



Die Rolle von T-Lymphozyten im myokardialen Reperfusionsschaden

The role of T-cells in myocardial reperfusion injury

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Denise Sandra Mathes

aus

Bamberg

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: **Professor Dr. Thomas Hünig**

1. Betreuer: **Professor Dr. Stefan Frantz**

2. Betreuer: **Professor Dr. Albrecht Müller**

3. Betreuer: **Professor Dr. Christoph Kleinschnitz**

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Juni 2014 in der Kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) angefertigt.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die an dieser Arbeit mitwirkten und mich auf dem Weg meiner Doktorarbeit begleiteten.

Zuerst möchte ich dem Erstbetreuer meiner Doktorarbeit, Professor Dr. Stefan Frantz, meinen besonderen Dank aussprechen. Er gab mir die Möglichkeit, unter seiner Leitung in einem angenehmen und offenen Betriebsklima eine Dissertation über eine hochinteressante Thematik anzufertigen. Ferner durfte ich mich bei weiteren Forschungsprojekten engagieren. Bei Fragen stand er mir stets beratend zur Seite. Auch konnte ich meinen Horizont methodisch auf dem Gebiet der kardiologischen und immunologischen Forschung erweitern und in großem Maße eigenständig handeln und experimentieren. Des Weiteren danke ich ihm sehr dafür, dass ich die Ergebnisse meiner Arbeit auf Kongressen, Retreats und Symposien vorstellen durfte und an zusätzlichen Förderungsveranstaltungen der Graduate School of Life Sciences teilnehmen durfte.

Meinen weiteren Supervisoren, Professor Dr. Albrecht Müller und Professor Dr. Christoph Kleinschnitz danke ich dafür, dass sie meine Betreuung im Rahmen der Graduate School of Life Science übernommen haben. In den gemeinsamen Meetings bereicherten sie das Projekt durch Impulse aus ihren Fachbereichen zusätzlich.

PD Dr. Ulrich Hofmann danke ich herzlich für sein besonderes Engagement in diesem Projekt, die kontinuierlich gute Betreuung und fachliche Unterstützung bei der Erstellung experimenteller Setups. Auch machte er mich mit einem Basiselement immunologischer Forschung, der Durchflusszytometrie vertraut. Zusammen erstellten wir neue FACS-Panels und diskutierten Details im komplexen Versuchsaufbau.

Professor Dr. Thomas Hünig danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die Aufnahme in das Graduiertenprogramm „Immunomodulation“, ebenso wie PD Dr. Thomas Kerkau und PD. Dr. Niklas Beyersdorf für die Aufnahme in das Arbeits- und Literaturseminar des Instituts für Virologie und Immunologie Würzburg. Hier wurden mir die Facetten der immunologischen Forschung näher gebracht und ich konnte weitere Ideen für mein eigenes Projekt entwickeln. Ebenso bedanke ich

mich dafür, dass ich das BD LSRII Flow Cytometer am Institut für Virologie und Immunbiologie problemlos nutzen durfte.

Meinen Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe von Professor Frantz, Barbara Bayer, Charlotte Dienesch und Helga Wagner danke ich für die tolle Unterstützung, den großen experimentellen Erfahrungsschatz, den sie an mich weitergaben, und die konstant hohe Qualität ihrer Arbeit. Auch haben sie mir mit ihrem Humor im Laboralltag einige grandiose Lacher beschert. Andrea, Christina, Edit, Gabriele, Hisa, Johannes, Sandra und Susanne danke ich für einige Jahre der guten Zusammenarbeit.

Dr. Benjamin Vogel, Georg Wedekind und Dr. Gustavo Ramos unterstützten mich in Fragen versuchstechnischer Standardisierung, Etablierung und Datenverarbeitung.

Dr. Paula Arias-Loza aus der Arbeitsgruppe von Professor Heinz-Theodor Pelzer bin ich herzlich verbunden für das Zur-Verfügung-Stellen der Mikroperfusions-Methode und ihre tatkräftige Unterstützung bei diesem Versuchsvorhaben.

Bei Christian Linden aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie bedanke ich mich für die Unterstützung bei Sorting-Experimenten am BD FACS Aria™ III Cell Sorter.

Last but not least bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen Eltern, die mir das Pharmaziestudium ermöglicht haben und die mir immer auf meinem akademischen Weg, und so auch in der Zeit der Promotion, unterstützend zur Seite standen.

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind eingereicht:

Paper

Mathes D.; Weirather J.; Arias P.; Vogel B.; Pachel C.; Sparwasser T.; Ertl G.; Kerkau T.; Beyersdorf N.; Frantz S.*; Hofmann U.*; CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote murine myocardial reperfusion injury by MHC class II-restricted T cell receptor signaling; *contributed equally; (eingereicht)

Poster

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B., Weirather J., Frantz S.; CD4⁺ T-cells play a detrimental role in myocardial Ischemia-Reperfusion Injury; 8th International Student`s Symposium (SCI) der Graduate School of Life Sciences, Würzburg (Deutschland); 2013

Hofmann U., **Mathes D.**, Weirather J., Beyersdorf N., Kerkau T. and Frantz S.; Abstract 212: CD4⁺ T-cell Activation By T-cell Receptor Engagement Contributes To Myocardial Ischemia-reperfusion Injury; Circulation Research 2013; 113: A212; American Heart Association (AHA); Basic Cardiovascular Sciences; Jahreskonferenz; Las Vegas (USA); 2013

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; Abstract P0603: Role of T-cells in cardiac ischemia-reperfusion injury; Immunology 2012; 137 (Suppl.1), p.386-387; European Congress of Immunology, Glasgow (Schottland); 2012

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; The role of T-cells in cardiac Ischemia-Reperfusion Injury; 7th International Student`s Symposium (EPOS) der Graduate School of Life Sciences, Würzburg (Deutschland); 2012

Hofmann U.; **Mathes D.**; Pachel C.; Vogel B.; Weirather J.; Ertl G. and Frantz S.; Abstract 12010: Role of T-cells in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury; Circulation 2012; 126: A12010; American Heart Association (AHA); Jahreskonferenz; Chicago (USA); 2012

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B., Weirather J., Frantz S.; Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury – Relevance of T-cells; International Joint Symposium des Sonderforschungsbereichs SFB 688 und des Comprehensive Heart Failure Centers Würzburg, Würzburg (Deutschland); 2012

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; Infiltration von T-Zell Subpopulationen nach myokardialer Ischämie/ Reperfusion; 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); Mannheim (Deutschland), 2012

Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; The role of T-cells in cardiac Ischemia-Reperfusion Injury; 6th International Student`s Symposium (BioBang) der Graduate School of Life Sciences, Würzburg (Deutschland); 2011

Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt (MI) gehört nach wie vor zu den führenden Todesursachen weltweit. Eine Minimierung der Infarktgröße, die durch die Dauer der Ischämie bestimmt wird, ist wesentlich für das Überleben und die Lebensqualität des Myokardinfarkt-Patienten. Die Reperfusion stellt aktuell eine zentrale klinische Intervention dar, um den myokardialen Schaden einzugrenzen. Dennoch führt die Reperfusion per se zu zusätzlichem Schaden am Herzen. Somit ist die Erforschung neuer Strategien zur Minimierung des myokardialen Reperfusionsschadens international von Interesse. Die Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens ist vielschichtig und einige Komponenten sind auch heute in ihrer Wirkweise noch nicht vollständig mechanistisch verstanden. Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle von CD4⁺ T-Zellen und insbesondere deren Subpopulation der regulatorischen T-Zellen im myokardialen Reperfusionsschaden und stellt neue, auf T-Zellen abzielende, Therapien in Ergänzung zur myokardialen Reperfusion vor.

Zunächst wurde eine Infiltration von T-Zellen in das Myokard nach Ischämie-Reperfusion (I/R) untersucht. Nach der Ischämie-Reperfusion wurden infiltrierende CD4⁺ T-Zellen als quantitativ führend und aktiviert identifiziert und erwiesen sich in der Infarktgrößenbestimmung als relevante Mediatoren des Reperfusionsschadens. CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) stellen eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften dar, die schnell und niederschwellig aktiviert werden können und kommen somit als zum Reperfusionsschaden beitragend in Frage. Mit Hilfe des Dereg (DEpletion of REGulatory T cells) -Mausmodells wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen zum myokardialen Reperfusionsschaden beitragen; Treg-depletierte Dereg-Mäuse waren vor dem Reperfusionsschaden geschützt und zeigten kleinere Infarktgrößen als die Kontrolltiere. Zudem wurde mittels Transferexperimenten gezeigt, dass für den Treg-vermittelten Reperfusionsschaden die Anwesenheit von CD25⁻ konventionellen T-Zellen (Tconv) erforderlich ist. Regulatorische T-

Zellen stellen also einen in der vorliegenden Arbeit identifizierten potentiellen Angriffspunkt zur Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens dar.

Anhand von T-Zell-Rezeptor transgenen OT-II Mäusen und MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse II Knockout (KO) Tieren wurde gezeigt, dass Autoantigenerkennung im myokardialen Reperfusionsschaden eine Rolle spielt. Zur vollen T-Zell-Aktivierung notwendig ist neben dem MHC Klasse II-Signalweg und Kostimulatoren auch das Moleküle CD154 (CD40L). Die Gabe eines inhibitorischen anti-CD154-Antikörpers reduzierte die Infarktgröße in Wildtyp-Tieren sigifikant. Der myokardiale Reperfusionsschaden kann neben Zellen der adaptiven Immunität auch durch Neutrophile Granulozyten, Plättchen oder Inflammation des Endothels verstärkt werden. Knockout Mäuse mit einer Defizienz an CD4⁺ T-Zellen verfügten über eine verbesserte Mikroperfusion. Mechanistisch war nach 24h Reperfusion die absolute Zellzahl an Neutrophilen Granulozyten im CD4 KO im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert; in Endothelzellen war die Regulation bestimmter Gene (VEGF α , TIMP-1 und Eng) nach I/ R im CD4 KO jedoch verändert.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit eine zentrale Rolle der Antigen-Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen im myokardialen Reperfusionsschaden. In Anwesenheit von CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen ist der Reperfusionsschaden erhöht. Somit können CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen potentiell als Ziel für neuartige Therapien des Myokardinfarkts genutzt werden.

Summary

Myocardial infarction (MI) is still one of the leading causes of mortality worldwide. Minimizing infarct size, which is determined by duration of ischemia, is of paramount importance for the rescue of myocardial tissue determining myocardial infarct size and prognosis. Currently, reperfusion is a central clinical intervention to curtail myocardial ischemia. However, reperfusion itself is leading to additional damage to the heart. Therefore, investigating new strategies to minimize myocardial reperfusion injury is of international interest. The pathophysiology of myocardial reperfusion injury is complex and some of its components are still mechanistically not completely understood. The present work determines the role of CD4⁺ T-cells and in particular their subset of regulatory T-cells in myocardial reperfusion injury, providing approaches for new T-cell directed therapies in addition to myocardial reperfusion.

Initially, an infiltration of T-cells into the myocardium was investigated after ischemia-reperfusion (I/ R). After ischemia-reperfusion, infiltrating CD4⁺ T-cells were identified as leading in quantity and activated and turned out to be relevant mediators of reperfusion injury influencing infarct size. CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (reg)-cells are a subpopulation of CD4⁺ T-cells with immunosuppressive features, being activated quickly and at a low threshold, thereby possibly mediating reperfusion injury. With the help of the Dereg (DEpletion of REGulatory T-cells) mouse model, regulatory T-cells were identified as involved in myocardial reperfusion injury; Treg-depleted Dereg mice were protected from reperfusion injury showing smaller infarct sizes than control mice. Additionally, transfer experiments revealed that Treg-mediated reperfusion injury needs the presence of CD25⁻ conventional T-cells (Tconv). That means that Tregs are a potential target identified in the present work to reduce myocardial reperfusion injury.

With the help of T-cell receptor transgenic OT-II mice and MHC (major histocompatibility complex) class II knockout (KO) mice, it was shown that recognition of autoantigen plays a role in myocardial reperfusion injury. Next to MHC class II-signaling and costimulators also the molecule CD154 (CD40L) is required for full T-cell activation. An inhibitory anti-CD154 antibody significantly reduced infarct size in wildtype mice. Besides by cells of the adaptive immunity, myocardial reperfusion injury can also be intensified by neutrophils, platelets or inflammation of the

endothelium. Knockout mice deficient in CD4⁺ T-cells revealed a better microperfusion. Mechanistically, after 24h of reperfusion, the absolute cell number of neutrophils was not altered in CD4 KO versus wildtype mice; however, in endothelial cells, the regulation of specific genes (VEGF α , TIMP-1 and Eng) was altered after I/R.

In summary, the present work shows a central role of recognition of antigen by the T-cell receptor for activation of CD4⁺ T cells in myocardial reperfusion injury. In the presence of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T-cells, myocardial reperfusion injury is enhanced. Hence, CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T-cells might constitute a new potential target for the therapy of myocardial infarction.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	8
1.1 Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens	10
1.1.1 Intrinsische Parameter	10
1.1.2 Zelluläre Komponenten	10
1.1.3 Humorale Komponenten	12
1.2 Adaptive Immunität in der Ischämie-Reperfusion	14
1.2.1 Die Klasse der T-Lymphozyten	14
1.2.2 Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	16
1.2.3 Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen	19
1.2.4 CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatorische T-Zellen	21
1.2.5 Zytokinprofil in der myokardialen Ischämie-Reperfusion	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material	26
2.1 Chemikalien	26
2.2 Antikörper	32
2.2.1 Primärantikörper	32
2.2.2 Sekundärantikörper/-reagentien	34
2.2.3 Antikörper und Toxin für Depletions-/ Inhibitionsexperimente	35
2.3 Lösungen, Puffer und Gele	35
2.4 Spezielle Verbrauchsmaterialien	38
2.5 Geräte	40
2.6 Auswertungs-Software und Bildverarbeitung	42
2.7 Versuchstiere und Tierhaltung	42
3 Methoden	44
3.1 Eingriffe am Tier	44
3.1.1 Operatives Verfahren der Ischämie-Reperfusion	44
3.1.2 Infarktgrößenbestimmung mit Evans` Blue/ TTC Färbung	45
3.1.3 Myokardialer Mikroperfusionsassay	48
3.1.4 Organentnahmen	50
3.1.5 Depletion von regulatorischen T-Zellen	51

3.1.6	Adoptiver Zelltransfer	52
3.1.7	Applikation blockierender Antikörper.....	53
3.2	Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten.....	53
3.3	Immunologische Methodik.....	55
3.3.1	Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	55
3.3.1.1	Herstellung von Einzelzellsuspensionen für FACS.....	56
3.3.1.2	Durchführung der FACS-Färbungen	57
3.3.1.3	Sort.....	58
3.3.2	MACS	59
3.4	Molekularbiologische Methoden	60
3.4.1	Quantitative RT-PCR	60
3.4.1.1	RNA-Isolation	60
3.4.1.2	RNA-Amplifikation	61
3.4.1.3	Herstellung von cDNA	61
3.4.1.4	TaqMan [®] -Assay basierte qRT-PCR	62
3.4.1.5	Kommerzielle qRT-PCR Arrays.....	63
3.4.2	SDS-Page und Western Blot.....	64
3.5	Statistische Auswertung	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Akkumulation von T-Zellen im Myokard nach Ischämie-Reperfusion	68
4.2	Aktivierungsstatus von T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion	72
4.2.1	Aktivierungsstatus von T-Zellen aus mediastinalen Lymphknoten nach Ischämie-Reperfusion.....	73
4.2.2	Aktivierungsstatus von zirkulierenden T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion.....	75
4.3	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatorische T-Zellen als Mediatoren des myokardialen Reperfusionsschadens	78
4.3.1	Ischämie-Reperfusion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen	79
4.3.2	Ischämie-Reperfusion nach adoptivem T-Zell-Transfer	82
4.3.3	Zytokinprofil von regulatorischen und konventionellen T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion.....	85
4.4	Antigenerkennung im T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden	87
4.4.1	Untersuchung einer Antigenerkennung im Reperfusionsschaden an OT-II Mäusen.....	87

4.4.2	Untersuchung einer Antigenerkennung im Reperfusionsschaden an MHC Klasse II KO Mäusen.....	88
4.4.3	CD40L-Beteiligung am T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden.....	89
4.5	Regulation von Osteopontin im Reperfusionsschaden.....	90
4.6	Unveränderte Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität in T-Zell-defizienten Mäusen	94
4.7	CD4 ⁺ T-Zell-vermittelte Veränderung der Mikroperfusion.....	97
4.7.1	Hinweise auf T-Zell-Interaktion mit Endothel.....	99
5	Diskussion.....	106
5.1	Akkumulation von CD4 ⁺ T-Zellen im Myokard nach Ischämie-Reperfusion.....	106
5.2	Bedeutung von CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatorischen T-Zellen für die Infarktgröße	107
5.3	Zytokine als Mediatoren der Treg-Antwort im myokardialen Reperfusionsschaden.....	110
5.4	Antigenerkennung in der myokardialen Ischämie-Reperfusion	111
5.5	CD40L-Beteiligung am T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden	113
5.6	Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten nach Ischämie-Reperfusion im T-Zell KO	114
5.7	CD4 ⁺ T-Zell-vermittelte Veränderung der Mikroperfusion.....	115
5.8	Veränderte endotheliale Genexpression im T-Zell-KO versus WT nach Ischämie-Reperfusion.....	115
5.9	Ausblick.....	118
6	Literaturverzeichnis	121
7	Anhang.....	137
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	137
7.2	Abbildungsverzeichnis	140
7.3	Tabellenverzeichnis.....	142
7.4	Publikationsliste.....	143
7.5	Curriculum Vitae	144
7.6	Weitere Beiträge zu Tagungen und Retreats	146
7.7	Besondere Posterbeiträge	147
7.8	Eidesstattliche Erklärung	148
7.9	Affidavit.....	148

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen tragen in der westlichen Welt deutlich zu Morbidität und Mortalität von Erwachsenen bei (Mathers and Loncar, 2006), (Murray and Lopez, 1997). In industrialisierten Ländern sind sie die führende Todesursache und Hochrechnungen gehen davon aus, dass sie es in den Schwellenländern bis zum Jahr 2020 ebenfalls sein werden (Hasdai et al., 2003),(Hamm, 2009). Laut Statistischem Bundesamt war 2012 und in den Vorjahren die Herz-/ Kreislaufkrankung die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt). 2012 verstarben 55 425 Menschen an einem Herzinfarkt. Der Anteil betroffener Männer war mit 55,7% etwas höher als der Anteil betroffener Frauen (44,3 %) (Statistisches Bundesamt).

Per Definition ist ein Myokardinfarkt „ein akuter Verschluss eines Koronargefäßes mit nachfolgender Nekrose des versorgten Myokardbezirkes“ (Böhm, 2003). Bereits eine Ischämiedauer von 20-30 Minuten kann zu irreversiblen Gewebeschaden führen (Reimer et al., 1977),(Steffens et al., 2009). Ein Myokardinfarkt kann sich ausgedehnt transmural über die gesamte Wanddicke vom Endokard bis zum Epikard oder nicht transmural erstrecken und im Wesentlichen subendokardiale Anteile betreffen (Mikroinfarkt) (Hochrein, 1993). Im Falle großer transmuraler Infarkte kann es zu linksventrikulärem Remodelling mit Infarktexpansion kommen (Kloner, 2013). Auch eine Hypertrophie des nicht-infarzierten Gewebes ist eine Folgeerscheinung (Kloner, 2013). Bei einem Verschluss des proximalen RIVA (Ramus interventricularis anterior; LAD) erstreckt sich der Infarkt zumeist auf die Vorderwand und das Kammerseptum (Lederhuber, 2010). Die pathogenetische Grundlage des Myokardinfarkts ist meist eine arteriosklerotische Koronarveränderung mit Gefäßstenosen, die ein oder mehrere Gefäßsysteme betreffen (Hochrein, 1993). Risikofaktoren der Arteriosklerose können beispielsweise eine Hypercholesterinämie, Hypertonie, Zigarettenrauchen, Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus oder Übergewicht sein (Mörl, 1981). In seiner klassischen Manifestation entsteht ein Myokardinfarkt infolge der Ruptur eines arteriosklerotischen Plaque (Mutschler, 2008) durch einen Embolus, der ein Koronargefäß verschließt; seltener durch eine

seröse oder hämorrhagische Quellung eines Plaques, zum Beispiel durch Wanddissektion (Hochrein, 1993). Vom Myokardinfarkt betroffen ist vor allem der linke Ventrikel an der Vorder-, Seiten- oder Hinterwand mit oder ohne Septumbeteiligung, selten ist der rechte Ventrikel mit einbezogen (Hochrein, 1993).

Das Eindämmen des myokardialen Schadens nach einem Infarkt ist für den Patienten unerlässlich. Eine prompte Wiedereröffnung des Koronargefäßes (Reperfusion) und die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung des Myokards ist essentiell um die Infarktgröße zu reduzieren und aus prognostischer Sicht die wichtigste Intervention. Therapeutische Ansätze stellen neben der Reperfusion die Thrombolyse, die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit Stent-Implantation und Gabe eines Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten und die koronare Bypass-Operation dar (Böhm, 2003). Als Beispiele für verwendete Therapeutika können intravenös applizierte Nitrate (Nitroglycerin) bei einem akuten ST-Elevations-Myokardinfarkt, Betablocker, Fibrinolytika (Alteplase, Reteplase, Tenecteplase) und weitere Thrombozytenaggregationshemmer (ASS, Clopidogrel, Abciximab, Eptifibatid, Tirofiban) genannt werden (Böhm, 2003).

Eine erfolgreiche Reperfusionstherapie innerhalb der ersten 6-12 Stunden nach einem Myokardinfarkt bestimmt über die linksventrikuläre Kontraktionsfunktion und Langzeitprognose des Patienten (Böhm, 2003). Obwohl die Reperfusion des ischämischen Myokards eine essentielle Intervention darstellt, führt sie paradoxerweise, wie von Jennings et al. zum ersten Mal 1960 beschrieben wurde (JENNINGS et al., 1960), jedoch zu einem zusätzlichen, reversiblen oder irreversiblen Schaden am Myokard, dem Reperfusionsschaden (Reperfusion Injury, RI) (Buja, 2005),(Maxwell and Lip, 1997),(Yellon and Hausenloy, 2007). So kann es trotz optimaler myokardialer Reperfusion nach einem Myokardinfarkt zu einer Mortalitätsrate von 10 % kommen, während die Inzidenz eines Herzversagens nach einem Myokardinfarkt fast bei 25 % liegt (Yellon and Hausenloy, 2007). Auch nach erfolgreicher Wiedereröffnung des vaskulären Versorgungssystems erhalten in manchen Fällen nicht alle Regionen des zuvor ischämischen Myokards unmittelbar uniform ihre vollständige Perfusion wieder. In diesem Fall spricht man von einem „no reflow“ Phänomen (Kloner et al., 1974),(Braunwald and Kloner, 1985),(Yellon and Hausenloy, 2007).

1.1 Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens

Der myokardiale Reperfusionsschaden ist multifaktoriell bedingt und seine Pathophysiologie ist bis heute nicht vollständig geklärt. Vielfältige Mechanismen tragen zur finalen Infarktgröße nach einer myokardialen Ischämie bei. Folgende Parameter sind bereits gut erforscht (Abbildung 1):

1.1.1 Intrinsische Parameter

Das erste Stadium des Reperfusionsschadens umfasst einen intrinsischen Zellschaden, der aufgrund von verschiedenen Prozessen wie der Öffnung eines mitochondrialen Porenkomplexes („mitochondrial permeability transition pore“, mPTP), der spannungsabhängig von Calcium und oxidativem Stress reguliert wird (Buja, 2013), einem Hypoxie-induzierten Anstieg an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species, ROS) (Zweier et al., 1989),(Garlick et al., 1987) und abstammenden freien Radikalen und Oxidantien (Superoxid-Anionen, O_2^- ; Hydroxylradikalen, OH^\cdot ; Hypochloriger Säure, HOCl; Wasserstoffperoxid, H_2O_2 und Peroxynitrit aus NO) (Maxwell and Lip, 1997),(Zweier and Talukder, 2006), einer intrazellulären Kardiomyozyten-Calciumüberladung oder zellulärem Schwellen verursacht wird (Murphy and Steenbergen, 2008).

1.1.2 Zelluläre Komponenten

Das zweite Stadium des Reperfusionsschadens umfasst die Induktion einer akuten inflammatorischen Reaktion durch zelluläre Komponenten (Haas et al., 2010a),(Dominguez-Rodriguez et al., 2014). Besonders die Bedeutung von inflammatorischen Zellen der angeborenen Immunität ist bereits gut erforscht (Rock et al., 2010),(Mann, 2011). Die angeborene Immunität wird aktiviert, wenn „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) auf „pathogen-associated molecular patterns“

(PAMPs) und „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) reagieren. Durch die Expression von verschiedenen PRRs und die Freisetzung von DAMPs als Folge des Ischämie- und Reperfusionsschadens werden Kardiomyozyten in die Lage versetzt, eine angeborene Immunantwort zu generieren (Lin and Knowlton, 2014).

Leukozyten

Auf der zellulären Ebene der angeborenen Immunität wurde z.B. ein zentraler Beitrag von Neutrophilen Granulozyten (Litt et al., 1989),(Dreyer et al., 1991),(Carbone et al., 2013),(de Boer et al., 2013) sowie Monozyten und Makrophagen nach einem permanenten Myokardinfarkt (Nahrendorf et al., 2007),(Frantz and Hofmann, 2012),(Frantz et al., 2013),(Frantz and Nahrendorf, 2014) und in verschiedenen Reperusionsmodellen (Schofield et al., 2013),(Jetten et al., 2013) gezeigt.

Neutrophile Granulozyten vermitteln einen myokardialen Schaden, indem sie, stimuliert durch proinflammatorische Mediatoren, Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale produzieren (Jordan et al., 1999). Auch setzen Neutrophile schädigende Degranulationsprodukte (Proteasen, Eicosanoide und Lipide, Adhäsionsmoleküle) frei (Vinten-Johansen, 2004). Neutrophile Granulozyten adhäreren über Selektine (P-Selektin, L-Selektin, E-Selektin), β_2 -Integrine (CD11/ CD18 Komplex) und die Immunglobulin Superfamilie (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) an das Endothel. Die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten an das kardiale Endothel führt zu dessen Aktivierung und funktionellem Schaden wie endothelialer Dysfunktion (Ma et al., 1991),(Tsao and Lefer, 1990) und erhöhter vaskulärer Permeabilität (Jordan et al., 1999). Im myokardialen Kontext ist eine Depletion von Neutrophilen mit verkleinerten Infarktgrößen assoziiert (Litt et al., 1989).

Monozyten und Makrophagen beugen Heilungsdefekten und linksventrikulärer Thrombusbildung nach einem Myokardinfarkt vor (Frantz et al., 2013).

Plättchen

Auch Plättchen sind an der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens beteiligt. An Orten vaskulären Schadens kommen Plättchen in Kontakt mit subendothelialen Komponenten wie Kollagenen oder Lamininen und bilden einen Blutpfropf, um einen exzessiven Blutverlust zu vermeiden (Nieswandt et al., 2011).

Doch kann die Plättchenaktivierung, -aggregation, Thrombusbildung und Freisetzung von Plättchen-abstammenden Mediatoren auch den Reperfusionsschaden verstärken (Eltzschig and Eckle, 2011). Auch geht die Rekrutierung von inflammatorischen Leukozyten in postischämische Mikrogefäße oft mit einer Akkumulation von Plättchen einher. So hängt z.B. die Leukozytenadhäsion von Plättchen-assoziiertem P-Selektin ab. Schätzungen ergeben, dass nach Ischämie-Reperfusion ca. 25% der Plättchen direkt an das venöse Endothel binden während die verbleibenden 75% der adhärenen Plättchen an Leukozyten angeheftet sind, die an die Gefäßwand gebunden sind (Tailor et al., 2005),(Rodrigues and Granger, 2010).

Endothelzellen

Inflammatorische residierende oder zirkulierende Leukozyten wie Neutrophile Granulozyten und T-Zellen können durch das Ausschütten einer Vielzahl an löslichen Mediatoren eine endotheliale Dysfunktion und erhöhte vaskuläre Permeabilität verursachen. Ebenso verantwortlich für eine Dysfunktion der endothelialen Barriere können physikochemische Faktoren wie das Schergefälle und die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten sein. Die endotheliale Hyperpermeabilität entsteht wahrscheinlich durch Veränderungen in der feinen Struktur des endothelialen Monolayers und einer Öffnung endothelialer parazellulärer Junctions (Esser et al., 1998), was eine Folge der Dissoziation von Verbindungsproteinen oder einer Kontraktion des Zytoskeletts ist (Kumar et al., 2009),(Rodrigues and Granger, 2010). Es kann zur Ödembildung und Verschlechterung der Organfunktion kommen.

1.1.3 Humorale Komponenten

Auch das Komplementsystem wird infolge des Reperfusionsschadens durch pre-existierende natürliche Antikörper aktiviert, die Autoantigene erkennen, die durch Gewebeschaden freigesetzt werden (Haas et al., 2010a),(Hofmann et al., 2010). Eine systemische Inhibition von C5, C3a und C1 ist in der myokardialen Ischämie und Reperfusion protektiv (Busche and Stahl, 2010),(Lu et al., 2013); C5aR^{-/-} Mäuse zeigen kleinere Infarktgrößen versus WT nach myokardialem Reperfusionsschaden (De Hoog et al., 2014).

Toll-like Rezeptoren (TLR) stellen das erste, Antigen-unabhängige Verteidigungssystem der angeborenen Immunität dar. Ihre Rezeptorfamilie erkennt molekulare Muster, die mit Pathogenen assoziiert sind und über die Bindung an ihre Liganden die Aktivierung mehrerer Kinasen und des Transkriptionsfaktors NF- κ B induzieren (Zuidema and Zhang, 2010). Die Toll-like Rezeptoren 2 (Frantz et al., 2001), 3, 4 (Frantz et al., 1999) und 6 sind in Kardiomyozyten exprimiert (Frantz et al., 2007a),(Frantz et al., 2009) und eine Aktivierung von inflammatorischen Zellen durch TLR nach einem Myokardinfarkt ist beschrieben. Die Expression von zirkulierendem TLR 2 vermittelt den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden, während die Antagonisierung von TLR 2 5 Minuten vor Reperfusion die Infarktgröße reduziert und die kardiale Funktion und Struktur erhält (Arslan et al., 2010). Kürzlich wurde auch ein Beitrag von TLR 3 zur myokardialen Ischämie-Reperfusion gezeigt: eine TLR 3-Defizienz milderte die durch I/ R induzierte myokardiale NF- κ B-Bindungsaktivität, eine TNF- α und IL-1 β -Produktion und die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen ins Myokard (Lu et al., 2014).

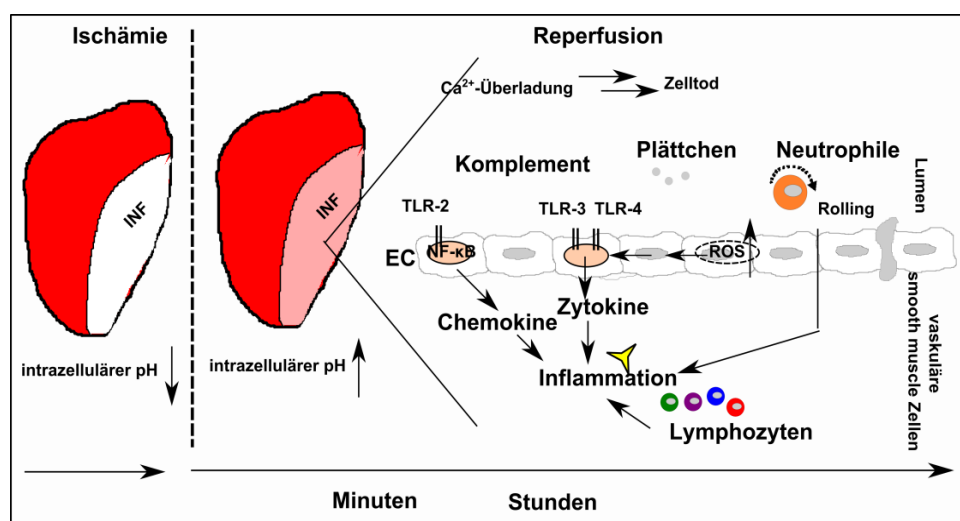


Abbildung 1: Bekannte pathophysiologische Komponenten in der Ischämie-Reperfusion.

Intrinsische und extrinsische Parameter vermitteln den myokardialen Reperfusionsschaden [modifiziert nach Eltzschig und Eckle (Eltzschig and Eckle, 2011), Steffens et al. (Steffens et al., 2009) und Michael et al. (Michael et al., 1995)].

Mechanistisch ist ein Beitrag der „innate“ Immunität zum Reperfusionsschaden bereits gut verstanden. Als Folge des Gewebeschadens werden DAMPs (danger associated

molecular patterns) exprimiert, die das angeborene Immunsystem alarmieren (Timmers et al., 2012). In postischämischen Geweben ist die Erkennung einer hoch konservierten Region in der „nonmuscle myosin heavy chain (Hc) type II (NMHC-II) A und C“ durch zirkulierendes IgM beschrieben, die den Schaden in murinen Modellen von Skelett- oder intestinaler Reperfusion auslöst (Zhang et al., 2006). Die Gruppe um Michael Carroll prägte den Begriff der „angeborenen Autoimmunität“ für den Ischämie-Reperfusionsschaden. Dieses Konzept umfasst sowohl intrinsische als auch extrinsische angeborene Immunantworten (Haas et al., 2010b; Hofmann et al., 2010; Zhang and Carroll, 2007). Es kommt zur Aktivierung von Komplement durch „natürlich auftretende Autoantikörper“ (naturally occurring autoantibody, Nab) gegen Autoantigene (Fleming, 2012), was ebenfalls zum myokardialen Schaden beiträgt (Weisman et al., 1990).

1.2 Adaptive Immunität in der Ischämie-Reperfusion

1.2.1 Die Klasse der T-Lymphozyten

Die vorliegende Arbeit setzt den Fokus auf die erworbene Immunität und beschäftigt sich mit der Bedeutung von T-Lymphozyten für den myokardialen Reperfusionsschaden. Sie beginnt mit der Basalcharakterisierung des immunologischen T-Zell-Profiles nach Ischämie und frühen Zeitpunkten der myokardialen Reperfusion. Die Abstammungslinie der T-Zellen ist in Abbildung 2 dargestellt. T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und besitzen heterodimere Rezeptoren, die mit den Proteinen des CD3-Komplexes assoziiert sind (Janeway, 2002). CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten stellen die beiden Hauptvertreter der T-Lymphozyten dar. Sie exprimieren einen Antigenrezeptor, der $\alpha:\beta$ -Rezeptor genannt wird. $\gamma:\delta$ T-Zellen exprimieren einen ähnlichen, aber strukturell unterschiedlichen Antigenrezeptor. NK T-Zellen hingegen stellen eine kleine Population von T-Lymphozyten dar, die das Oberflächenmolekül NK1.1, das für natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spezifisch ist, tragen. Sie exprimieren $\alpha:\beta$ Antigenrezeptoren, die von somatisch rekombinierten Genen kodiert sind, aber wie $\gamma:\delta$ T-Zellen fehlt ihnen Diversität (Abbas, 2012). NK T-Zellen erkennen Antigene, die vom MHC Klasse-I-ähnlichen Molekül CD1 präsentiert werden (Janeway, 2002).

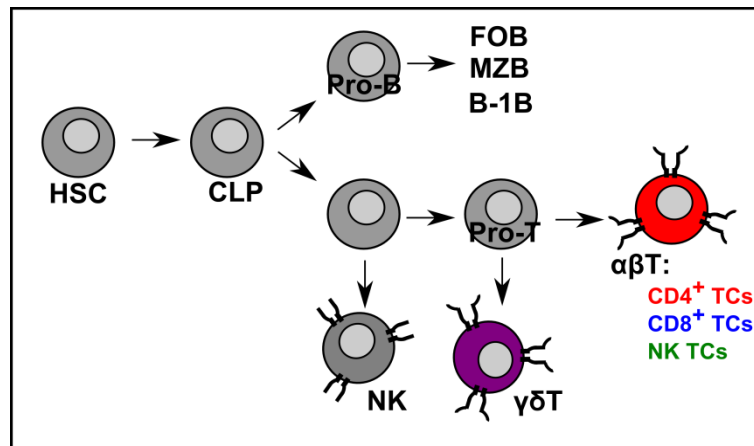


Abbildung 2: Abstammungslinie der T-Zellen.

Hämatopoietische Stammzellen (HSC) bilden „common lymphoid progenitors“ (CLP; Vorläuferzellen), aus denen sich B und T-Zellen, aber auch NK-Zellen bilden können. Während sich aus Pro-B-Zellen folliculäre B-Zellen (FOB), Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und B-1B-Zellen entwickeln können, ist aus Pro-T-Zellen eine Differenzierung zu $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zellen möglich [modifiziert nach Abbas (Abbas, 2012);S.175].

Die Relevanz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in der Ischämie-Reperfusion wurde in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Organen wie Herz (Yang et al., 2006), Hirn (Schroeter et al., 1994; Yilmaz et al., 2006), Leber (Zwacka et al., 1997) und Niere (Ysebaert et al., 2004) untersucht. CD4⁺ T-Zellen werden übereinstimmend überwiegend in Kurzzeit-Reperfusionsmodellen der verschiedenen Organe als schädigend beschrieben. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen wurden bereits als wichtig im Reperfusionsmodell beschrieben. So verbesserte eine Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen den ischämischen Hirnschaden (Shichita et al., 2009). In der renalen Ischämie-Reperfusion spielen $\gamma\delta$ T-Zellen in den ersten 72h eine Mediator-Rolle (Hochegger et al., 2007). Die Bedeutung von natürlichen Killer-T-Zellen in der Ischämie-Reperfusion ist vereinzelt in Arbeiten beschrieben. Lappas et al. zeigen 2006 eine Reduktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens durch Inhibition der CD1-abhängigen Aktivierung von NK T-Zellen (Lappas et al., 2006), im Modell der transienten Okklusion der mittleren cerebralen Arterie (tMCAO) findet sich hingegen kein Effekt in CD1^{-/-} Mäusen (Kleinschnitz et al., 2010). In Bezug auf das Herz finden Homma et al. 2013 eine Protektion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden nach Aktivierung von invarianten natürlichen Killer T-Zellen durch α -Galactosylceramid (Homma et al., 2013). Trotz dieser Vorarbeiten ist gerade in Bezug auf das Herz die Bedeutung und Funktionalität der adaptiven Immunität (Zuidema and

Zhang, 2010) und speziell von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nicht vollständig experimentell gezeigt und der adaptiv vermittelte Reperfusionsschaden ist mechanistisch nicht gänzlich verstanden. Gerade dieser mechanistische Aspekt und antikörpervermittelte Ansätze zur Minimierung des myokardialen Reperfusionsschadens stehen in dieser Arbeit im Mittelpunkt. In vivo stehen zur Aufklärung der Rolle von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Knockout-Modelle zur Verfügung. CD4 KO Mäuse wurden bereits 1991 von Rahemtulla et al. charakterisiert. Demnach kann in CD4 KOs das CD4-Protein nicht auf Oberflächen von Thymozyten oder Lymphknoten-Zellen homozygoter Tiere nachgewiesen werden; die T-Helferzell-Aktivität ist deutlich reduziert. Die Produktion von Interleukin 2 (IL-2) als Antwort auf Alloantigene in homozygoten versus heterozygoten Tieren ist deutlich reduziert, wobei geringe Mengen IL-2 trotzdem noch produziert werden (Rahemtulla et al., 1991); (<http://jaxmice.jax.org/strain/002663.html>).

CD8 KO Tiere haben keine CD8⁺CD4⁻ zytotoxische T-Zellen im Thymus und in den Lymphknoten. Außerdem sind das T-Zell- zu B-Zell-Verhältnis, das CD3⁻ - zu CD3^{low}- zu CD3^{high} - Verhältnis sowie die Funktionalität von CD4⁺ T-Helferzellen im Vergleich zu Wildtyp (WT; +/+) - und heterozygoten (+/-) Tieren normal (Fung-Leung et al., 1991), (<http://jaxmice.jax.org/strain/002665.html>).

1.2.2 Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Zur vollen T-Zell-Aktivierung und Initiierung einer Immunantwort sind klassischer Weise 2 Signale nötig (Bretscher and Cohn, 1970),(Bretscher, 1999),(Baxter and Hodgkin, 2002),(Chitnis and Khoury, 2003),(Hargreaves et al., 2004):

Signal 1 besteht aus der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit Antigen, das über den MHC Klasse II-Komplex (major histocompatibility complex, MHC) auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert wird (Abbildung 3). Innerhalb von Zellen werden Proteinantigene zu Peptiden abgebaut und, stabil an MHC-Moleküle gebunden, an die Zelloberfläche befördert. Peptide, die in Vesikeln entstehen, werden an MHC Klasse II-Moleküle gebunden und von CD4⁺ T-Zellen erkannt (Janeway, 2002). Zur Untersuchung eines Beitrags des T-Zell-Rezeptors eignen sich in vivo u.a. 2 Knockout-Mausmodelle: MHC Klasse II (MHCII) KO Tieren fehlen alle 4 klassischen murinen MHC Klasse II Gene und ungepaarte Ketten (MHC Klasse II Δ/Δ

Mäuse). Sie besitzen einen Mangel an CD4⁺ Lymphozyten im Thymus und in der Peripherie (Madsen et al., 1999), (<http://jaxmice.jax.org/strain/003584.html>) und können somit verwendet werden, um CD4⁺ T-Zell- und gleichzeitig MHC Klasse-II-Molekül-bezogene Fragestellungen zu beantworten. Die OT-II-Maus ist eine transgene Maus mit einem MHC Klasse II-restringierten $\alpha:\beta$ T-Zell-Rezeptor, der für Ovalbumin (OVA-Peptid 323-339) spezifisch ist (Barnden et al., 1998), (<http://jaxmice.jax.org/strain/004194.html>). Sie eignet sich für Studien zur Antigen-abhängigen T-Zellantwort.

Signal 2 erfolgt durch kostimulatorische Signalwege. Als „Kostimulator“ wird laut Definition ein Molekül bezeichnet, das „zusätzlich zum Antigen einen Stimulus oder ein sekundäres Signal zur Verfügung stellt, das für die Aktivierung naiver T-Zellen notwendig ist“ (Abbas, 2012). Für T-Lymphozyten sind die bekanntesten Kostimulatoren die Proteine B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die auf Antigen-präsentierenden Zellen (Dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten) exprimiert werden und an den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf der T-Zelloberfläche binden (Abbas, 2012). In der Abwesenheit kostimulatorischer Signale sterben T-Zellen oder werden *in vitro* anerg; *in vivo* erfolgt keine effektive Immunantwort mehr (Chitnis and Khoury, 2003). Somit stellt auch die Inhibition eines kostimulatorischen Signalwegs eine wichtige Möglichkeit dar, um eine Aktivierung des Immunsystems zu unterbinden.

Aktivierte CD4⁺ T-Zellen exprimieren eine Vielzahl an Proteinen, die das kostimulatorische Signal erhalten oder modifizieren, welches für die klonale Vermehrung und Differenzierung sorgt (Janeway, 2002). Hierzu gehört auch der CD40-Ligand (CD154), der an CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen (Noelle et al., 1992), Monozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen, aber auch Astrozyten, Keratinozyten und Endothelzellen bindet (Chitnis and Khoury, 2003) (Abbildung 3). Die Bindung von CD40L auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen an CD40 auf Endothelzellen führt zu einer Hochregulation von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Murakami et al., 1999),(Yellin et al., 1995). Rezeptor und Ligand sind der Tumornekrosefaktor (TNF) -Familie zugehörig. Nach seiner Ligation mit CD40L wird CD40 aktiviert und tritt in die Zelle ein. Dies führt zur Expression von proinflammatorischen und prothrombotischen Genen wie Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), Interferon- γ (IFN- γ) und TNF- α (Zhang et al., 2013), die auch in der myokardialen Ischämie-Reperfusion von Bedeutung sind (Herskowitz et al., 1995).

Spezielle Zytokine wie IL-2 und IL-15 (Skov et al., 2000) sowie IL-12 (Peng et al., 1998), (Hirohata, 1999) können die Expression von CD40L hochregulieren (Daoussis et al., 2004). CD40L wird transient exprimiert und kann auch als früher Aktivierungsmarker für T-Zellen verwendet werden. Die CD40L mRNA Expression ist bereits eine Stunde nach der T-Zell-Stimulation nachweisbar, auf der Zelloberfläche ist das CD40L Protein innerhalb von drei Stunden exprimiert und ebbt nach 16 Stunden ab (Fuleihan et al., 1994),(Daoussis et al., 2004). Neben der Vermittlung von T-Zell-Aktivierungssignalen wird über den CD40L-CD40-Signalweg auch die T-Zell-Proliferation angeregt (Janeway, 2002).

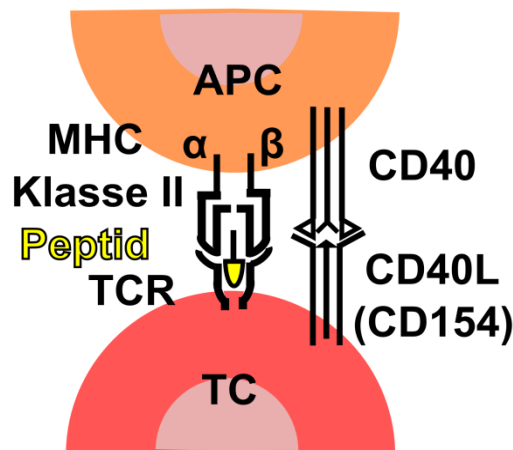


Abbildung 3: Die Signalwege MHC Klasse II und CD40-CD40L.

Im MHC Klasse II-Signalweg interagiert der T-Zell-Rezeptor (TCR) mit Antigen (Peptid), das über den MHC Klasse II-Komplex (major histocompatibility complex; polymorphe α und β -Ketten) auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert wird. CD40L (CD154) auf T-Zellen interagiert mit CD40 auf Antigen-präsentierenden Zellen. Es kommt zur Verstärkung der T-Zellantwort durch Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zelle [modifiziert nach Abbas (Abbas, 2012);S.128;S.209-210].

Neben CD40L eignen sich noch weitere Moleküle auf CD4⁺ T-Zellen auch als frühe Aktivierungsmarker:

Bereits wenige Stunden nach Aktivierung erhöhen T-Zellen ihre Expression des Plasmamembranproteins CD69. Durch die Bindung des Proteins CD69 an den Sphingosin 1-Phosphat-Rezeptor S1PR1 und der Reduktion von dessen Oberflächenexpression kommt es zu einem längeren Aufenthalt von aktivierten T-

Zellen in lymphoiden Organen; es kommt zur Proliferation und Differenzierung in Effektor- und Memory-T-Zellen. Nach der Zellteilung geht die CD69-Expression wieder zurück (Abbas, 2012).

Funktionale IL-2 Rezeptoren werden im Zuge der Aktivierung transient nach Aktivierung auf naiven und Effektor-T-Zellen exprimiert, während regulatorische T-Zellen immer IL-2-Rezeptoren exprimieren. Der IL-2 Rezeptor (IL-2R) besteht aus 3 nicht-kovalent assoziierten Proteinen, CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2/15R β) und CD132 (γ_c). Die Expression des Zytokinrezeptors CD25 befähigt aktivierte T-Zellen, auf das wachstumsfördernde Zytokin IL-2 zu antworten (Abbas, 2012), (Liao et al., 2013).

CD44 ist der Oberflächenrezeptor für das extrazelluläre Matrix-Glykosaminoglykan Hyaluronsäure. CD44-Hyaluronsäure-vermittelte Zell-Adhäsion spielt eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen und Inflammation (Ilangumaran et al., 1999). CD44 kann als zusätzliches Aktivierungsmolekül für T-Lymphozyten agieren.

CD62L (L-Selektin) ist ein Typ-I Transmembran-Zelladhäsionsmolekül. Es wird auf der Oberfläche der meisten zirkulierenden Leukozyten exprimiert (Ivetic, 2013) und ist für das Homing von naiven T-Zellen zu peripheren Lymphknoten verantwortlich (Abbas, 2012). Ein funktionaler Cross-Talk zwischen L-Selektin und dem T-Zell-Rezeptor Komplex wird von Murakawa et al. beschrieben (Murakawa et al., 1992), während Spertini beschreibt, dass eine Stimulation von T-Zellen über CD3 die Bindungsaktivität von L-Selektin erhöht (Spertini et al., 1991), (Wedepohl et al., 2012). Im Rahmen einer Aktivierung von T-Zellen wird CD62L herunter reguliert.

1.2.3 Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen

In Abhängigkeit von Antigen, Kostimulatoren und Zytokinen können sich naive CD4⁺ T-Zellen in Effektor-T-Zellen (T_H1, T_H2, T_H17) oder Foxp3⁺ T-Zellen differenzieren (Abbildung 4). Gerade die Balance zwischen diesen beiden Zellpopulationen ist wichtig zur Kontrolle der adaptiven Immunantwort und der Immuntoleranz.

Effektor-T-Zellen definieren sich v.a. über die Zytokine, die sie produzieren (Abbas, 2012). So findet die Differenzierung in T_H17-Zellen durch TGF- β -Stimulation in

Anwesenheit von IL-6 abhängig von den Transkriptionsfaktoren ROR γ t und STAT3 statt. Die T_H1-Differenzierung erfolgt hauptsächlich durch die Zytokine IFN- γ und IL-12 über Aktivierung der Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT1 und STAT4, während die T_H2-Differenzierung durch IL-4 unter Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6, der zusammen mit Signalen des T-Zell-Rezeptors die Expression von GATA-3 induziert, stimuliert wird (Amsen et al., 2009), (Abbas, 2012), (Abbildung 4). T_H1-Zellen produzieren IFN- γ , T_H2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 und T_H17-Zellen IL-17 und IL-22 (Abbas, 2012).

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead-Box-Protein P3) wurde 2003 als spezifisch für regulatorische T-Zellen identifiziert (Fontenot et al., 2003), (Hori et al., 2003), (Allan et al., 2008) und ist essentiell für die Differenzierung von α : β TCR⁺ T-Zellen zu natürlich vorkommenden („naturally occurring“) regulatorischen T-Zellen (nTreg) im Thymus ist (Sakaguchi et al., 2008). nTreg-Zellen haben immunsuppressive Eigenschaften und machen 5-10% der gesamten peripheren CD4⁺ T-Zellen aus (Dasgupta and Saxena, 2012). Des Weiteren sind Foxp3⁺ induzierbare („inducible“) regulatorische T-Zellen (iTreg) bekannt (Abbildung 4).

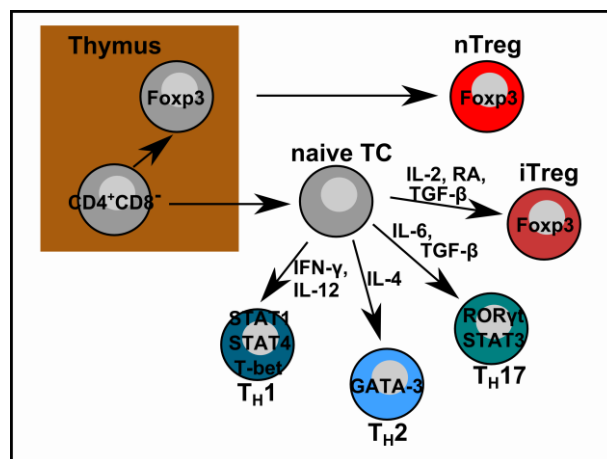


Abbildung 4: CD4⁺ T-Zell-Differenzierung in regulatorische (Treg) Zellen oder Effektor-T-Zellen (Teff).

Abhängig von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren (TF) kann eine Differenzierung von CD4⁺ naiven T-Zellen in Treg-Zellen oder Effektor-Zellen stattfinden. Bei T-bet und STAT1,3,4, GATA-3 und ROR γ t handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die zur Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1, T_H2 oder T_H17-Zellen notwendig sind (TC: T-cell; nTreg: „natural“ Treg; iTreg: „inducible“ Treg; RA: Retinolsäure) [modifiziert nach Sakaguchi und Abbas (Sakaguchi et al., 2008), (Abbas, 2012)].

1.2.4 CD4⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

Regulatorische CD4⁺ T-Zellen (Treg), auch als Suppressorzellen bekannt, da sie die Aktivierung und die Effektorfunktionen anderer, potentiell pathogener Lymphozyten unterdrücken, gelten als wichtige Regulatoren zum Erhalt der peripheren Immuntoleranz, die klassischerweise eine Immunantwort regulieren und einer Autoimmunantwort vorbeugen (Abbildung 5). Sie entstehen durch Erkennung von Selbstantigenen im Thymus („natural occurring“, nTreg) und wahrscheinlich, zu geringerem Anteil, durch Selbstantigenerkennung in peripheren lymphoiden Organen („inducible“, iTreg). Es handelt sich um CD4⁺ Zellen, die zuerst durch ihre konstitutive Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) identifiziert wurden (Sakaguchi et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor Foxp3, der zur Forkhead-Familie gehört, ist essentiell für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen. Mutationen im foxp3 Gen führen in Mäusen zu einer multisystemischen Autoimmunerkrankung und der Abwesenheit von CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Scurfy-Maus) (Brunkow et al., 2001). In Menschen ist ein „Analogon zu Scurfy“ bekannt, das ebenfalls durch Mutationen im FOXP3 Gen verursacht wird und mit einer Defizienz von regulatorischen T-Zellen einhergeht. Es handelt sich um die seltene Autoimmunerkrankung namens IPEX (X-chromosomal vererbtes Syndrom mit Immun-Dysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie) (Bennett et al., 2001).

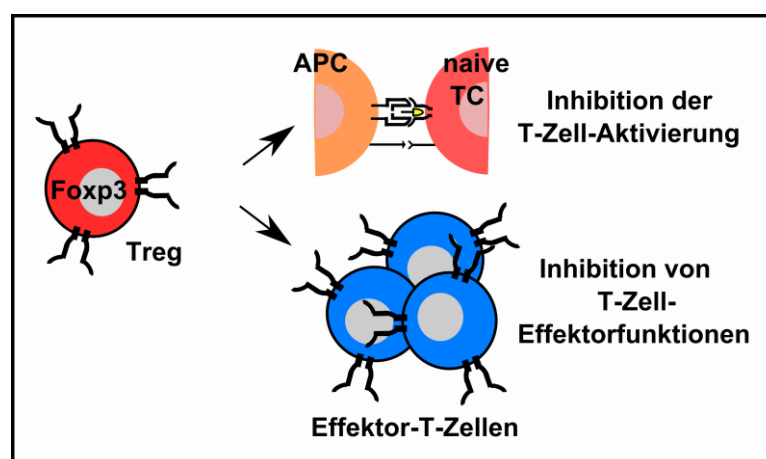


Abbildung 5: Funktionen regulatorischer T-Zellen.

Die Aktivierung und Effektorfunktionen von Lymphozyten werden in peripheren Geweben von regulatorischen T-Zellen supprimiert [modifiziert nach Abbas (Abbas, 2012);S.327].

Ein gutes Mausmodell zur Untersuchung von regulatorischen T-Zellen stellt die von Tim Sparwasser entwickelte DEREK-Maus (DEpletion of REGulatory T cells) dar, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Es handelt sich um eine BAC (bacterial artificial chromosome) transgene Mauslinie. DEREK-Mäuse besitzen ein Diphtherietoxin-Rezeptor-grün-fluoreszierendes Protein-Transgen (DTR-eGFP Transgen; eGFP: enhanced green fluorescent protein) unter Kontrolle eines zusätzlichen foxp3 Promoters. Somit können regulatorische T-Zellen spezifisch durch Applikation von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden (Lahl et al., 2007),(Lahl and Sparwasser, 2011). Diphtherietoxin ist ein Exotoxin aus *Corynebacterium diphtheriae*. In Menschen blockiert es die Proteinsynthese und führt zu Zelltod durch Apoptose. Maus-Zellen jedoch sind natürlicherweise resistent gegenüber Diphtherietoxin (Pappenheimer et al., 1982), da ihnen funktionale Oberflächenrezeptoren für das Toxin fehlen (Naglich et al., 1992).

In der myokardialen Ischämie-Reperfusion wurden regulatorische T-Zellen bisher kaum adressiert. Über ihre Funktion und dahinter stehende Mechanismen ist wenig bekannt. 2013 untersuchen Ke et al. den Effekt einer präventiven Gabe von Rosuvastatin bzw. einer Kombinationsgabe von Rosuvastatin und Mevalonsäure in der myokardialen Ischämie-Reperfusion in Ratten. Sie finden eine Protektion in der Rosuvastatin-behandelten Gruppe, die mit einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen im Myokard einhergeht, woraus auf eine anti-inflammatorische Antwort von regulatorischen T-Zellen geschlossen wird (Ke et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wird erstmals in verschiedenen experimentellen Ansätzen ohne weitere Interventionen wie eine Co-Medikation die Bedeutung und Funktionalität von Treg-Zellen sowie konventionellen T-Zellen für den myokardialen Reperfusionsschaden intensiv untersucht.

1.2.5 Zytokinprofil in der myokardialen Ischämie-Reperfusion

Vorwiegend werden Zytokine von Zellen des Immunsystems (Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen) produziert. Sie können aber auch im Zuge des Reperfusionsschadens von anderen nukleären Zellen im Myokard

exprimiert werden, z.B. von Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Kardiomyozyten (Vincent et al., 2013). Einerseits ermöglicht die Zytokinkaskade dem Myokard nach Ischämie eine schnelle Antwort auf Gewebeschaden, eine verlängerte Zytokinexpression kann aber auch nachteilige Effekte mit sich bringen (Kleinbongard et al., 2010), (Vincent et al., 2013). Im permanenten Myokardinfarkt (15 bis 30 min Ischämie) und der Ischämie-Reperfusion wurde in Vorarbeiten bereits aus dem kardialen Muskelgewebe ein Anstieg der relativen mRNA Expression von Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL) 13, IL-1, IL-2, und Transforming growth factor (TGF) β mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen. IL-6 und IFN- γ wurden kaum detektiert. Mittels mikrovaskulärer Histologie konnten die Proteine IL-1 β und TNF- α nur in den frühen Stunden nach Reperfusion (60 min) im Gewebe nachgewiesen werden (Herskowitz et al., 1995). Das Zytokinprofil von CD4⁺ T-Zellen und deren Subgruppen von regulatorischen und konventionellen T-Zellen wurde jedoch im myokardialen Reperfusionsschaden bisher nicht intensiv adressiert.

Osteopontin (OPN; Gen Spp1; secreted phosphoprotein 1) ist ein stark negativ geladenes, O-glykosyliertes Phosphoprotein, das in einer Vielfalt von Geweben und Zellen synthetisiert wird und in Körperflüssigkeiten sezerniert wird. In Bezug auf das Herz ist bereits bekannt, dass an den Tagen 1 und 2 nach Myokardinfarkt die OPN mRNA erhöht ist, während sie an den Tagen 7 und 14 wieder absinkt (Komatsubara et al., 2003). In übereinstimmenden Veröffentlichungen wurden im Tiermodell erhöhte Osteopontin mRNA- und Protein-Signale an den Tagen 1 und 2 in Makrophagen, die das myokardiale Infarktgebiet infiltrieren, beobachtet (Murry et al., 1994), (Komatsubara et al., 2003). Da OPN als Antwort auf Verletzung und Schaden hochreguliert wird, wird es auch im Kontext kardialer Erkrankungen als möglicher Biomarker diskutiert (Georgiadou et al., 2010), (Waller et al., 2010).

In Bezug auf eine mögliche Rolle von Osteopontin im myokardialen Reperfusionsschaden liegen bisher kaum Erkenntnisse vor. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen einer Osteopontin-Expression und T-Zellen. Osteopontin wurde ursprünglicherweise als Zytokin (Eta-1) identifiziert, das von aktivierten T-Zellen und transformierten Zelllinien produziert wird (Patarca et al., 1993). Rezeptoren für Osteopontin (OPN) schließen bestimmte Integrine und CD44-Varianten und Isoformen ein, welche Zelladhäsion, Migration und Überleben

vermitteln (Wang and Denhardt, 2008). Osteopontin wird von verschiedenen Zelltypen, u.a. auch T-Zellen, exprimiert und wird als T_H1 -Zytokin klassifiziert, weil es Zell-vermittelte Immunität moduliert, indem es die T_H1 Antwort fördert. In $CD4^+$ T-Zellen wird OPN mRNA in T_H1 , nicht in T_H2 polarisierten Zellen exprimiert (Nagai et al., 2001). Lösliches OPN moduliert die Differenzierung und Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (Higuchi et al., 2004) und inhibiert die Produktion des T_H2 -Zytokins IL-10. In vivo lässt sich die Rolle von Osteopontin auch mit Hilfe von Osteopontin KO Mäusen untersuchen. In Mäusen mit einem funktionellen Mangel im Osteopontin-Gen (*Spp1*) ist bisher eine veränderte Wundheilung gezeigt (Liaw et al., 1998).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Pathophysiologie der Ischämie-Reperfusion, vor allem in Hinblick auf metabolische Prozesse, Hypoxie-bedingte Schäden und auf Transkriptionsfaktor-ebene wurde in der Vergangenheit bereits eingehend erforscht (Frantz et al., 2007b),(Eltzschig and Eckle, 2011). Dennoch ist gerade auf der Ebene der Immunität die Bedeutung infiltrierender Entzündungszellen noch unklar. Es ist v.a. zu klären, ob Leukozyten für den Ischämie-Reperfusionsschaden mit verantwortlich sind, oder ob sie ein Epiphänomen im Rahmen der lokalen Entzündung durch den Hypoxie-bedingten Gewebeschaden darstellen. Erst vor Kurzem wurde deutlich, dass auch die adaptive Immunität im Kontext der Ischämie von Bedeutung sein kann (Zwacka et al., 1997),(Ysebaert et al., 2000),(Yokota et al., 2002),(Yang et al., 2006),(Hurn et al., 2007). Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits im Modell des permanenten Myokardinfarktes, dass CD4⁺ T-Zellen positiv zur myokardialen Wundheilung und darauf folgendem Remodelling beitragen (Hofmann et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte nun im Mausmodell der myokardialen Ischämie-Reperfusion und dem damit einhergehenden Reperfusionsschaden eine mögliche Rolle von T-Lymphozyten analysiert werden. Dazu sollten neben Wildttyp-Tieren auch mehrere Knockout-Mäuse zum Einsatz kommen. Folgende Teilaspekte befanden sich im Fokus der Arbeit:

- Verändert die myokardiale Ischämie-Reperfusion die relative T-Zell-Komposition im Herzen? Lässt sich eine von der Reperusionszeit abhängige Kinetik der T-Zellinfiltration beschreiben?
- Spielen T-Zellen für den myokardialen Reperfusionsschaden eine Rolle? Können die Effekte auf eine T-Zell-Subpopulation, möglicherweise regulatorische T-Zellen (Treg), zurückgeführt werden?
- In welchem Aktivierungszustand befinden sich relevante T-Zellen?
- Welche Mechanismen (Antigenerkennung, Zell-Zell-Interaktionen) führen zur T-Zell-Aktivierung im Ischämie-Reperfusionsgeschehen?
- Können potentielle Zielstrukturen auf T-Zellen, z.B. Rezeptoren oder Liganden, als zusätzliche Therapieoption im myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden identifiziert werden?

2 Material

2.1 Chemikalien

Materialbezeichnung	Firma/ Firmensitz bzw. Bezugsquelle
Eingriffe am Tier	
1µm blue fluorescent 365/ 415 microspheres	Invitrogen [®] ; Life technologies [™] , Deutschland
Buprenovet [®] 0,3mg/ ml	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Evans Blue (E2129)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
FBS Fetal Bovine Serum	Gibco [®] by Life Technologies [™]
Flüssiger Stickstoff	-
Isofluran CR [®]	Cp-Pharma, Burgdorf, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Liquemin N 25000	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm [®]	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
2-Propanol getrocknet	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,2µm red fluorescent 580/ 605 microspheres	Invitrogen [®] ,

	Life technologies™, Deutschland
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC; T-8877)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Trockeneis	-
Histologie	
Aceton	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)	Invitrogen®, Oregon, USA
Dodecyltrimethylammoniumchloride (Dotmac)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Formaldehyde, 16% methanol-free, ultra pure EM grade	Polysciences Inc., Warrington, USA
Glycerol for molecular biology	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Mowiol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
TissueTek®	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Zellsortierung	
Anti-PE (Phycoerythrin) MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Benzylpenicillin-Natrium	Infectopharm Arzneimittel, Heppenheim, Deutschland
CD4 Negativ Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH,

Material

	Bergisch Gladbach, Deutschland
Collagenase II (C6885)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Collagenase Type II	Worthington, Lakewood, USA
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco by Life technologies [™] , Deutschland
Fixation Buffer Diluent	eBioscience, San Diego, USA
Fixation Buffer Konzentrat	eBioscience, San Diego, USA
L-Glutamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercapthoethanol	Gibco Invitrogen [®] ; Life technologies [™] , Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco w/ o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, San Diego, USA
Protease XIV, Protease from Streptomyces griseus	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim,

(P5147)	Deutschland
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco® by Life Technologies™
Streptomycin sulfate	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody	BioLegend, London, UK
Trypan Blue Solution 0,4%	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
RNA-Isolation	
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Nuclease Free Water	Ambion®, Life Technologies™
Qubit® Assay Kits für RNA und Protein	Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland
Quant-iT™ Working Solution	Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland
RNA® later Soln.	Ambion®, Life Technologies™
RNeasy Micro Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA-Amplifikation	
ExpressArt mRNA Amplification Kit C&E TRinucleotide mRNA amplification Pico Kit	AmpTec, Hamburg, Deutschland
Umschreiben in cDNA	
AMP-D1, DnaseI, Amplification Grade	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München, Deutschland

RT-PCR	
<i>Alle Sonden wurden über von Applied Biosystems by Life technologies™, Darmstadt, Deutschland bezogen.</i>	
Mm99999915_g1 (GAPDH)	Life technologies™
Mm00436767_m1 (Osteopontin, Spp1)	Life technologies™
Mm00468256_m1 (Endoglin, Eng)	Life technologies™
Mm00438656_m1 (Endothelin 1)	Life technologies™
Mm01283760_m1 (HIF1- α)	Life technologies™
Mm01168134_m1 (IFN γ)	Life technologies™
Mm00446190_m1 (IL-6)	Life technologies™
Mm00434256_m1 (IL-2)	Life technologies™
Mm00439618_m1 (IL-17a)	Life technologies™
Mm00435613_m1 (Placental growth factor, Pgf)	Life technologies™
Mm00476931_m1 (Plasminogen activator, Plat)	Life technologies™
Mm01178820_m1 (TGF- β 1)	Life technologies™
Mm00441818_m1 (Timp-1)	Life technologies™
Mm99999068_m1 (TNF- α)	Life technologies™
Mm00437304_m1 (VEGF α)	Life technologies™
PAMM-011-ZA-2; RT ² Profiler™ PCR Array Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors	Qiagen, Hilden, Deutschland
PAMM-503ZA-2; RT ² Profiler™ PCR Array Mouse T Helper Cell Differentiation	Qiagen, Hilden, Deutschland
PAMM-015ZA-2; RT ² Profiler™ PCR Array Mouse Endothelial Cell Biology	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² SYBR® Green Fluor qPCR Mastermix	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Life technologies™, Bleiswijk, Niederlande
Western Blot, Zymographie	
30% Acrylamide/Bis Solution, 37 5:1	Bio-Rad, München, Deutschland

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
3x Blue Loading Buffer	Cell Signaling, Cambridge, UK
CAPS Buffer Grade	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling, Cambridge, UK
ECL [™] Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Nitrocellulose (Roti-NC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nonfat Dry Milk	Cell Signaling, Cambridge, UK
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Rockford, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Ponceau S Solution 0.1% (w/ v)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Restore [™] Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Roti [®] -Load 1, reduzierend, 4x konz.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (N,N,N,N, Tetramethylethylethylenediamin)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
Trizma Hydrochloride	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland

Material

Triton X-100	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland
TWEEN [®] 20 (Polyoxyethylensorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Bezugsquelle.

2.2 Antikörper

2.2.1 Primärantikörper

Antigen	Klon	Konjugat	Konz.	Firma/ Firmensitz bzw. Bezugsquelle
Annexin V	-	FITC	1: 100 (FC)	BioLegend, London, UK
7AAD	-		1: 100 (FC, Sort)	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
r CD3ε	145-2C11	PE/ Cy7 eFluor 450	1: 100 (FC,IF)	BioLegend, London, UK
r CD3		-	1: 100 (IF)	AbD Serotec, Puchheim, Deutschland
r CD4	GK1.5 RM4-5	A647	1: 100 (FC, Sort, IF)	BioLegend, London, UK
r CD8a	53-6.7	PerCP	1: 100 (FC)	BioLegend, London, UK
r CD11b	M1/ 70	PE	1: 100 (FC)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
r CD25	PC61	PE	1: 100	BioLegend,

			(FC, IF, Sort, MACS)	London, UK
r CD31		A488	1: 100 (FC, Sort)	BioLegend, London, UK
r CD44	IM7	FITC	1: 100 (FC)	BioLegend, London, UK
r CD45	30-F11	FITC	1: 100 (FC,IF)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
		eFluor 450	1: 100 (Sort)	eBioscience, San Diego, USA
r CD45.1	A20	FITC	1: 100 (FC)	BioLegend, London, UK
r CD62L	MEL-14	PE/ Cy7	1: 100 (FC)	eBioscience
h CD154 (CD40L)	MR1	PE	1: 100 (FC)	eBioscience
Foxp-3	FJK-16a	PE/ Cy5 -	1: 50 (FC, IF)	eBioscience, San Diego, USA
r $\gamma\delta$ TCR	GL3	PE	1: 100 (FC)	BioLegend, London, UK
Ki67	SolA15	A647	1: 50 (FC)	eBioscience, San Diego, USA
r NK1.1	PK136	PE	1: 100 (FC)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
m GAPDH			1:100.000 (WB)	Abcam, Cambridge, UK
Griffonia Simplicifolia Lectin I	-	Biotin	1: 100 (IF)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
r Ly6G	1A8	A647	1: 250 (FC,IF)	BioLegend, London, UK

Material

rb Osteopontin	EPR3688	-	1: 5.000 (WB)	Novus Biologicals, Littleton, USA
Phalloidin		atto 488	1: 100 (IF)	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2: Primärantikörper.

Abkürzungen: r: Spezies Ratte; h: Spezies Hamster; m: Spezies Maus; rb: Spezies Kaninchen; A: Alexa Fluor; Konz.: Angabe der Antikörper-Endkonzentration; IF: Immunfluoreszenz, FC: Flow Cytometry, WB: Western Blot; - unkonjugierter Antikörper.

2.2.2 Sekundärantikörper/-reagentien

Bezeichnung	Konjugat	Konz.	Firma/ Firmensitz bzw. Bezugsquelle
anti-rabbit IgG	HRP	1: 5.000 (WB)	Cell Signalling, Cambridge, UK
anti-mouse IgG	HRP	1: 20.000 (WB)	Cell Signalling, Cambridge, UK
donkey anti-rabbit (H+L)	A488	1: 200 (IF)	Invitrogen, Oregon, USA
goat anti-mouse IgG (H+L)	A555	1: 200 (IF)	Invitrogen, Oregon, USA
goat anti-rat IgG (H+L)	A647	1: 200 (IF)	Invitrogen, Oregon, USA
Streptavidin	A555	1: 200 (IF)	Invitrogen, Oregon, USA

Tabelle 3: Sekundärantikörper/-reagentien.

Abkürzungen: A: Alexa Fluor; HRP: Horseradish peroxidase; IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot.

2.2.3 Antikörper und Toxin für Depletions-/ Inhibitionsexperimente

Bezeichnung	Firma/ Firmensitz bzw. Bezugsquelle
Diphtheria Toxin, unnicked, Corynebacterium diphtheriae	Merck, Darmstadt, Deutschland
mCD25; clone:PC-61	BioXCell, West Lebanon, USA
Rat IgG1 Isotype Control	BioXCell, West Lebanon, USA
Hamster anti-mouse CD154 antibody MR-1	BioXCell, West Lebanon, USA
Hamster Polyclonal Isotype	BioXCell, West Lebanon, USA

Tabelle 4: Antikörper für Depletions- und Inhibitionsexperimente.

2.3 Lösungen, Puffer und Gele

Infarktgrößenbestimmung und Mikroperfusion		
10x PBS, pH 7,2-7,4	80,00 g 2,00 g 11,50 g 2,00 g ad 1000,00 ml	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ H ₂ O
Evans` Blue Lösung (5%)	2,50 g 200,00 µl	Evans Blue Liquemin N 25000
TTC-Lösung (2%)	0,20 g ad 10,00 ml	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid PBS
Blaue Mikrosphären-Lösung	100,00 µl 100,00 µl	1µm blaue Mikrosphären 10% Bovine Albumin Serum in NaCl-Lösung

Material

Rote Mikrosphären Lösung	50,00 µl 50,00 µl	0,2µm rote Mikrosphären 10% Bovine Albumin Serum in NaCl-Lösung
Histologie		
DAPI	10mg/ ml 1:1000	Stammlösung in H ₂ O, PBS
Puffer für Formalinlösung	7,40 g 4,10 g ad 900,00 ml	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O H ₂ O
Formalinlösung	33,00ml 10,00ml	Puffer für Formalinlösung Formaldehyd 16%
Mowiol (gemäß der Gebrauchsanweisung der Firma Roth®: www.carlroth.com/catalogue/catalogue.do?favOid=000000080000bee800030023&act=showBookmark&lang=de-de&market=DE)	2,40 g 6,00 g 6,00 ml 12,00 ml	Mowiol+ Glycerol 1h Rühren; RT; →+ H ₂ O auf Magnetprüher 1h mischen; → 0,2M Tris-HCl pH=8,5 zugeben; 2h Inkubation bei 50°C; alle 20 min für 2min auf Magnetprüher mischen; Zentrifugieren bei 5.000g, 20°C; 15min; Überstand mit 2,5% (w/v) DABCO versetzen und bei 37°C lösen; aliquotieren
FACS, Sort		
Verdaupuffer (FACS)	10,00mg 5,00mg ad 100,00ml	Collagenase II (Sigma-Aldrich®) Protease XIV PBS
Verdaupuffer (Sort)	3,00mg/ml	Collagenase II (Worthington) in PBS
Erythrozytenlysepuffer (Erylyse-Puffer)	0,15mM 10,00mM 150,00mM	EDTA NaHCO ₃ NH ₄ Cl

FACS-Puffer	0,10% 0,02%	BSA NaN ₃ in PBS
Antibiotika-Zusatz SC (Streptomycin, Chloramphenicol) (Sort)	100,00ml 100,00ml 140,00ml 24,00ml 5,00ml	FCS nichtessentielle Aminosäuren: Gibco MEM NEAA (100x); Gibco Godium Pyruvate 100mM (100x) 5% L-Glutamin 1g Streptomycinsulfat + 1g Benzylpenicillin-Natrium ad 10ml Wasser 2-Mercapthoethanol
Western Blot		
Blot-Puffer	10,00 mM 10,00 % ad 1000,00ml	CAPS (pH 11) Methanol (v/v) H ₂ O
SDS-Laufpuffer	0,384M 50,00mM 0,10 %	Glycin Tris/HCl (pH 8,6) SDS (w/v)
TBST	150,00 mM 10,00 mM 0,10 %	NaCl Tris/HCl (pH 7,4) Tween-20
Trenngel (15%) (Mengen für 2 Gele)	3,75ml 5,00ml 1,05ml 100,00µl 15,00µl 150,00µl	30% Acrylamid 1,50M Tris/ HCl H ₂ O 10% SDS (w/v) in H ₂ O TEMED 10% APS (w/v) in H ₂ O
Sammelgel (6%) (Mengen für 2 Gele)	1,50ml 2,55ml 5,80ml 100,00µl	30% Acrylamid 0,50M Tris/ HCl (pH 6,8) H ₂ O 10% SDS (w/v) in H ₂ O

	15,00µl	TEMED
	150,00µl	10% APS (w/v) in H ₂ O

Tabelle 5: Lösungen, Puffer und Gele.

2.4 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Firma/ Firmensitz
Alu-Folie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Biosphere [®] Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht; Deutschland
Cutasept [®] F; Haut-Desinfizienz	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
BD Discardit [™] II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
BD Falcon [™] 5ml Polystyrene Round Bottom Tubes; 12 x 75 mm style	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
BD Falcon [™] 5ml Polystyrene Round Bottom Tubes with Cell-Strainer Cap; 12 x 75 mm style	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Blotting Paper sheets	Munktell [®] , Falun, Schweden
Cellstar [®] Tubes; 50ml und 15ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cell Strainer 40µm Nylon	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Cell Strainer 100µm Nylon	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Counting Slides, dual chamber for cell counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Dualfilter ; PCR clean/ sterile	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo [®]	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen sterilisiert mit ETO	Dispomed [®] , Gelnhausen, Deutschland
Eppendorf Tubes 5.0ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Feather Microtome Blade Carbon Steel C35 Type	Feather®
iCycler iQ® PCR-Plates 96 well	Bio-Rad, München, Deutschland
ImmEdge™ Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
MACS® Separation Columns, 25 LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS® Separation Columns, 25 LD Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikropipetten Blaubrand® intraMARK	Brand, Wertheim, Deutschland
Microscope Slides SuperFrost Ultra plus®	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Microseal® `B` Seals	Bio-Rad, München, Deutschland
96-well-Mikrotestplatten V-Boden mit Deckel	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Nunc CryoTube Vials	Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Dänemark
Omnifix®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
0.5ml PCR-Gefäße farblos Life Science	Brand®
PCR Tubes 0.2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylen HR-16 blau monofil	Vömel, Kronberg, Deutschland
Rnase Zap® Wipes	Ambion®, Life technologies™
Roti®-NC (Nitrocellulose)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Silk Black 45cm, Surgical Suture	FSSB Chirurgische Nadeln GmbH, Jestetten, Deutschland
terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
TissueRuptor Disposable probes	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vasofix® Safety 22G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

WILKINSON SWORD classic	Solingen, Deutschland
-------------------------	-----------------------

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.

2.5 Geräte

Gerätebezeichnung	Firma/ Firmensitz
Beatmungspumpe Mini Vent Type 845	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
BD Aria III	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Calibur	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biozero Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Ilseburg, Deutschland
Brutschrank Hero cell 150	Thermo Scientific
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge Vortex Combi Spin 2400	NeoLab, Deutschland
Feinwaage Kern ABS	Kern [®] , Deutschland
Grobwaage Kern 440-33n	Kern [®] , Deutschland
Heizblock TDB-120	BioSan
Heizplatte	Eigenanfertigung Haustechnik
dunkle Histologiekammer	Eigenanfertigung Haustechnik
iCycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Kryostat Leica CM 1850	Leica, Wetzlar, Deutschland
LSR II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Lupenbrille	Eschenbach, Deutschland
Magnetrührer IKA RCT basic	IKA [®] , Staufen im Breisgau, Deutschland
Mastercycler Gradient Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Medizinischer Röntgenfilm SuperRX	Fujifilm Corporation
Mikroskop Leica EZ4HD	Leica, Wetzlar, Deutschland
Millipore [®] Wasseranlage	Millipore [®] , Darmstadt, Deutschland
Mini Protean [®]	Bio-Rad, München, Deutschland

MS 3 basic Vortexer	IKA [®] , Staufen im Breisgau, Deutschland
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer improved	Assistent [®] ; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Operationsmikroskop Carl Zeiss f170	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
pH Elektrode SenTix21	WTW, Deutschland
PowerPac [™] HC	Bio-Rad, München, Deutschland
QuadroMACS [™] Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Qubit 2.0	Invitrogen
Röntgenfilm Entwicklungsmaschine Ecomax [™]	Protec [®] Medical Systems, Oberstenfeld, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
TC 10 [™] automated cell counter	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler Biometra T personal	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tissue Ruptor	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trans-Blot [®]	Bio-Rad, München, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Wacom Bamboo [™] Tablet	Wacom
Western Blot Kassetten	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zeiss Imager.Z1m	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland

Tabelle 7: Geräte.

2.6 Auswertungs-Software und Bildverarbeitung

Name

FlowJo, TreeStar, Ashland, USA

GraphPad Prism 4, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

ImageJ (Version 1.44p)

Inkscape

Adobe® Photoshop 7.0

VGA Planimetrie, Deutschland

ZEN 2011, Zeiss Deutschland

2.7 Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle Experimente wurden männliche Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Im Schnitt wiesen die Tiere ein Gewicht von 20g-25g auf. Die Tiere wurden ihrer Art und ihren Bedürfnissen entsprechend angemessen ernährt, gepflegt und verhaltensgerecht untergebracht. Sie hatten ad libitum Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltung erfolgte unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen (SPF). Die Käfige waren der Größe und dem Endgewicht der Tiere angepasst und ermöglichten artgerechtes Verhalten. Mit Hilfe von Scorings und Belastungstabellen wurde das Befinden der Tiere regelmäßig beurteilt, dokumentiert und gemäß der Richtlinien gehandelt. Bei Versuchen mit Antikörperapplikationen wurden C57BL6/JOlaHsd Mäuse von Harlan Laboratories (An Venray, The Netherlands) verwendet. Alle genetisch veränderten Tiere und die dazugehörigen C57BL/6J Kontrolltiere (Stock 000664) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen (vgl. Tabelle 8) und waren anatomisch und physiologisch unauffällig. Informationen über die Tiere wurden aus den Gesundheitszeugnissen, der zitierten Literatur und über die zitierten Internetseiten der Firma The Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/index.html>) gewonnen. DEREK (Depletion of REGulatory T-cells)-Mäuse wurden von Professor Tim Sparwasser (TWINCORE Hannover) zur Verfügung gestellt. Um transgene Nachkommen zu erzeugen, wurden DEREK-Mäuse mit WT-Mäusen verpaart (heterozygote Zucht); eine homozygote Zucht ist nicht möglich. Alle in dieser Arbeit

enthaltenen Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Unterfranken durchgeführt.

Genetisch veränderte Tiere	Mausstamm	Stock	Kontrolle	Stock
CD4 KO	B6.129S2-Cd4 ^{tm1Mak} / J	002663	C57BL/ 6 J	000664
CD8 KO	B6.129S2-Cd8a ^{tm1Mak} / J	002665	C57BL/ 6 J	000664
OTII	B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/ J	004194	C57BL/ 6 J	000664
OPN KO	B6.129S6(Cg)-Spp1 ^{tm1Blh} / J	004936	C57BL/ 6 J	000664
MHCII KO	B6.129S2-H2 ^{dIAb1-Ea} / J	003584	C57BL/ 6 J	000664
PepBoy (CD45.1)	B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b / BoyJ	002014	C57BL/ 6 J	000664

Tabelle 8: Versuchstiere von „The Jackson Laboratory“.

3 Methoden

3.1 Eingriffe am Tier

3.1.1 Operatives Verfahren der Ischämie-Reperfusion

Durch Verschließen der linken vorderen absteigenden Koronararterie (LAD) wurde eine Ischämie (Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff) induziert. Anschließend wurde das verschlossene Gefäß wieder eröffnet und die Sauerstoffversorgung wieder hergestellt. Diese Methode stellt ein etabliertes Modell für den akuten Myokardinfarkt mit anschließender Reperfusion dar (Michael et al., 1995) und gewährleistet Einblick in systemische Einflüsse auf das Herz.

Die Tiere wurden zunächst mittels Isofluran-Inhalation leicht unter Aufrechterhaltung der Spontanatmung betäubt. Anschließend wurden die Tiere zur weiteren Beatmung unter der für die Operation zu vertiefenden Narkose orotracheal intubiert und mit einem Kleintierbeatmungsgerät beatmet. Die Narkose setzte sich aus etwa 0,8% Isofluran und 100% Sauerstoff zusammen. Das beatmete Tier wurde in Rückenlage an den Extremitäten auf der beheizten Operationsplatte mit Leukosilk befestigt.

Es erfolgte unter tiefer Narkose die linksseitige Thorakotomie. Der Thorax wurde mit Hilfe eines modifizierten Rippenspreizers offen gehalten. Die linke Herzkranzarterie wurde mit einem 6-0 Faden unter Einschluss eines 1cm langen Polyethylenschlauches (PE10) ligiert. Die Ischämiedauer betrug 30 Minuten. Die offene Thoraxwunde wurde in dieser Zeit mit Natriumchlorid-Lösung feucht gehalten. Die beheizbare Operationsplatte gewährte eine physiologische Körpertemperatur des Tieres von 37°C. Nach 30 Minuten wurde der PE10-Schlauch entfernt, was eine einfache Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes möglich machte. Die erfolgreiche Wiederherstellung der Durchblutung konnte visuell durch eine Farbveränderung des vorher weißen ischämischen Bereiches verfolgt werden. Der 6-0 Faden verblieb, unter einem Rippenbogen verwahrt, im Tier, um nach 24-stündiger Reperfusion die Infarktgrößenbestimmung mit der Evans`Blue/ TTC-Färbung zu ermöglichen. Danach wurde der Thorax mit Prolenfäden und die Haut mit Klammern verschlossen. Zur postoperativen Schmerzbehandlung wurden bei allen Tieren präemptiv stark wirksame Analgetika (Buprenorphin) appliziert. Die Anästhesie mit

Isofluran wurde nach dem vollständigen Verschluss der Haut beendet. Die Maus wurde bis zum Einsetzen der Spontanatmung über ein Beatmungsgerät mit Sauerstoff versorgt und extubierte sich nach kurzer Zeit selbst. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde das Tier erneut mit Isofluran betäubt und nach Standardmethoden wurde die Infarktgröße bestimmt (Evans`Blue/ TTC-Färbung) bzw. Organe für die molekularbiologische Aufarbeitung asserviert. Als Kontrollgruppe wurden Tiere scheinoperiert (sham-OP). Hier wurde die Operation analog zum beschriebenen Ischämie-Reperusionsverfahren durchgeführt. Es erfolgte die Thorakotomie, doch die LAD wurde nicht mit einem Faden verschlossen. Das operative Verfahren wurde von Charlotte Dienesch und Barbara Bayer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Frantz durchgeführt.

3.1.2 Infarktgrößenbestimmung mit Evans` Blue/ TTC Färbung

Nach einer Reperusionszeit von 24 h wurden die Tiere erneut inhalativ narkotisiert und auf der Operationsfläche fixiert. Das Tier wurde mit Cutasept[®] desinfiziert und der Thorax unterhalb der Operationsnaht eröffnet. Der operativ eingebrachte Vicrylfaden wurde wieder verschlossen und es wurden 500µl 5% Evans`-Blue-Lösung über die Herzspitze injiziert. Dies führte zu einer blauen Anfärbung der perfundierten Areale des Herzens. Ischämische Areale des Herzens verblieben weiß (area at risk, AAR). Die Größe der AAR wird einerseits durch den anatomisch bedingten Verlauf der Koronargefäße bestimmt, in denen sich die KO-Tiere von den WT unterscheiden können. Andererseits wird dieser Parameter auch durch den Operateur bestimmt, der die Koronararterie abbindet. Durch die langjährige Erfahrung der Operateure ist die area at risk in der Regel nahezu konstant. Als Erfolgskontrolle des Verfahrens wurde die systemische Verteilung der Evans`-Blue-Lösung und die Anfärbung der Extremitäten und aller Organe genutzt. Nun erfolgte, ebenfalls über die Herzspitze, die Injektion von 100µl gesättigter kardioplegischer KCl-Lösung. Es kam zum Herzstillstand durch Hyperkaliämie. Das Herz wurde entnommen, mit 0,9-prozentiger NaCl-Lösung gewaschen und gründlich über die Aorta und die Ventrikel mit NaCl-Lösung durchspült. Bei der nachfolgenden Herzpräparation wurden der rechte Ventrikel und Reste des Vicrylfadens entfernt.

Zum Schutz des Gewebes und als Schneidehilfe wurde das Herz in TissueTek® eingebettet und für eine halbe Stunde bei -20°C gelagert. Nach 30 Minuten wurde das Herz mit Hilfe einer 4-Klingen-Konstruktion in 5 Scheiben gleicher Dicke geschnitten. Bis zur Gegenfärbung mit 2% 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) – Lösung wurden die Schnitte 5 Minuten in NaCl aufbewahrt. Durch 10-minütiges Erwärmen der Herzscheiben bei 37°C in einem Thermomixer nahmen metabolisch aktive Areale des Herzens eine rote Färbung an. Hierbei handelte es sich um eine Reduktionsreaktion des verwendeten 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids zu 1,2,5-Triphenylformazan unter oxidativer Phosphorylierung mitochondrialer Dehydrogenase. Totes Herzgewebe besaß keine Dehydrogenaseaktivität und zeigte sich daher als weißes Areal (Infarktareal, INF). Die Herzschnitte wurden in einer mit Kochsalzlösung befüllten 96-well plate zwischengelagert und bis zur abgeschlossenen Auswertung bei 4°C aufbewahrt. Die Schnitte wurden unmittelbar nach dem Färbeverfahren auf einen Objektträger gelegt, mit Flüssigkeit benetzt, mit einem Deckglas bedeckt und mit einem EZ4 HD Stereo Mikroskop (Leica) von beiden Seiten in 8-facher Vergrößerung fotografiert.

Das blaue Areal zeigt perfundierte Teile des Herzens an, die nicht vom Infarktgeschehen betroffen waren. Nicht-blau-gefärbte Teile des Myokards sind ischämische bzw. Risikobereiche („area at risk“). Noch metabolisch aktives, vitales Gewebe zeigt sich in rot, infarziertes Gewebe in weiß (Abbildung 6).

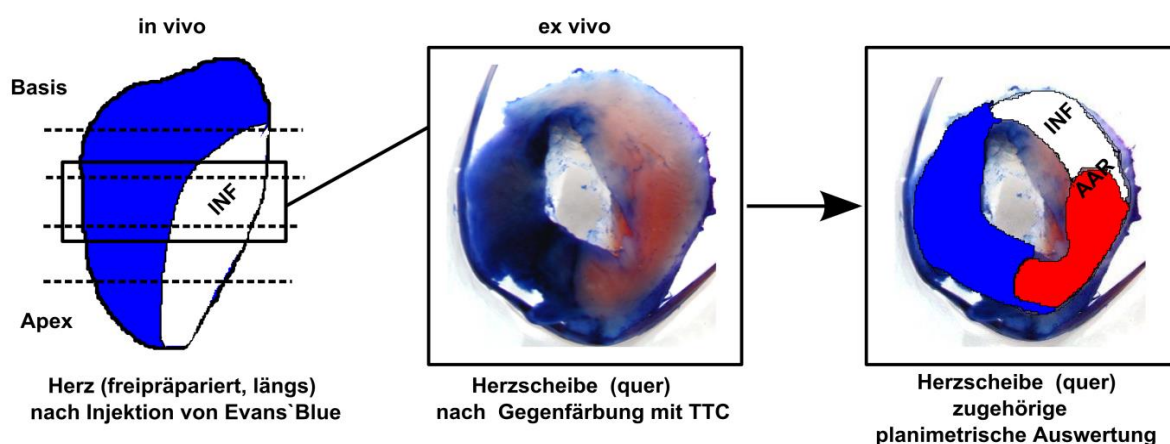


Abbildung 6: Prozedere der Evans' Blue/ TTC-Färbung.

Perfundiertes Gewebe färbt sich blau, infarziertes Areal verbleibt weiß. Metabolisch aktive Bereiche färben sich rot (INF= Infarktareal; AAR= area at risk; Abbildung modifiziert nach Michael (Michael et al., 1995), Adamek 2008 (Adamek)).

Alle Herzschnitte wurden auf einer Feinwaage gewogen. Die Quantifizierung der farbigen Areale erfolgte mittels einer VGA Planimetrie Software und einem Excel-gestützten VGA Planimetrie Report und wurde auf das Gewicht der Herzscheiben normiert. Man erhielt eine Flächenangabe in Pixel, als Variablen wurden der Infarkt in Prozent, die Area at risk in Prozent und der Quotient Infarkt per Area at risk (INF/ AAR) angegeben (Abbildung 7). Um eine bessere Linienführung beim Umfahren der Areale zu erzielen wurde ein Wacom Bamboo Tablet zur Auswertung verwendet.

Herzscheibe	weiße Fläche	rote Fläche	blaue Fläche	Gesamtfläche des Schnitts	Gewicht der Herzscheibe	Infarkt in Gewichts-%	AAR in Gewichts-%	INF/ AAR in Gewichts-%
1A	1006	0	28230	29236,0				
1B	698	390	28495	29583,0				
1	0,0	0,0	1,0	1,0	14,0	2,90%	3,56%	81,48%
2A	2727	12348	18371	33446,0				
2B	3449	3238	32053	38740,0				
2	0,1	0,2	0,7	1,0	33,7	8,53%	31,17%	27,36%
3A	7361	11592	26426	45379,0				
3B	6376	13794	15244	35414,0				
3	0,2	0,3	0,5	1,0	23,9	17,11%	49,36%	34,67%
4A	4190	6976	12312	23478,0				
4B	12660	7406	18951	39017,0				
4	0,3	0,2	0,5	1,0	23,3	25,15%	49,49%	50,81%
5A	1928	14610	8345	24883,0				
5B	6559	0	4399	10958,0				
5	0,3	0,3	0,4	1,0	7,7	33,80%	63,16%	53,52%

Abbildung 7: Exemplarische Auswertung einer Evans` Blue/ TTC-Färbung mit Excel. Das Herz wurde in 5 Scheiben zerschnitten. Die Herzscheiben (nummeriert von 1 bis 5) wurden von beiden Seiten (Vorderseite (A) und Rückseite (B)) fotografiert. Weiße, rote und blaue Flächen wurden planimetrisch vermessen (Einheit Pixel). Alle Scheiben wurden gewogen (Einheit mg).

Die planimetrische Auswertung der Bilder erfolgte doppelblind und wurde von einer zweiten unabhängigen Person (Barbara Bayer) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Frantz genaueausgewertet.

Zur Berechnung des Verhältnisses von Infarkt (INF) zu area at risk (AAR) kommen folgende Formeln zum Einsatz (Frantz et al., 2005),(Adamek et al., 2007),(Blömer et al., 2013):

Infarktgewicht $Wt_{INF} = (A_1 \times Wt_1) + (A_2 \times Wt_2) + (A_3 \times Wt_3) + (A_4 \times Wt_4) + (A_5 \times Wt_5)$

A = die durch Planimetrie bestimmte Fläche des infarzierten Gewebes

Wt = Gewicht (weight)

Wt₁₋₅ = Gewicht jeder einzelnen Herzscheibe

1-5 = Nummer der Herzscheibe; 1= Basis; 5= Spitze

prozentualer Anteil des Infarktgewichts am LV des Herzens = $(Wt_{INF} / Wt_{LV}) \times 100$

LV = linker Ventrikel des Herzens

Wt_{LV} = Gewicht des linken Ventrikels des Herzens

Wt_{INF} = Infarktgewicht

prozentualer Anteil der AAR am LV des Herzens = $(Wt_{LV} - Wt_{\text{blau gefärbter Bereich im LV}}) / Wt_{LV}$

AAR = area at risk

Formel 1: Berechnung des Infarkts zur area at risk.

3.1.3 Myokardialer Mikroperfusionsassay

Zur Bestimmung der Qualität der Reperfusion wurde ein von Dr. Paula Arias aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pelzer (Molekulare Kardiologie, ZEMM, Universitätsklinikum Würzburg) entwickelter Mikroperfusionsassay eingesetzt. Dazu wurden die Mäuse nach 30 Minuten Ischämie und 24h Reperfusion erneut mit Isofluran anästhesiert und auf dem Rücken liegend auf der Operationsfläche befestigt. Das Herz wurde durch einen thorakalen Schnitt und darauf folgender Eröffnung des interkostalen Raumes freigelegt. Ein Volumen von 200µl einer Lösung von 365/ 415 blau fluoreszierenden Mikrosphären (Invitrogen) wurde mit einer Insulinspritze in den Apex des linken Ventrikels injiziert. Da die Ligatur nach der Operation offen im Thorax verblieben war, konnten sich die blauen Mikrosphären ungehindert im Reperfuionsareal verteilen. Nach einer Wartezeit von 1 Minute nach Injektion der blauen Mikrosphären wurde die aus der Ischämie-Reperfuions-Operation stammende Ligatur wieder verschlossen und 100µl einer Lösung von 580/ 605 rot fluoreszierenden Mikrosphären (Invitrogen) wurden in den Apex des linken Ventrikels gespritzt. Durch die geschlossene Ligatur gelangten die roten Mikrosphären nur in das nicht-ischämische Areal des Myokards. 1 Minute später wurde das Herz entnommen und für histologische und molekularbiologische Analysen verwendet (Abbildung 8).

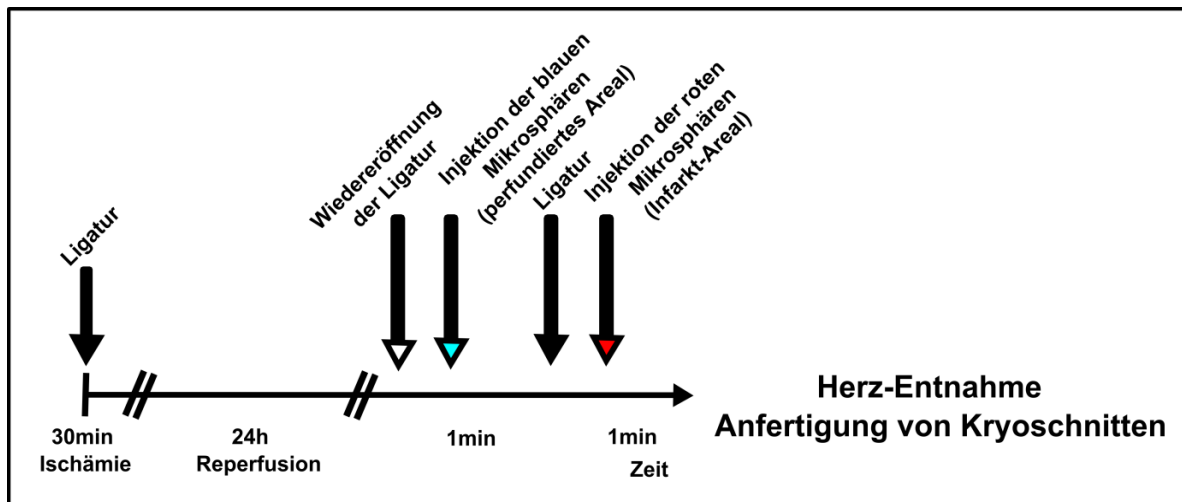


Abbildung 8: Zeitliches Flusschema des myokardialen Mikropertusionsassays.

Zur weiteren histologischen Analyse wurden jeweils 30µm dicke Kryoschnitte (3 Schnitte pro Objektträger) pro Tier angefertigt. Da die Fluoreszenz der Mikrosphären sehr stark war, war keine weitere histologische Gegenfärbung notwendig. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas bedeckt. Die Histologie zeigte die reperfundierten Bereiche (blaue Fluoreszenz) und die nicht-ischämischen Bereiche (rote Fluoreszenz), sowie die „no-reflow“-Bereiche (keine Fluoreszenz) an (Abbildung 9). Blaue Mikrosphären stellen damit ein hilfreiches Mittel dar, um Aussagen über die Qualität der nach Ischämie erfolgten Reperfusion zu treffen. Es wurden in einer 25-fach-Vergrößerung Übersichtsaufnahmen der ganzen Herzscheiben angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen konnte der Myokardbereich ohne rote Mikrosphären planimetrisch (VGA Planimetrie) ausgemessen und semiquantitativ zur Bestimmung des Infarktareals genutzt werden. Auch konnte man bereits in den Übersichtsaufnahmen visuell sehr gut die Qualität der Perfusion an den blauen Mikrosphären einschätzen. Ferner wurden von in einer 200-fach-Vergrößerung pro Tier jeweils 3 Bereiche aus dem Infarktareal, der Border-Zone (Übergangsbereich zwischen Septum und Infarkt) und dem Septum fotografiert. Die Fluoreszenzintensitäten der Einzelaufnahmen im roten und blauen Kanal wurden auf die Autofluoreszenz im Grünkanal normiert und Mittelwerte aus den 3 Aufnahmen pro Tier gebildet. Für alle Aufnahmen in dieser Versuchsreihe wurde ein Mikroskop BIOZERO von Keyence verwendet.

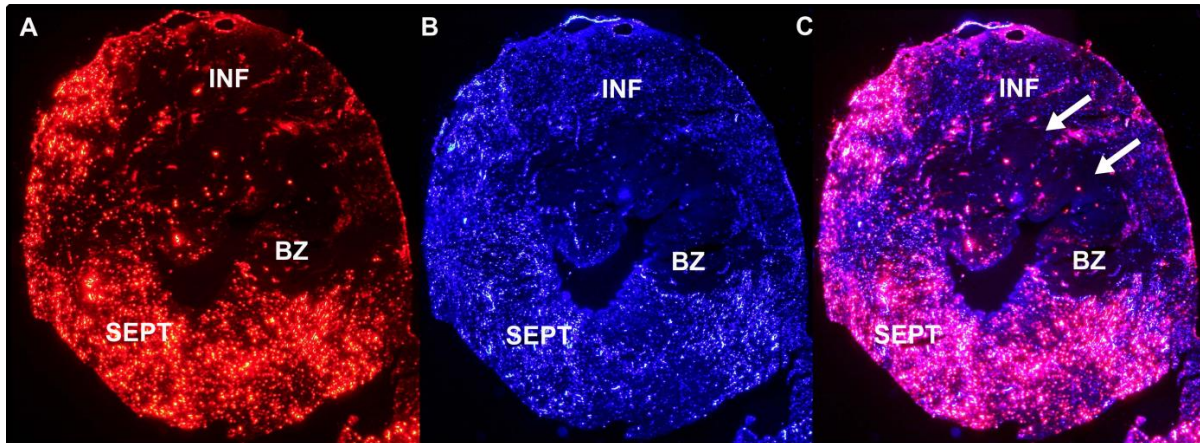


Abbildung 9: Exemplarischer Kryoschnitt im myokardialen Mikroperfusionsassay nach I/R.

A) Ischämische Bereiche des Myokards weisen keine rote Fluoreszenz auf. B) Gut reperfundierte Areale zeigen eine intensive blaue Fluoreszenz. C) In „No-reflow“-Bereichen ist weder rote noch blaue Fluoreszenz vorhanden (weiße Pfeile) [INF: Infarktbereich; BZ: Border zone; SEPT: Septum].

3.1.4 Organentnahmen

Im Rahmen der Organentnahme wurde zuerst sofort das Blut mit einer 1ml Einmalspritze (Dispomed[®]) entnommen und 5 min bei Raumtemperatur gelagert. Zur Gewinnung von Serum wurde das abgenommene Blut dann 10 min bei 5000 U/min bei 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco; Heraeus) und der Überstand abgenommen. Das Herz wurde entnommen, über die Aorta kanüliert und gründlich, auch über die Kammern, blutleer gespült. Anschließend wurde der rechte Ventrikel abgetrennt, der linke und rechte Ventrikel wurden gewogen. Der linke Ventrikel wurde vom Apex aus zur Basis in 4 gleich breite Ringe geschnitten. Die Herzspitze wurde halbiert; beide Hälften enthielten einen repräsentativen Narbenanteil. Eine Hälfte wurde sofort für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff eingefroren, die andere Hälfte wurde über Nacht in RNA^{later} bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag für RNA-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der vom Apex aus folgende Histologiering für Paraffinschnitte wurde über Nacht in gepufferter Formalinlösung aufbewahrt und am nächsten Tag in eine Rotilabo[®] Einbettkassette überführt. In dieser Kassette wurde der Histologiering für 1-7 Tage in einer 1 M KCl-Lösung bei Raumtemperatur konserviert. Vor der weiteren Verarbeitung wurde mit 2x demineralisiertem Wasser gespült. Es folgten die Entwässerung des Gewebes mit Hilfe eines Entwässerungs-

automaten mit absteigender Xylol- und Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin. Der vom Apex aus als nächstes folgende Ring wurde für Immunfluoreszenz verwendet. Der Kryoring wurde mit dem Apex nach unten in Cellstar[®] cell culture dishes in TissueTek[®] eingebettet, auf Trockeneis platziert und mit Isopentan schonend bei -20°C eingefroren. Den letzten Ring stellte die Basis dar. Auch er wurde in 2 Hälften geteilt, wobei die eine Hälfte über Nacht in RNA^{later} bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag für RNA-Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, während die andere Hälfte sofort für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Lunge und Milz wurden ebenfalls entnommen, mit isotonischer Kochsalzlösung von Blutresten befreit, abgetupft, und gewogen. Bis zur weiteren Verwendung zu molekularbiologischen Zwecken wurden alle, mit Ausnahme der zur Paraffinhistologie verwendeten, Gewebe bei -80°C gelagert.

3.1.5 Depletion von regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden gemäß der Protokolle von Lahl und Sparwasser (Lahl et al., 2007),(Lahl and Sparwasser, 2011) aus DEREK-Mäusen durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von 1µg Diphtherietoxin (DT) an den Tagen -4, -3 und -1 vor Ischämie-Reperfusion depletiert. Auch die WT-Wurfgeschwister erhielten als Kontrolle die gleichen Dosen an DT. Um zu überprüfen, ob das DT selbst toxische Effekte mit sich bringt bzw. sich auf den Gesundheitszustand der Tiere auswirkt, wurde neben der sorgfältigen klinischen Beobachtung das Gewicht der Tiere vor der ersten DT-Gabe und an jedem darauffolgenden Tag bis zum Versuchsende kontrolliert. Alle Tiere waren in ihrem Überleben und Gesundheitsstatus gegenüber unbehandelten WT-Tieren nicht beeinträchtigt.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden regulatorische T-Zellen aus WT-Tieren (Harlan) durch Applikation von 500µg i.p. eines monoklonalen anti-CD25-Antikörpers (Klon PC-61) an den Tagen -7 und -3 vor Ischämie-Reperfusion depletiert. Analog wurden als Kontrolle 500µg eines Rat IgG1 Isotype-Antikörpers gespritzt.

3.1.6 Adoptiver Zelltransfer

Im Rahmen der immunologischen „rescue“ Experimente wurden CD4⁺ T-Zellen von WT-Spendermäusen 24h vor Durchführung der Ischämie-Reperfusion in CD4 KO – Empfängermäuse transferiert. Dazu wurden im Rahmen der Organentnahme aus WT-Tieren (Harlan) Milzen und axiläre, mediastinale, mesenteriale und inguinale Lymphknoten entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Mit Hilfe einer MACS-Aufreinigung wurden zuerst nach Angaben des Herstellers durch negative Isolation CD4⁺ T-Zellen gewonnen, in einem zweiten Schritt wurden daraus durch positive Selektion CD25⁺ regulatorische und CD25⁻ konventionelle T-Zellen gewonnen. In einem ersten Experiment wurden CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) versus CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen (Tconv) in CD4 KO-Empfängertiere transferiert. Als Kontrollexperiment wurden in einem zweiten Durchgang Bulk-CD4⁺ T-Zellen versus CD4⁺CD25⁻ konventionelle T-Zellen in CD4 KO-Empfängertiere transferiert. Für die Transfers wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 80:20 für Tconv:Treg angesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 100µl. Die Injektion der Zellen erfolgte i.v. über die Vena femoralis 24h vor Ischämie-Reperfusion (Tag -1). An Tag 0 wurden die Tiere operiert (30 min Ischämie, 24h reperfusion). 24 h später erfolgten die Infarktgrößenbestimmungen durch Evans`Blue/ TTC-Färbung oder Sorting-Experimente aus Herz-drainierenden mediastinalen Lymphknoten (Abbildung 10).

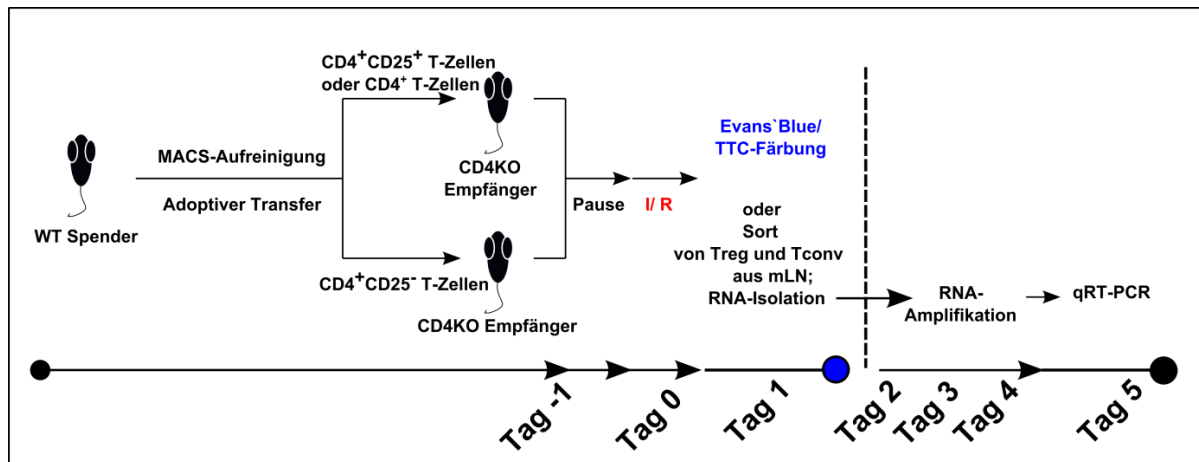


Abbildung 10: Adoptiver Zelltransfer.

24 h vor der Ischämie-Reperfusion werden CD4⁺CD25⁺ oder Bulk-CD4⁺ T-Zellen versus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in physiologischem Verhältnis aus WT-Spendertieren in CD4 KO-Empfängertiere transferiert. Nach 24-stündiger Reperfusion erfolgt die Infarktgrößenbestimmung über Evans`Blue/ TTC-Färbung oder der Sort von Treg und Tconv aus mLN mit anschließender RNA-Isolation, -Amplifikation und qRT-PCR.

3.1.7 Applikation blockierender Antikörper

CD154 (CD40L)-inhibierender Antikörper wurden retroorbital (r.o.) mit Reperfusion in WT-Mäuse (Harlan) injiziert. Die Kontrollgruppen erhielten analog die entsprechenden Isotyp-Kontrollen (Tabelle 9).

Antikörper	Dosis pro [g] Maus	Zeitpunkt der Applikation
Hamster anti-mouse CD154 (MR-1)	0,025mg/g	bei Reperfusion
Hamster Polyclonal Isotype Control	0,025mg/g	bei Reperfusion

Tabelle 9: Applikation blockierender Antikörper.

3.2 Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten

Immunfluoreszenz wurde eingesetzt, um CD3⁺ (Gesamt-)T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und regulatorische T-Zellen im Gewebe sichtbar zu machen und Aussagen über ihre

Lokalisation zu Lektin⁺ Gefäßen und Phalloidin-markierten Kardiomyozyten zu treffen.

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryoschnitten wurden Schnittdicken von 5µm angefertigt. Dazu wurde das Kryotom Leica CM1850 verwendet. Die Schnitte wurden auf Microscope Slides SuperFrost Ultra plus[®] aufgezogen. Die luftgetrockneten Schnitte wurden zu Beginn 3 min mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde 4% Formaldehyd für 10 min verwendet. Die Permeabilisation erfolgte mit 0,5% Dodecyltrimethylammoniumchlorid (Nakamura, 2001) in PBS (Dotmac; 10 min). Um unspezifische Fc-Bindungen zu vermeiden, wurde mit 5% Normal Goat Serum in PBS geblockt. Wurden in einer Färbung mehrere Primär- und Sekundärantikörper verwendet, wurden diese jeweils gemeinsam auf die Schnitte aufgebracht. Der aus der Ratte stammende unkonjugierte CD3-Antikörper (Serotec; 1:100) wurde mit goat anti-rat IgG-Alexa 647 (Invitrogen; 1:200) detektiert, ebenso wie der Ratte-CD4-Antikörper (Klon GK1.5, BioLegend; 1:100). Dieser war bereits mit Alexa 647 konjugiert und wurde zur Signalverstärkung nachgelabelt. Biotinyliertes Griffonia Simplicifolia Lectin I (Vector; 1:100) wurde mit Streptavidin-Alexa 555 (Invitrogen; 1:200) detektiert. Die Antikörper wurden in 5% Normal Goat Serum verdünnt. Die Schnitte wurden jeweils 30 min mit den Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Phalloidin-Atto 488 (Sigma) wurde gemeinsam mit den Sekundärantikörpern auf die Schnitte gegeben. Zuletzt wurden die Schnitte für 3 min mit DAPI (1:1000) inkubiert, um Zellkerne zu detektieren. Für die intrazelluläre Foxp3-Färbung wurde zusätzlich vor dem Blocking-Schritt eine Inkubation mit Methanol für 10 min durchgeführt. Der unkonjugierte purified anti-mouse/ rat Foxp3-Antikörper (eBioscience) wurde 1:50 eingesetzt und ebenfalls mit goat anti-rat IgG-Alexa 647 detektiert. Nach jedem einzelnen Färbeschritt wurden die Schnitte für 3 min mit PBS gewaschen. Alle Färbeschritte erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Präparate wurden mit Mowiol eingebettet und mit 24x60mm Deckgläsern verschlossen. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder erfolgte mit einem AxioImager.Z1 Epifluoreszenz-Mikroskop mit einem 20x und 40x-Objektiv und einer AxioCamMRm-Kamera (Carl Zeiss). Um einen repräsentativen Eindruck über die Zellverteilung im Schnitt zu bekommen, wurden pro Tier 3 Gefrierschnitte gefärbt, aufgenommen und bewertet. Zur weiteren Verarbeitung der Bilder wurde die ZEN Software (2011, Zeiss) verwendet.

3.3 Immunologische Methodik

3.3.1 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Ein Durchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter, FACS) wird verwendet, um Zellen nachzuweisen, zu sortieren und zu zählen. Der Begriff „FACS“ ist eine durch den Gerätehersteller BD (Becton Dickinson) geschützte Handelsmarke, wird aber im Sprachgebrauch generell für Fluoreszenz-basierte Zellsortierungen verwendet. Die Methode wurde erstmals in den 1960er Jahren entwickelt (Fulwyler, 1965),(Hulett et al., 1969).

Im FACS wandern die Zellen, aufgelöst in einem größeren Volumen Salzlösung, in einem Strom durch einen Laserstrahl. Durch die Lichtstreuung können bereits im FSC (forward scatter) die Zellen nach ihrer Größe und im SSC (side scatter) bezüglich ihrer Granularität beurteilt werden. Granulozyten mit einer rauen Oberfläche und einer Vielzahl von Vesikeln streuen z.B. mehr Licht als T-Zellen. Die Zellen werden durch monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenproteine [Proteine der CD-Klassifizierung; (Cluster of differentiation)] identifiziert, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Bei der Passage eines Laserstrahls wird bei markierten Zellen eine Fluoreszenz angeregt, die Informationen über die Expression von Oberflächenproteinen liefert (Janeway, 2002) (Abbildung 11). Durchflusszytometrische Messungen eignen sich sehr gut, um eine große Anzahl von Zellpopulationen mit bestimmten Eigenschaften aus Einzelzellsuspensionen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (>1000 Zellen/sec) genau zu analysieren. So wurden in der vorliegenden Arbeit z.B. 4 T-Zellsubpopulationen mit Hilfe von 6 fluoreszenzmarkierten Antikörpern gleichzeitig analysiert. Ferner ist bei großen Zellzahlen eine Quantifizierung möglich, da das emittierte Licht proportional zur Antigendichte ist (Aghaeepour et al., 2013). Im Zellsorter werden zusätzlich zur Identifizierung und Zellzählung gewünschte Populationen in Auffanggefäße (z.B. Falcons, Eppis) sortiert. Dazu wird eine elektrische Ladung erzeugt, die zur Zellvereinzlung und Ablenkung geladener Tröpfchen aus der Hauptrichtung des Flüssigkeitsstromes führt (Janeway, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten überwiegend zweidimensional dargestellt, wobei die Fluoreszenzen zweier Antikörper gegeneinander aufgetragen sind (Dot Plot).

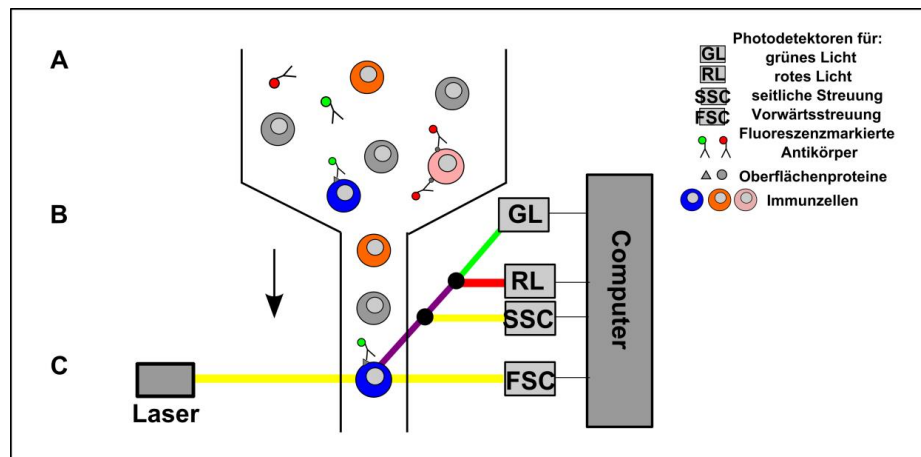


Abbildung 11: Prinzip der Durchflusszytometrie.

Bei der Durchflusszytometrie (FACS) werden Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen extra- oder intrazelluläre Antigene detektiert. A) Die aus Einzelzellsuspensionen stammenden markierten Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt. B) Sie wandern einzeln in einem Strom an einem Laser vorbei. C) Photomultiplier messen die Lichtstreuung (scatter) und Fluoreszenzemission der unterschiedlichen Farbstoffe. Die Daten werden an einen Computer geleitet und analysiert [(modifiziert nach Janeway (Janeway, 2002); S.682)].

3.3.1.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen für FACS

Einzelzellsuspensionen aus Herzgewebe

Die Maus wurde sachgerecht narkotisiert und das Herz entnommen. Mit Hilfe einer BD Discardit™ II 5ml-Spritze wurde das Herz über die Aorta und über die Kammern sehr gut mit Verdauerpuffer gespült. Dabei nahm das Herz einen blässeren Farbton an. Der rechte Ventrikel wurde entfernt, das Infarktgebiet herausgeschnitten und für spätere semiquantitative FACS-Angaben gewogen. Das Gewebe wurde in RPMI in ein Cellstrainer® cell culture dish, das bereits mit einem Nylon-Sieb mit 40µm Maschenweite (BD Falcon™) bestückt war, überführt und mit einer Schere vorverkleinert. Dieser Arbeitsschritt verhinderte Gewebeverlust durch Umfüllen. Nun erfolgte der Gewebeverdau durch 30-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂) mit einem Verdauerpuffer aus Collagenase aus Clostridium histolyticum (Sigma) und Protease aus Streptomyces griseus (Sigma) in RPMI. Das Gewebe

wurde dann mit einem Spritzenstempel das Nylon-Sieb mit 40µm Maschenweite gerieben. Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Einzelzellsuspensionen aus Lymphoiden Organen und Blut

Milz und Lymphknoten wurden entnommen, in ein mit RPMI gefülltes Schälchen mit einem 40µm Sieb (BD Falcon™ cell strainer) überführt und durchgerieben. Die Suspension wurde in ein 15ml Falcon (BD) überführt und 10 min bei 500G zentrifugiert. Zur Lyse von Erythrozyten wurden im Falle der Milz nun für 2 min 2ml Erylyse-Puffer auf das Pellet gegeben und gut resuspendiert. Die Lyse-Reaktion wurde mit PBS abgestoppt, die Suspension erneut 10 min bei 500G zentrifugiert, um anschließend mit der FACS Färbung beginnen zu können. Die Zellsuspensionen wurden stets auf Eis gelagert. Für die Blutverarbeitung wurde bei Raumtemperatur gearbeitet. Es wurde mit heparinisiertem retroorbital gewonnenem Vollblut gearbeitet. Die Kapillaren zur Blutentnahme waren mit Heparin benetzt; auch in die Eppis zur Blutaufbewahrung wurden 5µl Heparin vorgelegt. Für die Erythrozytenlyse und spätere FACS-Färbung wurden 50µl Blut verwendet. Die Inkubation mit Erylyse-Puffer dauerte hier 10min.

3.3.1.2 Durchführung der FACS-Färbungen

Herz und lymphoide Organe

Mittels einer Neubauer Zählkammer und dem polyanionischen Diazofarbstoff Trypanblau wurde die Zellzahl in 1 ml der Suspension bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine Vitalfärbung, bei der tote Zellen durch Trypanblau dunkelblau angefärbt werden. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran hingegen nehmen den sauren Farbstoff nicht auf und zeigen sich im Lichtmikroskop in weiß. Für semiquantitative FACS-Analysen war eine Zellzahl von 1×10^6 notwendig. Nach erneuter Zentrifugation wurde die entsprechende Zellzahl in eine 96-well V Bodenplatte überführt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 3 Minuten bei 500G), unspezifische Fc-Bindungsstellen wurden mit TruStain fcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody (1:100 in FACS-Puffer) geblockt. Für die Oberflächenfärbung wurde nach 15-minütiger Inkubation auf Eis der spezifische Antikörper-Cocktail (25µl pro well) in

doppelter Konzentration zugegeben. Es folgte die erneute Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Zellen wurden erneut mit FACS-Puffer gewaschen und für die Messung in FACS-Puffer (Endvolumen 300µl) in 5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes (BD) überführt.

Für eine intrazelluläre Färbung wurde nach erfolgter Oberflächenfärbung (analog der obigen Beschreibung) mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100µl FixPerm resuspendiert (1:4 Fixation/ Permeabilization Concentrate in Fixation/ Permeabilization Diluent; eBioscience) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in FixPerm inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit Permeabilisierungspuffer (1:10 Permeabilization Buffer in Aqua ad iniectionabilia Braun), auch die intrazellulären Antikörper wurden in Permeabilisierungspuffer angesetzt. Das Pellet wurde in 25µl Antikörper-(Cocktail) in einfacher Konzentration für 15 Minuten inkubiert und anschließend zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde danach in FACS-Puffer (Endvolumen 300µl) aufgenommen und in 5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes (BD) überführt.

Blut

Die Blutfärbungen erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll. Hier erfolgte kein Blocking-Schritt; sowohl bei dem eingesetzten Blutvolumen als auch bei dem verwendeten Antikörpervolumen handelte es sich um 50µl. Die Inkubationszeiten mit FixPerm wurden auf 45 Minuten erweitert.

Alle Proben wurden je nach Fragestellung an einem FACS Calibur Durchflusszytometer (BD) oder einem Multi-Laser Durchflusszytometer LSR II (BD) gemessen. Die Auswertung der FACS Plots erfolgte mit Hilfe von FlowJo.

3.3.1.3 Sort

Zum Sorten von Endothelzellen und CD4⁺ T-Zellen aus dem ischämischen und reperfundierten Teil des Myokards wurde analog zum FACS-Protokoll gearbeitet. Die Herzen wurden auf einer Glasplatte mit Hilfe einer extradünnen Rasierklinge (Wilkinson) zerkleinert. Das Herzgewebe wurde mit 3 mg/ml Collagenase Type 2, 360 u/mg (Worthington) in RPMI Medium für 35min bei 37°C im Brutschrank (5%

CO₂) verdaut. Pro Narbe wurde mit einem Volumen von 3ml Verdaupuffer gearbeitet. Anschließend erfolgten analog zur FACS-Färbung das Durchreiben durch das Nylon Siebchen und die Zentrifugation bei 500G. Anstatt mit 40µm Nylon Siebchen (BD) wurde zum Sorten von Endothelzellen mit 100µm Siebchen gearbeitet. Die Reaktion wurde mit 12 ml BSS/ BSA abgestoppt. Die Proben wurden in RPMI mit 5% FCS und Antibiotika-Zusatz (Streptomycin, Chloramphenicol) geblockt und gefärbt. Vor dem Sort wurden die Proben in 5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes mit Cell-Strainer Cap filtriert. Die Zellen wurden mit freundlicher Unterstützung von Christian Linden (Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg) an einem FACS Aria III-Sorter isoliert.

3.3.2 MACS

Die MACS (magnetic cell separation) -Aufreinigungen wurden mit einem QuadroMACS™ Separator (Miltenyi) durchgeführt. Einzelzellsuspensionen lymphoider Organe wurden wie oben beschrieben hergestellt. Zellzahlen wurden mit Trypanblau ermittelt. CD4⁺ T-Zellen wurden mit Hilfe des CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, mouse (Miltenyi) genau nach Angaben des Herstellers negativ isoliert. Die Reinheit betrug mindestens 80%. Ein Vorteil der Negativisolation ist, dass die Zielzellen nicht durch Fluoreszenzmarkierung verändert werden. Die CD4⁺ Fraktion wurde weiter verwendet, um CD25⁺ und CD25⁻ über positive Selektion zu gewinnen. Dazu wurden die Zellen mit anti-CD25PE-Antikörper (Klon PC 61; 10µl für 10⁷ Zellen) inkubiert. Markierte Zellen wurden dann mit Hilfe des Anti-PE-MicroBead Kits (Miltenyi) gewonnen. Dies geschah ebenfalls genau nach den Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung von CD4 Zellen kamen LD MACS® Separation Columns zum Einsatz, bei der weiteren Aufreinigung von CD25 Zellen LS MACS® Separation Columns (Miltenyi).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Quantitative RT-PCR

Bei der quantitativen real time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wird die RNA in DNA konvertiert und durch eine klassische Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) amplifiziert. Gemessen wird die Anzahl an PCR-Zyklen, die notwendig ist, um ein gegebenes RNA-Transkript zu amplifizieren, welches direkt mit dem Expressionslevel korreliert (Meister, 2011). Die Akkumulation des PCR-Produkts wird mit Hilfe eines fluoreszierenden Reportermoleküls, einer TaqMan[®]-Sonde oder des Farbstoffs SYBR[®] Green, gemessen. Proportional zum steigenden Amplifikationsprodukt steigt auch die Fluoreszenz, die vom Fluorophor emittiert wird (Introduction to Gene Expression, Getting Started Guide; Applied Biosystems by life technologies[™]; <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-probe-based-gene-expression-analysis.html>).

3.4.1.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA aus Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits von Qiagen (Cat.-No.: 74104) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die 24h bei 4°C in RNA^{later} solution aufbewahrten und mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Proben (ca. 20mg pro Probe) zuerst mit Hilfe eines stark denaturierenden Guanidin-Thiocyanat enthaltenden RTL-Puffers (600µl) mit dem TissueRuptor lysiert und homogenisiert (13.000 U/min; 2min). Dabei wurden Rnase inaktiviert. 500µl des klaren Überstands wurden in ein neues Eppendorf cap überführt und mit demselben Volumen 70 %-igem Ethanol versetzt, um passende Bindungsbedingungen auf der Säule zu erzeugen. Von dem Gemisch wurden 700µl auf eine RNeasy Mini spin Silica-Säule mit Collector Tube gegeben und 15sec bei 10.000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, das Eppendorf cap wiederverwendet und 700µl RW1 Puffer, der ebenfalls Guanidin Thiocyanat enthielt, auf die Säule gegeben und 15sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Derselbe Vorgang wurde zweimal mit RPE Waschpuffer wiederholt. Die Säule wurde vorsichtig aus dem Eppendorf cap genommen, um kein Ethanol zu verschleppen, auf ein neues 2ml Eppendorf safe-lock tube gegeben und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule

wurde erneut auf ein 2ml Tube umgesetzt und 1min bei 13.000 rpm zentrifugiert. RNA wurde mit 40µl Rnase freiem Wasser eluiert. Die RNA Konzentration wurde anschließend mit Qubit Fluorometer bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels eines Agilent 2100 Bioanalyzers bestimmt.

Zur Isolation von RNA aus gesorteten Zellen wurde das RNeasy[®] Micro Kit (50) von Qiagen (Cat.-No.: 74004) verwendet. Die Zellen wurden dazu direkt in 2M DTT-haltigen RLT-Puffer gesortet und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.4.1.2 RNA-Amplifikation

Nach der Isolation von RNA aus gesorteten Zellen musste diese zuerst amplifiziert werden, um für qRT-PCR-Arrays eingesetzt werden zu können, da die Ausbeute an Gesamt-RNA aus den Zellen niedriger als 1ng war. Dazu wurde das ExpressArt mRNA Amplification Kit C&E Trinucleotide mRNA amplification Pico Kit (#6399-A15, AmpTec) genau nach den Angaben der Herstellers verwendet. Besonders wichtig für eine Amplifikation mit diesem Kit ist die Abwesenheit von freier genomischer DNA, da die Methode auch sensitiv für kontaminierende DNA-Fragmente ist. Amplifiziert werden bevorzugt mRNAs mit Selektion gegen rRNAs. In drei Amplifikationsrunden folgen jeweils 5 Schritte aufeinander: Einzelstrang cDNA-Synthese, Template DNA-Synthese, Säulenaufreinigung der Template DNA, Amplifikation via in vitro Transkription, aRNA-Säulenaufreinigung. Der Erfolg der Amplifikation wurde durch Mitführen einer Positivkontrolle (Gesamt-RNA; 100 ng/µl) gewährleistet. Der Gehalt an RNA wurde nach der zweiten und dritten Amplifikationsrunde durch Messungen am Nanodrop bestimmt.

3.4.1.3 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus isolierter RNA wurde zuerst ein Dnase Verdau mit AMP-D1 (Sigma) durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Lösung (bis zu einer maximalen Konzentration von 1µg) mit Puffer und Dnase versetzt und mit Wasser aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion

abgestoppt und 10 min bei 70°C inkubiert. cDNA wurde mit iScript (Bio-Rad) synthetisiert. Dazu wurden 11µl Dnase-Lösung, 4µl Puffer, 1µl reverse Transkriptase und 4µl Wasser eingesetzt. Die PCR (Polymerasekettenreaktion) zum Umschreiben von RNA in cDNA wurde im Thermocycler Biometra nach folgendem Gradienten gefahren: 25°C (5 min); 42°C (30 min); 85°C (5 min); 4°C (hold). Anschließend wurden die Proben bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.1.4 TaqMan®-Assay basierte qRT-PCR

Die hergestellte cDNA wurde vor der weiteren Verwendung 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde der Master Mix hergestellt. Es wurde mit einem Probenvolumen von 25µl gearbeitet.

25,00 µl Ansatz:

12,50 µl	TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)
1,25 µl	ABI Sondenmix
6,25 µl	H ₂ O
5,00 µl	cDNA

Anschließend wurden die 96-well iCycler iQ® PCR-Plates pipettiert und mit Microseal® `B` Seals verschlossen. Von allen Proben wurden Dreifach-Bestimmungen angesetzt, ebenso von den Leerwerten für alle Gene. Alle Sonden waren FAM-markiert. Die RT-PCR wurde mit Hilfe des iCyclers (BioRad) durchgeführt. Bei Verwendung der TaqMan® Technologie kam folgendes Temperaturprofil zum Einsatz (Tabelle 10):

Parameter	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
UNG-Verdau	50°C	2 min	-
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	-
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing, Elongation	60°C	1 min	
Kühlphase	15°C	hold	-

Tabelle 10: Gerätebedingungen einer qRT-PCR.

Alle Zielgene wurden auf das Housekeeping Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normiert. Die erhobenen Daten wurden Excel-gestützt ausgewertet.

3.4.1.5 Kommerzielle qRT-PCR Arrays

Um bei bestimmten Fragestellungen zur Zytokinexpression im infarzierten Herzgewebe (PAMM-011-ZA-2), zur T-Zell-Differenzierung (PAMM-503ZA-2) oder Endothelzellbiologie (PAMM-015ZA-2) ein breit angelegtes Screening zu ermöglichen, kamen auch kommerzielle RT² ProfilerTM PCR Arrays der Firma Qiagen zum Einsatz. So konnte pro Array die Expression von 84 Genen gleichzeitig überprüft werden. Die Durchführung der Arrays erfolgte gemäß dem Handbuch der Firma Qiagen. Die cDNA wurde mit Hilfe des RT² First Strand Kits (Qiagen) synthetisiert. Die Detektion lief über SYBR Green (Qiagen). Auch waren die iCycler-Konditionen verkürzt. So erfolgte ein Hot Start mit Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C (10 min), gefolgt von 40 Zyklen aus Denaturierung (95°C; 15 sec), Annealing und Elongation (60°C; 1 min). Zur Analyse der erhobenen Daten wurde bei kommerziell erworbenen RT² Profiler PCR Arrays der Firma Qiagen die web-basierte RT² Profiler PCR Array-Analyse-Software der Firma verwendet.

3.4.2 SDS-Page und Western Blot

Prinzip Tankblotting (Bittner et al., 1980),(Lottspeich, 2006):

Bei der SDS-Page (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine durch Erhitzen auf 90°C denaturiert und mit dem Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) beladen. Das SDS ist im 4x Lämmli-Puffer enthalten. Durch die Beladung mit SDS erhalten alle Proteine eine gleichmäßige negative Ladung und stoßen sich gegenseitig voneinander ab. Zusätzlich reduziert im Puffer enthaltenes β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken in den Proteinen. Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine werden zerstört. Das Trennprinzip dieser Methode ist somit das Molekulargewicht (Wolfgramm, 2005). Größere Moleküle werden bei Ihrer Wanderung durch das Gel stärker gebremst als kleinere. Als Elektrophorese-Träger kommen Polyacrylamidgele zum Einsatz, die aus Acrylsäureamid-Bisacrylamid als Quervernetzer hergestellt werden. Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient als Radikalstarter, Ammoniumperoxydisulfat (APS) als Radikal-Bildner. An das Gelsystem wird eine Spannung angelegt. Die negativen Teilchen wandern zur Anode. In der vorliegenden Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-Page verwendet (Lottspeich, 2006); die Proteine wurden zuerst durch ihre Wanderung durch ein Sammelgel mit pH 6,8 aufkonzentriert und anschließend durch ein Trenngel mit pH 8,6 aufgetrennt. Die genauen Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel sind im Materialteil (Tabelle 5: Lösungen, Puffer und Gele) beschrieben. Im Western Blot werden die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mittels Primär- und Sekundärantikörpern detektiert.

Durchführung:

Zur Herstellung eines Herzlysats wurden ca. 20mg gefrorenes Narbengewebe in Eppi überführt, 200 μ l Cell Lysis Buffer (1:10 verdünnt in Wasser) mit 100mM PMSF in Ethanol (1:100) zugegeben und mit einem Tissue Ruptor zerkleinert. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Qubit Fluorometer. Die gewünschte Konzentration an Proteinlysats wurde mit 4x Lämmli Puffer bei 95°C im Heizblock aufgeköcht. Für die SDS-Page wurde ein Mini Protean[®] Gelsystem (BioRad) mit 1.00mm Gelen verwendet.

Die experimentelle Durchführung der SDS-Page mit anschließendem Blotten erfolgte nach dem von Dr. Benjamin Vogel (AG Frantz) optimierten Vorgehen (Vogel). Zuerst wurde das Trenngel bis knapp unter den Rand der Glasplatten des Gelsystems gegossen und langsam mit Aqua dest. überschichtet. Sobald das Trenngel fest war, wurde das Wasser vorsichtig abgegossen, das Sammelgel hinzugegeben und ein feiner Kamm mit 10 Taschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Gele in das Gelsystem eingebaut und SDS-Laufpuffer in die Kammern gegossen. Die Taschen wurden mit Hilfe von Gelloader Tips mit 30µl Probenvolumen befüllt. 10µl Page Ruler wurden als Ladder aufgetragen. Um Fehler zu vermeiden, wurde das Beladungsschema bereits vor Versuchsbeginn schriftlich festgelegt. Der Deckel wurde auf die Kammern aufgesetzt und über den PowerPacTM HC eine konstante Spannung von 120V angelegt. Nach ca. 2-3 h war die Elektrophorese beendet.

Nun folgte der Western Blot mit Hilfe des Trans-Blot[®]-Systems (BioRad). Es handelte sich um die Wetblot-Methode. Bereits während der Laufzeit der SDS-Page wurde der Blotpuffer frisch angesetzt (1L für einen Transfer) und bis zur Benutzung bei -20°C im Kühlraum aufbewahrt. Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden in Gelgröße zugeschnitten und ebenso wie die Schwämme für 10 min in Blot-Puffer eingelegt. Am Ende der SDS-Page wurde das Mini Protean[®] Gelsystem auseinandergelöst, das Sammelgel wurde vom Trenngel mit einem Skalpell abgelöst. Auch das Trenngel wurde im Blot-Puffer eingelegt. Nun wurde das Trans-Blot[®]-System in der angegebenen Reihenfolge nach dem „Sandwich-Prinzip“ von unten nach oben aufgebaut: schwarze Seite des Beladungsträgers nach unten, grober Schwamm (fiber pad), Whatman-Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Whatman-Filterpapier, grober Schwamm, durchsichtige Seite des Beladungsträgers. Um Blasen zwischen dem Gel und der Nitrocellulosemembran zu vermeiden, wurde vorsichtig durch Rollen eines Falcons auf dem Gel die Luft entfernt (Vogel). Das Gel-Paket wurde zusammen mit einem Coolpack in die Blotvorrichtung eingesetzt, Blot-Puffer eingefüllt, der Deckel aufgesetzt und der Transfer 1h bei 50V und 180 mA auf Eis durchgeführt.

Nach dem Blotten wurde die Membran in eine Küvette überführt und gut mit Aqua dest. gespült, um Salze zu entfernen. Anschließend wurde bis zur Rot-Färbung der Banden mit Ponceau S Solution 0.1% (w/ v) inkubiert und wiederum mit Aqua dest. gewaschen. Nun waren die aufgetrennten Proteine sichtbar. Die Membran wurde in

einer Klarsichtfolie eingescannt. Die Membran wurde 3x 5 min mit TBST (16g NaCl, 40ml Tris/ HCl, 2ml Tween 20 ad 2000ml H₂O) gewaschen. Geblockt wurde die Membran mit 5% Nutri Dry Milk in TBST 1h bei Raumtemperatur (RT). Die Membran wurde mit dem Primärantikörper bei RT für 1h inkubiert. Der Primärantikörper für Osteopontin wurde 1:5000 in 5% Milch eingesetzt. Die Membran wurde 3x 5 min mit 1x TBST gewaschen und anschließend bei RT für 30 min mit Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper anti-rabbit IgG-HRP wurde ebenfalls 1:5000 in 5% Milch eingesetzt. Erneut wurde kurz mit TBST gespült und 3x 5 min mit TBST gewaschen. Die Membran wurde 2 min lang unter Pipettieren mit 2ml ECL (Enhanced Chemilumineszenz)-Reagenz benetzt, danach zügig in einer Klarsichtfolie verpackt und die Banden wurden in der Dunkelkammer per Röntgenfilm mit einer Entwicklungsmaschine EcomaxTM detektiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte über ImageJ.

Um einen Western Blot mehrmals verwenden zu können und verschiedene Antigene aus den gleichen Proben nachweisen zu können, wurde die Nitrocellulose-Membran 30 min mit einem RestoreTM Western Blot Stripping Buffer im Brutschrank inkubiert, mit demineralisiertem Wasser gewaschen und 30 min bei RT unter Schwenken auf dem Schüttler mit 10 % Milch in TBST abgesättigt. Nun war eine Inkubation mit neuen Primär- und Sekundärantikörpern möglich. mGAPDH wurde 1:100.000 und anti-mouse HRP 1:20.000 in Milch verdünnt eingesetzt.

3.5 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM; standard error of the mean) angegeben. Statistische Berechnungen wurden mit dem Student'schen T-Test durchgeführt, wenn ein Parameter in zwei unabhängigen Vergleichsgruppen analysiert wurde. Auch wurde die Varianzanalyse (analysis of variance; ANOVA) verwendet. So kam der one-way ANOVA zum Einsatz, wenn Vergleiche eines Parameters zwischen mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden sollten. Sollten zur Erklärung der Zielvariablen zwei Parameter herangezogen werden, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit post hoc Bonferroni Test angewandt. Unterschiede zwischen Messgrößen wurden als signifikant bezeichnet, wenn die Wahrscheinlichkeit p für den Fehler 1. Art kleiner 5 % war ($p < 0,05$) (Bultmann, 2012). Ein Fehler 1. Art (α -Fehler) liegt vor, wenn eine Arbeitshypothese fälschlicherweise abgelehnt wird (Müller, 2013). Zur statistischen Analyse und Erstellung von Graphen wurde die Software Graph Pad Prism 4 verwendet (* $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

4 Ergebnisse

4.1 Akkumulation von T-Zellen im Myokard nach Ischämie-Reperfusion

Zuerst wurde mittels Immunfluoreszenz (IF) in Wildtyp-Tieren (WT) überprüft, ob die experimentelle myokardiale Ischämie-Reperfusion versus Scheinoperation (sham) die Frequenz an T Zellen im Herzen verändert. Zur Detektion von Leukozyten wurde ein anti-Ratte CD45 Antikörper verwendet, für Gesamt-T-Zellen kam ein Antikörper gegen CD3 zum Einsatz, der mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen assoziiert ist. Im ischämischen und reperfundierten Areal des Myokards waren mehr CD45⁺ und CD3⁺ Zellen nachweisbar als im scheinoperierten Myokard (Abbildung 12).

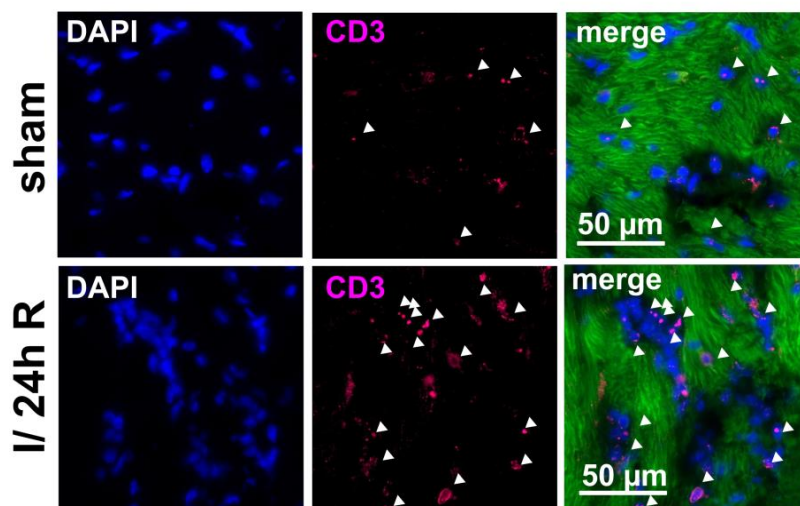


Abbildung 12: Immunfluoreszenz von CD3⁺ T-Zellen im Herzen. Nach Ischämie-Reperfusion waren histologisch deutlich mehr CD3⁺ Zellen im betroffenen Myokard nachweisbar als im Myokard von sham-operierten Tieren. CD3⁺ T-Zellen sind in pink dargestellt, Kerne in blau (DAPI), grün ist die Autofluoreszenz der Kardiomyozyten (20x Vergrößerung).

Um die histologischen Erkenntnisse zu quantifizieren, wurden durchflusszytometrische Messungen (FACS) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die absoluten Zellzahlen an CD45⁺ Leukozyten und CD45⁺CD3⁺ T Zellen 24h nach Induktion des Reperfusionsschadens signifikant anstiegen (sham versus I/ R: CD45⁺: 8,1±1,8

versus $14,5 \pm 1,5 \cdot 10^5$ Zellen absolut; $p=0,03$; $CD45^+CD3^+$: $8,1 \pm 2,6$ versus $88,4 \pm 21,0 \cdot 10^3$ Zellen absolut; $p=0,02$; [$n=7$]; Abbildung 13).

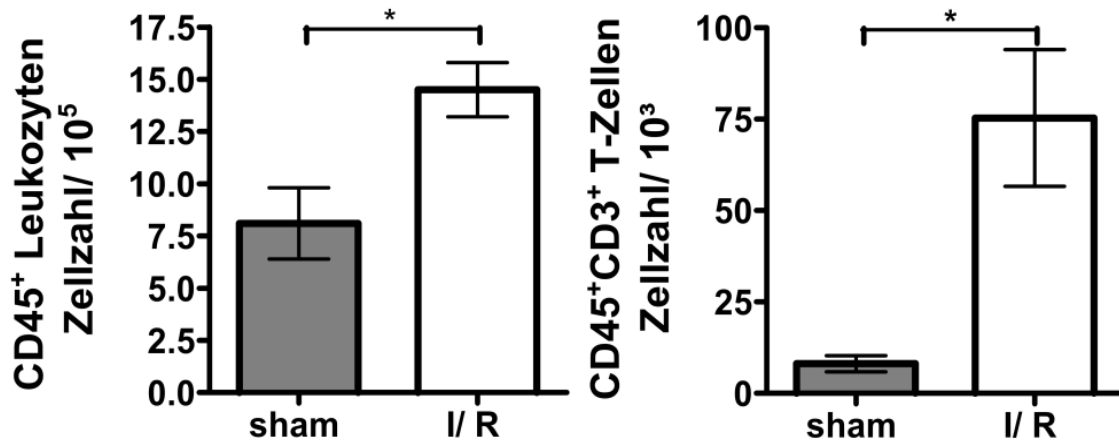


Abbildung 13: Quantifizierung von CD45⁺ und CD3⁺ Zellen im Herzen. Absolute Zellzahlen zeigten eine signifikante Zunahme an A) CD45⁺ Leukozyten und B) CD3⁺ T-Zellen nach 30 Minuten Ischämie und 24h Reperfusion (T-Test).

Um den Beitrag von T-Zellen zum Reperfusionsschaden besser zu verstehen, wurde mit Hilfe von FACS im Anschluss eine Kinetik der myokardialen Infiltration von T-Zellen und deren Subpopulationen erstellt. Dazu wurde stets eine 30-minütige Ischämie induziert, als Reperfusionsdauer wurden die Zeitpunkte 3h, 6h, 18h und 24h gewählt. Als Kontrolle wurden sham-operierte Tiere mitgeführt. Untersucht wurden CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK 1.1⁺ T-Zellen sowie $\gamma:\delta$ T-Zellen.

Abbildung 14 zeigt die Gating-Strategie zur Bestimmung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subset-Frequenzen aus dem Herzen nach Operation (I/R). Analog dazu wurden auch NK T-Zellen und $\gamma:\delta$ T-Zellen gegeneinander aufgetragen. Die Gating-Strategie zur Analyse lymphoider Organe und Blut begann stets mit dem Vorgaten auf das live-Gate.

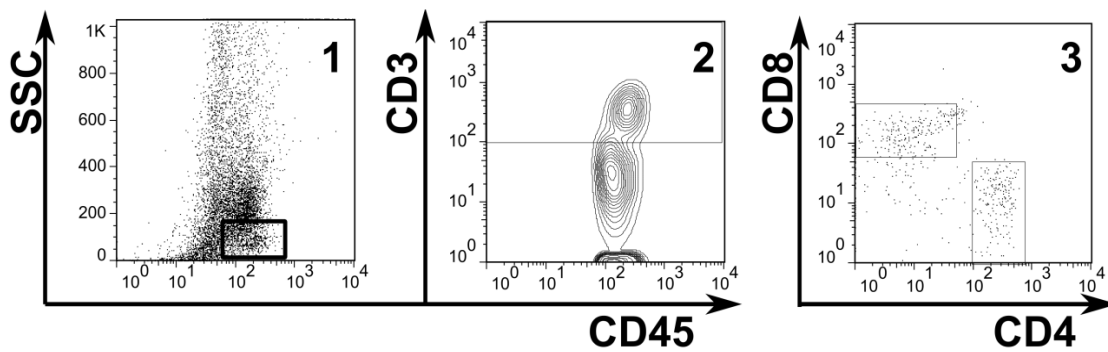


Abbildung 14: Gating-Strategie von T-Zell-Subpopulationen aus dem Herz.

Um T-Zell-Subpopulationen zu charakterisieren, wurde auf CD45⁺ Leukozyten vorgegated (Plot 1). Daraus wurden CD3⁺ T-Zellen detektiert (Plot 2). Abschließend konnten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Plot 3).

Interessanterweise zeigte sich, dass die relative Zusammensetzung der T-Zell-Subpopulationen nahezu konstant über die Reperfusionzeit (3h, 6h, 18h, 24h) war. NK1.1⁺ NK T-Zellen und $\gamma:\delta$ T-Zellen stellten die Minderheit dar, während CD4⁺ zu allen Zeitpunkten zwischen 35 und 45% und CD8⁺ T-Zellen zwischen 24 und 30% der CD3⁺ T-Zellen ausmachten. Abbildung 15 veranschaulicht die prozentuale Zusammensetzung von T-Zell-Subpopulationen im Zeitverlauf von 3h, 6h, 18h und 24h Reperfusionsdauer nach 30-minütiger Ischämie (24h: CD4⁺ T-Zellen: 44,2±1,2%; CD8⁺ T-Zellen: 24,2±2,5%; NK T-Zellen: 12,8±0,7%; $\gamma:\delta$ T-Zellen: 6,3±0,4%; [n=3 pro Zeitpunkt]) versus Scheinoperation.

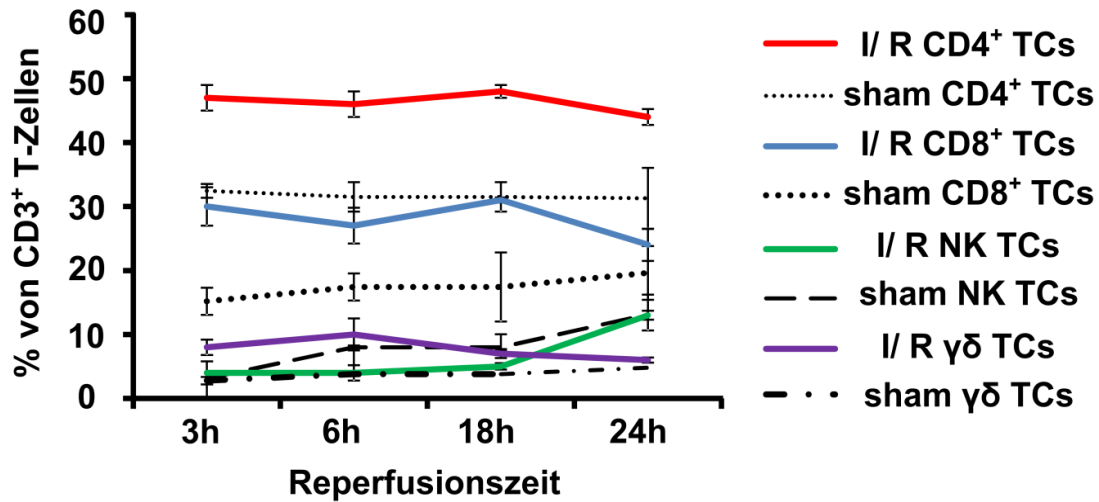


Abbildung 15: Reperusionsabhängige Kinetik der T-Zell-Infiltration ins Herz nach 30 min Ischämie.

Trotz unterschiedlicher Reperusionsdauern von 3h bis 24h war die relative T-Zell-Subset Komposition über die Zeit hinweg nahezu unverändert.

Zusätzlich sollte die Lokalisation von CD4⁺ T-Zellen im ischämisch-reperfundierten Herzgewebe weiter aufgeklärt werden. Dazu wurde eine Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten angefertigt. Viele CD4⁺ T-Zellen zeigten eine Kolo-kalisation zu Kardiomyozyten (47,3%) und Endothelzellen (32,7%), ein kleiner Anteil lag aber auch frei im Gewebe vor (Abbildung 16).

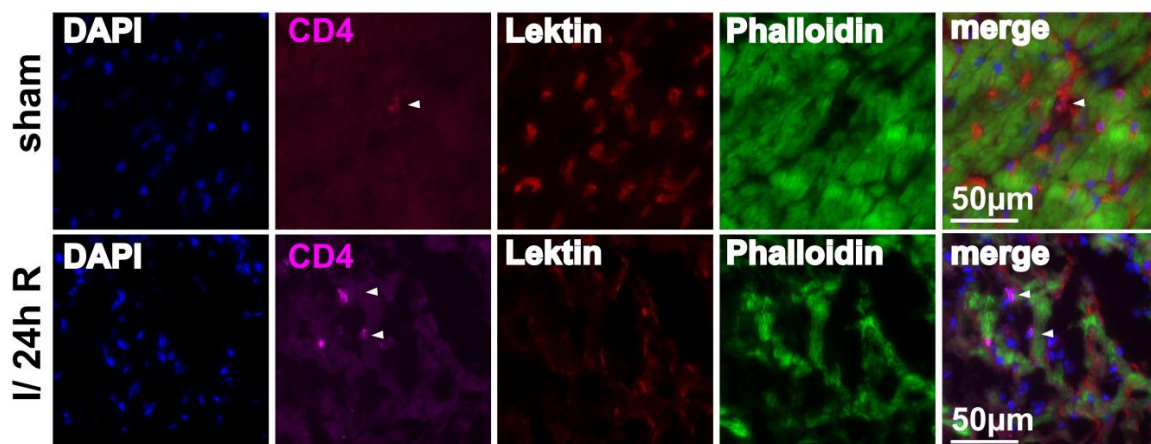


Abbildung 16: Immunfluoreszenz von CD4⁺ T-Zellen im Herzen.

Der Hauptanteil von CD4⁺ T-Zellen befand sich entweder in direkter Nähe zu Kardiomyozyten oder zu Endothelzellen. CD4⁺ sind in pink dargestellt. Zur Detektion von *bona fide* Endothelzellen wurde Lektin (rot) eingesetzt, für Kardiomyozyten Phalloidin (grün). Zellkerne sind in blau dargestellt (40x Vergrößerung).

Zusätzlich wurde auch die Subpopulation der regulatorischen T-Zellen in der Immunfluoreszenz untersucht. Es waren insgesamt sehr wenige Foxp3⁺ T-Zellen im Myokard nachweisbar, und zwar nur nach Ischämie-Reperfusion (Abbildung 17), während in sham-Herzen keine regulatorischen T-Zellen gefunden wurden.

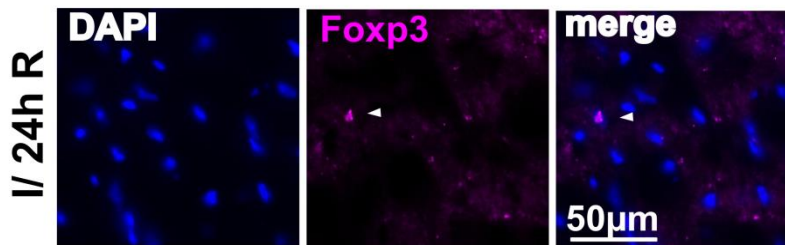


Abbildung 17: Immunfluoreszenz von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Herzen. Im Myokard waren nach Ischämie-Reperfusion vereinzelt Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen (pink) nachweisbar (DAPI: blau; 40x Vergrößerung).

Nach myokardialer Ischämie und Reperfusion konnte im Narbengewebe ein signifikanter Anstieg an Leukozyten und deren Subpopulation an CD3⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. CD4⁺ T-Zellen bildeten den Hauptanteil der infiltrierenden CD3⁺ T-Zellen; nach Infarkt waren vereinzelt regulatorische T-Zellen im Myokard nachweisbar.

4.2 Aktivierungsstatus von T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion

In den folgenden Experimenten lag der Schwerpunkt auf den beiden als Hauptpopulationen identifizierten Subtypen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Um die Relevanz der Zellen im Zusammenhang mit dem myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden zu bestärken, wurde der Aktivierungsstatus der beiden Zelltypen überprüft. Aufgrund der geringen Zelldichte im Herzen war ein Nachweis in der Durchflusszytometrie schwierig und hätte enorme Tierzahlen gefordert. Deshalb wurde die Analyse des Aktivierungsstatus aus Herz-drainierenden mediastinalen Lymphknoten und dem Blut ischämie-reperfundierter versus scheinoperierter Wildtyp-Tiere durchgeführt. Dazu wurden die Aktivierungsmarker CD69, CD25, CD44, CD62L und CD154 verwendet.

4.2.1 Aktivierungsstatus von T-Zellen aus mediastinalen Lymphknoten nach Ischämie-Reperfusion

Zuerst wurde die Expression des Markers CD69 nach 3h und 24h Reperfusion auf $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen aus Herz-drainierenden mediastinalen Lymphknoten versus scheinoperierten Tieren untersucht. Es zeigte sich innerhalb der ersten Stunden der Reperfusion eine Zunahme der Frequenzen von $CD69^+ CD4^+$ T-Zellen ($p > 0,05$; Abbildung 18A). Ein ähnliches Bild ergab sich bei regulatorischen T-Zellen. Interessanterweise zeigte sich nach 24h Reperfusion auch ein Anstieg an $CD69^+$ konventionellen T-Zellen versus sham (n.s., [n=3]; Abbildung 18B).

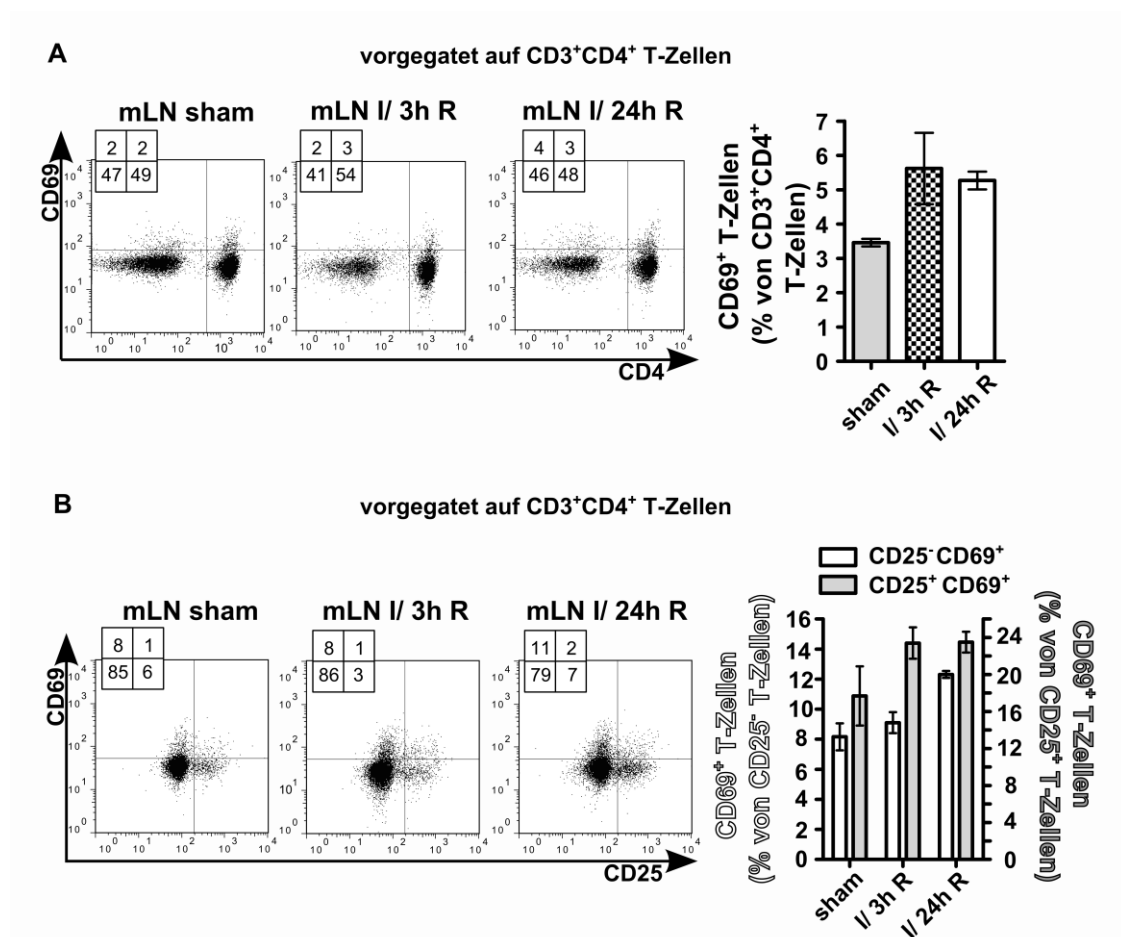


Abbildung 18: CD69-Expression auf $CD4^+$ T(reg) mLN-Zellen.

In den frühen Reperfusionstufen (3h, 24h) zeigte sich bereits ein moderater Anstieg der Frequenzen an A) $CD4^+CD69^+$ und B) $CD4^+CD25^+CD69^+$ T-Zellen (graue Balken, rechte y-Achse) sowie $CD4^+CD25^-CD69^+$ T-Zellen (weiße Balken, linke y-Achse; $p > 0,05$; [n=3]).

Analog zu den Erkenntnissen aus obigem Experiment zeigte sich auch eine moderate Regulation der frühen Aktivierungsmarker CD25 und CD154 auf CD4⁺ T-Zellen mediastinaler Lymphknoten (Abbildung 19). Die Gruppe der naiven Tiere verhielt sich zur Gruppe der scheinoperierten Tiere jeweils nahezu identisch. Auch hinsichtlich des Proliferationsmarkers Ki67 fand sich auf CD4⁺ T-Zellen im mLN nach 30 min Ischämie und 24h Reperfusion kein Unterschied (CD4⁺Ki67⁺ T-Zellen: WT naiv vs. I/ R: 12,8±0,7 vs. 11,1±3,8%; n.s.; [n=4]).

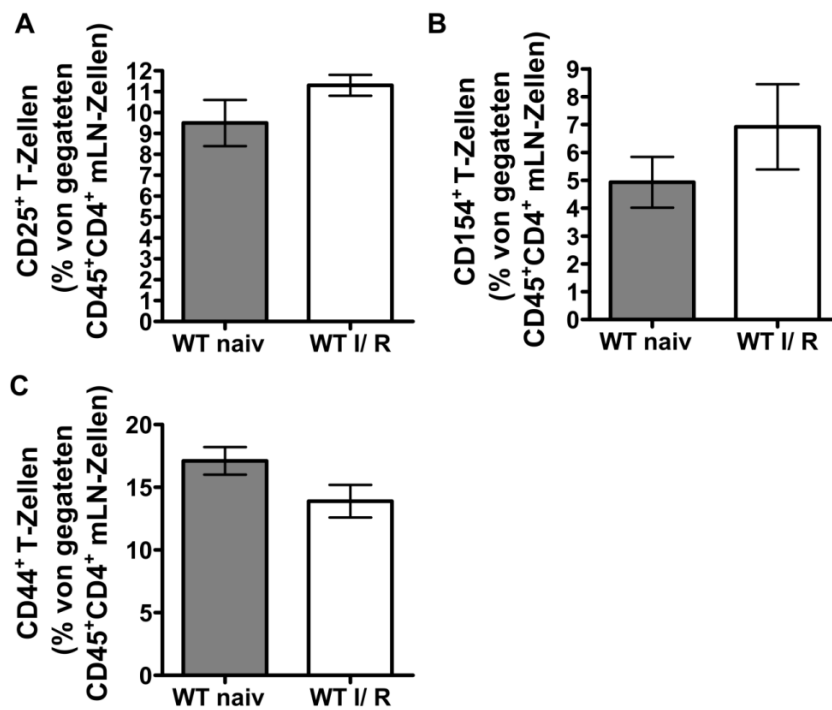


Abbildung 19: CD25-, CD154- und CD44-Expression auf CD4⁺ mLN-T-Zellen. Die Aktivierungsmarker A) CD25 B) CD154 und C) CD44 waren nach 24h Reperfusion auf CD4⁺ T-Zellen nicht signifikant reguliert, (T-Test; p>0,05).

4.2.2 Aktivierungsstatus von zirkulierenden T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion

In der Zirkulation fand sich nach 30 min Ischämie und 24h Reperfusion ein Anstieg an CD4⁺ T-Zellen, die für die Marker CD69 und CD25 positiv waren. Die Marker CD44 und CD154 waren hier im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant hochreguliert (Abbildung 20 A-D). Der Marker CD62L war hingegen nicht reguliert (CD4⁺CD62L⁻ T-Zellen: WT sham vs. I/ 24h R: 31,1±2,9 vs. 28,7±2,3; [n=3]; n.s.; T-Test).

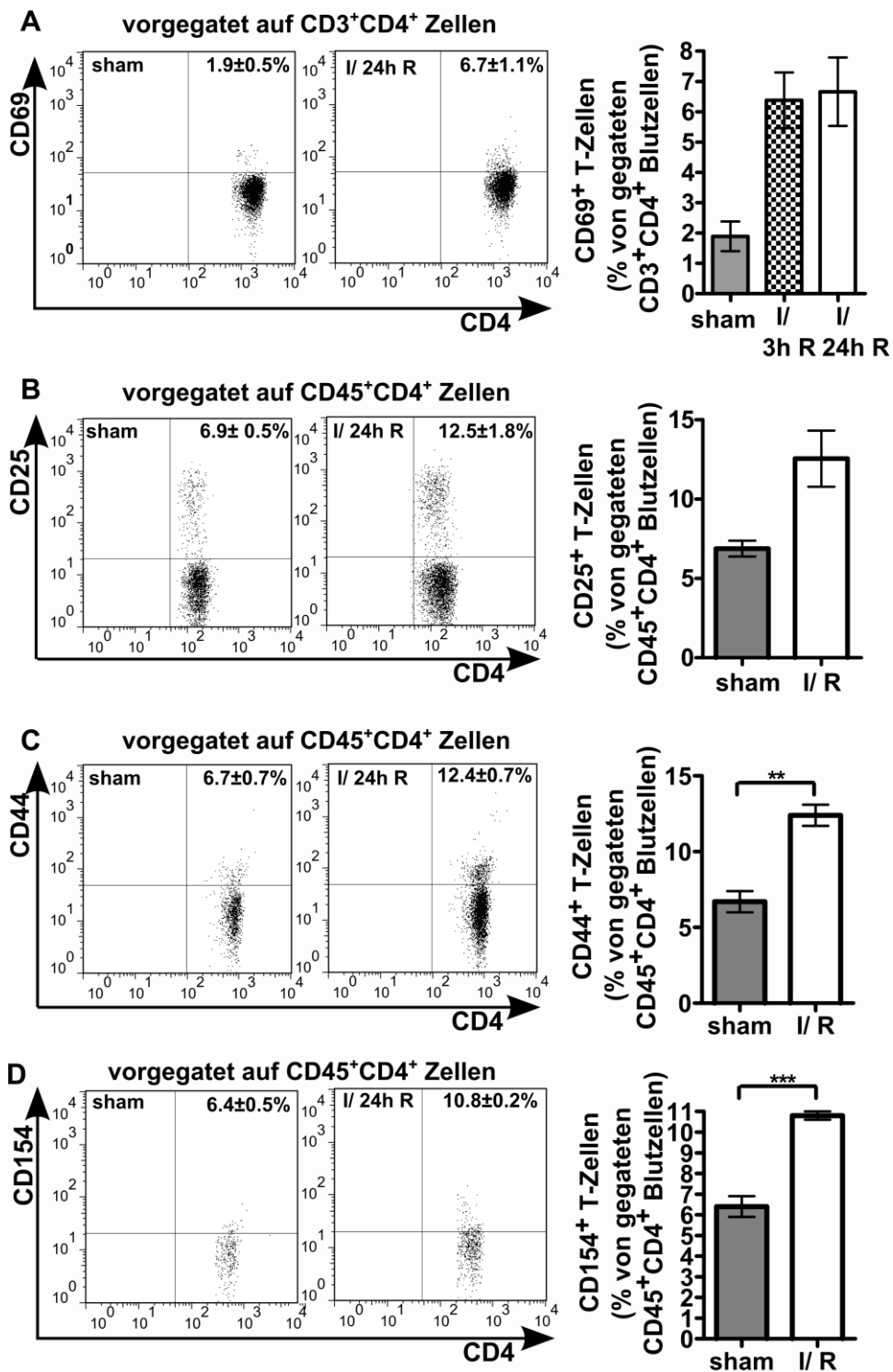


Abbildung 20: Aktivierungszustand von zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen.

Nach 3h und 24h Reperfusion waren CD4⁺ WT T-Zellen im Blut positiv für A) CD69 versus sham ([n=3]; ANOVA), nach 24h Reperfusion zeigte sich ein Anstieg an B) CD4⁺CD25⁺ ([n=3]), C) CD4⁺CD44⁺ ([n=3]) und D) CD4⁺CD154⁺ T-Zellen ([n=6]), der im Falle von CD44 und CD154 sigifikant war (A-C:T-Test).

In Bezug auf die Regulation des Markers CD69 auf zirkulierenden CD25⁺ T-Zellen fand sich der Peak nach 24h Reperfusion. Auch CD25⁻CD69⁺ konventionelle T-Zellen waren vorhanden (Abbildung 21).

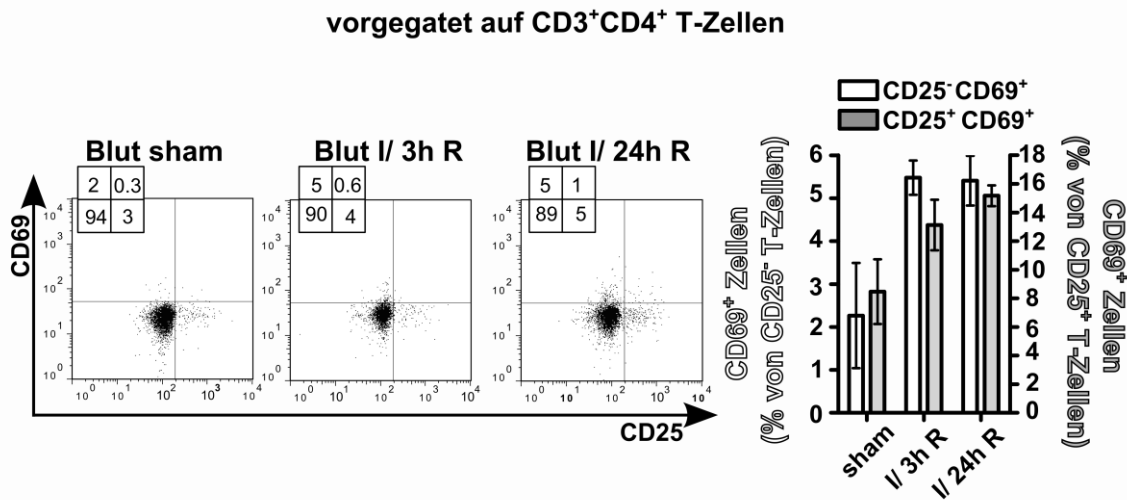


Abbildung 21: Aktivierungszustand von zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen.

Bereits nach 3h Reperfusion zeigte sich in der Zirkulation eine Aktivierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (graue Balken, rechte y-Achse) und CD4⁺CD25⁻ konventionellen T-Zellen (weiße Balken, linke y-Achse; n.s.; [n=2]; ANOVA).

Auf CD8⁺ T-Zellen aus dem Blut von WT-Tieren waren nach 24h Reperfusion keine Aktivierungsmarker signifikant reguliert (WT sham vs. I/ R: CD8⁺CD25⁺: 2,7±0,7 vs. 5,7±1,2%; CD8⁺CD62L: 19,4±2,3 vs. 17,1±0,9%; [n=3]; n.s.; T-Test).

Zusammengefasst wurde also gezeigt, dass 30 min Ischämie und 24h Reperfusion eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen induzieren. Dabei treten v.a. im peripheren Blut signifikant mehr aktivierte T-Zellen binnen Stunden nach Reperfusion auf.

4.3 CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen als Mediatoren des myokardialen Reperfusionsschadens

Im Folgenden wurden verschiedene Knockout-Mäuse eingesetzt, um die Relevanz von T-Zell-Subpopulationen für die myokardiale Ischämie-Reperfusion spezifischer eingrenzen zu können.

Zuerst wurden CD8 Knockout (KO) Tiere eingesetzt, um einen möglichen spezifischen Effekt von CD8⁺ T-Zellen im myokardialen Reperfusionsschaden zu analysieren. Nach standardisierter Induktion von Ischämie (30min) und Reperfusion (24h) wurde mittels Evans` Blue/ TTC-Färbung gezeigt, dass sich die Infarktgröße per area at risk (INF/ AAR) nicht signifikant änderte (WT vs. CD8 KO: INF/AAR: 84,8±4,3 vs. 65.6±8.5%; n.s.) (Abbildung 22).

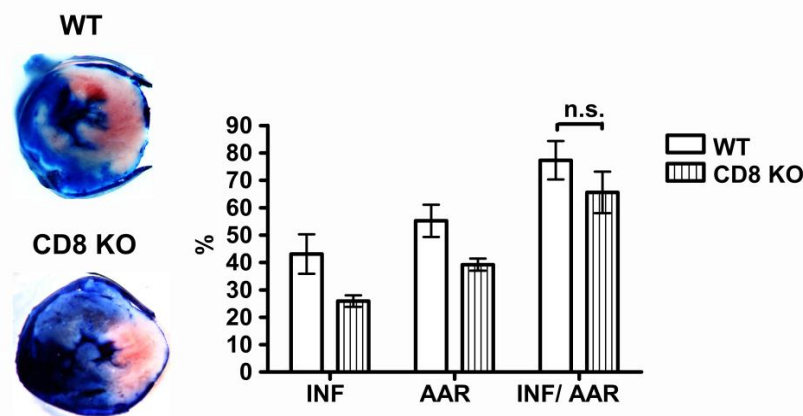


Abbildung 22: Infarktgrößenbestimmung im CD8 KO.

Die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen schützt nicht vor myokardialen Reperfusionsschaden. Die Infarktgröße per area at risk (INF/ AAR) war in der Evans`Blue/ TTC-Färbung nicht signifikant versus der WT-Gruppe verändert ([n=5]; ANOVA). Repräsentative Bilder von Evans`Blue/ TTC-Schnitten eines WT-Tieres und eines CD8 KO-Tieres sind gezeigt.

Nachdem eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch myokardiale Ischämie-Reperfusion gezeigt werden konnte, wurden als nächstes CD4⁺ T-Zell-defiziente Tiere (CD4 KO, The Jackson Laboratories) eingesetzt. Wie beschrieben wurde auch in CD4 KO und WT-Tieren für 30 min die linke Koronararterie ligiert, wiedereröffnet und 24h lang einmalig reperfundiert. Es zeigte sich, dass CD4 KOs bei vergleichbarer area at risk (WT vs. CD4 KO: AAR: 55,2±5,9 vs. 51,8±6,6%; n.s.)

deutlich kleinere Infarkte (WT vs. CD4 KO: $43,1 \pm 7,2$ vs. $24,2 \pm 2,5\%$) entwickelten als WT-Tiere, mit signifikantem Unterschied im Infarkt per area at risk (INF/ AAR: WT vs. CD4 KO: $84,8 \pm 4,3$ vs. $47,6 \pm 7,1\%$; $p < 0,01$; $[n=4]$; ANOVA; Abbildung 23). Anhand dieser zusätzlichen Erkenntnisse zum Phänotyp der CD4 KOs konzentrierten sich die folgenden Experimente auf $CD4^+$ T-Zellen.

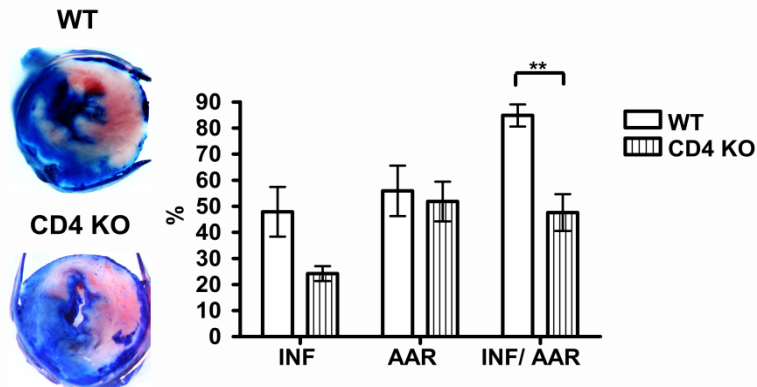


Abbildung 23: Infarktgrößenbestimmung im CD4 KO.

Ein Mangel an $CD4^+$ T-Zellen schützt vor myokardialen Reperfusionsschaden. CD4 KOs zeigten signifikant kleinere Infarktgrößen (INF/ AAR) versus WT. Repräsentative Bilder von Evans`Blue/ TTC-Schnitten eines WT-Tieres und eines CD4 KO-Tieres sind gezeigt.

Für die Rolle von T-Zellen im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschaden lässt sich damit folgern, dass CD4 KO-Tiere, aber nicht CD8 KO-Tiere vor dem myokardialen Reperfusionsschaden geschützt sind.

4.3.1 Ischämie-Reperfusion nach Depletion von regulatorischen T-Zellen

Vorherige Experimente zeigten, dass $CD4^+$ T-Zellen wesentlich zum RI beitragen. Nun sollte genauer eingegrenzt werden, welche Subpopulationen von $CD4^+$ T-Zellen am Reperfusionsschaden beteiligt sind. Regulatorische T-Zellen (Treg) können schnell agieren und niederschwellig v.a. durch Autoantigene aktiviert werden. Somit sollte ihr möglicher Beitrag zum RI untersucht werden. Um diese Fragestellung zu klären, wurde die Dereg-Maus (Depletion of REGulatory T cells) verwendet. Regulatorische T-Zellen können in diesem Tiermodell sehr spezifisch durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden. Die Treg Depletion erfolgte an

den Tagen -4, -3 und -1 vor der OP. Auch die Kontrollgruppe der wildtypischen Wurfgeschwister erhielt in gleicher Weise Dosen an DT. Vor Induktion der Operation (Tag 0) wurde zuerst die erfolgreiche Treg Depletion in der DEREK-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe per Durchflusszytometrie aus dem Blut der gespritzten Tiere nachgewiesen. Das Applikationsschema zeigte sich als erfolgreich; Frequenzen an $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen waren in der DEREK-Maus deutlich reduziert (WT Wurfgeschwister vs. DEREK: $CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen, vorgegattet auf $CD45^+CD4^+$ T-Zellen: $9,3\pm0,6$ vs. $2,7\pm0,2\%$; $p<0,001$; $[n=5]$; T-Test; Abbildung 24).

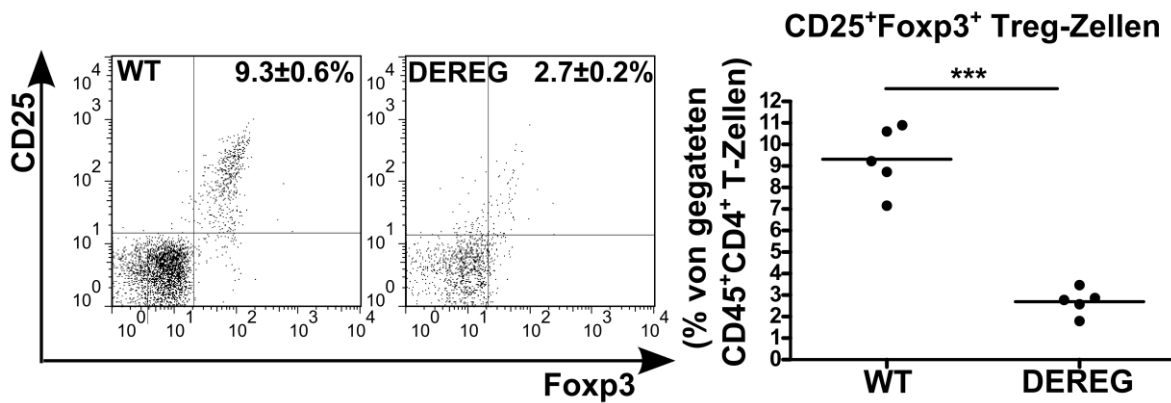


Abbildung 24: Nachweis der Treg-Depletion aus Blut. Durch Injektion von Diphtherietoxin an den Tagen -4, -3 und -1 vor der OP wurden $Foxp3^+$ T-Zellen signifikant aus DEREK-Mäusen depletiert.

Anschließend wurden die depletierten DEREK-Mäuse und behandelten WT-Wurfgeschwister der Ischämie (30 min) und Reperfusion (24h) unterzogen. In der anschließenden Evans`Blue/ TTC-Färbung zeigte sich, dass Treg depletierte DEREK-Mäuse vor dem myokardialen Reperfusionsschaden geschützt waren. Sie hatten bei vergleichbarer area at risk (WT Wurfgeschwister vs. DEREK: AAR: $36,7\pm5,1$ vs. $32,4\pm3,4$; n.s.) kleinere Infarkte (WT Wurfgeschwister vs. DEREK: INF: $20,3\pm2,5$ vs. $12,4\pm1,6\%$) und ein signifikant kleineres Verhältnis INF/ AAR (WT Wurfgeschwister vs. DEREK: INF/ AAR: DEREK: $60,4\pm2,1$ vs. $39,3\pm4,2\%$; $p<0,01$; $[n=5]$; Abbildung 25).

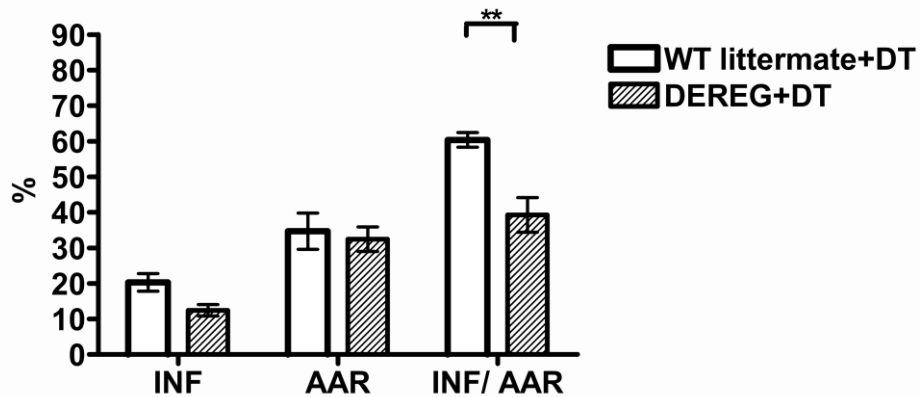


Abbildung 25: Infarktgrößenbestimmung in der Treg-depletierten DEREg-Maus. DEREg-Mäuse, aus denen an den Tagen -4, -3 und -1 vor Ischämie-Reperfusion mit Diphtherietoxin (DT) Treg-Zellen depletiert wurden, zeigten signifikant verkleinerte Infarktgrößen im Vergleich zu DT-behandelten WT-Wurfgeschwistern.

Um in einem mechanistisch umsetzbaren experimentellen Ansatz die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen für den myokardialen Reperfusionsschaden zu untersuchen, wurden in WT-Tieren regulatorische T-Zellen mittels eines anti-CD25-Antikörpers (Klon PC61) an den Tagen -7 und -3 vor Ischämie-Reperfusion depletiert. Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend einen Rat IgG1 Isotyp-Antikörper. Analog zum DEREg-Mausmodell wurde auch hier die erfolgreiche Depletion von $CD45^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen mittels einer FACS-Färbung aus dem Blut nachgewiesen (WT mit Isotyp-AK-Behandlung vs. WT mit anti-CD25-AK-Behandlung: $6,0 \pm 0,4\%$ vs. $2,8 \pm 0,2\%$; $p < 0,001$; [n=8]; T-Test). Am Tag 0 wurden die Tiere operiert (30 min Ischämie/ 24h Reperfusion). Es folgte eine Infarktgrößenbestimmung mittels Evans`Blue/ TTC-Färbung. Mit diesem Experiment konnte die Rolle der Treg-Zellen nicht weiter belegt werden, da die Infarktgröße fast identisch war (WT mit Isotyp-AK-Behandlung vs. WT mit anti-CD25-AK-Behandlung: AAR: $41,0 \pm 4,5$ vs. $50,1 \pm 3,5$; INF: $21,9 \pm 3,4$ vs. $23,5 \pm 3,8$; INF/ AAR: $53,5 \pm 8,0$ vs. $45,4 \pm 6,0$; n.s.; [n=8]; ANOVA; Abbildung 26). Im Gegensatz zur Treg-Depletion durch Diphtherie-Injektion an den Tagen -4, -3 und -1 vor der OP im DEREg-Mausmodell wirkte sich eine Antikörper-vermittelte Treg-Depletion mittels des Klons PC-61 an den Tagen -7 und -3 vor Ischämie-Reperfusion, möglicherweise durch das Zeitschema der Applikationen bedingt, nicht auf die Infarktgröße aus.

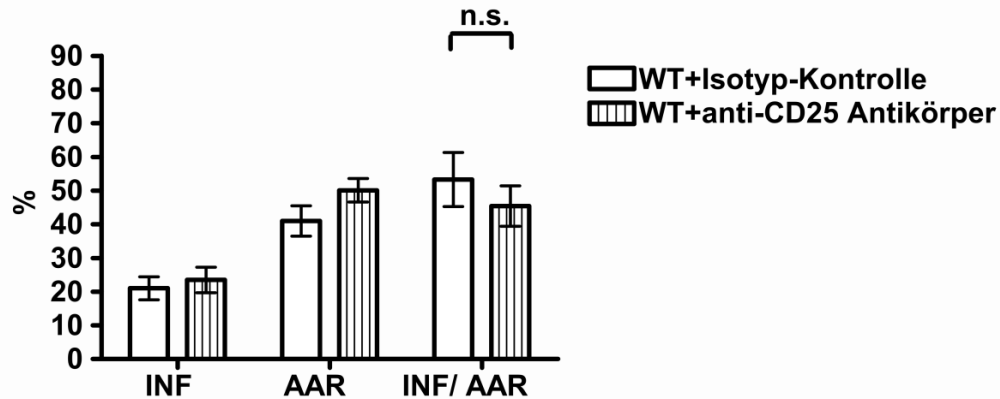


Abbildung 26: Infarktgrößenbestimmung nach anti-CD25 Antikörper-Depletion. Die Behandlung mit dem Treg-depletierenden anti-CD25 Antikörper (Klon PC61) an den Tagen -7 und -3 vor Ischämie-Reperfusion ergab in WT-Tieren im Vergleich zum Kontrollantikörper keine Veränderungen bezüglich der Infarktgröße.

4.3.2 Ischämie-Reperfusion nach adoptivem T-Zell-Transfer

In einem dritten Ansatz zur Aufklärung der Rolle von regulatorischen T-Zellen im Reperfusionsmodell wurde ein „Rescue“-Modell etabliert. Dabei wurden in einem physiologischen Verhältnis $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen versus $CD4^+CD25^-$ konventionelle T-Zellen in $CD4KO$ s transferiert. Zur Kontrolle wurden außerdem in einem zweiten Durchlauf Bulk- $CD4^+$ T-Zellen versus $CD4^+CD25^-$ konventionelle T-Zellen transferiert.

Zunächst wurde in einem vorausgestellten „proof-of principle“-Experiment (Abbildung 27) mittels FACS gezeigt, dass ein Zelltransfer i.v. erfolgreich durchführbar ist und $CD4^+$ T-Zellen aus dem Spendertier nach dem Transfer in lymphoiden Organen des Empfängertieres wiedergefunden werden können. Dazu wurden Mäuse verwendet, bei denen Leukozyten positiv für den kongenen Marker CD45.1 sind. Somit können $CD45.1^+$ T-Zellen mit Hilfe eines anti-CD45.1-Antikörpers nach dem Transfer in $CD45.2^+$ WT-Tiere detektiert werden.

Alle prozentualen Angaben der FACS-Plots ergaben sich mit einer Pre-Gating-Strategie auf $CD45^+$ Zellen aus dem live gate. Nach Transfer von $1 \cdot 10^6$ $CD4^+$ $CD45.1$ Zellen aus diesen Spendertieren wurden nach 24h 0,4% $CD4^+CD45.1^+$

Zellen im Blut, 1,5% in der Milz, 2,7% in iLN und 1,0% in mLN eines CD45.2 WT-Empfängertieres nachgewiesen ([n=1]).

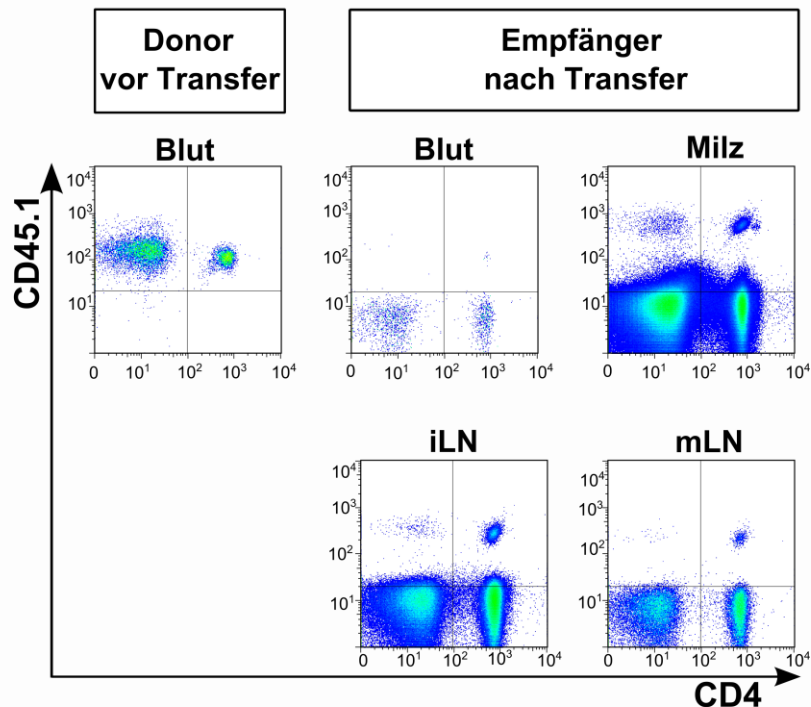


Abbildung 27: Proof-of-Principle für adoptiven Transfer.

T-Zellen aus einem Spendertier (CD45.1) sind 24h nach dem adoptiven Transfer in lymphoiden Organen des Empfängertieres (CD45.2) wieder auffindbar.

Nachdem sich dieses Experiment als erfolgreich erwiesen hatte, wurden pro Tier CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im physiologischen Verhältnis aus lymphoiden Organen (Milz, iLN, mLN, axilläre LN und zervikale LN) mittels MACS isoliert und in CD4 KOs transferiert (siehe Flusschema Abbildung 10). 24h später wurden die Tiere nach beschriebenem Verfahren operiert (I/ R). Auch von diesen Tieren wurde mittels Evans`Blue/ TTC-Färbung die Infarktgröße bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den bestimmten Parametern (CD4⁺CD25⁻ vs. CD4⁺CD25⁺: AAR: 39,7±4,1 vs. 45,8±2,4%; INF: 13,2±3,3 vs. 13,2±1,6%; INF/ AAR: 35,9±7,6 vs. 30,8±,6%; n.s.; [n=7]; ANOVA; Abbildung 28).

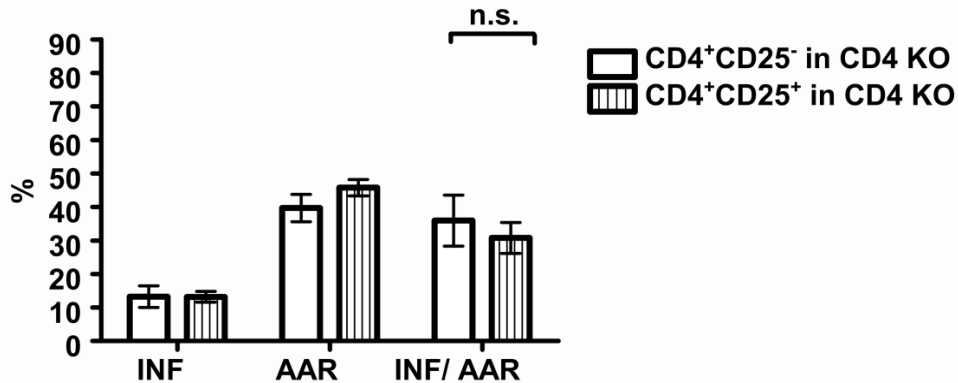


Abbildung 28: Infarktgrößenbestimmung nach Transfer von Treg vs. Tconv. Nach einem Transfer von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen versus CD4⁺CD25⁻ konventionellen T-Zellen in physiologischem Verhältnis war die Infarktgröße per area at risk von CD4 KO-Tieren unverändert.

In einem Kontrollexperiment wurden anschließend 1×10^6 MACS-aufgereinigte Gesamt (Bulk)-CD4⁺ T-Zellen versus $7,5 \times 10^5$ CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in CD4 KOs transferiert. Hier konnte die Infarktgröße durch die transferierten Zellen wieder signifikant vergrößert werden (CD4⁺CD25⁻ vs. CD4⁺: AAR: $39,8 \pm 1,9$ vs. $45,9 \pm 2,6\%$; INF: $8,3 \pm 1,4$ vs. $15,6 \pm 2,3\%$; INF/ AAR: $21,6 \pm 4,0$ vs. $33,2 \pm 3,5\%$; $p < 0,05$; [n=7]; ANOVA; Abbildung 29).

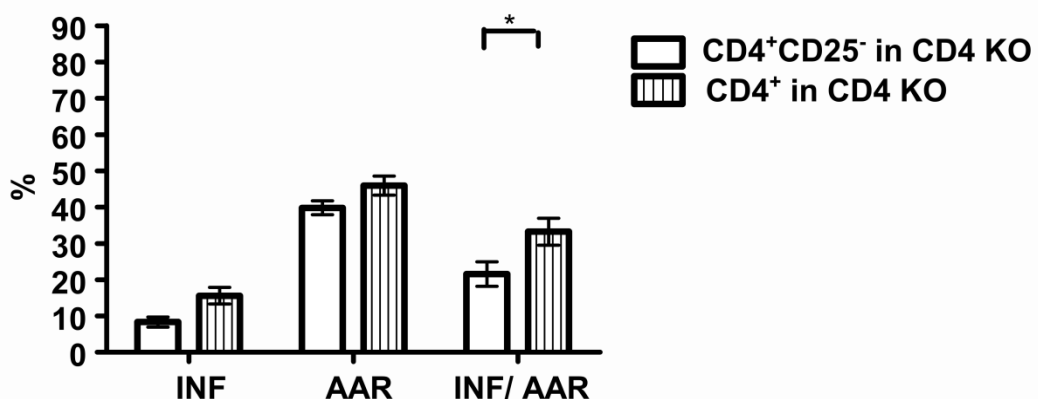


Abbildung 29: Infarktgrößenbestimmung nach Transfer von Bulk-CD4⁺ vs. Tconv. Durch einen Transfer von Bulk-CD4⁺ T-Zellen versus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen konnte ein Schaden im CD4 KO partiell wieder hergestellt werden.

Während der Transfer von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen versus CD4⁺CD25⁻ konventionellen T-Zellen zu gleichen Infarktgrößen führte (Abbildung 28), wurde durch den Transfer von Gesamt-CD4⁺ T-Zellen der Schaden im Vergleich zur CD4⁺CD25⁻ Gruppe signifikant erhöht. Die Daten aus den Transferexperimenten bestätigen den Befund im DEREK-Modell, dass Treg-Zellen an der Induktion des myokardialen Reperfusionsschadens teilhaben.

4.3.3 Zytokinprofil von regulatorischen und konventionellen T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion

Im Anschluss wurde das Zytokinprofil von regulatorischen T-Zellen und konventionellen T-Zellen nach Ischämie und Reperfusion genauer mittels qRT-PCR bestimmt. Da insgesamt nur sehr wenige CD4⁺ T-Zellen im Myokard nach Ischämie und Reperfusion detektierbar sind, stellt die geringe Zellzahl technisch eine Limitation dar, CD4⁺CD25⁺ regulatorische und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen im Herzen zu detektieren und zu sortieren. Deswegen wurde das Zytokinprofil von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus Herz-drainierenden mediastinalen Lymphknoten von operierten versus scheinoperierten WT-Tieren bestimmt. Konventionelle und regulatorische T-Zellen wurden nach der in Abbildung 30 aufgezeigten Gating-Strategie gesortet. Anschließend wurde aus den gesorteten Zellen mRNA gewonnen, 3 Runden amplifiziert und qRT-PCR durchgeführt.

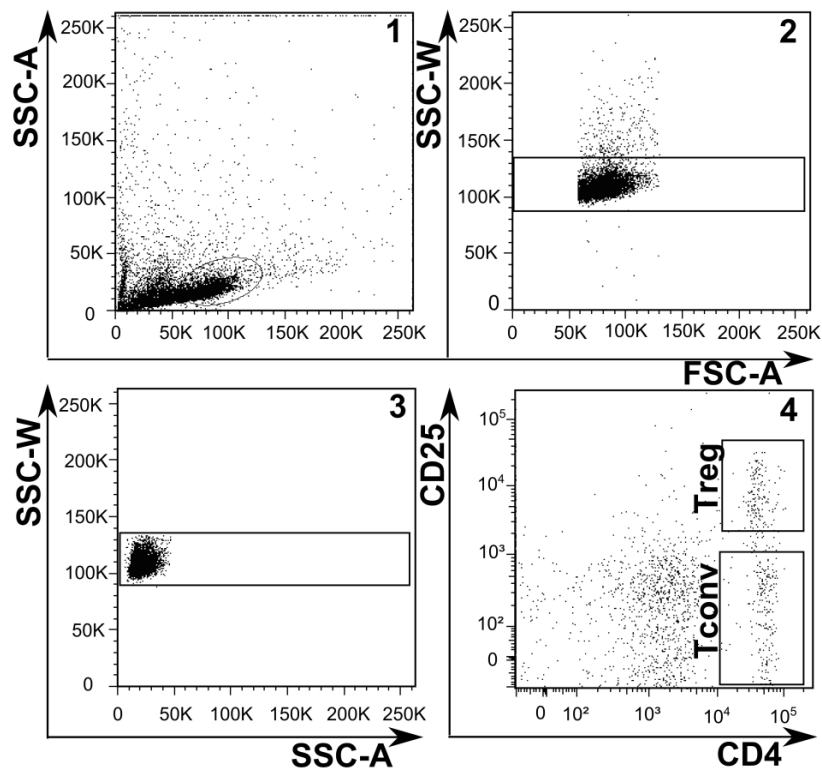


Abbildung 30: Gating-Strategie nach dem Sorten von regulatorischen T-Zellen aus Lymphknoten. Exemplarisch werden FACS-Plots aus mediastinalen Lymphknoten eines WT-Tieres nach Ischämie-Reperfusion (30min/ 24h) gezeigt.

Untersucht wurde die Expression von Genen bzw. Zytokinen, die nachweislich in der Literatur mit Ischämie-Reperfusion assoziiert sind bzw. von T-Zellen sezerniert werden können (Tabelle 11).

Bezeichnung des Gens	Abkürzung	fold change Tconv	fold change Treg
Tumor necrosis factor α	TNF- α	2,93	0,13
Transforming growth factor β	TGF- β	2,07	2,30
Interferon γ	IFN- γ	4,59	n/d
Interleukin 6	IL-6	n/d	n/d
Interleukin 17	IL-17	n/d	n/d
Hypoxia inducible factor 1, α subunit	HIF-1 α	1,57	0,42

Tabelle 11: Zytokin- und Chemokinprofil von regulatorischen und konventionellen T-Zellen nach I/ R.

Nach I/ R und sham-Operation wurden regulatorische und konventionelle T-Zellen aus mediastinalen Lymphknoten von WT-Tieren gesortet. Die Tabelle zeigt relative mRNA-Level (fold change; $2^{-\Delta\Delta C_t}$) nach I/ R, normiert auf die Scheinoperation. n/d bezeichnet nicht detektierbare Gene [n=2].

Während IL-6 und IL-17 in diesem Experiment nicht nachweisbar waren, zeigte sich eine Hochregulation von TNF- α und HIF-1 α auf konventionellen T-Zellen. IFN- γ wurde nur auf konventionellen T-Zellen detektiert.

4.4 Antigenerkennung im T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden

4.4.1 Untersuchung einer Antigenerkennung im Reperfusionsschaden an OT-II Mäusen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Antigenerkennung über MHC Klasse II-Moleküle eine Voraussetzung für den CD4⁺ T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden darstellt. Dazu wurde die T-Zell-Rezeptor transgene OT-II Maus eingesetzt. Sie besitzt CD4⁺ T-Zellen und exprimiert einen transgenen T-Zellrezeptor, der für ein Ovalbumin (OVA)-Peptid spezifisch ist. Somit kann gezielt eine Antigenerkennung untersucht werden. Auch auf die OT-II Maus wurde das beschriebene Ischämie-

Reperusionsmodell angewendet. Interessanterweise zeigte sich, dass die OT-II Maus vor dem myokardialen Reperfusionsschaden geschützt war und bei konstanter AAR (WT vs. OT-II: AAR: $37,0 \pm 4,4$ vs. $41,7 \pm 4,5\%$) signifikant kleinere Infarkte versus dem WT entwickelte (WT vs. OT-II: INF: $22,6 \pm 1,7$ vs. $15,9 \pm 2,2\%$; INF/ AAR: $63,7 \pm 6,8$ vs. $38,9 \pm 4,4\%$; $p < 0,01$; [n=4]; ANOVA; Abbildung 31).

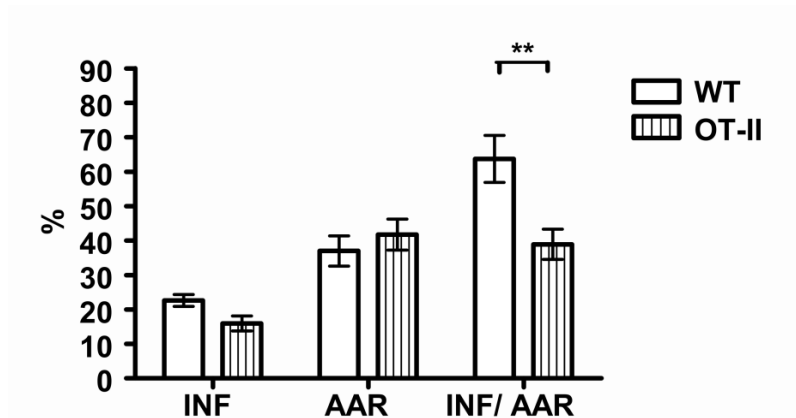


Abbildung 31: Infarktgrößenbestimmung in der OT-II-Maus. OT-II Tiere waren signifikant vor dem myokardialen Reperfusionsschaden geschützt.

4.4.2 Untersuchung einer Antigenerkennung im Reperfusionsschaden an MHC Klasse II KO Mäusen

In einem weiteren Mausmodell, der MHC Klasse II KO-Maus, sollten nun die OT-II Daten bekräftigt werden. Im Gegensatz zur transgenen OT-II Maus fehlen dem MHC Klasse II KO, analog zum CD4 KO, $CD4^+$ T-Zellen. Zugleich ist auch keine Antigenerkennung über den MHC Klasse II-Komplex möglich. In Vergleich zum CD4 KO, der über $CD8^+$ T-Zellen verfügt, die ebenfalls über den MHC Klasse II-Rezeptor agieren können, ist dieser Signalweg im MHC Klasse II KO zusätzlich blockiert. Somit kann insbesondere untersucht werden, ob MHC II restringierte Lymphozyten eine Rolle spielen. Ebenso wie die CD4 KO- und OT-II Maus zeigte auch die MHC Klasse II KO Maus eine signifikant kleinere Infarktgröße per area at risk (WT vs.

MHC Klasse II KO: AAR: $33,2 \pm 2,6$ vs. $41,0 \pm 3,4\%$; INF: $19,5 \pm 1,8$ vs. $13,6 \pm 1,0\%$; INF/AAR: $59,4 \pm 4,9$ vs. $34,5 \pm 4,7\%$; $p < 0,001$; $[n=4]$; ANOVA; Abbildung 32).

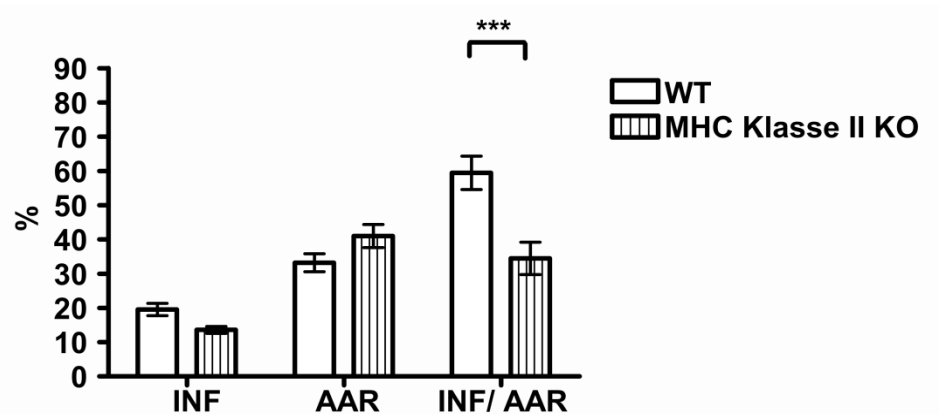


Abbildung 32: Infarktgrößenbestimmung im MHC Klasse II KO. MHC Klasse II KO-Tiere zeigten signifikant kleinere Infarkte per area at risk.

Zusammengefasst lässt sich anhand der Experimente im CD4 KO, MHC Klasse II KO und der OT-II-Maus sagen, dass $CD4^+$ T-Zellen im Modell der Ischämie und frühen Reperfusion die Infarktgröße advers beeinträchtigen. Dieser Effekt bedarf sowohl das Vorhandensein eines funktionellen T-Zell-Rezeptor-Repertoires als auch MHC II Moleküle.

4.4.3 CD40L-Beteiligung am T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden

T-Zell-Aktivierung erfolgt nicht nur allein über den T-Zell-Rezeptor; bei der Aktivierung sind auch Liganden und kostimulatorische Moleküle beteiligt. Im folgenden Experiment wurde ein möglicher Beitrag des Liganden CD154 (CD40L) untersucht. CD154 wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und bindet an CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen. Bereits die signifikante Hochregulation von CD154 auf wildtypischen $CD4^+$ T-Zellen im Blut deutete auf eine mögliche Relevanz dieses Moleküls im Infarktgeschehen hin. Die Funktionalität von CD154 wurde nach 30 min Ischämiezeit durch retroorbitale Einmalgabe von anti-Maus CD154 Antikörper (Klon

MR-1) bei Reperfusion inhibiert. Die Kontrollgruppe erhielt analog eine polyklonale Hamster Isotyp-Kontrolle. Auch hier wurden die nachfolgenden Experimente mit einem 24-Stunden-Reperfusionsmodell durchgeführt. Der auf die AAR normierte Infarkt war in der CD154-inhibierten Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (WT mit Isotyp-AK-Behandlung vs. WT mit anti-CD154-AK-Behandlung: AAR: $63,6 \pm 3,4$ vs. $66,9 \pm 3,3\%$; INF: $46,5 \pm 1,8$ vs. $40,1 \pm 2,5\%$; INF/ AAR: $75,3 \pm 3,0$ vs. $60,4 \pm 2,9\%$; $p < 0,001$; [n=12]; ANOVA; Abbildung 33). Somit stellt die Antikörper-vermittelte Blockade von CD40L eine Möglichkeit zur Reduktion des Reperfusionsschadens dar.

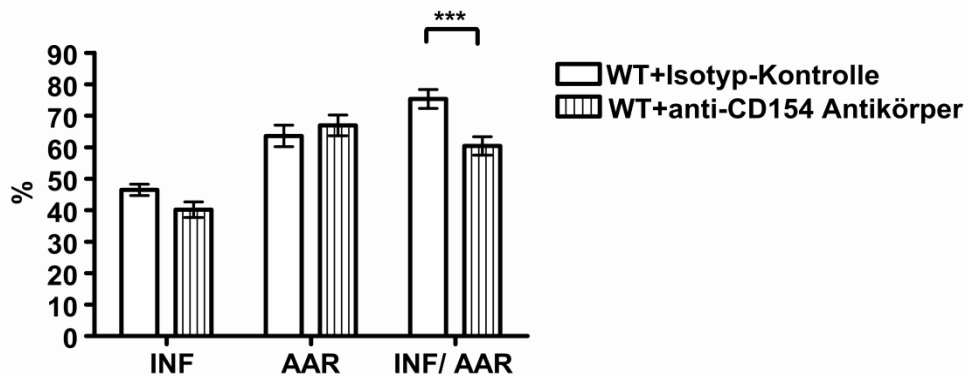


Abbildung 33: Infarktgrößenbestimmung nach Antikörper-vermittelter CD154-Inhibition.

Eine Antikörper-vermittelte Inhibition des kostimulatorischen Moleküls CD154 führt zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße.

4.5 Regulation von Osteopontin im Reperfusionsschaden

Im Folgenden wurde das durch den RI veränderte Zytokin- und Chemokin-Profil im gesamten myokardialen Narbengewebe von WT-Tieren (I/ R vs. sham) auf mRNA-Ebene zuerst mit einem kommerziellen „Mouse Cytokines & Chemokines RT² Profiler PCR Array“ (Qiagen) untersucht. Dabei zeigten sich folgende Genregulationen (Tabelle 12):

Bezeichnung des Gens	Abkürzung	2^{-ΔCt} WT sham	2^{-ΔCt} WT I/R
Chemokine (C-C motif) ligand 12	Ccl12	0,03	0,17
Chemokine (C-C motif) ligand 19	Ccl19	0,11	0,05
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	0,03	0,46
Chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	0,01	0,07
Chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	0,01	0,51
Chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	0,09	0,11
Chemokine (C-C motif) receptor 1	Ccr1	0,02	0,06
Chemokine (C-C motif) receptor 2	Ccr2	0,05	0,05
Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Cx3cl1	0,07	0,06
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	0,04	0,06
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	0,15	0,13
Platelet factor 4	Pf4	0,03	0,26
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Cxcl5	0,04	0,40
Interleukin 10 receptor, beta	Il10rb	0,53	0,22
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	0,06	0,12
Interleukin 15	Il15	0,12	0,09
Interleukin 1 beta	Il1b	0,03	0,11
Interleukin 1 receptor, type I	Il1r1	0,11	0,06
Interleukin 1 receptor, type II	Il1r2	0,03	0,58
Interleukin 6 signal transducer	Il6st	0,43	0,51
Integrin alpha M	Itgam	0,33	0,05
Integrin beta 2	Itgb2	0,07	0,21
Macrophage migration inhibitory factor	Mif	0,53	3,84
Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	Aimp1	0,43	0,88
Secreted phosphoprotein 1	Spp1	0,01	2,45
Transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	0,06	0,08
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	0,05	0,12

Ergebnisse

Toll interacting protein	Tollip	0,09	0,08
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	Hprt	0,35	0,84
Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	Hsp90ab1	3,68	7,85

Tabelle 12: RT² Profiler™ PCR Array Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors. Die Tabelle zeigt auf GAPDH normierte relative mRNA Level ($2^{-\Delta Ct}$) verschiedener aus dem Kontext der Inflammation stammenden Zytokine und Rezeptoren im Herzen von WT-Tieren nach Ischämie-Reperfusion (I/ 24h R) versus Scheinoperation (sham). Besonders auffällig ist die deutliche Hochregulation von Secreted phosphoprotein 1 (Spp1) nach I/ R ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 195,63). Pro Array wurde aus jeweils 2 Tieren gepooltes Gewebe eingesetzt.

Auf RNA-Ebene war aus gesamtem wildtypischen myokardialen Narbengewebe nach der Ischämie/ 24h Reperfusion versus sham deutlich das Gen Spp1 (codierend für Osteopontin) reguliert. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich zum kommerziellen Array auch nochmal durch einzeln durchgeführte qRT-PCRs belegt (WT I/ R normiert auf sham: $2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3,91; [n=3]). In einem weiteren Experiment wurde auch eine Osteopontin-Regulation in CD4 KOs untersucht. Interessanterweise gab es hier nach I/ R im CD4 KO keine Regulation von Spp1 versus WT I/ R (CD4 KO I/ R normiert auf WT I/ R: $2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0,0017; [n=3]). Aus diesem Grund war in der vorliegenden Arbeit Osteopontin als möglicher mechanistischer Regulator des T-Zell-vermittelten myokardialen Reperfusionsschadens von Interesse. Die Regulation von Osteopontin nach 3h und 24h Reperfusion versus sham wurde zusätzlich auch im Western Blot überprüft (Abbildung 34 A,B). Die densitometrische Auswertung bestätigte eine von der Reperfusionszeit abhängige signifikante Zunahme der Proteinexpression von Osteopontin versus sham (Abbildung 34 B).

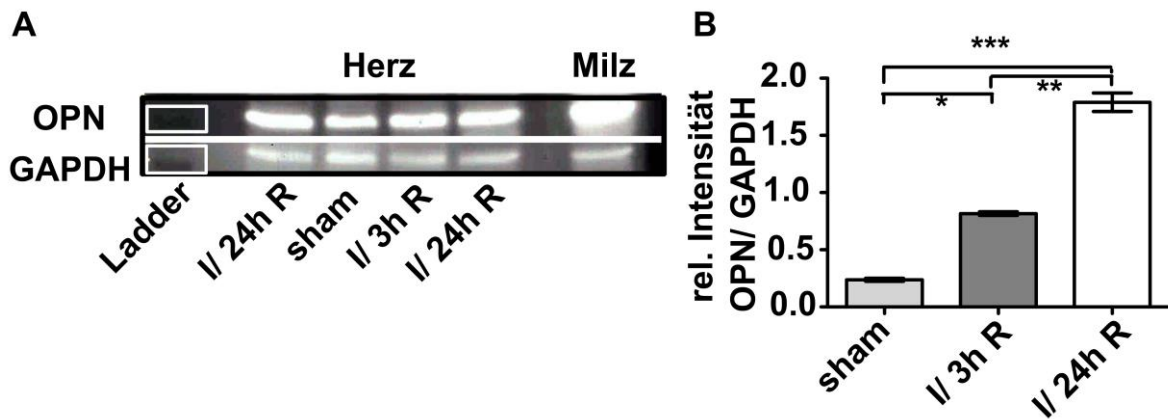


Abbildung 34: Western Blot auf Osteopontin.

A) Repräsentative Western Blot Banden von Osteopontin (OPN;31kDa) und GAPDH (36kDa) aus Herzgewebe scheineroperierter Tiere und nach Ischämie mit 3h bzw. 24h Reperfusion. B) Relative Intensität des Signals von Osteopontin zu GAPDH (Densitometrie). Es zeigte sich eine signifikante Zunahme an Osteopontin durch die Ischämie-Reperfusion (Reperfusionsdauer 3h bzw. 24h) im Vergleich zur Scheinoperation (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Da die molekularbiologischen Experimente für eine Rolle von Osteopontin im Infarktgeschehen sprachen, wurden als nächstes Osteopontin KO-Tiere verwendet und nach Ligatur der LAD für 30 min mit nachfolgender 24h Reperfusion die Infarktgröße per Evans`Blue/ TTC-Färbung bestimmt. Trotz einer deutlichen Regulation von Spp1 auf RNA- und Protein-Ebene zeigte sich bei den OPN KOs versus WT keine signifikant reduzierte INF/ AAR (WT vs. OPN: AAR: $38,1 \pm 7,2$ vs. $43,7 \pm 7,0\%$; INF: $22,9 \pm 4,4$ vs. $22,3 \pm 3,9\%$; INF/ AAR: $60,0 \pm 2,5$ vs. $50,8 \pm 8,0\%$; n.s.; [n=6]; ANOVA; Abbildung 35).

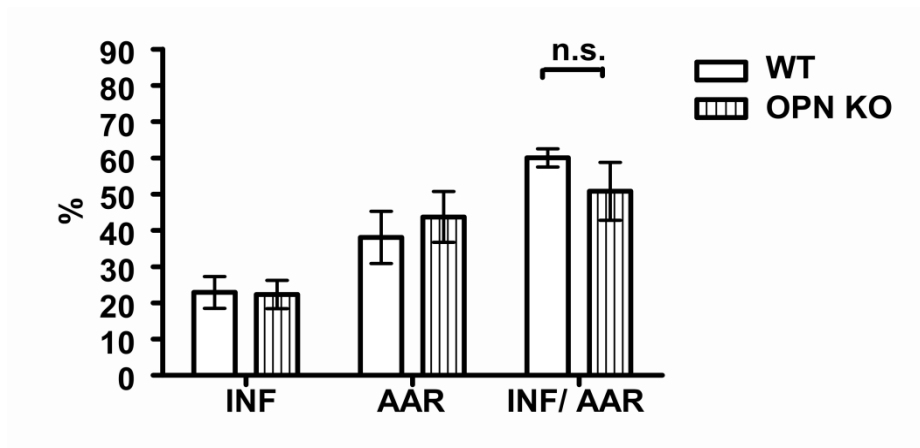


Abbildung 35: Infarktgrößenbestimmung im OPN KO. Im Modell der myokardialen Ischämie (30 min) und Reperfusion (24h) zeigten Osteopontin (OPN) KO-Tiere keinen signifikanten Phänotyp.

Auf molekularbiologischer Ebene (RNA, Protein) war im Wildtyp ein deutlicher Anstieg an Osteopontin nach 24h Reperfusion erkennbar. Dennoch zeigten Osteopontin KO-Tiere keine signifikante Änderung in ihrer Infarktgröße.

4.6 Unveränderte Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität in T-Zell-defizienten Mäusen

Neutrophile Granulozyten gehören zu den Zellen der angeborenen Immunität, die als Folge der Ischämie und Reperfusion zuerst in das Myokard infiltrieren. Die vorliegende Arbeit testete die Hypothese, dass $CD4^+$ T-Zellen und Neutrophile Granulozyten in einem „cross-talk“ zueinander stehen und ein wechselseitiges Rekrutierungssystem vorliegt, das zu einem verstärkten myokardialen Reperfusionsschaden führt. Dazu wurde die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und myeloiden Zellen in das Ischämie-Reperusionsgebiet von $CD4$ KO-Tieren und WT-Tieren mittels FACS-Analysen bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied in der absoluten Zellzahl und im Prozentsatz von $CD45^+CD11b^+Ly6G^+$ Neutrophilen Granulozyten (WT I/ 24h R vs. $CD4$ KO I/ 24h R: $10,0 \pm 2,6 \cdot 10^5$ vs. $8,4 \pm 4,1 \cdot 10^5$ Zellen/ g ischämisches Herzgewebe; n.s.; [n=5]; T-Test; Abbildung 36

A, B). Die absolute Zellzahl sowie der Prozentsatz an $CD45^+CD11b^+Ly6G^-$ monozytären Zellen und $CD45^+CD11b^-Ly6G^-$ Lymphozyten war vergleichbar zwischen beiden Gruppen (Abbildung 36 A,C,D).

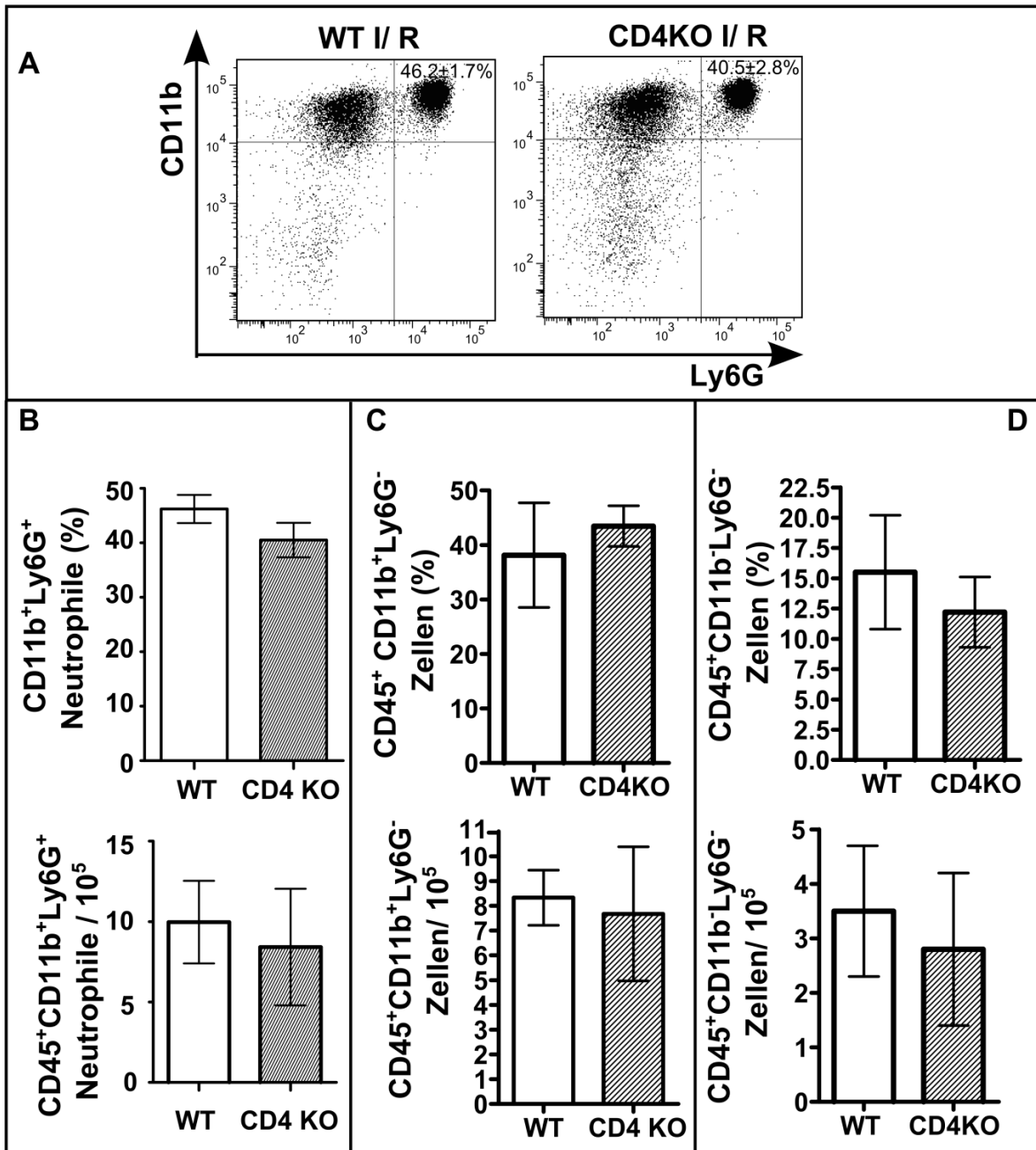


Abbildung 36: Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität in CD4 KO. Die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität (Neutrophile Granulozyten, myeloide Zellen) in CD4 KO-Tiere nach I/R war unverändert im Vergleich zum WT nach I/R. A) Repräsentative FACS Plots, B) Quantifizierung von myokardialen Neutrophilen Granulozyten, C) Quantifizierung von $CD45^+CD11b^+Ly6G^-$ Monozyten und D) $CD45^+CD11b^-Ly6G^-$ Lymphozyten. (B-D) Angaben in % und als absolute Zellzahl; vorgegated auf $CD45^+$ lebende Zellen ([n=5]; T-Test).

Zusätzlich wurde von diesen CD4 KO und WT-Tieren vor und nach I/ R Blut genommen, das mittels FACS-Analysen auf seine prozentuale Zusammensetzung an Leukozyten der angeborenen Immunität untersucht wurde. Die I/ R induzierte sowohl im WT-Tier als auch im CD4 KO einen signifikanten Anstieg von zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten versus sham. Allerdings zeigte sich analog zu den Ergebnissen aus dem Herzen keine Regulation bezüglich peripherer Neutrophiler Granulozyten im Vergleich von WT nach I/ R versus CD4 KO nach I/ R (Abbildung 37).

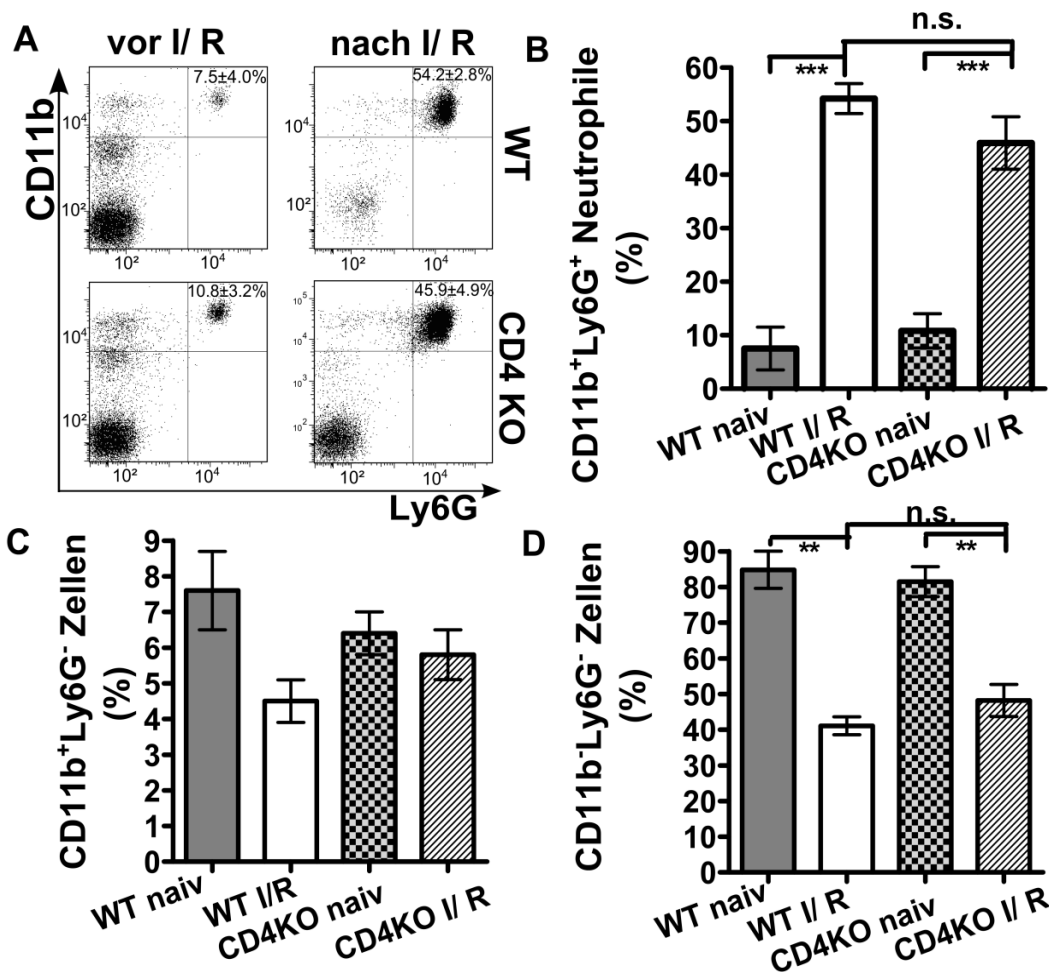


Abbildung 37: Periphere Leukozyten-Komposition im CD4 KO nach I/ R.

A) Repräsentative FACS Plots von Blut aus einem WT versus CD4 KO Tier nach I/ R. B) Der Prozentuale Anteil an CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen Granulozyten stieg nach dem myokardialen Reperfusionsschaden sowohl im WT als auch im CD4 KO. C) Der prozentuale Anteil an CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ monozytären Blutzellen war unverändert. D) CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ lymphozytären Blutzellen waren nach RI reduziert (B-D: vorgegattet auf CD45⁺ lebende Zellen; [n=5]).

Sowohl im Herzen als auch im Blut von CD4 KO-Tieren zeigte sich keine Veränderung am Anteil Neutrophiler Granulozyten nach myokardialem Reperfusionsschaden. CD4⁺ T-Zellen scheinen daher die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten nicht zu regulieren.

4.7 CD4⁺ T-Zell-vermittelte Veränderung der Mikroperfusion

Die Reperfusion stellt eine wichtige Intervention zur Therapie des Myokardinfarkts dar. Dennoch geht auch das Risiko eines sogenannten „No-Reflow-Phänomens“ mit der Reperfusion einher. D.h. es kommt trotz erfolgreicher Reperfusion zu einer unvollständigen Wiederherstellung des Blutflusses im ehemals ischämischen Gebiet auf Grund einer Störung der Mikroperfusion. In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen CD4⁺ T-Zellen und veränderter Qualität der Mikroperfusion überprüft. Dazu wurden 1µm große blaue und nach einer kurzen Wartezeit und Verschluss der Ligatur 0,2µm rote Mikrosphären in das ischämisch-reperfundierte Myokard von MHC Klasse II KOs und WT-Mäuse injiziert. Blaue Mikrosphären verteilten sich, bedingt durch die Ligatur, die nach der Operation offen im Thorax verblieben war, ungehindert im Reperusionsareal. Durch den Wiederverschluss der Ligatur gelangten die roten Mikrosphären nur in das nicht-ischämische Areal des Myokards. 1 Minute später wurde das Herz entnommen und für histologische Analysen verwendet (Abbildung 9). Anhand der planimetrischen Vermessung der Areale ohne rote Mikrosphären in den Übersichtsbildern des Gesamtschnitts wurde die „low perfusion area“ (entspricht der „area at risk“) der operierten Tiere bestimmt und zeigte sich als vergleichbar in beiden Gruppen (WT I/ R vs. MHC Klasse II KO I/ R: „area at risk“: 37,1±9,2 vs. 32,7±6,2%; p=0,8; [n=7]; T-Test; Abbildung 38 A,B).

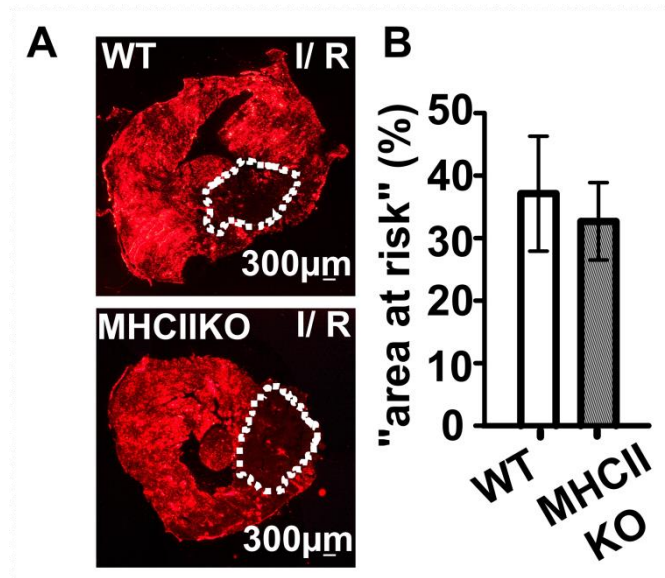


Abbildung 38: Planimetrische Bestimmung der AAR im mykardialen Mikroperfusionsassay.

WT und MHC Klasse II KO-Tiere zeigen nach I/ R im mykardialen Mikroperfusionsassay eine vergleichbare „area at risk“ (AAR). A) Repräsentative Kryoschnitte eines WT- und eines MHC Klasse II KO-Tieres nach I/ R und Mikrosphäreninjektion. Die „area at risk“ wird angezeigt durch Abwesenheit roter Mikrosphären (weiß gepunktete Bereiche; 25x Vergrößerung) B) Planimetrische Vermessung der „area at risk“.

Anhand der blauen Mikrosphären konnte gezeigt werden, dass die MHC Klasse II KOs im Infarktareal eine deutlich verbesserte Perfusion aufwiesen als die WT-Tiere (WT vs. MHC Klasse II KO: INF: $1,0 \pm 0,7$ vs. $3,6 \pm 0,2$; BZ: $2,6 \pm 0,8$ vs. $4,6 \pm 1,2$; Septum: $2,8 \pm 0,7$ vs. $5,0 \pm 1,7$; BZ: border zone; Abbildung 39 A,B).

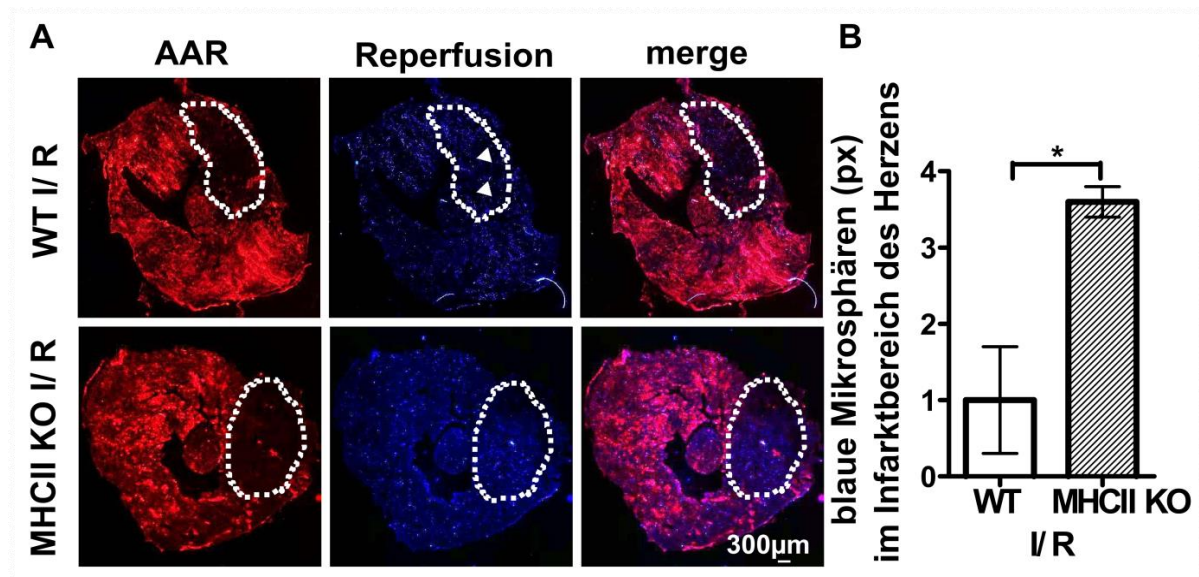


Abbildung 39: Verbesserte Mikroperfusion nach I/R in T-Zell defizienten Tieren. A) Repräsentative einzelne Bilder und Overlays von Kryoschnitten im myokardialen Mikroperfuptionsassay an einem WT- und MHC Klasse II-KO-Tier nach I/R. Areale ohne rote Mikrosphären zeigen die „area at risk“ an. Blaue Mikrosphären ermöglichen eine Aussage über die Qualität der Reperfusion. Weiß gepunktete Bereiche zeigen das Infarktareal an, weiße Pfeilspitzen „no reflow“ Bereiche (25x Vergrößerung). B) Die Quantifizierung der blauen Mikrosphären ergab eine signifikant bessere Mikroperfusion im MHC Klasse II KO mit weniger „no reflow“-Bereichen.

Bei vergleichbarer „area at risk“ wiesen MHC Klasse II KO-Tiere nach Reperfusion eine bessere Mikroperfusion im Infarktareal auf.

4.7.1 Hinweise auf T-Zell-Interaktion mit Endothel

Nachdem im myokardialen Mikroperfuptionsassay eine verbesserte Mikroperfusion in $CD4^+$ T-Zell defizienten Tieren gefunden worden war, wurde im Folgenden die Frage nach den mechanistischen Hintergründen gestellt. Durch die vorhergehenden Experimente konnten Neutrophile Granulozyten als Ursache ausgeschlossen werden. Als Arbeitshypothese wurde nun also eine durch den myokardialen Reperfusionsschaden getriggerte Interaktion von $CD4^+$ T-Zellen mit Endothelzellen formuliert, die sich auf die Mikroperfusion auswirkt. Um diese Arbeitshypothese zu

testen, wurde nach Veränderungen der Genregulation in Endothelzellen des T-Zell defizienten CD4 KOs gesucht. Dazu wurden WT und CD4 KO Mäuse der Ischämie-Reperfusion unterzogen. Endothelzellen wurden aus dem vorher ischämisch und reperfundierten Gewebe gesortet. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 40 gezeigt.

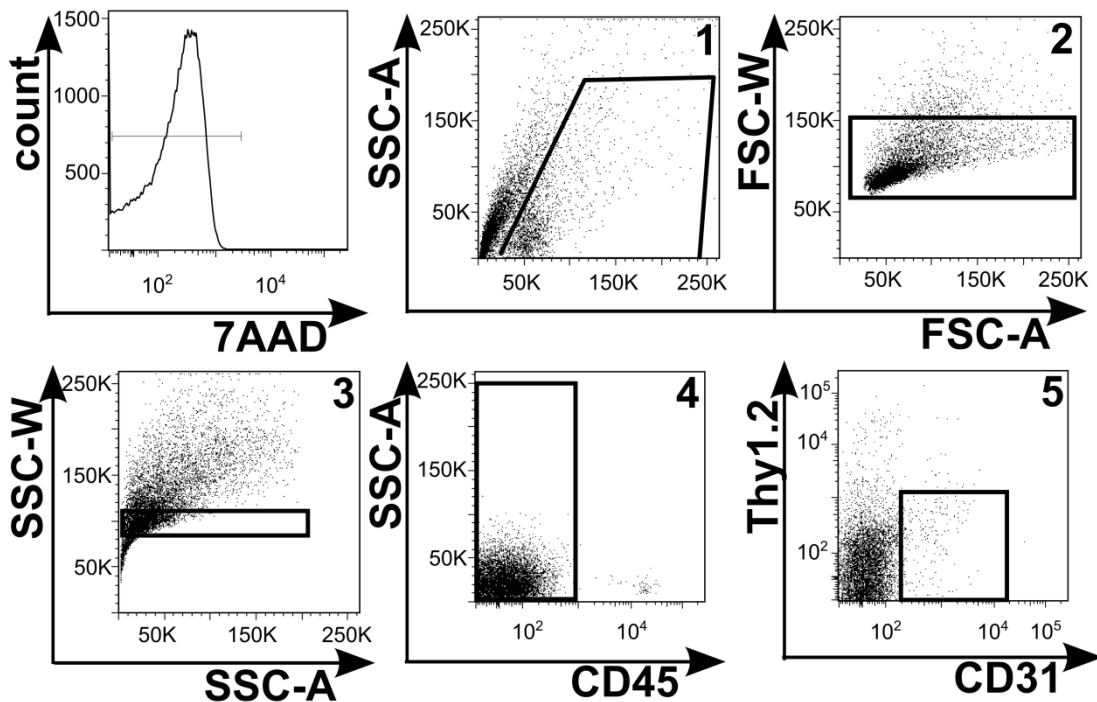


Abbildung 40: Gating-Strategie zum Sortieren von ECs aus Herzgewebe. Endothelzellen (ECs) wurden nach I/ R aus den Herzen operierter Tiere gesortet. Alle gesorteten Zellen waren 7-Aminoactinomycin (7AAD) negativ, CD45 negativ, CD31 positiv und Thy1.2 (CD90) negativ.

Aus den gesorteten Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mikro Kits RNA isoliert. Die mRNA wurde mit dem ExpressArt mRNA Amplifikation Kit C&E TR amplifiziert. Aus dem gewonnenen Material wurde ein RT Profiler PCR Array (Mouse Endothelial Cell Biology, PAMM-015ZA-2, Cat.No. 330231) durchgeführt. Gesortete Endothelzellen aus WT-Tieren nach I/ R wurden als Kontrollgruppe definiert. Als aussagekräftige Genregulation wurde ein fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert) von <-2 und >10 definiert (Tabelle 13).

Bezeichnung des Gens	Abkürzung	fold change CD4 KO / R vs WT / R
Superoxide dismutase 1, soluble	Sod1	-4,35
Caspase 1	Casp1	-3,78
Glucuronidase, beta	Gusb	-3,78
Beta-2 microglobulin	B2m	-2,50
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	-2,50
Caveolin 1, caveolae protein	Cav1	-2,33
Endothelial-specific receptor tyrosine kinase	Tek	-1,89
Annexin A5	Anxa5	-1,77
Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)	Mmp1a	-1,65
Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	Itgb1	-1,43
Coagulation factor II (thrombin) receptor	F2r	1,06
Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	Hsp90ab1	1,06
Kinase insert domain protein receptor	Kdr	1,06
Platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	1,06
Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Fas	1,30
Intercellular adhesion molecule 1	Icam1	1,40
Natriuretic peptide receptor 1	Npr1	1,40
Fibroblast growth factor 2	Fgf2	1,50
Cadherin 5	Cdh5	1,60
Thrombomodulin	Thbd	1,72
Bcl2-associated X protein	Bax	2,11
Endothelin 1	Edn1	2,79
Apolipoprotein E	Apoe	3,43

Ergebnisse

Endoglin	Eng	3,43
FMS-like tyrosine kinase 1	Flt1	3,68
Plasminogen activator, tissue	Plat	4,53
Bcl2-like 1	Bcl2l1	5,98
Transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	6,87
Vascular endothelial growth factor A	Vegfa	16,91
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	27,47
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2	27,47
Placental growth factor	Pgf	36,25
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	36,25
Natriuretic peptide type B	Nppb	n/d
Fibronectin 1	Fn1	n/d
Caspase 3	Casp3	n/d
Occludin	Ocln	n/d
Tissue factor pathway inhibitor	Tfpi	n/d
Vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	n/d
A disintegrin and metalloproteinase domain 17	Adam17	n/d
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Tnfsf10	n/d
Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2rl1	n/d
Interleukin 6	Il6	n/d
Matrix metalloproteinase 2	Mmp2	n/d
Protein C receptor, endothelial	Procr	n/d
Von Willebrand factor homolog	Vwf	n/d
Tumor necrosis factor	Tnf	n/d
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Cradd	n/d
Matrix metalloproteinase 9	Mmp9	n/d
Angiopoietin 1	Angpt1	n/d
Angiotensin II receptor, type 1a	Agtr1a	n/d
Angiotensinogen (serpin peptidase	Agt	n/d

inhibitor, clade A, member 8)		
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	n/d
Chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	n/d
Chemokine (C-X-C motif) receptor 5	Cxcr5	n/d
Endothelin 2	Edn2	n/d
Endothelin receptor type A	Ednra	n/d
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Fasl	n/d
Integrin beta 3	Itgb3	n/d
Interleukin 1 beta	Il1b	n/d
Interleukin 3	Il3	n/d
Interleukin 7	Il7	n/d
Plasminogen	Plg	n/d
Selectin, lymphocyte	Sell	n/d
Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	n/d
Thymidine phosphorylase	Tymp	n/d
Fibroblast growth factor 1	Fgf1	n/d
Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	n/d
Platelet factor 4	Pf4	n/d
Collagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	n/d
Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Itga5	n/d
Thrombospondin 1	Thbs1	n/d
Interleukin 11	Il11	n/d
Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Ptgis	n/d
Integrin alpha V	Itgav	n/d
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	n/d
Plasminogen activator, urokinase	Plau	n/d
Nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Nos3	n/d

Ergebnisse

Coagulation factor III	F3	n/d
Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Cx3cl1	n/d
Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	Ace	n/d
Kit oncogene	Kit	n/d
Selectin, platelet (p-selectin) ligand	Selplg	n/d
Selectin, endothelial cell	Sele	n/d
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	n/d
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	n/d
Selectin, platelet	Selp	n/d

Tabelle 13: RT² Profiler™ PCR Array Mouse Endothelial Cell Biology.

Nach I/ R wurden Endothelzellen aus CD4 KO Tieren und WT Tieren gesortet. Die Tabelle zeigt relative mRNA-Level (fold change; $2^{-\Delta\Delta C_t}$) von Genen, die in der Endothelzellbiologie von besonderer Bedeutung sind. n/d bezeichnet nicht detektierbare Gene. Eingesetzt wurde jeweils ein Pool aus amplifiziertem Material zweier operierter Tiere. Der Array wurde aus Kostengründen pro Genotyp nur 1x durchgeführt.

Die erhobenen Array-Daten und regulierten Gene wurden nun im Kontext der myokardialen Ischämie-Reperfusion und T-Zellimmunologie betrachtet. Dabei erwiesen sich die Gene Endoglin (Eng), Vascular endothelial growth factor A (VEGF α) und Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) als interessant und ihre Regulation wurde in weiteren qPCR TaqMan® Gene Expression Arrays im Einzelnen nachgeprüft (Abbildung 41).

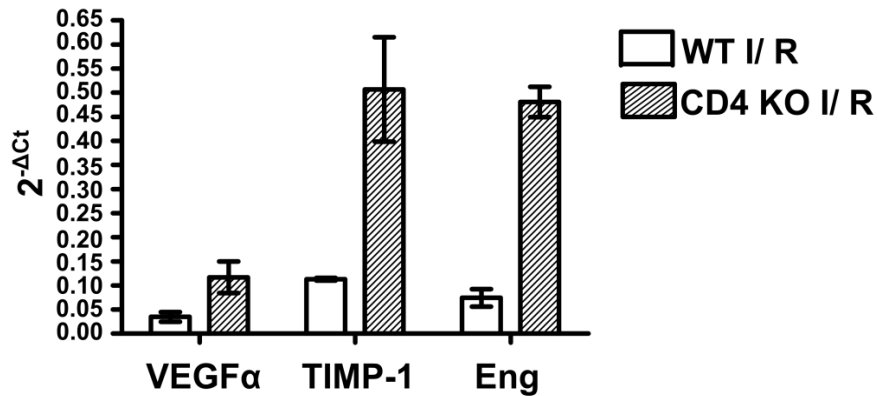


Abbildung 41: Genregulation gesorteter Endothelzellen aus CD4 KO-Tieren. Endothelzellen wurden aus operierten CD4 KO-Tieren gesortet. In der qRT-PCR zeigte sich eine Regulation der Gene Vascular endothelial growth factor A (VEGF α), Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) und Endoglin (Eng) versus WT nach I/ R. Angegeben ist die relative mRNA Expression ($2^{-\Delta C_t}$). Die Normierung erfolgte auf GAPDH (VEGF α : $p > 0,05$; TIMP-1: $p > 0,05$; Eng: $p < 0,001$; [n=2]).

Im T-Zell defizienten Tier waren nach Ischämie-Reperfusion in Endothelzellen die Gene VEGF α , TIMP-1 und Eng im CD4 KO versus WT reguliert. Die Ergebnisse dienen als erste mechanistische Hinweise auf eine Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Endothelzellen und eine mögliche Regulation der Perfusionsqualität.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich also wie folgt zusammenfassen (vgl. Abbildung 42): 30 min Ischämie und 24h Reperfusion bewirken eine Infiltration von Neutrophilen, CD4⁺, CD8⁺, NK und $\gamma:\delta$ T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen stellen die frequentiell größte Population dar und sind Mediatoren des myokardialen Reperfusionsschadens. In der Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen ist die Mikroperfusion verbessert. CD4⁺ T-Zellen werden Antigen-abhängig durch die I/ R aktiviert. Der Reperfusionsschaden wird nicht durch CD4⁺ T-Zell-Interaktion mit Neutrophilen Granulozyten mediiert, sondern offensichtlich durch eine T-Zell-Interaktion mit Endothelzellen (EC). Die Subpopulation der regulatorischen CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen wurde, unter dem Beitrag von CD4⁺CD25⁻ konventionellen T-Zellen, als wichtiger Regulator des myokardialen Reperfusionsschadens erkannt.

5 Diskussion

Die myokardiale Reperfusion stellt eine wesentliche Therapieform nach einem Myokardinfarkt dar. Obwohl sie die Infarktgröße reduziert und zu einem Benefit für den Patienten führt, ist die Identifizierung neuer zusätzlicher Therapieansätze essentiell, um den durch die Reperfusion verursachten Schaden einzudämmen. Das Immunsystem leistet einen wesentlichen Beitrag zum myokardialen Reperfusionsschaden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen, die zur erworbenen Immunität gehören, durch die myokardiale Ischämie-Reperfusion Antigen-abhängig aktiviert werden, auf die mikrovaskuläre Perfusion einwirken und so zum myokardialen Reperfusionsschaden beitragen. Die Subpopulation der $CD4^+Foxp3^+$ regulatorischen T-Zellen ist für den Reperfusionsschaden von besonderer Bedeutung.

5.1 Akkumulation von $CD4^+$ T-Zellen im Myokard nach Ischämie-Reperfusion

Die Kinetik der myokardialen Infiltration von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität sowohl nach permanentem Myokardinfarkt als auch nach Ischämie-Reperfusion war in den vergangenen 2 Jahrzehnten immer wieder von kardiologischem Interesse. So beschreiben Yan et al. in einem Modell von 45 Minuten Ischämie einen Peak an myokardialen $CD45^+$ Leukozyten und Gesamt- sowie $CD4^+$ T-Zellen nach 3 Tagen Reperfusion innerhalb eines experimentellen Zeitraums von einem bis zu sieben Tagen Reperfusion (Yan et al., 2013). Im Gegensatz dazu liegt in der hier vorliegenden Arbeit der Fokus auf den frühen Stunden der Reperfusion (3h – 24h), da dieses Zeitfenster von vorrangiger Bedeutung für die Infarktgröße, den Reperfusionsschaden und das klinische Ergebnis ist (Kloner, 2013). In der Tat stieg die absolute Zellzahl an myokardialen $CD3^+$ T-Zellen nach 24h Reperfusion im Vergleich zur scheinoperierten Kontrollgruppe signifikant an. Die Arbeit von Yang et al. betrachtet sogar noch

frühere Reperfusionzeitpunkte und zeigt im Modell der 45-minütigen Okklusion der LAD bereits nach 2 Minuten Reperfusion einen signifikanten Anstieg an CD3⁺ T-Lymphozyten auf, der bis zu 1h Reperfusion konstant erhalten bleibt (Yang et al., 2006).

Die gegenwärtige Arbeit untermauert die Relevanz von T-Zellen für den myokardialen Reperfusionsschaden und wählt ein realistisches Zeitfenster für die klinische Intervention. Darüber hinaus adressiert die vorliegende Arbeit die Frage nach dem Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen und regulatorischen T-Zellen nach Ischämie-Reperfusion. Dazu wurden frühe Aktivierungsmarker (CD69, CD44, CD154) verwendet. Bereits nach 3h Reperfusion waren CD4⁺ T-Zellen in Herz-drainierenden Lymphknoten und in der Zirkulation positiv für den frühen Aktivierungsmarker CD69; nach 24h Reperfusion war die Frequenz an CD44⁺ und CD154⁺ CD4⁺T-Zellen versus sham signifikant. Diese Daten belegen eine schnelle Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulation von regulatorischen T-Zellen durch Ischämie-Reperfusion.

5.2 Bedeutung von CD4⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen für die Infarktgröße

Eine Beteiligung von T-Lymphozyten am Reperfusionsschaden sowie deren Einfluss auf die Infarktgröße wurde in verschiedenen Organen wie Herz (Yang et al., 2006), Hirn (Hurn et al., 2007; Kleinschnitz et al., 2010), Leber (Zwacka et al., 1997), Niere (Rabb et al., 2000), Lunge (Geudens et al., 2007; de Perrot et al., 2003) und Intestinum (Linfert et al., 2009; Shigematsu et al., 2002) in der Vergangenheit bereits aufgezeigt. Als gängige Mausmodelle wurden RAG1^{-/-} Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen (Kleinschnitz et al., 2010), oder SCID (severe combined immunodeficiency) Mäuse (Shigematsu et al., 2002) verwendet. Im Kontext des Myokardinfarkts wurden in vorausgehenden Arbeiten RAG1^{-/-} Mäuse verwendet, die vor dem Infarktgeschehen geschützt waren. Durch adoptiven Transfer von CD4⁺ T-Zellen in RAG1^{-/-} Mäuse stieg die Infarktgröße wieder an (Yang et al., 2006). Antikörper-Depletion von CD4⁺, aber nicht CD8⁺ T-Zellen führte zur Reduktion der Infarktgröße (Yang et al., 2006). Zusätzlich wird in der vorliegenden Arbeit erstmals die CD4⁺ T-

Zell-Subpopulation der regulatorischen T-Zellen (Treg) untersucht und als zentraler Vermittler des myokardialen Reperfusionsschadens identifiziert. Treg-depletierte DEREK Mäuse waren signifikant vor dem Infarktgeschehen geschützt. Singulär betrachtet erscheint dieses Ergebnis zunächst überraschend, da regulatorische T-Zellen generell als prototypische anti-inflammatorische Zellen betrachtet werden, die Antigen-spezifische Immunreaktionen kontrollieren und eindämmen (Zheng, 2013). Interessanterweise ist dieses Ergebnis einer Protektion der DEREK Maus im myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell kongruent mit Erkenntnissen von Kleinschnitz et al. im cerebralen Modell der transienten Okklusion der Arteria cerebri media (tMCAO; transient middle cerebral artery occlusion). Im tMCAO-Modell führte die selektive Depletion von regulatorischen T-Zellen in der DEREK Maus zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße und einer verbesserten neurologischen Funktion 24h nach einem Schlaganfall (Kleinschnitz et al., 2012).

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden regulatorische T-Zellen, die konstitutiv die IL-2R α -Kette (CD25) auf ihrer Oberfläche exprimieren, mittels eines anti-CD25-Antikörpers depletiert. Dieses Experiment führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße. Die Effektivität einer Depletion von regulatorischen T-Zellen mit einem anti-CD25 Antikörper wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. So beschreiben Kohm et al., dass der anti-CD25 Antikörper zu einer funktionellen Inaktivierung durch Epitop-Shedding und nicht zu einer Depletion der regulatorischen T-Zellen führt (Kohm et al., 2006). Stephens und Anderton sowie Zelenay und Demengeot zeigen dagegen auf, dass die von Kohm et al. beschriebenen Effekte vom verwendeten Klon (7D4, PC 61) des anti-CD25 Antikörpers abhängen (Stephens and Anderton, 2006),(Zelenay and Demengeot, 2006),(Couper et al., 2007). So führt die Gabe des Klons 7D4 zu einem Verlust an CD25-Expression auf der Zelloberfläche, wobei die FOXP3⁺ Frequenz unverändert ist (Kohm et al., 2006; Zelenay and Demengeot, 2006). Die Gabe von 500 μ g des Klons PC 61 pro Maus führte hingegen zu einem Verlust an CD25-Expression auf der Zelloberfläche und dem Verlust von CD4⁺FOXP3⁺ Zellen (Zelenay and Demengeot, 2006). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Klon PC 61 verwendet. Couper et al. zeigen zusätzlich, dass der anti-CD25 Antikörper (Klon PC61) für mehrere Tage im System verbleibt und zu einer sterischen Hinderung für Fluorochrom-konjugierten anti-CD25 Antikörper führt, was die Interpretation der

Daten limitiert (Couper et al., 2007, 2009; Kassiotis, 2011; Lahl and Sparwasser, 2011). Interessanterweise zeigen Couper et al. auch, dass Versuche der Antikörper-vermittelten Depletion von Treg-Zellen nicht in der Lage waren, CD25⁺Foxp3⁺ oder CD25^{low} Foxp3⁺ Zellen zu depletieren, die möglicherweise noch über regulatorisches Potential verfügen (Couper et al., 2007). Dass in der vorliegenden Arbeit die Antikörper-vermittelte Treg Depletion in der myokardialen Ischämie-Reperfusion die Daten der DEREK-Maus nicht signifikant bestätigt, kann also mehrere Ursachen haben. Möglicherweise sind in der vorliegenden Arbeit trotz Antikörper-Depletion noch genügend CD4⁺ Treg-Zellen im System, die einen schädlichen Effekt ausführen können.

Um die Erkenntnisse zu Treg-Zellen in der myokardialen Ischämie-Reperfusion weiter zu stützen, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Der Transfer von regulatorischen versus konventionellen T-Zellen führte zu gleichen Infarktgrößen und hatte somit keinen Effekt. Der Transfer von CD4⁺ Bulk-T-Zellen hingegen ergab einen signifikanten Anstieg der Infarktgröße im Vergleich zur konventionellen Gruppe und somit eine Zunahme an Schaden. Jedoch konnte nicht die Infarktgröße des unbehandelten WT-Tieres wiederhergestellt werden. Somit wurden die erhobenen Daten des Transfers von CD4⁺ versus konventionellen T-Zellen als „partieller Rescue“ bezeichnet. Die Experimente wurden hinsichtlich Zeitpunkt, Zellzahl und Art des Transfers analog zu vergleichbaren Experimenten in der aktuellen Literatur (Kleinschnitz et al., 2012) durchgeführt. Da der Unterschied beim Transfer von Gesamt-CD4⁺ T-Zellen versus konventionellen T-Zellen signifikant war, konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass Treg-Zellen alleine nicht in der Lage sind, den Schaden zu vermitteln, sondern ein Zusammenwirken von regulatorischen und konventionellen T-Zellen für den myokardialen Schaden verantwortlich zu sein scheint. Die Aktivierungsdaten lassen vermuten, dass sowohl regulatorische als auch konventionelle T-Zellen gleichermaßen durch die Ischämie-Reperfusion aktiviert werden. Ferner ist es auch wahrscheinlich, dass von CD4⁺ T-Zellen Zytokine exprimiert werden, die am Reperfusionsschaden beteiligt sind. Möglicherweise erfordert eine Treg-Antwort im Myokard Faktoren, die von konventionellen T-Zellen zur Verfügung gestellt werden. Hier käme IL-2 in Frage, das für die Entwicklung von Treg-Zellen im Thymus, das Überleben und die Expansion sowie für die Homeostase

und Funktion von regulatorischen T-Zellen von Bedeutung ist (Fontenot et al., 2005), (Vang et al., 2008).

5.3 Zytokine als Mediatoren der Treg-Antwort im myokardialen Reperfusionsschaden

Regulatorische T-Zellen bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Zellen, „natural“ Treg-Zellen (nTreg) und „induced“ Treg-Zellen (iTreg) (Yuan and Malek, 2012), (Lehtimäki and Lahesmaa, 2013). Aufgrund der schnellen Hochregulation von CD69 auf Treg-Zellen nach 3h Reperfusion im vorliegenden experimentellen Modell und der Spezifität von Treg-Zellen für Autoantigene (Schmetterer et al., 2012) ist es eher wahrscheinlich, dass die Effekte in der myokardialen Ischämie-Reperfusion nTreg-Zell-vermittelt sind. Unter bestimmten Bedingungen können Treg-Zellen ihren Suppressor-Phänotyp verlieren und in pro-inflammatorische Zellen wie T_H17-Zellen, die IL-17 sekretieren, reprogrammiert werden; dieser Prozess ist von IL-6 abhängig (Sharma et al., 2013). Außerdem sind die Faktoren IL-6 und Hypoxie in der Lage, Treg-Zellen über den HIF-1-Signalweg in T_H17-Zellen zu konvertieren (Barbi et al., 2013). Beim Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1 α) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch Hypoxie stabilisiert wird. Für die Foxp3- und IL-17-Induktion ist u.a. auch der TGF- β 1-Signalweg erforderlich (Yang et al., 2008). Um die Funktion von regulatorischen T-Zellen zu untersuchen und die Hypothese der Reprogrammierung von Treg-Zellen zu stützen, wurde das Zytokinprofil von gesorteten regulatorischen und konventionellen T-Zellen aus Herz-drainierenden Lymphknoten nach Ischämie-Reperfusion versus sham analysiert. IL-6 und IL-17 konnten auf den gesorteten T-Zellen nicht detektiert werden, während sowohl konventionelle als auch regulatorische T-Zellen eine Regulation von TGF- β zeigten. Konventionelle T-Zellen zeigten eine deutlichere Regulation von HIF-1 α als regulatorische T-Zellen. Somit konnte eine mögliche Reprogrammierung nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Limitation in diesem Experiment stellte auch die geringe Verfügbarkeit von Zellen aus dem I/ R Myokard dar, die das technisch anspruchsvolle Sorting und die RNA Amplifikation erforderlich machte.

5.4 Antigenerkennung in der myokardialen Ischämie-Reperfusion

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Protektion der CD4 KO Maus. Da diese Maus möglicherweise MHC Klasse I- restringierte CD8⁺ T-Zellen besitzt, die über MHC Klasse II-präsentierte Autoantigene aktiviert werden können (Tyznik et al., 2004), wurde zur mechanistischen Klärung der Antigenerkennung und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen die T-Zell-Rezeptor transgene OT-II Maus verwendet, in der kein physiologisches Antigen-Portfolio erkannt werden kann. Die OT-II-Maus war vor dem Infarktgeschehen geschützt. Möglicherweise ist für die reduzierten Infarktgrößen in OT-II-Mäusen auch eine eingeschränkte Funktion von Treg-Zellen verantwortlich. Föhse et al. zeigten 2011, dass eine hohe T-Zell-Rezeptor-Diversität für eine optimale Suppressorfunktion von Treg-Zellen in experimenteller „Graft versus Host Disease“ (GvHD; Transplantat-Wirt-Reaktion) notwendig ist (Föhse et al., 2011). Auch die MHC Klasse II KO Maus, die sowohl keine T-Zellen besitzt als auch keine Antigenerkennung im Kontext von MHC Klasse II ermöglicht, war geschützt. Somit erbringt die vorliegende Arbeit den experimentellen Beleg, dass CD4⁺ T-Zellen im Modell der myokardialen Ischämie-Reperfusion über den MHC Klasse II-Komplex Antigen erkennen, aktiviert werden und den Reperfusionsschaden vermitteln. Die Frage nach der Antigen-Abhängigkeit in der Ischämie-Reperfusion wurde in der Vergangenheit bereits in anderen Organen adressiert und führte zu unterschiedlichen Erkenntnissen. In einigen Arbeiten aus dem Kontext der Lebertransplantation wird der Ischämie-Reperfusionsschaden als primär Antigen-unabhängiger inflammatorischer Faktor beschrieben (Ke et al., 2005; Shen et al., 2009, 2002). Die Inhibition einer CD4⁺ T-Zell-Aktivierung mit einem monoklonalen YTS177 Antikörper (anti-CD4 Epitop) (Qin et al., 1990) ohne Depletion der CD4⁺ Zielzellen war nicht in der Lage, die Leber vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden zu bewahren, woraus geschlossen wurde, dass T-Zellen im Leber-Ischämie-Reperfusionsschaden ohne Antigen-spezifische de-novo Aktivierung agieren (Shen et al., 2009). Es liegen aber auch Arbeiten vor, die im Leber-Ischämie-Reperfusionsschaden eine Antigen-abhängige T-Zell-Antwort aufzeigen. So ist die OT-II Maus im Lebermodell analog zur myokardialen Ischämie-Reperfusion geschützt (Kuboki et al., 2009). Auch im Modell des ischämischen Schlaganfalls

wurden von Kleinschnitz et al. umfangreiche murine Studien zu dieser Thematik durchgeführt. So wurden u.a. auf MHC Klasse II limitierte OTII/ RAG1 Mäuse (spezifisch für Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉) und auf MHC Klasse II limitierte 2D2/ RAG 1 Mäuse (spezifisch für MOG₃₅₋₅₅) verwendet. Um eine Relevanz der T-Zell-Rezeptor-Costimulation im experimentellen Schlaganfall zu untersuchen wurden ferner CD28^{-/-}, PD1^{-/-} und B7-H1^{-/-} Mäuse eingesetzt. Im Modell der tMCAO waren alle T-Zell-Rezeptor transgenen Tiere, bei denen nur 1 definiertes Antigen erkannt werden kann, sowie KOs mit beeinträchtigten kostimulatorischen Signalen anfällig für die fokale Hirnischämie (Kleinschnitz et al., 2010), womit eine Antigen-unabhängige T-Zell-Antwort vorliegt. Diese Studien zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen im Ischämie-Reperfusionsgeschehen organabhängig unterschiedlich zu einer Immunantwort bewegt werden. Als wahrscheinliche Erklärung hierfür kann die organspezifisch unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung und die Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. Dendritischen Zellen angeführt werden. Im Myokard weisen die aufgezeigten Experimente an der OT-II und MHC Klasse II KO Maus auf eine Antigen-Abhängigkeit hin. Es wäre also z.B. denkbar, dass im Myokard Dendriten zwischen Endothelzellen hindurch ins Gefäßlumen gelangen und CD4⁺ T(reg)-Zellen durch MHC Klasse II-Präsentation auf Endothelzellen aktivieren (Perez et al., 1998),(Lozanoska-Ochser et al., 2008),(Thornton et al., 2012).

Die Identität eines für die T-Zellaktivierung relevanten (Auto-)Antigens in der myokardialen Ischämie-Reperfusion ist bisher nicht geklärt. Lv et al. zeigten jüngst, dass die α -Isoform der Myosin-heavy chain (α -MyHC) weder in Maus noch im Menschen im Thymus exprimiert wird und daher keiner thymischen (zentralen Toleranz) unterliegt. Dieses prototypische myokardiale Autoantigen wurde als Autoantigen für pathogene CD4⁺ T-Zellen im Mausmodell der Myokarditis (Lv et al., 2011) identifiziert und mag auch im Kontext des vorliegenden Modells eine Rolle spielen. Andererseits mag die T-Zellantwort sich hier nicht nur auf myokardspezifische, sondern universelle nicht-gewebsspezifische Autoantigene beziehen, die durch den ischämischen Schaden in größerer Menge freigesetzt werden.

Zusammengefasst stellen die CD4 KO, OT-II und MHC Klasse II Mäuse Modelle zur Analyse des T-Zell-abhängigen Reperfusionsschadens und einer Antigenerkennung dar und führen übereinstimmend zu dem Ergebnis der signifikanten Reduktion der

Infarktgröße. Diese Daten sprechen für ein Antigen-abhängiges System und belegen die zentrale Rolle von CD4⁺ T-Zellen am myokardialen Reperfusionsschaden.

5.5 CD40L-Beteiligung am T-Zell-vermittelten Reperfusionsschaden

Der CD154 (CD40L)-CD40 Signalweg stellt ein essentielles sekundäres Signal zum Beginn und Erhalt der T-Zell-abhängigen Immunantwort dar (Sayegh and Turka, 1998). In dieser Arbeit wurde das Molekül CD154 bei Einleitung der Reperfusion durch Antikörper-Gabe inhibiert. Die Inhibition führte zur signifikanten Reduktion der Infarktgröße und stellt somit eine potentielle Therapie dar. Die Identifizierung von CD154 als protektiv im Kontext der myokardialen Ischämie-Reperfusion deckt sich mit Erkenntnissen aus anderen Organen. So verbesserte die Unterbrechung des CD154-Signalwegs mit dem hier verwendeten monoklonalen anti-CD154-Antikörper (Klon MR1) einen Reperfusionsschaden an der Leber. Die Transaminase-Spiegel im Serum und eine T_H1- vermittelte Zytokinproduktion sanken, während anti-apoptotische Proteine (Bcl-2/Bcl-xl) induziert und das pro-apoptotische Protein Caspase 3 unterdrückt wurden (Ke et al., 2005). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt Shen et al. in einem analogen Modell (Shen et al., 2009). Auch im Modell des postischämischen Lungenschadens (Moore et al., 2002) war die Immunoneutralisation von CD40 und CD40L mit einem Benefit verbunden.

Die Expression und primäre Funktion des Oberflächenrezeptors CD40 und seines Liganden CD154 wird generell B- und T-Lymphozyten zugeschrieben. Jedoch kann auch eine Vielzahl anderer Zelltypen sowohl den Rezeptor als auch den Liganden exprimieren, z.B. Monozyten, Dendritische Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen (Schönbeck and Libby, 2001) oder Plättchen (Delmas et al., 2005; Ishikawa et al., 2005; Khandoga et al., 2006). Auch Plättchen wurden vor Kurzem als wichtige Mediatoren des myokardialen Reperfusionsschadens erkannt (Mathes und Pachel et al., unveröffentlicht) und bereits 2001 zeigte eine klinische Studie, dass CD154 auf Plättchen, ebenso wie Spiegel an löslichem CD154, in Patienten mit instabiler Angina und Myokardinfarkt erhöht sind (Garlichs et al., 2001). Die vorliegende Arbeit zeigt einen protektiven Effekt der CD154-Inhibition in der

myokardialen Ischämie-Reperfusion jedoch steht der experimentelle Beweis einer direkten Korrelation mit CD4⁺ T-Zellen noch aus.

5.6 Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten nach Ischämie-Reperfusion im T-Zell KO

Im Kontext der akuten Inflammation werden Neutrophile Granulozyten schnell zum Ort des Geschehens rekrutiert (Kolaczowska and Kubes, 2013). Die vorliegende Arbeit bestätigt dies und zeigt, dass es nach Ischämie-Reperfusion zur signifikanten Zunahme der Frequenzen an Neutrophilen Granulozyten sowohl im Herzen als auch im Blut kommt. Diese Rekrutierung ist multifaktoriell bedingt und bereits früher belegt. So können z.B. ein Reperfusion-induzierter Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies, eine Zytokinproduktion und das Komplementsystem (Schofield et al., 2013) Ursachen der Neutrophileninfiltration sein. Oxidantien und Proteasen verursachen als Folge lethalen Schaden am koronaren vaskulären Endothel und an Kardiomyozyten (Vinten-Johansen, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Hypothese getestet, dass Neutrophile Granulozyten als „Linker“ zwischen angeborener und adaptiver Immunität fungieren und so den adversen Effekt von CD4⁺ T-Zellen medieren. Als vor kurzem entschlüsselter Mechanismus wäre hierbei eine NETose (Bildung von „neutrophil extracellular nets“) denkbar, die CD4⁺ T-Zellen aktiviert, indem sie ihren Aktivierungs-Threshold herabsetzt (Tillack et al., 2012),(Kolaczowska and Kubes, 2013). Die koronare Neutrophileninfiltration in T-Zell-defizienten CD4 KO Tieren und WT Tieren wurde in dieser Arbeit nach dem myokardialen Reperfusionsschaden verglichen. Es ergaben sich vergleichbare Zellzahlen an Neutrophilen Granulozyten im CD4 KO und im WT. Nach 24h Reperfusion konnte also kein direktes Rekrutierungsphänomen zwischen T-Zellen und Neutrophilen Granulozyten im murinen myokardialen Reperfusionsschaden nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte der Zeitpunkt der Reperfusion sein. Wie Yan et al. beschreiben, ist im Langzeitversuch einer myokardialen Reperfusion (Tag 1 bis Tag 7) nach 24h Reperfusion das Maximum der absoluten Zellzahl an infiltrierenden Neutrophilen Granulozyten erreicht (Yan et al., 2013). Aus dem Schlaganfallmodell ist bekannt, dass Neutrophile

Granulozyten nach 4h Reperfusion 85% aller adhärenen Leukozyten ausmachen, während nach 24h Reperfusion nur noch 20% der adhärenen Leukozyten Neutrophile sind (Yilmaz et al., 2006),(Yilmaz and Granger, 2010). Somit findet eventuell eine Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zu früheren Reperfusionzeitpunkten statt.

5.7 CD4⁺ T-Zell-vermittelte Veränderung der Mikroperfusion

Funktionell zeigt diese Arbeit eine verbesserte Mikroperfusion im reperfundierten Myokard im MHC Klasse II KO. Eine mögliche Erklärung stellt eine T(reg)-Zell-vermittelte mikrovaskuläre Dysfunktion dar, die zu einem Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität durch Interaktion von T(reg)-Zellen mit myokardialen Endothelzellen führt, wie sie von Kleinschnitz et al. im tMCAO-Modell (transient middle cerebral artery occlusion) postuliert wird (Kleinschnitz et al., 2012). Im tMCAO-Modell interagieren Treg-Zellen mit dem ischämischen Hirn-Endothel in einem Selektin- und Integrin-vermittelten Mechanismus über den LFA-ICAM 1-Signalweg, was zu einem Anstieg der Infarktgröße führt (Kleinschnitz et al., 2012). Weiterhin denkbar ist ein zusätzlicher zellulärer „Cross-Talk“ zwischen CD4⁺ T(reg)-Zellen, Endothelzellen und Plättchen, die durch Ischämie-Reperfusion aktiviert werden. Aus dem Mausmodell des postischämischen Leberschadens ist z.B. bekannt, dass CD4⁺ T-Zellen das Endothel über CD40L-CD40 und CD28-B7 kostimulatorische Signalwege aktivieren und an Plättchen binden, die Plättchen-Adhärenz an das Endothel steigt und es kommt zum Versagen der sinusoidalen Perfusion sowie nekrotischen Gewebeschaden (Khandoga et al., 2006).

5.8 Veränderte endotheliale Genexpression im T-Zell-KO versus WT nach Ischämie-Reperfusion

Um die verbesserte Mikroperfusion im T-Zell-Knockout mechanistisch aufzuklären, wurde eine mögliche Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellen und Endothelzellen postuliert. Endothelzellen wurden aus CD4 KO und WT Mäusen jeweils nach myokardialer Ischämie und Reperfusion gesortet. Die Regulation verschiedener

Gene wurde mit einem kommerziellen RT-PCR Array aus dem Bereich der Endothelzellbiologie überprüft. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte ein breites Spektrum an Genen betrachtet werden. Besonders deutlich regulierte Gene wurden anschließend separat erneut analysiert. Endothelzellen aus CD4 KOs hatten eine höhere mRNA Expression von Endoglin (Eng), Vascular endothelial growth factor (VEGF α) und Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). Der Beitrag von CD4⁺ T-Zellen zur Regulation dieser der Angiogenese zuzuordnenden Gene ist im Kontext der Ischämie-Reperfusion unklar. Wahrscheinlich sind T-Zell-assoziierte Zytokine für die Regulation dieser Gene verantwortlich. Bekannt ist, dass die Ischämie-Reperfusion per se zu einer transienten Gewebehypoxie führt und das Endothel aktiviert. Der Anstieg des „Hypoxia-inducible factor 1“ (HIF-1) ist ein früher Marker für ein ischämisches Ereignis wie den Myokardinfarkt (Lee et al., 2000) und scheint eine zentrale Rolle in der Regulation oben aufgeführter Gene einzunehmen. So bindet der HIF-1-Komplex an ein funktionales Element im Endoglinpromotor (López-Novoa and Bernabeu, 2010), wobei Endoglin auch ein TGF- β -Korezeptor ist (Sánchez-Elsner et al., 2002), und auch VEGF hat eine regulatorische HIF-1 Sequenz in seiner Promotorregion (Lee et al., 2000). Am Kaninchen wurde im Ischämie-Modell gezeigt, dass die Gabe von VEGF im Zeitraum von 2 und 3 Stunden nach MCAO das Infarktvolume, den Wassergehalt und neurologische Defizite signifikant reduziert (Yang et al., 2012). Timp-1 ist ein endogener Regulator der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9). Im Modell der tubulointerstitiellen Fibrose erhöhte der proinflammatorische Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), aber nicht das Interleukin-1 β (IL-1 β) dosisabhängig die latente Form von MMP-9 während die Timp-1 Expression sowohl durch TNF- α als auch IL-1 β sank (Nee et al., 2004). In Hepatozyten wurde die Proteinexpression von Timp-1 durch IL-1 β und IL-6 stimuliert (Roeb et al., 1995). Bei TNF- α , IL-1 β und IL-6 handelt es sich um multifunktionale Zytokine, die auch während der Ischämie-Reperfusion reguliert sind (Sharma and Das, 1997). Möglicherweise kann also die Timp-1 Regulation durch eine abgemilderte Expression proinflammatorischer Zytokine in Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen erklärt werden. Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster von Genen in Endothelzellen und T-Zellen nach myokardialer Ischämie-Reperfusion, der eventuell auch Einfluss auf die Mikroperfusion nimmt. Letztendlich könnte das beobachtete Genexpressionsmuster auch unabhängig von T-Zellen ein Resultat der verringerten Infarktgröße im CD4⁺ defizienten Tier sein.

Die vorliegende Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass $CD4^+$ T-Zellen und regulatorische T-Zellen eine Schlüsselstellung in der Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens einnehmen. Während Ischämie und Reperfusion Antigen-abhängig eine Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen induzieren, führt die Abwesenheit von $CD4^+$ und regulatorischen T-Zellen zu einer Reduktion der Infarktgröße. Eine verbesserte Mikroperfusion des reperfundierten Myokards im T-Zell-Knockout ist möglicherweise auf eine Interaktion von $CD4^+$ T-Zellen mit Endothelzellen zurückzuführen.

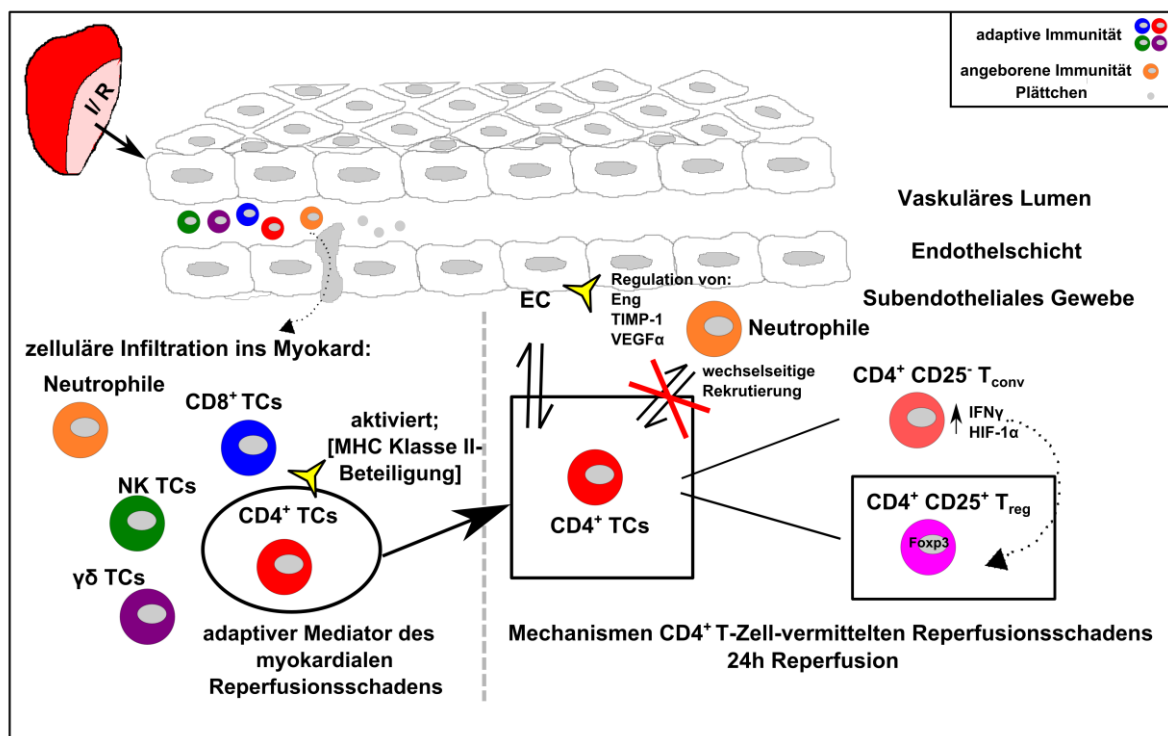


Abbildung 42: Mechanistische Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

$CD4^+$ Treg-Zellen wurden als relevant im myokardialen Reperfusionsschaden identifiziert [(modifiziert nach Michael (Michael et al., 1995), Eltzschig und Eckle (Eltzschig and Eckle, 2011))].

5.9 Ausblick

Das Auffinden neuer Therapiestrategien für den Myokardinfarkt ist von aktueller Relevanz, da die Reperfusionstherapie per se zu Schaden am Myokard führt. Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass die inflammatorische Reaktion zum Reperfusionsschaden beiträgt, doch neue Therapiestrategien waren limitiert durch die unvollständige Aufklärung der intra- und interzellulären Aktion von Immunzellen (Arslan et al., 2011).

Durch die hier vorliegende Arbeit kann der Beitrag der adaptiven Immunität zur Pathophysiologie des myokardialen Reperfusionsschadens auf T-Zell-Ebene besser verstanden werden. Es wurden mehrere Faktoren analysiert, die als mögliche neue therapeutische Zielstrukturen zur Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens in Frage kommen.

Regulatorische T-Zellen wurden in verschiedenen klinischen Fragestellungen, besonders Krebs und Organtransplantation (Trzonkowski et al., 2013), seit Längerem als vielversprechendes Agens erkannt und z.T. wurden auch schon Interventionen an Patienten durchgeführt. Als bereits klinisch gut etablierte Treg-depletierende oder inhibierende Krebstherapeutika sind z.B. niedrige Dosen von Cyclophosphamid, Interleukin-2 oder anti-Interleukin-2-Rezeptor Toxine zu nennen (Golovina and Vonderheide, 2010). Vertreter sind das IL-2 Fusionsprotein Denileukin Difitox (ONTAK) (Hobeika et al., 2011) oder der monoklonale anti-IL-2R α Antikörper Daclizumab (Sampson et al., 2012). Daclizumab wurde begleitend mit einer auf den EGFRvIII (epidermal growth factor receptor variant III) abzielenden Vakzinierung eingesetzt. Dies führte in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Pilotstudie an Temozolomid-behandelten Patienten mit Glioblastom zur Depletion von CD4⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen und war sicher und effektiv (Sampson et al., 2012). Ein Eingriff in die T-Zell-Biologie zur Therapie des Myokardinfarkts steht noch ganz am Anfang und weitere tierexperimentelle und klinische Studien sind für dieses Vorhaben absolut notwendig. Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen und Treg-Zellen signifikant die Infarktgröße reduzierte, wäre eine vorübergehende pharmakologische Depletion oder Inhibition von CD4⁺

(regulatorischen) T-Zellen mit Einleitung der Reperfusion als neuer Therapieansatz denkbar.

Anhand der OT-II und MHC Klasse II Knockout Mäuse, die in der myokardialen Ischämie-Reperfusion geschützt waren, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Autoantigenerkennung geschlossen. Zur weiteren Reproduktion dieser Daten und eventuell auch zur Auffindung eines Ansatzes mit klinischer Relevanz würde die pharmakologische Inhibition der Antigen-Erkennung durch die T-Zelle prinzipiell einen eleganten Weg zur Reduktion des Reperfusionsschadens darstellen. Als weiteres Experiment wäre also die Applikation eines anti-MHC Klasse II-Antikörpers bei Reperfusion mit anschließender Ermittlung der Infarktgröße per Evans`Blue/ TTC-Färbung denkbar. In der Literatur kommt dazu z.B. der Blocking-Antikörper gegen I-A^{b,d,q} / I-E^{d,k} Alloantigene (Klon M5/114.15.2, BioLegend) im Leber-Ischämie-Reperfusionsmodell zum Einsatz (Khandoga et al., 2006). Dieser wurde in einer Dosis von 1mg/ kg in der Maus verwendet. Zusätzlich wurden auch höhere Antikörper-Dosen (2mg/ kg und 3mg/kg) getestet, die keinen Unterschied im Vergleich zur niedrigen Dosis von 1mg/ kg ergaben. Im Leber-Kontext hatte die Blocking-Antikörper-Gabe versus IgG2b-κ (Dosis 1mg/ kg) keinen Effekt, was als MHC Klasse-unabhängiger Mechanismus interpretiert wurde. Die Akkumulation von Plättchen in den Sinusoiden, die Leukozyten-Adhärenz in den Venolen, das sinusoidale Perfusionsversagen und der Gehalt an Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) in [U/ L] waren in der Blocking- und Kontrollgruppe nahezu identisch (Khandoga et al., 2006). Ausgehend von diesem Experiment von Khandoga et al. in der Leber wäre ein vergleichbarer Ansatz mit titrierter Antikörper-Dosis im gesättigten Bereich auch im myokardialen Reperfusionsschaden interessant. Zusätzlich zu zeigen wäre eine tatsächliche funktionelle Blockade des MHC Klasse II Rezeptors durch den Antikörper. Eine Änderung der Frequenzen bzw. des Aktivierungsstatus von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen und die Expression von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche wäre zu analysieren. Unter Berücksichtigung der durchzuführenden Vorversuche in vitro und in vivo handelt es sich bei einem LEAFTM purified anti-mouse I-A/ I-E Antibody (M5/11.15.2) eventuell um einen Antikörper, der präventiv zur Reduktion des myokardialen Reperfusionsschadens appliziert werden kann.

Der monoklonale Antikörper gegen CD154 wurde bereits in mehreren experimentellen Tierstudien als vielversprechende Therapieoption für Immunsystem-assoziierte Erkrankungen wie Atherosklerose, Multiple Sklerose und EAE (experimental allergic encephalomyelitis) (Gerritse et al., 1996), SLE (systemischer Lupus erythematoses), rheumatoider Arthritis, Dermatomyositis oder Transplantatabstoßung erkannt (Chitnis and Khoury, 2003), (Daoussis et al., 2004). Klinische Tests stehen noch aus. Eine Inhibition von CD154 bei Einleitung der Reperfusion führte in der vorliegenden Arbeit auch im kardialen Kontext im Mausmodell zur signifikanten Reduktion der Infarktgröße und erwies sich somit als wirksam zur Verringerung des myokardialen Reperfusionsschadens. Um nachzuweisen, dass die Reduktion der Infarktgröße auf eine Inhibition von CD154 auf CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen ist, werden im nächsten Schritt Transferexperimente von CD4⁺ T-Zellen aus CD154^{-/-} Mäusen zum Einsatz kommen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit identifizieren CD4⁺ Treg-Zellen bzw. ihre T-Zell-Rezeptor- und Liganden-vermittelten Aktivierungsmechanismen als potentiell erfolgversprechend zur Minimierung des myokardialen Reperfusionsschadens.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, A.K. (2012). *Cellular and molecular immunology* (Philadelphia, Pa.: Elsevier, Saunders).

Adamek, A.K. Einfluss des Immunsystems und der endothelialen NO-Synthese auf den myokardialen ischämischen Schaden, Influence of immune system and endothelial NO synthase on myocardial ischemic injury.

Adamek, A., Jung, S., Dienesch, C., Laser, M., Ertl, G., Bauersachs, J., and Frantz, S. (2007). Role of 5-lipoxygenase in myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 51–54.

Aghaeepour, N., Finak, G., FlowCAP Consortium, DREAM Consortium, Hoos, H., Mosmann, T.R., Brinkman, R., Gottardo, R., and Scheuermann, R.H. (2013). Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods* 10, 228–238.

Allan, S.E., Broady, R., Gregori, S., Himmel, M.E., Locke, N., Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., and Levings, M.K. (2008). CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol. Rev.* 223, 391–421.

Amsen, D., Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2009). How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr. Opin. Immunol.* 21, 153–160.

Arslan, F., Smeets, M.B., O'Neill, L.A.J., Keogh, B., McGuirk, P., Timmers, L., Tersteeg, C., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., et al. (2010). Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 121, 80–90.

Arslan, F., de Kleijn, D.P., and Pasterkamp, G. (2011). Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 292–300.

Barbi, J., Pardoll, D., and Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol. Rev.* 252, 52–77.

Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* 76, 34–40.

Baxter, A.G., and Hodgkin, P.D. (2002). Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 439–446.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 27, 20–21.

Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, C.F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 102, 459–471.

Blömer, N., Pachel, C., Hofmann, U., Nordbeck, P., Bauer, W., Mathes, D., Frey, A., Bayer, B., Vogel, B., Ertl, G., et al. (2013). 5-Lipoxygenase facilitates healing after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 108, 367.

De Boer, O.J., Li, X., Teeling, P., Mackaay, C., Ploegmakers, H.J., van der Loos, C.M., Daemen, M.J., de Winter, R.J., and van der Wal, A.C. (2013). Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 109, 290–297.

Böhm, M. (2003). *Arzneimitteltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen* (Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.).

Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76, 1713–1719.

Bretscher, P.A. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 185–190.

Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169, 1042–1049.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68–73.

Buja, L.M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 14, 170–175.

Buja, L.M. (2013). The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria. *Tex. Heart Inst. J. Tex. Heart Inst. St Lukes Episcop. Hosp. Tex. Child. Hosp.* 40, 221–228.

Bultmann, M. (2012). *Mathematik und Statistik für Pharmazeuten* (Eschborn: Govi-Verl.).

Busche, M.N., and Stahl, G.L. (2010). Role of the complement components C5 and C3a in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *Ger. Med. Sci. GMS E-J.* 8.

Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N., and Montecucco, F. (2013). Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 110, 501–514.

Chitnis, T., and Khoury, S.J. (2003). Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 837–849; quiz 850.

- Couper, K.N., Blount, D.G., de Souza, J.B., Suffia, I., Belkaid, Y., and Riley, E.M. (2007). Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 4136–4146.
- Couper, K.N., Lanthier, P.A., Perona-Wright, G., Kummer, L.W., Chen, W., Smiley, S.T., Mohrs, M., and Johnson, L.L. (2009). Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 3985–3994.
- Daoussis, D., Andonopoulos, A.P., and Liossis, S.-N.C. (2004). Targeting CD40L: a promising therapeutic approach. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *11*, 635–641.
- Dasgupta, A., and Saxena, R. (2012). Regulatory T cells: a review. *Natl. Med. J. India* *25*, 341–351.
- Delmas, Y., Viallard, J.-F., Villeneuve, J., Grosset, C., Pasquet, J.-M., Déchanet-Merville, J., Nurden, P., Pellegrin, J.-L., Rosenbaum, J., Combe, C., et al. (2005). [Platelet-associated CD154: a new interface in haemostasis and in the inflammatory reaction]. *Médecine Sci. MS* *21*, 825–831.
- Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., and Reiter, R.J. (2014). Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era. *World J. Cardiol.* *6*, 100–106.
- Dreyer, W.J., Michael, L.H., West, M.S., Smith, C.W., Rothlein, R., Rossen, R.D., Anderson, D.C., and Entman, M.L. (1991). Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* *84*, 400–411.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* *17*, 1391–1401.
- Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.* *111 (Pt 13)*, 1853–1865.
- Fleming, S.D. (2012). Naturally occurring autoantibodies mediate ischemia/reperfusion-induced tissue injury. *Adv. Exp. Med. Biol.* *750*, 174–185.
- Föhse, L., Suffner, J., Suhre, K., Wahl, B., Lindner, C., Lee, C.-W., Schmitz, S., Haas, J.D., Lamprecht, S., Koenecke, C., et al. (2011). High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 3101–3113.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1142–1151.

- Frantz, S., and Hofmann, U. (2012). Monocytes on the scar's edge. *J. Am. Coll. Cardiol.* *59*, 164–165.
- Frantz, S., and Nahrendorf, M. (2014). Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc. Res.*
- Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T., and Kelly, R.A. (1999). Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* *104*, 271–280.
- Frantz, S., Kelly, R.A., and Bourcier, T. (2001). Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *276*, 5197–5203.
- Frantz, S., Calvillo, L., Tillmanns, J., Elbing, I., Dienesch, C., Bischoff, H., Ertl, G., and Bauersachs, J. (2005). Repetitive postprandial hyperglycemia increases cardiac ischemia/reperfusion injury: prevention by the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 591–593.
- Frantz, S., Ertl, G., and Bauersachs, J. (2007a). Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* *4*, 444–454.
- Frantz, S., Tillmanns, J., Kuhlencordt, P.J., Schmidt, I., Adamek, A., Dienesch, C., Thum, T., Gerondakis, S., Ertl, G., and Bauersachs, J. (2007b). Tissue-specific effects of the nuclear factor kappaB subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* *171*, 507–512.
- Frantz, S., Bauersachs, J., and Ertl, G. (2009). Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Res.* *81*, 474–481.
- Frantz, S., Hofmann, U., Fraccarollo, D., Schäfer, A., Kranepuhl, S., Hagedorn, I., Nieswandt, B., Nahrendorf, M., Wagner, H., Bayer, B., et al. (2013). Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 871–881.
- Fuleihan, R., Ramesh, N., Horner, A., Ahern, D., Belshaw, P.J., Alberg, D.G., Stamenkovic, I., Harmon, W., and Geha, R.S. (1994). Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* *93*, 1315–1320.
- Fulwyler, M.J. (1965). Electronic separation of biological cells by volume. *Science* *150*, 910–911.
- Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Rahemtulla, A., Kündig, T.M., Vollenweider, M., Potter, J., van Ewijk, W., and Mak, T.W. (1991). CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* *65*, 443–449.
- Garlichs, C.D., Eskafi, S., Raaz, D., Schmidt, A., Ludwig, J., Herrmann, M., Klinghammer, L., Daniel, W.G., and Schmeisser, A. (2001). Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart Br. Card. Soc.* *86*, 649–655.

- Garlick, P.B., Davies, M.J., Hearse, D.J., and Slater, T.F. (1987). Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ. Res.* *61*, 757–760.
- Georgiadou, P., Iliodromitis, E.K., Kolokathis, F., Varounis, C., Gizas, V., Mavroidis, M., Capetanaki, Y., Boudoulas, H., and Kremastinos, D.T. (2010). Osteopontin as a novel prognostic marker in stable ischaemic heart disease: a 3-year follow-up study. *Eur. J. Clin. Invest.* *40*, 288–293.
- Gerritse, K., Laman, J.D., Noelle, R.J., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Boersma, W.J., and Claassen, E. (1996). CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2499–2504.
- Geudens, N., Vanaudenaerde, B.M., Neyrinck, A.P., Van De Wauwer, C., Vos, R., Verleden, G.M., Verbeken, E., Lerut, T., and Van Raemdonck, D.E.M. (2007). The importance of lymphocytes in lung ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* *39*, 2659–2662.
- Golovina, T.N., and Vonderheide, R.H. (2010). Regulatory T cells: overcoming suppression of T-cell immunity. *Cancer J. Sudbury Mass* *16*, 342–347.
- Haas, M.S., Alicot, E.M., Schuerpf, F., Chiu, I., Li, J., Moore, F.D., and Carroll, M.C. (2010a). Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *87*, 618–627.
- Haas, M.S., Alicot, E.M., Schuerpf, F., Chiu, I., Li, J., Moore, F.D., and Carroll, M.C. (2010b). Blockade of self-reactive IgM significantly reduces injury in a murine model of acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *87*, 618–627.
- Hamm, C.W. (2009). Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI-ACS). *Kardiologe* *3*, 81–100.
- Hargreaves, R.E.G., Monk, N.J., and Jurcevic, S. (2004). Selective depletion of activated T cells: the CD40L-specific antibody experience. *Trends Mol. Med.* *10*, 130–135.
- Hasdai, D., Lev, E.I., Behar, S., Boyko, V., Danchin, N., Vahanian, A., and Battler, A. (2003). Acute coronary syndromes in patients with pre-existing moderate to severe valvular disease of the heart: lessons from the Euro-Heart Survey of acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.* *24*, 623–629.
- Herskowitz, A., Choi, S., Ansari, A.A., and Wesselingh, S. (1995). Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am. J. Pathol.* *146*, 419–428.
- Higuchi, Y., Tamura, Y., Uchida, T., Matsuura, K., Hijiya, N., and Yamamoto, S. (2004). The roles of soluble osteopontin using osteopontin-transgenic mice in vivo: proliferation of CD4+ T lymphocytes and the enhancement of cell-mediated immune responses. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* *71*, 1–11.

- Hirohata, S. (1999). Human Th1 responses driven by IL-12 are associated with enhanced expression of CD40 ligand. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 78–85.
- Hobeika, A.C., Morse, M.A., Osada, T., Peplinski, S., Lyster, H.K., and Clay, T.M. (2011). Depletion of human regulatory T cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 707, 219–231.
- Hochegger, K., Schätz, T., Eller, P., Tagwerker, A., Heininger, D., Mayer, G., and Rosenkranz, A.R. (2007). Role of alpha/beta and gamma/delta T cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293, F741–F747.
- Hochrein, H. (1993). *Checkliste Kardiologie* (Stuttgart u.a.: Thieme).
- Hofmann, U., Bauersachs, J., and Frantz, S. (2010). Nothing but natural: targeting natural IgM in ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 87, 589–590.
- Hofmann, U., Beyersdorf, N., Weirather, J., Podolskaya, A., Bauersachs, J., Ertl, G., Kerkau, T., and Frantz, S. (2012). Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 125, 1652–1663.
- Homma, T., Kinugawa, S., Takahashi, M., Sobirin, M.A., Saito, A., Fukushima, A., Suga, T., Takada, S., Kadoguchi, T., Masaki, Y., et al. (2013). Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 62, 179–188.
- De Hoog, V.C., Timmers, L., Van Duijvenvoorde, A., De Jager, S.C.A., Van Middelaar, B.J., Smeets, M.B., Woodruff, T.M., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., Hack, C.E., et al. (2014). Leukocyte expression of complement C5a receptors exacerbates infarct size after myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.
- Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J., and Herzenberg, L.A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166, 747–749.
- Hurn, P.D., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Kaler, L.J., Vandenberg, A.A., and Offner, H. (2007). T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1798–1805.
- Ilanguvaran, S., Borisch, B., and Hoessli, D.C. (1999). Signal transduction via CD44: role of plasma membrane microdomains. *Leuk. Lymphoma* 35, 455–469.
- Ishikawa, M., Vowinkel, T., Stokes, K.Y., Arumugam, T.V., Yilmaz, G., Nanda, A., and Granger, D.N. (2005). CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* 111, 1690–1696.
- Ivetic, A. (2013). Signals regulating L-selectin-dependent leucocyte adhesion and transmigration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 550–555.

- Janeway, C. (2002). *Immunologie* (Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.).
- JENNINGS, R.B., SOMMERS, H.M., SMYTH, G.A., FLACK, H.A., and LINN, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* *70*, 68–78.
- Jetten, N., Donners, M.M.P.C., Wagenaar, A., Cleutjens, J.P.M., van Rooijen, N., de Winther, M.P.J., and Post, M.J. (2013). Local delivery of polarized macrophages improves reperfusion recovery in a mouse hind limb ischemia model. *PloS One* *8*, e68811.
- Jordan, J.E., Zhao, Z.Q., and Vinten-Johansen, J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *43*, 860–878.
- Kassiotis, G. (2011). *Regulatory T cells* (New York [u.a.]: Humana Press).
- Ke, B., Shen, X.-D., Gao, F., Tsuchihashi, S., Farmer, D.G., Briscoe, D., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2005). The CD154-CD40 T-cell co-stimulation pathway in liver ischemia and reperfusion inflammatory responses. *Transplantation* *79*, 1078–1083.
- Ke, D., Fang, J., Fan, L., Chen, Z., and Chen, L. (2013). Regulatory T cells contribute to rosuvastatin-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Coron. Artery Dis.* *24*, 334–341.
- Khandoga, A., Hanschen, M., Kessler, J.S., and Krombach, F. (2006). CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* *43*, 306–315.
- Kleinbongard, P., Heusch, G., and Schulz, R. (2010). TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol. Ther.* *127*, 295–314.
- Kleinschnitz, C., Schwab, N., Kraft, P., Hagedorn, I., Dreykluft, A., Schwarz, T., Austinat, M., Nieswandt, B., Wiendl, H., and Stoll, G. (2010). Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* *115*, 3835–3842.
- Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Göbel, K., Schuhmann, M.K., Langhauser, F., Helluy, X., Schwarz, T., Bittner, S., et al. (2012). Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood*.
- Kloner, R.A. (2013). Current State of Clinical Translation of Cardioprotective Agents for Acute Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *113*, 451–463.
- Kloner, R.A., Ganote, C.E., and Jennings, R.B. (1974). The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J. Clin. Invest.* *54*, 1496–1508.
- Kohm, A.P., McMahon, J.S., Podojil, J.R., Begolka, W.S., DeGutes, M., Kasprovicz, D.J., Ziegler, S.F., and Miller, S.D. (2006). Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* *176*, 3301–3305.

- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 159–175.
- Komatsubara, I., Murakami, T., Kusachi, S., Nakamura, K., Hirohata, S., Hayashi, J., Takemoto, S., Suezawa, C., Ninomiya, Y., and Shiratori, Y. (2003). Spatially and temporally different expression of osteonectin and osteopontin in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *12*, 186–194.
- Kuboki, S., Sakai, N., Tschöp, J., Edwards, M.J., Lentsch, A.B., and Caldwell, C.C. (2009). Distinct contributions of CD4⁺ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *296*, G1054–G1059.
- Kumar, P., Shen, Q., Pivetti, C.D., Lee, E.S., Wu, M.H., and Yuan, S.Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* *11*, e19.
- Lahl, K., and Sparwasser, T. (2011). In vivo depletion of FoxP3⁺ Tregs using the DREG mouse model. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *707*, 157–172.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* *204*, 57–63.
- Lappas, C.M., Day, Y.-J., Marshall, M.A., Engelhard, V.H., and Linden, J. (2006). Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J. Exp. Med.* *203*, 2639–2648.
- Lederhuber, H.C. (2010). *Basics Kardiologie* (München: Elsevier, Urban & Fischer).
- Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W., and Thistlethwaite, P.A. (2000). Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N. Engl. J. Med.* *342*, 626–633.
- Lehtimäki, S., and Lahesmaa, R. (2013). Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Front. Immunol.* *4*, 294.
- Liao, W., Lin, J.-X., and Leonard, W.J. (2013). Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* *38*, 13–25.
- Liaw, L., Birk, D.E., Ballas, C.B., Whitsitt, J.S., Davidson, J.M., and Hogan, B.L. (1998). Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J. Clin. Invest.* *101*, 1468–1478.
- Lin, L., and Knowlton, A.A. (2014). Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. *Life Sci.* *100*, 1–8.
- Linfert, D., Chowdhry, T., and Rabb, H. (2009). Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Rev. Orlando Fla* *23*, 1–10.

- Litt, M.R., Jeremy, R.W., Weisman, H.F., Winkelstein, J.A., and Becker, L.C. (1989). Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 80, 1816–1827.
- López-Novoa, J.M., and Bernabeu, C. (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, H959–H974.
- Lottspeich, F. (2006). *Bioanalytik* (München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.).
- Lozanoska-Ochser, B., Klein, N.J., Huang, G.C., Alvarez, R.A., and Peakman, M. (2008). Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 6109–6116.
- Lu, C., Ren, D., Wang, X., Ha, T., Liu, L., Lee, E.J., Hu, J., Kalbfleisch, J., Gao, X., Kao, R., et al. (2014). Toll-like receptor 3 plays a role in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 22–31.
- Lu, F., Fernandes, S.M., and Davis, A.E., 3rd (2013). The effect of C1 inhibitor on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 22, 75–80.
- Lv, H., Havari, E., Pinto, S., Gottumukkala, R.V.S.R.K., Cornivelli, L., Raddassi, K., Matsui, T., Rosenzweig, A., Bronson, R.T., Smith, R., et al. (2011). Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 1561–1573.
- Ma, X.L., Tsao, P.S., Viehman, G.E., and Lefer, A.M. (1991). Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery. *Circ. Res.* 69, 95–106.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10338–10343.
- Mann, D.L. (2011). The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ. Res.* 108, 1133–1145.
- Mathers, C.D., and Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, e442.
- Maxwell, S.R., and Lip, G.Y. (1997). Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiol.* 58, 95–117.
- Meister, G. (2011). *RNA biology* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Michael, L.H., Entman, M.L., Hartley, C.J., Youker, K.A., Zhu, J., Hall, S.R., Hawkins, H.K., Berens, K., and Ballantyne, C.M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am. J. Physiol.* 269, H2147–H2154.

- Moore, T.M., Shirah, W.B., Khimenko, P.L., Paisley, P., Lausch, R.N., and Taylor, A.E. (2002). Involvement of CD40-CD40L signaling in postischemic lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L1255–L1262.
- Mörl, H. (1981). *Herzinfarkt* (Berlin [u.a.]: Springer).
- Müller, A. (2013). *Kompakt-Wissen Gymnasium / Mathematik - Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik* (Freising: Stark Verlagsgesellschaft).
- Murakami, K., Ma, W., Fuleihan, R., and Pober, J.S. (1999). Human endothelial cells augment early CD40 ligand expression in activated CD4+ T cells through LFA-3-mediated stabilization of mRNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2667–2673.
- Murakawa, Y., Minami, Y., Strober, W., and James, S.P. (1992). Association of human lymph node homing receptor (Leu 8) with the TCR/CD3 complex. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 1771–1776.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* 88, 581–609.
- Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1436–1442.
- Murry, C.E., Giachelli, C.M., Schwartz, S.M., and Vracko, R. (1994). Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 145, 1450–1462.
- Mutschler, E. (2008). *Arzneimittelwirkungen* (Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.).
- Nagai, S., Hashimoto, S., Yamashita, T., Toyoda, N., Satoh, T., Suzuki, T., and Matsushima, K. (2001). Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int. Immunol.* 13, 367–376.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051–1061.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047.
- Nakamura, F. (2001). Biochemical, electron microscopic and immunohistological observations of cationic detergent-extracted cells: detection and improved preservation of microextensions and ultramicroextensions. *BMC Cell Biol.* 2, 10.
- Nee, L.E., McMorrow, T., Campbell, E., Slattery, C., and Ryan, M.P. (2004). TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 66, 1376–1386.

- Nieswandt, B., Pleines, I., and Bender, M. (2011). Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J. Thromb. Haemost. JTH 9 Suppl 1*, 92–104.
- Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., and Aruffo, A. (1992). A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6550–6554.
- Pappenheimer, A.M., Harper, A.A., Moynihan, M., and Brockes, J.P. (1982). Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J. Infect. Dis.* 145, 94–102.
- Patarca, R., Saavedra, R.A., and Cantor, H. (1993). Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol.* 13, 225–246.
- Peng, X., Remacle, J.E., Kasran, A., Huylebroeck, D., and Ceuppens, J.L. (1998). IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 1166–1172.
- Perez, V.L., Henault, L., and Lichtman, A.H. (1998). Endothelial antigen presentation: stimulation of previously activated but not naïve TCR-transgenic mouse T cells. *Cell. Immunol.* 189, 31–40.
- De Perrot, M., Young, K., Imai, Y., Liu, M., Waddell, T.K., Fischer, S., Zhang, L., and Keshavjee, S. (2003). Recipient T cells mediate reperfusion injury after lung transplantation in the rat. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 4995–5002.
- Qin, S.X., Wise, M., Cobbold, S.P., Leong, L., Kong, Y.C., Parnes, J.R., and Waldmann, H. (1990). Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 20, 2737–2745.
- Rabb, H., Daniels, F., O'Donnell, M., Haq, M., Saba, S.R., Keane, W., and Tang, W.W. (2000). Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F525–F531.
- Rahemtulla, A., Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Kündig, T.M., Sambhara, S.R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C.J., and Zinkernagel, R.M. (1991). Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353, 180–184.
- Reimer, K.A., Lowe, J.E., Rasmussen, M.M., and Jennings, R.B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786–794.
- Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F., and Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 321–342.
- Rodrigues, S.F., and Granger, D.N. (2010). Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc. Res.* 87, 291–299.

- Roeb, E., Graeve, L., Müllberg, J., Matern, S., and Rose-John, S. (1995). TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1 beta and IL-6 in primary rat hepatocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 762, 462–464.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1151–1164.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sampson, J.H., Schmittling, R.J., Archer, G.E., Congdon, K.L., Nair, S.K., Reap, E.A., Desjardins, A., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., et al. (2012). A pilot study of IL-2R α blockade during lymphopenia depletes regulatory T-cells and correlates with enhanced immunity in patients with glioblastoma. *PloS One* 7, e31046.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C., and Bernabéu, C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 43799–43808.
- Sayegh, M.H., and Turka, L.A. (1998). The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med.* 338, 1813–1821.
- Schmetterer, K.G., Neunkirchner, A., and Pickl, W.F. (2012). Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 2253–2276.
- Schofield, Z.V., Woodruff, T.M., Halai, R., Wu, M.C.-L., and Cooper, M.A. (2013). Neutrophils - A Key Component of Ischemia Reperfusion Injury. *Shock Augusta Ga.*
- Schönbeck, U., and Libby, P. (2001). The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 4–43.
- Schroeter, M., Jander, S., Witte, O.W., and Stoll, G. (1994). Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J. Neuroimmunol.* 55, 195–203.
- Sharma, H.S., and Das, D.K. (1997). Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm.* 6, 175–183.
- Sharma, M.D., Huang, L., Choi, J.-H., Lee, E.-J., Wilson, J.M., Lemos, H., Pan, F., Blazar, B.R., Pardoll, D.M., Mellor, A.L., et al. (2013). An inherently bifunctional subset of Foxp3⁺ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity* 38, 998–1012.
- Shen, X., Wang, Y., Gao, F., Ren, F., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., and Zhai, Y. (2009). CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatol. Baltim. Md* 50, 1537–1546.

- Shen, X.-D., Ke, B., Zhai, Y., Amersi, F., Gao, F., Anselmo, D.M., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection. *Transplantation* 74, 315–319.
- Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D.J., et al. (2009). Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadelta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 15, 946–950.
- Shigematsu, T., Wolf, R.E., and Granger, D.N. (2002). T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirc. N. Y. N* 1994 9, 99–109.
- Skov, S., Bonyhadi, M., Odum, N., and Ledbetter, J.A. (2000). IL-2 and IL-15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 3500–3505.
- Spertini, O., Kansas, G.S., Munro, J.M., Griffin, J.D., and Tedder, T.F. (1991). Regulation of leukocyte migration by activation of the leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature* 349, 691–694.
- Statistisches Bundesamt Staat & Gesellschaft - Todesursachen - 2012: Anstieg der Todesfälle im Vergleich zum Vorjahr um 2 % - Statistisches Bundesamt (Destatis).
- Steffens, S., Montecucco, F., and Mach, F. (2009). The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thromb. Haemost.* 102, 240–247.
- Stephens, L.A., and Anderton, S.M. (2006). Comment on “Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells.” *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 2036; author reply 2037–2038.
- Taylor, A., Cooper, D., and Granger, D.N. (2005). Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. *Microcirc. N. Y. N* 1994 12, 275–285.
- Thornton, E.E., Looney, M.R., Bose, O., Sen, D., Sheppard, D., Locksley, R., Huang, X., and Krummel, M.F. (2012). Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J. Exp. Med.* 209, 1183–1199.
- Tillack, K., Breiden, P., Martin, R., and Sospedra, M. (2012). T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 3150–3159.
- Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V.C., Arslan, F., Appelman, Y., and de Kleijn, D.P.V. (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* 94, 276–283.

Trzonkowski, P., Dukat-Mazurek, A., Bieniaszewska, M., Marek-Trzonkowska, N., Dobyszuk, A., Juścińska, J., Dutka, M., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2013). Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 27, 605–614.

Tsao, P.S., and Lefer, A.M. (1990). Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am. J. Physiol.* 259, H1660–H1666.

Tyznik, A.J., Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2004). The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 199, 559–565.

Vang, K.B., Yang, J., Mahmud, S.A., Burchill, M.A., Vegoe, A.L., and Farrar, M.A. (2008). IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 3285–3290.

Vincent, A., Lattuca, B., Merlet, N., Sportouch-Dukhan, C., and Barrère-Lemaire, S. (2013). New insights in research about acute ischemic myocardial injury and inflammation. *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 12, 47–54.

Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61, 481–497.

Vogel, B. Organisation von Chromatin durch HMGA1 Proteine, Organisation of chromatin through HMGA1 proteins.

Waller, A.H., Sanchez-Ross, M., Kaluski, E., and Klapholz, M. (2010). Osteopontin in cardiovascular disease: a potential therapeutic target. *Cardiol. Rev.* 18, 125–131.

Wang, K.X., and Denhardt, D.T. (2008). Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 333–345.

Wedepohl, S., Beceren-Braun, F., Riese, S., Buscher, K., Enders, S., Bernhard, G., Kilian, K., Blanchard, V., Dervedde, J., and Tauber, R. (2012). L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 257–264.

Weisman, H.F., Bartow, T., Leppo, M.K., Marsh, H.C., Jr, Carson, G.R., Concino, M.F., Boyle, M.P., Roux, K.H., Weisfeldt, M.L., and Fearon, D.T. (1990). Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249, 146–151.

Wolfgramm, U. (2005). *Arbeitsbuch Biochemie für Mediziner und Biologen* (Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.).

Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., et al. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 62, 24–35.

- Yang, J., Guo, L., Liu, R., and Liu, H. (2012). Neuroprotective effects of VEGF administration after focal cerebral ischemia/reperfusion: dose response and time window. *Neurochem. Int.* 60, 592–596.
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., et al. (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29, 44–56.
- Yang, Z., Day, Y.-J., Toufektsian, M.-C., Xu, Y., Ramos, S.I., Marshall, M.A., French, B.A., and Linden, J. (2006). Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 114, 2056–2064.
- Yellin, M.J., Brett, J., Baum, D., Matsushima, A., Szabolcs, M., Stern, D., and Chess, L. (1995). Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J. Exp. Med.* 182, 1857–1864.
- Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121–1135.
- Yilmaz, G., and Granger, D.N. (2010). Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 12, 193–204.
- Yilmaz, G., Arumugam, T.V., Stokes, K.Y., and Granger, D.N. (2006). Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 113, 2105–2112.
- Yokota, N., Daniels, F., Crosson, J., and Rabb, H. (2002). Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74, 759–763.
- Ysebaert, D.K., De Greef, K.E., Vercauteren, S.R., Ghielli, M., Verpooten, G.A., Eyskens, E.J., and De Broe, M.E. (2000). Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 15, 1562–1574.
- Ysebaert, D.K., De Greef, K.E., De Beuf, A., Van Rompay, A.R., Vercauteren, S., Persy, V.P., and De Broe, M.E. (2004). T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* 66, 491–496.
- Yuan, X., and Malek, T.R. (2012). Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 73, 773–782.
- Zelenay, S., and Demengeot, J. (2006). Comment on “Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells.” *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 2036–2037; author reply 2037–2038.
- Zhang, M., and Carroll, M.C. (2007). Natural antibody mediated innate autoimmune response. *Mol. Immunol.* 44, 103–110.
- Zhang, B., Wu, T., Chen, M., Zhou, Y., Yi, D., and Guo, R. (2013). The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease. *Immunol. Lett.* 153, 58–61.

Zhang, M., Alicot, E.M., Chiu, I., Li, J., Verna, N., Vorup-Jensen, T., Kessler, B., Shimaoka, M., Chan, R., Friend, D., et al. (2006). Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *J. Exp. Med.* 203, 141–152.

Zheng, S.G. (2013). Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2, 94–106.

Zuidema, M.Y., and Zhang, C. (2010). Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J. Cardiol.* 2, 325–332.

Zwacka, R.M., Zhang, Y., Halldorson, J., Schlossberg, H., Dudus, L., and Engelhardt, J.F. (1997). CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J. Clin. Invest.* 100, 279–289.

Zweier, J.L., and Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 70, 181–190.

Zweier, J.L., Kuppusamy, P., Williams, R., Rayburn, B.K., Smith, D., Weisfeldt, M.L., and Flaherty, J.T. (1989). Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J. Biol. Chem.* 264, 18890–18895.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin
AG	Antigen
APC	Antigen-präsentierende Zelle
aRNA	amplifizierte RNA
AAR	area at risk
BAC	bacterial artificial chromosome
BZ	border zone
CD	Cluster of Differentiation
CD40L (CD154)	CD40 Ligand
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CLP	Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor)
DAMP	damage-associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DEREG	Depletion of REGulatory T-cells
DT	Diphtherietoxin
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EVB	Evans` Blue
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FC	Durchflusszytometrie (Flow Cytometry)
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
IF	Immunfluoreszenz
iLN	inguinaler Lymphknoten
IL	Interleukin

INF	Infarkt
INF/ AAR	Infarkt per area at risk
I/ R	Ischämie-Reperfusion
iTreg	Induzierbare Treg-Zelle (inducible Treg)
KO	Knockout
LAD	left anterior descending; RIVA
MACS	Magnetische Zell-Separation (magnetic cell separation)
mLN	mediastinaler Lymphknoten
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
MI	Myokardinfarkt
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
NET	neutrophil extracellular trap
NK TC	Natürliche Killer-T-Zelle
NKZ	Natürliche Killerzelle
nTreg	natürlich vorkommende Treg-Zelle (naturally occurring Treg)
OPN	Osteopontin
OVA	Ovalbumin
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RI	Reperfusionsschaden (Reperfusion Injury)
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S1PR1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEPT	Septum

SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Spp1	Secreted phosphoprotein 1
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TC	T-Zelle (T-cell)
Tconv	konventionelle T-Zelle
TGF	Transforming growth factor
tMCAO	Transiente Okklusion der mittleren cerebralen Arterie (transient middle cerebral artery occlusion)
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bekannte pathophysiologische Komponenten in der Ischämie-Reperfusion.	13
Abbildung 2: Abstammungslinie der T-Zellen.	15
Abbildung 3: Die Signalwege MHC Klasse II und CD40-CD40L.....	18
Abbildung 4: CD4 ⁺ T-Zell-Differenzierung in regulatorische (Treg) Zellen oder Effektor-T-Zellen (Teff).	20
Abbildung 5: Funktionen regulatorischer T-Zellen.	21
Abbildung 6: Prozedere der Evans`Blue/ TTC-Färbung.	46
Abbildung 7: Exemplarische Auswertung einer Evans` Blue/ TTC-Färbung mit Excel.	47
Abbildung 8: Zeitliches Flusschema des myokardialen Mikropertusionsassays.	49
Abbildung 9: Exemplarischer Kryoschnitt im myokardialen Mikropertusionsassay nach I/ R.	50
Abbildung 10: Adoptiver Zelltransfer.....	53
Abbildung 11: Prinzip der Durchflusszytometrie.	56
Abbildung 12: Immunfluoreszenz von CD3 ⁺ T-Zellen im Herzen.....	68
Abbildung 13: Quantifizierung von CD45 ⁺ und CD3 ⁺ Zellen im Herzen.....	69
Abbildung 14: Gating-Strategie von T-Zell-Subpopulationen aus dem Herz.....	70
Abbildung 15: Reperusionsabhängige Kinetik der T-Zell-Infiltration ins Herz nach 30 min Ischämie.	71
Abbildung 16: Immunfluoreszenz von CD4 ⁺ T-Zellen im Herzen.....	71
Abbildung 17: Immunfluoreszenz von Foxp3 ⁺ regulatorischen T-Zellen im Herzen..	72
Abbildung 18: CD69-Expression auf CD4 ⁺ T(reg) mLN-Zellen.....	73
Abbildung 19: CD25-, CD154- und CD44-Expression auf CD4 ⁺ mLN-T-Zellen.....	74
Abbildung 20: Aktivierungszustand von zirkulierenden CD4 ⁺ T-Zellen.	76
Abbildung 21: Aktivierungszustand von zirkulierenden CD4 ⁺ CD25 ⁺ und CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen.	77
Abbildung 22: Infarktgrößenbestimmung im CD8 KO.....	78
Abbildung 23: Infarktgrößenbestimmung im CD4 KO.....	79
Abbildung 24: Nachweis der Treg-Depletion aus Blut.	80
Abbildung 25: Infarktgrößenbestimmung in der Treg-depletierten DEREK-Maus. ...	81
Abbildung 26: Infarktgrößenbestimmung nach anti-CD25 Antikörper-Depletion.....	82
Abbildung 27: Proof-of-Principle für adoptiven Transfer.	83
Abbildung 28: Infarktgrößenbestimmung nach Transfer von Treg vs. Tconv.....	84
Abbildung 29: Infarktgrößenbestimmung nach Transfer von Bulk-CD4 ⁺ vs. Tconv. .	84
Abbildung 30: Gating-Strategie nach dem Sorten von regulatorischen T-Zellen aus Lymphknoten.....	86
Abbildung 31: Infarktgrößenbestimmung in der OT-II-Maus.....	88
Abbildung 32: Infarktgrößenbestimmung im MHC Klasse II KO.	89
Abbildung 33: Infarktgrößenbestimmung nach Antikörper-vermittelter CD154-Inhibition.	90

Abbildung 34: Western Blot auf Osteopontin.	93
Abbildung 35: Infarktgrößenbestimmung im OPN KO.	94
Abbildung 36: Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunität in CD4 KOs. ...	95
Abbildung 37: Periphere Leukozyten-Komposition im CD4 KO nach I/ R.	96
Abbildung 38: Planimetrische Bestimmung der AAR im mykardialen Mikroperfusions- assay.	98
Abbildung 39: Verbesserte Mikroperfusion nach I/ R in T-Zell defizienten Tieren. ...	99
Abbildung 40: Gating-Strategie zum Sorten von ECs aus Herzgewebe.	100
Abbildung 41: Genregulation gesorteter Endothelzellen aus CD4 KO-Tieren.	105
Abbildung 42: Mechanistische Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.	117

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Bezugsquelle.....	32
Tabelle 2: Primärantikörper.....	34
Tabelle 3: Sekundärantikörper/-reagentien.....	34
Tabelle 4: Antikörper für Depletions- und Inhibitionsexperimente.....	35
Tabelle 5: Lösungen, Puffer und Gele.....	38
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	40
Tabelle 7: Geräte.....	41
Tabelle 8: Versuchstiere von „The Jackson Laboratory“.....	43
Tabelle 9: Applikation blockierender Antikörper.....	53
Tabelle 10: Gerätebedingungen einer qRT-PCR.....	63
Tabelle 11: Zytokin- und Chemokinprofil von regulatorischen und konventionellen T-Zellen nach I/ R.....	87
Tabelle 12: RT ² Profiler™ PCR Array Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors.....	92
Tabelle 13: RT ² Profiler™ PCR Array Mouse Endothelial Cell Biology.....	104

7.4 Publikationsliste

Jahr	Titel
	<p>Mathes D.*; Weirather J.; Arias P.; Vogel B.; Pachel C.; Sparwasser T.; Ertl G.; Kerkau T.; Beyersdorf N.; Frantz S. *, Hofmann U.*; CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells promote murine myocardial reperfusion injury by MHC class II-restricted T cell receptor signaling; (<i>submitted 2014</i>)</p> <p>*contributed equally</p>
	<p>Mathes D.*, Pachel C.*, Lorenz V., Arias P., May F., Nordbeck P., Hofmann U., Nieswandt B., Frantz S.; Reduced myocardial ischemia-reperfusion damage with GPVI, but not GPIIb or GPIIb/IIIa platelet-inhibition; (<i>Manuskript in Arbeit</i>)</p>
	<p>Spitzl A. *, Mathes D.*, Chen W. *, Oberwinkler H. *, Röck K., Gaßner B., Umbenhauer S., Kämmerer U., Baba H., Hofmann U., Frantz S., Kuhn M.; Endothelial actions of ANP aggravate inflammation in the early phase after acute myocardial infarction;</p>
2013	<p>Pachel C., Mathes D., Bayer B., Dienesch C., Wangorsch G., Heitzmann W., Lang I., Ardehali H., Ertl G., Dandekar T., Wajant H., Frantz S.; Exogenous Administration of a Recombinant Variant of TWEAK Impairs Healing after Myocardial Infarction by Aggravation of Inflammation.; PLoS One. 2013 Nov 11;8(11)</p>
2013	<p>Blömer N., Pachel C., Hofmann U., Nordbeck P., Bauer W., Mathes D., Frey A., Bayer B., Vogel B., Ertl G., Bauersachs J., Frantz S.; 5-Lipoxygenase facilitates healing after myocardial infarction.; Basic Res Cardiol. 2013;108(4):367</p>

7.5 Curriculum Vitae

7.6 Weitere Beiträge zu Tagungen und Retreats

Jahr	Titel
2013	<p>Mathes D., Pachel C., Arias P., Lorenz V., May F., Nordbeck P., Dienesch C., Bayer B., Wagner H., Ertl G., Nieswandt B., Frantz S.</p> <p>Inhibition of platelet collagen receptor GPVI reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and associated inflammation in mice</p> <p>Retreat des Deutschen Zentrums für Herzinsuffizienz, Pommersfelden; (Deutschland)</p>
2013	<p>Pachel C., Mathes D., Arias P., Lorenz V., May F., Dienesch C., Bayer B., Umbenhauer S., Heitzmann W., Wagner H., Ertl, Nieswandt B., Frantz S.;</p> <p>Inhibition of platelet collagen receptor glycoprotein GPVI reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and associated inflammation in mice</p> <p>79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); Mannheim (Deutschland)</p>
2012	<p>Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J., Frantz S.;</p> <p>Infiltration von T-Zell Subpopulationen nach myokardialer Ischämie/ Reperfusion;</p> <p>78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK); Mannheim (Deutschland)</p>

7.7 Besondere Posterbeiträge

Jahr	Titel
2012	<p>Posterpreis des Deutschen Zentrums für Herzinsuffizienz Würzburg (DZHI):</p> <p>Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; Role of T-Cells in cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Banz (Deutschland)</p>
2012	<p>Top 10-Poster:</p> <p>Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; The role of T-cells in cardiac Ischemia-Reperfusion Injury; 7th International Student`s Symposium (EPOS) der Graduate School of Life Sciences; Würzburg (Deutschland)</p>
2011	<p>Top 10-Poster:</p> <p>Mathes D., Hofmann U., Pachel C., Vogel B.; Weirather J. and Frantz S.; The role of T-cells in cardiac Ischemia-Reperfusion Injury; 6th International Student`s Symposium (BioBang) der Graduate School of Life Sciences; Würzburg (Deutschland)</p>

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle von T-Lymphozyten im myokardialen Reperfusionsschaden“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

7.9 Affidavit

Hereby I confirm that my thesis entitled “The role of T-cells in myocardial reperfusion injury” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/ or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature