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 10) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 7). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 24 durchgeführt. **(a)** CD4⁺ T-Zellen anteilig an CD45⁺ Zellen (Leukozyten) **(b)** Absolute Zahl CD4⁺ T-Zellen pro μl Blut. **(c)** CD8⁺ T-Zellen anteilig an CD45⁺ Zellen (Leukozyten). **(d)** Absolute Zahl CD8⁺ T-Zellen pro μl Blut. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, * p < 0,05, ** p < 0,01.

3.3.4 Im Blut von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen zeigte sich nach achtwöchiger Western-Typ Diät eine verminderte Aktivierung CD4⁺ T-Lymphozyten

In den im Kapitel 3.3.3 beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es in peripheren Lymphknoten und im Blut der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe nach achtwöchiger fettreicher Western-Typ Diät signifikante Unterschiede im T-Zellphänotyp gibt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen anteilig an allen vorhandenen CD4⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten, Milz und Blut zwischen beiden Gruppen verschieden ist.

Nach Auswahl einzelner lebendiger Leukozyten wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, wurden aktivierte T-Zellen durchflusszytometrisch anhand einer Hochregulation des Adhäsionsmoleküls CD44 und einer verminderten Expression des L-Selectin (CD62L) identifiziert.

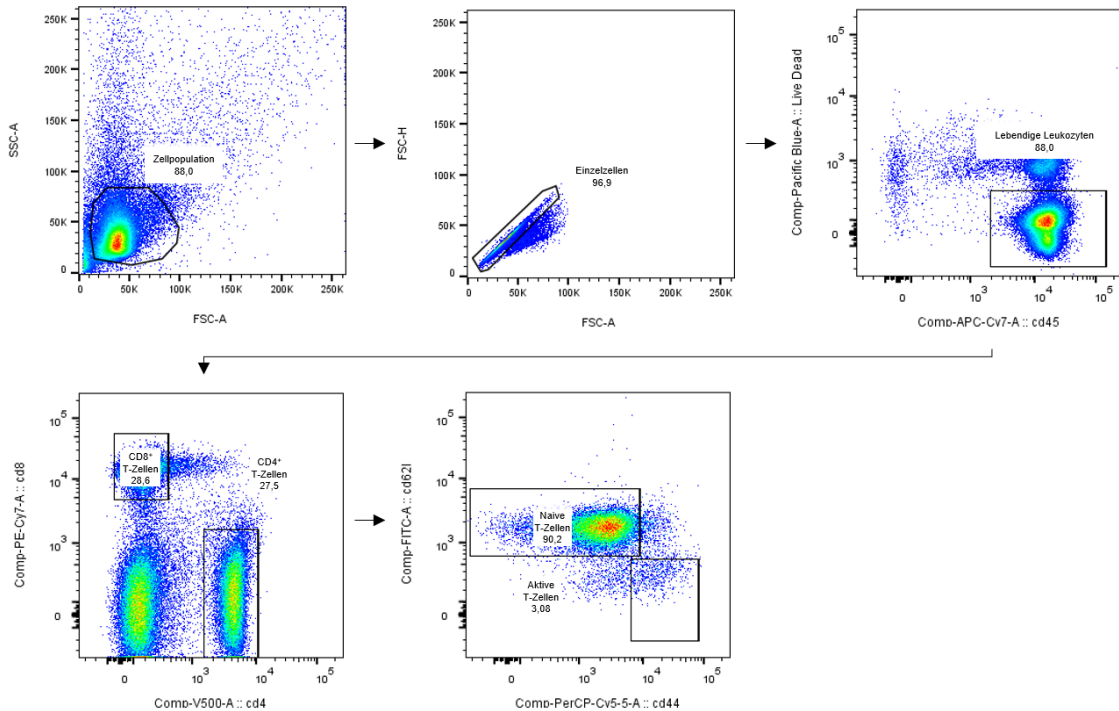


Abbildung 26 Gating Strategie aktivierte T-Zellen exemplarisch. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Der für T-Zellen charakteristische T-Zellrezeptor β wurde genutzt, um diese Population zu erkennen. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt. Aktivierte T-Zellen wurden anhand einer Hochregulation des Adhäsionsmoleküls CD44 und einer verminderten Expression des L-Selectin (CD62L) identifiziert.

Der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Zellen zeigte sich in der Milz und peripheren Lymphknoten beider Gruppen unverändert. Im Blut der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse konnte eine signifikante Verminderung aktivierter CD4⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Lymphozyten erkannt werden.

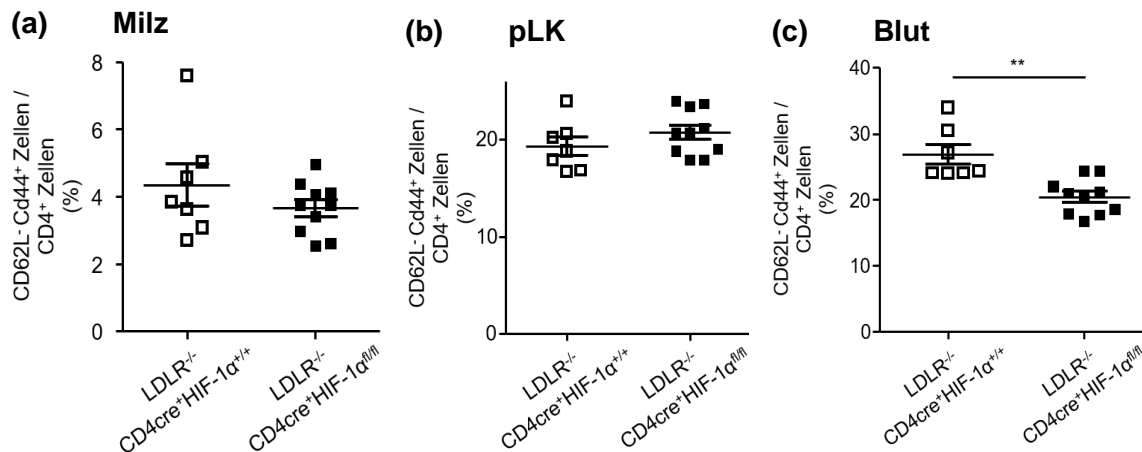


Abbildung 27 T-Zell Aktivierung in Milz, peripheren Lymphknoten und Blut weiblicher $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäuse ($n = 7$) und weiblicher $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäuse ($n = 10$) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät zeigte eine verminderte Aktivierung im Blut der $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäuse. Durchflusszytometrische Analyse der aktivierten $CD4^{+}$ T-Zellen in Milz, peripheren Lymphknoten und Blut von $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen ($n = 10$) im Vergleich zu $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen ($n = 7$). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 26 durchgeführt. **(a)** $CD62L^{-}CD44^{+}$ T-Zellen anteilig an $CD4^{+}$ T-Zellen in der Milz **(b)** $CD62L^{-}CD44^{+}$ T-Zellen anteilig an $CD4^{+}$ T-Zellen in peripheren Lymphknoten. **(c)** $CD62L^{-}CD44^{+}$ T-Zellen anteilig an $CD4^{+}$ T-Zellen im Blut. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test, ** $p < 0,01$.

3.3.5 T_H1 -Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei $HIF-1\alpha$ Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokin mRNA Expression in Milz und peripheren Lymphknoten

Weiterführend wurden verschiedene T-Zell Subtypen näher betrachtet. T_H1 -Zellen wurden durchflusszytometrisch und mit qPCR auf Quantität und Zytokinexpression untersucht.

In Milz und peripheren Lymphknoten von $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{+/+}$ Mäusen und $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen wurden nach Auswahl einzelner lebendiger Leukozyten, wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, T_H1 -Zellen durchflusszytometrisch als $IFN\gamma^{+}$ -Zellen anteilig an allen $CD4^{+}$ Zellen identifiziert (exemplarisch s. Abbildung 10).

In beiden Geweben zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Genotypen kein Unterschied im Anteil der T_H1 -Zellen an der Gesamtheit $CD4^{+}$ T-Lymphozyten. Auch die nähere Untersuchung der T_H1 -Zellen in der Milz, die die absolute Anzahl $IFN\gamma^{+}$ Zellen und die $IFN\gamma$ mRNA Expression umfasste, zeigten keine Unterschiede zwischen $LDLR^{-/-}CD4cre^{+}HIF-1\alpha^{fl/fl}$ Mäusen und der Kontrollgruppe.

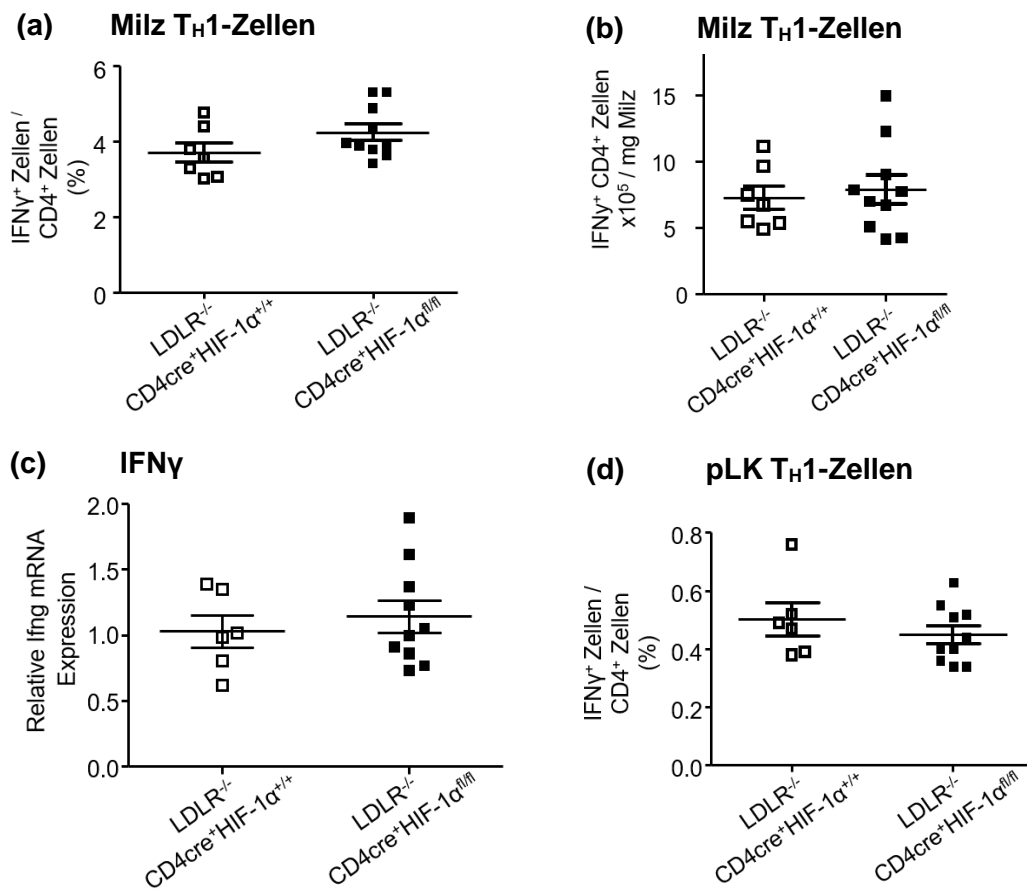


Abbildung 28 TH₁-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokinproduktion von IFNγ in Milz und peripheren Lymphknoten. Analyse von IFNγ in TH₁-Zellen mittels Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) aus Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 10) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 6-7). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 10 durchgeführt. **(a)** Durchflusszytometrische Analyse IFNγ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in der Milz. **(b)** Absolute Zahl IFNγ⁺ CD4⁺ T-Zellen pro mg Milz. **(c)** Analyse der Ifng mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen in der Milz. **(d)** Durchflusszytometrische Analyse IFNγ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test.

3.3.6 TH₁₇-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokin mRNA Expression in Milz und peripheren Lymphknoten

In Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen und LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen wurden TH₁₇-Zellen durchflusszytometrisch als IL17⁺-Zellen anteilig an allen CD4⁺ Zellen identifiziert, nachdem Zellrückstände, -doubletten und tote Zellen, wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, exkludiert wurden (exemplarisch s. Abbildung 10). In beiden Geweben zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Genotypen kein Unterschied im Anteil der TH₁₇-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-

Lymphozyten. Auch die nähere Untersuchung der T_H17-Zellen in der Milz, die die absolute Anzahl IL17⁺ Zellen und die IL17 mRNA Expression umfasste, zeigten keine Unterschiede zwischen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe.

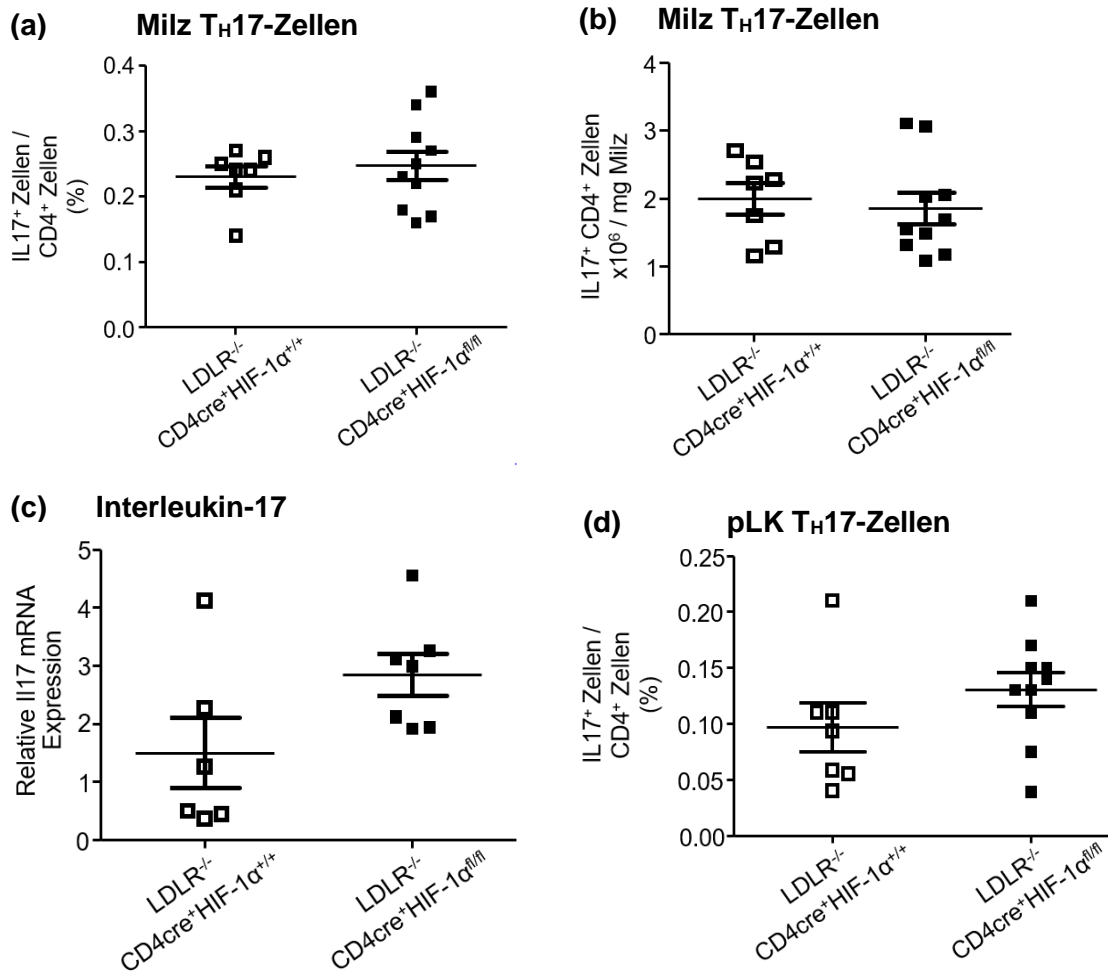


Abbildung 29 T_H17-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1 α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokinproduktion von IL-17 in Milz und peripheren Lymphknoten. Analyse von IL-17 in T_H17-Zellen mittels Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) aus Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen (n = 10) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäusen (n = 6-7). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 10 durchgeführt. **(a)** Durchflusszytometrische Analyse IL17⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in der Milz. **(b)** Absolute Zahl IL17⁺ CD4⁺ T-Zellen pro mg Milz. **(c)** Analyse der Effektorzytokin IL17 mRNA Expression mittels qPCR relativ zum konstitutiv exprimierten Hprt-Gen in der Milz. **(d)** Durchflusszytometrische Analyse IL17⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test.

3.3.7 T_{reg}-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1 α Defizienz keine veränderte Anzahl in Milz und peripheren Lymphknoten

In Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäusen und LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen wurden T_{reg}-Zellen durchflusszytometrisch als FoxP3⁺CD25⁺-Zellen anteilig an allen CD4⁺ Zellen identifiziert, nachdem Zellrückstände, -doubletten und tote Zellen, wie in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, exkludiert wurden.

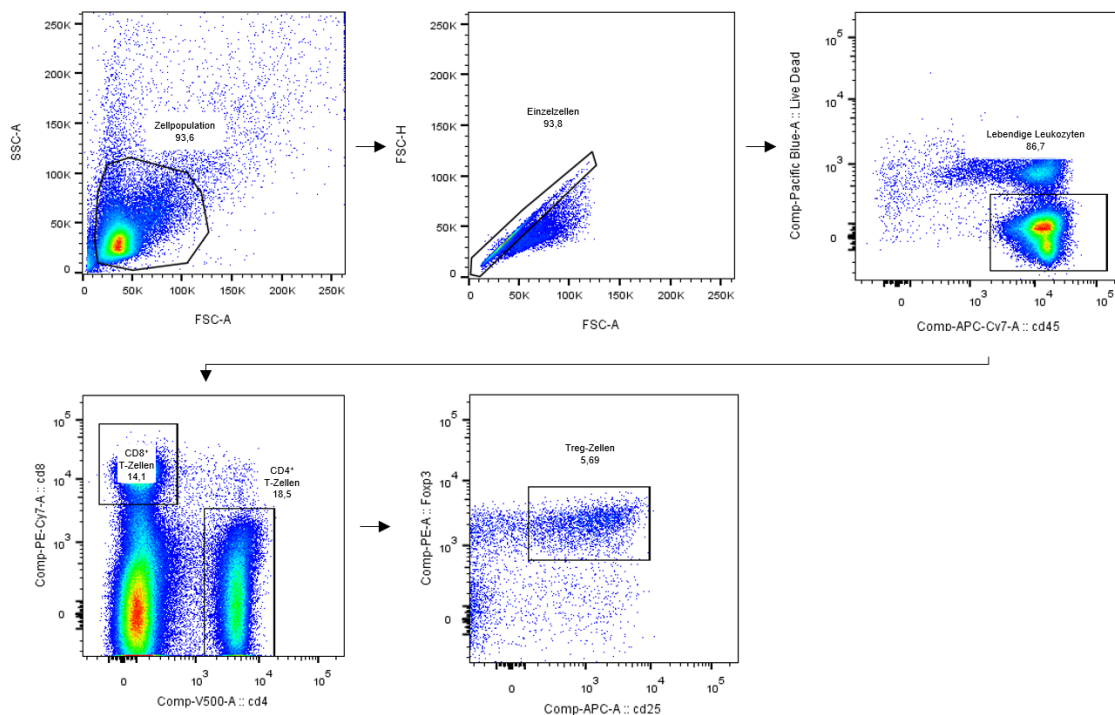


Abbildung 30 Gating Strategie T_{reg} Zellen exemplarisch. Anhand Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitenstreulicht (*side scatter*, SSC) wurden Zelltrümmer exkludiert. Im nächsten Schritt wurden Zelldoubletten ausgeschlossen und die Population lebendiger einzelner Leukozyten mittels *live/dead* und CD45 Markern festgelegt. Folgend wurde die T-Zell-Population anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterteilt. T_{reg}-Zellen wurden als FoxP3⁺CD25⁺-Zellen anteilig an allen CD4⁺ Zellen identifiziert.

In beiden Geweben zeigte sich zwischen den zwei verschiedenen Genotypen kein Unterschied im Anteil der T_{reg}-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Lymphozyten. Auch die nähere Untersuchung der T_{reg}-Zellen in der Milz, die die absolute Anzahl FoxP3⁺CD25⁺ Zellen im Milzgewebe umfasste, zeigte keinen Unterschied zwischen LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe.

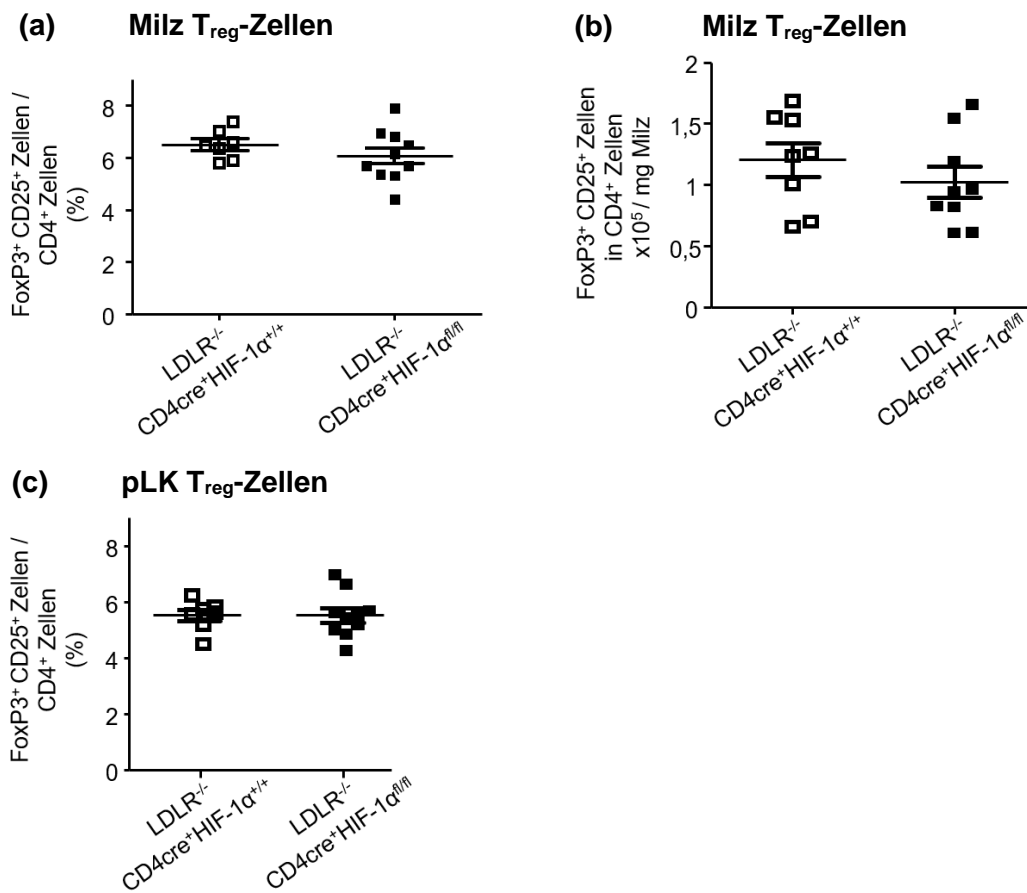


Abbildung 31 T_{reg}-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl in Milz und peripheren Lymphknoten. Analyse von FoxP3⁺ T_{reg}-Zellen mittels Durchflusszytometrie aus Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen (n = 9-10) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{+/+} Mäusen (n = 7). Das Gating wurde nach Gating Abbildung 30 durchgeführt. **(a)** Durchflusszytometrische Analyse FoxP3⁺CD25⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in der Milz. **(b)** Absolute Zahl FoxP3⁺CD25⁺ T-Zellen pro mg Milz. **(c)** Durchflusszytometrische Analyse FoxP3⁺CD25⁺ T-Zellen anteilig an allen CD4⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test.

3.3.8 CD8⁺ T-Zellen in vivo zeigten nach achtwöchiger Western-Typ Diät bei HIF-1α Defizienz eine vermehrte IFNγ Produktion in Milz und peripheren Lymphknoten

Wie bereits in Kapitel 3.3.3.1 gezeigt wurde, ist die absolute Zahl CD8⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Es erfolgte eine nähere Untersuchung der Produktion des Zytokins IFNγ in der Gruppe CD8⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten und der Milz in LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1α^{fl/fl} Mäusen und der Kontrollgruppe. Das Gating der Zellpopulation wurde wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben durchgeführt (exemplarisch s. Abbildung 14).

In durchflusszytometrischen Analysen wurde in beiden Geweben ein erhöhter Anteil IFN γ ⁺ Zellen in CD8⁺ T-Zellen in LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen festgestellt. Die absolute Anzahl IFN γ ⁺CD8⁺ T-Zellen pro mg Milz unterschied sich zur Kontrollgruppe nicht.

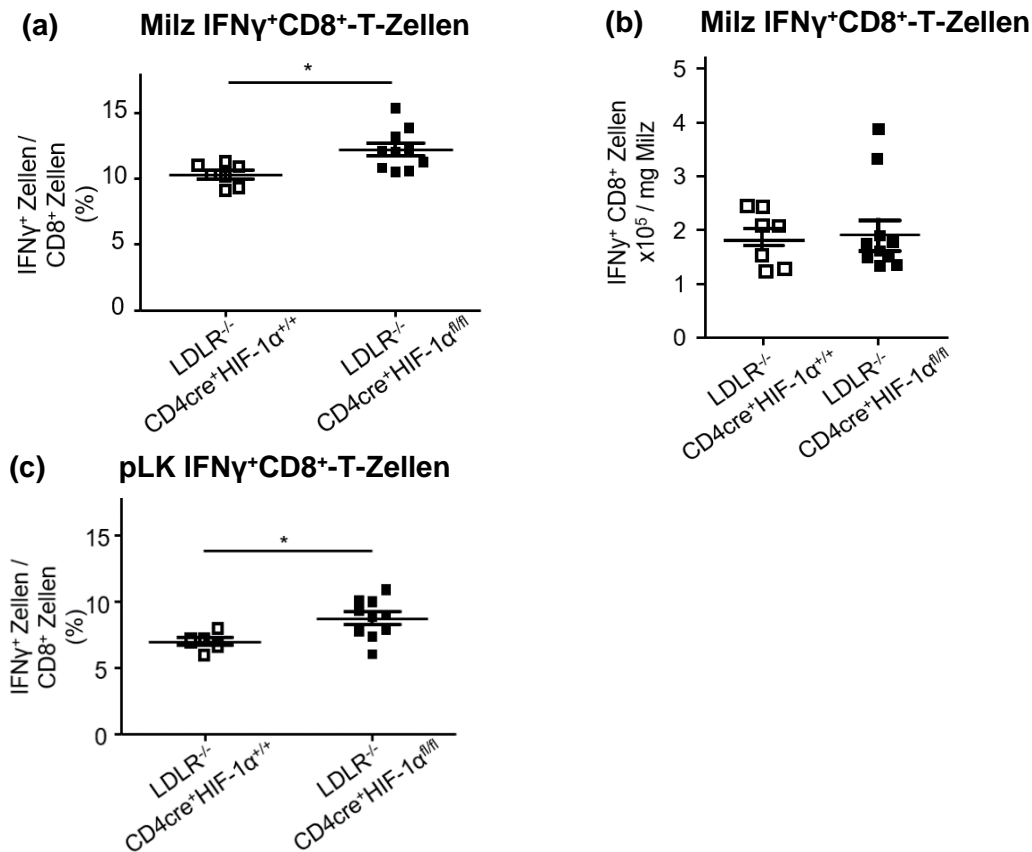


Abbildung 32 CD8⁺ T-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1 α Defizienz eine vermehrte IFN γ Produktion in Milz und peripheren Lymphknoten. Analyse von IFN γ in CD8⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) aus Milz und peripheren Lymphknoten von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen (n = 10) im Vergleich zu LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} Mäusen (n = 7). Das Gating wurde nach Gating Strategie 6 (s. Anhang) durchgeführt. **(a)** Durchflusszytometrische Analyse IFN γ ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD8⁺ T-Zellen in der Milz. **(b)** Absolute Zahl IFN γ ⁺CD8⁺ T-Zellen pro mg Milz. **(c)** Durchflusszytometrische Analyse IFN γ ⁺ T-Zellen anteilig an allen CD8⁺ T-Zellen in peripheren Lymphknoten. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Statistische Analyse durchgeführt mittels t-Test * p < 0,05.

3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Kapitel erfolgt die tabellarische Zusammenfassung der in dieser Promotionsarbeit generierten Ergebnisse.

Tabelle 10 Zusammenfassung der Ergebnisse bei HIF-1 α Defizienz in T-Lymphozyten
 Legende: \uparrow signifikant vermehrt, \downarrow signifikant vermindert, \leftrightarrow kein signifikanter Unterschied detektierbar; M: Milz, pLK: periphere Lymphknoten, B: Blut.

		In vitro	Atherosklerose	Myokardinfarkt
T_H1	Anzahl	\leftrightarrow	M / pLK: \leftrightarrow	
	IFNγ⁺ Zellen	\leftrightarrow	M / pLK: \leftrightarrow	
T_H17	Anzahl	\downarrow	M / pLK: \leftrightarrow	
	IL17⁺ Zellen	\leftrightarrow	M / pLK: \leftrightarrow	
T_{reg}	Anzahl	\uparrow	M / pLK: \leftrightarrow	
	IL10⁺ Zellen	\leftrightarrow		
CD8⁺	Anzahl			
	Effektor-zytokin⁺ Zellen	Perforin \uparrow	M / pLK: IFN γ \uparrow	
T-Zellen allgemein	Phänotypisierung		pLK: CD4 und CD8 absolut \uparrow M: \leftrightarrow B: CD4 \uparrow	
	Aktivierung CD4⁺ T-Zellen		pLK: \leftrightarrow M: \leftrightarrow B: \downarrow	
Atherosklerotische Plaque	Größe		\uparrow	
	Zusammensetzung		Makrophagen \downarrow	
Kardiomyozyten Größe				\leftrightarrow
Kapillardichte				\leftrightarrow

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse und Hypothesen

4.1.1 Einführung in die Diskussion

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die Rolle des Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktors HIF-1 α in Lymphozyten und die Auswirkung auf die Atherosklerose und den Myokardinfarkt zu untersuchen. Hierzu wurde spezifisch in Lymphozyten die Funktion von HIF-1 α ausgeschaltet.

Die Analyse atherosklerotischer Plaques im Mausmodell zeigte einen veränderten Phänotyp mit vermehrter Plaqueausbildung in der Aorta der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse. Im Myokardinfarkt-Modell konnte einer postinfarziell eingeschränkten kardialen Funktion in CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen kein morphologisches Korrelat in Kardiomyozytengröße oder Kapillardichte im Myokard zugeschrieben werden.

4.1.2 HIF-1 α in T-Lymphozyten in der Atherosklerose

Zur in vivo Untersuchung der Rolle von HIF-1 α in der Atherosklerose wurden LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{+/+} und LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse für 8 Wochen mit fettreicher Western-Typ Diät gefüttert. Zwischen den Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Cholesterolkonzentrationen im Blut, weshalb Nebeneffekte durch ein verändertes Lipidprofil zu vernachlässigen sind. Die Milzmasse der LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäuse konnte als Ausdruck einer gesteigerten systemischen Immunreaktion signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden.

Die Analyse der atherosklerotischen Plaques zeigte nach Ausschalten von HIF-1 α in T-Zellen eine signifikant erhöhte Plaqueausdehnung in allen anatomischen Abschnitten der Aorta der Mäuse. Der größte Plaqueanteil konnte im Bereich des Aortenbogens gesehen werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine protektive Rolle von HIF-1 α in T-Lymphozyten bezüglich Plaqueausbildung schließen. Die im Aortenbogen am stärksten ausgeprägte Plaqueausbildung kann durch die durch den Blutfluss bedingten Scherspannungen erklärt werden. Diese führen zu einer Endotheldysfunktion, was die Ausbildung von atherosklerotischen Plaques begünstigt [9, 170].

Eine nähere histologische Untersuchung der zellulären Zusammensetzung wies in den größeren Plaques eine reduzierte Makrophagenanzahl nach. Anteile von T-Lymphozyten, glatten Muskelzellen und nekrotischem Kern in den Plaques zeigten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

T_H1-Zellen wirken durch die IFN γ -abhängige Monozyteninfiltration in die Plaque und die folgende Aktivierung der Makrophagen proatherogen. In der Literatur wird die Wirkung von HIF-1 α in T_H1-Zellen kontrovers beschrieben. Es konnte sowohl ein vermindertes Vorkommen von T_H1 in hypoxischem Milieu gezeigt werden [159] als auch eine vermehrte T_H1-Zell Bildung durch experimentelle HIF-Akkumulation [162]. Der verminderte Makrophagenanteil in der Plaque der Mäuse nach Ausschalten von HIF-1 α in T-Lymphozyten lässt die Hypothese einer eingeschränkten T_H1 Anzahl oder Funktion zu. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in vivo Analysen zu T_H1-Zellen konnten in Milz und peripheren Lymphknoten keine signifikanten Unterschiede in Zellzahl und Effektorzytokin mRNA zeigen. Auch die in vitro Versuche konnten in Milz und peripheren Lymphknoten keine signifikanten Unterschiede bezüglich Zellzahl und Effektorzytokin zwischen beiden Gruppen nachweisen. Ein möglicher Grund hierfür ist die geringe untersuchte Fallzahl. Da die T_H1-Zellen im Blut oder in der Plaque direkt jedoch nicht untersucht wurden, könnte eine Einflussnahme im Sinne einer verminderten Makrophagenaktivierung durch verminderte T-Zellzahl und Effektorzytokinsekretion möglich sein.

Auch CD8⁺ T-Zellen beeinflussen die Makrophagenakkumulation in atherosklerotischen Plaques. Dies konnte durch eine CD8⁺-Zell Depletion in atherosklerotischen Mausmodellen gezeigt werden, welche zu einer Reduktion der Plaque führte [38].

In CD8⁺ T-Zellen ist HIF-1 α entscheidend für die Expression der Effektorzytokine IFN γ und TNF α [164]. CD8⁺ T-Zellen beeinflussen durch IFN γ Sekretion die Monopoese im Knochenmark, welche in einer erhöhten Anzahl Ly6C^{hi} Monozyten in der Atherosklerose resultiert. In Mäusen mit funktionseingeschränkten CD8⁺ T-Lymphozyten führt eine reduzierte Monozytenanzahl im Blut zu einer Reduktion der Makrophagenakkumulation in der atherosklerotischen Plaque [39, 40].

Mittels durchflusszytometrischen Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert IFN γ positive CD8⁺ T-Zellen untersucht. Hier ließ sich eine vermehrte Anzahl in der HIF-1 α defizienten Gruppe nachweisen. Eine Beeinflussung des gesamten IFN γ durch

andere IFN γ produzierende CD4⁺ T-Zellen kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Konträr zu den hier generierten Daten zur IFN γ Produktion durch CD8⁺ T-Zellen konnten Palazon et al. zeigen, dass HIF-1 α defiziente zytotoxische T-Zellen eine reduzierte Expression der Effektorzytokine IFN γ und TNF α aufweisen [164]. Andere Untersuchungen der Zytokinproduktion in CD8⁺ Lymphozyten konnten wiederum nachweisen, dass stimulierte HIF-1 α defiziente CD8⁺ T-Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mehr IFN γ als die Wildtyp-Kontrolle produzieren [171].

Zytokine und Mediatoren, welche von CD8⁺ T-Zellen sezerniert werden, beeinflussen ebenfalls die Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Vor allem Perforin und Granzym führen zu einem vermehrten Zelltod mit ausgeprägterem nekrotischen Kern und damit instabileren Plaques [172]. Nach Ausschalten der HIF- β -Untereinheit in T-Zellen wird in der Literatur eine geringere Produktion der zytotoxischen Mediatoren Perforin und Granzym beschrieben [165]. Das Ausschalten von HIF-1 α in T-Lymphozyten in den hier durchgeführten in vitro Versuchen konnte eine vermehrte Produktion von Perforin nachweisen. Anteilig ist der nekrotische Kern der untersuchten Plaques nicht vergrößert. Die insgesamt vergrößerte Plaque könnte durch eine absolute Zunahme des nekrotischen Kerns durch zytotoxische Mediatoren erklärt werden.

Es ist bekannt, dass HIF-1 α die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen beeinflusst. HIF-1 α führt zur Induktion von T_H17 Zellen und zur Inhibierung von T_{regs} [158]. Es werden sowohl die Anzahl der Zellen als auch die nachweisbaren Effektorzytokine verändert. In den in vitro Experimenten dieser Dissertationsarbeit ließ sich nach Ausschalten von HIF-1 α in T-Lymphozyten eine verminderte T_H17 Zellanzahl sowie eine erhöhte T_{reg} Zellzahl messen. Die Untersuchung der Effektorzytokine von T_H17 und T_{regs} konnte auf mRNA Ebene zwar Trends, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen. In vivo ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren.

Um die oben genannten Effekte auf die atherosklerotischen Plaques nach Ausschalten von HIF-1 α in T-Zellen den einzelnen T-Zell Subtypen zuzuordnen, sind weiterführende Experimente zur näheren Differenzierung der einzelnen Subtypen und deren Auswirkung in der atherosklerotischen Plaque notwendig. Eine Analyse der Anteile der einzelnen Subtypen sowie derer Effektorzytokinexpression im Aortengewebe könnte mittels Durchflusszytometrie näher untersucht werden. Damit könnte versucht werden, eine Differenzierung der Funktion und Relevanz der einzelnen Subtypen auf die

Ausprägung der Atherosklerose in dem hier untersuchten Mausmodell zu untersuchen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde das Aortengewebe vollständig für immunhistochemische und histologische Färbungen verwendet. Weiterführende Experimente zu Phänotyp und Aktivierung der Makrophagen in den Plaques und im Blut der HIF-1 α defizienten Mäuse könnten helfen, die Wechselwirkung zwischen T-Zellen und Makrophagen zu erklären.

4.1.2.1 T-Zell Aktivierung

Die Untersuchung der Gesamtanzahl und Aktivität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Milz, Lymphknoten und Blut zeigte in Lymphknoten eine absolut erhöhte T-Lymphozytenzahl. In der Milz waren zwar keine signifikanten Unterschiede pro Milligramm Milzgewebe erkennbar, allerdings war das Milzgewicht der HIF-1 α defizienten Mäuse signifikant erhöht. Es könnte angenommen werden, dass in den lymphatischen Organen die absolute Anzahl der T-Lymphozyten in HIF-1 α defizienten Mäusen als Ausdruck einer gesteigerten Immunreaktion erhöht war. In der Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen ließ sich kein Unterschied detektieren.

Relevant für die Ausbildung der atherosklerotischen Plaque sind die T-Zellen, welche über das Blut zur Plaque transportiert werden. Im Blut der Mäuse mit HIF1 α Defizienz in Lymphozyten ließ sich eine signifikant reduzierte Aktivierung CD4⁺ T-Lymphozyten nachweisen. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen. Eine von Tian et al. durchgeführte Untersuchung von T-Lymphozyten in Ratten, welche hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden, zeigte eine verminderte Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Blut acht Stunden und drei Tage nach Induktion der Atherosklerose. Bei längerer Exposition konnte jedoch eine signifikant erhöhte CD8⁺ T-Zell Aktivierung nachgewiesen werden [173].

Wichtig zur Beurteilung der Aussagekraft der Daten zu T-Zell Anzahl und Aktivierung in den einzelnen Kompartimenten ist die T-Zell Migration in Atherosklerose Mausmodellen. Ob es sich bei den untersuchten T-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten um residente oder migrierende T-Lymphozyten handelt, kann ohne weiterführende Experimente nicht differenziert werden. Hierzu könnte eine ergänzende Untersuchung zur Migration der T-Zellen im Atherosklerose Mausmodell angeschlossen werden.

4.1.3 HIF-1 α in T-Zellen im Myokardinfarkt

Vorherige histologische und echokardiographische Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten nach HIF-1 α Ausschalten in T-Lymphozyten im Myokardinfarktmodell größere Infarktzone und eine eingeschränkte kardiale Funktion 28 Tage nach Infarktinduktion zeigen.

In dem hier untersuchten Mausmodell wurde eine mögliche zellmorphologische Korrelation für diese eingeschränkte Funktion untersucht. Hierzu wurden sowohl die Zellgröße der Kardiomyozyten als auch die Kapillardichte in Kryoschnitten infarzierter Mausherzen gemessen.

Verschiedene zelluläre Stimuli führen nach einem Myokardinfarkt zu Umbauprozessen im Myokard. Wichtig für die postinfarzielle Phase und die Sauerstoffversorgung des verbleibenden vitalen Myokards ist die Neovaskularisation. Diese wird vor allem durch eine Hochregulation von VEGF durch HIF-1 α initiiert [118]. Bekannt ist, dass HIF-1 α ein relevanter Faktor für die Angiogenese ist [138].

Eine verminderte Blutversorgung der Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt ist determinierend für die Ausprägung der Infarktgröße und der Funktion der verbleibenden Kardiomyozyten. Die morphologischen Auswirkungen einer direkten Interaktion von HIF-1 α in T-Lymphozyten und Faktoren, die zu einer vermehrten Angiogenese nach Myokardischämie führen, konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Anpassung der Kardiomyozyten auf den Myokardinfarkt im Sinne einer Hypertrophie oder eine Atrophie konnte in der untersuchten Gruppe nicht festgestellt werden. Die funktionellen Auswirkungen, die in den Herzen der HIF-1 α defizienten Mäuse beobachtet wurden, hängen daher wahrscheinlich nicht mit einer Änderung der Kardiomyozytengröße oder Veränderungen in der Kapillardichte zusammen.

4.2 Limitationen der Studie

Das spezifische Ausschalten der HIF-1 α Aktivität in T-Lymphozyten mittels Cre/loxP System hat die Limitation, dass es nicht isoliert für CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen, sondern sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wirkt. Begründet ist dies wie bereits beschrieben in der Phase der doppelten Positivität in der Reifung der T-Lymphozyten [167]. Um die genaue Funktion und spezifische Veränderungen der T-Zell Subtypen zu untersuchen, wäre ein isoliertes Ausschalten von HIF-1 α notwendig. Andrews et al. beschreiben beispielsweise eine Cre-gesteuerte Allel-konditionierte Linie zur

spezifischen Untersuchung von CD4⁺ T-Zellen, bei der mittels Tamoxifen und Cre-System eine gezielte Manipulation bestimmter Gensequenzen in CD4⁺ T-Zellen durchgeführt werden kann [174]. Ein vergleichbares spezifisches Modell ist für CD8⁺ T-Zellen aktuell nicht etabliert.

Eine weitere Limitation der Studie sind die geringen Fallzahlen der in vitro Experimente. Einige Experimente lassen einen Trend erkennen, können aufgrund der geringen Fallzahl jedoch keine signifikanten Unterschiede zeigen. Zur Reproduktion der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ist daher die Durchführung weiterer Wiederholungsexperimente erforderlich.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden die in vivo Versuche mit Mäusen nach achtwöchiger fettreicher Western-Typ Diät durchgeführt. Um eine mögliche Dynamik der festgestellten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe beschreiben zu können, ist es sinnvoll, weitere Versuchsreihen mit vier- beziehungsweise zwölfwöchiger Western-Typ Diät durchzuführen.

Zur weiterführenden Untersuchung der Plaquezusammensetzung und der Rolle der verschiedenen T-Zell Subtypen auf die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose wäre eine T-Zell Phänotypisierung aus dem atherosklerotischen Plaquegewebe notwendig. Außerdem könnte die Interaktion und Migration der einzelnen Zelltypen untersucht werden. Hierzu bieten sich Migrationsassays und Kokulturen verschiedener Zelltypen, welche in atherosklerotischen Plaques vorkommen, mit HIF-1 α defizienten T-Zellen an.

Zur Auswertung der histologischen Schnitte ist eine präzise und vergleichbare Messmethode der Zellzahl und Zellgröße notwendig, um störende Einflussgrößen zu minimieren. Eine mögliche Methode ist die der Stereologie, welche es ermöglicht, aus zweidimensionalen Schnitten möglichst genaue Informationen über dreidimensionale Zellen und Strukturen zu erheben [175].

Zur Simulation hypoxischer Bedingungen in vitro wurden die Lymphozyten mit Cobalt(II)-Chlorid (CoCl₂) inkubiert. CoCl₂ wird als mit eine der effektivsten Substanzen zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α beschrieben [168, 169] und ist ein etabliertes Modell zur Simulation von Hypoxie [176]. Eine Alternative stellt die

Inkubation der Zellen in einer Hypoxiekammer dar, bei der die Sauerstoffkonzentration präzise vorgegeben werden kann.

Beide der genannten Methoden bleiben jedoch Hypoxie-Simulationen und reproduzieren nicht vollständig die physiologischen und Gewebe-spezifischen Sauerstoffkonzentration in vivo ab [177]. Zudem kann HIF-1 α auch unter nicht-hypoxischen Bedingungen durch oxLDL oder proinflammatorische Zytokine stabilisiert werden [178].

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Daten aus den Experimenten, die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass HIF-1 α in T-Lymphozyten bei der Ausbildung von Atherosklerose ein wichtiger Faktor ist. Die Experimente konnten nach achtwöchiger fettreicher Western-Typ Diät von LDLR^{-/-}CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen einen klaren Phänotypen mit vermehrter Plaqueausbildung zeigen. Die Zusammensetzung der Plaques war bis auf eine verminderte Makrophagenanzahl jedoch vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Zum genaueren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und Ursachen der vermehrten Plaqueausprägung ist eine weiterführende Untersuchung der T-Zell Subtypen in der Plaque sowie deren Wechselwirkung mit sonstigen in der Plaque vorkommenden Zellen durchzuführen.

Vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in CD4cre⁺HIF-1 α ^{fl/fl} Mäusen größere Infarktzone und eine eingeschränkte kardiale Funktion 28 Tage nach Infarktinduktion nachweisen. In den durchgeführten Analysen der histologischen Schnitte der infarzierten Herzen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in Größe der Kardiomyozyten oder der Kapillarisation gezeigt werden. Es könnten weitere Untersuchungen der pathophysiologischen Ursachen, die dieser eingeschränkten kardialen Funktion zugrunde liegen, angeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich die entscheidende Rolle von HIF-1 α in kardiovaskulären Erkrankungen auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente nachvollziehen. Es konnte ein eindeutiger Phänotyp im atherosklerotischen Mausmodell gezeigt werden. Weitere ergänzende Experimente werden zum genaueren Verständnis der Plaquezusammensetzung, Veränderungen auf zellulärer Ebene und Zellinteraktionen benötigt. In Zukunft könnte HIF-1 α in T-Lymphozyten in kardiovaskulären Erkrankungen ein möglicher Angriffspunkt zur medikamentösen

Prävention oder Therapie dieser Erkrankungen mit Verbesserung des klinischen Outcomes der Patienten und Patientinnen sein.

5 Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist als Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen, welche die häufigste Todesursache weltweit darstellen, von großer klinischer und wissenschaftlicher Relevanz. Atherosklerose ist charakterisiert durch Einlagerungen von Lipiden in die Gefäßwand, welche zur Ausbildung von Plaques führen. Als Folge wird eine chronische Entzündungsreaktion eingeleitet, die durch spezifische Immunzellen, unter anderem T-Lymphozyten, und komplexe molekulare Prozesse aufrechterhalten wird. Durch eine verminderte Sauerstoffdiffusionskapazität und eine hohe Zelldichte ist das Milieu in den Plaques hypoxisch. Zur zellulären Anpassung an ein solches hypoxisches Milieu werden Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF) in den Immunzellen stabilisiert. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, welches die Transkription bestimmter Zielgene initiiert, die den Zellen notwendige Adaptationen des Zellstoffwechsels an ein vermindertes Sauerstoffangebot ermöglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, inwiefern sich ein Ausschalten des Transkriptionsfaktor HIF-1 α selektiv in T-Lymphozyten auf Atherosklerose und Myokardinfarkt auswirkt. Die funktionelle Bedeutung von HIF-1 α in T-Zellen in der Pathogenese dieser Erkrankungen wurde an zwei Mausmodellen untersucht.

Im Atherosklerose Modell wurde Biomaterial von LDLR^{-/-} Mäusen mit T-Zell spezifischem Knockout von HIF-1 α nach achtwöchiger fettreicher Western-Typ Diät untersucht. Histologisch zeigte sich eine vermehrte Plaqueausprägung und ein verminderter Makrophagenanteil in den Plaques. Durchflusszytometrisch und mittels qPCR konnten keine Unterschiede in der Lymphozytendifferenzierung in Milz und Lymphknoten dieser Mäuse nachgewiesen werden.

Im Myokardinfarkt-Modell mit T-Zell spezifischem HIF-1 α Knockout konnte in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine vergrößerte Infarktzone mit eingeschränkter kardialer Funktion nachgewiesen werden. Histologisch konnte im Rahmen dieser Arbeit hierfür kein zellmorphologisches Korrelat in Kardiomyozytengröße oder der Vaskularisation des Myokards gefunden werden.

In Zukunft könnte HIF-1 α in T-Lymphozyten ein möglicher Angriffspunkt zur medikamentösen Prävention oder Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126. DOI: 10.1056/nejm199901143400207
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695. DOI: 10.1056/NEJMra043430
3. Skálén K, Gustafsson M, Rydberg EK et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417: 750-754. DOI: 10.1038/nature00804
4. Gallino A, Aboyans V, Diehm C et al. Non-coronary atherosclerosis. *Eur Heart J* 2014; 35: 1112-1119. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu071
5. Vos T, Lim SS, Abbafati C et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. In: *The Lancet*. Elsevier; 2020: 1204-1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9
6. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 683-689. DOI: 10.2337/diacare.24.4.683
7. Piepoli M, Hoes A, Agewall S et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal* 2016; 37: 2315-2381.
8. Herold G. *Innere Medizin*. In: Köln: Herold, Gerd; 2019: 250-260, 806-816.
9. Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M et al. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 52-63. DOI: 10.1038/s41569-019-0239-5
10. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874. DOI: 10.1038/nature01323
11. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; 12: 204-212. DOI: 10.1038/ni.2001
12. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS et al. 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. DOI: 10.1161/01.atv.18.5.842
13. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791. DOI: 10.1126/science.1990440
14. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19: 1166-1172. DOI: 10.1038/nm.3258
15. Fowler S, Shio H, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations. *Lab Invest* 1979; 41: 372-378.
16. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK et al. 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. DOI: 10.1073/pnas.76.1.333
17. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-325. DOI: 10.1038/nature10146
18. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to

- macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009; 119: 136-145. DOI: 10.1172/jci35535
19. Libby P, Buring JE, Badimon L et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5: 56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z
 20. Naghavi M, Libby P, Falk E et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003; 108: 1664-1672. DOI: 10.1161/01.Cir.0000087480.94275.97
 21. Ovchinnikova O, Robertson AK, Wågsäter D et al. T-cell activation leads to reduced collagen maturation in atherosclerotic plaques of Apoe(-/-) mice. *Am J Pathol* 2009; 174: 693-700. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080561
 22. Amento EP, Ehsani N, Palmer H et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1223-1230. DOI: 10.1161/01.atv.11.5.1223
 23. Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L et al. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989; 170: 1595-1608. DOI: 10.1084/jem.170.5.1595
 24. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89: 36-44. DOI: 10.1161/01.cir.89.1.36
 25. Llodrá J, Angeli V, Liu J et al. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11779-11784. DOI: 10.1073/pnas.0403259101
 26. Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 799-810. DOI: 10.1016/s0008-6363(97)00229-0
 27. Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 872-878. DOI: 10.1161/01.Atv.0000067935.02679.B0
 28. Frostegård J, Ulfgren AK, Nyberg P et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43. DOI: 10.1016/s0021-9150(99)00011-8
 29. Hansson GK, Jonasson L, Holm J et al. Gamma-interferon regulates vascular smooth muscle proliferation and Ia antigen expression in vivo and in vitro. *Circ Res* 1988; 63: 712-719. DOI: 10.1161/01.res.63.4.712
 30. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 1117-1125. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63471-2
 31. 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. DOI: 10.1161/hq0302.104905
 32. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest* 2004; 114: 427-437. DOI: 10.1172/jci20479
 33. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 387-401. DOI: 10.1038/s41569-020-0352-5

34. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P et al. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One* 2007; 2: e779. DOI: 10.1371/journal.pone.0000779
35. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM et al. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2013; 123: 1323-1334. DOI: 10.1172/jci63891
36. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12: 178-180. DOI: 10.1038/nm1343
37. Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation* 2012; 126: 1256-1266. DOI: 10.1161/circulationaha.112.099044
38. Schäfer S, Zerneck A. CD8(+) T Cells in Atherosclerosis. *Cells* 2020; 10. DOI: 10.3390/cells10010037
39. Cochain C, Zerneck A. Protective and pathogenic roles of CD8(+) T cells in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2016; 111: 71. DOI: 10.1007/s00395-016-0589-7
40. Cochain C, Koch M, Chaudhari SM et al. CD8+ T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6C-high Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice. *Circ Res* 2015; 117: 244-253. DOI: 10.1161/circresaha.117.304611
41. Knuuti J, Wijns W, Saraste A et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J* 2020; 41: 407-477. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz425
42. Fleck E, Heinemann M, Meinertz T et al. 33. Deutscher Herzbericht 2021. In: Frankfurt am Main: Deutsche Herzstiftung; 2022:
43. Juliard JM, Golmard JL, Ducrocq G et al. Universal reperfusion therapy can be implemented: lessons from 20 years of management of patients admitted within 6 hours of symptom onset with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102: 259-267. DOI: 10.1016/j.acvd.2009.01.006
44. Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1446-1453. DOI: 10.1016/s0735-1097(03)01057-x
45. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014; 114: 1852-1866. DOI: 10.1161/circresaha.114.302721
46. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786-794. DOI: 10.1161/01.cir.56.5.786
47. Prabhu SD. Post-infarction ventricular remodeling: an array of molecular events. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 547-550. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2005.01.014
48. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981-2988. DOI: 10.1161/01.cir.101.25.2981
49. van Diepen S, Newby LK, Lopes RD et al. Prognostic relevance of baseline pro- and anti-inflammatory markers in STEMI: an APEX AMI substudy. *Int J Cardiol* 2013; 168: 2127-2133. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.01.004
50. Larose E, Rodés-Cabau J, Pibarot P et al. Predicting late myocardial recovery and outcomes in the early hours of ST-segment elevation myocardial infarction traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged

- myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2459-2469. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.02.033
51. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 2002; 91: 988-998. DOI: 10.1161/01.res.0000043825.01705.1b
 52. Mylonas KJ, Jenkins SJ, Castellan RF et al. The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an 'M2' phenotype in response to Th2 immunologic challenge. *Immunobiology* 2015; 220: 924-933. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.01.013
 53. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 2016; 118: 400-409. DOI: 10.1161/circresaha.115.307778
 54. Hart DN, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981; 154: 347-361. DOI: 10.1084/jem.154.2.347
 55. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015; 5: 1841-1875. DOI: 10.1002/cphy.c150006
 56. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; 63: 185-195. DOI: 10.1097/fjc.0000000000000003
 57. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008; 58: 88-111. DOI: 10.1016/j.phrs.2008.06.007
 58. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1907-1939. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1907
 59. Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2014; 109: 444. DOI: 10.1007/s00395-014-0444-7
 60. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 2016; 119: 91-112. DOI: 10.1161/circresaha.116.303577
 61. Lugin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N et al. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol* 2015; 194: 499-503. DOI: 10.4049/jimmunol.1401948
 62. Zerneck A, Preissner KT. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2016; 118: 469-479. DOI: 10.1161/circresaha.115.307961
 63. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576. DOI: 10.1006/jmcc.1998.0829
 64. Ghigo A, Franco I, Morello F et al. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 270-280. DOI: 10.1093/cvr/cvu030
 65. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 292-300. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.38
 66. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res* 2011; 108: 1133-1145. DOI: 10.1161/circresaha.110.226936
 67. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 1066-1070. DOI: 10.1161/atvbaha.114.304652
 68. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009; 325: 612-616. DOI: 10.1126/science.1175202

69. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol* 2008; 173: 57-67. DOI: 10.2353/ajpath.2008.070974
70. Chen B, Frangogiannis NG. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation* 2017; 24. DOI: 10.1111/micc.12305
71. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G et al. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 206039. DOI: 10.1155/2013/206039
72. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 31-47. DOI: 10.1016/s0008-6363(01)00434-5
73. Peet C, Ivetic A, Bromage DI et al. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2020; 116: 1101-1112. DOI: 10.1093/cvr/cvz336
74. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204: 3037-3047. DOI: 10.1084/jem.20070885
75. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998; 98: 699-710. DOI: 10.1161/01.cir.98.7.699
76. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 70: 74-82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015
77. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; 110: 159-173. DOI: 10.1161/circresaha.111.243162
78. Chen W, Saxena A, Li N et al. Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2598-2608. DOI: 10.1161/atvbaha.112.300310
79. Anzai A, Anzai T, Nagai S et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* 2012; 125: 1234-1245. DOI: 10.1161/circulationaha.111.052126
80. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N et al. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res* 2014; 115: 55-67. DOI: 10.1161/circresaha.115.303895
81. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M et al. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol* 2010; 176: 2177-2187. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090759
82. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M et al. Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice. *Circ Res* 2012; 111: 1037-1047. DOI: 10.1161/circresaha.112.270132
83. Virag JI, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* 2003; 163: 2433-2440. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63598-5
84. Ramos G, Hofmann U, Frantz S. Myocardial fibrosis seen through the lenses of T-cell biology. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 92: 41-45. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.018
85. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2012; 107: 232. DOI: 10.1007/s00395-011-0232-6
86. Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N et al. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell

- therapy. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62: 1890-1901. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.07.057
87. Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D et al. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *Faseb j* 2013; 27: 871-881. DOI: 10.1096/fj.12-214049
 88. van Amerongen MJ, Bou-Gharios G, Popa E et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *J Pathol* 2008; 214: 377-386. DOI: 10.1002/path.2281
 89. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 2012; 125: 1652-1663. DOI: 10.1161/circulationaha.111.044164
 90. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2141-2149. DOI: 10.1006/jmcc.2000.1261
 91. Curato C, Slavic S, Dong J et al. Identification of noncytotoxic and IL-10-producing CD8+AT2R+ T cell population in response to ischemic heart injury. *J Immunol* 2010; 185: 6286-6293. DOI: 10.4049/jimmunol.0903681
 92. Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I et al. Cytotoxic CD8(+) T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. *Nat Commun* 2021; 12: 1483. DOI: 10.1038/s41467-021-21737-9
 93. Yan X, Shichita T, Katsumata Y et al. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc* 2012; 1: e004408. DOI: 10.1161/jaha.112.004408
 94. Liuzzo G, Biasucci LM, Trotta G et al. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1450-1458. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.06.040
 95. Lluberas N, Trías N, Brugnini A et al. Lymphocyte subpopulations in myocardial infarction: a comparison between peripheral and intracoronary blood. *Springerplus* 2015; 4: 744. DOI: 10.1186/s40064-015-1532-3
 96. Saxena A, Dobaczewski M, Rai V et al. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307: H1233-1242. DOI: 10.1152/ajpheart.00328.2014
 97. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med* 2013; 19: 1273-1280. DOI: 10.1038/nm.3284
 98. Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 2000; 6: 157-162. DOI: 10.1016/s1357-4310(00)01677-4
 99. Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 268-283. DOI: 10.1038/s41580-020-0227-y
 100. Corcoran SE, O'Neill LA. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest* 2016; 126: 3699-3707. DOI: 10.1172/jci84431
 101. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb j* 2002; 16: 1151-1162. DOI: 10.1096/fj.01-0944rev
 102. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 588-594. DOI: 10.1016/s0959-437x(98)80016-6
 103. Hochachka PW, Lutz PL. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 130: 435-459. DOI: 10.1016/s1096-4959(01)00408-0

104. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47. DOI: 10.1038/nrc704
105. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732. DOI: 10.1038/nrc1187
106. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 2014; 41: 518-528. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.09.008
107. Scholz CC, Taylor CT. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13: 646-653. DOI: 10.1016/j.coph.2013.04.009
108. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2011; 12: 9-22. DOI: 10.1038/nrc3183
109. Gruber M, Hu CJ, Johnson RS et al. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2301-2306. DOI: 10.1073/pnas.0608382104
110. Hara S, Hamada J, Kobayashi C et al. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 808-813. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5659
111. Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-5514. DOI: 10.1073/pnas.92.12.5510
112. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51-60.
113. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 47-71. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720
114. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005; 2005: re12. DOI: 10.1126/stke.3062005re12
115. Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol* 2004; 24: 1-13. DOI: 10.1159/000075346
116. Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson TD et al. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 296: 139-185. DOI: 10.1016/b978-0-12-394307-1.00003-5
117. Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* 1995; 270: 21021-21027. DOI: 10.1074/jbc.270.36.21021
118. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4613. DOI: 10.1128/mcb.16.9.4604
119. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; 268: 21513-21518.
120. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9082-9087. DOI: 10.1073/pnas.97.16.9082
121. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M et al. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 20055-20062. DOI: 10.1074/jbc.272.32.20055

122. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 24147-24152. DOI: 10.1074/jbc.274.34.24147
123. Zhou J, Schmid T, Brüne B. Tumor necrosis factor- α causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 α through a nuclear factor- κ B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2216-2225. DOI: 10.1091/mbc.e02-09-0598
124. Frede S, Stockmann C, Freitag P et al. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochem J* 2006; 396: 517-527. DOI: 10.1042/bj20051839
125. Nishi K, Oda T, Takabuchi S et al. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 983-995. DOI: 10.1089/ars.2007.1825
126. Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A et al. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* 2007; 178: 7516-7519. DOI: 10.4049/jimmunol.178.12.7516
127. Cummins EP, Berra E, Comerford KM et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18154-18159. DOI: 10.1073/pnas.0602235103
128. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 609-617. DOI: 10.1038/nri2607
129. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE et al. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 112: 645-657. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00154-5
130. Walmsley SR, Print C, Farahi N et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med* 2005; 201: 105-115. DOI: 10.1084/jem.20040624
131. Dang EV, Barbi J, Yang HY et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 146: 772-784. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.033
132. Abe H, Semba H, Takeda N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* 2017; 24: 884-894. DOI: 10.5551/jat.RV17009
133. Koivunen P, Serpi R, Dimova EY. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition in cardiometabolic diseases. *Pharmacol Res* 2016; 114: 265-273. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.11.003
134. Zemlenyi T, Crawford DW, Cole MA. Adaptation to arterial wall hypoxia demonstrated in vivo with oxygen microcathodes. *Atherosclerosis* 1989; 76: 173-179. DOI: 10.1016/0021-9150(89)90101-9
135. Björnheden T, Levin M, Evaldsson M et al. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 870-876. DOI: 10.1161/01.atv.19.4.870
136. Li X, Zhang Q, Nasser MI et al. Oxygen homeostasis and cardiovascular disease: A role for HIF? *Biomed Pharmacother* 2020; 128: 110338. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110338
137. Arif M, Pandey R, Alam P et al. MicroRNA-210-mediated proliferation, survival, and angiogenesis promote cardiac repair post myocardial infarction in rodents. *J Mol Med (Berl)* 2017; 95: 1369-1385. DOI: 10.1007/s00109-017-1591-8
138. Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Front Pediatr* 2015; 3: 33. DOI: 10.3389/fped.2015.00033

139. Sano M, Minamino T, Toko H et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007; 446: 444-448. DOI: 10.1038/nature05602
140. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 236-242. DOI: 10.1093/cvr/cvq045
141. Zan T, Li H, Du Z et al. Enhanced endothelial progenitor cell mobilization and function through direct manipulation of hypoxia inducible factor-1 α . *Cell Biochem Funct* 2015; 33: 143-149. DOI: 10.1002/cbf.3091
142. Wang Y, Liu J, Chen X et al. Dysfunctional endothelial-derived microparticles promote inflammatory macrophage formation via NF- κ B and IL-1 β signal pathways. *J Cell Mol Med* 2019; 23: 476-486. DOI: 10.1111/jcmm.13950
143. Ding HG, Deng YY, Yang RQ et al. Hypercapnia induces IL-1 β overproduction via activation of NLRP3 inflammasome: implication in cognitive impairment in hypoxemic adult rats. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 4. DOI: 10.1186/s12974-017-1051-y
144. Feng S, Bowden N, Fragiadaki M et al. Mechanical Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Drives Endothelial Dysfunction at Atheroprone Sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 2087-2101. DOI: 10.1161/atvbaha.117.309249
145. Aarup A, Pedersen TX, Junker N et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Macrophages Promotes Development of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 1782-1790. DOI: 10.1161/atvbaha.116.307830
146. Roiniotis J, Dinh H, Masendycz P et al. Hypoxia prolongs monocyte/macrophage survival and enhanced glycolysis is associated with their maturation under aerobic conditions. *J Immunol* 2009; 182: 7974-7981. DOI: 10.4049/jimmunol.0804216
147. Swain L, Wottawa M, Hillemann A et al. Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions. *J Leukoc Biol* 2014; 96: 365-375. DOI: 10.1189/jlb.2HI1013-533R
148. Chaudhari SM, Sluimer JC, Koch M et al. Deficiency of HIF1 α in Antigen-Presenting Cells Aggravates Atherosclerosis and Type 1 T-Helper Cell Responses in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2316-2325. DOI: 10.1161/atvbaha.115.306171
149. Heusch G. Myocardial Ischemia: Lack of Coronary Blood Flow or Myocardial Oxygen Supply/Demand Imbalance? *Circ Res* 2016; 119: 194-196. DOI: 10.1161/circresaha.116.308925
150. Kido M, Du L, Sullivan CC et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 2116-2124. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.08.045
151. Yang B, He K, Zheng F et al. Over-expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in vitro protects the cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2014; 15: 579-586. DOI: 10.2459/JCM.0b013e3283629c52
152. Ockaili R, Natarajan R, Salloum F et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H542-548. DOI: 10.1152/ajpheart.00089.2005
153. Robador PA, San José G, Rodríguez C et al. HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia. *Cardiovasc Res* 2011; 92: 247-255. DOI: 10.1093/cvr/cvr202

154. Sousa Fialho MDL, Abd Jamil AH, Stannard GA et al. Hypoxia-inducible factor 1 signalling, metabolism and its therapeutic potential in cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865: 831-843. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.09.024
155. Barile L, Lionetti V, Cervio E et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014; 103: 530-541. DOI: 10.1093/cvr/cvu167
156. DeBerge M, Lantz C, Dehn S et al. Hypoxia-inducible factors individually facilitate inflammatory myeloid metabolism and inefficient cardiac repair. *J Exp Med* 2021; 218. DOI: 10.1084/jem.20200667
157. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol* 2011; 186: 3299-3303. DOI: 10.4049/jimmunol.1003613
158. Shi LZ, Wang R, Huang G et al. HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 2011; 208: 1367-1376. DOI: 10.1084/jem.20110278
159. Shehade H, Acolty V, Moser M et al. Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function. *J Immunol* 2015; 195: 1372-1376. DOI: 10.4049/jimmunol.1402552
160. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A et al. Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1 α . *Eur J Immunol* 2008; 38: 2412-2418. DOI: 10.1002/eji.200838318
161. Lee JH, Elly C, Park Y et al. E3 Ubiquitin Ligase VHL Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α to Maintain Regulatory T Cell Stability and Suppressive Capacity. *Immunity* 2015; 42: 1062-1074. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.05.016
162. Clever D, Roychoudhuri R, Constantinides MG et al. Oxygen Sensing by T Cells Establishes an Immunologically Tolerant Metastatic Niche. *Cell* 2016; 166: 1117-1131.e1114. DOI: 10.1016/j.cell.2016.07.032
163. Doedens AL, Phan AT, Stradner MH et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol* 2013; 14: 1173-1182. DOI: 10.1038/ni.2714
164. Palazon A, Tyrakis PA, Macias D et al. An HIF-1 α /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell* 2017; 32: 669-683.e665. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.10.003
165. Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV et al. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J Exp Med* 2012; 209: 2441-2453. DOI: 10.1084/jem.20112607
166. Ghosh K, Van Duyne GD. Cre-loxP biochemistry. *Methods* 2002; 28: 374-383. DOI: 10.1016/s1046-2023(02)00244-x
167. Zúñiga-Pflücker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 67-72. DOI: 10.1038/nri1257
168. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5: 378-389. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.05.007
169. Piret JP, Mottet D, Raes M et al. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 443-447. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04680.x
170. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14871-14876. DOI: 10.1073/pnas.0406073101

171. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H et al. Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2006; 177: 4962-4965. DOI: 10.4049/jimmunol.177.8.4962
172. Kyaw T, Winship A, Tay C et al. Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation* 2013; 127: 1028-1039. DOI: 10.1161/circulationaha.112.001347
173. Tian YM, Nie HJ, Liu JY et al. [Effect of hypoxia on activation of the peripheral blood T lymphocyte in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2011; 27: 145-148.
174. Andrews LP, Vignali KM, Szymczak-Workman AL et al. A Cre-driven allele-conditioning line to interrogate CD4(+) conventional T cells. *Immunity* 2021; 54: 2209-2217.e2206. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.08.029
175. Kipp M, Kiessling MC, Hochstrasser T et al. Design-Based Stereology for Evaluation of Histological Parameters. *J Mol Neurosci* 2017; 61: 325-342. DOI: 10.1007/s12031-016-0858-9
176. Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol* 2019; 39: 556-570. DOI: 10.1002/jat.3749
177. Bowler E, Lodomery MR. Working with Hypoxia. *Methods Mol Biol* 2019; 1990: 109-133. DOI: 10.1007/978-1-4939-9463-2_10
178. Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J et al. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood* 2003; 101: 4847-4849. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2711

Appendix

I) Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
ANGPT1/2	Angiopoetin 1 und 2
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	antigenpräsentierende Zellen
Apo B100	Apolipoprotein B100
ApoB100	Apolipoprotein B 100
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ASCVD	atherosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (<i>atherosclerotic cardiovascular disease</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure; <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CoCl ₂	Cobalt(II)-Chlorid
Cre	<i>cyclization recombination</i>
DAMP	<i>danger associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBPS	Dulbecco's phosohatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIH	<i>factor inhibiting HIF</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>forkhead-box-protein P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Erdbeschleunigung
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GLUT1	Glukosetransporter 1
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>

HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRE	Hypoxie-responsive Elemente
IFN γ	Interferon γ
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-17	Interleukin-17
IL-17A	Interleukin-17A
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-23	Interleukin-23
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
kDA	Kilodalton
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
LDLR	<i>low density lipoprotein</i> Rezeptor
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C ^{hi}	<i>Lymphocyte antigen 6C high</i>
Ly6C ^{low}	<i>Lymphocyte antigen 6C low</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signals</i>
NSTEMI	<i>non ST-elevation myocardial infarction</i>
ODD	sauerstoff-abhängigen Abbaudomäne; <i>oxygen dependent degradation</i>
oxLDL	oxidiertes <i>low density</i> Lipoprotein
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung; <i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>endothelial cell platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase-Domänen-Proteine; <i>prolyl hydroxylase domain</i>
pLK	periphere Lymphknoten
Prothymosin α	PTMA
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	quantitative real time Polymerasekettenreaktion
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROR γ T	<i>RAR-related orphan receptor gamma t</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SSC	<i>side scatter</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
TAD	Transaktivierungsdomänen
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
T _H 1	T-Helferzellen vom Typ 1
T _H 17	T-Helferzellen vom Typ 17
T _H 2	T-Helferzellen vom Typ 2
TLR	<i>toll like</i> Rezeptoren
TMSB4	Thymosin β 4
TNF α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
U	unit
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
ZEB2	<i>Zink-Finger E-box binding homebox 2</i>
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin

II) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenese der Atherosklerose	3
Abbildung 2	Pathogenese und Phasen des Myokardinfarkts mit vorherrschenden Zelltypen.....	9
Abbildung 3	T-Zell Subtypen mit Effektorzytokinen, Transkriptionsfaktoren und ihrer Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen	11
Abbildung 4	Funktion und Regulation von HIF-1 in normoxischem und hypoxischem Milieu.....	15
Abbildung 5	Analyse der Kardiomyozytenfläche in infarzierten Herzen: Herstellung der Schnitte und Auswahl der zu analysierenden Regionen.	32
Abbildung 6	Exemplarische Reinheitskontrolle nach Isolation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen aus der Milz mittels Isolations Kit der Firma Miltenyi Biotec.....	34
Abbildung 7	Cycler-Programm zur cDNA-Synthese.....	37
Abbildung 8	qPCR Programm.....	38
Abbildung 9	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen zeigten in CD4 ^{cre} HIF-1 α ^{<i>fl/fl</i>} Mäusen keine Expression von HIF-1 α mRNA.....	55
Abbildung 10	Gating Strategie IFN γ -Produktion in T _H 1-Zellen exemplarisch.....	56
Abbildung 11	T _H 1-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1 α Defizienz keine Veränderung von Anzahl oder Produktion der Ifng- und Tnfa-mRNA.....	57
Abbildung 12	T _H 17-Zellen in vitro waren bei HIF-1 α Defizienz unter Hypoxiesimulation mittels CoCl ₂ vermindert nachweisbar.	58
Abbildung 13	Vermehrte Expression von in T _{reg} -Zellen exprimiertem Foxp3 bei Defizienz von HIF-1 α	59
Abbildung 14	Gating Strategie zytotoxische Zytokine in CD8 ⁺ T-Zellen exemplarisch.....	60
Abbildung 15	CD8 ⁺ T-Zellen in vitro zeigten bei HIF-1 α Defizienz auf mRNA Ebene eine verstärkte Produktion des Proteins Perforin.....	61
Abbildung 16	Die Fläche der Kardiomyozyten im infarzierten Herzen wurde durch Ausschalten der Funktion von HIF-1 α in T-Zellen nicht verändert.....	63
Abbildung 17	Die Dichte der Kapillaren im infarzierten Myokard wurde durch Ausschalten der Funktion von HIF-1 α in T-Zellen nicht verändert.	64

Abbildung 18	Körpergewicht, Serumcholesterin und Milzgewicht der weiblichen LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{+/+} Mäuse (n = 7) und der weiblichen LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäuse (n = 10) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät.	65
Abbildung 19	Eine HIF-1α Defizienz in T-Zellen aggravierte das Ausmaß atherosklerotischer Plaques in LDLR ^{-/-} Mäusen.....	67
Abbildung 20	Die histologische Zusammensetzung der Plaques von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen (n = 10) zeigten nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät einen verminderten Makrophagenanteil, weiter aber keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (n = 7).	69
Abbildung 21	Gating Strategie CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten.	70
Abbildung 22	T-Zellphänotypisierung in peripheren Lymphknoten von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen (n = 9) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{+/+} Mäuse (n = 7) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät ein vermehrtes absolutes Auftreten von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen.....	72
Abbildung 23	T-Zellphänotypisierung in der Milz von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen (n = 9) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{+/+} Mäuse (n = 7) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät keine signifikanten Unterschiede.	73
Abbildung 24	Gating Strategie CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten im Blut.	74
Abbildung 25	T-Zellphänotypisierung im Blut von LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäusen (n = 9) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{+/+} Mäuse (n = 7) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät eine signifikant erhöhte CD4 ⁺ T-Zellpopulation.	75
Abbildung 26	Gating Strategie aktivierte T-Zellen exemplarisch.	76
Abbildung 27	T-Zell Aktivierung in Milz, peripheren Lymphknoten und Blut weiblicher LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{+/+} Mäuse (n = 7) und weiblicher LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäuse (n = 10) nach acht Wochen fettreicher Western-Typ Diät zeigte eine verminderte Aktivierung im Blut der LDLR ^{-/-} CD4cre ⁺ HIF-1α ^{fl/fl} Mäuse.....	77
Abbildung 28	T _H 1-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokinproduktion von IFN _γ in Milz und peripheren Lymphknoten.	78

Abbildung 29	T _H 17-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1 α Defizienz keine veränderte Anzahl oder Zytokinproduktion von IL-17 in Milz und peripheren Lymphknoten.	79
Abbildung 30	Gating Strategie T _{reg} Zellen exemplarisch.	80
Abbildung 31	T _{reg} -Zellen in vivo zeigten bei HIF-1 α Defizienz keine veränderte Anzahl in Milz und peripheren Lymphknoten.	81
Abbildung 32	CD8 ⁺ T-Zellen in vivo zeigten bei HIF-1 α Defizienz eine vermehrte IFN γ Produktion in Milz und peripheren Lymphknoten.	82

III) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Cholesterol-Assay Mastermix.....	26
Tabelle 2	Protokoll Paraffinierung.....	27
Tabelle 3	Protokoll Entparaffinierung.....	27
Tabelle 4	Protokoll Antigendemaskierung.....	28
Tabelle 5	Immunhistochemische Färbungen	29
Tabelle 6	Protokoll Dehydrierung.....	30
Tabelle 7	Zusammensetzung Zytokine T-Zell Polarisationsmedium.....	35
Tabelle 8	Zusammensetzung Mastermix cDNA Synthese	37
Tabelle 9	Zusammensetzung Mastermix qPCR.....	38
Tabelle 10	Zusammenfassung der Ergebnisse bei HIF-1 α Defizienz in T-Lymphozyten.....	83

IV) Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen für die Überlassung des Themas, die vielfältigen mir zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten und für die fachliche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Dr. Clément Cochain und Dr. Núria Amézaga Solé danke ich herzlich für die intensive Betreuung, Hilfestellung und die wertvollen Ratschläge im Labor und zu dieser Arbeit während der gesamten Zeit. Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Biomedizin des Universitätsklinikums Würzburg, die einen maßgeblichen Anteil an der Realisierung dieser Arbeit haben. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere Guiseppa Rizzo, Sarah Schäfer, Petra Hönig-Liedl, Melanie Rösch, Yvonne Kerstan und Doris Kitzberger.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützten und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir somit die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gaben.

V) Lebenslauf

VI) Eigene Veröffentlichungen/Kongressteilnahme

Vafadarnejad E, Rizzo G, Krampert L, Arampatzi P, Arias-Loza AP, Nazzal Y, Rizakou A, **Knochenhauer T**, Bandi SR, Nugroho VA, Schulz DJJ, Roesch M, Alayrac P, Vilar J, Silvestre JS, Zerneck A, Saliba AE, Cochain C. Dynamics of Cardiac Neutrophil Diversity in Murine Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2020 Oct 9;127(9):e232-e249. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317200. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32811295.

Teilnahme an der 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie 2023 in Hamburg mit Kurzvorträgen zu den folgenden Themen:

- Outcome in night- vs. daytime surgery for acute type A aortic dissection.
- Postoperative deep sternal wound infection in CABG and use of bilateral mammary artery in patients with poor diabetic status.