

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

**Charakterisierung der CD4+- und CD8+-T-Zell-Immunantwort
nach Myokardinfarkt im Mausmodell**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lotte Büchner

aus Schweinfurt (Bayern)

Würzburg, März 2023



Referent: Prof. Dr. med. Stefan Frantz

Korreferent: Prof. Dr. Katrin Heinze

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in das Thema Myokardinfarkt	1
1.2	Rolle der Immunzellen nach Myokardinfarkt	1
1.3	Funktion und Unterteilung der Lymphozyten	2
1.4	Erläuterung ausgewählter Zytokine und Transkriptionsfaktoren	5
1.5	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum	8
2.2	Material	8
2.3	Antikörper	9
2.4	Erläuterung der Mausmodelle und der Organentnahme	11
2.4.1	Naive Mäuse	11
2.4.2	Myokardinfarkt im Mausmodell	12
2.4.3	Schein-Operation	13
2.5	Durchflusszytometrie	13
2.5.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	13
2.5.2	Zellgewinnung	13
2.5.3	Anfärbung der Zellen	14
2.5.4	Übersicht der Antikörper für die Durchflusszytometrie	15
2.5.5	Durchflusszytometrische Analyse	17
2.5.6	Layouts zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	17
2.6	Selbständiges Labeln eines Antikörpers	18
2.6.1	Alexa Fluor 546 Labeling Kit für CD206	18
2.7	Immunfluoreszenz	19
2.7.1	Prinzip der Immunfluoreszenz	19
2.7.2	Gewinnung der Gefrierschnitte	19
2.7.3	Anfärbung und Aufbereitung der Gefrierschnitte	19

2.7.4	Scannen der Präparate	20
2.8	Lichtblattmikroskopie	21
2.8.1	Prinzip der Lichtblattmikroskopie (LSFM).....	21
2.8.2	Gewinnung der Herzen und Lymphknoten	21
2.8.3	Aufarbeitung und Anfärbung der Organe.....	22
2.8.4	Übersicht der Antikörper für die Lichtblattmikroskopie.....	23
2.8.5	Scannen der Präparate	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Immunphänotypisierung der T-Zell-Antworten nach Myokardinfarkt mittels Durchflusszytometrie	25
3.1.1	Intrazelluläre Zytokine und T-Zell-Subgruppenanalyse im Herzen und in den mediastinalen Lymphknoten.....	25
3.1.2	Intrazelluläre Zytokine und Unterteilung der T-Zellen in der Milz, im Thymus und in den subiliakalen Lymphknoten	31
3.1.3	Transkriptionsfaktoren der T-Zellen in den untersuchten Organen ..	34
3.2	Bildliche Darstellung der T-Zellen nach Myokardinfarkt	37
3.2.1	Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung von kardialen T-Zellen für die Lichtblattmikroskopie	37
3.2.2	Darstellung der T-Zellen und deren Verteilung im Myokard nach MI.	43
3.2.3	Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung von T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten für die Lichtblattmikroskopie	45
3.2.4	Darstellung der T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten mittels Lichtblattmikroskopie.....	46
4	Diskussion	48
4.1	Interpretation der Ergebnisse	48
4.1.1	Einordnung der T-Zell-Immunantwort nach Myokardinfarkt.....	48
4.1.2	Bewertung der Darstellung von T-Zellen im Myokard und in den mediastinalen Lymphknoten nach Myokardinfarkt	50
4.2	Limitationen dieser Arbeit	51

5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55

Meinen Eltern, die mir ein unbeschwertes Studium ermöglicht haben.

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema Myokardinfarkt

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen heutzutage immer noch die häufigste Todesursache weltweit dar [1]. Im Jahr 2019 sind allein in Deutschland bei insgesamt 939.520 Todesfällen 44.282 Menschen aufgrund eines akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkts (MI) verstorben [2], was immerhin fast 5% darstellt. Ein akuter Myokardinfarkt ist definiert durch das Auftreten einer akuten Myokardschädigung mit klinischem Nachweis einer akuten Myokardischämie, einem dynamischen Anstieg des kardialen Muskeleiweißes Troponin und mindestens eines weiteren Kriteriums, das für eine Myokardschädigung spricht [3].

Auch wenn aufgrund von deutlichen Verbesserungen in der Diagnostik und durch neue Therapiemöglichkeiten die Mortalität nach MI innerhalb der letzten Jahrzehnte deutlich gesunken ist, ist die Krankenhaussterblichkeit mit ca. 9% immer noch zu hoch [4]. Der MI ist und bleibt eine häufig gestellte, lebensbedrohliche Diagnose und macht es erforderlich, weiterhin intensiv an den Vorgängen und möglichen Angriffspunkten zur Förderung der Reparatur des geschädigten Myokards zu forschen, um so neue Erkenntnisse zu gewinnen und diese in den klinischen Alltag zu integrieren.

1.2 Rolle der Immunzellen nach Myokardinfarkt

Unser Immunsystem ist nicht nur für die körpereigene Abwehr von Krankheitserregern unabdingbar, sondern spielt auch in der akuten und chronischen Phase nach MI eine entscheidende Rolle [5]. Zunächst einmal kommt es nach einem MI durch die verletzten Herzmuskelzellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen [6], die das Einwandern und die Aktivierung von Zellen des angeborenen (z.B. Makrophagen) und erworbenen (z.B. Lymphozyten) Immunsystems bewirken und somit zur Entzündung im Gewebe führen [7]. Diese Phase der Entzündung ist notwendig, um abgestorbene Zellen aus dem Infarktbereich zu entfernen und die Reparatur des geschädigten Herzmuskelgewebes durch Aktivierung von mesenchymalen Stammzellen in Gang zu setzen. Auch wenn die Entzündungsphase unabdingbar ist, so muss diese dennoch genau reguliert werden, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern, da diese zur Ausdehnung der Verletzung des Myokards und zum Absterben auch von noch lebensfähigen Herzmuskelzellen führen könnte [8]. Ungefähr am 7. Tag nach Infarkt beginnt die Heilungsphase. Hierbei werden unter anderem zur Versorgung des Gewebes neue Blutgefäße gebildet und in diesem

Zeitraum erreicht auch die Anzahl an T- und B-Lymphozyten im Herzgewebe ihren Höhepunkt. Insbesondere die T-Lymphozyten (T-Zellen) sorgen in dieser Phase durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen für die notwendige Unterdrückung der Entzündungsreaktion. Im Anschluss daran erfolgt die Umbauphase des Infarktgewebes, wobei fibröses Narbengewebe entsteht. Dieses Narbengewebe ist einerseits nützlich, da es die Ausdünnung und Ruptur der Herzwand verhindern kann, andererseits handelt es sich im Gegensatz zu den zuvor vorhandenen kontraktile Herzmuskelzellen um ein faserreiches Ersatzgewebe. Das kann zu einer starken Einschränkung der kardialen Kontraktion führen und damit in eine Herzinsuffizienz münden [9]. Es ist bereits bekannt, dass T-Zellen, und hier vor allem die CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen), eine große Rolle im Reparatur- und Heilungsprozess nach MI spielen. Dies konnte im Tiermodell gezeigt werden, da CD4-Knockout-Mäuse, die im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine CD4⁺ T_H-Zellen besitzen, nach MI durch eine beeinträchtigte Wundheilung mit resultierender linksventrikulärer Dilatation auffallen [10]. Dabei sind unter den CD4⁺ T-Zellen insbesondere die Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen, auch als regulatorische T-Zellen (Treg) bekannt, hervorzuheben, da diese nach therapeutischer Aktivierung die Wundheilung und das Überleben nach MI im Mausmodell verbessern können [11]. Betrachtet man andere Untergruppen der CD4⁺ T-Zellen, so fördern beispielsweise T_H1-Zellen, die bevorzugt proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ) sekretieren, eine Entzündung im Myokard nach MI, während T_H2-Zellen, die vor allem antiinflammatorisches Interleukin-4 (IL-4) sekretieren, eher die Fibrosierung des geschädigten Herzgewebes unterstützen [12]. Inwiefern diese T-Zellen nun mit ihren unterschiedlichen Markern eher einen positiven oder einen negativen Effekt auf die Heilung nach MI haben und wie genau das Zusammenspiel der Immunzellen nach MI funktioniert, ist immer noch unklar. Fest steht, dass sowohl die pro- als auch die antiinflammatorischen Eigenschaften der T-Zellen entscheidend für die Herzfunktion nach MI sind, weshalb diese Zellen und deren Immunantwort im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.3 Funktion und Unterteilung der Lymphozyten

Lymphozyten sind Zellen der adaptiven Immunabwehr, sie müssen im Gegensatz zu Zellen der angeborenen Immunabwehr (z.B. Komplementsystem, Neutrophile, Makrophagen, Eosinophile) vor Funktionsaufnahme einen Reifungsprozess durchlaufen, wobei dieser für B-Lymphozyten (B-Zellen) im Knochenmark und für T-

Zellen im Thymus erfolgt. Diese beiden Regionen stellen die primären lymphatischen Organe dar [13]. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen hingegen die Lymphknoten, die Milz und die Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT), wie z.B. die Tonsillen oder die Peyer-Plaques im Darm [14]. Die adaptive Immunabwehr kann in zwei Bereiche aufgeteilt werden, in die humorale und in die zellvermittelte Immunabwehr.

Die humorale Immunabwehr wird durch die B-Zellen gewährleistet, indem diese nach Antigen-stimulierter Differenzierung zu Plasmazellen lösliche Antikörper sezernieren, die ein Antigen spezifisch binden und unschädlich machen können. Unter einem Antigen versteht man in diesem Fall eine Substanz, die der eigene Körper als fremd erkennt und die eine spezifische Immunantwort auslöst, indem Antikörper gebildet werden. Die zellvermittelte Immunabwehr wird von den T-Zellen übernommen, wobei die naiven T-Zellen, die anhand des Oberflächenprofils CD62L+/CD44- zu erkennen sind [15], zunächst einmal durch das Erkennen und Binden eines durch ein MHC-Molekül auf der Oberfläche einer anderen Zelle präsentierten Antigens an den T-Zell-Rezeptor (TZR) aktiviert werden müssen. CD8+ T-Zellen sind hierbei auf die Antigenpräsentation durch ein MHC-Klasse-I-Molekül angewiesen, das auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt und zelleigene Peptide der jeweiligen Zellen präsentiert. CD4+ T-Zellen hingegen sind auf die Präsentation eines Antigen-Fragments mittels MHC-Klasse-II-Moleküls angewiesen, wobei hier die dargebotenen Peptide aus prozessierten Proteinen stammen. Das MHC-Klasse-II-Molekül wird nur auf bestimmten Zelloberflächen exprimiert, unter anderem auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, die daher auch antigenpräsentierende Zellen genannt werden.

Nach Aktivierung der naiven T-Zellen folgt die Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen, was anhand der Hochregulierung des Oberflächenmarkers CD44 und der Expression anderer Chemokinrezeptoren, die die Einwanderung der aktivierten T-Zellen in entzündetes Gewebe ermöglichen, zu erkennen ist [15]. Die CD8+ T-Zellen differenzieren sich zu CD8+ zytotoxischen Lymphozyten (ZTL) und die CD4+ T-Zellen zu CD4+ T-Helfer-Lymphozyten (T_H-Zellen).

Die ZTL können an der Oberfläche anderer Zellen bestimmte Antigene erkennen, die diese Zellen als Virus-infiziert oder entartet ausweisen und diese infizierten Zellen durch die Sekretion von zytolytischen Proteinen, wie z.B. Perforin, in die Apoptose, den programmierten Zelltod, treiben.

T_H-Zellen greifen in viele Vorgänge der adaptiven und angeborenen Immunabwehr ein, indem sie Zytokine sezernieren, außerdem lassen sie sich in weitere Untergruppen unterteilen.

T_H1-Zellen fördern die Abwehr von intrazellulären Keimen durch Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und ZTL. Sie sezernieren vor allem IFN- γ , Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α). Defekte in diesem System können zu überschießenden Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen führen [13].

T_H2-Zellen helfen bei der Abwehr von Wurmparasiten und Allergenen, sie sezernieren vor allem IL-4, Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10). Fehlfunktionen können hier zu allergischen Reaktionen führen, dabei sind u.a. Eosinophile, Basophile und Mastzellen beteiligt [13]. Insbesondere über die Zytokine IL-4 und IL-10 sind T_H2-Zellen auch entscheidend an der Herunterregulierung überschießender Immunantworten durch T_H1-vermittelte Entzündungsreaktionen beteiligt [16].

T_H17-Zellen sezernieren vor allem IL-17, sie haben eine starke proinflammatorische Wirkung und helfen den neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. Außerdem sind sie an der Entstehung unterschiedlichster Autoimmunerkrankungen beteiligt, wenn sie auch nach der Beseitigung von Krankheitserregern noch aktiv bleiben, oder wenn das Gleichgewicht zwischen den Untergruppen der T-Zellen gestört ist [17].

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) haben die wichtige Aufgabe, die immunologische Selbsttoleranz zu wahren und überschießende Immunantworten aufzuhalten, um Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Sie sezernieren vor allem die Zytokine *transforming growth factor-beta* (TGF- β) und IL-10 und sind durch den Transkriptionsfaktor *forkhead-box-protein p3* (Foxp3) gekennzeichnet [13].

Neben der Differenzierung zu Effektorzellen können sich T-Zellen auch zu Gedächtniszellen entwickeln. Die Besonderheit dieser Zellen besteht darin, dass bei einer Reinfektion mit demselben Erreger eine viel schnellere und präzisere Immunreaktion ausgelöst wird, da sie durch eine erhöhte Affinität gegenüber dem Antigen viel leichter aktiviert werden können, um dann rasch Zytokine sezernieren zu können [18].

In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}-Zellen) und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}-Zellen) unterschieden. T_{EM}-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die sie zur Einwanderung in nicht-lymphatisches, entzündetes Gewebe befähigen und sie können nach Aktivierung durch ihr Antigen

innerhalb kürzester Zeit Zytokine wie z.B. IFN- γ , IL-4 und IL-5 sezernieren, um eine schnelle Immunantwort zu gewährleisten [19, 20]. T_{CM}-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche unter anderem den Rezeptor CD62L, der für die Einwanderung in sekundäre lymphatische Organe nötig ist, wo die T_{CM}-Zellen ruhen. Nach Stimulation durch ihr Antigen proliferieren sie und differenzieren sich zu Effektorzellen, die dann wiederum Zytokine produzieren [21].

1.4 Erläuterung ausgewählter Zytokine und Transkriptionsfaktoren

Nachdem einige Zytokine und Transkriptionsfaktoren bereits Erwähnung gefunden haben, sollen die für diese Arbeit relevanten Beispiele nun in Bezug auf ihr Vorkommen und ihre Funktion beschrieben werden.

IFN- γ wird vor allem von T_{H1}-Zellen, ZTL und NK-Zellen sezerniert. Es sorgt durch eine vermehrte Expression von IL-12-Rezeptoren auf der Oberfläche von naiven T-Zellen für einen größeren Einfluss von IL-12 und bewirkt damit eine Differenzierung zu T_{H1}-Zellen [16, 22]. IFN- γ ist entscheidend für die Abwehr von intrazellulären Erregern und stimuliert die angeborene zelluläre Immunabwehr, indem es unter anderem Makrophagen und NK-Zellen aktiviert [23, 24]. Des Weiteren kann es die Produktion von IgG-Antikörpern stimulieren, insbesondere den Klassenwechsel von IgM zu IgG [25], wobei IgG unter anderem für die Komplementaktivierung, die Opsonierung von pathogenen Keimen und Neutralisation von Toxinen zuständig ist. Opsonierung bedeutet, dass beispielsweise die Oberfläche von Bakterien mit Antikörpern markiert wird, die dann mittels eines Rezeptors an der Oberfläche von Immunzellen wie z.B. Neutrophilen, Makrophagen oder Eosinophilen erkannt werden, was die Phagozytose und Entfernung der pathogenen Keime erleichtert [13].

In Zusammenhang mit dem Zytokin IFN- γ muss auch der T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21 (T-bet) genannt werden. Dieser initiiert die Entwicklung von naiven T-Zellen zu T_{H1}-Zellen und stimuliert die Expression des charakteristischen T_{H1}-Zytokins IFN- γ sowohl in T_{H1}- als auch in anderen Zellen. Zusätzlich unterdrückt T-bet die Expression von charakteristischen T_{H2}-Zytokinen, wie z.B. IL-4 und IL-5. [26].

IL-4 fungiert als Gegenspieler von IFN- γ , denn es ist das typische Zytokin von T_{H2}-Zellen und sorgt dafür, dass sich naive T-Zellen nicht zu T_{H1}-, sondern zu T_{H2}-Zellen differenzieren [26]. Es wird neben T_{H2}-Zellen vor allem von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sezerniert [27]. IL-4 stimuliert die B-Zellen und sorgt für einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgE [28]. IgE-Antikörper sind wichtig für die

Abwehr von Parasiten, da sie Wurmlarven opsonieren können, um sie für eosinophile Granulozyten kenntlich zu machen. Außerdem können sie allergische Reaktionen auslösen, da sie an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten mittels eines Rezeptors gebunden werden können und nach Antigenkontakt zur Ausschüttung von bestimmten Botenstoffen, wie z.B. Histamin und verschiedenen Proteasen, führen [13]. IL-4 verursacht eine so genannte „alternative Aktivierung“ von Makrophagen. Diese beinhaltet unter anderem die Hochregulierung von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen zur besseren Antigenpräsentation, aber auch eine moderate Hemmung der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Unterstützung der Wundheilung mittels Förderung der Gewebeneubildung und Zellproliferation [29]. Insgesamt lässt sich also sagen, dass IL-4 überwiegend antiinflammatorische Eigenschaften besitzt.

Der typische Transkriptionsfaktor für T_H2-Zellen ist GATA-3. Dieser Zinkfinger-Transkriptionsfaktor ist in T_H2-Zellen hochreguliert und notwendig für die Transkription von T_H2-Zytokinen, zu denen, wie schon erwähnt, auch IL-4 gehört [30].

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es wird vor allem von T_H17-Zellen sezerniert und beeinflusst unterschiedlichste Zellarten. Beispielsweise führt es bei Endothelzellen zu Entzündungen und wirkt prokoagulatorisch, Epithelzellen und Fibroblasten werden zur Zytokin- und Enzymproduktion angeregt. Auch auf Monozyten und dendritische Zellen hat IL-17 eine entzündungsfördernde Wirkung, indem es die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine fördert [31].

RAR-related orphan receptor gamma-T (ROR γ T) ist der entscheidende Transkriptionsfaktor zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen und eine kontinuierliche Expression von ROR γ T ist erforderlich, um die Funktion der T_H17-Zellen aufrecht zu erhalten. [17].

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist für die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und deren Funktion zuständig. Da Foxp3+ T_{reg} die Aktivität autoinflammatorischer T-Zellen unterdrücken können, kann eine Mutation im Bereich des Foxp3-Gens zu Autoimmunerkrankungen führen. Somit ist die Regulierung der Foxp3-Expression von entscheidender Bedeutung für eine kontrollierte Immunantwort [32].

Latency-associated peptide (LAP) ist nicht-kovalent an das Zytokin TGF- β 1 gebunden und kann im Komplex von vielen Immunzellen sekretiert oder auf ihrer Zelloberfläche exprimiert werden. T-Zellen, die LAP produzieren und sezernieren spielen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Immunantwort. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass LAP+ T-Zellen Autoimmunerkrankungen

unterdrücken können. Beispielsweise können sie die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α reduzieren und wirken mithilfe von TGF- β 1 antiinflammatorisch [33]. In der an LAP gebundenen Form ist TGF- β 1 noch inaktiv und muss erst durch bestimmte Integrasen oder Proteasen durch Freisetzung aus der nicht-kovalenten Bindung aktiviert werden [34].

1.5 Zielsetzung

Auch wenn durch jahrzehntelange Forschung bereits einiges über die Rolle der T-Zellen bei und nach MI bekannt ist, herrschen dennoch weiterhin einige Wissenslücken in diesem Themengebiet. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass T_{reg} nach MI die Reparatur des Herzens fördern [11]. Im Gegensatz dazu dominieren im Vergleich zu anderen T-Zellen T_H17-Zellen bei der chronischen ischämischen Herzkrankheit nach MI und scheinen schädlich für die Heilung des Myokards nach MI zu sein [35]. Inwiefern andere Untergruppen der T-Zellen einen förderlichen oder schädlichen Effekt nach MI im Herzen haben und welche Rolle der Differenzierungsstatus für die Immunreaktion nach MI spielt, ist und bleibt bisher unklar.

Daher ist das Ziel dieser Arbeit, ein besseres Verständnis für die T-Zellen nach MI im Mausmodell zu bekommen. Dafür wurde einerseits eine Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort mittels durchflusszytometrischer Analyse des Herzens und verschiedener lymphatischer Organe nach MI mit Fokus auf pro- und antiinflammatorische Zytokine und deren Transkriptionsfaktoren durchgeführt und andererseits ein Protokoll zur Anfärbung von T-Zellen in Mäuseherzen und Lymphknoten für die Lichtblatmikroskopie etabliert. Dadurch konnte nicht nur die Immunantwort der T-Zellen quantitativ charakterisiert werden, sondern auch deren Lage und Verteilung qualitativ im Myokard und in den mediastinalen Lymphknoten beurteilt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche liegt eine Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen AZ-55.2.2-2532-2-648 vor.

2.2 Material

Reagenzien	Firma	Katalognummer
10x Phosphate Buffered Saline	Bio-Rad	1610780
96 Well Conical (V) Bottom Plate	Thermo Fisher Scientific	277143
Agarose Low Melt	Carl Roth	6351.1
Alexa Fluor 546 Antibody Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific	A20183
Aqua Zombie Fixable viability dye	Biolegend	423102
B. Braun Injekt Solo Einmalspritzen	B. Braun	15550-02
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich	SIALW213705-1KG-K
Benzylbenzoat	Sigma-Aldrich	SIALB6630-250ML
Bovine Serum Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific	B14
Carbo-Free Blocking Solution	Vector Laboratories	VECSP-5040
Collagenase Type II	Sigma-Aldrich	C2-28-100MG
eBioscience Cell Stimulation Cocktail	Thermo Fisher Scientific	00-4970-93
eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer	Thermo Fisher Scientific	00-4222-26
Ethanol	Carl Roth	5054.1
Falcon konische Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Thermo Fisher Scientific	10788561
Fisherbrand Deckglas aus Borosilikatglas	Thermo Fisher Scientific	12323128
Fisherbrand Mikroskopobjektträger	Thermo Fisher Scientific	11562203
Fisherbrand Quadratische antistatische Wägeschiffchen aus Polystyrol	Thermo Fisher Scientific	12942860
Fötales Kälberserum	Sigma-Aldrich	F2442-50ML
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	Biolegend	421403
Gibco RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific	11530586
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Cytogen	04-33500
MACS SmartStrainers (70	Miltenyi Biontec	130-110-916

µm)		
Methanol	Sigma-Aldrich	646377-1L
Mowiol	Sigma-Aldrich	81381-50G
n-Hexan	Carl Roth	KK48.1
OneComp eBeads Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific	01-1111-41
PBS-Puffer	Serva	42595.01
ROTI Histofix 4% Formaldehyd	Carl Roth	P087.1
Sarstedt Inc 12x75 Tube 5 ml Flow Cyto/PK500	Thermo Fisher Scientific	NC9001762
Scientific Device Laboratory Aqua-Hold Pap Pen 2	Thermo Fisher Scientific	23-769-533
Square – Glass Tubing	VitroCom	S102
Thermo Scientific DAPI	Thermo Fisher Scientific	10374168
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Science Services	SA62550-01
Triton X 100	Carl Roth	3051.2
Wasser, doppelt destilliert	Carl Roth	3478.1
Wasserstoffperoxid	Carl Roth	CP26.1

2.3 Antikörper

Antikörper	Firma	Klon	Katalognummer
Alexa Fluor 488 anti-mouse CD206 (MMR) Antibody	Biologend	monoklonal, Klon C068C2	141709
Alexa Fluor 488 anti-mouse CD4 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon GK1.5	100425
Alexa Fluor 488 anti-mouse I-A/I-E Antibody	Biologend	monoklonal, Klon M5/114.15.2	107615
Alexa Fluor 594 anti-mouse CD68 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon FA-11	137020
Alexa Fluor 647 anti-GATA3 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon 16E10A23	653809
Alexa Fluor 647 anti-mouse CD206 (MMR) Antibody	Biologend	monoklonal, Klon C068C2	141711
Alexa Fluor 647 anti-mouse CD4 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon GK1.5	100426
Alexa Fluor 647 anti-mouse CD4 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon RM4-5	100533
Alexa Fluor 647 anti-mouse/human	Biologend	monoklonal, Klon RA3-6B2	103229

CD45R/B220 Antibody			
Anti-CD3 antibody	Abcam	polyklonal	Ab5690
APC anti-mouse LAP Antibody	Biologend	monoklonal, Klon TW7-16B4	141405
APC anti-mouse/human CD44 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon IM7	103011
APC/Cyanine7 anti-mouse CD4 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon GK1.5	100413
BV421 rat anti-mouse IL-4	BD Biosciences	monoklonal, Klon 11B11	562915
CD206 Polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific	polyklonal	PA5-46994
CD3 antibody	Bio Rad	monoklonal, Klon KT3	MCA500GA
CD4 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	monoklonal, Klon GK1.5	sc-13573
CD4 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	monoklonal, Klon MT310	sc-1961 AF546
CD4 Rat, anti-Mouse, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	monoklonal, Klon RM4-5	17198471
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific	polyklonal	A-31573
FITC anti-mouse CD62L Antibody	Biologend	monoklonal, Klon MEL-14	104405
FITC anti-mouse IFN- γ Antibody	Biologend	monoklonal, Klon XMG1.2	505805
Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	polyklonal	A-11006
Pacific Blue anti-mouse FOXP3 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon MF-14	126409
PE anti-mouse TCR V β 6 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon RR4-7	140003
PE/Cyanine7 anti-mouse CD69 Antibody	Biologend	monoklonal, Klon H1.2F3	104511
PE/Cyanine7 anti-mouse CD8a Antibody	Biologend	monoklonal, Klon 53-6.7	100721

PE/Cyanine7 anti-T-bet Antibody	Biolegend	monoklonal, Klon 4B10	644823
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD8a Antibody	Biolegend	monoklonal, Klon 53-6.7	100733
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse IL-17A Antibody	Biolegend	monoklonal, Klon TC11-18H10.1	506919
Purified anti-mouse CD16/32 Antibody	Biolegend	monoklonal, Klon 93	101302
Purified anti-mouse CD31 Antibody	Biolegend	monoklonal, Klon 390	102401
Rat anti Mouse CD68	Bio-Rad	monoklonal, Klon FA-11	MCA1957
ROR γ (t) Antibody, anti-human/mouse, REAfinity	Miltenyi Biotec	Monoklonal, Klon REA278	130-124-078
α -Smooth Muscle Actin (D4K9N) XP Rabbit mAb (Alexa Fluor 555 Conjugate)	Cell Signaling Technology	monoklonal, Klon D4K9N	60839S

2.4 Erläuterung der Mausmodelle und der Organentnahme

2.4.1 Naive Mäuse

Für alle Versuche wurden männliche, 8-12 Wochen alte BALB/c-Mäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet. Hierbei handelt es sich um einen im Labor gezüchteten Albino-Stamm der Hausmaus *Mus musculus*. Die Mäuse wurden von Charles River käuflich erworben, nach Ankunft für mindestens 7 Tage akklimatisiert und in einzeln belüfteten Käfigen in Gruppen zwischen 2 und 6 Tieren unter speziellen pathogen-armen Bedingungen (SPF) in einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkel-Zyklus und unter Standarddiät gehalten.

Um eine Übersicht darüber zu bekommen, wie sich das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Immunzellen bei Labormäusen grundsätzlich verhält, wurden zunächst naive Mäuse durch Genickbruch euthanasiert. Um restliches Blut aus den Mäuseherzen auszuwaschen, wurde über eine Kanülierung der Aorta das Herz für ca. 20 Minuten über eine Perfusionspumpe mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), welches mit Heparin versetzt wurde, perfundiert. Daraufhin wurden Herz, Thymus, subiliakale und mediastinale Lymphknoten und Milz entfernt (Abbildung 1) und für die durchflusszytometrische Analyse zunächst in eine Lösung bestehend aus HBSS/BSA gegeben. Die beiden unterschiedlichen Lymphknotenstationen wurden gewählt, da sich mediastinal regionale, das Herz drainierende Lymphknoten befinden,

in denen zum Teil nach MI aktivierte T-Zellen proliferieren und nachfolgend in das Herz einwandern. Dahingegen sind subiliakale Lymphknoten fern vom Herzen und nicht direkt an der kardialen Immunreaktion nach MI beteiligt [10], weshalb dadurch ein Vergleich zwischen der Immunreaktion in Herz-drainierenden und nicht Herz-drainierenden Lymphknoten möglich ist.

Die Herzen und Lymphknoten, die für die Lichtblatmikroskopie gebraucht wurden, wurden nach Perfusion des Herzens in Formalin gegeben.

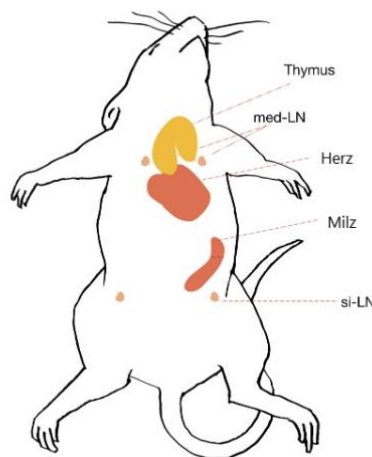


Abbildung 1 Darstellung der untersuchten Organe

Herz, Thymus, Milz, subiliakale und mediastinale Lymphknoten wurden naiven Mäusen oder am Tag 7 nach MI oder Schein-Operation entnommen und für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Modifiziert nach [36]

2.4.2 Myokardinfarkt im Mausmodell

Um einen MI zu verursachen, wurden die Mäuse unter Inhalationsanästhesie intubiert und mechanisch beatmet. Daraufhin wurde unter aseptischen Bedingungen der Thorax im Bereich des 3. Interkostalraums eröffnet und die linke Koronararterie mittels Naht permanent verschlossen. Die erfolgreiche Ligatur wurde durch ein Abblassen und eine Akinesie des Myokards im Versorgungsbereich der linken Koronararterie festgestellt. Daraufhin wurden der Brustkorb und die Haut der Maus mittels Einzelknopf-Nähten wieder verschlossen, die Narkose beendet und die Maus extubiert. Diese Eingriffe wurden standardisiert durch speziell geschultes Personal durchgeführt.

Am 7. Tag nach diesem Eingriff wurden die Mäuse mittels Genickbruch geopfert und die Organentnahme erfolgte analog zu den naiven Mäusen.

2.4.3 Schein-Operation

Als Kontrolle für die Mausmodelle nach MI dienten scheinoperierte Mäuse. Dabei wurde der gleiche Eingriff wie bei den Mäusen mit MI durchgeführt, nur die Ligatur der linken Koronararterie wurde weggelassen. Auch hier wurden die Mäuse am 7. Tag nach dem Eingriff geopfert und die Organentnahme erfolgte genau wie oben beschrieben.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie fließen die Zellen hintereinander durch eine Messkammer, in der sie mit einem Laser angestrahlt werden. Dadurch entsteht einerseits Streulicht und andererseits durch die vorherige Anfärbung der Zellen mit Antikörpern Fluoreszenzlicht. Durch die Detektion des Streu- und Fluoreszenzlichts können somit die einzelnen Zellen unterschieden und in ihrer Häufigkeit gezählt werden [37].

2.5.2 Zellgewinnung

Zur Analyse unterschiedlicher Zellarten wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Pro Gruppe wurden 4-12 Mäuse untersucht. Nach Organentnahme wurden für die Zellgewinnung die Herzen in eine Lösung bestehend aus Kollagenase und RPMI gegeben und für 30 Minuten bei 37°C zur Kollagenspaltung („Verdau“) belassen. Daraufhin wurden die Herzen durch ein Sieb mit 70 µm Porengröße gerieben, um eine Einzelzellsuspension zu generieren. Um die intrazellulären Zytokine und die Transkriptionsfaktoren nachzuweisen, wurden die Zellen anschließend mit dem eBioscience Cell Stimulation Cocktail (plus Proteintransportinhibitoren) für 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von HBSS/BSA-Puffer und Zentrifugation bei 4°C mit 400g für 5 Minuten wurden die Zellen nach Entfernung des Überstandes in FACS-Puffer verdünnt und es konnte mit der Zellfärbung begonnen werden. Für die Zellgewinnung aus Lymphknoten, Thymus und Milz konnten die Organe direkt durch das Sieb gerieben werden, ein vorangehender Verdau war nicht erforderlich und die folgenden Schritte waren identisch zu den oben genannten.

2.5.3 Anfärbung der Zellen

Zur Anfärbung der Zellen für die Durchflusszytometrie musste zunächst eine Aqua-Zombie-Lösung vorbereitet werden, indem diese 1:1.000 in PBS verdünnt wurde. Diese Lösung dient dazu, lebende von toten Zellen zu unterscheiden, da der Farbstoff nur in tote Zellen mit beschädigten Membranen eindringen kann. Außerdem wurden die Antikörper der jeweiligen Panels in einem Mastermix mit FACS-Puffer für die Oberflächenantigene und mit dem Permeabilisationspuffer für die intrazellulären Antigene vorbereitet und anti-FCR CD 16/32 in einer Konzentration von 1:200 hinzugefügt. Nach diesen Vorbereitungen wurden die gewonnenen Zellen in eine Mikrotiterplatte mit 96 Nöpfchen übertragen, wobei auf genug Abstand zwischen den Nöpfchen geachtet wurde, um eine Vermischung der Zellen zu verhindern. Die Mikrotiterplatten wurden bei 4°C mit 400 g für 3 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand mit einer schnellen Handbewegung ins Waschbecken befördert. Um die lebenden Zellen anzufärben, wurden sie mit 100 µl Aqua Zombie Lösung vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Nachdem 100 µl FACS-Puffer hinzugefügt wurde, folgte wieder eine Zentrifugation bei 4°C mit 400 g für 3 Minuten, wobei danach der Überstand entfernt wurde. Für die Anfärbung der Marker auf der Oberfläche der Zellen wurden 25 µl des entsprechenden Antikörper-Mastermix in jedes Nöpfchen gegeben und gut gemischt, wobei die Konzentration der unterschiedlichen Antikörper zwischen 0,7 und 5 µg/ml betrug. Für die Herzzellen wurden jeweils 50 µl Mastermix benutzt. Parallel dazu wurden für die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der benutzten Antikörper Kompensationskontrollen hergestellt. Dafür wurde je ein Tropfen des oneComp eBeads mit 1 µl des jeweiligen Antikörpers in einem Nöpfchen angefärbt und die weitere Aufarbeitung erfolgte genauso wie folgend für die angefärbten Zellen beschrieben. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Mikrotiterplatten für 15 Minuten bei 4°C in den dunklen Kühlraum gestellt. Daraufhin wurde in jedes Nöpfchen 100 µl FACS Puffer hinzugefügt und für 3 Minuten bei 4°C mit 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt, 200 µl FACS Puffer in jedes Nöpfchen hinzugefügt und die Zellen waren fertig für die Analyse.

Für die Anfärbung der intrazellulären Marker mussten zunächst der Fixationspuffer 1:3 und der Permeabilisationspuffer 10:1 mit PBS verdünnt werden. Dann wurden die Zellen in 100 µl Fixationspuffer gemischt und die Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Nach Hinzufügen von 100 µl Permeabilisationspuffer pro Nöpfchen wurden die Zellen für 3 Minuten bei 4°C mit 400g zentrifugiert und dann der Überstand entfernt. Daraufhin wurden die Zellen mit

jeweils 25 µl (für die Herzen 50 µl) des entsprechenden Antikörper-Mastermix gut durchmischt, wobei die Konzentration der unterschiedlichen Antikörper zwischen 4 und 10 µg/ml betrug. Nachdem die Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen wurden, wurde jeweils 100 µl Permeabilisationspuffer zu den Zellen gegeben und die Platte wurde für 3 Minuten bei 4°C mit 400g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden 200 µl FACS Puffer in jedes Nöpfchen hinzugefügt und die Zellen konnten analysiert werden. Außerdem wurden zur Aufklärung von Artefakten ungefärbte Kontrollen angefertigt und analysiert. Hierbei wurden dieselben Schritte wie bei der Anfärbung der Zellen befolgt, aber die Antikörper weggelassen.

2.5.4 Übersicht der Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die im Folgenden gezeigten Tabellen (Tabelle 1) geben einen Überblick über die bei der Durchflusszytometrie benutzten Antikörper.

Panel 1 Ohne Stimulation		
Marker	Farbstoff	Konzentration
Live/dead	BV510	1:1.000
CD4	APC-Cy7	2 µg/ml
CD8	Percp-Cy5.5	1 µg/ml
TCRVβ6	PE	0,7 µg/ml
CD62L	FITC	5 µg/ml
CD44	APC	2 µg/ml
CD69	PE-Cy7	2 µg/ml

A

Panel 2 Nach Stimulation mit eBioscience Cell Stimulation Cocktail für 3,5 Stunden bei 37°C		
Marker	Farbstoff	Konzentration
Live/dead	BV510	1:1.000
CD4	APC-Cy7	2 µg/ml
CD8	PE-Cy7	1 µg/ml
TCRVβ6	PE	0,7 µg/ml
IFN-γ	FITC	10 µg/ml
IL-17	Percp-Cy5.5	10 µg/ml
IL-4	BV421	4 µg/ml
LAP	APC	4 µg/ml

B

Panel 3		
Nach Stimulation mit eBioscience Cell Stimulation Cocktail für 3,5 Stunden bei 37°C		
Marker	Farbstoff	Konzentration
Live/dead	BV510	1:1.000
CD4	APC-Cy7	2 µg/ml
CD8	Percp-Cy5.5	1 µg/ml
TCRVβ6	PE	0,7 µg/ml
T-bet	PE-Cy7	4 µg/ml
GATA-3	A647	10 µg/ml
RORγT	Vio515	4 µg/ml
Foxp3	Pac. Blue	10 µg/ml

C

Tabelle 1 Übersicht der Antikörper für die Durchflusszytometrie

- A. Unterteilung der T-Zellen.** Mithilfe des ersten Panels kann zwischen T_H-Zellen, ZTL, naiven T-Zellen, T_{EM}-Zellen und T_{CM}-Zellen unterschieden werden.
- B. Zytokinproduktion.** Mithilfe des zweiten Panels kann die Zytokinproduktion der T-Zellen beurteilt werden.
- C. Transkriptionsfaktoren.** Mithilfe des dritten Panels können die Transkriptionsfaktoren der T-Zellen und der Anteil an T_{reg} beurteilt werden.

Die Unterteilung der T-Zellen erfolgte mithilfe der Antikörper des ersten Panels (Tabelle 1 A). Dabei wurde zunächst einmal - wie in jedem Panel - zwischen CD4+ T_H-Zellen und CD8+ ZTL unterschieden und bei diesen wiederum zwischen CD62L+/CD44-naiven T-Zellen, CD62L-/CD44+ T_{EM}-Zellen und CD62L+/CD44+ T_{CM}-Zellen [38, 39]. Außerdem wurde CD69 in das Panel integriert, denn dieser Rezeptor dient als früher Aktivierungsmarker von Leukozyten und dadurch, dass er bei der Lymphozytenaktivierung vorübergehend exprimiert wird, kann zwischen aktiven und ruhenden T-Zellen unterschieden werden [40]. Zuletzt wurde noch im Panel 1 – wie in den anderen Panels auch – die Expression des T-Zell-Rezeptors TCRVβ6 untersucht, der das Produkt des Gens TRBV19 darstellt. Dieser TZR wurde gewählt, da in einer vorherigen Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Expression desselben in kardialen T-Zellen nach MI im Mausmodell signifikant erhöht war [36].

Die Panels 2 (Tabelle 1 B) und 3 (Tabelle 1 C) widmeten sich den schon beschriebenen Zytokinen mit ihren jeweiligen Transkriptionsfaktoren, außerdem wurde die Anzahl an T_{reg} mittels des Transkriptionsfaktors Foxp3 untersucht. Die Bestimmung der verschiedenen Marker diente der Unterscheidung zwischen einer proinflammatorischen (IFN-γ - Tbet, IL-17 - RORγT) und antiinflammatorischen (IL-4 - GATA-3, LAP) Immunantwort der T_H-Zellen und ZTL. Da hierbei die Zytokine in den

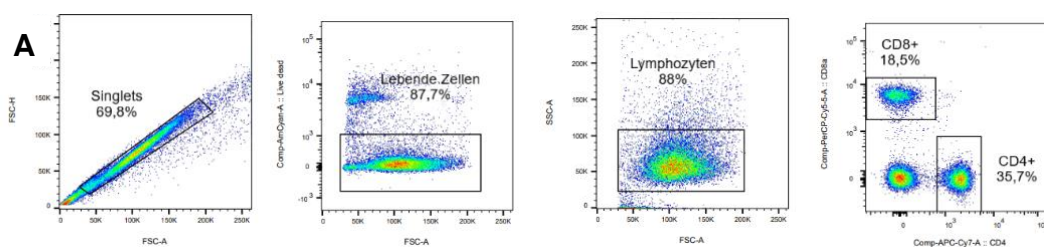
Zellen und nicht im Serum nachgewiesen wurden, konnte genau bestimmt werden, welche Zellart wie viele und welche Zytokine exprimiert.

2.5.5 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Analyse der Zellen wurde ein BD-FACS-Gerät verwendet und die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms FlowJo in der Version 10. Außerdem wurden anhand der Daten Graphen mittels GraphPad Prism erstellt und auch die statistische Analyse erfolgte durch die GraphPad Prism Software der Version 9 mittels Ordinary one-way ANOVA und Multiple comparisons. Als signifikant wurde ein p-Wert von $<0,05$ definiert und signifikante Werte wurden mit * markiert.

2.5.6 Layouts zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte zunächst für alle Panels gleich (Abbildung 2 A). Zuerst wurden mit der Vorwärtslichtstreuung (FSC) die Singlets, also die Zellen, die einzeln den Laserstrahl passieren, detektiert und dann in dieser Population die lebenden Zellen erfasst. Daraus wurden mit der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung (SSC) die Lymphozyten ermittelt und diese dann in CD4+ T_H-Zellen und CD8+ ZTL unterteilt. Für diese beiden Gruppen wurde dann jeweils der Anteil an T_H-Zellen bzw. ZTL bestimmt, der positiv für die zu untersuchenden Marker der oben genannten drei Panels war (Abbildung 2 B-D).



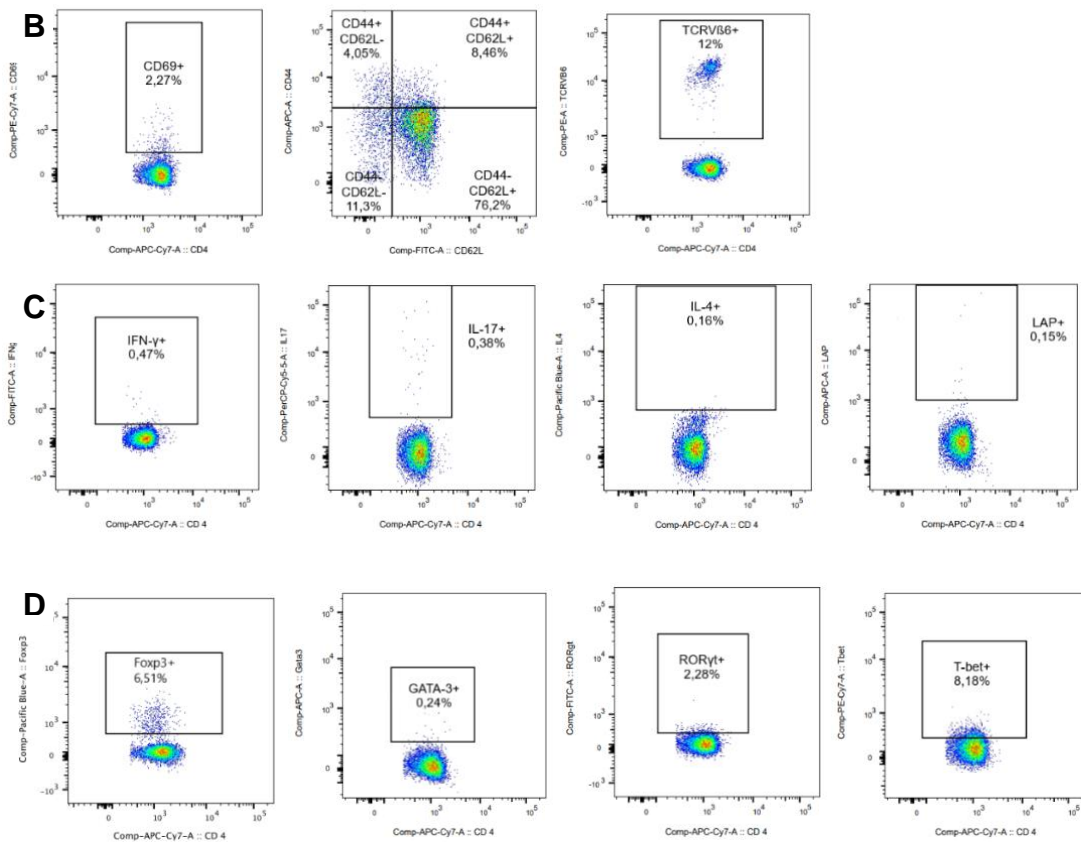


Abbildung 2 Darstellung der Layouts zur Auswertung der Durchflusszytometrie am Beispiel eines mediastinalen Lymphknotens nach MI

- A. Gating zur Filterung der Zielzellen.** Dies wurde jeweils zu Beginn jedes Panels benutzt.
- B. Gating für Panel 1.** Es sind die Ergebnisse für CD4+ T_H-Zellen dargestellt, dasselbe Gating wurde auch für CD8+ ZTL genutzt.
- C. Gating für Panel 2.** Es sind die Ergebnisse für CD4+ T_H-Zellen dargestellt, dasselbe Gating wurde auch für CD8+ ZTL genutzt.
- D. Gating für Panel 3.** Es sind die Ergebnisse für CD4+ T_H-Zellen dargestellt, dasselbe Gating wurde auch für CD8+ ZTL genutzt.

2.6 Selbständiges Labeln eines Antikörpers

2.6.1 Alexa Fluor 546 Labeling Kit für CD206

Markiert wurde der CD206 polyklonale IgG-Antikörper aus der Ziege. Dafür wurde zunächst 1 ml deionisiertes Wasser zu der vorbereiteten Natriumbikarbonat-Lösung hinzugefügt und gut gemischt. 1 ml des Antikörpers wurde mit 100 µl 1 M Natriumbikarbonat vermischt und davon 100 µl in das Gefäß mit dem Farbstoff gegeben und dieser wurde dann vorsichtig darin aufgelöst. Die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und das Gefäß dabei alle 10-15 Minuten

vorsichtig geschüttelt. Nach Ablauf dieser Stunde wurde eine Zentrifugensäule in ein Reagenzglas gesteckt, mit 1,5 ml Reinigungsharz befüllt und für 3 Minuten bei 1100 g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl der hergestellten Lösung tröpfchenweise in die Zentrifugensäule gegeben, diese wurde auf ein Sammelgefäß gesteckt und anschließend für 5 Minuten bei 1100 g zentrifugiert. Danach enthielt das Sammelgefäß den gewünschten Antikörper CD206 markiert mit Alexa Fluor 546.

2.7 Immunfluoreszenz

2.7.1 Prinzip der Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zunächst auf ein bestimmtes Gewebe Antikörper aufgebracht, welche an die Antigene der gesuchten Zellen binden. In einem zweiten Schritt werden nun fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugegeben, die spezifisch an den ersten Antikörper binden. Nach Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich die gesuchten Zellen im Gewebe genauer lokalisieren und darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode vor allem genutzt, um passende Antikörper zum Anfärben von Immunzellen in Mäuseherzen zu finden und diese dann für die Lichtblattemikroskopie zu nutzen.

2.7.2 Gewinnung der Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden Mäuseherzen im Ganzen in Tissue-Tek O.C.T. eingebettet und bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Herzen wurden dann im Kryostaten bei -20°C in 7 µm dicke Scheiben geschnitten und jeweils 2 Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden im Gefrierschrank bei -20°C bis zur Anfärbung der Schnitte aufbewahrt.

2.7.3 Anfärbung und Aufbereitung der Gefrierschnitte

Für die Anfertigung der Immunfluoreszenz wurden zunächst die eingefrorenen Herzschnitte aus dem Gefrierschrank genommen und für 1 Stunde bei Raumluft getrocknet. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Hälfte der Präparate wurde für 10 Minuten in eine Lösung bestehend aus Methanol mit 15% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gegeben und nach Ablauf dieser Zeit

wieder dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde hinzugefügt, da die Herzen in der Lichtblatmikroskopie auch mit 15% H_2O_2 inkubiert werden müssen, um die Hämgruppen des Myoglobins im Herzmuskel zu bleichen. Das H_2O_2 kann die Bindungsstellen der benutzten Antikörper auf ihren Zielzellen zerstören, wodurch dann eine Anfärbung der Zellen nicht mehr möglich wäre. Da die Immunfluoreszenz in diesem Fall diente, um passende Antikörper für die Lichtblatmikroskopie zu finden und um auszuschließen, dass die Anfärbung aufgrund der nötigen Hämgruppen-Bleichung mit H_2O_2 nicht funktioniert, wurde jeder Antikörper sowohl auf ein Präparat mit vorheriger Bleichung mit H_2O_2 , als auch auf ein Präparat ohne diesen Bleichungsschritt gegeben, um beide Bedingungen miteinander vergleichen zu können. Anschließend wurden wieder alle Herzschnitte auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Stift umkreist und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 30-50 μ l kohlenstofffreier Blockierungslösung bedeckt. Dann wurden sie wieder dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Verdünnung der primären Antikörper in der Blockierungslösung wurden pro Objektträger ca. 30-50 μ l auf einen der beiden Herzschnitte gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Auf den anderen Herzschnitt wurde als Kontrolle jeweils nur der Blockierungspuffer gegeben. Nach Ablauf der Stunde folgte wieder ein Waschvorgang mit PBS für jeweils dreimal 5 Minuten. Anschließend wurden die Sekundärantikörper auf beide Herzschnitte gegeben und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. 5 Minuten vor Ablauf der Zeit wurde zur Anfärbung der Zellkerne 5 μ l Hoechst/DAPI hinzugegeben. Nach einem letzten Waschschrift in üblicher Form wurde auf die Schnitte eine Mowiol-Lösung gegeben und sie wurden jeweils mit einem Deckglas bedeckt. Bis zur Analyse am Mikroskop wurden sie bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.7.4 Scannen der Präparate

Zur Darstellung der Herzschnitte wurde das DMi8 S Immunfluoreszenz-Mikroskop von Leica verwendet. Für die Auswertung und Beurteilung der Antikörper wurde das Programm ImageJ benutzt.

2.8 Lichtblattmikroskopie

2.8.1 Prinzip der Lichtblattmikroskopie (LSFM)

Die Lichtblattmikroskopie bietet die Möglichkeit, Organe im Ganzen, ohne vorherige Schnitthanfertigung mit dabei einhergehendem möglichen Informationsverlust, dreidimensional darzustellen. Dafür ist zunächst eine Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes notwendig, es wird mit Antikörpern angefärbt, dehydriert und optisch geklärt, damit das Laserlicht das komplette Organ penetrieren kann. Dann wird es an einer Halterung befestigt, in eine mit dem optischen Klärungsmittel Benzylalkohol/Benzoessäurebenzylester (BABB) gefüllte Probenkammer gegeben und mithilfe einer Linse wird das Laserlicht zu einem dünnen Lichtblatt geformt, das jeweils eine definierte Schicht der Probe beleuchtet. Die durch den Laser angeregte Fluoreszenz wird dann durch eine senkrecht davon angebrachte Kamera detektiert. Durch das Bewegen der Probe innerhalb des dünnen Lichtblatts in Schritten zwischen 2 bis 5 μm kann das komplette Organ gescannt werden, wobei Hunderte von einzelnen Bildern detektiert und gespeichert werden. Diese können dann am Computer wieder zusammengesetzt werden, wodurch ein dreidimensionales Bild entsteht. Um mehrere Antikörper detektieren zu können, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind, wird das mikroskopierte Organ mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge gescannt und die dadurch emittierte Fluoreszenz detektiert. Die entstandenen Bilder werden in unterschiedlichen Kanälen gespeichert, die dann letztendlich am Computer zusammengesetzt werden können, sodass mehrere durch Antikörper angefärbte Zielzellen gleichzeitig sichtbar sein können [41, 42]. In diesem Fall wurden Laser mit der Wellenlänge von 488 nm, 532 nm und 640 nm und für die Darstellung der Mäuseherzen ein Lichtblattmikroskop mit 5-facher Vergrößerung und für die Lymphknoten mit 20-facher Vergrößerung benutzt.

2.8.2 Gewinnung der Herzen und Lymphknoten

Für die Lichtblattmikroskopie wurde zunächst das Blut aus den Mäuseherzen herausgewaschen, indem über eine Kanülierung der Aorta das Herz für ca. 20 Minuten mit einer Perfusionspumpe und PBS perfundiert wurde. Anschließend wurde das Herz entnommen und die Naht, die durch Verschluss der linken Koronararterie für den MI gesorgt hatte, entfernt. Außerdem wurde die Herzbasis mit einem Skalpell entfernt, um mit der Inkubationslösung auch die innere Ventrikelwand zu erreichen. Danach wurde

es für 2 Stunden bei 4°C in 4% PFA gegeben. Auch die Lymphknoten wurden entnommen und direkt für 2 Stunden bei 4°C in 4% PFA gegeben.

2.8.3 Aufarbeitung und Anfärbung der Organe

Die Mäuseherzen und die Lymphknoten wurden zweimal für je 15 Minuten mit PBS gewaschen, daraufhin wurden nur die Herzen für 30 Minuten bei 4°C in 15% H₂O₂ in Methanol eingelegt. Dieser Schritt ist wie bereits erwähnt bei den Herzen notwendig, um die Hämgruppen des Myoglobins im Herzmuskel zu bleichen. Dies ist durch andere bei der Lichtblattmikroskopie verwendete Lösungsmittel, wie z. B. BABB, das die Proben durch Entfernung der Lipide optisch klärt, nicht möglich. Im nächsten Schritt wurden die Herzen gründlich mit PBS gewaschen und dann in eine Lösung bestehend aus PBS mit 2% FCS und 0,5% TritonX100 gegeben und für 2 Tage bei 4°C auf dem Schüttler belassen. Auch die Lymphknoten wurden in die genannte Lösung gegeben und für 2 Tage bei 4°C auf dem Schüttler belassen, allerdings betrug hier die Konzentration an TritonX100 nur 0,1%. Nachdem die Lösung mit PBS gewaschen wurde, wurden die Organe in eine Lösung bestehend aus PBS mit 0,5% TritonX100 (für Lymphknoten wieder 0,1% TritonX100) und den benötigten Antikörpern gegeben und die Herzen für 7 Tage und die Lymphknoten für 5 Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal über Nacht mittels PBS gewaschen. Da für die Anfärbung der Mäuseherzen sekundäre Antikörper nötig waren, wurden die Herzen wieder in eine Lösung bestehend aus PBS mit 0,5% TritonX100 und den Sekundärantikörpern gegeben, für 7 Tage bei 4°C inkubiert und dann zweimal über Nacht mit PBS gewaschen.

Für die Lymphknoten musste 1% Agarose in destilliertem Wasser aufgelöst werden, indem es für 1 Minute bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt wurde. Es wurde in flüssigem Zustand in eine längliche Glaskapillare mit quadratischem Durchmesser gefüllt und die Lymphknoten wurden darin eingebettet. Nach Abkühlung und Aushärtung der Agarose konnte sie mit den enthaltenen Lymphknoten aus der Kapillare entfernt werden und es konnte anschließend mit der Entwässerung begonnen werden. Die Einbettung der Lymphknoten in Agarose ist notwendig, da die Lymphknoten allein zu klein wären, um sie mittels Pinzette in der Probekammer des Lichtblattmikroskops zu befestigen und die einzelnen Schichten zu mikroskopieren. Dank der Agarose wird die Oberfläche vergrößert, die Pinzette kann im oberen Bereich des Zylinders befestigt werden und die darunter befindlichen eingebetteten Lymphknoten können im Ganzen mikroskopiert werden.

Die Herzen und die in Agarose eingebetteten Lymphknoten wurden mittels einer Ethanolreihe entwässert, wobei die Herzen jeweils für 1,5 bis 2 Stunden in aufsteigender Reihenfolge mit 30%, 50%, 70%, 80% und 90% Ethanol inkubiert wurden und anschließend mit 100% Ethanol über Nacht, während bei den Lymphknoten die Ethanolreihe jeweils morgens und abends in aufsteigender Reihenfolge ausgetauscht wurde. Danach wurden die jeweiligen Organe für höchstens 2 Stunden in ca. 5 ml n-Hexan gegeben, wobei zweimalig 2,5 ml Hexan entnommen und durch 2,5 ml BABB (Benzylalkohol : Benzylbenzoat 1 : 2) ersetzt wurde und für je 1,5 Stunden inkubiert wurde. Abschließend wurden die Präparate direkt in ca. 5 ml BABB gegeben und für mindestens 24 Stunden darin belassen. Nach Ablauf dieser 24 Stunden konnten die Präparate mikroskopiert werden.

2.8.4 Übersicht der Antikörper für die Lichtblattmikroskopie

Die im Folgenden gezeigten Tabellen (Tabelle 2) geben einen Überblick über die bei der Lichtblattmikroskopie benutzten Antikörper.

Herz LSFM		
Marker	Farbstoff	Konzentration
CD3	-	4 µg/ml
anti rabbit	A647	20 µg/ml
CD68	-	10 µg/ml
anti rat	A488	20 µg/ml
CD206	markiert mit A546	2 µg/ml

A

mediastinale Lymphknoten LSFM		
Marker	Farbstoff	Konzentration
CD4	A488	5 µg/ml
B220	A647	1,7 µg/ml

B

Tabelle 2 Übersicht der Antikörper für die Lichtblattmikroskopie

- A. Anfärbung der Mäuseherzen.** Zur Anfärbung der Herzen wurden Antikörper zur Darstellung von T-Zellen und Makrophagen benutzt.
- B. Anfärbung der mediastinalen Lymphknoten.** Bei den Lymphknoten wurden jeweils T-Zellen und B-Zellen sichtbar gemacht.

In den Mäuseherzen wurden die T-Zellen mithilfe eines CD3-Antikörpers dargestellt [43]. Außerdem wurden Antikörper zur Anfärbung von Makrophagen gewählt, CD68 zum Nachweis von Makrophagen allgemein und CD206 zum Nachweis von antiinflammatorischen Makrophagen (Tabelle 2 A). Diese beiden Makrophagen-Subtypen unterscheiden sich dadurch, dass Makrophagen allgemein eher proinflammatorische Eigenschaften besitzen, wie z.B. durch die Sekretion großer Mengen proinflammatorischer Zytokine oder die Stimulation von T_H1 -Zellen, während CD206+ Makrophagen eher durch antiinflammatorische Eigenschaften wie die Immunregulation, Hilfe beim Gewebeumbau, oder die Fähigkeit zur effizienten Phagozytose gekennzeichnet sind [44, 45].

Bei den mediastinalen Lymphknoten wurden T_H -Zellen mithilfe des CD4-Antikörpers und B-Zellen durch den B220-Antikörper angefärbt (Tabelle 2 B) [46].

2.8.5 Scannen der Präparate

Für die bildliche Darstellung der Organe wurden die Lichtblatmikroskope im Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg benutzt, eines mit 5-facher Vergrößerung und eines mit 20-facher Vergrößerung. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit den Programmen ImageJ und Imaris Viewer.

3 Ergebnisse

3.1 Immunphänotypisierung der T-Zell-Antworten nach Myokardinfarkt mittels Durchflusszytometrie

3.1.1 Intrazelluläre Zytokine und T-Zell-Subgruppenanalyse im Herzen und in den mediastinalen Lymphknoten

Zur Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort nach MI wurden unter anderem die intrazellulären Zytokine und das Verhältnis von naiven T-Zellen zu Gedächtniszellen genauer betrachtet. Die Zytokine dienen den T-Zellen dazu, mit anderen Immunzellen zu interagieren. Damit können je nach Situation unterschiedliche Zytokine ausgeschüttet werden, wodurch andere Immunzellen aktiviert und somit eine Immunreaktion hervorgerufen werden kann, oder es können auch andere Immunzellen gehemmt werden, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Anhand der Zytokine lässt sich damit aussagen, ob eine pro- oder eine antiinflammatorische Immunantwort der T-Zellen in den jeweiligen untersuchten Organen vorherrscht.

Nach der Auswertung der intrazellulären Zytokine in T_H-Zellen im Herzen ergab sich bei den proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-17 kein signifikanter Unterschied im Vergleich von scheinoperierten Mäusen zu Mäusen nach MI. Lediglich bei den IL-17+ T_H-Zellen ergab sich eine signifikante Erhöhung im Vergleich von naiven Mäusen zu Mäusen nach MI (Abbildung 3 A), jedoch würde sich auch bei einem Vergleich zwischen naiven und scheinoperierten Mäusen eine signifikante Erhöhung des Anteils an IL-17+ T_H-Zellen ergeben. Daher ist dieser Unterschied nicht speziell auf den Myokardinfarkt zurückzuführen, sondern macht lediglich deutlich, dass ein operativer Eingriff am Thorax eine proinflammatorische Reaktion der T_H-Zellen im Herzen hervorruft, ob mit oder ohne MI. Bei den antiinflammatorischen Zytokinen der T_H-Zellen ergab sich für IL-4 kein Unterschied zwischen den drei Gruppen, aber für den Anteil an LAP+ T_H-Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen (Abbildung 3 B).

Bei Betrachtung der intrazellulären Zytokine der ZTL im Herzen ergab sich ein sehr ähnliches Bild. Bei den proinflammatorischen Zytokinen konnte für IFN- γ kein Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden, dahingegen zeigte sich für den Anteil an IL-17+ ZTL ein signifikanter Anstieg nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen (Abbildung 3 C). Für die antiinflammatorischen Zytokine der ZTL im Herzen ergab sich wie bei den T_H-Zellen kein Unterschied für IL-4+ ZTL, aber

einen signifikanten Anstieg des Anteils an LAP+ ZTL nach MI im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Herzen nach MI sowohl von T_H-Zellen als auch ZTL signifikant mehr LAP produziert wird und im Herzen insgesamt bei Betrachtung der Häufigkeit der für die jeweils untersuchten Zytokine positiven T-Zellen nach MI eine antiinflammatorische Immunantwort überwiegt. Für die proinflammatorische Immunantwort der T-Zellen im Herzen scheint lediglich IL-17 für die ZTL nach MI eine Rolle zu spielen.

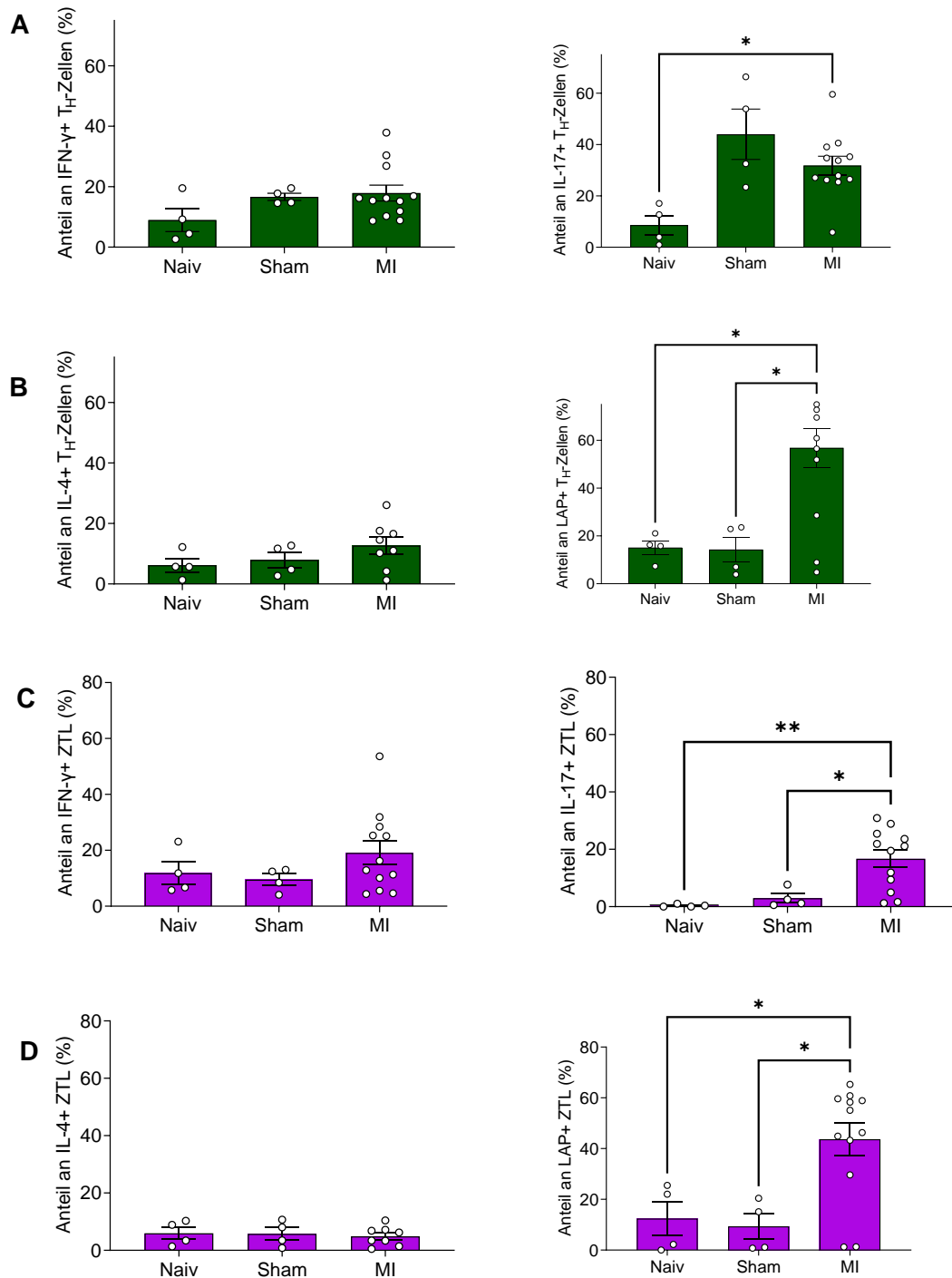


Abbildung 3 Intrazelluläre Zytokine der T_H-Zellen und ZTL im Herzen von naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$

A. Proinflammatorische Zytokine der T_H-Zellen. Signifikante Erhöhung des Anteils an IL-17+ T_H-Zellen im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven Mäusen.

- B. Antiinflammatorische Zytokine der T_H-Zellen.** Signifikanter Anstieg des Anteils an LAP+ T_H-Zellen im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen.
- C. Proinflammatorische Zytokine der ZTL.** Signifikanter Anstieg des Anteils an IL17+ ZTL im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen.
- D. Antiinflammatorische Zytokine der ZTL.** Signifikanter Anstieg des Anteils an LAP+ ZTL im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen.

Bei Betrachtung der pro- und antiinflammatorischen intrazellulären Zytokine der T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen, sowohl bei den T_H-Zellen als auch bei den ZTL (Abbildung 4 A-D). Interessanterweise ließ sich in den mediastinalen Lymphknoten keine Erhöhung des Anteils an LAP+ T_H-Zellen oder ZTL nach MI feststellen. Dies spricht dafür, dass es nach MI lokal im Herzen zu einer signifikanten Erhöhung der LAP-Produktion in ZTL und T_H-Zellen kommt und dies in keinem anderen der untersuchten Organe wiederzufinden ist.

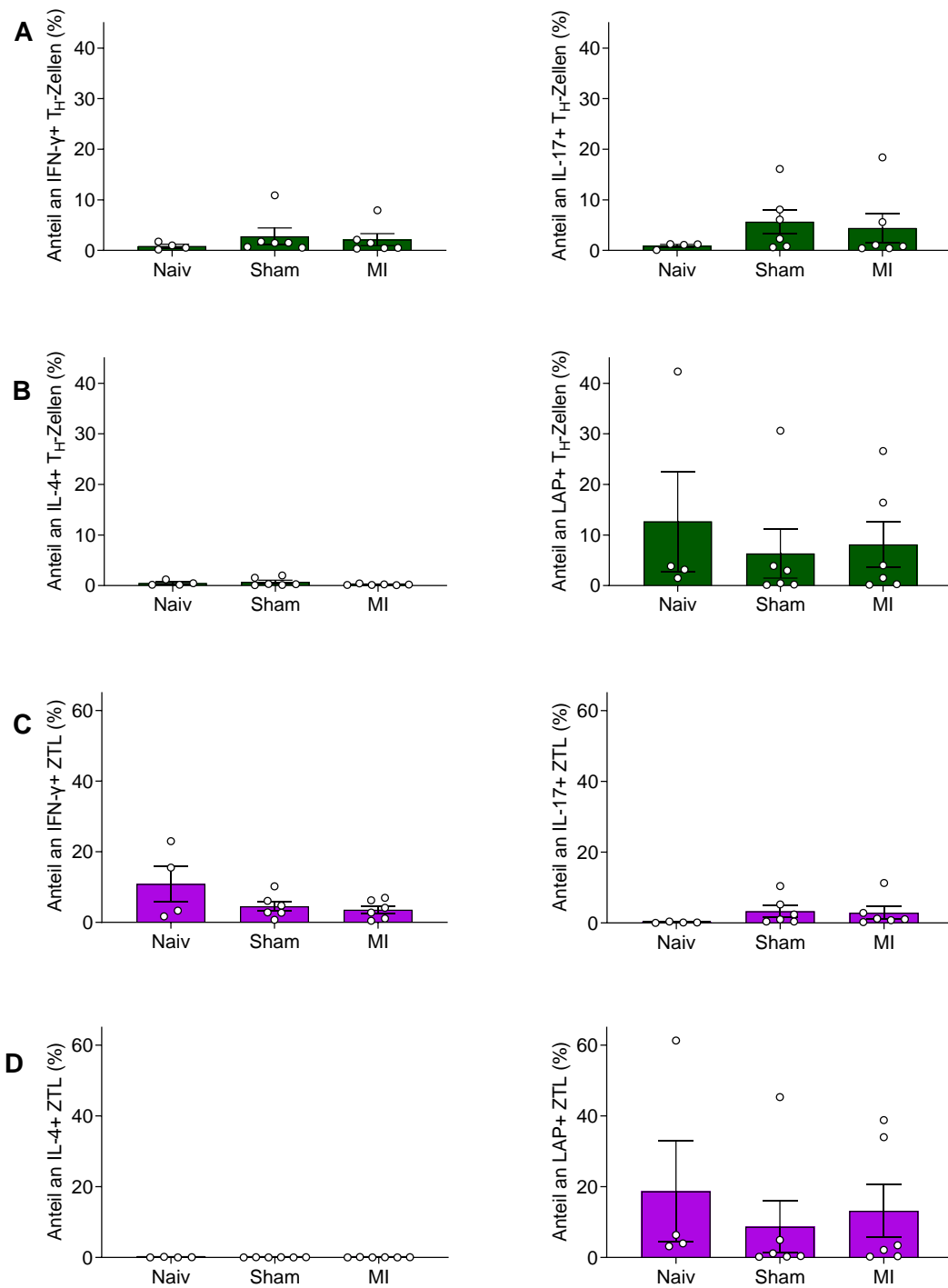


Abbildung 4 Intrazelluläre Zytokine der T_H -Zellen und ZTL in mediastinalen Lymphknoten von naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI

- A. Proinflammatorische Zytokine der T_H -Zellen.** Darstellung der IFN- γ + und IL-17+ T_H -Zellen in mediastinalen Lymphknoten.
- B. Antiinflammatorische Zytokine der T_H -Zellen.** Darstellung der IL-4+ und LAP+ T_H -Zellen in mediastinalen Lymphknoten.

- C. Proinflammatorische Zytokine der ZTL.** Darstellung der IFN- γ + und IL-17+ ZTL in mediastinalen Lymphknoten.
- D. Antiinflammatorische Zytokine der ZTL.** Darstellung der IL-4+ und LAP+ T_H-Zellen in mediastinalen Lymphknoten.

Um neben der akuten Immunantwort nach MI auch bleibende Veränderungen des immunologischen Gedächtnisses zu untersuchen, wurde innerhalb der drei Gruppen der Anteil an naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich sowohl bei scheinoperierten Mäusen als auch bei Mäusen nach MI ein Absinken der Häufigkeit von naiven T-Zellen (Abbildung 7 C) und ein Ansteigen der Häufigkeit von Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 7 B) im Vergleich zu den naiven Mäusen. Dies galt sowohl für T_H-Zellen als auch für ZTL. Es ergab sich bei T_H-Zellen ein signifikanter Anstieg des Anteils an Gedächtnis-T_H-Zellen bei Mäusen nach MI im Vergleich zu naiven Mäusen (Abbildung 7 B) und bei den ZTL ein signifikanter Abfall des Anteils an naiven T-Zellen bei Mäusen nach MI im Vergleich zu naiven Mäusen (Abbildung 7 C). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl nach Schein-Operation als auch nach MI eine Entzündungsreaktion stattfindet, die zur Bildung von Gedächtnis-T-Zellen führt. Dies könnte bei einem möglichen Reinfarkt zu einer veränderten Immunantwort führen.

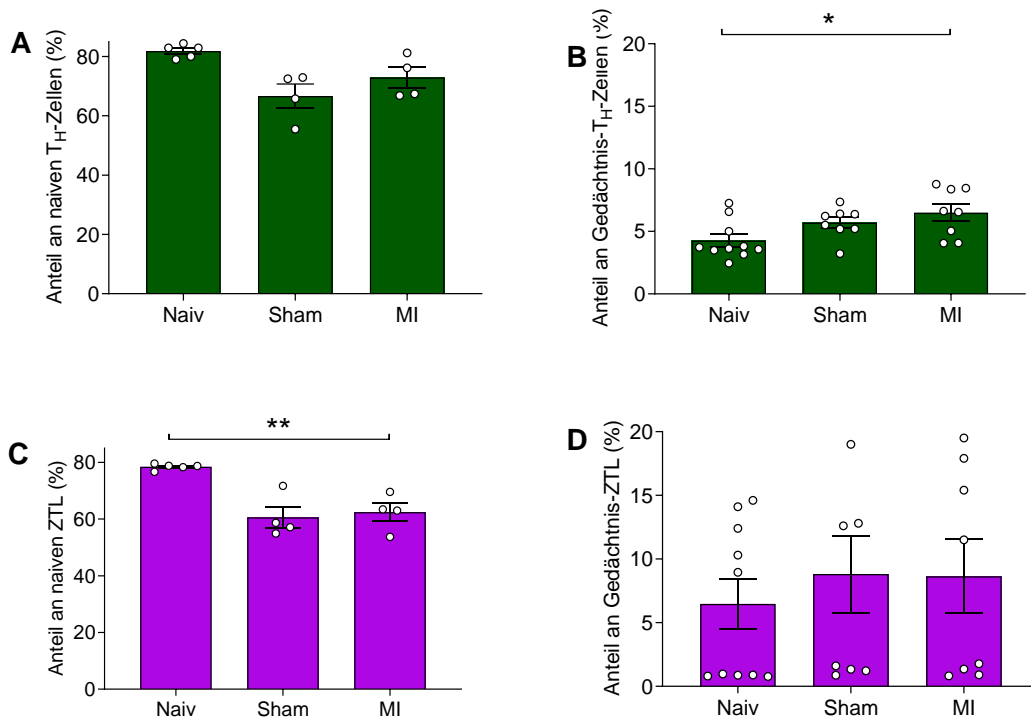


Abbildung 5 Gegenüberstellung von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten bei naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$

- A. **Anteil an naiven T_H-Zellen.** Erniedrigung des Anteils an naiven T_H-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nach MI.
- B. **Anteil an Gedächtnis-T_H-Zellen.** Signifikante Erhöhung des Anteils an Gedächtnis-T_H-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nach MI.
- C. **Anteil an naiven ZTL.** Signifikante Erniedrigung des Anteils an naiven ZTL in den mediastinalen Lymphknoten nach MI.
- D. **Anteil an Gedächtnis-ZTL.** Erhöhung des Anteils an Gedächtnis-ZTL in den mediastinalen Lymphknoten nach MI.

3.1.2 Intrazelluläre Zytokine und Unterteilung der T-Zellen in der Milz, im Thymus und in den subiliakalen Lymphknoten

Die Ergebnisse von Panel 1 und 2 für T_H-Zellen und ZTL aus dem Thymus, der Milz und den subiliakalen Lymphknoten zeigten keine nennenswerten Auffälligkeiten, weshalb diese der Vollständigkeit halber lediglich unter Nennung der Mittelwerte und Standardabweichung in einer Tabelle aufgeführt sind (Tabelle 3 und 4). Signifikante Unterschiede wurden markiert, wobei sich diese nur zwischen naiven Mäusen und Mäusen nach MI ergaben.

CD4+	Thymus					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen ***	24,92	1,80	40,25	7,75	47,65	4,83
Gedächtniszellen	9,03	3,6	9,2	2,3	8,15	1,91
CD69	21,26	5,06	26,73	6,43	22,25	4,5
TCRVβ6	9,69	0,44	10,12	0,7	10,63	0,35
IFN-γ	0,31	0,06	7,66	9,25	4,93	5,44
IL-17	0,55	0,53	13,65	16,14	24,24	25,56
IL-4	1,16	0,46	1,45	0,83	1,49	0,34
LAP	15,99	26,78	18,47	20,16	17,55	14,95
CD4+	Milz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen **	73,95	5,02	54,48	2,28	61,1	4,11
Gedächtniszellen	8,32	2,96	9,9	4,38	11,98	4,86
CD69	0,62	0,13	1,13	0,44	1,18	0,3

TCRV β 6	11,65	0,62	11,93	0,31	11,88	0,42
IFN- γ	2	0,65	4,64	4,16	3,2	1,04
IL-17	0,47	0,46	3	3,87	1,45	1,47
IL-4	1,87	2,81	1,16	1,51	0,97	0,91
LAP	7,39	7,22	8,98	10,92	10,93	13,16
CD4+	subiliakale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen	79,2	4,93	71,98	6,77	75,88	5,82
Gedächtniszellen	3,62	1,32	2,83	1,8	4,08	1,33
CD69	0,89	0,21	4,98	5,06	2,04	0,97
TCRV β 6	11,54	0,31	11,93	0,51	11,83	0,13
IFN- γ	0,43	0,19	6,75	9,57	0,6	0,38
IL-17	0,2	0,09	9,3	11,04	3,25	4,75
IL-4	0,12	0,05	4,91	9,89	0,16	0,2
LAP	4,5	4,69	6,75	11,82	10,71	17,71
CD4+	Herz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
TCRV β 6	9,47	3,09	5,95	0,63	7	2,94
CD4+	mediastinale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
CD69 **	0,73	0,34	2,3	0,63	2,42	0,91
TCRV β 6	11,6	0,16	11,95	0,58	11,65	0,3

Tabelle 3 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 1 und 2 für CD4+ TH-Zellen

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$ und die jeweiligen signifikanten Unterschiede wurden fett markiert

In der Tabelle sind der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) des Anteils an T_H-Zellen genannt, der positiv für den jeweiligen Marker ist. Dargestellt sind die Ergebnisse von Panel 1 und 2 für den Thymus, die Milz und die subiliakalen Lymphknoten, sowie die in den Graphen fehlenden Ergebnisse für das Herz und die mediastinalen Lymphknoten.

CD8+	Thymus					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen **	15,9	6,09	27,3	4,41	29,9	1,73
Gedächtniszellen	9,17	13,65	6,19	6,16	7,69	8,27
CD69	3,57	1,36	2,06	0,72	2,02	0,72
TCRVβ6	5,3	1,6	3,76	0,52	4,24	0,84
IFN-γ	2,36	0,21	1,84	1,12	2,49	1,33
IL-17	0,13	0,08	2,03	1,19	1,95	1,68
IL-4	0,14	0,09	0,1	0,05	0,18	0,1
LAP	10,46	15,68	8,44	9	13,98	13,6
CD8+	Milz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen **	75,48	3,46	58,7	1,31	64,2	4,79
Gedächtniszellen	7,84	6,58	9,17	6,73	9,91	7,24
CD69	0,79	0,11	0,59	0,07	0,53	0,22
TCRVβ6	9,96	0,18	10,08	0,2	10,07	0,54
IFN-γ *	17,88	11,74	6,12	5,91	6,65	1,57
IL-17	0,23	0,35	1,13	0,76	0,86	0,97
IL-4	0,14	0,24	0,09	0,16	0,03	0,05
LAP	13,62	13,81	13,31	14,7	16,85	23,43
CD8+	subiliakale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
Naive Zellen	74,1	6,63	51,28	26,75	66	9,84
Gedächtniszellen	5,36	4,8	4,53	4,99	6,25	5,27
CD69	0,74	0,25	1,1	0,93	0,8	0,33
TCRVβ6	10,32	0,43	7,29	4,94	9,83	0,4
IFN-γ	15,7	11,03	5,46	4,59	5,51	4,2
IL-17	0,06	0,04	1,5	2,76	2,23	2,93
IL-4	0,03	0,02	0,07	0,1	0,05	0,06
LAP	10,96	10,51	8,56	14,92	19,9	30,63
CD8+	Herz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
TCRVβ6	7,79	3,46	4,8	0,79	5,38	1,8

CD8+	mediastinale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
CD69	0,78	0,35	0,93	0,27	0,96	0,32
TCRV β 6	10,15	0,53	9,19	0,84	9,57	1,49

Tabelle 4 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 1 und 2 für CD8+ ZTL

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$ und die jeweiligen signifikanten Unterschiede wurden fett markiert

In der Tabelle sind der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) des Anteils an ZTL genannt, der positiv für den jeweiligen Marker ist. Dargestellt sind die Ergebnisse von Panel 1 und 2 für den Thymus, die Milz und die subiliakalen Lymphknoten, sowie die in den Graphen fehlenden Ergebnisse für das Herz und die mediastinalen Lymphknoten.

3.1.3 Transkriptionsfaktoren der T-Zellen in den untersuchten Organen

Um die Regulation der Immunantwort innerhalb der T-Zellen genauer beurteilen zu können, wurden auch die Transkriptionsfaktoren untersucht, die unter anderem die Expression der jeweiligen Zytokine fördern.

Hier ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Gruppen, weshalb die Ergebnisse lediglich der Vollständigkeit halber in einer Tabelle zusammengefasst wurden (Tabelle 5 und 6). Es lassen sich hier jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen ablesen und signifikante Unterschiede wurden entsprechend gekennzeichnet. Diese ließen sich wieder nur im Vergleich zwischen naiven Mäusen und Mäusen nach MI finden. Auch wenn sich somit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von Transkriptionsfaktoren zwischen scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI finden ließen, so fiel dennoch auf, dass im Herzen der Anteil an Foxp3+ T-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen durchweg am höchsten war (Abbildung 6). Diese Erkenntnis trifft für alle drei Versuchsgruppen zu und spricht dafür, dass im Myokard bevorzugt T_{reg} vorhanden sind, unabhängig vom MI.

CD4+	Herz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	8,97	10,57	11,22	9,48	17,01	10,48
RORyT	40	27,22	56,63	27,12	29,12	25,91
GATA-3	5,89	3,33	27,98	22,93	21,3	17,81
Foxp3	10,92	8,13	8,68	2,89	9,57	4,7
CD4+	mediastinale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	0,83	0,56	3,19	1,31	2,8	2,92
RORyT	1,77	0,73	2,61	2,82	2,73	2,46
GATA-3	0,88	0,74	8,13	12,03	8,22	11,69
Foxp3	6,39	1,21	4,79	2,62	5	2,1
CD4+	Thymus					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	2,71	1,57	5,68	1,42	6,05	5,44
RORyT	2,75	1,27	5,9	4,64	5,97	5,02
GATA-3	5,95	1,24	31,43	14,26	24,78	11,96
Foxp3	3,07	0,9	5,28	2,35	5,43	1,95
CD4+	Milz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	2,94	3,53	4,07	4,39	2,3	0,91
RORyT	2,46	1,02	2,86	1,49	3,71	1,52
GATA-3	2,49	1,04	17,2	12,77	8,84	7,68
Foxp3	7,29	1,6	4,13	3,14	6,67	4,2
CD4+	subiliakale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	0,73	0,58	1,53	2,27	0,72	0,58
RORyT	1,3	0,27	6,73	13,03	1,29	0,75
GATA-3	0,38	0,24	11,43	13,78	5,19	6,94
Foxp3	5,82	1,16	3,46	2,11	4,92	1,51

Tabelle 5 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 3 für CD4+ T_H-Zellen

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$ und die jeweiligen signifikanten Unterschiede wurden fett markiert

In der Tabelle sind der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) des Anteils an T_H-Zellen genannt, der positiv für den jeweiligen Marker ist. Dargestellt sind die Ergebnisse von Panel 3 für die untersuchten Organe.

CD8+	Herz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	13,67	13,17	19,55	4,9	10,16	5,02
RORyT	32,53	8,09	67,77	23,44	44,18	12,79
GATA-3	4,37	4,81	38,89	27,9	22,77	15
Foxp3	1,07	1,12	1,63	1,99	7,09	7,43
CD8+	mediastinale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	5,84	2,37	9,85	2,78	6,97	4,4
RORyT	9,58	11,16	6,7	7,95	5,77	5,35
GATA-3	0,5	0,66	9,49	14,24	5,86	9,62
Foxp3 **	0,34	0,05	0,08	0,07	0,1	0,1
CD8+	Thymus					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	2,89	1,84	4,86	2,63	4,13	3,36
RORyT	6,32	1,19	8,3	4,16	7,91	4,67
GATA-3	0,48	0,19	13,59	7,78	10,36	9,01
Foxp3	0,07	0,04	0,18	0,1	0,1	0,05
CD8+	Milz					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	8,73	6,54	8,88	8,07	5,63	2,31
RORyT	10,33	9,88	5,93	5,02	5,82	4,28
GATA-3	0,21	0,21	9,63	9,96	3,41	5,34
Foxp3 ***	0,58	0,17	0,12	0,13	0,12	0,1
CD8+	subiliakale Lymphknoten					
Marker	Naiv		Sham		MI	
	M	SD	M	SD	M	SD
T-bet	4,78	2,53	4,1	3,01	3,22	1,86
RORyT	10,35	6,27	5,05	6,11	4,74	4,26
GATA-3	0,13	0,16	7,92	14,16	6,47	10,19
Foxp3	0,59	0,14	0,12	0,09	0,21	0,12

Tabelle 6 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 3 für CD8+ ZTL

Verglichen wurden jeweils Mäuse nach MI mit naiven Mäusen und mit scheinoperierten Mäusen, * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,005$ und die jeweiligen signifikanten Unterschiede wurden fett markiert

In der Tabelle sind der Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) des Anteils an ZTL genannt, der positiv für den jeweiligen Marker ist. Dargestellt sind die Ergebnisse von Panel 3 für die untersuchten Organe.

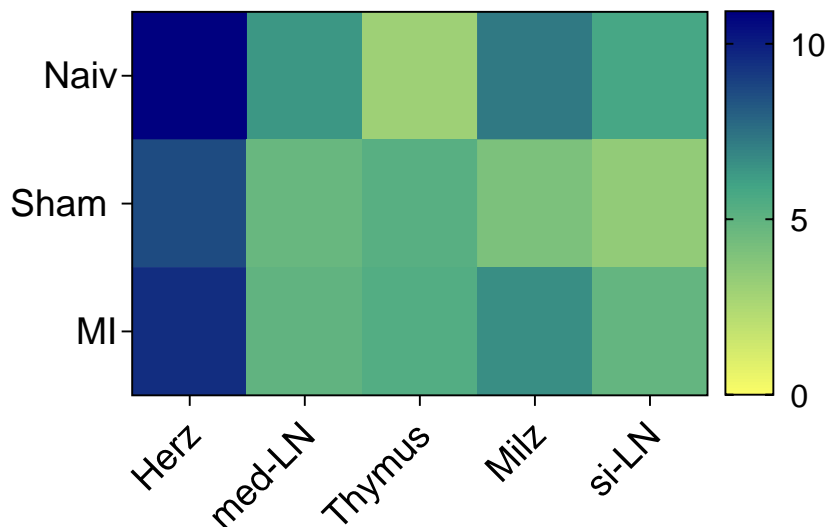


Abbildung 6 Anteil der Foxp3+ T-Zellen in den analysierten Organen und Mäusegruppen

Gezeigt wird der Anteil an Foxp3+ T-Zellen in den verschiedenen Organen und Mäusegruppen mittels Heatmap. Dabei wird in Blau ein großer Anteil (ca. 10 %), in Grün ein mittlerer Anteil (ca. 5%) und in Gelb ein geringer Anteil (bis zu 0%) angezeigt.

3.2 Bildliche Darstellung der T-Zellen nach Myokardinfarkt

3.2.1 Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung von kardialen T-Zellen für die Lichtblatmikroskopie

Da neben der Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort nach MI mittels Durchflusszytometrie die T-Zellen auch bildmorphologisch in Mäuseherzen und Lymphknoten dargestellt werden sollten, musste ein dafür geeignetes Verfahren gewählt werden. Die Lichtblatmikroskopie wurde ausgewählt, da bei diesem Verfahren das untersuchte Organ im Ganzen gescannt und dreidimensional dargestellt werden kann. Bis zum Erreichen eines zufriedenstellenden Ergebnisses mussten jedoch zunächst einige vorhandene Probleme gelöst und das Protokoll zur Vorbereitung und

Anfärbung der Organe optimiert werden. Herzen enthalten viel Myoglobin. Dieses ist ein globuläres Muskelprotein, das eine sauerstoffbindende Häm-Gruppe enthält [47]. Um Organe, die reich an Häm-Gruppen sind, so zu präparieren, dass sie durchgängig für Laserlicht sind, müssen die Häm-Gruppen verändert werden. Dafür ist die alleinige Entfärbung mit BABB nicht ausreichend, da hierbei lediglich die Lipide, die eine Streuung des Laserlichts verursachen, aus den Organen entfernt werden. Somit ist für die Mäuseherzen ein zusätzlicher Schritt zum Bleichen des Gewebes mit 15% H_2O_2 in Methanol notwendig (Abbildung 7). Die Behandlung mit H_2O_2 kann aber eine Veränderung der Zielstruktur der Antikörper bewirken und dadurch die Bindung und Signalgebung der Antikörper erschweren [48]. Ein weiteres Problem stellte die Wahl eines geeigneten Antikörpers zur Anfärbung der T-Zellen im Myokard dar.

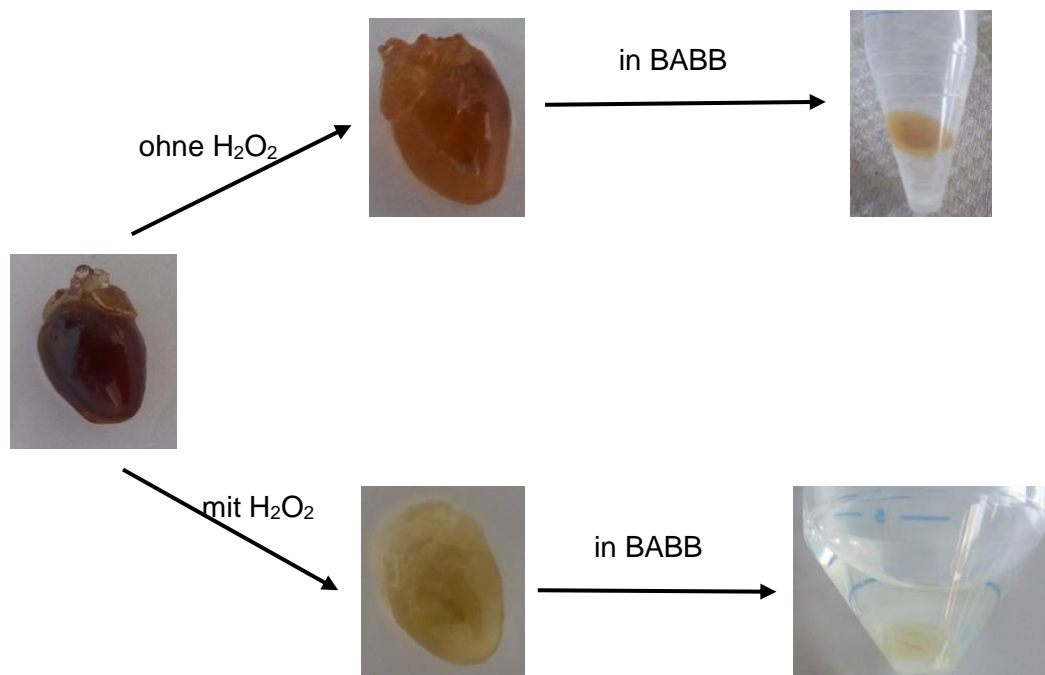
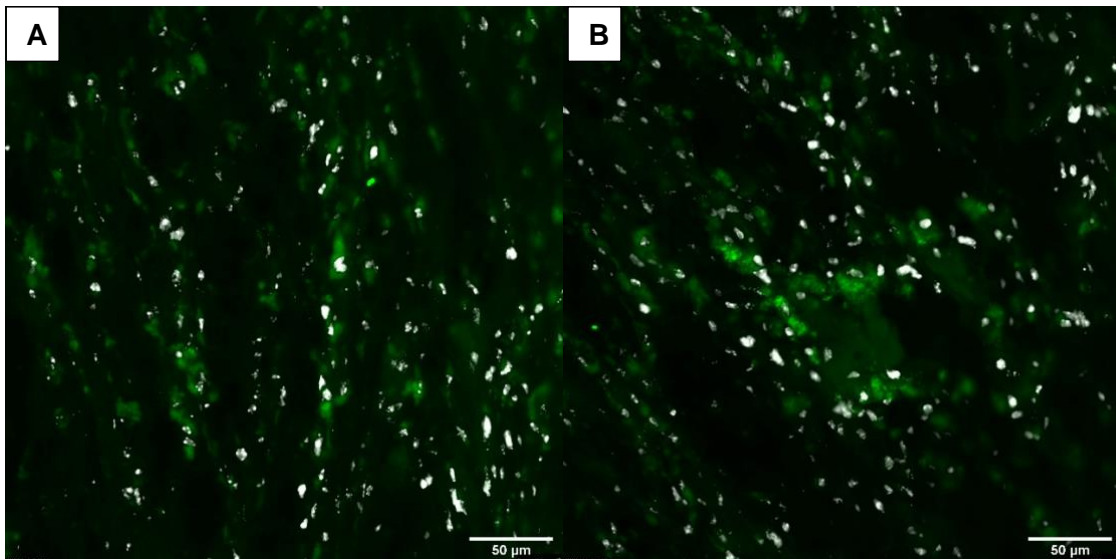


Abbildung 7 Entfärbung der Mäuseherzen

Dargestellt ist der Weg vom unbehandelten Mäuseherz (links) bis zur für die Bildgebung nötigen Entfärbung, einmal ohne Ausbleichen mit H_2O_2 (oben) und einmal mit (unten). Außerdem sind die jeweils unterschiedlich behandelten Herzen in BABB gezeigt.

Um für die Lichtblatmikroskopie geeignete Antikörper zur Anfärbung der Herzen zu finden, wurde die Immunfluoreszenz benutzt, da die Vorbereitungszeit der Organe für die Immunfluoreszenz mit rund einem Tag deutlich kürzer ist als bei der Lichtblatmikroskopie mit ungefähr zwei Wochen. Dabei wurden zur Darstellung der T-Zellen unterschiedlichste Antikörper ausprobiert (Tabelle 7), die jedoch alle kein zufriedenstellendes Ergebnis liefern konnten. Auch die Anfärbung anderer Immunzellen, wie z.B. Makrophagen, bereitete zunächst große Schwierigkeiten. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass durch das nötige Ausbleichen der Mäuseherzen für die Lichtblatmikroskopie die anzufärbenden Antigene zerstört werden, wurden auch in der Immunfluoreszenz ähnliche Bedingungen geschaffen und immer zwei Präparate mit demselben Antikörper angefärbt, wobei jeweils eines davon vorher für 10 Minuten in 15% H₂O₂ in Methanol gegeben wurde. Dabei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den Präparaten (Abbildung 8). Bei beiden Ansätzen konnte kein ausreichendes Signal des jeweiligen Antikörpers festgestellt werden. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die anzufärbenden Antigene nicht durch das H₂O₂ zerstört wurden, sondern bis dahin einfach noch nicht der passende Antikörper zur Anfärbung von T-Zellen im Herzen gefunden werden konnte.



Grün = Autofluoreszenz, Grau = Zellkerne

Abbildung 8 Testung von CD4 GK1.5 A647 in Mäuseherzen nach MI mittels Immunfluoreszenz

In beiden Bildern sind jeweils in Grau die Zellkerne (DAPI) und in Grün die Autofluoreszenz dargestellt.

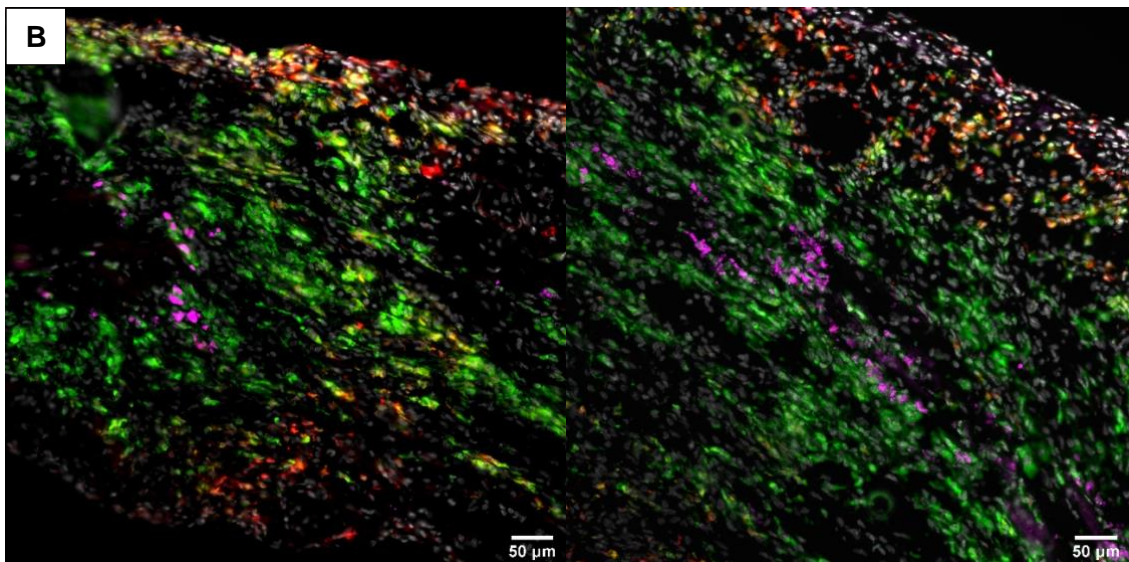
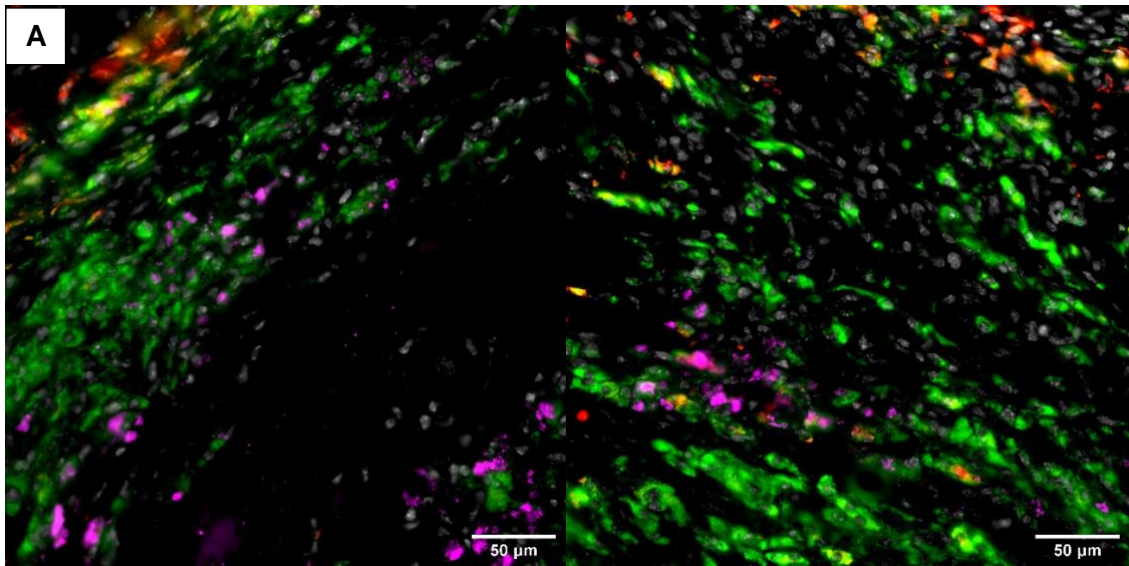
- A. **Nach Vorbehandlung mit H₂O₂.** Es können keine T-Zellen im Myokard angefärbt werden.
- B. **Ohne Vorbehandlung mit H₂O₂.** Auch hier können keine T-Zellen angefärbt werden.

Mäuseherzen		
Marker	Farbstoff	Verdünnung
CD3	-	1:100
CD4, Klon GK1.5	A647	1:100
CD4, Klon RM4-5	A647	1:100
CD68	A594	1:100
CD206	A488	1:100
αSMA	A555	1:100
CD31	-	1:100
CD4, Klon GK1.5	-	1:50
CD4	A546	1:50
CD4, Klon GK1.5	A488	1:100
CD4, Klon RM4-5	A488	1:100
CD206	A647	1:100

Tabelle 7 Auflistung der benutzten Antikörper zur Anfärbung der Mäuseherzen

Die Tabelle enthält alle Antikörper, die benutzt wurden, um Strukturen in Mäuseherzen mittels Immunfluoreszenz anzufärben. Alle diese Antikörper zeigten unter dem Mikroskop kein ausreichendes Signal.

Schließlich konnten in der Immunfluoreszenz funktionierende Antikörper zur Anfärbung von T-Zellen (CD3), Makrophagen allgemein (CD68) und antiinflammatorische Makrophagen (CD206) gefunden werden (Abbildung 9), woraufhin auch die Herzen für die Lichtblatmikroskopie nach oben genanntem Herz-LSFM-Panel (Tabelle 2) angefärbt wurden. In der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass sich die T-Zellen im Herzen am 7. Tag nach MI in direkter Nähe zu den proinflammatorischen CD68+ Makrophagen befinden. Antiinflammatorische, CD206+ Makrophagen zeigten sich hingegen in anderen Bereichen des Herzens ohne direkten Kontakt zu den T-Zellen.



Grün = Makrophagen allgemein, Rot = antiinflammatorische Makrophagen, Magenta = T-Zellen, Grau = Zellkerne

Abbildung 9 Darstellung von T-Zellen und Makrophagen in Mäuseherzen nach Myokardinfarkt mittels Immunfluoreszenz

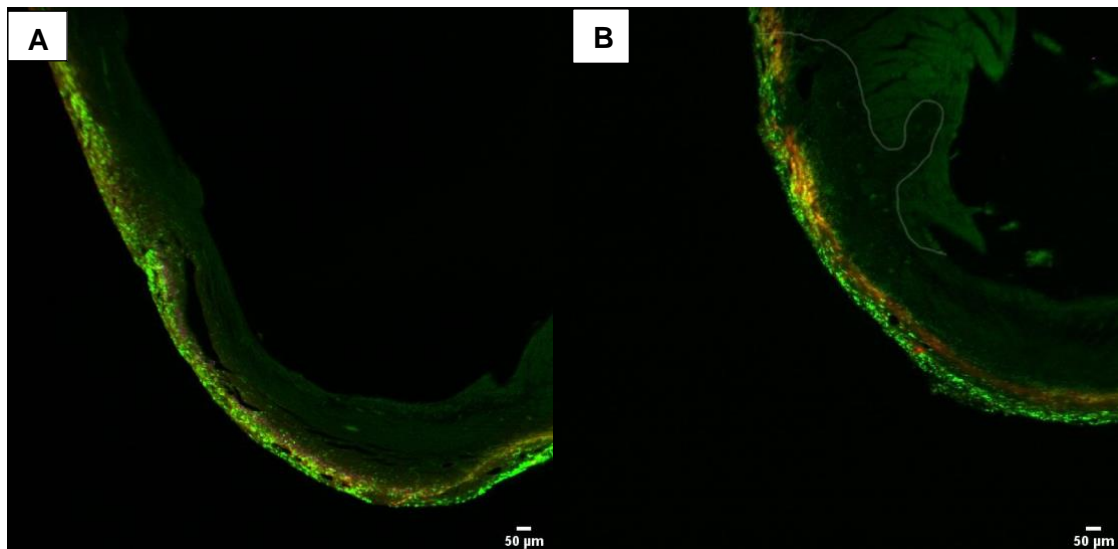
In den einzelnen Bildern sind jeweils in Magenta T-Zellen (CD3), in Grün Makrophagen allgemein (CD68), in Rot antiinflammatorische Makrophagen (CD206) und in Grau die Zellkerne (DAPI) dargestellt.

- A. 40-fache Vergrößerung.** Immunfluoreszenz eines Mäuseherzens nach Myokardinfarkt in 40-facher Vergrößerung.
- B. 20-fache Vergrößerung.** Immunfluoreszenz eines Mäuseherzens nach Myokardinfarkt in 20-facher Vergrößerung.

Nachdem die Mäuseherzen auch für die Lichtblatmikroskopie mit den in der Immunfluoreszenz funktionierenden Antikörpern angefärbt wurden, zeigte sich hier

eine unzureichende Penetration der Antikörper in das Gewebe. Bei Betrachtung der Präparate mittels Lichtblatmikroskopie ergab sich somit, dass sich die Antikörper an der Außenseite der Herzkammer sammelten (Abbildung 10). Um dieses Problem zu adressieren, wurde die Konzentration von TritonX100, das zu Beginn nur in einer Konzentration von 0,1 % verwendet wurde, auf 0,5 % erhöht. Außerdem wurde bei den anfangs im Ganzen verwendeten Herzen nun die Herzbasis entfernt, sodass die Antikörper auch leichter die Innenseite des Herzens erreichen konnten und somit von beiden Seiten aus das Herz infiltrieren konnten.

Nach diesen Veränderungen zeigte sich keine Ansammlung der Antikörper am Rand des Präparates mehr und die angefärbten T-Zellen konnten auch in der Herzwand nachgewiesen werden (Abbildung 11). Zwar konnte die gute Darstellung der Makrophagen mithilfe der in der Immunfluoreszenz überzeugenden Antikörper (CD206 und CD68) nicht wiederholt werden, aber die Anfärbung der im Fokus stehenden T-Zellen blieb weiterhin erfolgreich.



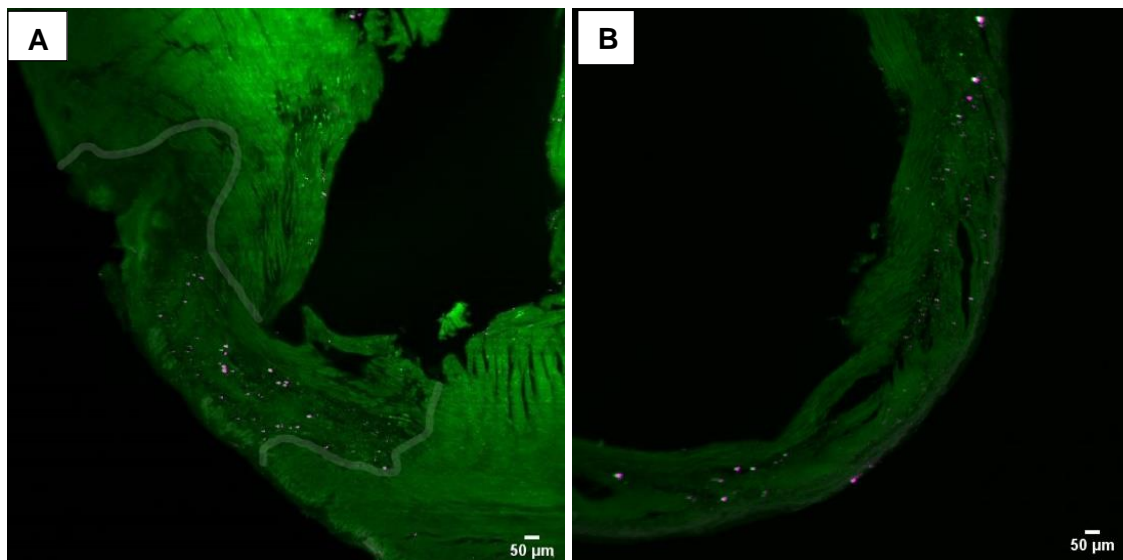
Grün = Autofluoreszenz und Makrophagen allgemein, Rot = antiinflammatorische Makrophagen

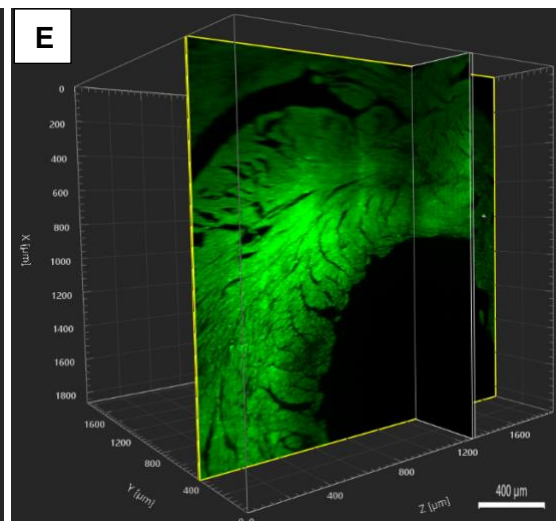
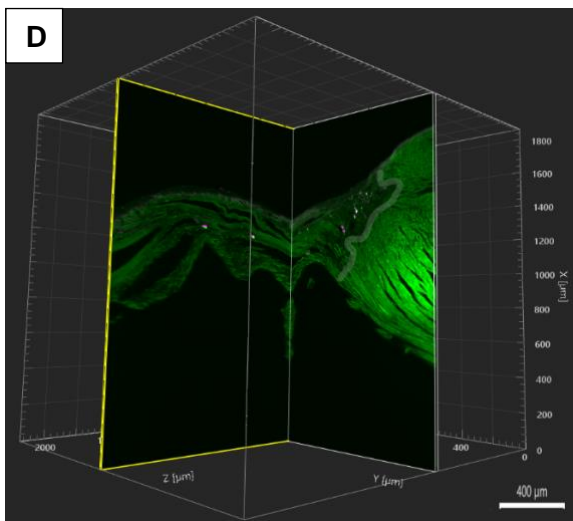
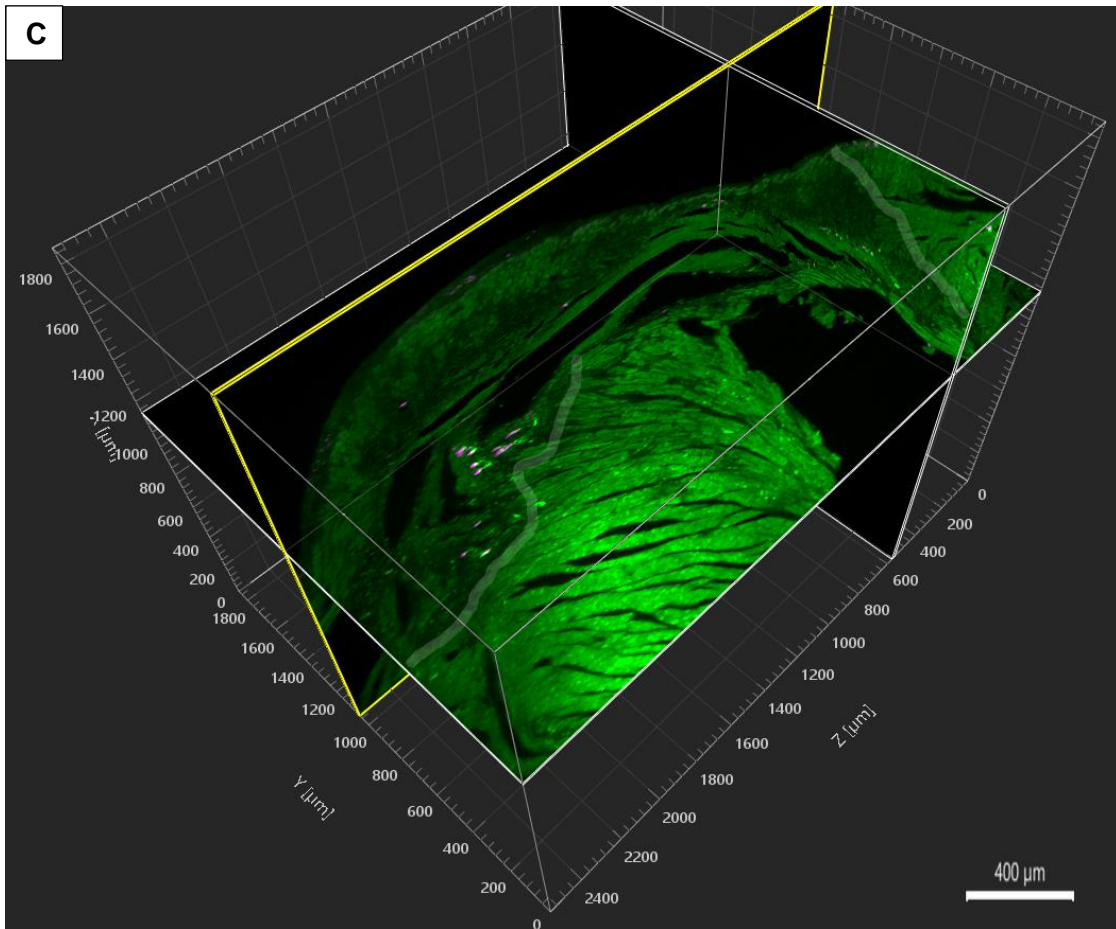
Abbildung 10 Mäuseherzen nach Myokardinfarkt in der Lichtblatmikroskopie vor Verbesserung des Protokolls

- A. Infarktbereich.** Darstellung des Infarktbereichs mit Ansammlung der Antikörper an der Ventrikelaußenseite. (Z-Stack 75 µm)
- B. Infarktbereich neben intaktem Myokard.** Das intakte Myokard (Hellgrün) wurde mittels einer hellen Linie vom Infarktbereich (Dunkelgrün) abgegrenzt. Auch hier kam es zur Ansammlung der Antikörper an der Ventrikelaußenseite (Z-Stack 75 µm).

3.2.2 Darstellung der T-Zellen und deren Verteilung im Myokard nach MI

Nach der Optimierung des Protokolls zur Anfärbung von T-Zellen im Myokard nach MI mittels Lichtblattmikroskopie und der Wahl des passenden Antikörpers konnten die T-Zellen schließlich in den Mäuseherzen dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass sich die T-Zellen insbesondere im Infarktbereich ansammelten (Abbildung 11 A – D). Das neben dem Infarktbereich liegende gesunde Myokard war weitgehend frei von ihnen und es ließen sich dort nur vereinzelt T-Zellen finden (Abbildung 11 E). Außerdem konnte bei den 6 untersuchten Präparaten eine homogene Verteilung der T-Zellen innerhalb der Infarktnarbe festgestellt werden, ohne Gruppierung mehrerer Zellen in einem Bereich. Da die Anfärbung der Makrophagen für die Lichtblattmikroskopie mit den gewählten Antikörpern nicht möglich war, konnte keine Aussage über die Interaktion oder Lage der T-Zellen im Vergleich zu anderen Immunzellen im Myokard nach MI getroffen werden. Dennoch wird durch die Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung der T-Zellen im Myokard mittels Lichtblattmikroskopie zukünftig die Darstellung der Interaktion unterschiedlicher Immunzellen nach MI möglich sein.





Grün = Autofluoreszenz, Magenta = T-Zellen

Abbildung 11 Darstellung der T-Zellen im Myokard nach MI

- A. **Infarktbereich neben intaktem Myokard.** Das intakte Myokard (Hellgrün) wurde vom Infarktbereich (Dunkelgrün) mithilfe einer hellen Linie abgegrenzt. In Magenta sind hauptsächlich im Infarktbereich, vereinzelt auch im intakten Myokard, T-Zellen zu erkennen (Z-Stack 75 µm).

- B. Infarktbereich.** Darstellung der T-Zellen (Magenta) im Infarktbereich des Myokards (Z-Stack 75 μm).
- C. Infarktbereich neben intaktem Myokard in 3 Ebenen.** Das intakte Myokard (Hellgrün) wurde vom Infarktbereich (Dunkelgrün) durch eine helle Linie abgegrenzt. In Magenta sind in 3 unterschiedlichen Ebenen die T-Zellen dargestellt (XZ-Ebene 10,4 μm , XY-Ebene 20 μm , YZ-Ebene 10,4 μm).
- D. Infarktbereich neben intaktem Myokard in 2 Ebenen.** Das intakte Myokard (Hellgrün) wurde vom Infarktbereich (Dunkelgrün) mithilfe einer hellen Linie abgegrenzt. Im Infarktbereich sind T-Zellen (Magenta) dargestellt (XZ-Ebene 10,4 μm , XY-Ebene 20 μm).
- E. Intaktes Myokard in 2 Ebenen.** Dargestellt ist nur das intakte Myokard außerhalb des Infarktbereiches. Hier finden sich keine T-Zellen (Magenta) (XZ-Ebene 10,4 μm , XY-Ebene 20 μm).

3.2.3 Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung von T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten für die Lichtblatmikroskopie

Da neben den Herzen auch die mediastinalen Lymphknoten im Fokus der durchflusszytometrischen Analyse bezüglich der Immunantwort nach MI standen, wurden auch hier die T-Zellen mittels Lichtblatmikroskopie dargestellt. Dabei bereitete die geringe Größe der Lymphknoten Schwierigkeiten. Da die Präparate für die Lichtblatmikroskopie an einer Pinzette in eine Kammer gefüllt mit BABB gehängt werden müssen und die Lymphknoten mit ihren 1-2 mm dafür zu klein sind, mussten sie in eine andere Substanz eingebettet werden, um die Oberfläche zu vergrößern und ein Einspannen in die Pinzette möglich zu machen. Für das Einbetten wurde daher Agarose gewählt und auch hier war ein langsames Herantasten notwendig. Zunächst wurden die Lymphknoten nach Anfärbung in 4% Agarose in ein quadratisches Wägeschiffchen eingebettet und dann die Ränder mit einem Skalpell so weit wie möglich abgeschnitten. Nach Entwässerung und Entfärbung dieser Präparate zeigte sich jedoch, dass die jeweiligen Lösungen die Agarose nicht durchdringen konnten und die Lymphknoten immer noch deutlich sichtbar waren (Abbildung 12 A). Daraufhin wurde in 1%-Schritten die Konzentration an Agarose bis zu 1% reduziert und zum Einbetten der Lymphknoten wurden quadratische Glaskapillaren (3 x 3 mm) benutzt. Dadurch wurde die nötige Menge an Agarose auf ein Minimum reduziert und die Entfärbung war erfolgreich, sodass die Lymphknoten innerhalb der Agarose kaum noch zu erkennen waren (Abbildung 12 B).

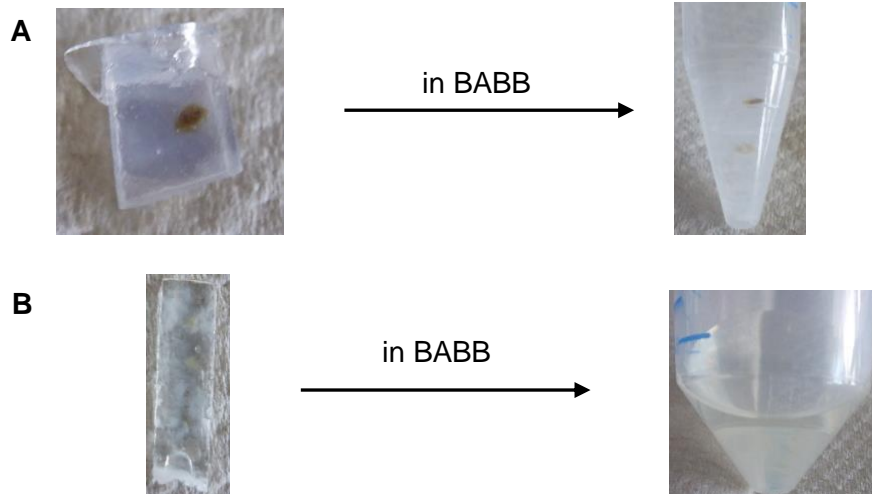


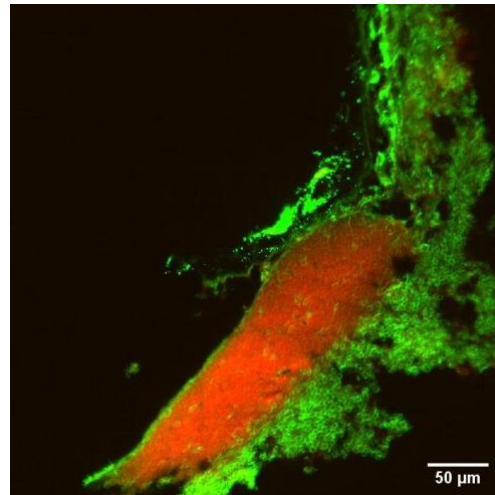
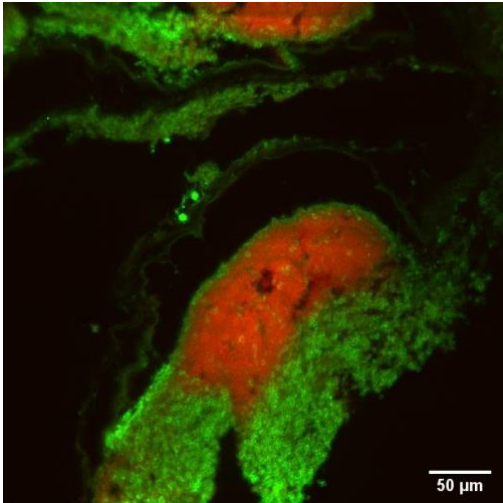
Abbildung 12 Lymphknoten eingebettet in Agarose für die Lichtblattmikroskopie

- A. Vor Verbesserung des Protokolls.** Die Lymphknoten sind noch deutlich sichtbar und kaum entfärbt.
- B. Nach Verbesserung des Protokolls.** Die Lymphknoten sind fast nicht mehr auszumachen und vor allem in BABB annähernd unsichtbar.

3.2.4 Darstellung der T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten mittels Lichtblattmikroskopie

Nach Verbesserung des Protokolls konnten die CD4+ T_H-Zellen im mediastinalen Lymphknoten angefärbt und mikroskopiert werden. Da die Lymphknoten insbesondere durch das Vorkommen von B-Zellen in Form von Lymphfollikeln, umgeben von T-Zellen, gekennzeichnet sind, wurde außerdem ein Antikörper zur Darstellung der B-Zellen gewählt. Dadurch konnte die Struktur der Lymphknoten sichtbar gemacht werden, nämlich sowohl die Lymphfollikel, in denen die Reifung und Differenzierung der B-Zellen stattfindet, als auch die T-Zone, in der die Vermehrung der T-Zellen stattfindet (Abbildung 13). Außerdem konnten innerhalb der Lymphfollikel einzelne T_H-Zellen ausgemacht werden, die den positiv selektierten B-Zellen wichtige Überlebenssignale zukommen lassen [14].

Das optimierte Protokoll zur Anfärbung und Bildgebung von mediastinalen Lymphknoten mittels Lichtblattmikroskopie kann zukünftig auch zum Nachweis anderer Zellen oder Marker genutzt werden, um die immunologischen Vorgänge nach MI besser zu verstehen.



Rot = B-Zellen, Grün = T-Zellen

Abbildung 13 Darstellung der mediastinalen Lymphknoten mittels Lichtblatmikroskopie

Auf beiden Bildern sind jeweils in Grün die T_H -Zellen (CD 4+) und in Rot die B-Zellen (B220+) in Form von Lymphfollikeln dargestellt. Innerhalb der Lymphfollikel sind einzelne T_H -Zellen (Grün) auszumachen.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

4.1.1 Einordnung der T-Zell-Immunantwort nach Myokardinfarkt

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Immunantwort der T-Zellen im Mausmodell nach MI weiter zu charakterisieren. Der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Reparatur des Herzens nach MI hat innerhalb der letzten Jahrzehnte immer mehr Aufmerksamkeit erfahren. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel der pro- und antiinflammatorischen T-Zell-Immunantwort für den Heilungsprozess nach MI notwendig ist. Dabei kann beispielsweise ein Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort anstatt den Heilungsprozess zu fördern, auch gegenteilige Effekte haben und den Gewebeschaden nach MI noch weiter vergrößern [9, 10, 36]. Um nun die Immunantwort der T-Zellen nach MI weiter zu charakterisieren und um herauszufinden, welche pro- und antiinflammatorischen Zytokine und Transkriptionsfaktoren in T_H-Zellen und ZTL im Fokus stehen, wurden diese mittels Durchflusszytometrie genauer untersucht.

Der zum Teil sehr geringe Unterschied der Immunantwort zwischen scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI war überraschend und unterstreicht, dass schon die Schein-Operation der Mäuse einen relevanten Eingriff darstellt und zu einer starken Immunreaktion führt. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen wären wahrscheinlich bei getroffener Vorauswahl der Mäuse bezüglich einer ausreichenden und ähnlichen Infarktgröße und Herzfunktion deutlicher gewesen.

Interessant waren vor allem die Ergebnisse bezüglich LAP+ T_H-Zellen im Herzen, da sich hier ein signifikanter Unterschied nach MI im Vergleich zu naiven oder scheinoperierten Mäusen ergab. Daraus lässt sich schließen, dass die Produktion von LAP und somit auch TGF- β 1 nach MI in T-Zellen hochreguliert wird. Wie schon erwähnt, ist LAP wichtig für eine ausgeglichene Immunantwort und TGF- β 1 zählt zu den antiinflammatorischen Zytokinen [33]. Die untersuchten Organe wurden 7 Tage nach MI entnommen, ungefähr zu dieser Zeit beginnt auch die Heilungsphase im Myokard nach MI. Für eine funktionierende Heilung des Myokards ist eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion notwendig [9] und dabei scheint LAP eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Hypothese lässt sich dadurch stützen, dass auch der Anteil an LAP+ ZTL im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen deutlich erhöht ist. Auffällig war außerdem, dass in den mediastinalen

Lymphknoten kein Unterschied für die Zytokine im Vergleich der jeweiligen drei Gruppen gefunden werden konnte. Dies spricht dafür, dass die signifikante Erhöhung des Anteils an LAP+ T-Zellen nach MI nur lokal im Herzen stattfindet und in keinem anderen der untersuchten lymphatischen Organe.

Auf der Seite der proinflammatorischen Zytokine zeigte sich lediglich für den Anteil an IL-17+ ZTL im Herzen eine signifikante Erhöhung nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen. Somit scheint IL-17 eine Rolle bei der proinflammatorischen Immunantwort nach MI im Herzen zu spielen. Ob diese Immunantwort nun notwendig und förderlich ist für die beginnende Wundheilung im Herzen am Tag 7 nach MI oder eher größeren Schaden anrichtet, bleibt unklar.

Die signifikante Erhöhung des Anteils an Gedächtnis-T_H-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nach MI spricht dafür, dass sich das immunologische Gedächtnis nach MI verändert. Die Bildung von Gedächtniszellen dient der schnelleren und gezielteren Immunantwort bei erneutem Kontakt bzw. Auftreten eines Immuntriggers. Genauer bedeutet dies, dass z.B. bei Reinfektion mit einem dem Immunsystem bereits bekanntem Erreger die damals gebildeten Gedächtniszellen leichter aktiviert werden können, um schneller Zytokine zu sezernieren und den Erreger in einem kürzeren Zeitraum erfolgreich zu entfernen [18]. Interessant wäre nun das Verhalten der nach einem MI gebildeten Gedächtnis-T-Zellen bei einem Reinfarkt zu untersuchen. Es wäre denkbar, dass auch hier eine Beschleunigung der Immunantwort stattfindet. Was dies für Auswirkungen auf die Heilung des geschädigten Myokards nach einem Reinfarkt hätte, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die in einer vorherigen Arbeit festgestellte signifikant erhöhte Expression des TZR TCRV β 6 in kardialen T-Zellen nach MI konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden [36]. Der Anteil an dafür positiven T_H-Zellen war sogar geringer als in der Gruppe von naiven Mäusen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass in der Arbeit von Rieckmann et al. eine Hochdurchsatz-Sequenzierung zur Analyse der TZR genutzt wurde, während die T-Zellen, an deren Oberfläche sich TCRV β 6 befand, in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie herausgefiltert wurden. Daher könnte es sein, dass die Expression des TZR TCRV β 6 in kardialen T-Zellen nach MI zwar signifikant erhöht ist, sich jedoch nicht alle TCRV β 6 auf der Oberfläche der T-Zellen befinden. Dies müsste in weiteren Versuchen im direkten Vergleich zwischen Hochdurchsatz-Sequenzierung und Durchflusszytometrie von TCRV β 6+ T-Zellen näher untersucht werden.

Bei den Transkriptionsfaktoren der T-Zellen ergab sich kein Unterschied zwischen den drei untersuchten Gruppen. Auffällig war jedoch, dass der Anteil an Foxp3+ T_{reg} im Herzen durchgehend höher war als in allen anderen untersuchten Organen, sowohl bei den Mäusen mit als auch ohne MI (Abbildung 6). Dies spricht dafür, dass T_{reg} im Herzen eine besondere Rolle spielen und im Myokard eine Umwandlung der T-Zellen zu T_{reg} begünstigt wird.

4.1.2 Bewertung der Darstellung von T-Zellen im Myokard und in den mediastinalen Lymphknoten nach Myokardinfarkt

Da neben der Frage, wie die T-Zellen die Wundheilung beeinflussen, auch die Frage, wo sich die T-Zellen dabei im Herzen befinden, beantwortet werden sollte, wurde ein Protokoll zur Darstellung der T-Zellen im Herzen und in den mediastinalen Lymphknoten in der Lichtblattemikroskopie etabliert.

Nachdem die T-Zellen im Herzen nach MI mittels Lichtblattemikroskopie dargestellt werden konnten, zeigte sich, dass sich die T-Zellen am 7. Tag nach MI insbesondere im Infarktbereich relativ gleichmäßig verteilt angesammelt haben. Das bedeutet, dass sich die T-Zellen am Ort der notwendigen Wundheilung befinden und direkt oder über die Ausschüttung von Zytokinen Einfluss auf den Heilungsverlauf des Myokards nehmen. Um in Erfahrung zu bringen, mit welchen anderen Zellen die T-Zellen im Myokard nach MI interagieren und wo sich diese befinden, wären weitere Versuche mit Anfärbung von T-Zellen und anderen Immunzellen nötig. Außerdem wäre es interessant herauszufinden, welche Art von T-Zellen sich im Infarktgewebe ansammeln, ob hier z.B. eher die pro- oder die antiinflammatorischen T-Zellen dominieren. Dafür müsste ein Protokoll etabliert werden, das die Anfärbung von T-Zellen und von pro- und antiinflammatorischen Markern (z.B. Zytokinen oder Transkriptionsfaktoren) im Herzen nach MI vereint.

Dank der Etablierung eines Protokolls zur Anfärbung von T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten konnten auch diese mittels Lichtblattemikroskopie sichtbar gemacht werden. Zur Beurteilung des Zusammenspiels zwischen den Immunzellen aus den mediastinalen Lymphknoten und aus dem Herzen wären auch hier weitere Marker zur Differenzierung der T-Zellen in pro- und antiinflammatorisch und ein Vergleich der Verteilung der Immunzellen vor und nach MI interessant.

In dieser Arbeit wurde die Immunantwort der T-Zellen nach MI auf durchflusszytometrischer und mikroskopischer Ebene charakterisiert und damit neue Erkenntnisse hinzugewonnen. Insbesondere LAP+ T-Zellen scheinen nach MI im

Herzen eine entscheidende Rolle zu spielen und die Funktion dieser Zellen im Reparaturprozess nach MI sollte in weiteren Versuchen genauer unter die Lupe genommen werden. Nachdem der Grundstein für die Anfärbung der T-Zellen im Herzen und in den mediastinalen Lymphknoten bereits gelegt wurde, sollten nun in darauf aufbauenden Versuchen weitere Immunzellen mittels Lichtblatmikroskopie dargestellt werden, um den direkten immunologischen Vorgang im Infarktgewebe nach MI immer besser zu verstehen.

4.2 Limitationen dieser Arbeit

Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung der T-Zell-Antwort nach MI mittels Durchflusszytometrie zeigten eindeutig, dass allein schon die Schein-Operation mit der Thorakotomie einen großen Eingriff in den Organismus darstellt. In dieser Gruppe an Mäusen kam es in den untersuchten Organen zu einer Immunreaktion der T-Zellen, die zum Teil sogar stärker ausfiel als nach MI. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass weder die Größe des Infarkts noch die Herzfunktion vor Organentnahme bestimmt wurde. Sie wurde lediglich bei Entnahme des Herzens morphologisch in die Kategorien klein, mittel und groß eingeteilt. Dies erklärt auch die zum Teil sehr große Streubreite der Ergebnisse, da unterschiedlich große Infarkte auch unterschiedliche Immunreaktionen hervorrufen können und der Unterschied zwischen einem kleinen Infarkt und einer Schein-Operation kleiner ist als zwischen einem großen Infarkt und einer Schein-Operation. Somit lässt sich sagen, dass bei Wiederholung der Experimente eine vorherige Bestimmung der Infarktgröße und der Funktion des Herzens z.B. mittels Echokardiographie notwendig ist, um die Immunreaktion nach miteinander vergleichbaren MI aufzudecken und zu kleine Infarkte direkt von der Analyse auszuschließen.

Außerdem stellen die für diese Arbeit notwendigen Operationen an Mäusen eine große Herausforderung dar und benötigen viel Expertise. Nicht nur ein Herzinfarkt kann nach dem Eingriff unterschiedlich groß ausfallen, sondern auch bei einer reinen Thorakotomie kann unterschiedlich viel Schaden gesetzt werden. Um auszuschließen, dass bei der Schein-Operation das sehr nahe gelegene Herz versehentlich verletzt wurde, sollte auch hier vor der Organentnahme eine Kontrolle des Herzens mittels Echokardiographie erfolgen.

Die beiden Einflussfaktoren der unterschiedlichen Größe des MIs und des Kollateralschadens bei operativer Ligatur der linken Koronararterie sollten somit möglichst klein gehalten werden. Dies könnte zukünftig durch die Anwendung eines

neuen, minimal-invasiven Verfahrens zur Induktion eines MI in Mäuseherzen möglich sein. Dabei wird zunächst bei betäubten Mäusen mittels Echokardiographie die linke Koronararterie dargestellt und dann diese gezielt mit Hilfe einer elektrischen Nadel punktiert und koaguliert. Als Kontrolle dient dabei die alleinige Einführung der Nadel ohne folgende Stromabgabe und somit ohne Koagulation der linken Koronararterie [49]. Diese standardisierte, minimal-invasive Methode könnte zukünftig die Induktion von in ihrer Ausdehnung vergleichbaren MI erleichtern. Dadurch wird eine größere Homogenität innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen erreicht.

5 Zusammenfassung

Die Rolle des Immunsystems nach MI hat innerhalb der letzten Jahrzehnte immer mehr Aufmerksamkeit erfahren, trotzdem herrschen weiterhin einige Unklarheiten. Daher war es Ziel dieser Arbeit, das Verhalten der T-Zellen nach MI im Mausmodell näher zu betrachten und zu analysieren. Dafür wurde einerseits mittels Durchflusszytometrie die T-Zell-Immunantwort im Herzen und in verschiedenen lymphatischen Organen mit Fokus auf pro- und antiinflammatorische Zytokine und deren Transkriptionsfaktoren genauer analysiert und andererseits ein Protokoll etabliert, um die T-Zellen im Herzen und in den Lymphknoten mittels Lichtblattemikroskopie sichtbar zu machen.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression von LAP, welches nicht-kovalent an das antiinflammatorische Zytokin TGF- β 1 gebunden ist und das wichtig für eine ausgeglichene Immunantwort ist, indem es überschießende Entzündungsreaktionen verhindert, in T-Zellen im Herzen nach MI im Vergleich zu naiven und scheinoperierten Mäusen signifikant hochreguliert war. Dieses Ergebnis konnte nur im Herzen und in keinem anderen der untersuchten Organe erzielt werden, weshalb es sich somit um eine lokale Immunreaktion handeln muss, die nur im Herzen nach MI stattfindet. Eine weitere Besonderheit war, dass die Häufigkeit des Vorkommens an Foxp3+ T_{reg} im Herzen im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen durchgehend am höchsten war, sowohl bei den Mäusen nach MI als auch bei naiven und scheinoperierten Mäusen. Dies unterstreicht, dass Foxp3+ T_{reg} im Herzen eine wichtige Rolle spielen.

Dank der Verbesserung des Protokolls zur bildlichen Darstellung von T-Zellen im Herzen konnte gezeigt werden, dass sich diese nach MI insbesondere im Infarktgewebe befinden und dort relativ gleichmäßig verteilt sind. Außerdem konnten die mediastinalen Lymphknoten im Ganzen dargestellt und die einzelnen T-Zellen sichtbar gemacht werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse zur Charakterisierung der T-Zell-Immunantwort nach MI im Mausmodell hinzugewonnen werden konnten. Die LAP+ T-Zellen scheinen nach MI im Herzen eine wichtige Rolle zu spielen, weshalb die Funktion dieser Zellen im Reparaturprozess nach MI in zukünftigen Versuchen genauer betrachtet werden sollte. Außerdem wurde der Grundstein zur Anfärbung und Darstellung von T-Zellen in Herzen und in Lymphknoten mittels Lichtblattemikroskopie gelegt, weshalb daran weitergearbeitet werden sollte, um auch andere Immunzellen neben den T-Zellen zeigen zu können. Dadurch können

weitere Hinweise auf das Zusammenspiel der Immunzellen nach MI erhalten werden, um die immunologischen Vorgänge immer besser verstehen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. 2020 18.07.2021].
2. Bundesamt, S. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb>. 2019 18.07.2021].
3. Kardiologie, D.G.f. https://leitlinien.dgk.org/files/26_2018_pocket_leitlinien_4_definition_mi.pdf. 2018 19.07.2021].
4. Tebbe, U., et al., *Reduction of in-hospital mortality and improved secondary prevention after acute myocardial infarction: first results from the Registry of Secondary Prevention after Acute Myocardial Infarction (SAMI)*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2007. **132**(30): p. 1559-1566.
5. Epelman, S., P.P. Liu, and D.L. Mann, *Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 117-29.
6. Wei, X., et al., *EDIL3 deficiency ameliorates adverse cardiac remodeling by neutrophil extracellular traps (NET)-mediated macrophage polarization*. Cardiovasc Res, 2021.
7. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 24-35.
8. Frangogiannis, N.G., *Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration*. Curr Opin Cardiol, 2015. **30**(3): p. 240-5.
9. Nunes-Silva, V., S. Frantz, and G.C. Ramos, *Lymphocytes at the Heart of Wound Healing*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1003**: p. 225-250.
10. Hofmann, U., et al., *Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice*. Circulation, 2012. **125**(13): p. 1652-63.
11. Weirather, J., et al., *Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 55-67.
12. Kologrivova, I., et al., *Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 664457.
13. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage ed. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 304 - 322.
14. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage ed. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 323 - 332.
15. Berard, M. and D.F. Tough, *Qualitative differences between naive and memory T cells*. Immunology, 2002. **106**(2): p. 127-38.
16. Lederer, J.A., et al., *Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 397-406.
17. Park, T.Y., et al., *RORgammat-specific transcriptional interactomic inhibition suppresses autoimmunity associated with TH17 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(52): p. 18673-8.
18. Chang, J.T., E.J. Wherry, and A.W. Goldrath, *Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1104-15.
19. Pepper, M., et al., *Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 583-95.

20. Reinhardt, R.L., et al., *Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 101-5.
21. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-63.
22. Serfling, E., et al., *The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1498**(1): p. 1-18.
23. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 749-95.
24. Sher, A. and R.L. Coffman, *Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 385-409.
25. Snapper, C.M. and W.E. Paul, *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production*. *Science*, 1987. **236**(4804): p. 944-7.
26. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. *Cell*, 2000. **100**(6): p. 655-69.
27. Gadani, S.P., et al., *IL-4 in the brain: a cytokine to remember*. *J Immunol*, 2012. **189**(9): p. 4213-9.
28. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 721-32.
29. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 23-35.
30. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. *Cell*, 1997. **89**(4): p. 587-96.
31. Miossec, P. and J.K. Kolls, *Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(10): p. 763-76.
32. Ono, M., *Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes*. *Immunology*, 2020. **160**(1): p. 24-37.
33. Boswell, S., et al., *Induction of latency-associated peptide (transforming growth factor-beta(1)) expression on CD4+ T cells reduces Toll-like receptor 4 ligand-induced tumour necrosis factor-alpha production in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. *Immunology*, 2011. **133**(3): p. 278-87.
34. Karhadkar, T.R., T.D. Meek, and R.H. Gomer, *Inhibiting Sialidase-Induced TGF-beta1 Activation Attenuates Pulmonary Fibrosis in Mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021. **376**(1): p. 106-117.
35. Bansal, S.S., et al., *Activated T Lymphocytes are Essential Drivers of Pathological Remodeling in Ischemic Heart Failure*. *Circ Heart Fail*, 2017. **10**(3): p. e003688.
36. Rieckmann, M., et al., *Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(11): p. 4922-4936.
37. Cossarizza, A., et al., *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies*. *Eur J Immunol*, 2017. **47**(10): p. 1584-1797.
38. Baaten, B.J., C.R. Li, and L.M. Bradley, *Multifaceted regulation of T cells by CD44*. *Commun Integr Biol*, 2010. **3**(6): p. 508-12.
39. Yang, S., et al., *The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22560.
40. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(3): p. 136-40.
41. Brede, C., et al., *Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(12): p. 4439-46.

42. Santi, P.A., *Light sheet fluorescence microscopy: a review*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(2): p. 129-38.
43. Feng, Z., et al., *A Novel Nanomedicine Ameliorates Acute Inflammatory Bowel Disease by Regulating Macrophages and T-Cells*. Mol Pharm, 2021.
44. Luan, G., et al., *Butorphanol Promotes Macrophage Phenotypic Transition to Inhibit Inflammatory Lung Injury via kappa Receptors*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 692286.
45. Matsuyama, S., et al., *Properties of macrophages and lymphocytes appearing in rat renal fibrosis followed by repeated injection of cisplatin*. J Vet Med Sci, 2021.
46. Lee, W., et al., *Resident vs nonresident multipotent mesenchymal stromal cell interactions with B lymphocytes result in disparate outcomes*. Stem Cells Transl Med, 2021. **10**(5): p. 711-724.
47. Vanek, T. and A. Kohli, *Biochemistry, Myoglobin*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
48. Han, S., Y. Cui, and D.L. Helbing, *Differential effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment on epitope recognition in western blotting*. Anal Biochem, 2019. **586**: p. 113417.
49. Sicklinger, F., et al., *A Minimal-Invasive Approach for Standardized Induction of Myocardial Infarction in Mice*. Circ Res, 2020. **127**(9): p. 1214-1216.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

A488/546/555/594/647	Alexa Fluor 488/546/555/594/647
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanine7
αSMA	α -Smooth Muscle Actin
BABB	Benzylalkohol/Benzoesäurebenzylester
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution
BV510/421	Brilliant Violet 510/421
B-Zellen	B-Lymphozyten
CD	cluster of differentiation
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCR	Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fix/Perm	Fixation/Permeabilization
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtslichtstreuung
g	Normalerdschwerebeschleunigung
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IFN-γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAP	latency-associated peptide
M	Mittelwert
med-LN	mediastinale Lymphknoten
MHC	Major histocompatibility complex
MI	Myokardinfarkt
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Pac. Blue	Pacific Blue
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanine7
Percp-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein-Cyanine5.5
PFA	Paraformaldehyd
RORγt	RAR-related orphan receptor gamma-T
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
Sham	scheinoperierte Mäuse
si-LN	subiliakale Lymphknoten
SSC	Seitwärtslichtstreuung
T-bet	T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21
T_{CM}-Zellen	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen
T_{EM}-Zellen	Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta

T_H-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
T_{reg}	regulatorische T-Zellen
T-Zellen	T-Lymphozyten
TZR/TCR	T-Zell-Rezeptor

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der untersuchten Organe	12
Abbildung 2 Darstellung der Layouts zur Auswertung der Durchflusszytometrie am Beispiel eines mediastinalen Lymphknotens nach MI	18
Abbildung 3 Intrazelluläre Zytokine der T _H -Zellen und ZTL im Herzen von naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI.....	27
Abbildung 4 Intrazelluläre Zytokine der T _H -Zellen und ZTL in mediastinalen Lymphknoten von naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI ...	29
Abbildung 5 Gegenüberstellung von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen in mediastinalen Lymphknoten bei naiven Mäusen, scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach MI	31
Abbildung 6 Anteil der Foxp3+ T-Zellen in den analysierten Organen und Mäusegruppen.....	37
Abbildung 7 Entfärbung der Mäuseherzen	38
Abbildung 8 Testung von CD4 GK1.5 A647 in Mäuseherzen nach MI mittels Immunfluoreszenz	39
Abbildung 9 Darstellung von T-Zellen und Makrophagen in Mäuseherzen nach Myokardinfarkt mittels Immunfluoreszenz.....	41
Abbildung 10 Mäuseherzen nach Myokardinfarkt in der Lichtblatmikroskopie vor Verbesserung des Protokolls	42
Abbildung 11 Darstellung der T-Zellen im Myokard nach MI	44
Abbildung 12 Lymphknoten eingebettet in Agarose für die Lichtblatmikroskopie.....	46
Abbildung 13 Darstellung der mediastinalen Lymphknoten mittels Lichtblatmikroskopie	47

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der Antikörper für die Durchflusszytometrie	16
Tabelle 2 Übersicht der Antikörper für die Lichtblattmikroskopie	23
Tabelle 3 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 1 und 2 für CD4+ TH-Zellen.....	32
Tabelle 4 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 1 und 2 für CD8+ ZTL	34
Tabelle 5 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 3 für CD4+ T _H -Zellen	35
Tabelle 6 Auflistung der durchflusszytometrischen Ergebnisse von Panel 3 für CD8+ ZTL.....	36
Tabelle 7 Auflistung der benutzten Antikörper zur Anfärbung der Mäuseherzen	40

IV Danksagung

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Gustavo Ramos für die gute Betreuung, die tolle Unterstützung und die ansteckende Begeisterung bei jeder neuen Entdeckung. Außerdem möchte ich dem ganzen Laborteam danken, insbesondere Marga, Murilo, Elena, Nils und Chiara für die große Hilfe und die schöne gemeinsame Zeit.

Mein Dank gilt außerdem meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stefan Frantz, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg, für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin Heinze für die Nutzung der Lichtblattemikroskope im RVZ in Würzburg und an Herrn Jürgen Pinnecker für die tolle Einführung und permanente Hilfsbereitschaft.

Der größte Dank gilt meinen Eltern für die grenzenlose und liebevolle Unterstützung, die ich schon mein ganzes Leben erfahren darf, meinem Bruder, der mir ein großes Vorbild ist und Robert, der immer für mich da ist und mit dem alles Schwere viel leichter erscheint.

VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Eigene Veröffentlichungen:

- The healing myocardium mobilizes a distinct B-cell subset through a CXCL13-CXCR5-dependent mechanism.
Heinrichs M, Ashour D, Siegel J, Büchner L, Wedekind G, Heinze KG, Arampatzi P, Saliba AE, Cochain C, Hofmann U, Frantz S, Campos Ramos G. *Cardiovasc Res.* 2021 Nov 22;117(13):2664-2676. doi: 10.1093/cvr/cvab181.
- Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-specific T helper cell responses.
Rieckmann M, Delgobo M, Gaal C, Büchner L, Steinau P, Reshef D, Gil-Cruz C, Horst ENT, Kircher M, Reiter T, Heinze KG, Niessen HW, Krijnen PA, van der Laan AM, Piek JJ, Koch C, Wester HJ, Lapa C, Bauer WR, Ludewig B, Friedman N, Frantz S, Hofmann U, Ramos GC. *J Clin Invest.* 2019 Aug 13;129(11):4922-4936. doi: 10.1172/JCI123859.