

**Die Rolle von myeloiden Zellen und  
deren Interaktion mit inflammatorischen  
Mediatoren bei der Pathogenese des  
Myokardinfarktes**

**Dissertation**  
Zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Stefanie Finger**  
Geboren am 10.02.1985 in Dresden

Mainz, Oktober 2017

Aus dem

**Zentrum Kardiologie – Kardiologie I**

und dem

**Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)**

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2018

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anatomie, zellulärer Aufbau und Funktion des humanen Herzens .....	1
1.1.1 Lage, Anatomie und zellulärer Aufbau des menschlichen Herzens .....	1
1.1.2 Blutversorgung des Herzmuskelgewebes über die Herzkranzgefäße.....	3
1.1.3 Herzfunktion.....	4
1.1.3.1 Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels .....	4
1.1.3.2 Regulierung der Herztätigkeit .....	5
1.1.3.3 Untersuchungsmethoden zur Herzfunktion.....	6
1.2 Funktionen und zellulärer Aufbau des Blutkreislaufs.....	6
1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	8
1.3.1 Der Myokardinfarkt.....	9
1.4 Mausmodelle des Myokardinfarktes.....	11
1.5 Angeborene und erworbene Immunantwort .....	12
1.5.1 Der Einfluss von myeloiden Immunzellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	15
1.5.1.1 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten beim Myokardinfarkt.....	15
1.5.1.2 Die Funktion von Monozyten/Makrophagen beim Myokardinfarkt.....	17
1.5.2 Der Einfluss von lymphoiden Immunzellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	19
1.5.2.1 Die Funktion von B-Zellen beim Myokardinfarkt .....	20
1.5.2.2 Die Bedeutung von T-Zellen beim Myokardinfarkt .....	20
1.5.2.2.1 Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen .....	20
1.5.2.2.2 Die Rolle von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen beim Myokardinfarkt .....	21
1.5.2.3 Der Einfluss von NK-Zellen beim Myokardinfarkt.....	22
1.6 Ziel der Dissertation.....	24
1.6.1 Hypothesen.....	25
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
2.1 Material.....	26

---

2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.3 Chirurgische Instrumente .....	28
2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen .....	28
2.1.4.1 Puffer für Blutentnahme.....	30
2.1.4.2 Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie .....	30
2.1.4.3 Puffer für RNA Isolierung.....	30
2.1.4.4 Anästhesie und Antagonisierung.....	31
2.1.5 Kits.....	31
2.1.6 Antikörper für Durchflusszytometrie .....	32
2.1.7 qRT-PCR Primer.....	32
2.1.8 Spezielle Software .....	33
2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Versuchstiere.....	33
2.2.1.1 Rechtliche Voraussetzungen – Tierversuchsanträge.....	34
2.2.1.2 Haltungsbedingungen und Zucht.....	34
2.2.1.3 Verwendete Mausstämme.....	34
2.2.1.4 Behandlungen der Versuchstiere .....	36
2.2.1.4.1 <i>In vivo</i> Depletion von LysM <sup>+</sup> myelomonocytyären Zellen .....	36
2.2.1.4.2 <i>In vivo</i> Depletion von Gr-1 <sup>+</sup> Zellen .....	37
2.2.2 Zellkultur .....	38
2.2.2.1 Produktion und Aufreinigung des monoklonalen anti-Gr-1 Antikörpers ....	38
2.2.3 Operative Methoden .....	39
2.2.3.1 LAD („left anterior descending coronary artery“) Ligatur .....	39
2.2.3.2 Implantation von EKG Transmittern.....	42
2.2.4 Organentnahme .....	42
2.2.5 Isolierung und adaptiver Zelltransfer von neutrophilen Granulozyten oder Monozyten .....	43
2.2.6 <i>In vivo</i> Cathelicidin Applikation.....	43

---

2.2.7 Echokardiographie .....	44
2.2.7.1 Linksventrikuläre Funktion.....	44
2.2.8 Durchflusszytometrie.....	46
2.2.8.1 Zellaufarbeitungen.....	47
2.2.8.2 Zelloberflächenfärbungen für FACS .....	47
2.2.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	50
2.2.9.1 RNA Isolierung aus murinem Herzgewebe .....	51
2.2.9.2 RNA Konzentrationsbestimmung.....	52
2.2.9.3 Durchführung qRT-PCR .....	52
2.2.9.3.1 Expressionsanalyse.....	52
2.2.9.3.2 Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse.....	54
2.2.10 Histologie .....	54
2.2.11 Statistik .....	55
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
3.1 Die Rolle von LysM <sup>+</sup> myelomonocytyären Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	56
3.1.1 LysM <sup>+</sup> Zellepletion führt zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate und signifikant vermehrten Fibrosebildung nach Myokardinfarkt.....	56
3.1.2 Verminderter Gr-1 <sup>+</sup> Zellinflux bei LysM <sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt.....	58
3.1.3 Verminderte IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ Expression bei LysM <sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt.....	60
3.2. Effekte der IFN- $\gamma$ -Defizienz und TNF- $\alpha$ -Defizienz auf Zellrekrutierung, LV Funktion und Überleben nach Myokardinfarkt .....	64
3.2.1 Postinfarkt-Überleben und linksventrikuläre Funktion sind abhängig von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ .....	64
3.2.2 Verminderter Zellinflux bei IFN- $\gamma$ -defizienten und TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt.....	65
3.2.3 Verminderte Neutrophilen-Chemotaxis, Monozyten-Chemotaxis und IL-12-Expression bei IFN- $\gamma$ -defizienten und TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt .....	71
3.3. Die Rolle von Gr-1 <sup>+</sup> Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	73

---

3.3.1 Gr-1 <sup>+</sup> Zelldepletion führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate und Verschlechterung der LV Funktion .....	75
3.3.2 Verminderte Zellinfiltration bei anti-Gr-1-behandelten Mäusen nach Myokardinfarkt .....	76
3.3.3 Depletion von Neutrophilen führt zu einer verminderten Monozyten-Chemotaxis nach Myokardinfarkt.....	83
3.3.4 Rekonstitutionsversuche bei Gr-1 <sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt .....	86
3.4. Die Rolle von Cathelicidin bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	88
3.4.1 Cathelicidinmangel führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate, verstärktem „cardiac remodeling“ und Verschlechterung der LV Funktion .....	88
3.4.2 Induktion des Myokardinfarktes führt zu einer pulslosen elektrischen Aktivität mit Herzkreislaufstillstand bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren.....	90
3.4.3 Verminderter Zellinflux bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt .....	92
3.4.4 Verminderte Neutrophilen-Chemotaxis, Monozyten-Chemotaxis und IL-12-abhängiges „IFN- $\gamma$ -signaling“ bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt .....	97
3.4.5 Rekonstitution des Wildtyp-Phänotypus bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt.....	99
3.5 Effekte der Ifngr1-Defizienz auf LV Funktion und Zellrekrutierung nach Myokardinfarkt.....	105
3.5.1 Ifngr1-Defizienz führt zu einer Verschlechterung der systolischen Herzleistung nach Myokardinfarkt.....	105
3.5.2 Verminderte Zellinfiltration bei Ifngr1-defizienten Tieren nach Myokardinfarkt .....	106
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>110</b>
4.1 Die Bedeutung von LysM <sup>+</sup> myelomonocytyären Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	110
4.2 IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ vermitteln die myelomonocytyäre Zellrekrutierung beim Myokardinfarkt.....	113
4.3 Der überlebenswichtige Einfluss von Gr-1 <sup>+</sup> Neutrophilen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes .....	117
4.4 Die essentielle Funktion von Cathelicidin bei der Monozyten-Chemotaxis, beim „cardiac remodeling“ und Überleben nach Myokardinfarkt .....	119

---

4.5 Die Monozyten/Makrophageninfiltration nach Myokardinfarkt ist abhängig vom Ifngr1 auf LysM <sup>+</sup> Zellen.....	122
4.6 Weitere Fragestellungen hinsichtlich der IFN- $\gamma$ Produktion nach Myokardinfarkt .....	124
4.6.1 Fibroblastenaktivierung führt mutmaßlich nicht zur IFN- $\gamma$ Sezernierung nach Myokardinfarkt .....	125
4.6.2 Dendritische Zellen als potentielle Stimulatoren der IFN- $\gamma$ Produzenten.....	125
4.6.3 $\gamma$ : $\delta$ T-Zellen als potentiell zeitige IFN- $\gamma$ Produzenten beim Myokardinfarkt ..	126
4.6.4 „Innate lymphocyte cells“ als potentiell zeitige IFN- $\gamma$ Produzenten beim Myokardinfarkt .....	128
4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick .....	128
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>132</b>
Summary .....	134
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>136</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>151</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	151
Abbildungsverzeichnis .....	155
Tabellenverzeichnis .....	159
Anhang Tabellen .....	160
Eidesstattliche Erklärung .....	182
Danksagung .....	183
<i>Curriculum Vitae</i> .....	184

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Anatomie, zellulärer Aufbau und Funktion des humanen Herzens

#### 1.1.1 Lage, Anatomie und zellulärer Aufbau des menschlichen Herzens

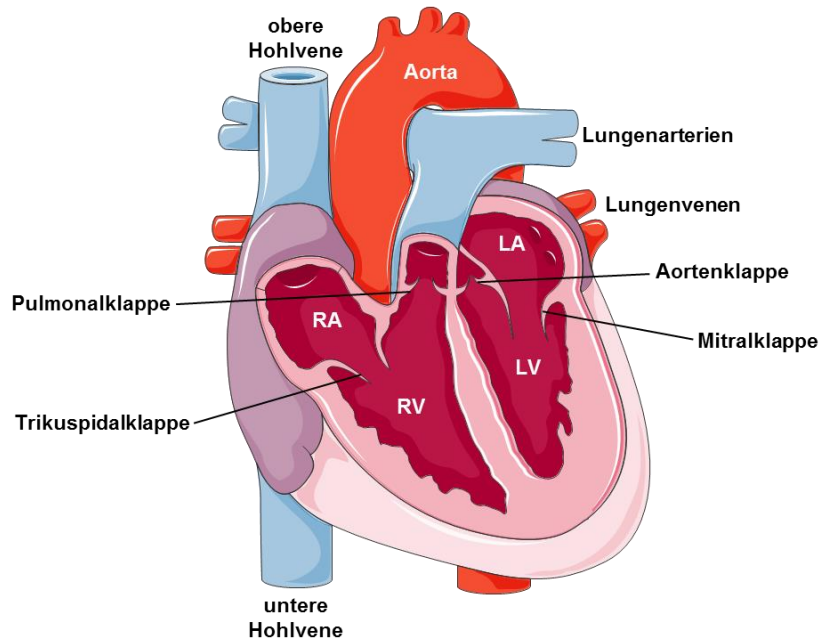
Das menschliche Herz - ein Hohlorgan - liegt thorakal innerhalb des Perikards (Herzbeutel), begrenzt vom Brustfell und auf dem Zwerchfell aufliegend sowie an rechter und linker Lunge anliegend. Anatomisch besteht es aus vier Kammern, unterteilt in *Atrium dextrum* (rechter Vorhof) und *Atrium sinistrum* (linker Vorhof) sowie in *Ventriculus dexter* (rechte Herzkammer) und *Ventriculus sinister* (linke Herzkammer). Über die Herzscheidewände lässt sich die linke Herzhälfte von der rechten Herzhälfte abgrenzen. Das *Septum interatriale* trennt hierbei die Vorhöfe. Zur Trennung des rechten und linken Ventrikels dient hingegen das *Septum interventriculare*, bestehend aus *Pars membranacea* sowie *Pars muscularis* [1].

Eine weitere Aufteilung des Herzens erfolgt nach Arealen, man differenziert dabei zwischen der kranial und dorsal liegenden Herzbasis (*Basis cordis*) sowie der apikal gelegenen Herzspitze (*Apex cordis*). Die Herzbasis wird von den großen Gefäßen determiniert. Hierzu zählen die *Vena cava superior* und *inferior* (obere und untere Hohlvene) sowie die *Venae pulmonales* (sie bilden zusammen das sogenannte Venenkreuz) und die aus den Herzkammern abgehenden, großen Arterienstämme (*Aorta ascendens* und *Truncus pulmonalis*). *Vena cava superior* und *inferior* münden in den rechten Atrium (RA), die *Venae pulmonales* hingegen enden im linken Atrium (LA) des Herzens [2].

Als viszerales Blatt bezeichnet man die innerste Schicht des Perikards. Es ist mit dem Epikard, der äußersten Schicht des Herzens, verbunden. Unter dem Epikard befindet sich wiederum eine Fettschicht, in welcher die Herzkranzgefäße verlaufen. Diesem anschließend folgt eine spezialisierte Herzmuskelgewebsschicht - das Myokard. Die innerste Schicht des Herzens besteht aus dem Endokard und bildet ebenfalls - die als Ventil dienenden - vier Herzklappen. Diese lassen sich in zwei Kategorien einordnen - die Segelklappen trennen hierbei die Vorhöfe und Herzkammern. Zu ihnen werden die Trikuspidalklappe (*Valva tricuspidalis*) sowie die Mitralklappe (*Valva mitralis*) gezählt. Zwischen dem RA und dem rechten Ventrikel (RV) befindet sich die Trikuspidalklappe. Die Mitralklappe liegt dagegen zwischen dem LA sowie dem linken Ventrikel (LV). Ferner repräsentieren Taschenklappen die zweite Herzklappenkategorie. Sie fungieren als



Ventil zwischen den Herzkammern und den Auswurfgefäßen: die Pulmonalklappe (*Valva trunci pulmonalis*) liegt zwischen RV und *Truncus pulmonalis*, die Aortenklappe (*Valva aortae*) befindet sich zwischen LV und *Aorta ascendens* [2, 3].



**Abbildung 1-1: Herzanatomie**

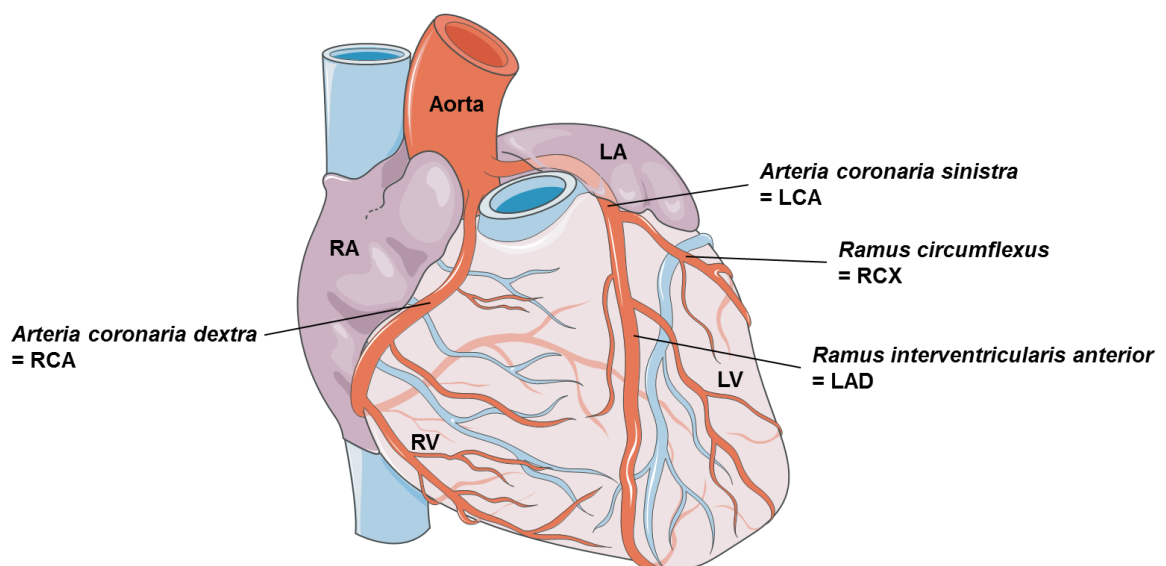
Obere und untere Hohlvene münden in den rechten Vorhof (RA). Die Trikuspidalklappe zwischen dem rechten Vorhof und der rechten Kammer (RV) verhindert den Rückfluss des Blutes zurück in den Vorhof. Von der rechten Herzkammer wird das Blut über den *Truncus pulmonalis* in die Lungenarterien zum Lungenkreislauf gepumpt - die Pulmonalklappe verhindert den Rückfluss zurück in die Kammer. Anschließend wird das Blut aus der Lunge über die Lungenvenen über den linken Vorhof (LA) in die linke Herzkammer (LV) gepumpt. Ein Rückfließen wird durch die Mitralklappe verhindert. Im Anschluss wird das Blut über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt - die Aortenklappe verhindert den Rückfluss in die linke Herzkammer. Modifiziert unter Verwendung von Servier Medical Art [4].

Zu einem Drittel besteht das menschliche Herz aus Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten). Der größere Anteil umfasst weitere interstitielle Zelltypen wie glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen der Koronargefäße und des Endokards, Fibroblasten und andere Bindegewebszellen sowie Mastzellen und weitere Zellen des Immunsystems [5].

Im Herz existieren zwei verschiedene Arten von Kardiomyozyten. Eine ist verantwortlich für die Herzkontraktion, die andere Gruppe ist für die Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung zuständig. Ein weiterer Zelltyp des Herzens sind Schrittmacherzellen - sie sind in der Lage selbst Aktionspotentiale auszulösen. Diese Zellen befinden sich im Sinusknoten, im AV-Knoten (Atrioventrikular-Knoten) und in den His-Bündeln. Herzkranzgefäße wiederum bestehen aus glatten Muskelzellen, Endothelzellen und adventitiellen Zelltypen (Adipozyten, Fibroblasten). Kardiale Fibroblasten sind in der Lage, extrazelluläre Matrix, vorrangig Kollagen Typ I, zu bilden, intrazellulär abzulagern und Herzmuskelzellen sowie Gefäße zu binden.

### 1.1.2 Blutversorgung des Herzmuskelgewebes über die Herzkranzgefäße

Die Herzkranzgefäße werden in Arterien und Venen aufgeteilt. Drei Koronarvenen (*Vena cordis magna*, *Vena cordis media*, *Vena cordis parva*) transportieren das sauerstoffarme Blut vom Herzmuskel in den *Sinus coronarius* des rechten Vorhofs. Die rechten und linken Koronararterien, welche den Herzmuskel selbst mit sauerstoffreichem Blut versorgen, stammen aus der Aorta. Sie können untereinander durch Anastomosen verbunden sein, die jedoch bei jeglicher Art von Mangel durchblutung von einzelnen Arterien im Herzgewebe nicht in der Lage sind eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher zu stellen.



#### Abbildung 1-2: Koronararterien

Die Koronararterien werden unterteilt in *Arteria coronaria sinistra* (LCA, engl. left coronary artery) und in *Arteria coronaria dextra* (RCA, engl. right coronary artery). Die LCA teilt sich auf in *Ramus interventricularis anterior* (RIVA oder LAD, engl. left anterior descending) und *Ramus circumflexus* (RCX). Die RCA teilt sich auf in *Arteria marginalis dexter* und in *Ramus interventricularis posterior* und den *Ramus posterolateralis dexter*. LA, linker Vorhof; LV, linker Ventrikel; RA, rechter Vorhof; RV, rechter Ventrikel. Modifiziert unter Verwendung von Servier Medical Art [4].

Die Koronararterien werden unterteilt in *Arteria coronaria sinistra* (LCA, engl. left coronary artery), welche die vordere Herzseite (2/3 der linken Herzkammer und Septum) mit Blut versorgt und in die *Arteria coronaria dextra* (RCA, engl. right coronary artery), welche die Hinterwand des LVs sowie die rechte Herzkammer mit Blut versorgt und für die Versorgung des Sinusknoten und des Atrioventrikularknotens als Teil des Reizleitungssystems wichtig ist. Die LCA teilt sich auf in *Ramus interventricularis anterior* (RIVA oder LAD, engl. left anterior descending) und *Ramus circumflexus* (RCX). Die

RCA teilt sich demgegenüber auf in *Arteria marginalis dexter* und in *Ramus interventricularis posterior* und den *Ramus posterolateralis dexter* (Abbildung 1-2).

### 1.1.3 Herzfunktion

Das als Hohlmuskel bezeichnete Herz sorgt nach dem Saug-Druck-Pumpen-Prinzip für die Blutzirkulation im Körper und damit für die Versorgung aller Organe mit sauerstoffreichem Blut. Die rechte Herzhälfte befördert dabei das Blut zur Sauerstoffanreicherung über den Lungenkreislauf, wobei die linke Herzhälfte das Blut durch den Körperkreislauf pumpt. *Vena cava superior* und *Vena cava inferior* transportieren anschließend sauerstoffarmes Blut aus dem Körperkreislauf zum RV des Herzens. Die Trikuspidalklappe zwischen RA und RV verhindert hierbei den Rückfluss des Blutes zurück in den Vorhof. Vom RV wird das sauerstoffarme Blut weiter über den *Truncus pulmonalis* in die Lungenarterien zum Lungenkreislauf gepumpt. Die Pulmonalklappe verhindert dabei den Rückfluss zurück in die Kammer. In der Lunge wird das Blut mit Sauerstoff angereichert, Kohlenstoffdioxid wird abgegeben. Anschließend wird es über die Lungenvenen in den LA und weiter in den LV gepumpt. Ein Rückfließen wird durch die Mitralklappe verhindert. Innerhalb der Atrien und Ventrikel befinden sich die Papillarmuskeln. Diese sind mit der Mitrals- sowie Trikuspidalklappe verbunden und für deren Bewegung verantwortlich. Über die Aorta wird das sauerstoffreiche Blut schließlich in den Körperkreislauf gepumpt, wobei die Aortenklappe verhindert, dass es zurück in den LV fließen kann [3, 6].

#### 1.1.3.1 Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels

Zur Herzmuskelkontraktion über elektrische Signale sind spezialisierte Herzmuskelzellen in der Lage rhythmische Impulse für die Herzaktion zu erzeugen. Durch das Zusammenwirken von Natriumkanälen, Kationenkanälen, Calciumkanälen und Kaliumkanälen entsteht ein elektrisches Signal. Auslöser für die Herzmuskelzellkontraktion ist, nach Depolarisation der Zellmembran, eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Aktivierung und Öffnung der Calciumkanäle. Das dabei entstehende elektrische Signal wird Aktionspotential genannt und führt zur Kontraktion der Herzmuskelzelle. Zur Erregungsweiterleitung der Impulse über das gesamte Herz, sind die einzelnen Muskelzellen über „gap junctions“ verbunden. Diese liegen innerhalb der Zellmembran und dienen zur Weitergabe von Natrium, Calcium und Kalium. Die Erregungsbildung beginnt im Sinusknoten und breitet sich anschließend

über rechten und linken Vorhof aus, weiter über den AV-Knoten bis zum rechten und linken Ventrikel. Das vom AV-Knoten ausgehende His-Bündel teilt sich in den rechten und linken Tawara-Schenkel bis zu den Purkinje-Fasern an der Herzspitze. Herzmuskelkontraktion und Herzmuskelentspannung (Relaxation) erfolgen aufgrund der Interaktion von Strukturproteinen (Aktin) und Motorproteinen (Myosin) auf Ebene der Kardiomyozyten. Bei gleichzeitiger Kontraktion einer Herzkammer kann Druck ausgeübt und damit Blut ausgeworfen werden (Systole), wohingegen bei gleichzeitiger Entspannung der Kammermuskelfasern wieder Blut aus den Vorhöfen aufgefüllt werden kann (Diastole) [6].

### 1.1.3.2 Regulierung der Herztätigkeit

Für eine normale Herztätigkeit ist die Versorgung des Herzens mit Sauerstoff und Energie über die Herzkranzgefäße nötig. Der Energiebedarf für die Herzfunktion wird hauptsächlich über den oxidativen Abbau von Fettsäuren, Glukose und Laktat abgedeckt.

Die Durchblutung des Herzmuskels bei Anpassung an die entsprechende Herzleistung wird über Neurotransmitter und lokale Faktoren (u.a. Konzentration an Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid) reguliert. Die Neurotransmitter des Sympathikus, Noradrenalin und Adrenalin, bewirken die Erweiterung der Koronararterien über  $\beta_1$ -Rezeptoren und sorgen für eine gesteigerte Durchblutung. Eine Vasokonstriktion wird über  $\alpha$ -Rezeptoren vermittelt und durch Noradrenalin ausgelöst, die Vasodilatation hingegen wird über die Ausschüttung von Acetylcholin (Parasympathikus) durch die stimulierte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen hervorgerufen. Im Gegensatz dazu wirkt Acetylcholin auf den Gefäßmuskel vasokonstriktorisch. Lokal führen eine sinkende Sauerstoffkonzentration und eine ansteigende Kohlenstoffdioxidkonzentration mit sinkendem pH-Wert zu einer Vasodilatation. Die sinkende Sauerstoffkonzentration bewirkt zudem im Herzgewebe - vermittelt über membranständige Nukleosid-Transporter - die Freisetzung von Adenosin. Das Purinnukleosid Adenosin blockiert als Signalmolekül wiederum die Sezernierung von exzitatorischen Neurotransmittern und verursacht ebenfalls eine Gefäßdilataion. Vom Herzgefäßendothel werden ferner das Gewebshormon Prostaglandin, Stickstoffmonoxid oder der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF) mit vasodilatatorischer Wirkung freigesetzt [2, 6].

### 1.1.3.3 Untersuchungsmethoden zur Herzfunktion

Mit einem Elektrokardiogramm (EKG) können Erregungsabläufe im Herzen dargestellt werden - die Summe der elektrischen Aktivität wird beim EKG mit Hilfe unterschiedlicher Ableitungen über die Zeit gemessen. Sichtbare EKG-Ausschläge benennt man dabei mit den Buchstaben P, Q, R, S, T. Die P-Welle reflektiert die Erregung der Vorhöfe. Die PQ-Zeit entspricht der Summe der Vorhoferregung. Der QRS-Komplex repräsentiert wiederum die Ventrikeldepolarisation. Während der EKG-Aufzeichnung sollte Q ein negativer Ausschlag sein, R hingegen ein positiver Ausschlag. Anschließend folgt S, ebenfalls mit negativem Ausschlag. Die QT-Zeit stellt die Zeit von Beginn der Ventrikelerregung bis zum Ende der Repolarisation dar. Die ST-Strecke entspricht der Ventrikeldepolarisierung und die T-Welle zeigt die Ventrikelrepolarisation (siehe Abbildung 3-27, A). Es handelt sich beim EKG um eine apparative Untersuchungsmethode, welche Rückschlüsse auf Herzfrequenz, Störungen in der Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung, Schädigungen der Herzmuskelzellen, Extrasystolen, kompensatorischen Pausen sowie Vorhof- und Kammerflimmern erlaubt. Daneben ist die Echokardiografie ebenfalls eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung und Diagnostik der Herzanatomie (Herzklappen, Myokard- und Kammerstrukturen) und der Herzfunktion. Das Herzzeitvolumen und die Ejektionsfraktion lassen sich mittels echokardiografischer Untersuchung bestimmen. Das Herzzeitvolumen definiert das Volumen des Blutes, welches pro Zeiteinheit durch das Herz befördert wird. Der prozentuale Anteil des bei Herzkontraktion ausgeworfenen Blutvolumens in Bezug auf das Gesamtvolumen in der Kammer wird als Ejektionsfraktion (EF) beschrieben. Über die EF wird die Pumpleistung des Herzens beurteilt. Sie gilt als Maß für die Kontraktilität des Herzens und beträgt bei normaler Herzleistung  $\geq 55\%$ . Die Berechnung der EF wird im Kapitel 2.2.7.1 erläutert.

Ebenfalls Auskunft über die Herzkontraktilität gibt die Kontraktionsgeschwindigkeit. Sie wird als Maximalgeschwindigkeit der Druckzunahme während der Kontraktionsphase definiert und mittels Herzkatheter-Untersuchung gemessen [6, 7].

## 1.2 Funktionen und zellulärer Aufbau des Blutkreislaufs

Das Blut dient in erster Linie dem Transport der Blutgase (Sauerstoff, Kohlendioxid) sowie von Hormonen, Substraten und Stoffwechselprodukten und zur Weiterleitung von Wärme. Über die arteriellen Gefäße wird das Blut vom Herzen über die Aorta zu den Organen des Körpers gepumpt. Wohingegen das Blut über die Venen von den Organen

des Körpers wieder zurück zum Herzen geleitet wird. Der Blutkreislauf wird dabei in einen Körperkreislauf und einen Lungenkreislauf unterteilt. Das Blut in den Arterien des Körperkreislaufs ist sauerstoffreich. Demgegenüber transportieren die Arterien des Lungenkreislaufs sauerstoffarmes Blut. Die Venen des Körperkreislaufs führen wiederum sauerstoffarmes Blut, während die Venen des Lungenkreislaufs sauerstoffreiches Blut weiterleiten.

Die Blutgefäßwände setzen sich üblicherweise aus drei Schichten zusammen. Die Intima, die innerste Schicht, besteht aus Endothelzellen, welche wichtige Funktionen bei Adhäsionsvorgängen, der Blutgerinnung und der Regulierung des Gefäßdurchmessers haben. Die mittlere Schicht, Media, besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern sowie elastischen Fasern. Die äußerste Schicht wird Adventitia genannt und besteht aus Bindegewebe [2].

Das über die Blutgefäße transportierte Blut enthält zelluläre Bestandteile (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten), nicht-zelluläre Bestandteile (Plasma) und kleine Moleküle wie Zucker, Salze und Proteine, aber auch Hormone und Nährstoffe sowie Stoffwechselabfallprodukte.

Leukozyten sind in der Lage Krankheitserreger - wie Bakterien, Viren, Pilze - und andere Fremdkörper zu erkennen sowie zu eliminieren und sind an der angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Immunreaktion beteiligt. Sie sind kernhaltig und stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab, welche sich entweder zu myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen weiter entwickeln. Aus der myeloiden Vorläuferzelllinie gehen Monozyten, Makrophagen, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten hervor. T- und B-Lymphozyten sowie Natürliche Killer-Zellen stammen hingegen von lymphoiden Vorläuferzellen ab.

Hämatopoetischen Stammzellen können sich gleichermaßen zu erythroiden Vorläuferzellen spezialisieren und weiter zu Erythrozyten differenzieren. Diese sind kernlos, enthalten den Blutfarbstoff Hämoglobin und gewährleisten den Transport von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid.

Thrombozyten (Blutplättchen) sind kernlos, bilden sich aus myeloiden Vorläuferzellen (Megakaryozyten) und spielen eine essentielle Rolle bei der Blutstillung und Blutgerinnung (Hämostase). Bei der Verletzung von einem Blutgefäß werden die im Blut zirkulierenden Thrombozyten aktiviert, bilden Aggregate und sezernieren Stoffe (u.a. Gerinnungsfaktoren V und VIII sowie Fibrinogen, thrombozytäre Proteine, wie Fibronectin und Thrombospondin, von-Willebrand-Faktor und Wachstumsfaktoren), welche für die Blutstillung förderlich sind. Das Blutplasma ist eine proteinreiche

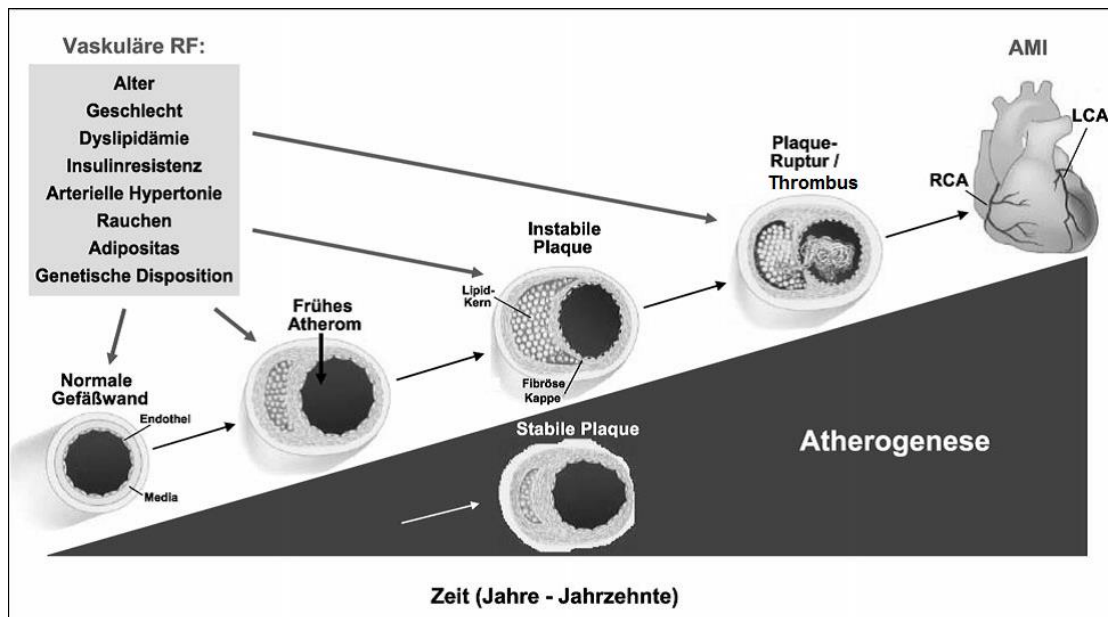
Extrazellulärflüssigkeit, enthält Albumin und Globuline, dient ebenfalls der Immunabwehr sowie der Blutgerinnung und dem Transport schwer löslicher Stoffe.

Bei Gefäßverletzung sollen die Bestandteile des hämostatischen Systems im Blut den Zweck erfüllen, die verletzte Stelle zu schließen und vor Blutverlust zu schützen - die Wechselwirkung zwischen Thrombozyten, Gefäßendothel und Gerinnungsfaktoren (aus dem verletzten Gewebe sowie aus dem Blutplasma) ist dabei essentiell. Die Bestandteile der Fibrinolyse (u.a. Plasmin), sollen demgegenüber eine inadäquate Blutgerinnung - wie bei der Thrombose - verhindern [6, 8-11].

### **1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

2011 wurden Herz-Kreislauf-Erkrankungen als globale Haupttodesursache identifiziert [12]. Fast ein Drittel aller Todesfälle weltweit ließen sich auch im Jahr 2013 weiterhin auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückführen [13]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. World Health Organization) klassifiziert die Krankheiten des Kreislaufsystems hierbei in: akutes rheumatisches Fieber, chronische rheumatische Herzkrankheiten, Hypertonie, ischämische Herzkrankheiten, pulmonale Herzkrankheit und Krankheiten des Lungenkreislaufes, zerebrovaskuläre Krankheiten, Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren, Krankheiten der Venen, der Lymphgefäße und der Lymphknoten und sonstige Formen der Herzkrankheit und Krankheiten des Kreislaufsystems [14]. Als bekannte Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen werden Alter, männliches Geschlecht, Bluthochdruck, Hyperglykämie, Rauchen, Dyslipidämie, Adipositas und genetische Disposition genannt [3, 15-17].

Zu den prominentesten, kardiovaskulären Erkrankungen zählt neben arterieller Hypertonie, Durchblutungs- und Herzrhythmusstörungen auch die Arteriosklerose. Dabei handelt es sich um eine chronische Inflammationserkrankung, bei der es zur Ausbildung von Plaques in den Blutgefäßen kommt. Die Entstehung der Arteriosklerose wird Atherogenese genannt. Bei dieser findet eine Cholesterinablagerung in den Gefäßen statt und führt zur Bildung von Atheromen (Abbildung 1-3). In dessen Folge kommt es zu Entzündungsprozessen, zusätzlich lagern sich Blutbestandteile, Lipide, Stoffwechselprodukte und Calciumsalze an und führen zur Bildung von Plaques. Diese Plaques bestehen aus Inflammationszellen, Lipidakkumulationen, toten Zellen und fibrotischem Material [18, 19]. Die Blutgefäße verlieren in diesem Bereich ihre Funktionalität und der Blutfluss wird erschwert. Als Folgeerkrankung kann es zum Myokardinfarkt, zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder zum Schlaganfall kommen.



**Abbildung 1-3: Atherogenese [7]**

Vaskuläre Risikofaktoren beeinflussen die Entstehung und die Pathogenese von Arteriosklerose. RF, Risikofaktoren; AMI, engl. acute myocardial infarction; LCA, engl. left coronary artery; RCA, engl. right coronary artery.

Unter den zehn Haupttodesursachen weltweit befanden sich 2013 die ischämischen Herzerkrankungen (IHD, engl. ischaemic heart disease) auf dem ersten Platz. Die Alterung und das Wachstum der Bevölkerung führten zu einer Zunahme der Gesamtzahl an kardiovaskulären Todesfällen. Ischämische Herzkrankheiten, ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall verursachten in fast allen Ländern weiterhin die meisten kardiovaskulären Todesfälle [13].

### 1.3.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt (MI) ist innerhalb der kardiovaskulären Erkrankungen immer noch eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Morbidität [17, 20-22]. Er resultiert dabei aus ischämischen Verletzungen des Herzmuskelgewebes, meist aufgrund von Unterbrechungen der Blutzufuhr - verursacht durch thrombotischen oder embolischen Verschluss der Koronararterien [23, 24]. Verschiedene Risikofaktoren, insbesondere Hyperlipidämie, aber auch die genetische Prädisposition, Adipositas, Diabetes, Bluthochdruck und Rauchen erhöhen die Wahrscheinlichkeit für ischämische Ereignisse [15, 16]. Die Anzahl der Leukozyten im Blut prognostiziert hierbei die Mortalität nach MI - eine erhöhte Leukozytenanzahl korreliert mit einem Anstieg der Sterblichkeit [25, 26]. Allerdings sind die zellulären Mechanismen die zum Anstieg führen noch nicht ausreichend geklärt.



Als häufigste Erkrankung der Arterien des Menschen und damit hauptsächlich im Zusammenhang mit der Entwicklung und Pathogenese des MI stehend, wird die Arteriosklerose genannt. Die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques in einer Koronararterie hat den akuten MI zur Folge [21]. Dadurch wird der arterielle Blutfluss unmittelbar vermindert oder sogar gestoppt und das darunterliegende Myokardareal nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Wenn das entsprechende Myokard mit Sauerstoff unterversorgt ist (Hypoxie) und nicht reperfundiert wird, beginnt das Herzgewebe nekrotisch zu werden [27, 28]. Dabei wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst sowie verschiedene Signalwege aktiviert, damit einerseits abgestorbene Zellen und Matrixdebris aus der Infarktzone abtransportiert, andererseits Wundheilungsprozesse zur Narbenbildung und Neovaskularisation initiiert werden können [29]. Eine bestmögliche Heilung ist daher abhängig von einem Gleichgewicht zwischen der adäquaten Aktivierung und der rechtzeitigen Inhibierung von inflammatorischen Signalwegen, damit es zu keiner exzessiven Immunantwort kommt [30].

Frantz *et al.* beschrieben in diesem Sinne den Myokardinfarkt als heilende Wunde (engl. healing wound) [31]. Der Heilungsprozess wird dabei in eine inflammatorische und eine postinflammatorische reparative Phase unterteilt. Die erste Phase beginnt mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, ausgelöst durch verschiedene Trigger. Inflammatorische Mediatoren werden freigesetzt und Inflammationszellen werden verstärkt vom infarzierten Myokard angezogen. Dabei führt die umgehende Expression inflammatorischer Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Herzgewebe zu einer chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten. Neutrophile Granulozyten und aktivierte Makrophagen beseitigen tote Zellen sowie Zelldebris und sezernieren weitere Mediatoren, welche das Fibroblastenwachstum fördern und die Angiogenese induzieren. Die postinflammatorische reparative Phase ist durch Inhibierung der Zytokinausschüttung, Beseitigung von inflammatorischen Infiltraten und Initiierung der Kollagenproduktion charakterisiert, um eine stabile Narbe im geschädigten Myokard auszubilden.

Bei einem beachtlichen Anteil von Myokardinfarktpatienten induziert dieser Reparaturmechanismus jedoch schwere strukturelle und funktionale Veränderungen in der Infarktzone und auch im angrenzenden nicht infarzierten Herzgewebe [32]. Diese Patienten weisen myokardiale Wandverdünnung, Ausbreitung der Infarktzone, pathologische Kardiomyozytenhypertrophie, Apoptose von Kardiomyozyten und Remodellierung von extrazellulärer Matrix auch in der dem Ischämieareal umliegenden Zone (engl. remote zone) auf. Eine verzögerte Phagozytose von geschädigten Kardiomyozyten kann das arrhythmogene Potenzial noch verstärken oder zu

mechanischen Komplikationen, wie z.B. Herzwandrupturen oder zur Entstehung von ventrikulären Aneurysmen führen [33]. Sind die Regulationsmechanismen des Heilungsprozesses demnach exzessiv oder suppressiv gestört, kann dies zur Bildung einer defekten Narbe, zu Funktionsstörungen und verstärktem „adverse ventricular remodeling“ führen. Eine überschießende oder prolongierte inflammatorische Antwort resultiert demnach in der Persistenz von nekrotischem Detritus (Zell- und Gewebstrümmer), beeinträchtigt die Narbenbildung und führt zur Vergrößerung des Infarktareals auf umliegendes Gewebe mit Ausdünnung der Ventrikelwand und somit möglicherweise zur Ventrikelruptur und zur Herzinsuffizienz [25, 27, 34, 35]. Gegenwärtig umfasst die Behandlung bzw. Vorbeugung von Herzinsuffizienz hauptsächlich neurohumorale Mediatoren wie  $\beta$ -Blocker, Mineralokortikoid-Rezeptorantagonisten sowie Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE, engl. angiotensin-converting enzyme) -Hemmer. Allerdings wird der angeborenen Immunantwort, als wichtiges therapeutisches Target zur Vorbeugung von „cardiac remodeling“ nach MI, immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt [36].

#### 1.4 Mausmodelle des Myokardinfarktes

Um pathophysiologische und -biologische Prozesse beim Myokardinfarkt zu untersuchen, sind Tiermodelle nötig. Zur Erzeugung des Myokardinfarktes in Tierversuchen wurden folgende Methoden beschrieben [37-41]:

- Permanente LAD Ligatur
- Ischämie/Reperfusion Schaden
- Kryo-Ischämie Verletzung
- Hitzekauterisation

Die **permanente Ligatur der LAD** („left anterior descending coronary artery“) Koronararterie führt zum permanenten Verschluss des Gefäßes unterhalb der Ligatur. Dabei verbleibt der für die Ligatur verwendete chirurgische Faden dauerhaft um das Gefäß. Diese chirurgische Methode imitiert die infarktassoziierten pathobiologischen und pathophysiologischen Aspekte bei myokardialer Ischämie [38].

Weiterhin findet auch die **Ischämie-Reperfusions (I/R)-Methode** Anwendung [39]. Dabei wird die Ligatur ebenfalls manuell gesetzt. Im Unterschied zum permanenten Gefäßverschluss wird bei der I/R-Technik die LAD Ligatur nach einigen Minuten wieder

gelöst. Dies erlaubt eine Wiederherstellung des Blutflusses im zuvor ligierten Gefäß, hinterlässt jedoch einen ischämischen Schaden im Gewebe - abhängig vom Zeitraum der Ligatur.

Bei der **Kryo-Infarkt-Methode** wird das Myokardgewebe durch Einfrieren zerstört. Flüssiger Stickstoff wird dabei - mit Hilfe eines Applikators - direkt auf das Gewebe aufgebracht, wobei nicht gesichert ist, dass die Kryo-Verletzung auch zur Ischämie im Myokard führt.

Als vierte Methode wird die **Kauterisation** genannt [40], eine operative Methode, bei der das Myokardgewebe ebenfalls zerstört oder zerschnitten wird. Man unterscheidet drei verschiedene Kauterisationsarten: Kauterisation mit chemischen Mitteln, Hitzekauterisation oder Kältekauterisation. Bei der Hitzekauterisation wird mit Hilfe eines Elektrokauters Hitze über elektrischen Strom erzeugt, um das Gewebe zu verletzen. Die Elektrokauterisationstechnik wird angewandt, um epikardial kleine, lokale Infarkte zu induzieren [41].

Sowohl bei der Kryo-Infarkt-Methode, als auch bei der Infarktinduktion mittels Hitzekauterisation kann nicht sicher gewährleistet werden, dass ein Infarktschaden im Herzgewebe verursacht wird. Aus diesem Grund wurde das operative Ligaturmodell gewählt, um einen Myokardinfarkt zu induzieren. Zur spezifischen Determination der Eigenschaften von Inflammationszellen und grundlegender Mechanismen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes wurde in der vorliegenden Arbeit die permanente Ligatur der LAD verwendet und nicht das Ischämie/Reperfusion Modell. Die Reperfusion der Koronararterien gilt als therapeutische Maßnahme und stellt damit eine erste Intervention gegenüber den inflammatorischen Prozessen nach Induktion des Myokardinfarktschadens dar.

## 1.5 Angeborene und erworbene Immunantwort

Das Immunsystem der Säugetiere besteht aus spezifischer und unspezifischer Immunantwort [10]. Die angeborene Immunantwort enthält zelluläre und humorale Abwehr- und Schutzmechanismen, welche sehr schnell einsetzen, jedoch unspezifisch sind. Auf diese Weise können Entzündungsreaktionen ausgelöst oder Krankheitserreger umgehend abgetötet werden. Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und Natürliche Killerzellen sind Immunzellen, welche zur

unspezifischen Abwehr in der Lage sind. Zu den humoralen Bestandteilen zählen Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und Chemokine, sowie das Komplementsystem - bestehend aus Proteinen, welche kaskadenartig aktiviert werden und wiederum Inflammationzellen aktivieren.

Die angeborene Immunreaktion beinhaltet weiterhin „pattern recognition receptors“ (PRRs). Zu den PRRs wird die Gruppe der „toll-like receptor“ (TLR) gezählt. Diese Transmembranrezeptoren können „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) erkennen, stimulieren die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und aktivieren das Komplementsystem sowie Akut-Phase-Proteine, wie Plasminogen oder Fibrinogen.

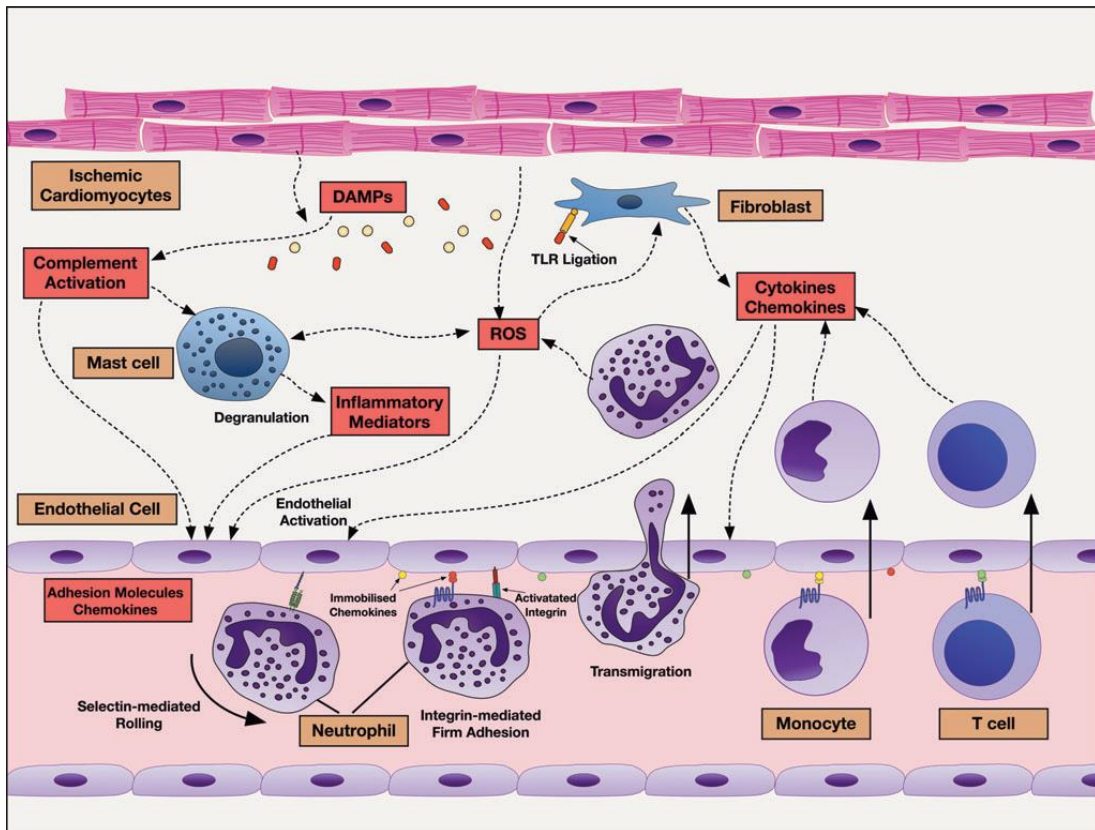
Inflammationszellen der unspezifischen Immunreaktion aktivieren die spezifische Immunantwort - insbesondere DCs bilden, als klassische antigenpräsentierende Zellen, die Brücke zur spezifischen Immunantwort.

Die spezifische oder erworbene Immunreaktion beinhaltet ebenfalls zelluläre und humorale Anteile. Sie richtet sich spezifisch gegen die Epitope von Antigenen. Die Erkennung dieser erfolgt meist über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, engl. major-histocompatibility-complex), welche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Ein weiterer Bestandteil der spezifischen Abwehr sind Antikörper (Immunglobuline). Diese werden von aktivierten B-Lymphozyten gebildet, können chemotaktisch wirken und das Komplementsystem aktivieren. Zelluläre Bestandteile sind B-Zellen sowie T-Lymphozyten, eingeteilt in zytotoxische T-Zellen, T- Helfer-Zellen sowie regulatorische T-Zellen und Gedächtniszellen. T- und B-Lymphozyten divergieren durch ihren Antigenrezeptoren sowie nach ihrem Differenzierungsort (Thymus oder Knochenmark) [6, 8].

### **Immunantwort nach Myokardinfarkt triggert die Leukozytenmigration**

Während des akuten Myokardinfarktes triggern abgestorbene Kardiomyozyten Inflammations- und Reparationsmechanismen. Diese dienen zur effektiven Beseitigung von nekrotischem Gewebe sowie zur Myokardheilung durch Bildung einer Kollagen-basierten, stabilen Narbe und zur Vermeidung von kardialer Ruptur, ventrikulären Aneurysmen, myokardialer Fibrose oder Ventrikeldilatation.

Zunächst werden intrazelluläre Bestandteile von nekrotischen Zellen entlassen, agieren als „danger signals“ und aktivieren das angeborene Immunsystem. Der „toll like receptor“, (TLR)-vermittelte Signalweg, die Komplementkaskade sowie die Bildung von ROS („reactive oxygen species“) induzieren dabei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B („Nuclear Factor-kappa B“) in residenten Myokardzellen und die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus diesen Zellen [42].



**Abbildung 1-4: Inflammationsantwort und Leukozytenrekretierung nach MI [43]**

Nach Aktivierung der Inflammationskaskade werden Mediatoren freigesetzt, welche zur Endothelzellaktivierung sowie zur Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen führen. Diese induzieren wiederum die Rekrutierung von Leukozyten: nach Selektin-vermitteltem „rolling“ werden immobilisierte Leukozyten mittels Integrinaktivierung fest ans Endothelium gebunden und können anschließend ins Gewebe transmigrieren. Dieser Prozess resultiert in der Infiltration zahlreicher verschiedener Leukozytenpopulationen.

Zusätzlich sind aktivierte Thrombozyten an der Modifizierung der chemotaktischen, adhäsiven und proteolytischen Eigenschaften von Endothelzellen beteiligt und fördern damit die Rekrutierung, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten ins Inflammationsgewebe [44]. Über proinflammatorische Mediatoren bewirkt der Myokardinfarkt initial die Infiltration von Zellen der angeborenen Immunantwort ins Infarktgewebe (Abbildung 1-4). Neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen werden dabei als primäre Effektorzellen angesehen, welche die Heilung nach MI entscheidend beeinflussen [33, 45]. Residente kardiale Mastzellen bilden zudem proinflammatorische und profibrotische Zytokine und triggern damit gleichermaßen die Inflammationskaskade nach MI [46]. Über Phagozytose beseitigen aktivierte Leukozyten tote Zellen und Matrixfragmente. Darüber hinaus sezernieren Makrophagen Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche zur Formation von Granulationsgewebe führen. Nach Beseitigung der Gewebestrümmen wird die inflammatorische Antwort unterdrückt. Neutrophile werden von Makrophagen phagozytiert und reparative Monozyten werden rekrutiert [45]. Lymphozyten und Makrophagen tragen anschließend zur Infarktheilung

bei, indem sie inhibitorische Mediatoren produzieren. Fibroblasten und Endothelzellen sind ebenfalls mit an der Heilungsphase nach MI beteiligt [47].

### **1.5.1 Der Einfluss von myeloiden Immunzellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes**

Der Myokardinfarkt führt zu einer rapiden Nekrose von Kardiomyozyten. Um infolgedessen schnell eine größtmögliche Gewebsintegrität und -funktion zu erreichen, werden myeloide Zellen über eine erhöhte Mobilisierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und aus der Milz rekrutiert und aktiviert [48]. Der Untergang der Kardiomyozyten, die Bildung von reaktivem Sauerstoff oder Angiotensin-vermittelte proinflammatorische Aktivitäten führen weiterhin zur Aktivierung von Signalen des angeborenen Immunsystems und sind ebenfalls an der Initiation der Entzündungsreaktion beteiligt [49].

#### **1.5.1.1 Die Rolle von neutrophilen Granulozyten beim Myokardinfarkt**

Nach Entstehung von myokardialer Ischämie werden neutrophilenanziehende CXC Chemokine hochreguliert - patrouillierende Monozyten und residente Makrophagen erkennen DAMPs („damage-associated molecular patterns“) und produzieren neutrophile Granulozyten-anziehende Zytokine (Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-6) und Chemokine (CXCL1, CXCL2) [36, 50]. Neutrophile Granulozyten sind demnach die ersten Zellen, die ins infarzierte Herz einwandern. Sie sind kurzlebige Zellen und werden über Adhäsionsmoleküle rekrutiert. Die Regulation der Neutrophilenextravasation aus dem Blutkreislauf ins Myokard beginnt mit dem Festhalten der Neutrophilen an den Endothelzellen der Blutgefäße. Dies geschieht über die Verknüpfung von Molekülen aus der Selektinfamilie auf der Oberfläche von Neutrophilen und den vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM, engl. vascular cell adhesion protein), welche auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen exprimiert werden. Die stabile Retention von Neutrophilen im Gewebe wird über Chemokine vermittelt und induziert durch die Aktivierung von CD18/CD11 Integrin (LFA1, Mac-1, p150, p95) auf Neutrophilen und der Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1/ICAM-2, engl. intercellular adhesion molecule -1/-2) auf Endothelzellen [28, 29]. Die Anzahl an peripheren Neutrophilen und das Neutrophilen/Lymphozyten Verhältnis stehen im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose [51], speziell einer Verschlechterung der Infarktgröße und der Herzfunktion sowie verstärktem „remodeling“

nach einem Infarkt [52]. Monoklonale Antikörper gegen L-Selektin [53] und P-Selektin konnten effektiv zur Verminderung der Neutrophilen-Akkumulation eingesetzt werden und die myokardiale Nekrose innerhalb weniger Stunden nach Reperfusion des infarzierten Myokards reduzieren [54]. Im Gegensatz dazu konnte bei ICAM-1/P-Selektin-Knock-out Mäusen trotz signifikanter Reduktion der Leukozytenanzahl kein Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden [55]. Andererseits konnten Antikörper gegen den CD11/CD18 Integrinrezeptor in experimentellen Ischämie-Reperusions-Modellen die Infarktgröße vermindern, den koronaren Blutfluss und die linksventrikuläre Funktion verbessern sowie die Infiltration von Neutrophilen reduzieren [56].

Emigrierende Neutrophile entlassen ihren granulären Zellinhalt (Azurocidin, Cathelicidin, Cathepsin G), was wiederum die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen ermöglicht [50]. Nahrendorf *et al.* identifizierten innerhalb der ersten 24 Stunden eine frühe Neutrophilen-Akkumulation im infarzierten Myokard von Mäusen und kurz danach eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen [45]. Neutrophile und Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten/M1 Makrophagen kooperieren stets um die Entzündungsreaktion zu amplifizieren. Dies geschieht über die freigegebenen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) sowie der Phagozytose und dem Abbau von nekrotischem Detritus. Die Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen stimuliert Makrophagen auch dazu, antiinflammatorische Zytokine zu produzieren (TGF- $\beta$ , IL-10) [50].

Neutrophile sind demnach für das Umprogrammieren der Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp mit verantwortlich, was schlussendlich zur Auflösung der Inflammation führt [36]. Über ihre Eigenschaft, Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp zu polarisieren, sind Neutrophile entscheidend an der Reparatur des Herzens nach Infarkt beteiligt [57].

Neutrophilen-depletierte Mäuse mit Herzinfarkt hatten eine schlechtere Herzfunktion, erhöhte Fibrose und fortgeschrittene Herzinsuffizienz. NGAL („neutrophil gelatinase-associated lipocalin“) im Neutrophilensekretom wurde hier als wichtiger Mediator detektiert, welcher Makrophagen dazu stimuliert, apoptotische Zellen für die Phagozytose einzuschließen [57]. Weiterhin produzieren Neutrophile auch MMP (Matrix Metalloproteinase) -8 und -9, welche extrazelluläre Matrix abbauen können. MMP-8 und MMP-9 Level sind erhöht bei Patienten mit linksventrikulärer Ruptur nach Herzinfarkt [58]. Die Inhibierung von beispielsweise MMP-9 in Mäusen schwächt die linksventrikuläre Dilatation und die Kollagenakkumulation im infarzierten Herzareal nach Ligatur der Koronararterie ab [59] und fördert die Angiogenese [60].

Neutrophile spielen eine wesentliche Rolle beim Abbau von nekrotischem Gewebe und stimulieren bzw. beschleunigen die proinflammatorische Zytokinproduktion, was zur

Beseitigung von Detritus durch rekrutierte Makrophagen führt. „NETosis“ ist eine weitere Art des Neutrophilensterbens, anders als bei der Apoptose werden sogenannte NETs („neutrophil extracellular traps“) ausgebreitet. Die Neutrophilen entlassen dabei dekondensiertes Chromatin inklusive toxischer Histone sowie Proteasen [61]. NETs haben außerdem zytotoxische und prothrombotische Eigenschaften. Sie sind demnach involviert bei der Pathogenese der Thrombusentstehung, bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt [62], aber auch bei der Myokardverletzung bei Mäusen mit induziertem Herzinfarkt [63]. Die Spaltung oder die Beseitigung von NET Chromatin durch Verabreichung von DNase I führte zu einer Verbesserung der kardialen Kontraktionsfunktion bei einem I/R Mausmodell und hatte somit einen kardioprotektiven Effekt bei Mäusen [63].

### 1.5.1.2 Die Funktion von Monozyten/Makrophagen beim Myokardinfarkt

Monozyten/Makrophagen sind von entscheidender Wichtigkeit bei der Regulierung der inflammatorischen ebenso wie bei der reparativen Antwort nach Myokardinfarkt [45, 64]. Zwei verschiedene murine Monozyten-Subpopulationen werden sequentiell und aktiv zum infarzierten Herz rekrutiert. Zuerst dominieren die Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten. Sie erreichen ihren Akkumulations-Peak an Tag 3 nach Infarkt und haben hierbei phagozytische, proteolytische und inflammatorische Funktionen. Anschließend dominieren Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten (Maximum an Tag 7) und fördern den Heilungsprozess durch Myofibroblasten-Akkumulation, Angiogenese und Ablagerung von Kollagen.

Abweichend von der murinen Klassifizierung werden humane Monozyten-Subpopulationen entsprechend ihrer CD14 und CD16 Expression unterteilt. Humane CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>low/-</sup> Monozyten besitzen einen inflammatorischen Phänotyp und können mit den murinen Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten gleich gesetzt werden. Humane CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high/+</sup> Monozyten sind vergleichbar mit den murinen Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten [25].

Während der ersten Entzündungsphase der Infarktheilung infiltrieren Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten das infarzierte Gewebe über den spezifischen CCR2 Oberflächenrezeptor als Reaktion auf die Hochregulierung von MCP-1 („monocyte-chemoattractant protein-1“) [33]. In der sich anschließenden Heilungsphase werden Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten über den CX3CR1 Rezeptor rekrutiert [45]. Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten exprimieren inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MPO, MMPs) und proteolytische Mediatoren („cathepsins“, „urokinase plasminogen activator“). Diese fördern den Abbau von infarziertem Gewebe und die Beseitigung von nekrotischen Zell- und Gewebstrümmern. Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten wiederum exprimieren antiinflammatorische Zytokine (IL-10, TGF-



β) sowie VEGF („vascular endothelial growth factor“), dienen der Vermittlung der Myofibroblasten-Akkumulation und der Angiogenese, sind notwendig für das Granulationsgewebe sowie dem Abbau von Kollagen während der Auflösung der Inflammation [45].

Die Hemmung von CCR2 während der ersten Wochen nach einem Infarkt konnte die Rekrutierung von Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten reduzieren und führte zu einer verbesserten Ejektionsfraktion nach MI [35]. Eine experimentelle Ablation von Monozyten/Makrophagen über die intravenöse Injektion von Clodronat-geladenen Liposomen führte zu einer erhöhten Sterblichkeit und ebenso zu einem erhöhten Auftreten von linksventrikulärer Thrombusbildung. Möglicherweise wurde dies durch eine eingeschränkte endokardiale Heilung begünstigt [64].

Monozyten differenzieren zu Makrophagen, sobald eine lokale Hochregulierung des M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“) stattfindet [65]. Makrophagen, welche von Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten abstammen, werden als M1 Makrophagen beschrieben. Sie sind in der Lage Infarktdetritus durch Phagozytose zu beseitigen - eine Grundvoraussetzung, um verletztes Gewebe durch Granulationsgewebe zu ersetzen und eine stabile Narbe zu bilden. Im Zusammenhang mit der Auflösung der Entzündungsreaktion werden M1 Makrophagen durch M2 Makrophagen ersetzt. Diese vermitteln die Auflösung und können gleichermaßen von Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten abstammen. Die Hauptaufgabe der M2 Makrophagen ist es, die Angiogenese zu fördern und Kollagen zu produzieren [27]. Die Polarisierung der Makrophagen wird ebenfalls durch den Faktor IRF5 („interferon regulatory factor-5“) und den Rezeptor MR (Mineralokortikoidrezeptor, engl. myeloid mineralocorticoid receptor) reguliert.

Die *in vivo* Hemmung von IRF5 reduzierte die Anzahl an inflammatorischen Makrophagen und verbesserte die Infarktheilung [66]. Auf der anderen Seite konnte die Aktivierung des MR durch Mineralokortikoide (Aldosterone) die Polarisierung der Makrophagen in Richtung des inflammatorischen M1 Phänotypus verstärken, wohingegen eine MR-Defizienz in Makrophagen eine schützende Wirkung gegen kardiale Hypertrophie und Fibrose hatte [67].

Die Akkumulation von Makrophagen wird im Herzgewebe nach Infarkt durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert. Hierbei bilden Makrophagen im infarzierten Herzen eine Quelle für Renin und ACE. Diese Enzyme sind für die lokale Produktion von Angiotensin II (AT II) und der anschließenden Aktivierung von kardialen Fibroblasten mit verantwortlich [68]. Über AT II werden myelomonozytäre Zellen *via* AT<sub>1</sub>R (Angiotensin II Rezeptor) von der Milz zum infarzierten Herzgewebe geleitet [69, 70]. Das Gewebshormon AT II reguliert zudem die Ausschüttung des Mineralokortikoids Aldosteron, welches wiederum proinflammatorisch *via* Mineralokortikoidrezeptor auf

Kardiomyozyten wirkt. Zusätzlich hat Aldosteron einen direkten Einfluss auf die fibrotische Reaktion des Herzens, indem es Makrophagen zu einem profibrotischen Phänotyp differenzieren lässt [67, 71].

Infolge der Blockade des Mineralokortikoidrezeptors nach Myokardinfarktinduktion mittels MR-Antagonist kann die Ausdünnung sowie die Dilatation der infarzierten Herzwände signifikant reduziert werden und führt zu einer Verbesserung der LV Funktion [72]. Die genetische, Kardiomyozyten-spezifische Ablation des MR förderte gleichermaßen die Myokardinfarktheilung, höchstwahrscheinlich aufgrund der frühzeitig beschleunigten RANTES (CCL5)-abhängigen Chemotaxis von myelomonzytären Zellen [73].

Sobald es jedoch zu einer verstärkten Akkumulation von Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten (Monozytose) kommt, ist die Auflösung der Inflammation nach MI bei Mäusen gestört und das „adverse LV remodeling“ wird gefördert [74]. Klinische Daten unterstützen experimentelle Hinweise, dass auch ROS eine wichtige Rolle beim „cardiac remodeling“ spielt [75]. Durch die Modifizierung redoxsensitiver Proteine und Enzyme kann der regulatorische Effekt von ROS auf die Immunantwort beim Myokardinfarkt manipuliert werden. Hämoxygenase 1 (HO-1) ist bekanntermaßen ein induzierbares, stressresponsives Enzym, welches Häm zu Bilirubin, Kohlenmonoxid und freiem Eisen oxidiert. Es besitzt antiinflammatorische und antiapoptotische sowie kardioprotektive Eigenschaften. HO-1-defiziente Mäuse hatten nach Ischämie/Reperusions-Verletzung signifikant größere Infarkte und eine erhöhte inflammatorische Leukozyteninfiltration - speziell Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten und Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile - im infarzierten Myokard. Dieser Effekt konnte über eine rAAV.hHO-1 (engl. recombinant adenoassociated virus-encoding human heme oxygenase-1) Behandlung HO-1-defizienter Mäuse rückgängig gemacht werden [76].

### **1.5.2 Der Einfluss von lymphoiden Immunzellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes**

Weitere Leukozyten, welche das infarzierte Herz invadieren, sind dendritische Zellen [77], Lymphozyten [78, 79] und Mastzellen [46]. Verglichen mit der Anzahl an Neutrophilen sowie Monozyten/Makrophagen ist deren Anzahl relativ gering. Allerdings scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Infarktheilung und bei der Kommunikation mit myeloiden Zellen zu spielen [35].

Im Folgenden sollen die spezifischen, immunregulatorischen Funktionen von lymphoiden Zellpopulationen bei der Pathogenese des Myokardinfarkts umfassender erläutert werden. Mit Hinblick auf deren Zusammenspiel mit myeloiden Zellen ist

bekannt, dass Lymphozyten die Mobilisierung und Rekrutierung von Monozyten aus der Milz, dem Knochenmark und dem Blut sowie die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen nach MI triggern [80]. Zu den Lymphozyten, welche das infarzierte Myokard invadieren, zählen B-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, speziell T<sub>H</sub>1 Zellen und T<sub>reg</sub> Zellen, gamma:delta T-Zellen und NKT Zellen [43]. Die protektiven oder pathogenen Effekte der Lymphozyten beim Myokardinfarkt sind abhängig von der jeweiligen Zellpopulation sowie vom Zeitpunkt nach Infarktbeginn.

#### **1.5.2.1 Die Funktion von B-Zellen beim Myokardinfarkt**

Die Hauptaufgabe von B-Lymphozyten ist die Produktion von Immunglobulinen (Antikörper) mit unterschiedlichen Funktionen [43]. Reife B-Zellen produzieren zudem CCL7 und induzieren damit eine erhöhte Rekrutierung von Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten nach MI. Dies resultierte in einer Zunahme der Myokardgewebszerstörung und verschlechterter kardialer Funktion bei Mäusen. Die genetische und die antikörpervermittelte Depletion von B-Zellen konnte die Monozyteninfiltration vermindern sowie die LV Funktion verbessern und ventrikuläres „remodeling“ 14 Tage nach MI abschwächen [81].

#### **1.5.2.2 Die Bedeutung von T-Zellen beim Myokardinfarkt**

T-Zellen, welche den Oberflächenmarker CD4 exprimieren, werden als T-Helferzellen bezeichnet [43]. Abhängig von ihrer Zytokinproduktion werden sie weiter charakterisiert in T<sub>H</sub>1 Zellen (produzieren IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), T<sub>H</sub>2 Zellen (produzieren IL-4, IL-13), T<sub>H</sub>17 Zellen (produzieren IL-17) und regulatorische T<sub>reg</sub> Zellen (produzieren IL-10, TGF- $\beta$ ) [82]. T-Zellen, die den Oberflächenmarker CD8 exprimieren, werden wiederum als zytotoxische T-Zellen definiert. Sie sind ebenfalls in der Lage IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  zu produzieren [83].

##### **1.5.2.2.1 Aktivierung und Rekrutierung von T-Zellen**

Die Anzahl der T-Zellen, welche innerhalb der ersten 30 min nach I/R das Herzgewebe infiltrieren, ist relativ gering. Dennoch könnten die wenigen Zellen an der Inflammationskaskade nach MI sowie an der folgenden Aktivierung von weiteren T-Zellen und von Neutrophilen und gewebspezifischen Makrophagen teilhaben [84].

Arteriosklerotische Plaques - als Trigger für die Thrombusentstehung in Koronararterien und Auslöser von akutem MI - aktivieren ebenso T-Lymphozyten [85]. Die klassische T-Zellaktivierung benötigt die Präsentation von Antigenen *via* APCs (Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen) gegenüber dem klassischen T-Zellrezeptor [79]. Dendritische Zellen und Makrophagen sind in der Lage, Antigene auf dem MHC-II Komplex gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren [79]. Ein antigenunabhängiger Mechanismus zur Aktivierung von T-Lymphozyten beinhaltet die Beteiligung von IL-12, MCP-1, RANTES, MIP-1 sowie IP-10 [86, 87].

Die Depletion von Neutrophilen *via* anti-Ly-6G Antikörper hatte bei einem Mausmodell der venösen Thrombose keinen Effekt auf die T-Zellrekrutierung [88]. Wogegen die Depletion von Monozyten mittels dem LysM<sup>idTR</sup> Mausmodell zu einer verminderten T-Zellrekrutierung führte. Dies spricht für eine essentielle Rolle der Monozyten bei der T-Zellanlockung in der Venenwand nach Thromboseinduktion [88].

Monozyten scheinen auch bei der T-Zellaktivierung und der Rekrutierung nach Myokardinfarkt eine Schlüsselfunktion einzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass der Myokardinfarkt die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert [79]. Eine prompte Infiltration von Lymphozyten ins infarzierte Myokard - möglicherweise über myokardiale Proteine als Antigene für die Zellaktivierung - ist jedoch relativ selten und benötigt die vorangegangene Aktivierung über die Inflammationszellen der angeborenen Immunantwort. Der koordinierte Aktivierungsprozess von klassischen und regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen förderte in diesem Zusammenhang die Wundheilung und das Überleben nach MI [79].

#### **1.5.2.2.2 Die Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beim Myokardinfarkt**

Die Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der Wundheilung und dem „remodeling“ nach MI wurde mittels CD4 Knock-out Tiere untersucht und zeigte eine Verschlechterung der LV Funktion sowie eine gestörte Kollagen- und Narbenbildung im Infarktgewebe verglichen mit WT Tieren. Im infarzierten Myokard CD4-defizienter Mäuse konnte mittels immunhistologischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen zudem eine erhöhte Gesamtanzahl an Leukozyten sowie an proinflammatorischen Monozyten an Tag 7 nach MI detektiert werden. Weiterhin ließ sich bei CD4-defizienten Mäusen eine erhöhte Expression an MCP-1 und MMP-9 feststellen. MMP-9 wird vorwiegend von infiltrierenden Leukozyten während der ersten Tage nach MI sezerniert und ist assoziiert mit einem „adverse cardiac remodeling“ sowie einer gestörten Wundheilung nach MI [59]. IL-10 und IFN- $\gamma$  stellen typische antiinflammatorische und proinflammatorische

Zytokine dar, welche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert werden. Die IFN- $\gamma$  und IL-10 Expression in der Infarktzone bei CD4-defizienten Mäusen war signifikant verringert. Antiinflammatorische Zytokine - wie IL-10 - beeinflussen ebenfalls die extrazelluläre Matrixbildung über Modifizierung der Myofibroblasten-Differenzierung und -Proliferation [78]. CD8<sup>+</sup> T-Zellen kompensierten hingegen den Mangel an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei CD4 KO Mäusen [89].

Regulatorische Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>), eine Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, besitzen einen antiinflammatorischen Phänotyp. T<sub>reg</sub> Zellen expandieren in Herzständigen Lymphknoten und akkumulieren - nach Rekrutierung über CCL5/CCR5 - in geringer Anzahl im infarzierten Myokard [78]. T<sub>regs</sub> beeinflussen den Übergang von der Inflammationsphase hin zur Reparationsphase nach MI durch Verbesserung der Infarktheilung über T-Zell-vermittelte Regulierung der Monozyten/Makrophagen-Differenzierung.

Die genetische T<sub>reg</sub> Zellablation *via* Foxp3<sup>DTR</sup> Mausmodell sowie über anti-CD25-vermittelte Phagozytose von T<sub>reg</sub> Zellen vor Myokardinfarktinduktion führten zu einer M1-Makrophagen-Polarisierung bei gleichzeitiger Verlängerung der Inflammation. Ein Anstieg der Neutrophilen- und Ly-6C<sup>high</sup> Monozyteninfiltration sowie die verminderte Expression von Infarktheilungsfaktoren waren detektierbar. Fünf Tage post-MI konnten signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mRNA Level im Herzgewebe gemessen werden. Komplementär dazu war die absolute Anzahl an nicht-regulatorischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Infarktgewebe von Foxp3-Zelldepletierten Tieren signifikant erhöht. Eine verstärkte kardiale Inflammation war zudem mit der Zunahme des „cardiac remodeling“ nach MI verbunden.

Die therapeutische T<sub>reg</sub> Zellaktivierung *via* anti-CD28 Behandlung zwei Tage nach MI induzierte die Differenzierung der Monozyten zu M2 Makrophagen und war assoziiert mit einer positiven Infarktprognose, der Aktivierung von Myofibroblasten sowie mit einer erhöhten Expression von Monozyten/Makrophagen-stämmigen Proteinen (u.a. TGF $\beta$ , IL-10), welche demnach die Wundheilung nach Infarkt förderten und das Überleben verbesserten [90]. Die weitere Einteilung der T<sub>reg</sub> Zellen erfolgt nach unterschiedlichen Markern in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen, T<sub>H</sub>3 Zellen und NKT Zellen. Die Aktivierung von NKT Zellen führte bei Mäusen zu einer verbesserten systolischen Funktion und zu einem verminderten „LV remodeling“ 28d nach MI - aufgrund der erhöhten Produktion von kardioprotektiven Zytokinen, wie IL-10 [91].

### 1.5.2.3 Der Einfluss von NK-Zellen beim Myokardinfarkt

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) unterscheiden sich von NKT Zellen phänotypisch, nach Ursprung sowie durch unterschiedliche Effektorfunktionen [92]. Sie lassen sich nicht eindeutig zum adaptiven oder zum angeborenen Immunsystem zählen, sondern beinhalten Funktionen beider Systeme. NK-Zellen sind zytotoxische, lymphatische Zellen, besitzen jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren und können somit keine APCs erkennen. Sie reifen im Knochenmark, im Lymphknoten, der Milz und im Thymus. Beim Menschen repräsentieren 5-15 % der zirkulierenden Lymphozyten NK-Zellen, in der Maus sind es nur 2-5 % [93].

Von Makrophagen freigesetzte Interferone und Zytokine aktivieren NK-Zellen. Der Tötungsmechanismus aktivierter Zellen ist identisch mit dem der zytotoxischen T-Zellen [8]. Zytotoxisches Granula wird dabei an der Oberfläche gebundener Zielzellen freigesetzt, Effektorproteine anschließend durch die Zellmembranen geschleust und damit der programmierten Zelltod ausgelöst.

Über das T-bet/ IFN- $\gamma$ / IL-12 „signaling“ aktivieren Monozyten und NK-Zellen sich gegenseitig [94]. T-bet (TBx21) nimmt in diesem Kontext eine zentrale Bedeutung bei der Kontrolle der IFN- $\gamma$  Expression ein. Die T-bet-abhängige Produktion von IL-12 in Monozyten und die IFN- $\gamma$ -abhängige Aktivierung und Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder DCs werden dabei in einer positiven Aktivierungsschleife angetrieben. NK Zellen produzieren die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  [95, 96]. IL-12, IL-18 und TNF- $\alpha$  - sezerniert von aktivierten Makrophagen - wurden als Aktivatoren für die IFN- $\gamma$  Produktion in NK Zellen identifiziert [97-100]. Negative Regulatoren der IFN- $\gamma$  Produktion sind hingegen IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ .

NK-Zellen exprimieren weder T-Zell-spezifische noch B-Zell-spezifische Rezeptoren, sondern den Oberflächenmarker NK1.1 (murin) oder CD16/Fc $\gamma$ RIII und CD56 (human) [101]. Sie konnten in arteriosklerotischen Plaques detektiert werden und experimentelle Studien zeigten weiterhin, dass NK-Zellen die Gefäßwand infiltrieren und damit die Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen fördern [102, 103].

Die Depletion von NK-Zellen in einem Mausmodell hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zytokinexpression (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ ) sowie auf die Neutrophilen- und Makrophageninfiltration ins infarzierte Myokard und auf das „LV remodeling“ nach MI. Stattdessen wiesen NK-Zell-depletierte und infarktinduzierte Mäuse einen verschlechterten respiratorischen Phänotyp infolge der Entwicklung von kardiogenen, pulmonalen Ödemen nach MI auf. CD107a<sup>+</sup> und IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellpopulationen waren unverändert, wohingegen IL-10<sup>+</sup> Populationen anstiegen. Ein adaptiver Transfer mit NK-Zellen aus WT Tieren in NK-Zell-depletierte Tiere verbesserte den respiratorischen Phänotyp [101].

## 1.6 Ziel der Dissertation

Die Suche nach einem geeigneten Therapieansatz, um das „adverse ventricular remodeling“ sowie die Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt zu verhindern und somit das Postinfarkt-Überleben zu verbessern, bleibt weiterhin eine Herausforderung. Eine generelle Reduktion inflammatorischer Funktionen scheint unzweckmäßig zu sein und ein spezifischer, zeitlich limitierter Ansatz wesentlich brauchbarer. Zu diesem Anliegen wurde die positive oder zum Teil auch negative Rolle verschiedener Immunzellpopulationen sowie prominenter Zytokine und Chemokine bei der Pathogenese des Herzinfarktes bereits ausführlich diskutiert. Jedoch bleiben in diesem Zusammenhang noch immer viele Fragen offen, weshalb weitere Untersuchungen zur Klärung dieser und auch zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze nötig sind, um die bestmögliche Behandlung nach einem Infarkt zu erreichen.

Es ist bisher bekannt, dass der Myokardinfarkt einen initialen Zellaufstrom an Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen provoziert. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, aber auch Resultate aus anderen klinischen und experimentellen Studien zeigten diesbezüglich die Wichtigkeit der inflammatorischen Antwort nach einem Myokardinfarkt. Die myeloiden Zellen sind als Teil des angeborenen Immunsystems sowohl involviert bei der initialen Entzündungsphase des Myokardinfarktes als auch bei dem anschließenden Heilungsprozess. Ein Eingriff entweder in den Entzündungsprozess und/oder in den Heilungsprozess zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. an unterschiedlichen Orten ist hilfreich, um die Rolle dieser Zellen genauer zu determinieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den spezifischen Einfluss von myeloiden Immunzellen und deren Zusammenspiel mit inflammatorischen Mediatoren beim Myokardinfarkt detaillierter zu analysieren, um potentiell neue immunregulatorische Therapiemöglichkeiten für klinische Applikationen zu erforschen. Insbesondere die Charakterisierung der unterschiedlichen Bedeutungen und Auswirkungen auf inflammatorische Prozesse sowie dem funktionalen Phänotyp in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Myokardinfarktinduktion sollten dabei erarbeitet werden.

Zur weiteren Determination der Eigenschaften von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen sowie grundlegender Mechanismen bei der Pathogenese und der Heilung des Myokardinfarktes wurde die permanente Ligatur der LAD gewählt, um einen Myokardinfarkt zu induzieren. Mit Hilfe dieses murinen Infarktmodells, bei dem zusätzlich eine selektive Depletion von verschiedenen Immunzellen erzielt oder systemische Knock-outs verwendet wurden, sollten die entsprechenden Immunzellen sowie wichtige Chemokine und Zytokine und deren kardioprotektive oder teilweise negative Rolle im Postinfarkt-Geschehen untersucht werden. Hierbei sollte überprüft werden, welchen

spezifischen Effekt die genetische Ausschaltung (mittels Knock-out) oder die pharmakologische Eliminierung (mittels Antikörper) der Immunzellen (Neutrophile, Monozyten/Makrophagen) oder der Entzündungsmediatoren (Interferon-gamma, Tumornekrosefaktor-alpha, Cathelicidin) auf das Postinfarkt-Überleben, die LV-Funktion, das „cardiac remodeling“, die Zellinfiltration sowie die Zytokin- und Chemokinexpression nach Infarkt hat.

### **1.6.1 Hypothesen**

Erstens sollte überprüft werden, ob eine intakte neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis und Monozytenaktivierung für das Überleben, die kardiale Funktion und das „cardiac remodeling“ nach Myokardinfarkt erforderlich ist. Es sollten folgende Hypothesen getestet werden:

**Hypothese 1: Myelomonozytäre LysM<sup>+</sup> Zellen sind essentiell an der inflammatorischen Antwort nach Myokardinfarkt beteiligt.**

**Hypothese 2: Die Aktivität von Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen ist notwendig für die Entzündungs- und Reparatonsmechanismen nach Myokardinfarkt.**

**Hypothese 3: Die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis wird beim Myokardinfarkt durch Cathelicidin (CRAMP) vermittelt.**

Zweitens sollte anhand folgender Hypothesen geprüft werden, ob die Aktivität myeloider Inflammationszellen von der Interferon-gamma-Rezeptor Expression abhängig ist und ob das „Interferon-gamma-signaling“ notwendig für das Überleben, die kardiale Funktion und das „cardiac remodeling“ nach Myokardinfarkt ist:

**Hypothese 4: Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ist maßgeblich an der Inflammationsantwort myeloider Zellen nach Myokardinfarkt beteiligt.**

**Hypothese 5: Die Expression des Interferon-gamma-Rezeptor 1 (Ifngr1) ist wichtig für das inflammatorische Verhalten myeloider Zellen nach Myokardinfarkt.**



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Bezeichnung Gerät	Hersteller (Firmensitz)
BD FACSCanto II (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Durchlichtmikroskop, Axio Lab. A1	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
EKG-Transmitter TA11ETA-F10 und Receiver-Plattformen	Data Science International (St. Paul, MN, USA)
Eppendorf Research® plus Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µL	MicroImaging Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Leica M50 Mikroskop	Leica Mikrosysteme GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Nano Drop 2000 (UV/Vis-Spektralphotometer)	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Respirationsapparatur Minivent Harvard Typ 845	Hugo Sachs Elektronik (March, Deutschland)
Temperatur-Kontrollmodul	Föhr Medical Instruments GmbH (Seeheim, Deutschland)
Thermomix Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer compact	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Tiefkühlschrank -86°	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
TissueLyser II	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Ultraschallkopf RMV707B (15-45 MHz; Mouse cardiac)	FUJIFILM VisualSonics (Toronto, Ontario, Kanada)
UniVet Porta Tischnarkosegerät	Groppler Medizintechnik (Deggendorf, Deutschland)
Ventilated Cabinet	Tecniplast Deutschland (Hohenpeißenberg, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Vevo 770 Imaging System (Ultraschallgerät)	FUJIFILM VisualSonics (Toronto, Ontario, Kanada)
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5702 R-Bundle A-4-38	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810 R-Bundle A-4-81	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller (Firmensitz)</b>
1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße, klar	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
1 ml-Spritze, Tuberkulinspritze, grün	Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland)
10, 20, 200, 1000 µl Filterspitzen, steril, Rack	StarLab (Hamburg, Deutschland)
2 ml-Spritze, Injekt Luer	Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland)
6-well Platten, Flachboden mit Deckel	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
96-well Platten, PS, steril, F-Boden	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Abdeckfolie viewseal	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
C-Chip Neubauer Improved	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cell Strainer 40 µm, steril, Nylon	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Cell Strainer 70 µm, steril, Nylon	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Enthaarungscreme SNÄ® Epil	Rufin cosmetic GmbH (Langenhagen, Deutschland)
Eppendorf® Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falcon® Gefäß 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
ImmunoPlatten MaxiSorp F96 (NUNC)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Kanüle 26G; 0,45 x 13 mm	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Kanüle 30G; 0,30 x 13 mm	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Latexhandschuh, Größe S	Lohmann & Rauscher (Neuwied, Deutschland)
Leukofix® (2,5 cm x 9,2 m)	BSN Medical (Hamburg, Deutschland)
Leukosilk® S (2,5 cm x 9,2 m)	BSN Medical (Hamburg, Deutschland)
Low Profile 96-well unskirted PCR Plate, natural	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
MACS MS-Säule, steril	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Micro Amp Optical Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Microseal "B" Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Microtiterplatte, PP, 96-well, Halbrand	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
octeniderm® farblos	Schülke und Mayr
Pasteurpipetten, unsteril	VWR (Darmstadt, Deutschland)

Petrischale, 94 x 16 mm, ohne Nocken, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Prolene 8706H 6/0 C1+C1, 1 x 75 cm	Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland)
Prolene 8889H 6/0 C1, 1 x 75 cm	Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland)
Prolene EH7469LG 8/0 2xBV 130-5, 1 x 75 cm	Johnson & Johnson (Neuss, Deutschland)
Röhrchen mit Rundboden, 5 ml, unsteril	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Skalpell Feather Fig 11	PFM medical AG (Köln, Deutschland)
Skalpell Feather Fig 21	PFM medical AG (Köln, Deutschland)
stainless steel beads	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Swab, Holz/Watte	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vasofix® safety Braunüle 22G blau	Braun B. Melsungen (Melsungen, Deutschland)
Wägeschälchen, antistatisch, weiß, 30 ml	VWR (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.3 Chirurgische Instrumente

**Tabelle 3: Verwendete chirurgische Instrumente**

Name	Firma	Bestellnummer
Castroviejo micro Nadelhalter, gerade	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)	12060-01
Federschere, spitz/spitz	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)	15006-09
Graefe Pinzette, gebogen, width 8 mm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)	11052-10
Graefe Pinzette, gebogen, width 6 mm	Roboz Surgical Instrument Co., Inc. (Gaithersburg, MD, USA)	RS-5111
Halsted Mosquito Hemostats, gebogen, 12,5 cm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)	13009-12
Lexer Baby Scissor, gerade, 10 cm	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, Deutschland)	14078-10

### 2.1.4 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt.

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen**

Name	Hersteller (Firmensitz)
Ammoniumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Atipamezol-Hydrochlorid	Pfizer (New York, NY, USA)

BD FACS™ Clean Solution	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS™ Flow	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS™ Lysing solution	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BD FACS™ Shutdown Solution	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Buprenorphin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Collagenase Typ II	Lifetechnologies (Carlsbad, CA, USA)
DNase I grade II	Roche (Mannheim, Deutschland)
Diphtheria-Toxin (Corynebacterium diphtheriae)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Fentanyl-Dihydrogencitrat	Johnson&Johnson (New, Brunswick, NJ, USA)
Flumazenil	B.Braun, Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Forene (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) – Isofluran	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Formaldehydlösung, 16 %	Thermo Scientific
Guanidiniumisothiocyanat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	B.Braun, Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Medetomidin-Hydrochlorid	Pfizer Pharma (Berlin, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Midazolam-Hydrochlorid	Pharma Plus GmbH (Hamel, Deutschland)
Natriumacetat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium-Citrat Dihydrat pH 7,0	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N-Lauroylsarkosin Natriumsalz	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies Gibco BRL (New York, NY, USA)
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
RNase away	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Aqua-Phenol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti®-Chlorophorm-Isomylalkohol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640 + L-Glutamin	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

SONOSID® Ultraschall-Gel	ASID BONZ GmbH (Herrenberg, Deutschland)
Temgesic 0,3 mg/ml	Reckitt Benckiser (Koblenz, Deutschland)
Terralin Liquid	Schuelke & Mayr GmbH
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

#### 2.1.4.1 Puffer für Blutentnahme

##### Citratpuffer

2,941 g Natrium-Citrat Dihydrat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O (3,2 %)

#### 2.1.4.2 Puffer und Lösungen für Durchflusszytometrie

##### PBS/FCS Puffer

FCS (engl. Fetal Calf Serum, hitzeinaktiviert) 2 % (% v/v) in PBS (engl. Phosphate Buffered Saline)

##### Ammonium-Chlorid-Kalium (ACK) Lysepuffer

NH<sub>4</sub>Cl 150 mM

KHCO<sub>3</sub> 1,0 mM

Na-EDTA 0,1 mM

pH 7,2 - 7,4 in ddH<sub>2</sub>O

##### Trypanblau-Lösung

1:10 verdünnt in PBS

#### 2.1.4.3 Puffer für RNA Isolierung

##### Git-Puffer

Guanidiniumisothiocyanat 5 M

Natrium-Citrat (pH 7,0) 0,25 M

N-Lauroylsarkosin 0,5 % (% w/w)

+ β-Mercaptoethanol

#### 2.1.4.4 Anästhesie und Antagonisierung

Verschiedene Faktoren müssen bei der Wahl der Narkosemittel berücksichtigt werden: die Art der Operation, die Dauer der Operation und die zu erwartende Schmerzhaftigkeit des Eingriffes sowie mögliche Wechselwirkungen mit zusätzlich applizierten Substanzen (z.B. Antikörper, Cathelicidin).

##### **Anästhesie für Ultraschalluntersuchung und Blutentnahme**

Für die Ultraschalluntersuchung wurde eine Isofluran-Inhalationsnarkose verwendet. Isofluran besitzt eine geringe analgetische Wirkung und wurde über eine Gas-Misch-Einheit mit angeschlossenenem Isofluranverdampfer in einer Konzentration von 3 – 4 % mit 100 % Sauerstoff gemischt in eine Gesichtsmaske geleitet, um die Anästhesie zu gewährleisten. Die Tiere wurden auf einer beheizbaren Plattform fixiert und während der Untersuchung wurde eine Konzentration von 1,5 – 2,5 % Isofluran mit 100 % Sauerstoff, bei einer Flussrate von 0,4 l/min gewählt. Die Körpertemperatur wurde dabei stets über eine Rektalsonde überprüft, um eine Temperatursenkung zu vermeiden. Bei der Blutentnahme über Herzpunktion wurde die Isofluran-Inhalationsnarkose verwendet.

##### **Narkose für LAD/SHAM Operation sowie für Implantation der EKG Transmitter (intraperitoneale Applikation):**

Medetomidin 0,5 mg/kg KG

Midazolam 5,0 mg/kg KG

Fentanyl 0,05 mg/kg KG

##### **Antagonisierung für LAD/SHAM Operation sowie für Implantation der EKG Transmitter (subkutane Applikation):**

Atipamezol 2,5 mg/kg KG

Flumazenil 0,5 mg/kg KG

Naloxon 1,2 mg/kg KG

#### 2.1.5 Kits

**Tabelle 5: Verwendete Kits**

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
-------------	-------------------------

High Capacity RNA to DNA (Umschreibkit)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TaqMan RNA to CT One Step Kit	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

### 2.1.6 Antikörper für Durchflusszytometrie

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper/Zellmarker und gekoppelte Fluorochrome für die Durchflusszytometrie**

Antikörper (anti-mouse)	Farbe	Klon	Hersteller (Firmensitz)
CD11b (Mac-1)	PE	M1/70	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
CD11b (Mac-1)	PE-Cy7	M1/70	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD3	V500	500A2	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
CD16/CD32 (FC Rezeptor Block)	-	93	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD45	APC-eFluor 780	30-F11	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD45.2	FITC	104	eBioscience (San Diego, CA, USA)
F4/80	APC	BM8	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Ly-6C	Per-Cp5.5	AL-21	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Ly-6G	FITC	1A8	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Ly-6G und Ly-6C (Gr-1)	FITC	RB6-8C5	BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
NK1.1	PE-Cy7	PK136	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Name	Farbe	Klon	Hersteller (Firmensitz)
PO-PRO™-1 Iodide (435/455)	PB	-	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

### 2.1.7 qRT-PCR Primer

Alle qRT-PCR Primer wurden von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 7: Verwendet Primer für die qRT-PCR**

Name qRT-PCR Primer	Genname	Spezies	Bestellnummer
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	Maus	Mm00438285_m1
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	Maus	Mm00441242_m1
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	Maus	Mm00438270_m1
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Maus	Mm04207460_m1
CXCR1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1	Maus	Mm00731329_s1
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Maus	Mm00436454_m1
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	Maus	Mm02620111_s1
IFNG	interferon gamma	Maus	Mm99999071_m1
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	Maus	Mm00599890_m1
IL1B	interleukin 1 beta	Maus	Mm00434228_m1
IL12B	interleukin 12b	Maus	Mm01288989_m1
IL6	interleukin 6	Maus	Mm00446190_m1
MMP2	matrix metalloproteinase 2	Maus	Mm00439498_m1
MMP9	matrix metalloproteinase 9	Maus	Mm00442991_m1
TBP	TATA box binding protein	Maus	Mm00446973_m1
TGF-beta	transforming growth factor	Maus	Mm01298616_m1
TNF	tumor necrosis factor	Maus	Mm00443258_m1
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Maus	Mm01281449_m1

## 2.1.8 Spezielle Software

**Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software**

Software	Hersteller (Firmensitz)
CFX Manager™ Software Version 2.1	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
DataQuestSystems	Data Science International (St. Paul, MN, USA)
Endnote X6	Thomson Reuters (New York City, NY, USA)
FlowJo Version 10	Tree Star, Inc. (Ashland, OR, USA)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
Image-Pro Plus Version 7.0	Media Cybernetics, Inc. (Rockville, MD, USA)
Microsoft Office (Word, Excel)	Microsoft (Redmond, Washington, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere



### 2.2.1.1 Rechtliche Voraussetzungen – Tierversuchsanträge

Alle tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt (LUA) von Rheinland-Pfalz in Koblenz genehmigt. Die entsprechenden Tierversuchsantragsnummern lauten:

- G10-1-051
- G15-1-067

Zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche wurde weiterhin die erfolgreiche Teilnahme am FELASA B Kurs („Federation of European Laboratory Animal Science Association“) vorausgesetzt.

### 2.2.1.2 Haltungsbedingungen und Zucht

Die Versuchstiere wurden in den dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der zentralen Tierhaltung der Universitätsmedizin Mainz (ZVTE) gehalten. In Filtertop Makrolonkäfigen Typ II wurden maximal fünf gleichgeschlechtliche Bestandtiere oder maximal drei Zuchttiere (Inzuchtstämme) pro Käfig gehalten. Einmal wöchentlich erfolgte ein Einstreuwechsel. Zellstofftücher und Plastikhäuser wurden ebenfalls zur Verfügung gestellt, um einen natürlichen Lebensraum mit Rückzugs- und Beschäftigungsmöglichkeiten zu simulieren. Die Versuchstiere wurden in ventilierten Käfigschränken (Ventilated Cabinet, Tecniplast) eingestallt, dabei war die Temperatur bei 20 bis 24 °C, die Luftfeuchte bei 45 bis 65 % und ein zwölfstündiges Hell-Dunkel-Regime mit 50 bis 100 Lux in der Licht-Phase eingestellt. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Leitungswasser und artgerechtem Pellet Futter (ssniff Spezialitäten GmbH, Soest).

### 2.2.1.3 Verwendete Mausstämme

Folgende Kontrollmausstämme und transgene Mausstämme wurden in der vorliegenden Dissertationsarbeit für die Tierversuche benutzt:

- LysMCre<sup>+/-</sup> (Abkürzung: LysM)
- ROSA26<sup>IDTR/wt</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> (Abkürzung: LysM<sup>IDTR</sup>)

- C57BL/6
- CRAMP<sup>-/-</sup>
- IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>
- Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>
- TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>

**LysMCre<sup>+/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** Die Cre-Rekombinase wurde bei diesen transgenen Mäusen unter Kontrolle des murinen Lysozym M (LysM)-Promotors auf dem Chromosom 10 eingefügt (Knock-in), womit eine LysM-zellspezifische Cre Expression erreicht wird - die offizielle Stammbezeichnung lautet B6.129P2-Lyz<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J [104]. Dieser Stamm wurde als **LysM** abgekürzt und diente als Kontrolle für LysM<sup>iDTR</sup> Mäuse sowie als Kontrolle für Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Mäuse.

**ROSA26<sup>iDTR/wt</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** Durch den gezielten Knock-in des Diphtherietoxin Rezeptors (DTR) in die Promotorregion des Rosa26 Gens wurde die Funktion dieses Gens zerstört. Des Weiteren wurde ein von loxP-Erkennungsstellen eingerahmtes Stopp-Signal zwischen den Rosa26 Promotor und die DTR-Region eingefügt. Durch Kreuzung von LysMCre Mäusen mit ROSA26iDTR Mäusen konnte das Stopp-Signal auf LysM-positiven Zellen spezifisch ausgelöscht werden (Cre/loxP-Rekombinationssystem) - die offizielle Stammbezeichnung lautet C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1(HBEGF)Awai</sup>/J [105]. In diesen generierten, heterozygoten ROSA26<sup>iDTR/wt</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> (abgekürzt **LysM<sup>iDTR</sup>**) Tieren wird der DTR nur in LysM<sup>+</sup> Zellen exprimiert und die intraperitoneale Applikation von Diphtherietoxin (DTX) ermöglicht somit eine spezifische Ablation von LysM<sup>+</sup> Zellen. Überlebens- und Neubildungszeiten von LysM<sup>+</sup> Zellen unterscheiden sich in Abhängigkeit der DTR-Expressionsraten dieser Zellen. Somit kann es zu Abweichungen im Verhalten bei den jeweils untersuchten Zellpopulationen (Neutrophile, Monozyten) kommen [104, 105].

Dieses Mausmodell wurde initial bei einem Wundheilungs-Mausmodell verwendet sowie in einem Hypertonus-Mausmodell zur Untersuchung der Angiotensin II-vermittelten vaskulären Dysfunktion. Für beide Studien stellte sich das LysM<sup>iDTR</sup>-Mausmodell zur selektiven Ablation von LysM<sup>+</sup> Zellen für die Charakterisierung myeloider Inflammationszellen als geeignet dar [106, 107].

**C57BL/6:** Als Kontrolltiere für die entsprechenden Knock-out Stämme (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>, CRAMP<sup>-/-</sup>) wurden Wildtyp-Tiere mit der Stammbezeichnung C57BL/6 verwendet. Es handelt sich bei C57BL/6 Mäusen um eine Inzuchtlinie, welche als genetischer Hintergrund für genetisch modifizierte Mausstämme genutzt wird [108].

**CRAMP<sup>-/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** Durch die gezielte Ausschaltung des *Camp* Gens kann das murine antimikrobielle Peptid Cathelicidin (CRAMP) nicht mehr produziert werden. Es handelt sich dabei um einen homozygoten Knock-out. Entsprechend abhängige Zellaktivitäten sind eingeschränkt [109].

**IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** Mäuse mit nicht-funktionalem Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) Gen wurden generiert, indem das normale IFN- $\gamma$  Allel in embryonalen Stammzellen durch ein defektes Allel ersetzt wurde (homozygoter Knock-out). Diese gezielte Mutation führt dazu, dass global kein IFN- $\gamma$  mehr produziert werden kann und entsprechend abhängige Zellaktivitäten und Immunantworten eingeschränkt sind [110].

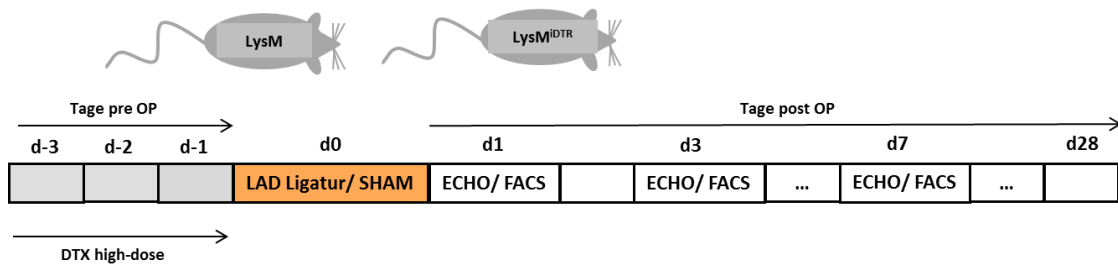
**Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** C57BL/6N-*Ifngr1*<sup>tm1.1Rds/J</sup> Mäuse wurden mit LysMCre Mäusen gekreuzt, um *Ifngr1*<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Mäuse zu generieren. Dieser Stamm erlaubt eine gezielte Eliminierung des Interferon-gamma Rezeptor 1 (*Ifngr1*) auf myelomonozytären LysM<sup>+</sup> Zellen. LysMCre<sup>+/-</sup> Tiere - abgekürzt LysM - dienten als Kontrollen.

**TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> (C57BL/6 Hintergrund):** Durch gezielte Ausschaltung des Gens wird global kein Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in defizienten Mäusen produziert. Es handelt sich ebenfalls um einen homozygoten Knock-out. Entsprechend abhängige Zellaktivitäten und Immunantworten sind eingeschränkt [111].

## 2.2.1.4 Behandlungen der Versuchstiere

### 2.2.1.4.1 *In vivo* Depletion von LysM<sup>+</sup> myelomonozytären Zellen

Bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren wird der induzierbare Diphtherietoxinrezeptor (iDTR) nur in Lysozym M (LysM)-positiven Zellen exprimiert. Die Applikation von Diphtherietoxin (DTX) ermöglicht in diesem Modell die Depletion von LysM-spezifischen und DTR-exprimierenden Zellen. Lysozym M (LysM) wird hauptsächlich von Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet [104-106]. Beide Zellspezies besitzen verschiedene Überlebens- und Neubildungszeiten. Daher kann der DTR unter Kontrolle des Lysozym M-Promotors ebenfalls unterschiedliche Expressionsraten - abhängig vom Zelltyp und von den Zelleigenschaften - aufweisen (siehe auch Kapitel 2.2.1.3).



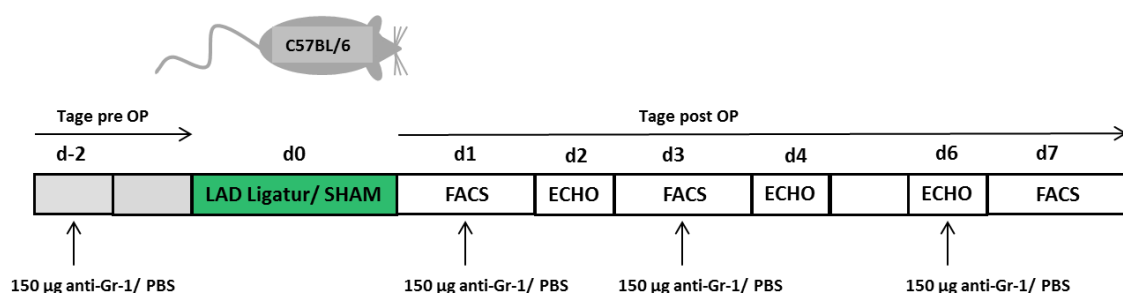
### Abbildung 2-1: Behandlungsregime LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Mäuse

Zur selektiven Ablation von LysM<sup>+</sup> Zellen wurden LysM<sup>iDTR</sup> Tiere sowie LysM Kontrolltiere täglich bis zur LAD Ligatur/SHAM Operation über intraperitoneale Applikation mit high-dose (25 ng/g) Diphtherietoxin (DTX) behandelt. Anschließend wurden an Tag (d) 1, 3, 7 und 14, 21, 28 nach OP Versuche durchgeführt.

Zur selektiven Ablation von LysM<sup>+</sup> Zellen wurden LysM<sup>iDTR</sup> Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere (LysM) täglich bis zur LAD Ligatur/SHAM Operation über intraperitoneale Applikation mit high-dose (25 ng/g) Diphtherietoxin (Sigma-Aldrich; gelöst in PBS) behandelt. Die Depletionsbehandlung begann drei Tage vor LAD Ligatur/SHAM Operation (Abbildung 2-1).

#### 2.2.1.4.2 *In vivo* Depletion von Gr-1<sup>+</sup> Zellen

Die Applikation des anti-Gr-1 Antikörpers zur selektiven Depletion von Gr-1<sup>+</sup> Zellen erfolgte unter Kurznarkose mit Isofluran. Die anti-Gr-1 Behandlung begann zwei Tage vor LAD Ligatur/SHAM Operation. C57BL/6 Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion mit dem Antikörper (150 µg in 100 µl PBS) behandelt. Kontrolltiere erhielten nur Puffer (100 µl PBS). Anschließend wurden die Mäuse an Tag 1, Tag 3 und Tag 6 nach OP noch mal mit dem anti-Gr-1 Antikörper behandelt, zum Erhalt der Depletion bis Versuchsende (Abbildung 2-2). Die Überprüfung der Depletionseffizienz erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse des venösen Blutes.



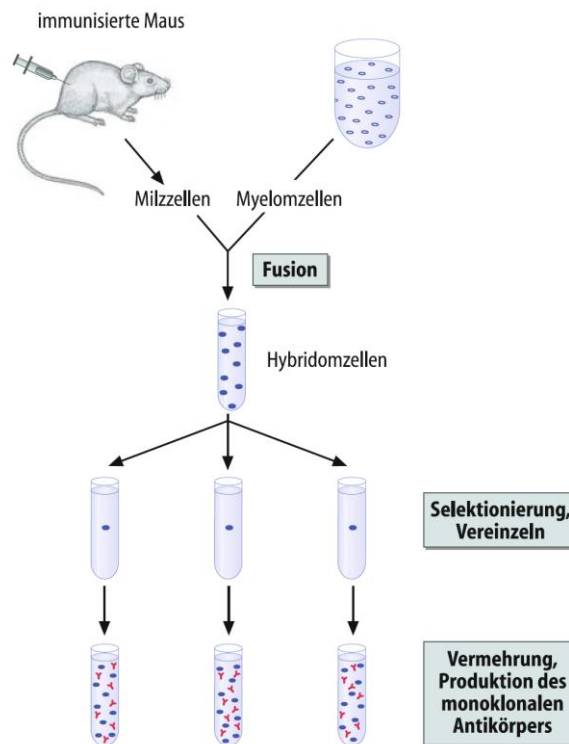
### Abbildung 2-2: Behandlungsregime Placebo (PBS) oder mit anti-Gr-1 Antikörper behandelter C57BL/6 Mäuse

Zur selektiven Depletion von Gr-1<sup>+</sup> Zellen wurde C57BL/6 Mäusen der anti-Gr-1 Antikörper (150 µg in 100 µl PBS) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Behandlung begann zwei Tage vor LAD Ligatur/SHAM Operation. Kontrolltiere erhielten nur Puffer (100 µl PBS). Anschließend wurden den Tieren an Tag 1, 3 und 6 nach OP nochmalig anti-Gr-1 Antikörper bzw. PBS i.p. injiziert.

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Produktion und Aufreinigung des monoklonalen anti-Gr-1 Antikörpers

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern dienen Hybridomzellen. Nachdem eine Maus mit einem spezifischen Antigen immunisiert wurde, beginnt diese aktivierte B-Lymphozyten zu bilden. Aus der Milz des Versuchstieres entnommene B-Lymphozyten wurden anschließend mit Myelomzellen fusioniert, wodurch die entstehenden Hybridzellen immortalisiert werden und in der Lage sind, unbeschränkt antigenspezifische Antikörper zu produzieren. Nach selektiver Abtrennung von nicht-fusionierten Zellen (z.B. über HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) - Selektionsmedium) und anschließender Vereinzeln sind die Hybridomzellen in Zellkultur fähig einen Klon zu bilden, welcher nur einen spezifischen Antikörper herstellt (Abbildung 2-3) [112].



**Abbildung 2-3: Herstellung monoklonaler Antikörper über Hybridomzellen [112]**

Aus der Milz entnommene B-Lymphozyten werden mit Tumorzellen (Myelomzellen) fusioniert, wodurch Hybridomzellen entstehen und in der Lage sind spezifische Antikörper zu produzieren. Nach Selektionierung und Vereinzeln sind diese Hybridomzellen in Zellkultur in der Lage einen Klon zu bilden, welcher nur einen spezifischen Antikörper herstellt.

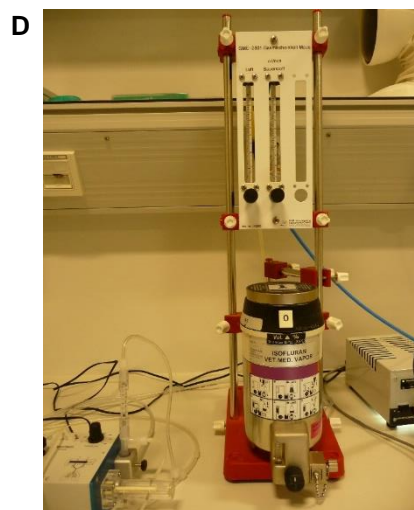
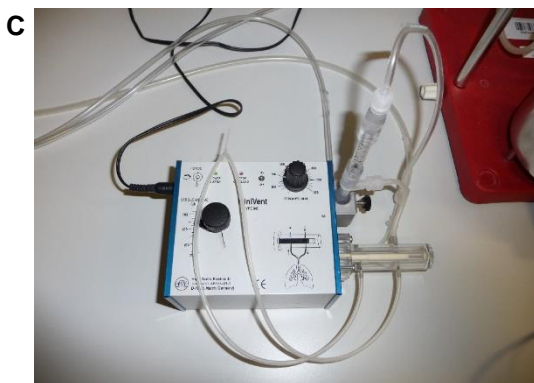
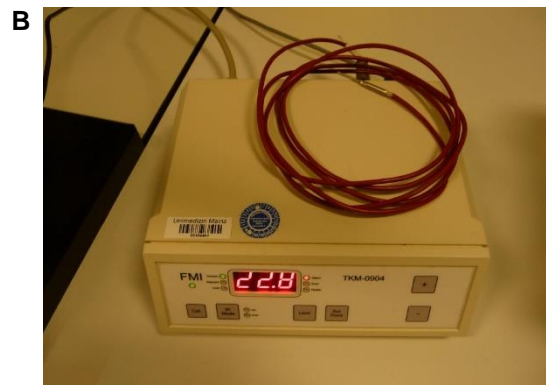
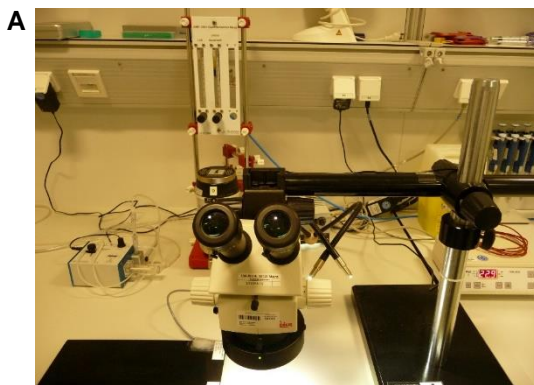
Hybridomzellen (Klon RB6-8C5, in Kooperation mit Markus Radsak, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt) wurden in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sobald ausreichend viele Zellen vorhanden waren (ca. 80-90% Konfluenz), wurde der Flascheninhalt anschließend 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert, um die Zellüberstände von den Zellen zu trennen. Die Effizienz der Antikörperproduktion durch die Hybridomzellen wurde regelmäßig *via* ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) überprüft. Die Zellen wurden so lange kultiviert und die Überstände gesammelt, bis ein Endvolumen von mindestens 3 l erreicht war. Anschließend wurden die Zellüberstände mit Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) präzipitiert und über eine Protein G Säule gereinigt, um den murinen monoklonalen anti-Gr-1 Antikörper zu erhalten. Dieser Antikörper erkennt den Oberflächenrezeptor Gr-1 („granulocyte differentiation antigen-1“) auf myeloiden Zellen, bindet an Ly-6G und Ly-6C und depletiert damit effektiv Gr-1<sup>+</sup> Zellen. Ly-6G wird exklusiv von neutrophilen Granulozyten exprimiert, Ly-6C wird von Neutrophilen, aber auch von Dendritischen Zellen, Subpopulationen von Lymphozyten und Monozyten exprimiert [113].

### 2.2.3 Operative Methoden

#### 2.2.3.1 LAD („left anterior descending coronary artery“) Ligatur

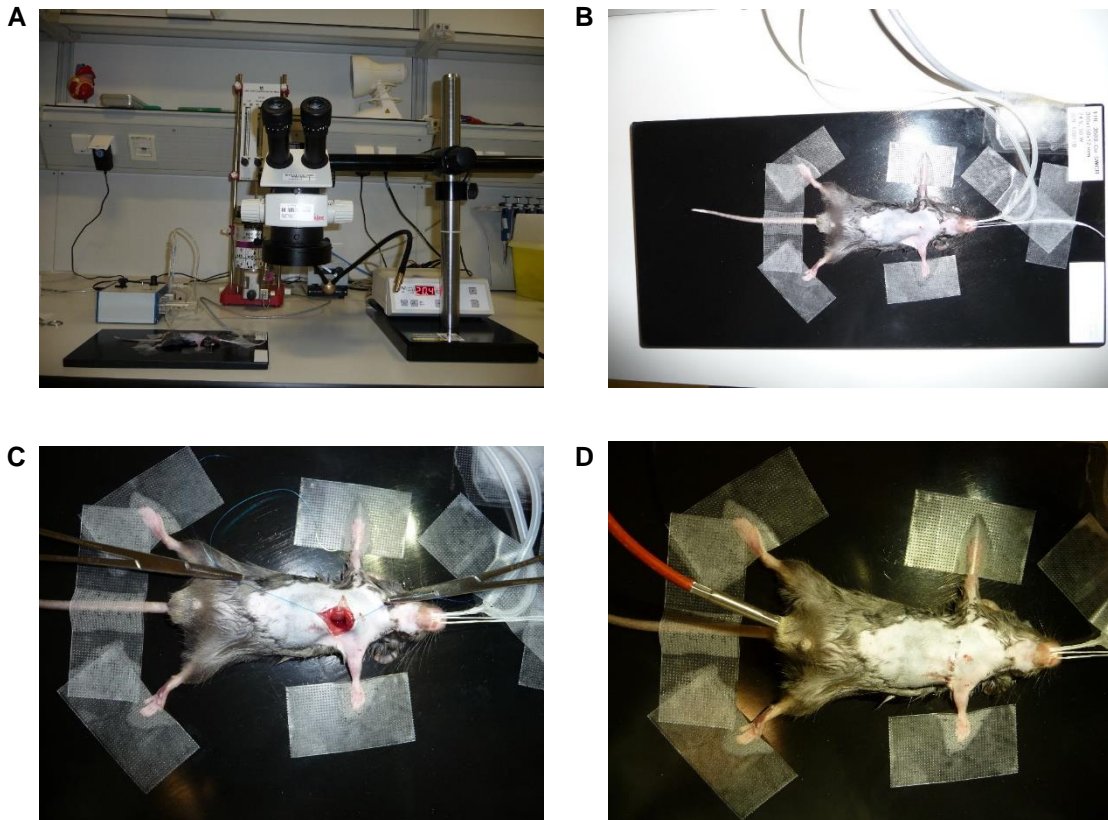
Die Mäuse wurden für die Operation mit einer intraperitonealen Gabe von Midazolam (5,0 mg/kg KG)/ Medetomidin (0,5 mg/kg KG)/ Fentanyl (0,05 mg/kg KG) narkotisiert. Zur Analgesie diente der Opiatagonist Fentanyl, als Sedativum und Muskelrelaxans wurden der  $\alpha$ 2-Adrenorezeptor-Agonist Medetomidin und das Benzodiazepin Midazolam gewählt. Ein Mindestgewicht von 20 g und ein Durchschnittsalter von zwei bis drei Monaten wurden vorausgesetzt. Bei erloschenem Lidreflex wurden die Augen zum Schutz vor Erblindung mit Bepanthen<sup>®</sup> Salbe bedeckt. Nach Erreichen einer entsprechenden Narkosetiefe (fehlender Zwischenzehenreflex) wurden die Mäuse auf einer bei 37° C temperierten Wärmeplatte (Temperatur-Kontrollmodul, Föhr Medical Instruments) in Rückenlage mit Leukofix<sup>®</sup> an den Extremitäten sowie am Schwanz fixiert. Zur Intubation wurde der Kopf des Tieres leicht überstreckt und die oberen Schneidezähne mit Zahnseide ebenfalls an der Wärmeplatte fixiert. Zur künstlichen Beatmung (200  $\mu$ l Strokevolumen, 150 strokes/min) während der Operation wurde ein Tubus (Vasofix<sup>®</sup> safety Braunüle 22G blau) vorsichtig über die Trachea eingeführt und mit einer Respirationsapparatur (Minivent Harvard Typ 845, Hugo Sachs Elektronik) verknüpft. Die Lage des Tubus wurde visuell anhand der Thoraxbewegung kontrolliert.

Nach Enthaarung des Thorax sowie Desinfektion mit octeniderm® wurde links medioclaviculär ein ca. 1 cm großer Hautschnitt gesetzt, die Haut wurde stumpf zur Seite präpariert, anschließend der *M. pectoralis major* und *minor* durchtrennt. Die jeweils obere und untere Rippe vom gewählten Operationsfenster wurden mit einem 6-0 Prolene Faden unterbunden und nach kranial bzw. kaudal gespreizt. Anschließend wurden die Interkostalmuskeln vorsichtig eingeschnitten, mit daraus resultierender Sicht auf Lunge und Herz wurde das Perikard stumpf gelöst. Die LAD liegt bei normaler Anatomie medial lateral des linken Vorhofohres, sie wurde zur permanenten Ligatur mit einem 8-0 Prolene Faden abgebunden. Zur Kontrolle der korrekten Ligatur stehen zwei Methoden zur Verfügung: einerseits verfärbt sich das Myokard aufgrund der Ischämie weiß, andererseits kann man über die intramuskuläre Ableitung eines EKG's (Elektrokardiogramm-Apparatur, Hugo Sachs Elektronik) charakteristische Erregungs-Rückbildungsstörungen (ST-Hebungen) beobachten. Nach Lagekontrolle erfolgte das Zunähen des OP Situs mit einem 6-0 Prolene Faden, insbesondere ist auf eine gute Muskelnaht zu achten (Pneumothorax Gefahr).



**Abbildung 2-4: Versuchsaufbau der Geräte für die SHAM oder LAD Operation**

Folgende Geräte wurden für die Durchführung der SHAM oder LAD Operation verwendet: **A**, Operationsmikroskop (Leica M50 Mikroskop); **B**, Temperatur-Kontrollmodul (Föhr Medical Instruments) und Wärmeplatte; **C**, Respirationsapparat (Minivent Harvard Typ 845, Hugo Sachs Elektronik); **D**, UniVet Porta Tischnarkosegerät mit Isofluranverdampfer (Groppler Medizintechnik).

**Abbildung 2-5: Versuchsaufbau für SHAM oder LAD Operation**

Nach Erreichen der Narkosetiefe wurden die Mäuse auf einer bei 37° C temperierten Wärmeplatte fixiert (**A**). Nach Intubation wurden die Tiere über die Respirationsapparat während der Operation künstlich beatmet (**B**). Das Operationsfenster wurde mit einem 6-0 Prolene Faden unterbunden, aufgespreizt und mit Nadelhaltern fixiert. Nach Einschnitt in die Interkostalmuskeln resultierte die Sicht auf Lunge und Herz. Anschließend wurde das Perikard stumpf gelöst (**C**). Die LAD wurde zur permanenten Ligatur mit einem 8-0 Prolene Faden abgebunden. Abschließend erfolgte das Zunähen des OP Situs mit einem 6-0 Prolene Faden (**D**), die Antagonisierung und die Extubation. SHAM-operierte Tiere wurden mit der gleichen Prozedur außer der LAD Ligatur operiert.

Anschließend wurde die Narkose mittels subkutaner Injektion von  $\alpha 2$ -Adrenorezeptor-Antagonist Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil (0,5 mg/kg KG) sowie Opiatantagonist Naloxon (1,2 mg/kg KG) antagonisiert. Die Extubation erfolgte erst dann, wenn die Maus wieder eine ausreichende Eigenatmung zeigte. Im Anschluss an die Operation erfolgte die subkutane Gabe von Buprenorphin (0,1 mg/kg KG) zur Analgesie. Schein-operierte Tiere (SHAM OP) wurden mit der gleichen Prozedur außer der LAD Ligatur operiert (Abbildung 2-4 und 2-5). Um nach der Operation eine



Unterkühlung zu vermeiden, wurden die Käfige inklusive der operierten Tiere für mindestens eine Stunde vor einer Infrarot-Wärmelampe positioniert. Innerhalb der nächsten 12 bis 24 h nach der Operation wurde der Gesundheitszustand (Verhalten, Aussehen des Fells und Operationsnaht) der Tiere beurteilt und die Tiere unter Umständen erneut mit Buprenorphin (0,1 mg/kg KG, s.c.) behandelt.

### **2.2.3.2 Implantation von EKG Transmittern**

Die Mäuse wurden für die Implantation der EKG Transmitter (TA11ETA-F10, Data Science International, St. Paul, MN, USA) mit einer intraperitonealen Gabe von Midazolam/ Medetomidin/ Fentanyl narkotisiert. Anschließend wurden der abdominale Bereich sowie der thorakale Bereich großzügig enthaart und desinfiziert. Die Mäuse wurden auf einer 37° C temperierten Wärmeplatte (Temperatur-Kontrollmodul, Föhr Medical Instruments) in Rückenlage fixiert. Für die subkutane Implantation wurden drei Hautöffnungen vorgenommen - zwei im abdominalem Bereich und eine im thorakalen Bereich. Nach subkutaner Positionierung des Transmitters sowie in-muskulärer Fixierung der ableitenden Drähte, rechts und links vom Sternum lokalisiert, erfolgte das Zunähen mittels eines 6-0 Prolene Fadens an den zuvor geöffneten Körperstellen. Anschließend wurde die Narkose mittels subkutaner Injektion von Atipamezol und Flumazenil sowie Naloxon antagonisiert. Im Anschluss an die Operation erfolgte die subkutane Gabe von Buprenorphin zur Analgesie.

Die Aktivierung des Transmitters erfolgte nach einwöchiger Rekonvaleszenz und nachfolgender LAD Ligatur/SHAM Operation. Hierzu wurden die Versuchstiere in Einzelkäfighaltung auf Receiver-Plattformen positioniert. Die Elektrokardiogramme wurden in 5-Minuten-Intervallen aufgezeichnet. Unter Verwendung der Software Dataquest A.R.T. (Data Science International) wurden die Daten gespeichert und anschließend ausgewertet.

### **2.2.4 Organentnahme**

Nach der Operation/Behandlung wurden die Tiere entweder an Tag 1, Tag 3, Tag 7 oder nach 4 Wochen mittels Isofluran-Inhalationsanästhesie unter dem Abzug tief narkotisiert. Unter dieser Narkose wurde der Thorax geöffnet und anschließend das Blut durch Herzpunktion (für die FACS-Analyse) entnommen. Die Tiere starben in der Tiefnarkose ohne Wiedererwachen. Anschließend wurden verschiedene Organe (Herz, Milz, Knochenmark) entnommen. Diese wurden für die nachfolgenden physiologischen,

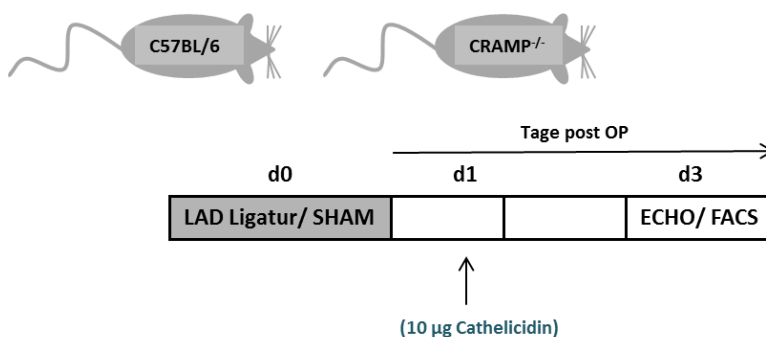
histologischen, molekularbiologischen und proteinchemischen Untersuchungen aufgearbeitet.

### 2.2.5 Isolierung und adaptiver Zelltransfer von neutrophilen Granulozyten oder Monozyten

Gr-1<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von Wildtypieren C57BL/6 und über MACS („magnetic assisted cell sorting“) Positivselektion isoliert. Monozyten wurden hingegen aus dem Herzblut isoliert. Dazu wurden Spendertiere mittels überdosierter Isofluran-Narkose und anschließender Herzblutentnahme geopfert. Die entsprechenden Zellen wurden in unterschiedlichen Verfahren von ungewünschten Zellen separiert, gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Applikation der jeweiligen Zellsuspension erfolgt intravenös über die Schwanzvene des Empfängertieres. Dafür wurde das Versuchstier kurzzeitig in einer Fixiereinheit für Mäuse festgehalten. Der Zelltransfer über die Schwanzvene erfolgt ohne Narkotisierung des Tieres. Zur Rekonstitution der jeweiligen Zellspezies wurden die Versuchstiere ein Tag nach SHAM oder LAD Operation mit  $1 \times 10^6$  bis  $0,5 \times 10^7$  Neutrophilen bzw. Monozyten (in 0,9 % NaCl) behandelt. Kontrolltiere erhielten nur 0,9 %ige NaCl-Lösung.

### 2.2.6 *In vivo* Cathelicidin Applikation

Zur Wiederherstellung der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis *via* Cathelicidin wurde CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren ein Tag nach LAD Ligatur/ SHAM Operation 10 µg synthetisches Cathelicidin Peptid (in gereinigtem H<sub>2</sub>O) i.p. injiziert (Abbildung 2-6).



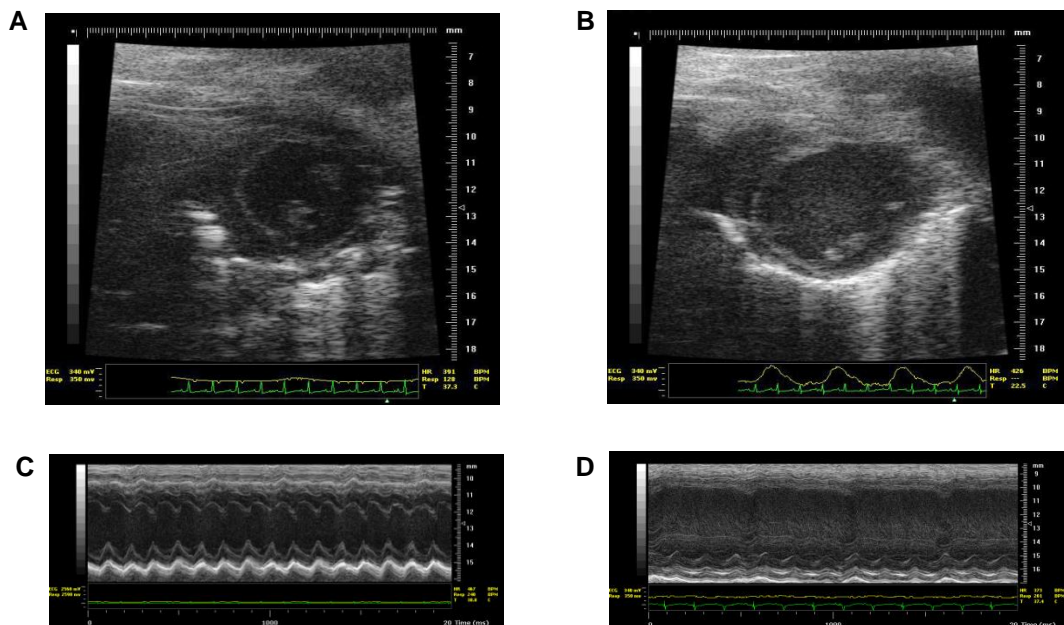
#### Abbildung 2-6: Behandlungsregime Cathelicidin-behandelter CRAMP<sup>-/-</sup> Mäuse

CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren wurde zur Wiederherstellung der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis ein Tag nach LAD Ligatur/SHAM Operation 10 µg synthetisches Cathelicidin Peptid (in gereinigtem H<sub>2</sub>O) i.p. injiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte C57BL/6 Mäuse. Drei Tage nach OP erfolgten die Versuche (ECHO/FACS).

## 2.2.7 Echokardiographie

### 2.2.7.1 Linksventrikuläre Funktion

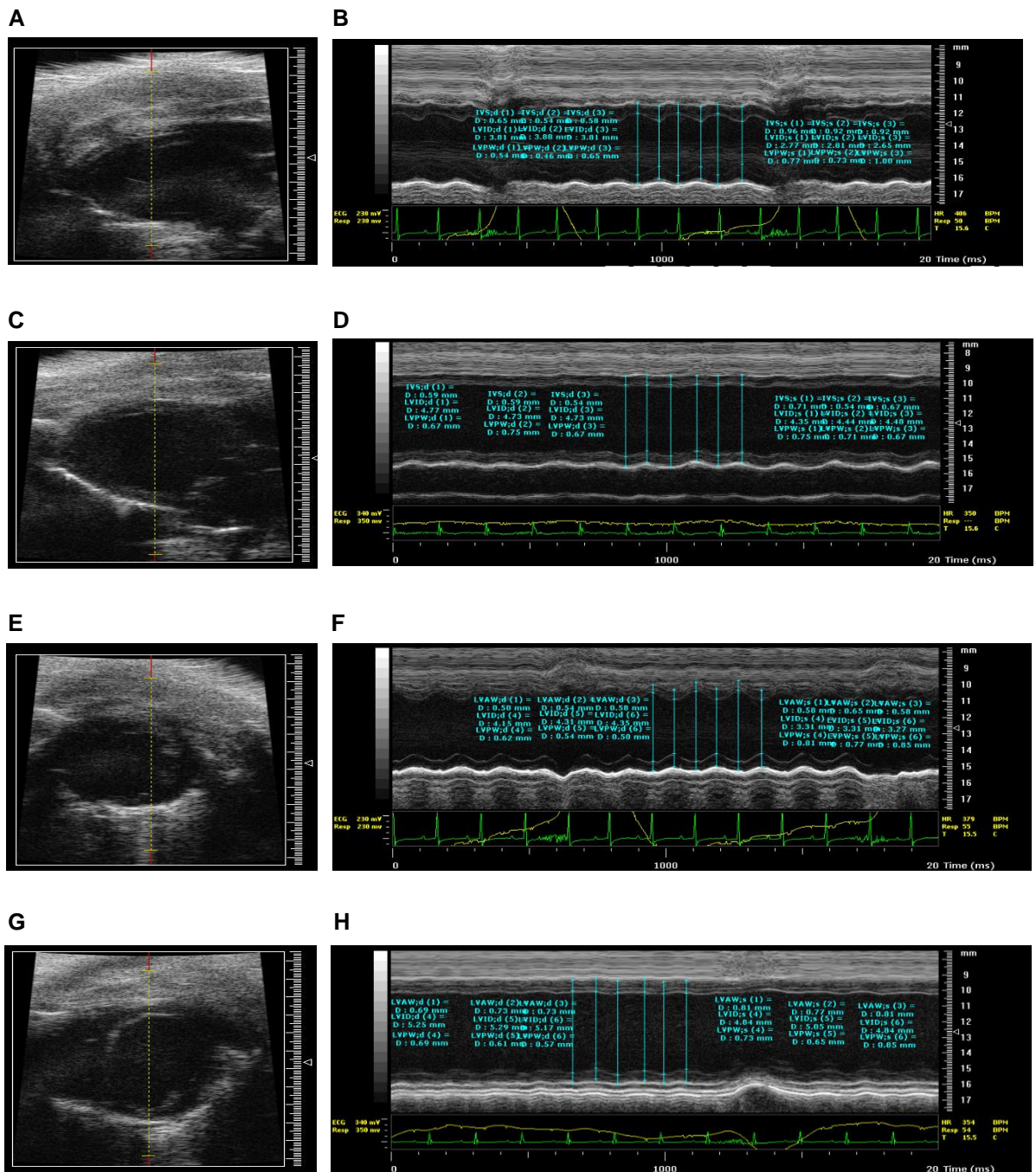
Die Evaluierung funktionaler Herzparameter erfolgte mittels Kleintierultraschallgerät (Vevo 770 System, FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Ontario, Canada) sowie unter Verwendung des RMV707B (15 - 45 MHz) Ultraschallkopfes (FUJIFILM VisualSonics). Echokardiogramme (ECHO) wurden unter Spontanatmung und Kurznarkose akquiriert. Die Versuchstiere wurden auf einem beheizbaren Tisch fixiert und über eine Nasenmaske wurde 1,5 – 2,5 % Isofluran mit 0,4 l/min 100 % Sauerstoff gemischt, zugeführt. Elektrokardiogramm sowie Puls und Körpertemperatur wurden parallel während der ECHO Aufnahme kontrolliert.



#### Abbildung 2-7: Echokardiografische Aufnahmen

Repräsentative echokardiografische Aufnahmen sieben Tage nach SHAM Operation (**A, C**) oder LAD Ligatur (**B, D**). **A und B**, B-mode Aufnahme in der parasternalen Kurzachse (SAX, engl. parasternal short axis). **C und D**, M-mode Aufnahme in der parasternalen Kurzachse.

Zur Beurteilung der linksventrikulären (LV) Herzfunktion wurde die Ejektionsfraktion (EF) anhand von M-mode Bildern, welche an zweidimensionale B-mode Bilder gekoppelt sind, sowohl in der parasternalen Längsachse (PLAX) als auch in der parasternalen Kurzachse (SAX) auf Höhe der Papillarmuskel bestimmt. Für jeden evaluierten Parameter wurden drei aufeinanderfolgende Herzbewegungszyklen ausgemessen und anschließend gemittelt (Abbildung 2-7 und 2-8).



**Abbildung 2-8: Auswertung echokardiografischer Aufnahmen**

Exemplarische Bilder zur echokardiografischen Auswertung und Bestimmung der EF, LV Masse Index und RWT. **A, B, E, F:** Drei Tage nach SHAM Operation; B-mode Aufnahme in der parasternalen Längsachse und Kurzachse; M-mode Aufnahme in der parasternalen Längsachse und Kurzachse. **C, D, G, H:** Drei Tage nach LAD Ligatur; B-mode Aufnahme in der parasternalen Längsachse und Kurzachse; M-mode Aufnahme in der parasternalen Längsachse und Kurzachse.

LVID,d (engl. LV internal diameter, diastole) und LVID,s (engl. LV internal diameter, systole) wurden ausgemessen, um LVEDV (engl. LV end-diastolic volume) und LVESV (engl. LV end-systolic volume) zu bestimmen und anschließend die EF anhand folgender Formeln zu berechnen:

$$\text{LVEDV } (\mu\text{l}) = 7 / (2,4 + \text{LVID,d}) \times \text{LVID,d}^3$$

$$\text{LVESV } (\mu\text{l}) = 7 / (2,4 + \text{LVID,s}) \times \text{LVID,s}^3$$

$$\text{EF } (\%) = ((\text{LVEDV} - \text{LVESV}) / \text{LVEDV}) \times 100$$

Aufgrund kongruenter Ergebnisse bezüglich der EF in der SAX und der PLAX wurde anschließend stets die Darstellung in der PLAX gewählt. Die Ausmessung der LV-Hinterwand (LVPW, engl. LV posterior wall) und LV-Vorderwand (LVAW, engl. LV anterior wall) in der SAX sowie der Septumdicke (IVS, engl. inter ventricular septum) in der PLAX erfolgte ebenfalls anhand von M-mode Aufnahmen. Anschließend konnte der LV Masse Index (engl. LV mass index) und die relative Wanddicke (RWT, engl. relative wall thickness) anhand folgender Formeln bestimmt werden [114-116]:

$$\text{LV Masse (mg)} = 0,8 \times (1,04 \times ((\text{LVID,d} + \text{LVPW,d} + \text{IVS,d})^3 - \text{LVID,d}^3) + 0,6$$

$$\text{LV Masse Index } (\mu\text{l/mg}) = \text{LVEDV} / \text{LV Masse}$$

$$\text{RWT} = (\text{LVPW,d} + \text{IVS,d}) / \text{LVID,d}$$

### 2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, engl. fluorescence-activated cell sorting) dient der Analyse von Zelleigenschaften anhand spezifischen Oberflächenmarker. Das Prinzip nutzt die Emissionsdetektion von Farbstoff-markierten Einzelzellsuspensionen, welche einen Laserstrahl mit entsprechender Wellenlänge passieren und so nach Färbung, Form und Größe sortiert werden. Trifft das Licht des Lasers auf eine mit Fluoreszenzfarbstoff-markierte Zelle werden die Elektronen angeregt und erreichen ein höheres Energielevel. Anschließend kehren sie auf ein niedrigeres Energielevel zurück. Entsprechend des jeweiligen Emissionsspektrums entstehen Fluoreszenzsignale, welche repräsentative Informationen über die analysierte Zellpopulation liefern. Mit Hilfe des Seitwärtsstreulichts (SSC, engl. sideward scatter) kann - über Brechung des Lichts - die Granularität der Zellpopulation beurteilt werden und anhand des Vorwärtsstreulichts (FSC, engl. forward scatter) - mittels der Beugung des Lichts - die Zellgröße.

### 2.2.8.1 Zellaufarbeitungen

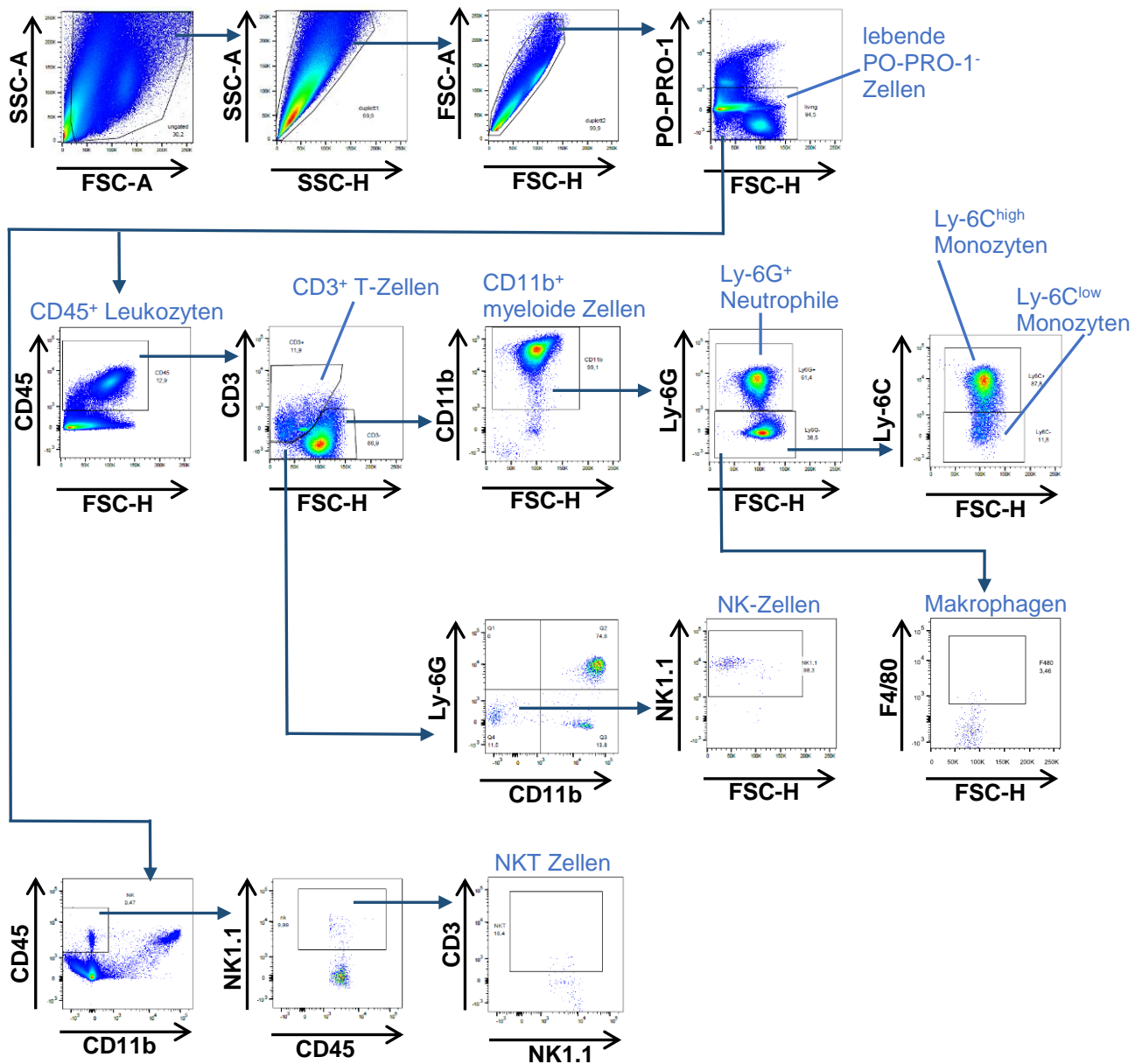
Infarziertes Herzgewebe von LAD-ligierten Mäusen bzw. Herzgewebstücke aus SHAM-operierten Tieren wurden zunächst gewogen, anschließend mechanisch zerkleinert und mit einem Mix aus Collagenase II (1 mg/ml, gelöst in PBS)/ DNase I (50 µg/ml, gelöst in PBS) für 30 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde die Flüssigkeit im Anschluss durch ein Zellsieb (70 µm) gepresst und mit PBS + 2 % FCS gewaschen. Zur Erythrozytenlyse wurde ACK Lysepuffer zugefügt und für maximal 2 min bei 4°C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde erneut PBS + 2 % FCS hinzugefügt bei 300 g, 6 min, 4°C zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 200 µl PBS + 2 % FCS aufgenommen.

Milzen wurden nach Isolierung aus der Maus und Gewichtsbestimmung direkt durch ein Zellsieb (40 µm) gepresst und ebenfalls mit PBS + 2 % FCS gewaschen. Zur Erythrozytenlyse wurde Ammonium-Chlorid-Kalium Puffer zugefügt und für maximal 6 min bei 4°C inkubiert. Das gewaschene Zellpellet wurde in 1 ml PBS + 2 % FCS aufgenommen.

Zur Ermittlung der Zellanzahl wurde eine Referenzprobe mit Trypanblau-Lösung (1:10 in PBS) gefärbt. Nur beschädigte oder nicht-vitale Zellen können diesen Farbstoff aufnehmen und werden dunkelblau angefärbt, vitale Zellen hingegen erscheinen weiß. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.8.2 Zelloberflächenfärbungen für FACS

Unspezifische Bindungen wurden mit einem Fc-Block (CD16/CD32) blockiert. Herz-, Milz-, Knochenmarkseinzelsuspensionen und Blut wurden nach entsprechender Aufarbeitung mit einem Mix aus monoklonalen FACS-Antikörpern gefärbt (15 min, 4°C, dunkel). Alle verwendeten Farbstoff-markierten Antikörper und Zellmarker für die FACS-Analyse sind in Tabelle 6 unter Kapitel 2.1.6 aufgelistet. Maximal 1 Mio. Zellen wurden mit Hilfe des BD FACS Canto II (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) aufgenommen. Lebende Zellen wurden anschließend mit der FlowJo Software (FlowJo Version 5, Treestar; Ashland, Oregon, USA) analysiert.

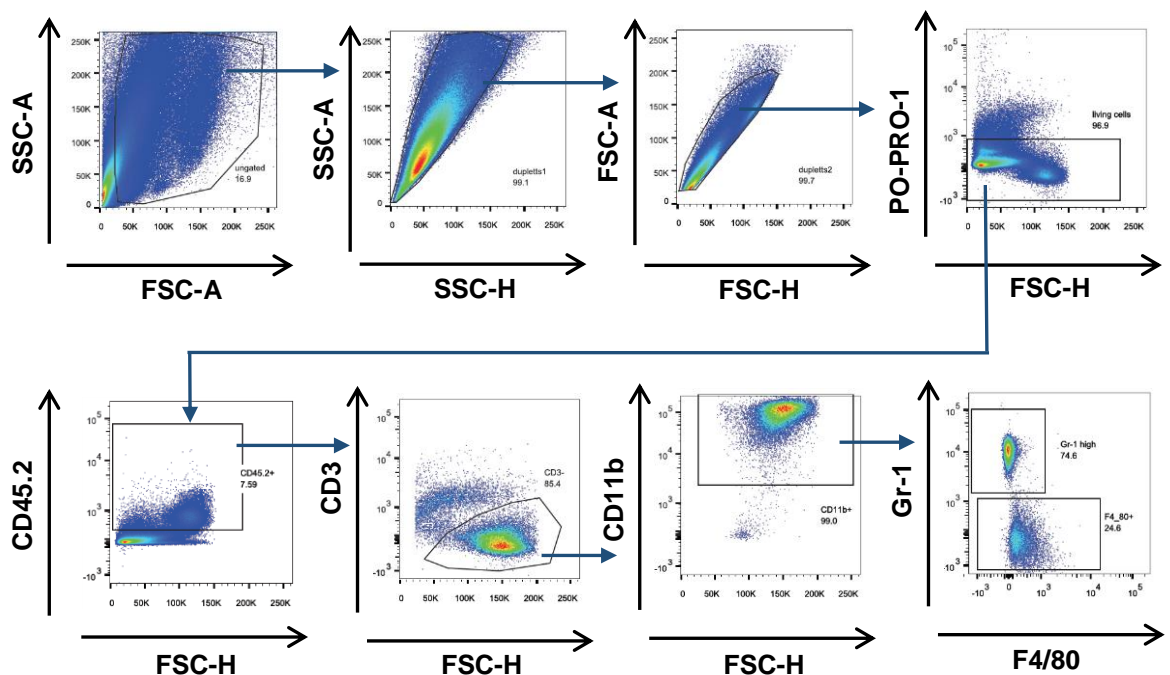


**Abbildung 2-9: FACS „gating“ Strategie von Herzgewebe, Milzgewebe aus C57BL/6, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup>, anti-Gr-1- oder Placebo-behandelten Tieren und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper bzw. Zellmarker gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1 und F4/80 gefärbt. Exemplarische Darstellung der FACS-Plots mit „gating“ Strategie zur Auswertung der Messergebnisse. PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>-</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert. FSC-A, engl. forward scatter-area; FSC-H, engl. forward scatter-height; SSC-A, engl. sideward scatter-area; SSC-H, engl. sideward scatter-height.

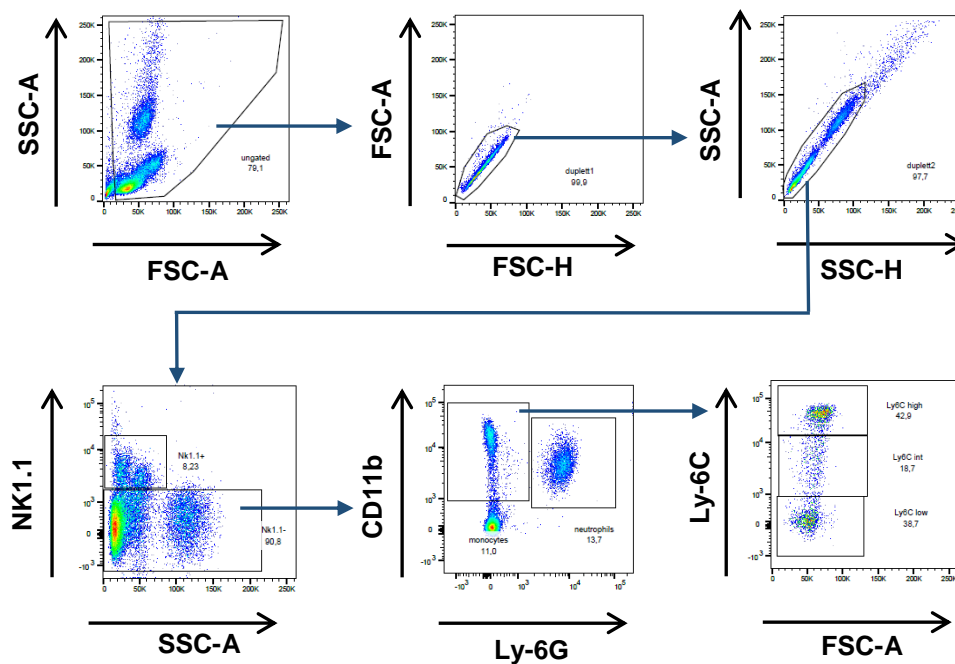
**Tabelle 9: Auflistung der durchflusszytometrisch analysierten Immunzellpopulationen im Herz- und Milzgewebe sowie in venösem Blut anhand der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper oder Zellmarker**

Immunzellpopulation in Herz- und Milzgewebe	Beschreibung
PO-PRO-1 <sup>-</sup>	Lebende Zellen
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup>	Leukozyten
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup>	T-Zellen
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup>	Myeloide Zellen
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>+</sup> oder PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Gr-1 <sup>+</sup>	Neutrophile Granulozyten
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / Ly-6C <sup>high</sup>	Inflammatorische Monozyten
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / Ly-6C <sup>low</sup>	Reparative Monozyten
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / F4/80 <sup>+</sup> oder PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / F4/80 <sup>+</sup>	Makrophagen
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD3 <sup>-</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / CD11b <sup>-</sup> / NK1.1 <sup>+</sup>	NK-Zellen
PO-PRO-1 <sup>-</sup> / CD45 <sup>+</sup> / CD11b <sup>-</sup> / NK1.1 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup>	NKT Zellen
Immunzellpopulation im Blut	Beschreibung
NK1.1 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>+</sup>	Neutrophile Granulozyten
NK1.1 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup>	Monozyten
NK1.1 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / Ly-6C <sup>high</sup>	Inflammatorische Monozyten
NK1.1 <sup>-</sup> / CD11b <sup>+</sup> / Ly-6G <sup>-</sup> / Ly-6C <sup>low</sup>	Reparative Monozyten



**Abbildung 2-10: FACS „gating“ Strategie von Herzgewebe aus LysM und LysM<sup>idTR</sup> Tieren**  
 Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörpern bzw. Zellmarkern gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Gr-1 und F4/80 gefärbt. Exemplarische Darstellung der FACS-Plots mit „gating“ Strategie zur Auswertung der Messergebnisse. PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup> Neutrophile und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen wurden analysiert. FSC-A, engl. forward scatter-area; FSC-H, engl. forward scatter-height; SSC-A, engl. sideward scatter-area; SSC-H, engl. sideward scatter-height.





**Abbildung 2-11: FACS „gating“ Strategie von venösem Blut aus C57BL/6,  $IFN-\gamma^{-/-}$ ,  $TNF-\alpha^{-/-}$ , anti-Gr-1- oder Placebo-behandelten Tieren und CRAMP $^{-/-}$  Tieren**

Venöses Blut wurde mit Antikörper gegen CD11b, NK1.1, Ly-6G und Ly-6C gefärbt und anschließend der prozentuale Anteil an NK1.1 $^{+}$ /CD11b $^{+}$ /Ly-6G $^{+}$ , NK1.1 $^{+}$ /CD11b $^{+}$ /Ly-6G $^{-}$ , NK1.1 $^{+}$ /CD11b $^{+}$ /Ly-6G $^{+}$ /Ly-6C $^{high}$  und Ly-6C $^{low}$  Zellen bestimmt. Exemplarische Darstellung der FACS-Plots mit „gating“ Strategie zur Auswertung der Messergebnisse. FSC-A, engl. forward scatter-area; FSC-H, engl. forward scatter-height; SSC-A, engl. sideward scatter-area; SSC-H, engl. sideward scatter-height.

### 2.2.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und beginnt mit der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA (dsDNA), an welche sich am 5′ – und am 3′ – Ende des zu vervielfältigenden Bereiches spezifische Oligonukleotide (Primer) anlagern („annealing“). Diese Oligonukleotide werden von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase unter Zugabe von freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) verlängert („elongation“). Ein Abbruch der „elongation“ erfolgt erst durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 95°C mit Denaturierung der dsDNA. Bei Anwesenheit freier Oligonukleotide und Abkühlung der Probe auf 40 - 60°C binden sich diese komplementär an die DNA-Stränge. Anschließend wird die Synthese weiterer Doppelstränge wiederholt. Als Polymerase wird meist die thermostabile Taq-DNA-Polymerase mit 5′ - 3′ - Exonukleaseaktivität verwendet.

Die PCR wird als real-time PCR bezeichnet, da die Menge der vervielfältigten RNA-Stränge direkt abgelesen werden kann. Als Detektionsmittel für die Amplifikationsmenge der real-time-Proben werden meist fluoreszierende Moleküle und Sonden benutzt. Diese

sind am Ende von sequenzspezifischen Oligonukleotiden gebunden [117]. Unter qRT-PCR versteht man die quantitative Analyse der mRNA Expression im entsprechenden Gewebe über die Methode der reversen Transkriptase real-time PCR. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme verwendet, das TaqMan™ -System und die SYBRGreen™ -Detektion. Die Detektion der Sequenzen basiert auf der Anregung des jeweilig eingesetzten fluoreszierenden Moleküls durch kurzwelliges Licht, dabei wird höherwelliges Licht abgestrahlt. Diese Abstrahlung wird pro PCR-Zyklus abgelesen und deren Intensität ausgewertet - wobei das gemessene Abstrahlungssignal mit der PCR-Amplifikationsmenge in Abhängigkeit von der ursprünglich vorhandenen Menge an DNA korreliert. Je mehr Amplifikationen, desto höher das Fluoreszenzsignal. Unspezifische Signale können mit Hilfe der Quencher-Methode unterdrückt werden. Dabei wird ein weiteres fluoreszierendes Molekül in räumlicher Nähe zu dem abstrahlenden Molekül an das andere Ende der Oligonukleotidproben angefügt. Dies gewährleistet, dass nach Anregung des Detektionsmoleküls und dem Transfer auf das Quencher-Molekül und anschließender Abtrennung von diesem, die spezifische Fluoreszenz gemessen werden kann. Die hier verwendeten TaqMan™ -Sonden sind mit einem Fluoreszenz-Reporter-Molekül (FAM, 6-Carboxy-Fluorescein) sowie mit einem Quencher-Molekül (TAMRA, 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) gekoppelt und binden an die spezifischen Oligonukleotidsequenzen der Probe. SYBRGreen™ hingegen ist ein nicht-gekoppelter fluoreszierender Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet.

### **2.2.9.1 RNA Isolierung aus murinem Herzgewebe**

Zur Isolierung der RNA aus Herzgewebe mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die Proben zuerst in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend mindestens 24 h bei -80°C gelagert. Zum Zellaufschluss und -lyse wurde anschließend das gefrorene Gewebe unter Vermeidung von Auftauen, in 600 µl Git-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und mit Hilfe des TissueLyser II und 5 mm „stainless steel beads“ (Qiagen, Hilden, Deutschland), bei einer Frequenz von 40 Schläge/Sekunde für 5 min mechanisch zerkleinert und für mindestens 24 h bei -20°C inkubiert. Der verwendete Git-Puffer enthielt das proteindenaturierende Reagenz Guanidiniumisothiocyanat. Anschließend wurden 0,1 Vol 2 M Natriumacetat zur Absenkung des pH-Wertes im Lysat sowie 1,0 Vol wassergesättigtes Phenol hinzugefügt und gevortext. Danach wurde 0,5 Vol Chloroform/Isomylalkohol hinzugefügt. Es erfolgte erneutes Vortexen und eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Im nächsten Schritt sollte durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) und aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften von DNA,

RNA und Proteinen eine Phasentrennung der Probe erreicht werden. Die unterste Phase enthielt Proteine, die mittlere Phase enthielt DNA und die oberste wässrige Phase RNA. Diese oberste Phasenschicht mit RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1,0 Vol eiskaltes Isopropanol hinzugefügt, vermischt und anschließend mindestens 60 min bei -20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, das RNA-Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgekippt, das Reaktionsgefäß umgedreht und auf Zellstoffpapier 5 min getrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration sowie die Reinheit der Probe bestimmt. Bei -80°C konnte die RNA bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### **2.2.9.2 RNA Konzentrationsbestimmung**

Mittels UV-Vis-Spektrophotometer (Nano Drop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) erfolgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der vorher isolierten RNA Proben, bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. 1 µl unverdünnte Probe wurde für die Messung eingesetzt. Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen und von Phenolen. Anhand des Quotienten aus OD (optischer Dichte) 260/ OD 280 kann die Reinheit der RNA Probe bestimmt werden. Dieser sollte stets zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA Konzentration wurde mittels folgender Formel bestimmt:

Konzentration der RNA [ng/µl] = OD 260 x Verdünnung x 40.

### **2.2.9.3 Durchführung qRT-PCR**

#### **2.2.9.3.1 Expressionsanalyse**

Die mRNA Expression wurde mittels TaqMan™ RT-PCR (one-step quantitative Real-Time reverse Transkriptase PCR) oder SYBRGreen™ RT-PCR analysiert. 0,05 µg der Gesamt-RNA wurde für die qRT-PCR eingesetzt. Für den TaqMan™ RT-PCR Mastermix Ansatz wurde das QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet, welches eine HotStarTaq DNA Polymerase enthält. Alle verwendeten qRT-PCR Primer und Sonden für die mRNA Expressionsanalyse stammen von TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) und sind in Tabelle 7 im

Kapitel 2.1.7 aufgelistet. Für die SYBRGreen™ RT-PCR wurde 0,05 µg der Gesamt-RNA vorab mittels High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Es wurden immer Zweifachbestimmungen durchgeführt und folgende Mastermix Ansätze für die qRT-PCR verwendet:

**TaqMan™ RT-PCR Mastermix Ansatz (Volumen/well):**

QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	12,5 µl
RNase-freies Wasser	8,5 µl
Primer	1,25 µl
QuantiTect Probe RT Mix	0,25 µl
Probe (RNA)	2,5 µl

**SYBRGreen™ RT-PCR Mastermix Ansatz (Volumen/well):**

SYBRGreen Master Mix	10 µl
RNase-freies Wasser	4 µl
Forward Primer	2 µl
Reverse Primer	2 µl
Probe (cDNA)	2 µl

Nach Versiegelung der PCR-Platte mit einer transparenten Folie für optische Messungen wurde die qRT-PCR mit dem CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad, München, Deutschland) unter Verwendung folgender PCR-Zyklen durchgeführt:

**TaqMan™ RT-PCR Protokoll:**

1. 50°C für 30 min
  2. 95°C für 15 min
  3. 94°C für 15 s
  4. 60°C für 1 min  
+ Platte lesen
  5. gehe zu 3., 55 Wiederholungen
- ENDE

**SYBRGreen™ RT-PCR Protokoll:**

1. 95°C für 3 min
2. 95°C für 15 s
3. 60°C für 1 min

4. 72°C für 10 s  
+ Platte lesen
  5. gehe zu 2., 50 Wiederholungen
  6. Schmelzkurve 75 bis 95°C, Erhöhung um 0,2°C, 10 s  
+ Platte lesen
- ENDE

#### 2.2.9.3.2 Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse

Zur Quantifizierung der mRNA Expressionsunterschiede ist eine Normalisierung nötig. Als Referenzgen für die Normalisierung der Zielgenexpression diente das „house keeping gene“ TBP („TATA-box binding protein“). Die gemessenen Ct-Werte („Cycle threshold“) des Zielgens wurden ins Verhältnis zu den Ct-Werten des Referenzgens gesetzt. Die relative mRNA Quantifizierung erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode unter Verwendung folgender Formeln [118]:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Zielgen}) - \Delta\text{Ct} (\text{Referenzgen})$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

Anhand dieser Methode konnten die Expressionsunterschiede bei behandelten bzw. bei Knock-out Tieren im Vergleich zur Standardprobe (Kontrolle) quantifiziert werden. Die kardialen mRNA Expressionsergebnisse wurden normalisiert auf das Referenzgen sowie bezogen auf die Kontrolle in Prozent dargestellt - die Expression der Kontrolle wurde bei Berechnung der relativen Expression stets auf 100% gesetzt.

#### 2.2.10 Histologie

In Paraffin eingebettete murine Herzen wurden mit Hämatoxylin (blauviolette Färbung basophiler Strukturen, wie Nukleus, DNA und Ribosomen) und Eosin (rötliche Färbung azidophiler Strukturen, wie Zytoplasmaproteine, Mitochondrien und Kollagen) gefärbt, um einen Überblick über die Gewebestrukturen zu gewinnen. Zur Beurteilung von fibrotischen Veränderungen im Herzgewebe wurde die Siriusrot-Färbung (rötliche Färbung des Kollagens) oder die Masson-Trichrom-Färbung (blaugrüne Färbung des Kollagens) verwendet. Die Einbettung und Färbung der Proben erfolgte in der Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz.

Die histologischen Ergebnisse wurden anschließend bei 10-facher Vergrößerung mittels Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) fotografiert. Unter Verwendung der Image ProPlus Software (Version 7.0, Media Cybernetics, Inc.) erfolgte die Quantifizierung des Kollagengehaltes anhand der Siriusrot-Färbung - kalkuliert in Prozent pro Herzareal bezogen auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels (% per Area/ Total).

### **2.2.11 Statistik**

Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM, engl. standard error of the mean) dargestellt. Statistische Auswertungen und grafische Darstellungen der Ergebnisse erfolgten mittels der Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten wurde der D'Agostino und Pearson Test gewählt. Aufgrund des Versuchsaufbaus, Anzahl der Gruppen sowie der Ergebnisse bezüglich der Normalverteilung der Daten wurde ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's multiple comparison Test oder eine One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's multiple comparison Test bzw. eine Two-way ANOVA durchgeführt. N gibt stets die Anzahl der Tiere pro Gruppe wieder. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Sternen (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; ns, nicht signifikant) markiert.

### 3 ERGEBNISSE

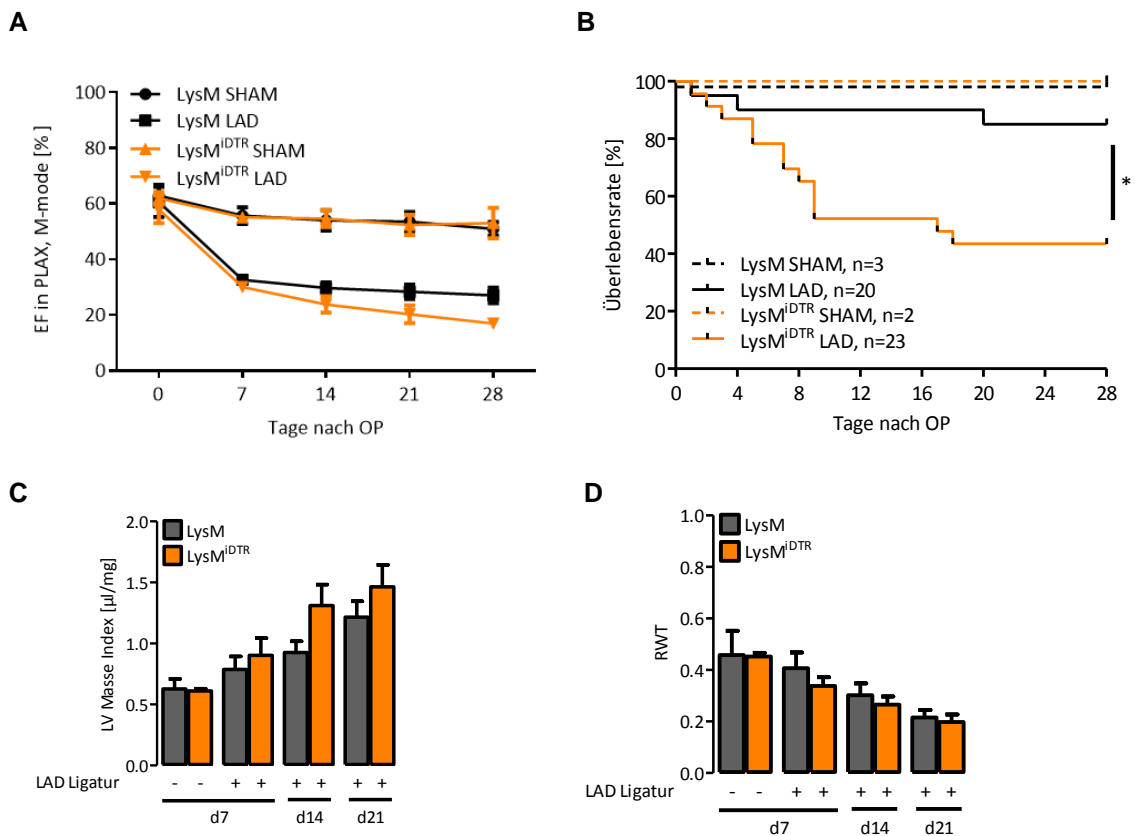
#### 3.1 Die Rolle von LysM<sup>+</sup> myelomonocytyären Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes

Im Rahmen dieser Arbeit sollte - *via* DTX-mediierter Ablation LysM<sup>+</sup> myelomonocytyären Zellen - der Einfluss dieser Zellen auf die Pathogenese und Heilung des Myokardinfarktes untersucht werden. Die Depletion wurde drei Tage vor Operation bei LysM<sup>IDTR</sup> Tieren gestartet. Als Kontrolltiere dienten LysM Mäuse (siehe Depletionsregime unter Kapitel 2.2.1.4.1, Abbildung 2-1). Nach der Depletionsbehandlung wurde entweder der Myokardinfarkt mittels permanenter Ligatur der LAD ausgelöst oder eine SHAM Operation durchgeführt.

##### 3.1.1 LysM<sup>+</sup> Zelldepletion führt zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate und signifikant vermehrten Fibrosebildung nach Myokardinfarkt

Zur Untersuchung der Mortalitätsrate und der Überprüfung der kardialen Funktion wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Zusätzlich wurde am Tag 0 vor Operation sowie an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach Operation (OP) ein Hochfrequenzultraschall des Herzens an operierten Tieren durchgeführt und relevante Parameter (Ejektionsfraktion, LV Masse Index, relative Wanddicke) berechnet. Die mittlere basale Ejektionsfraktion am Tag 0 vor OP betrug bei LysM Tieren  $61,8 \pm 3,1$  % und bei LysM<sup>IDTR</sup> Tieren  $60 \pm 2,6$  % (Abbildung 3-1, A). Die Induktion des Myokardinfarktes führte zu einer Abnahme der Ejektionsfraktion ab Tag 7 nach OP sowohl in der LysM Kontrollgruppe ( $32,6 \pm 1,4$  %) als auch in der depletierten LysM<sup>IDTR</sup> Gruppe ( $30,0 \pm 1,9$  %) im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren (Anhang Tabelle 1; LysM SHAM,  $55,7 \pm 3,0$  %; LysM<sup>IDTR</sup> SHAM,  $55,1 \pm 1,5$  %).

Innerhalb 28 Tage nach OP ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der LysM LAD Gruppe und der LysM<sup>IDTR</sup> LAD Gruppe in Bezug auf die Herzfunktionsparameter feststellen. Die gemessene Ejektionsfraktion war jedoch ab Tag 14 bei LAD-ligierten LysM<sup>IDTR</sup> Tieren marginal schlechter (d14,  $23,8 \pm 2,9$  %; d28,  $17,0 \pm 1,4$  %) als bei LAD-ligierten LysM Tieren (d14,  $29,7 \pm 2,1$  %; d28,  $27 \pm 2,8$  %).

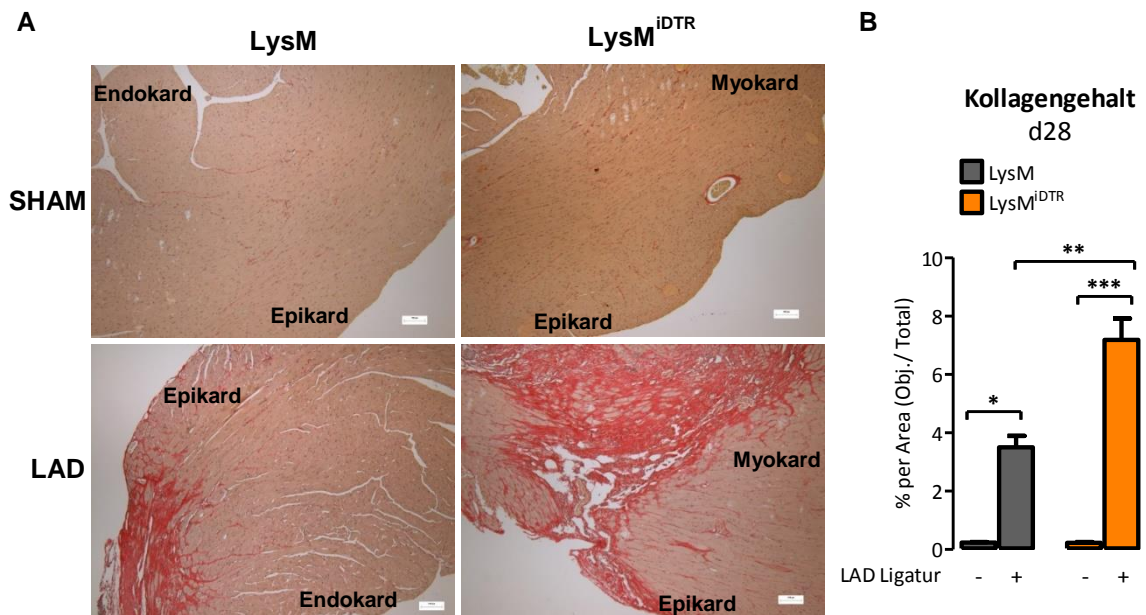


**Abbildung 3-1: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren**

**A**, Grafische Darstellung der Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX) in der M-mode Darstellung; Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-19 Tiere; Two-way ANOVA; nicht signifikant (ns). **B**, Überlebensrate in Prozent; n=2-23; Log-rank (Mantel-Cox) Test; \*,  $p < 0,05$ . **C**, Linksventrikulärer (LV) Masse Index ( $\mu\text{l}/\text{mg}$ ) an Tag 7 (d7) nach SHAM Operation (-) oder an d7, Tag 14 (d14) und Tag 21 (d21) nach LAD Ligatur (+) von LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-8 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns. **D**, Relative Wanddicke des linken Ventrikels („relative wall thickness“, RWT); Mittelwert  $\pm$  SEM; n=4-8 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test.

Weiterhin nahmen ab Tag 7 bei LAD-ligierten LysM<sup>iDTR</sup> sowohl der mittlere LV Masse Index - als Maß für „cardiac remodeling“ - marginal zu (Abbildung 3-1, C; d7,  $0,8 \pm 0,1 \mu\text{l}/\text{mg}$  vs.  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{l}/\text{mg}$ ; d21,  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{l}/\text{mg}$  vs.  $1,5 \pm 0,2 \mu\text{l}/\text{mg}$ ) sowie die relative Wanddicke des linken Ventrikels (RWT) im Vergleich zu LAD-ligierten LysM Tieren marginal ab (Abbildung 3-1, D). Die Überlebensrate in der LysM<sup>iDTR</sup> LAD Gruppe lag nach 28 Tagen bei 52 % und war signifikant schlechter als in der LysM LAD Gruppe mit 90 % Überlebenswahrscheinlichkeit. SHAM-operierte Tiere überlebten zu 100 % (Abbildung 3-1, B). Die vermehrte Bildung von Bindegewebe, hauptsächlich Kollagenfaser, ist ein erstes Anzeichen für die Entstehung von Fibrose nach Myokardinfarkt. Die Fibrosierung führt wiederum zu narbigen sowie strukturellen Veränderungen (Herzgröße, -masse, -form) von infarziertem, aber auch von umliegendem, gesundem Gewebe. Dieser Prozess resultiert schließlich in einer Funktionsstörung des Herzgewebes sowie des gesamten Organs.



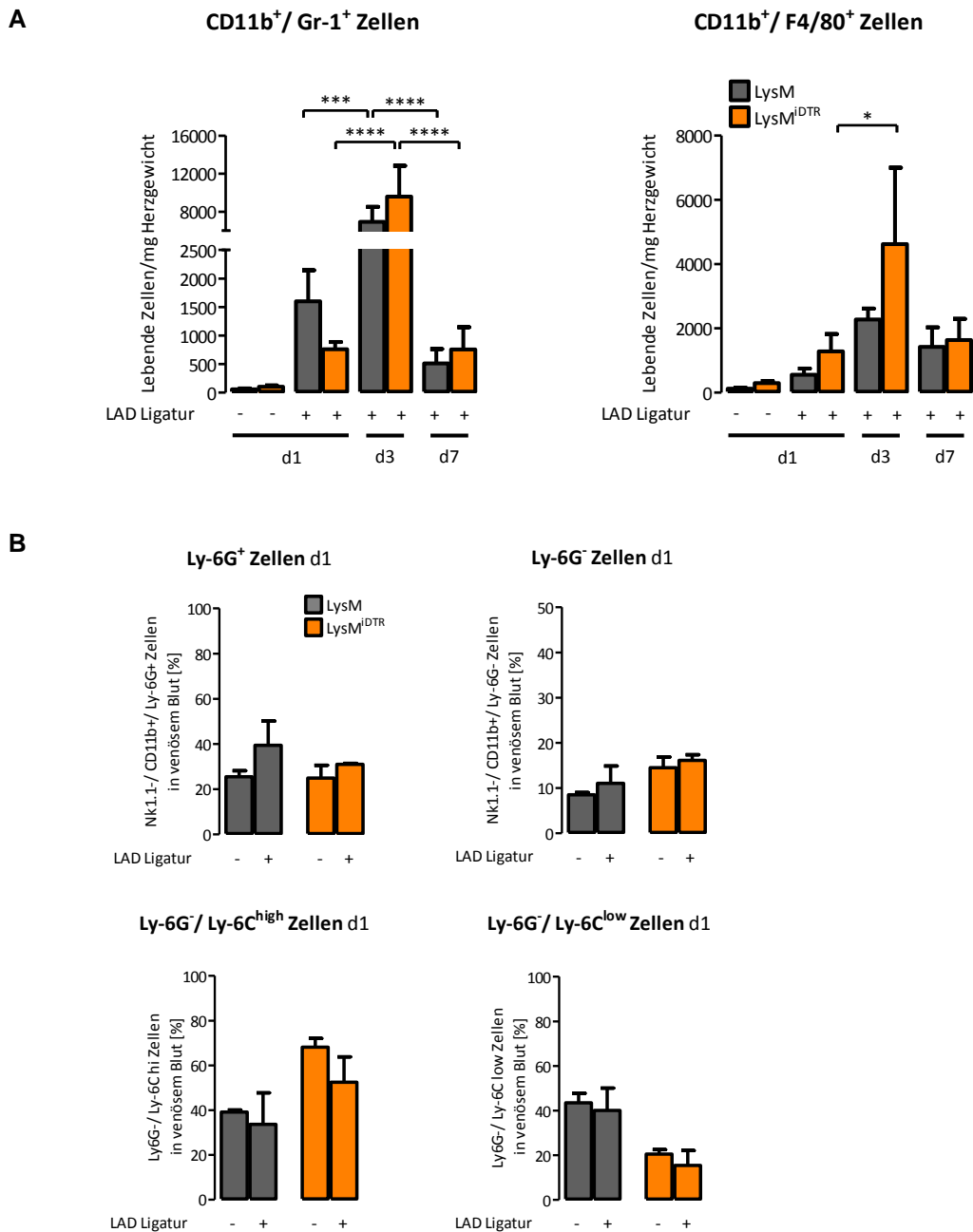


**Abbildung 3-2: Sirius Rot Färbung von Herzparaffinschnitten bei LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren**  
**A**, Sirius Rot Färbung von Herzparaffinschnitten an Tag 28 (d28) nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+); 10-fach Vergrößerung. **B**, Kollagengehalt, kalkuliert in Prozent pro Herzareal bezogen auf Gesamtfläche des linken Ventrikels (% per Area/ Total); Mittelwert ± SEM; n=2-4 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Der fibrotische Umbau des Herzgewebes wird als „cardiac remodeling“ bezeichnet. Abbildung 3-2 zeigt die Fibrosebildung im Herzgewebe 28 Tage nach OP anhand der Sirius Rot Färbung. Der mittlere, prozentuale Kollagenanteil bezogen auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels wurde als Marker für die Fibrosebildung kalkuliert. Bei SHAM-operierten Tieren ließ sich kaum fibrotisches Herzgewebe nachweisen (LysM SHAM, 0,2 ± 0,01 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> SHAM, 0,2 ± 0,03 %). Der Kollagengehalt war jedoch im infarzierten Herz von LysM-depletierten LysM<sup>iDTR</sup> Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu infarzierten LysM Kontrolltieren (Abbildung 3-2, B; LysM LAD, 3,5 ± 0,4 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 7,2 ± 0,7 %).

### 3.1.2 Verminderter Gr-1<sup>+</sup> Zellinflux bei LysM<sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt

Im nächsten Schritt wurde *via* durchflusszytometrischer Analyse untersucht, ob die spezifische Zelldepletion die Infiltration von myelomonocytierten Inflammationszellen ins infarzierte Herzgewebe beeinflusst. Einzelzellsuspensionen aus enzymatisch aufgearbeitetem Herzgewebe wurden hierfür hergestellt und unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Gr-1 und F4/80 für die Zellfärbung (siehe „gating“ Strategie unter Kapitel 2.2.8.2) an Tag 1, 3 und 7 nach OP analysiert.



**Abbildung 3-3: Durchflusszytometrische Analyse der myelomonozytären Zellinfiltration bei LysM und LysM<sup>IDTR</sup> Tieren**

Durch Collagenase II/ DNase I Verdau hergestellte Einzelzellsuspensionen des Herzgewebes wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Gr-1 und F4/80 gefärbt. PO-PRO-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> Neutrophile und PO-PRO-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> Makrophagen wurden analysiert und die Zellanzahl wurde auf das Herzgewicht normiert. Venöses Blut wurde mit Antikörper gegen CD11b, NK1.1, Ly-6G und Ly-6C gefärbt und anschließend der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **A**, Grafische Darstellung der FACS Analyse von Herzgewebe an Tag 1 (d1) nach SHAM Operation (-) oder an d1, Tag 3 (d3), Tag 7 (d7) nach LAD Ligatur (+) von LysM (grau) und LysM<sup>IDTR</sup> Tieren (orange); Mittelwert ± SEM; n=4-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*, p<0,05. **B**, Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d1 nach Operation; Mittelwert ± SEM; n=2 Tiere.

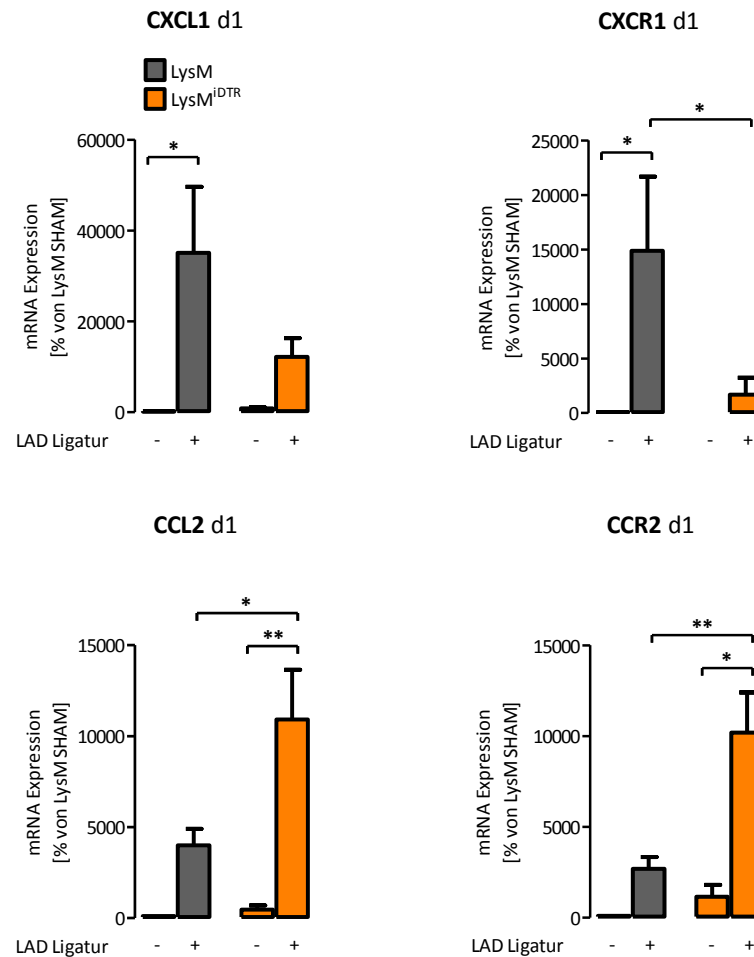
Eine erhöhte myelomonozytäre Zellinfiltration in das infarzierte Herzgewebe konnte ab Tag 1 nach OP detektiert werden. Die Anzahl an lebenden PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen pro mg Herzgewicht stieg tendenziell bis Tag 3 und nahm anschließend bis Tag 7 nach OP sowohl in der LysM LAD Gruppe als auch in der LysM<sup>iDTR</sup> LAD Gruppe wieder ab. Es konnten an Tag 3 nach OP deutlich mehr CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup> Neutrophile im Infarktgewebe von LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren als an Tag 1 oder an Tag 7 nach OP nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 2; Abbildung 3-3, A). Bei LysM<sup>iDTR</sup> Mäusen stieg zusätzlich die Anzahl an CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1. Es konnten an allen untersuchten Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Jedoch wanderten tendenziell weniger CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup> Neutrophile einen Tag nach LAD Ligatur ins infarzierte Herzgewebe von LysM<sup>iDTR</sup> Tieren ein als bei LysM Kontrolltieren (Abbildung 3-3, A; LysM LAD, 1602 ± 542 Zellen vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 760 ± 128 Zellen) - eine tendenziell effektivere Ablation an Ly-6G<sup>+</sup> Zellen war auch im Blut an Tag 1 erkennbar (Abbildung 3-3, B). CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen wanderten marginal vermehrt ein (Abbildung 3-3, B; LysM LAD, 557 ± 190 Zellen vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 1281 ± 540 Zellen).

### **3.1.3 Verminderte IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ Expression bei LysM<sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt**

Es ist bekannt, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer ausgeprägten inflammatorischen Antwort im Herzgewebe kommt. Diese führt neben einer verstärkten Emigration von Entzündungszellen und Chemotaxis auch zur erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Zusätzlich zur FACS Analyse wurden mRNA Expressionsanalysen *via* real-time PCR von korrespondierenden Chemokinen und an der Chemotaxis beteiligter Zellrezeptoren an Tag 1 nach OP sowie von wichtigen Zytokinen an Tag 1 und Tag 7 nach OP durchgeführt. In Abbildung 3-4 ist die kardiale mRNA Expression der Chemokine CXCL1, CCL2 sowie der Chemokinrezeptoren CXCR1, CCR2 in Prozent im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Expression der Kontrolle, LysM SHAM, wurde dabei stets auf 100% gesetzt. CXCL1 wird von Monozyten/Makrophagen sowie von Endothelzellen und Fibroblasten freigesetzt und ist bedeutend für die Neutrophilenchemotaxis und -aktivierung. Der Rezeptor CXCR1 stellt ein integrales Membranprotein auf neutrophilen Zellen dar. Er bindet an das Chemokin IL-8, welches ebenfalls für die Neutrophilenchemotaxis spezifisch ist [8].

Assoziiert mit der Induktion des Myokardinfarktes stieg das mittlere Expressionslevel von CXCL1 und CXCR1 bei LysM Tieren ein Tag nach OP im Vergleich zu SHAM-operierten

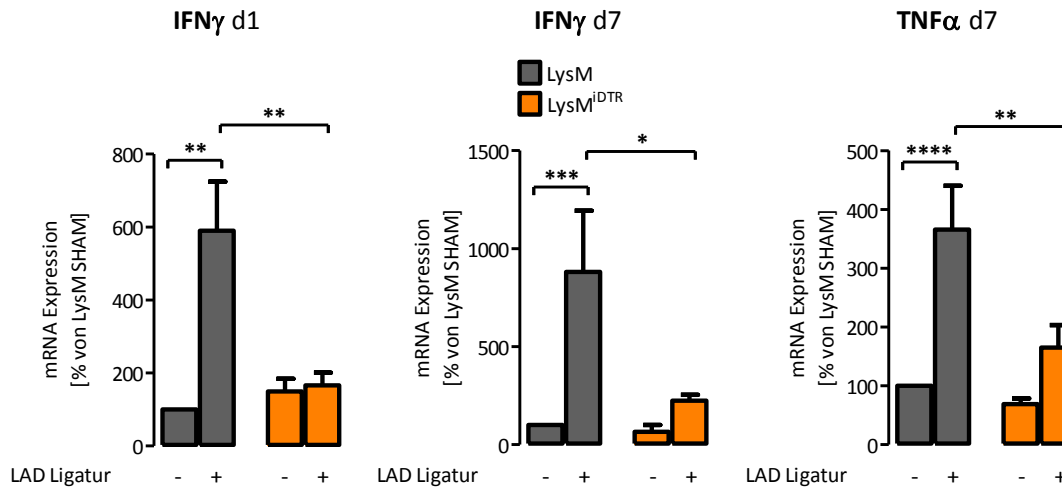
Tieren (Abbildung 3-4; CXCL1, 100,0 % vs. 35077,0 ± 14571,0 %; CXCR1, 100,0 % vs. 14879,0 ± 6796,0 %). Innerhalb der LysM<sup>DTR</sup> Gruppe war kein Unterschied bezüglich der CXCL1 und CXCR1 mRNA Expression detektierbar.



#### Abbildung 3-4: Chemokin mRNA Expressionsanalyse bei LysM und LysM<sup>DTR</sup> Tieren

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse der Chemokine CXCL1, CXCR1, CCL2, CCR2 aus Herzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+) von LysM (grau) und LysM<sup>DTR</sup> Tieren (orange); mRNA Expression ist dargestellt als % der Kontrolle (LysM SHAM); Mittelwert ± SEM; n=2-6 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass im Herzinfarktareal von LysM<sup>DTR</sup> Tieren der Chemokinrezeptor CXCR1 signifikant herunterreguliert war im Vergleich zu LysM Tieren (Abbildung 3-4; LysM LAD, 14879,0 ± 6796,0 % vs. LysM<sup>DTR</sup> LAD, 1702,0 ± 1539,0 %). Das Chemokin CCL2 (MCP-1) bindet an CCR2, wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen erzeugt und dient der Aktivierung von Makrophagen [8].



**Abbildung 3-5: IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mRNA Expressionsanalyse bei LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren**  
 Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse des Zytokins IFN- $\gamma$  aus Herzgewebe an d1 und d7 nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+) von LysM (grau) und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren (orange), sowie TNF- $\alpha$  aus Herzgewebe an d7 nach SHAM Operation oder LAD Ligatur von LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-8 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Die LysM<sup>+</sup> Zelldepletion führte zu einem Expressionsanstieg von CCL2 (Abbildung 3-4; LysM LAD, 3989,0  $\pm$  910,9 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 10915,0  $\pm$  2735,0 %), wichtig für die Monozytenchemotaxis, sowie zum Anstieg des CCR2-Expressionslevels bei LAD-ligierten LysM<sup>iDTR</sup> Tieren (LysM LAD, 2693,0  $\pm$  646,7 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 10181,0  $\pm$  2223,0 %).

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von Chemokinen und Rezeptoren, welche für Neutrophilen- und Monozyten/Makrophagen-Chemotaxis entscheidend sind, korrelierten mit den Zellinfiltrationsanalysen. Die Herunterregulierung der Neutrophilen-Chemotaxis führte zu einer verminderten Einwanderung von Gr-1<sup>+</sup> Zellen im Herzen und die verstärkte Monozyten-Chemotaxis reflektierte wiederum eine erhöhte Makrophagenrekrutierung im infarzierten Herzen von LysM<sup>iDTR</sup> Tieren.

Im Zusammenhang mit Inflammations- und Heilungsprozessen nach Myokardinfarkt wurde die Expression von wichtigen Mediatoren überprüft. IFN- $\gamma$  ist hierbei ein proinflammatorisches Zytokin. Es wird von T-Zellen und NK-Zellen produziert und dient der Aktivierung von Makrophagen. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  sind ebenso proinflammatorische Zytokine und werden von aktivierten Makrophagen sezerniert. TNF- $\alpha$  wird ebenfalls von Lymphozyten, wie T-Zellen und NK-Zellen, aber auch von Neutrophilen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen produziert. IL-1 $\beta$  und IL-6 aktivieren wiederum Lymphozyten. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sind zudem Aktivatoren von Endothelzellen. MMP2 und MMP9 sind Matrixmetalloproteasen, welche extrazelluläre Matrix abbauen und vorwiegend von infiltrierenden Leukozyten während der ersten Tage nach MI

sezerniert werden. Der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ , engl. transforming growth factor-beta) ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches wichtig für die Kollagensynthese ist, von Makrophagen sezerniert werden kann und Zielzellen zu einem antiinflammatorischen, reparativen Phänotyp polarisiert. VEGF-A („vascular endothelial growth factor A“) ist ein Signalprotein, es stimuliert die Angiogenese [8]. LAD-ligierte und LysM<sup>+</sup> Zell-depletierte LysM<sup>iDTR</sup> Tiere wiesen signifikant reduzierte IFN- $\gamma$  Expressionslevel bereits einen Tag nach OP im Vergleich zu LAD-ligierten LysM Tieren auf (Abbildung 3-5; LysM LAD, 590,0  $\pm$  134,3 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 166,1  $\pm$  34,5 %). Eine verminderte kardiale mRNA Expression von IFN- $\gamma$  (Abbildung 3-5; LysM LAD, 880,7  $\pm$  312,9 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 224,7  $\pm$  29,6 %) und TNF- $\alpha$  (LysM LAD, 365,8  $\pm$  74,3 % vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, 165,3  $\pm$  38,0 %) bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren war auch sieben Tage nach OP nachweisbar. Die Überprüfung der Expressionslevel von MMP2, MMP9, IL-1 $\beta$ , IL-6, sowie TGF- $\beta$  und VEGF-A zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

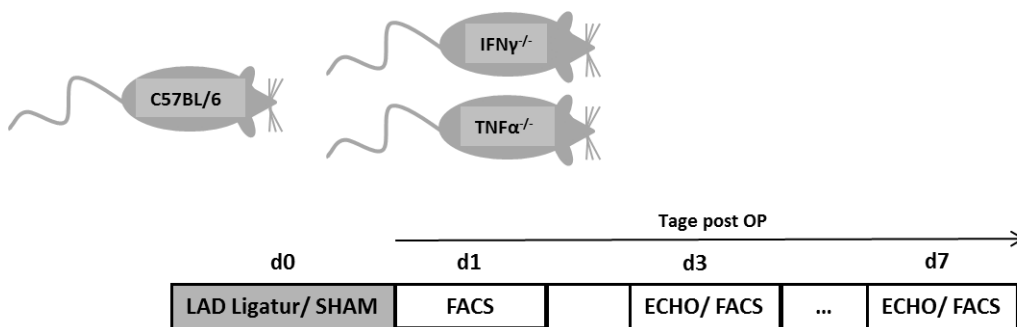
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in diesem genetischen Depletionsmodell der Maus, keine signifikanten Unterschiede bezüglich LV-Funktion und Zellinfiltration nachweisbar waren. Es zeigte sich dennoch eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate, einhergehend mit einer vermehrten kardialen Fibrosierung sowie einer signifikant geringeren IFN- $\gamma$  Expressionsrate bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren nach Myokardinfarkt - LysM<sup>iDTR</sup> sind heterozygote Tiere bezüglich des Diphtherierezeptors, was eine nur heterozygote Expression des DTR erlaubt und zu keiner kompletten bzw. signifikanten Auslöschung von LysM<sup>+</sup> Zellen führte. Eine tendenziell verminderte Infiltration von Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen ins infarzierte Herz von LysM<sup>+</sup> Zell-depletierten Tieren konnte gemessen werden. Jedoch erlaubt die nur partielle Depletion der LysM<sup>+</sup> Zellen keine zuverlässige Aussage darüber, wie viele Neutrophile und Monozyten real ausgeschaltet wurden. Daher erschien dieses Tiermodell zur weiteren, exakten Analyse des Infiltrationsverhaltens von Entzündungszellen nach Myokardinfarkt nicht geeignet. Festzuhalten ist dennoch, dass mit dem LysM<sup>+</sup> Depletionsmodell gezeigt werden konnte, dass sowohl Neutrophile als auch Monozyten einen wichtigen Einfluss auf die Mortalität, die Fibrosebildung und die Expression von inflammatorischen Mediatoren nach Myokardinfarkt nehmen. Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen beim Herzinfarkt wurden im Folgenden spezifischere Ablationsstrategien angewendet sowie verschiedene Knock-out Mäuse eingesetzt.

### 3.2. Effekte der IFN- $\gamma$ -Defizienz und TNF- $\alpha$ -Defizienz auf Zellrekrutierung, LV Funktion und Überleben nach Myokardinfarkt

Die LysM<sup>+</sup>-Zelldepletion im LysM<sup>IDTR</sup> Myokardinfarkt-Mausmodell resultierte in einer maßgeblich verminderten IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mRNA Expression in der LysM<sup>IDTR</sup> LAD Gruppe. Folglich sollte die Rolle der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bei der Pathogenese des Myokardinfarktes determiniert werden.

#### 3.2.1 Postinfarkt-Überleben und linksventrikuläre Funktion sind abhängig von IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$

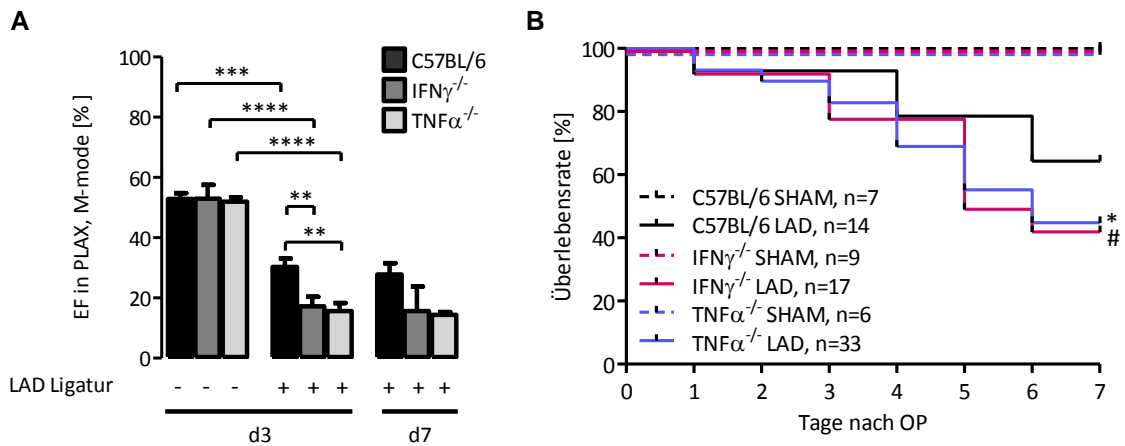
IFN- $\gamma$ -defiziente und TNF- $\alpha$ -defiziente Tiere wurden zur Untersuchung der Mortalitätsrate und der Überprüfung der Herzfunktion über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. An Tag 3 und Tag 7 wurde ein Herzultraschall durchgeführt (Abbildung 3-6).



#### Abbildung 3-6: Versuchsablauf C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse

C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tiere wurden entweder LAD-ligiert oder SHAM-operiert (d0). Anschließend wurden an Tag (d) 1, 3, 7 nach OP Versuche (ECHO/FACS) durchgeführt.

Die mittlere Ejektionsfraktion an Tag 3 nach SHAM Operation betrug bei C57BL/6 Tieren  $52,9 \pm 1,9$  %, bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren  $53,0 \pm 4,6$  % und bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren  $53,0 \pm 4,6$  % (Abbildung 3-7, A). Die Induktion des Myokardinfarktes führte ab Tag 3 nach OP zu einer hoch signifikanten Abnahme der mittleren Ejektionsfraktion sowohl bei C57BL/6 Tieren ( $30,3 \pm 2,7$  %) als auch bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren ( $17,2 \pm 3,2$  %) und bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren ( $15,6 \pm 2,7$  %) im Vergleich zu den jeweils SHAM-operierten Tieren (Abbildung 3-7, A).



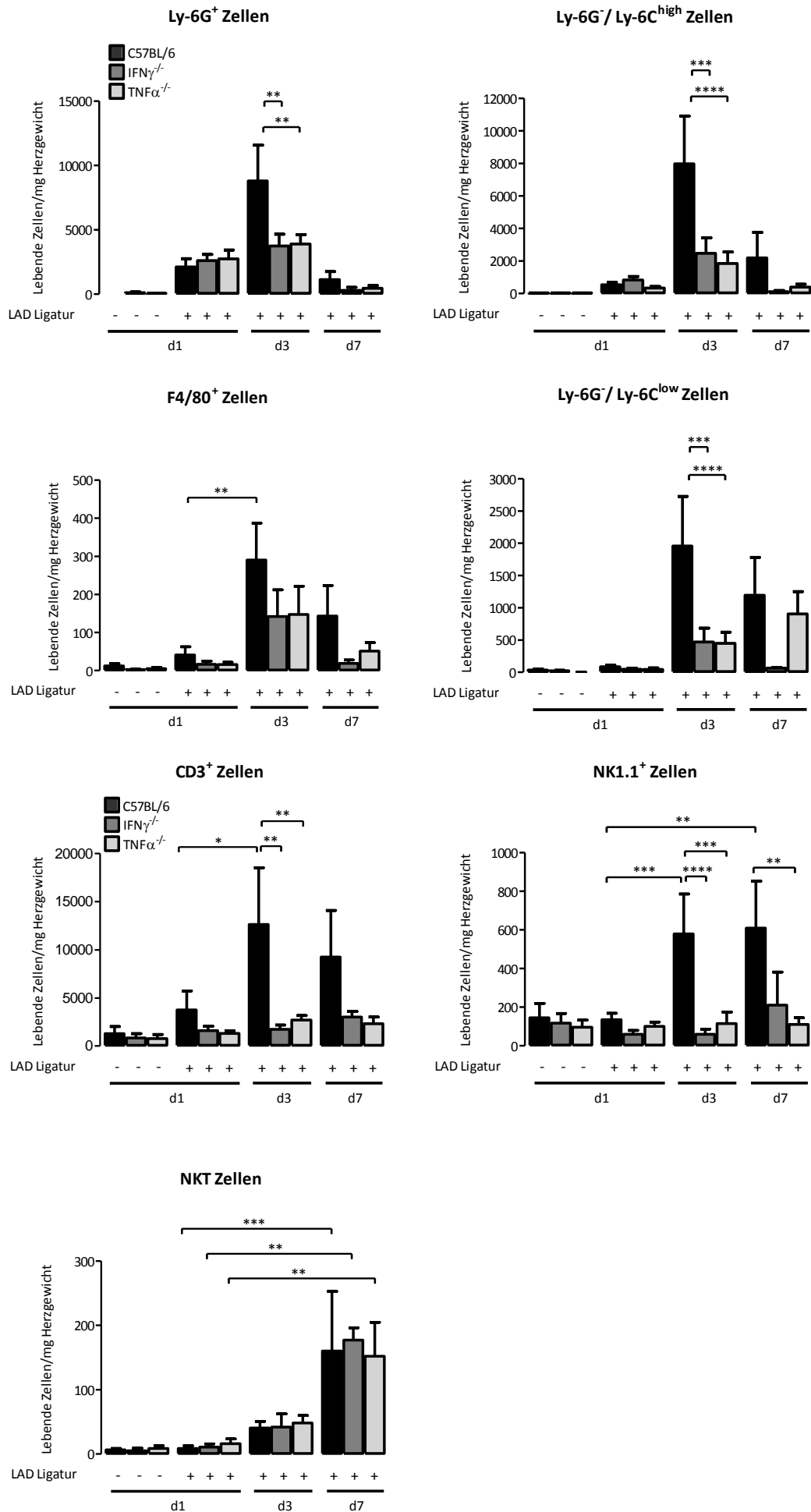
**Abbildung 3-7: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**  
**A**, Ejektionsfraktion in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX) der M-mode Darstellung an d3 nach SHAM Operation (-) oder an d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01. **B**, Überlebensrate in Prozent; n=6-33; Log-rank (Mantel-Cox) Test; \*, # p<0,05.

Zusätzlich hatten zytokindefiziente, infarktoperierte Tiere eine entscheidend verminderte Herzfunktion im Vergleich zur C57BL/6 LAD Gruppe (Anhang Tabelle 5; Abbildung 3-7, A). Die deutliche Verschlechterung der systolischen Herzleistung bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen nach Herzinfarkt war assoziiert mit einer signifikant reduzierten Überlebensrate. In der IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD Gruppe lag diese nach 7 Tagen bei 43 % und in der TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Gruppe bei 45 % im Vergleich zu 64 % Überlebenswahrscheinlichkeit in der C57BL/6 LAD Gruppe. SHAM-operierte Tiere überlebten zu 100 % (Abbildung 3-7, B).

### 3.2.2 Verminderter Zellinflux bei IFN- $\gamma$ -defizienten und TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt

Anhand der Durchflusszytometrie wurde die Zellinfiltration in das Herzgewebe sowie der Anteil an inflammatorischen Zellen im Milzgewebe und im venösen Blut an Tag 1, 3 und 7 nach OP analysiert. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1 und F4/80 wurden verwendet (siehe „gating“ Strategie unter Kapitel 2.2.8.2). Die Induktion des Myokardinfarktes war assoziiert mit einem Anstieg der myelomonozytären Zellinfiltration in das infarzierte Herzgewebe (Abbildung 3-8).



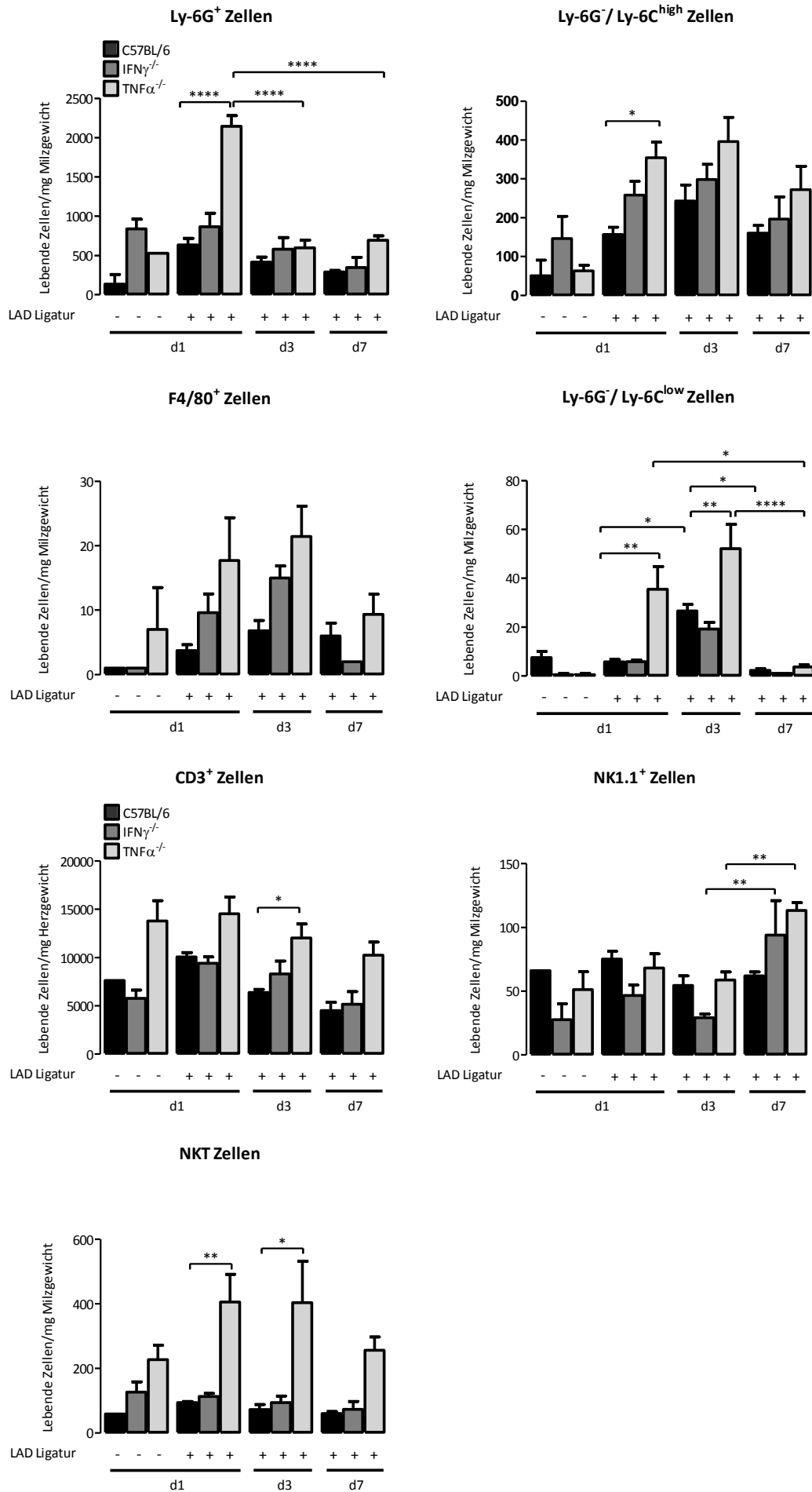


**Abbildung 3-8: Durchflusszytometrische Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 (schwarz), IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (dunkelgrau) und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren (hellgrau). PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-17 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Die mittlere Anzahl an lebenden PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Zellen (Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen) pro mg Herzgewicht (C57BL/6 LAD, 8793  $\pm$  2773 Zellen; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 3726  $\pm$  914 Zellen; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 3875  $\pm$  745 Zellen) sowie an inflammatorischen Ly6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten (C57BL/6 LAD, 7970  $\pm$  2947 Zellen; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 2472  $\pm$  968 Zellen; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 1850  $\pm$  703 Zellen) und reparativen Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten (C57BL/6 LAD, 1960  $\pm$  767 Zellen; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 471  $\pm$  217 Zellen; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 450  $\pm$  174 Zellen) waren signifikant vermindert im infarzierten Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP im Vergleich zu infarzierten C57BL/6 Tieren (Anhang Tabelle 6; Abbildung 3-8). Nur bei C57BL/6 LAD Tieren stieg die mittlere Anzahl an PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1. Weiterhin konnte im infarzierten Herzgewebe von C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren deutlich mehr PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen an Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 nach OP identifiziert werden (Anhang Tabelle 6; Abbildung 3-8). Bei C57BL/6 LAD Tieren stieg die mittlere Anzahl an PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> T-Zellen an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1 sowie die mittlere Anzahl an PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen an Tag 3 und Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 nach OP (Anhang Tabelle 6; Abbildung 3-8). Drei Tage nach Infarktinduktion waren signifikant weniger CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren nachweisbar im Vergleich zur C57BL/6 LAD Gruppe (Abbildung 3-8; C57BL/6 LAD, 8836  $\pm$  4250 Zellen; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 1742  $\pm$  441 Zellen; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 2697  $\pm$  479 Zellen). Es konnten eindeutig weniger NK1.1<sup>+</sup> Zellen im infarzierten Gewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tieren an Tag 3 und an Tag 7 nach OP sowie bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren an Tag 3 im Vergleich zu C57BL/6 Tieren nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 6; Abbildung 3-8).

Die Infarktinduktion war ebenfalls mit einem Anstieg der Inflammationszellzahl im Milzgewebe der operierten Tiere verbunden. Die höchste Anzahl an lebenden Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen pro mg Milzgewicht bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren konnte an Tag 1 im Vergleich zu Tag 3 und Tag 7 nach OP detektiert werden (Anhang Tabelle 7; Abbildung 3-9).



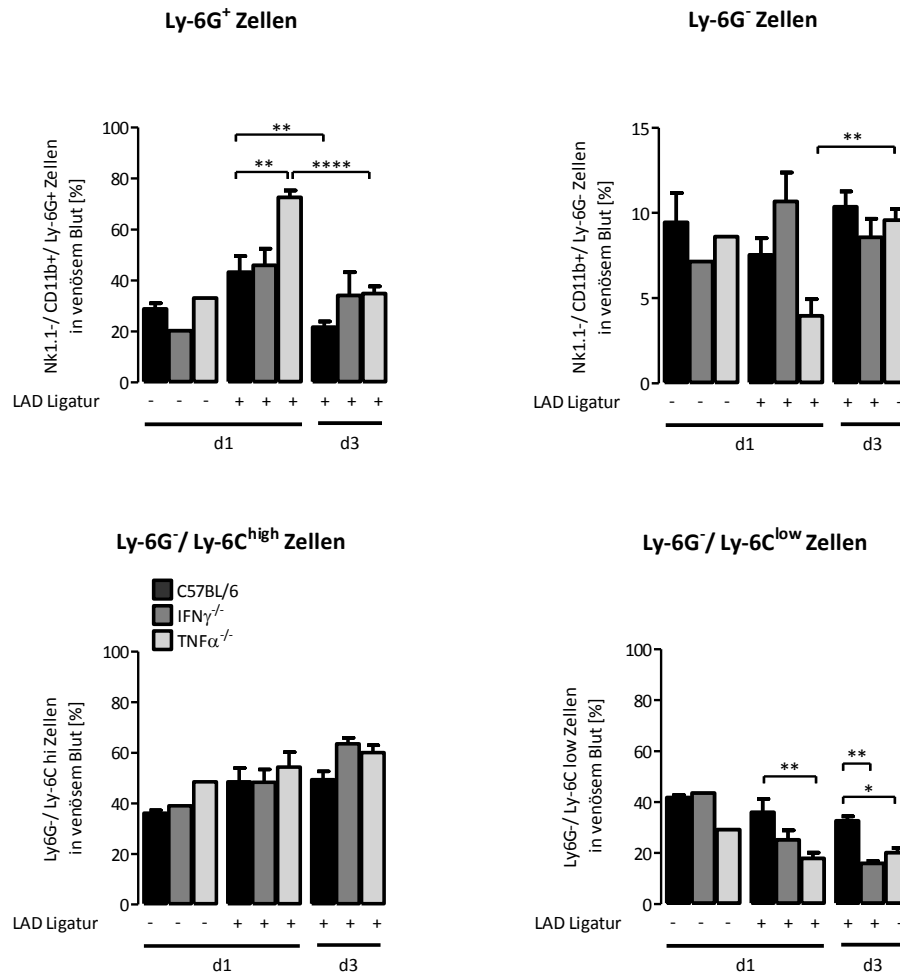
**Abbildung 3-9: FACS Analyse der Zellinfiltration von Milzgewebe bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 (schwarz), IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (dunkelgrau) und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren (hellgrau). PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen (632  $\pm$  86 Zellen vs. 2145  $\pm$  134 Zellen) sowie an inflammatorischen Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten (157  $\pm$  19 Zellen vs. 354  $\pm$  41 Zellen) im Milzgewebe von TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren war ein Tag nach OP maßgeblich höher im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Abbildung 3-9). Die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Milzgewebe von TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren war signifikant höher einen Tag (6  $\pm$  1 Zellen vs. 36  $\pm$  9 Zellen) und drei Tage (27  $\pm$  3 Zellen vs. 52  $\pm$  10 Zellen) nach OP im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren. An Tag 7 nach OP konnten weniger Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren im Vergleich zu Tag 1 und Tag 3, bei C57BL/6 LAD Tieren im Vergleich zu Tag 3, sowie weniger Zellen an Tag 1 als an Tag 3 nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 7; Abbildung 3-9). Bei F4/80<sup>+</sup> Zellen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen messbar.

Im Milzgewebe von LAD-ligierten TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren konnten an Tag 3 nach OP deutlich mehr CD3<sup>+</sup> T-Zellen, sowie an Tag 1 und Tag 3 signifikant mehr NKT Zellen im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren ermittelt werden (Anhang Tabelle 7; Abbildung 3-9). Sieben Tage nach Infarkt OP stieg die mittlere Anzahl an NK1.1<sup>+</sup> Zellen bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren verglichen mit Tag 3 an.

Eine verminderte Anzahl an Zellen im Herzgewebe (Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup>, CD3<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup> Zellen) aber eine erhöhte Zellzahl im Milzgewebe (Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup>, CD3<sup>+</sup>, NKT Zellen) weisen speziell bei TNF- $\alpha$ -defizienten Tieren auf eine eingeschränkte Zellrekrutierung aus der Milz ins infarzierte Herz hin. Die Infarktinduktion resultierte demnach im Anstieg von Inflammationszellen bzw. in der vermehrten Speicherung von Inflammationszellen in der Milz, jedoch in einer signifikant verminderten Zellrekrutierung in das Herzgewebe. Die Neutrophilen-, Monozyten/ Makrophagen-Chemotaxis bei zytokine-defizienten Tieren sollten anschließend noch spezifischer untersucht werden.

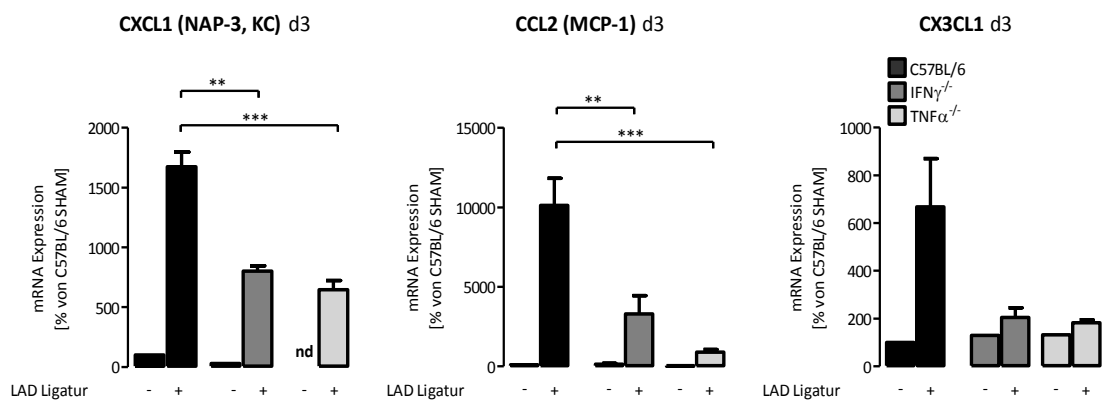


**Abbildung 3-10: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**  
 Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 (schwarz), IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (dunkelgrau) und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren (hellgrau). Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-13 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen in venösem Blut betrug bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren ein Tag nach OP  $72,6 \pm 2,7$  % und war signifikant höher als bei C57BL/6 LAD Tieren mit  $43,3 \pm 6,3$  % (Abbildung 3-10). Weiterhin zirkulierten sowohl bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren als auch bei C57BL/6 LAD Tieren prozentual mehr Ly-6G<sup>+</sup> Zellen an Tag 1 als an Tag 3 im Blut. Bei TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren stieg der Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup> Zellen im Blut an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1 nach OP, jedoch nicht bei C57BL/6 LAD Tieren (Anhang Tabelle 8; Abbildung 3-10). Signifikant weniger NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Zellen zirkulierten in TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren an Tag 1 und Tag 3 und in IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren an Tag 3 nach OP verglichen mit C57BL/6 LAD Tieren.

### 3.2.3 Verminderte Neutrophilen-Chemotaxis, Monozyten-Chemotaxis und IL-12-Expression bei IFN- $\gamma$ -defizienten und TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt

Die mRNA Chemokinexpression nach Myokardinfarkt wurde bei IFN- $\gamma$ -defizienten und TNF- $\alpha$ -defizienten Mäusen mittels real-time PCR untersucht. In Abbildung 3-11 ist die kardiale mRNA Expression der Chemokine CXCL1, CCL2 und CX3CL1 an Tag 3 in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM, wurde auf 100 % gesetzt) dargestellt.

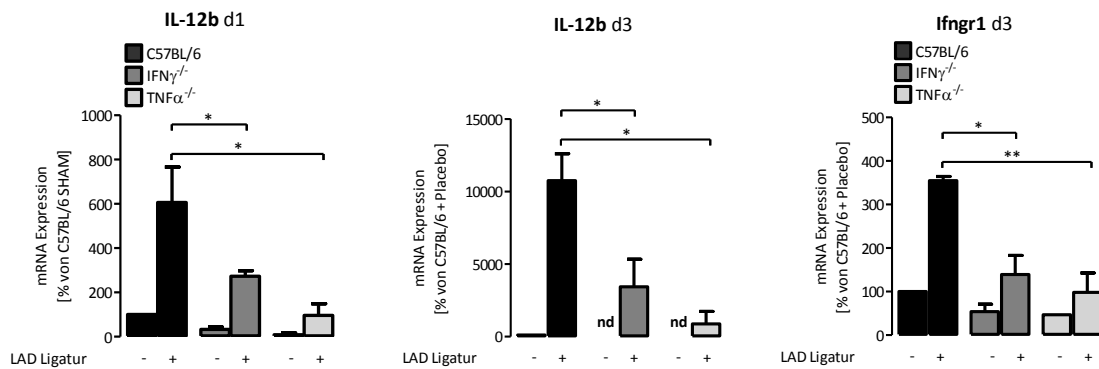


**Abbildung 3-11: Chemokin mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse der Chemokine CXCL1, CCL2 und CX3CL1 an d3 aus Herzgewebe nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (schwarz), IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (dunkelgrau) und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren (hellgrau); Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-6 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01.

Die mittleren Expressionslevel von CXCL1 und CCL2 waren signifikant vermindert im Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren drei Tage nach Infarkt OP im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Abbildung 3-11; CXCL1: C57BL/6 LAD, 1674,0  $\pm$  124,3 % vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 802,0  $\pm$  43,9 % und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 647,3  $\pm$  74,8 %; CCL2: C57BL/6 LAD, 10116,0  $\pm$  1690,0 % vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, 3307,0  $\pm$  1134,0 % und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, 912,4  $\pm$  161,4 %). Bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren konnte zusätzlich ein marginal geringeres CX3CL1 mRNA Expressionslevel an Tag 3 identifiziert werden, verglichen mit C57BL/6 LAD Tieren (Abbildung 3-11).

Parallel zur verminderten Neutrophilen- und Monozyteninfiltration ins infarzierte Herz von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren konnten demnach geringere CXCL1 und CCL2 Expressionslevel identifiziert werden; beides sind Anhaltspunkte für eine verschlechterte Neutrophilen- und Monozytenchemotaxis bei zytokindefizienten Mäusen.



**Abbildung 3-12: mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse von IL-12b an Tag 1 und Tag 3 sowie Ifngr1 an Tag 3 aus Herzgewebe nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (schwarz), IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (dunkelgrau) und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren (hellgrau); Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-6 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

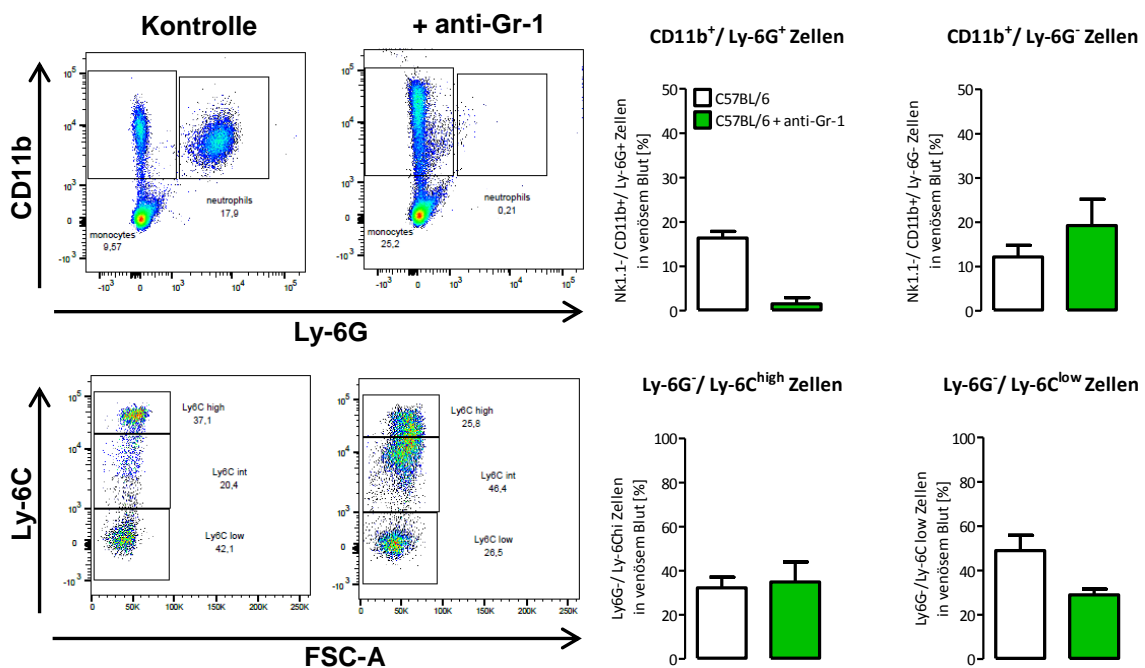
Zur Überprüfung des „IFN- $\gamma$ -signaling“ zwischen Monozyten und NK-Zellen bzw. T-Zellen wurde die Expression von IL-12 und Ifngr1 gemessen. Parallel zur verringerten myokardialen Infiltration von Monozyten, CD3<sup>+</sup> Zellen und Nk1.1<sup>+</sup> Zellen bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren drei Tage nach MI konnten signifikant verringerte Expressionslevel an IL-12b im Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD Tieren sowohl ein Tag als auch drei Tage nach Infarkt OP im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 10; Abbildung 3-12). Weiterhin konnte im Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach MI ein deutlich geringeres Ifngr1 Expressionslevel verglichen mit C57BL/6 Tieren identifiziert werden (Anhang Tabelle 10; Abbildung 3-12). Sowohl die verminderte Infiltration von Monozyten, CD3<sup>+</sup> und NK1.1<sup>+</sup> Zellen als auch die geringere mRNA Expression an IL-12b und Ifngr1 sind Hinweise für eine vermindertes Il-12- und IFN- $\gamma$ -abhängiges „signaling“ zwischen den Zellen in zytokinefizienten Tieren.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das Überleben nach Myokardinfarktinduktion essentiell von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  abhängig ist. Es ließen sich signifikante Unterschiede bezüglich der linksventrikulären Funktion und der Zellinfiltration nachweisen. Einerseits führte eine IFN- $\gamma$ - oder TNF- $\alpha$ -Defizienz nach Myokardinfarkt zur maßgeblichen Verschlechterung der linksventrikulären Funktion im Vergleich zu C57BL/6 Tieren. Andererseits konnte eine eindeutig verminderte Zellrekrutierung an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, inflammatorischen Ly-6C<sup>high</sup> und reparativen Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten, sowie an CD3<sup>+</sup> und an NK1.1<sup>+</sup> Zellen ins Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren detektiert werden. Komplementär dazu war die Neutrophilen- und

Monozyten-Chemotaxis bei  $\text{IFN}\gamma^{-/-}$  und  $\text{TNF}\alpha^{-/-}$  Tieren entscheidend vermindert. Signifikant geringere CXCL1 und CCL2 mRNA Expressionslevel führten demnach zu einem verminderten myokardialen Zellinflux. Wohingegen in der Milz mehr Ly-6G<sup>+</sup> Zellen, Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen, CD3<sup>+</sup> Zellen und NKT Zellen detektiert wurden, was ebenfalls für eine gestörte Zellrekrutierung aus der Milz ins Herzgewebe spricht. Zusätzlich konnte in zytokindefizienten Mausstämmen nach MI ein signifikant beeinträchtigtes „IFN- $\gamma$ -signaling“ zwischen Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen - abhängig von der IL-12b und *lfngr1* Expression - festgestellt werden.

### 3.3. Die Rolle von Gr-1<sup>+</sup> Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes

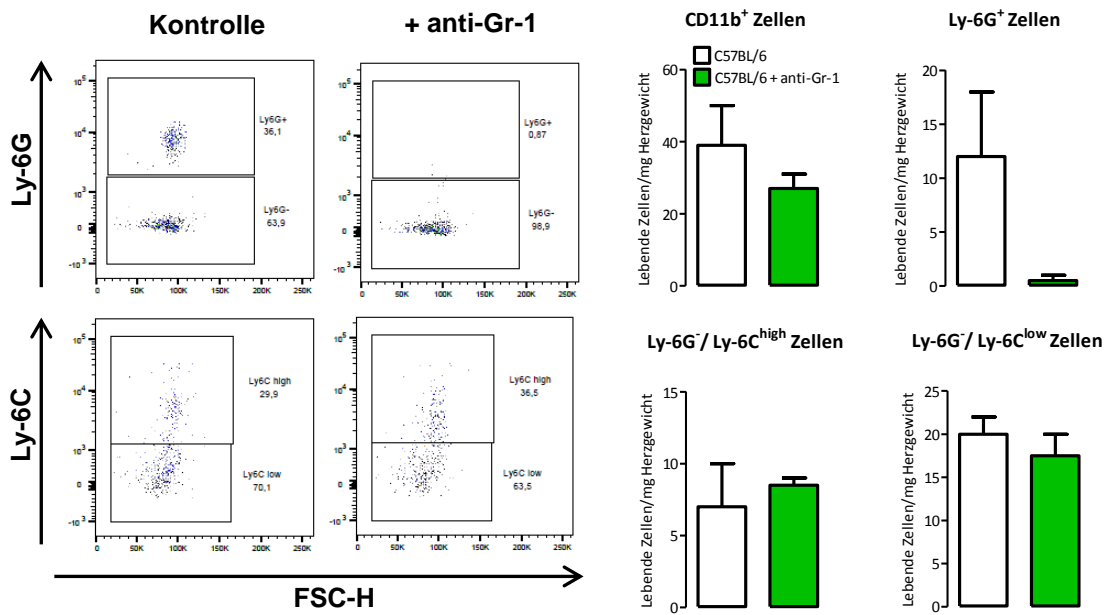
Mit den bisher gezeigten Daten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Ablation von LysM<sup>+</sup> Zellen bei LysM<sup>IDTR</sup> Tieren als auch die IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Defizienz bei Knock-out Tieren zu einer verminderten Infiltration von Neutrophilen ins infarzierte Herzgewebe führt. Folglich sollte die Rolle der Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes ebenfalls genauer beschrieben werden.



**Abbildung 3-13: Depletionskontrolle von venösem Blut nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7**

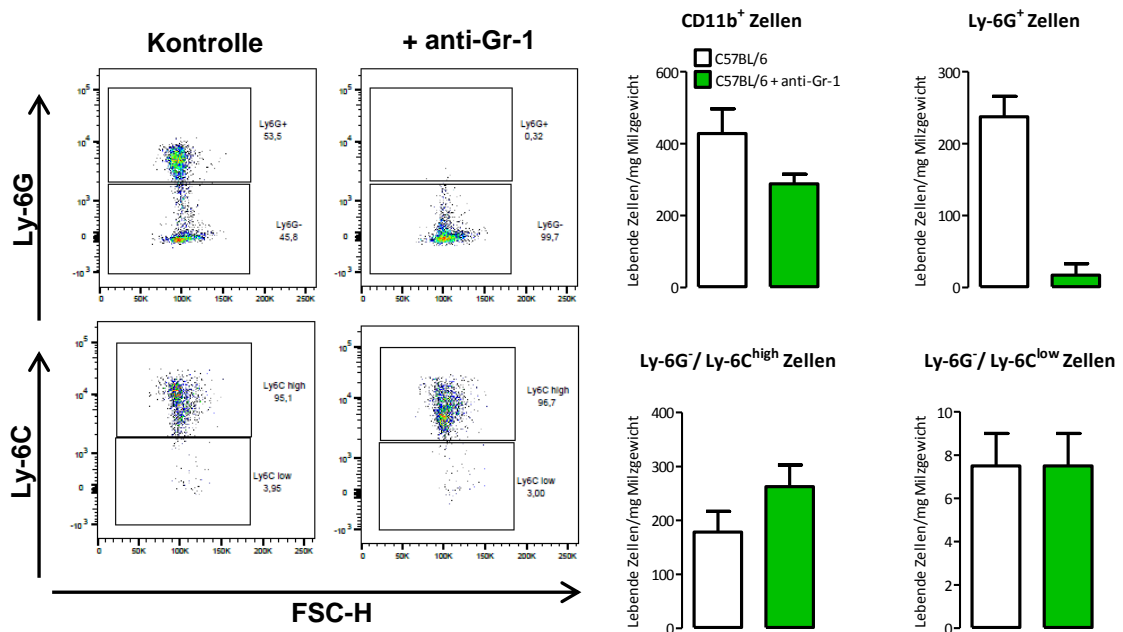
Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut aus C57BL/6 Kontrolltieren (weiß) oder mit anti-Gr-1 Antikörper depletierte C57BL/6 Tiere (grün) an Tag 7 (d7) nach Behandlung. Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2.





**Abbildung 3-14: Depletionskontrolle von Herzgewebe nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Herzgewebe aus C57BL/6 Kontrolltieren (weiß) oder mit anti-Gr-1 Antikörper depletierte C57BL/6 Tiere (grün) an d7 nach Behandlung. PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten wurden analysiert; Mittelwert ± SEM; n=2.



**Abbildung 3-15: Depletionskontrolle von Milzgewebe nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe aus C57BL/6 Kontrolltieren (weiß) oder mit anti-Gr-1 Antikörper depletierte C57BL/6 Tiere (grün) an d7 nach Behandlung. PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten wurden analysiert; Mittelwert ± SEM; n=2.

Mithilfe des anti-Gr-1 Antikörpers, welcher die Zelloberflächen-Antigene Ly-6G und Ly-6C erkennt, konnten Gr-1<sup>+</sup> Zellen im Blut, Milz und Herzgewebe bei C57BL/6 Tieren effektiv depletiert werden (Abbildung 3-13 bis 3-15).

### **3.3.1 Gr-1<sup>+</sup> Zelldepletion führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate und Verschlechterung der LV Funktion**

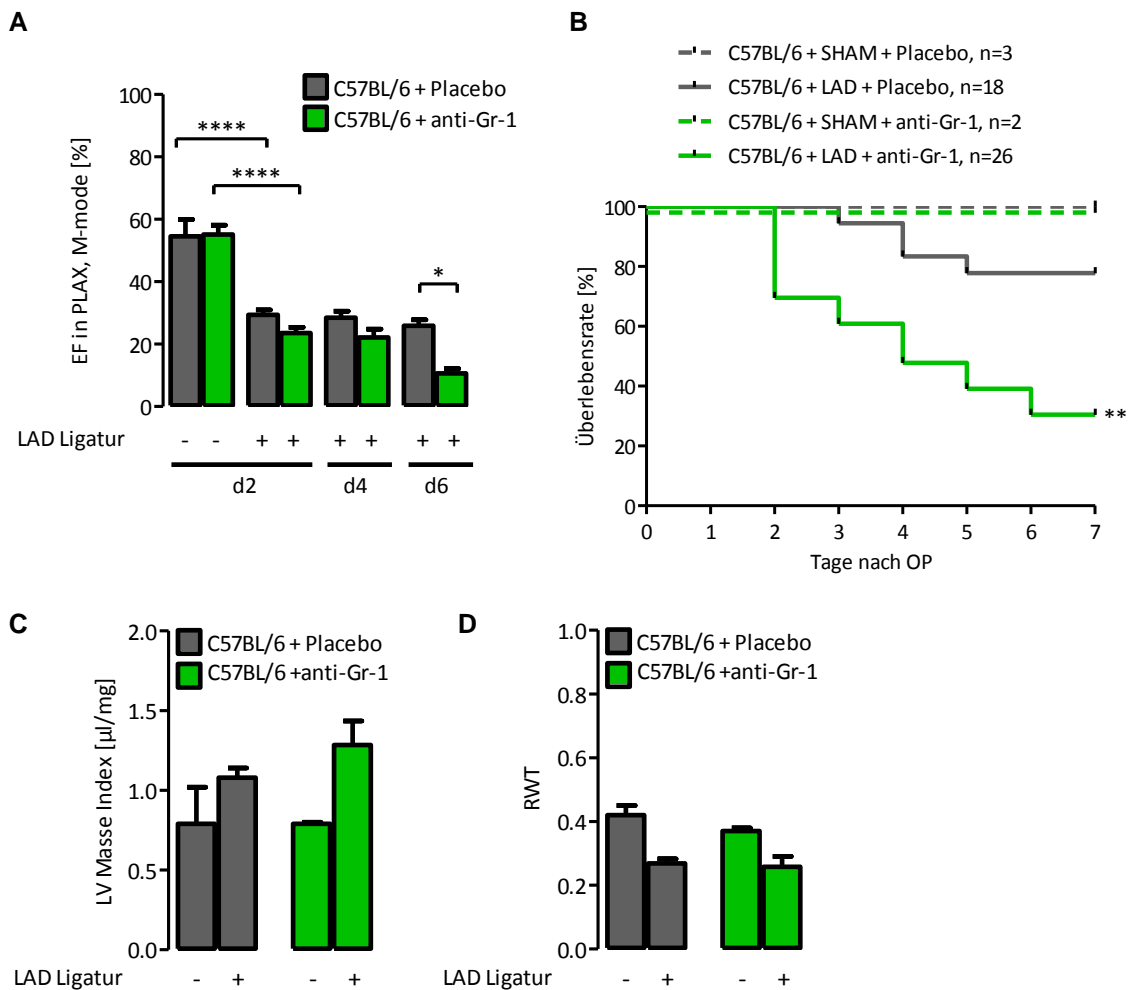
Zur Untersuchung der Überlebensrate und der Herzfunktion wurden die Tiere über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. An Tag 2, Tag 4 und Tag 6 wurde ein Herzultraschall durchgeführt (siehe Abbildung 2-2 unter Kapitel 2.2.1.4.2).

Die mittlere Ejektionsfraktion an Tag 2 nach SHAM Operation betrug bei Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren  $54,6 \pm 5,4$  % und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren  $55,1 \pm 3,0$  % (Abbildung 3-16, A). Die Induktion des Myokardinfarktes führte zwei Tage nach OP zu einer hoch signifikanten Abnahme der mittleren Ejektionsfraktion bei Placebo-behandelten Tieren ( $29,3 \pm 1,7$  %) ebenso wie bei Gr-1<sup>+</sup> Zell-depletierten Tieren ( $23,6 \pm 1,8$  %) im Vergleich zu den jeweils SHAM-operierten Tieren. Anti-Gr-1-behandelte Tiere wiesen sechs Tage nach Herzinfarktinduktion eine signifikant schlechtere, systolische Funktion im Vergleich zur Placebo-behandelten LAD Gruppe auf (Abbildung 3-16, A;  $25,9 \pm 1,9$  % vs.  $10,6 \pm 1,5$  %).

Komplementär dazu betrug die Überlebensrate in der C57BL/6 + anti-Gr-1 + LAD Gruppe nach sieben Tagen nur noch 30 % und war somit entscheidend schlechter als in der C57BL/6 + Placebo + LAD Gruppe (78 % Überlebenswahrscheinlichkeit). SHAM-operierte Tiere überlebten zu 100 % (Abbildung 3-16, B).

Keine signifikanten Unterschiede konnten bezüglich des LV Masse Index und der relative Wanddicke identifiziert werden (Abbildung 3-16, C und D).

Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate (70 %) in der C57BL/6 + anti-Gr-1 + LAD Gruppe konnte sieben Tage nach Infarktoperation keine relevante Stichprobe für histologische Auswertungen (Fibroseggehalt) gewonnen werden.

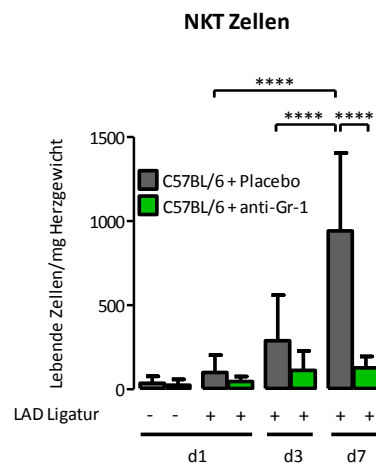
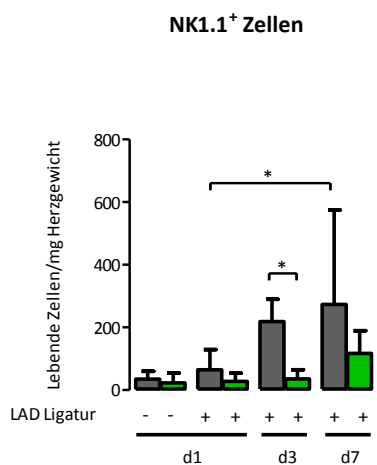
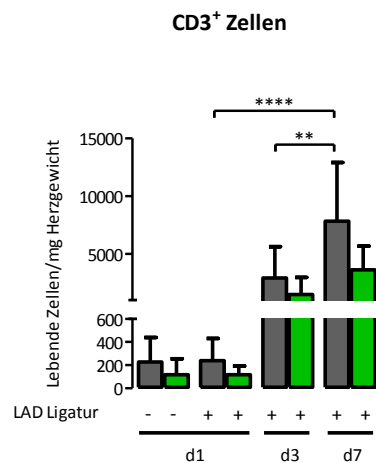
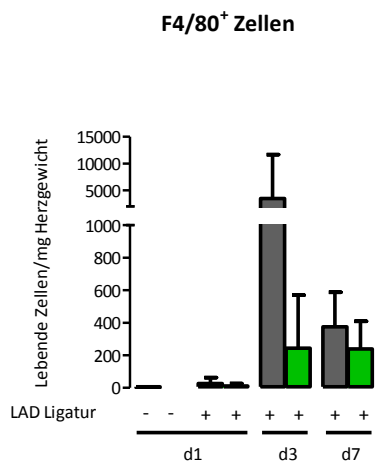
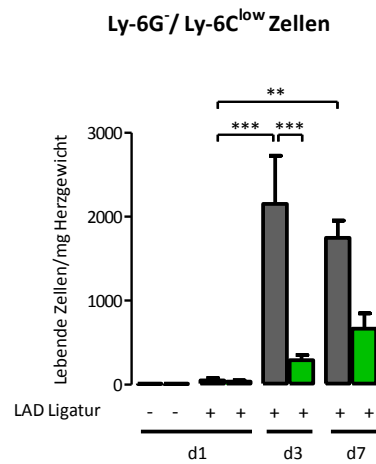
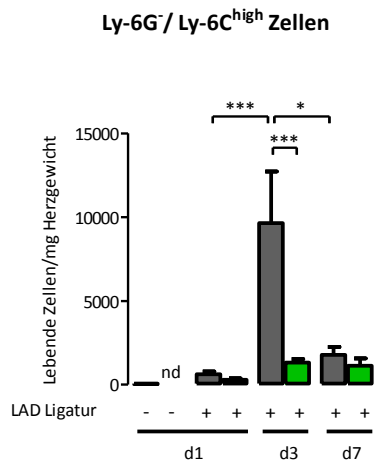
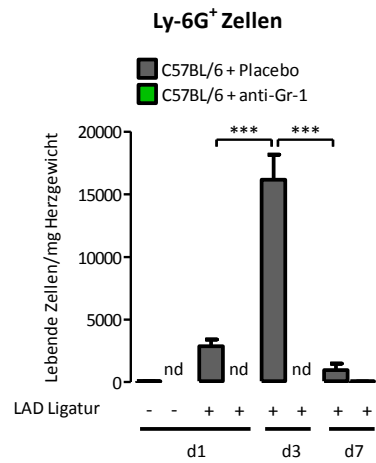
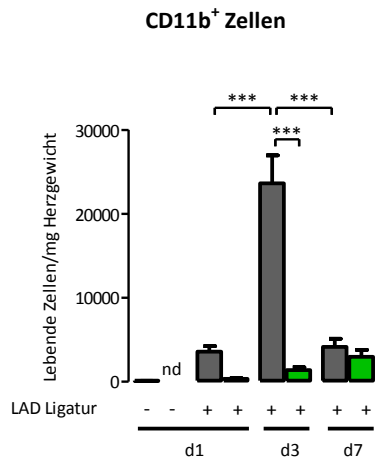


**Abbildung 3-16: Kardiiale Funktion und Überlebensrate bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

**A**, Ejektionsfraktion in Prozent in der PLAX in der M-mode Darstellung an d2 nach SHAM Operation (-) oder an d2, d4, d6 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=6-19 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; \*,  $p < 0,05$ . **B**, Überlebensrate in Prozent; n=2-26; Log-rank (Mantel-Cox) Test; \*\*,  $p < 0,01$ . **C**, LV Masse Index in  $\mu\text{l}/\text{mg}$  an d7 nach OP; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-8 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns. **D**, Relative Wanddicke des linken Ventrikels ("relative wall thickness", RWT) an d7 nach OP; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

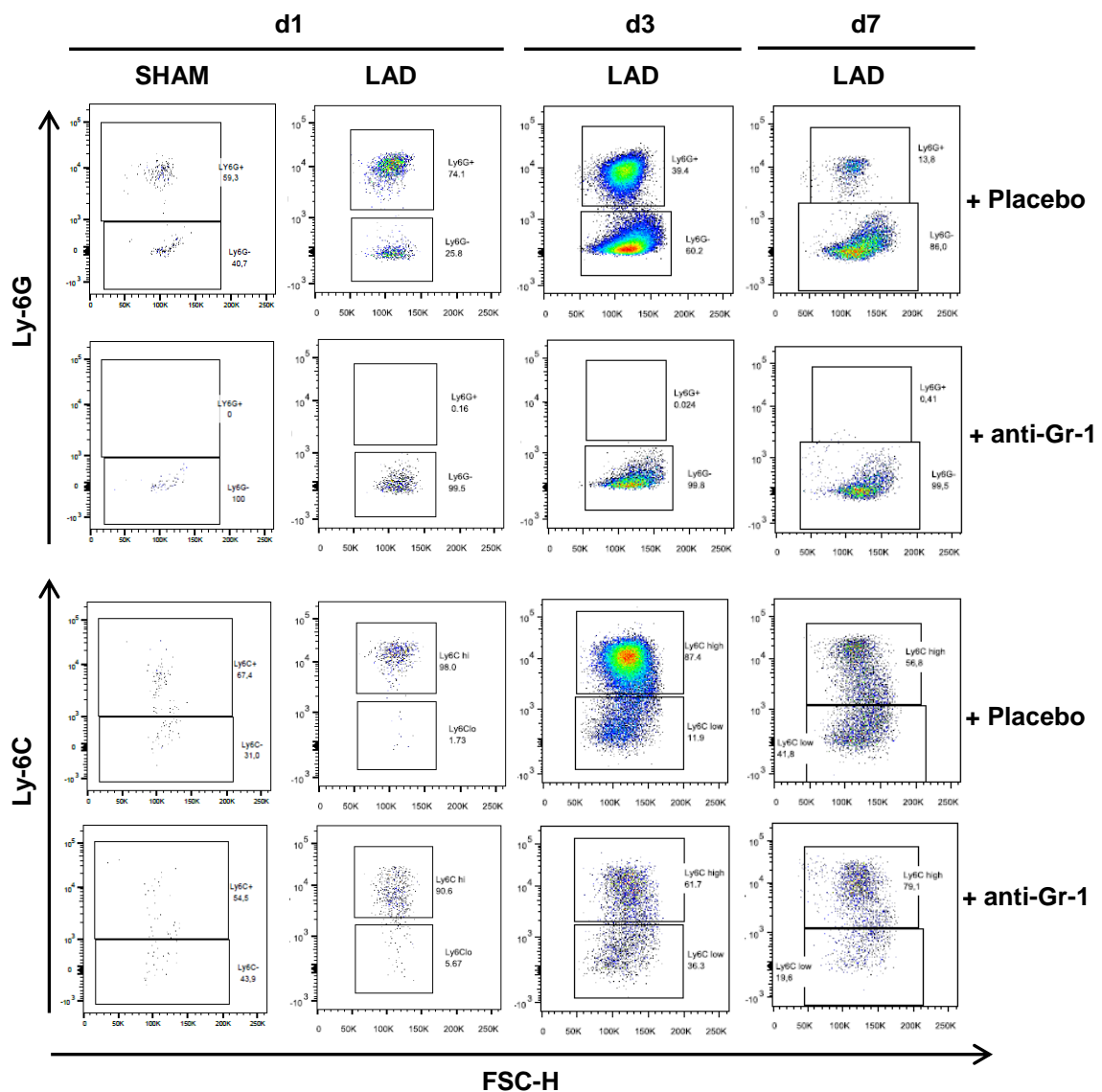
### 3.3.2 Verminderte Zellinfiltration bei anti-Gr-1-behandelten Mäusen nach Myokardinfarkt

Der kardiiale Zellinflux sowie der Anteil an Inflammationszellen im Milzgewebe und im venösen Blut wurden mittels FACS an Tag 1, 3 und 7 nach OP untersucht. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1 und F4/80 wurden für die Zellfärbung verwendet (siehe „gating“ Strategie unter Kapitel 2.2.8.2).



### Abbildung 3-17: FACS Analyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Herzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt. PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>-</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-10 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05. nd, nicht detektierbar.



### Abbildung 3-18: Repräsentative FACS Plots

Repräsentative FACS Plots von infiltrierten PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten und PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten ins Herzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo oder anti-Gr-1 Antikörper behandelt.

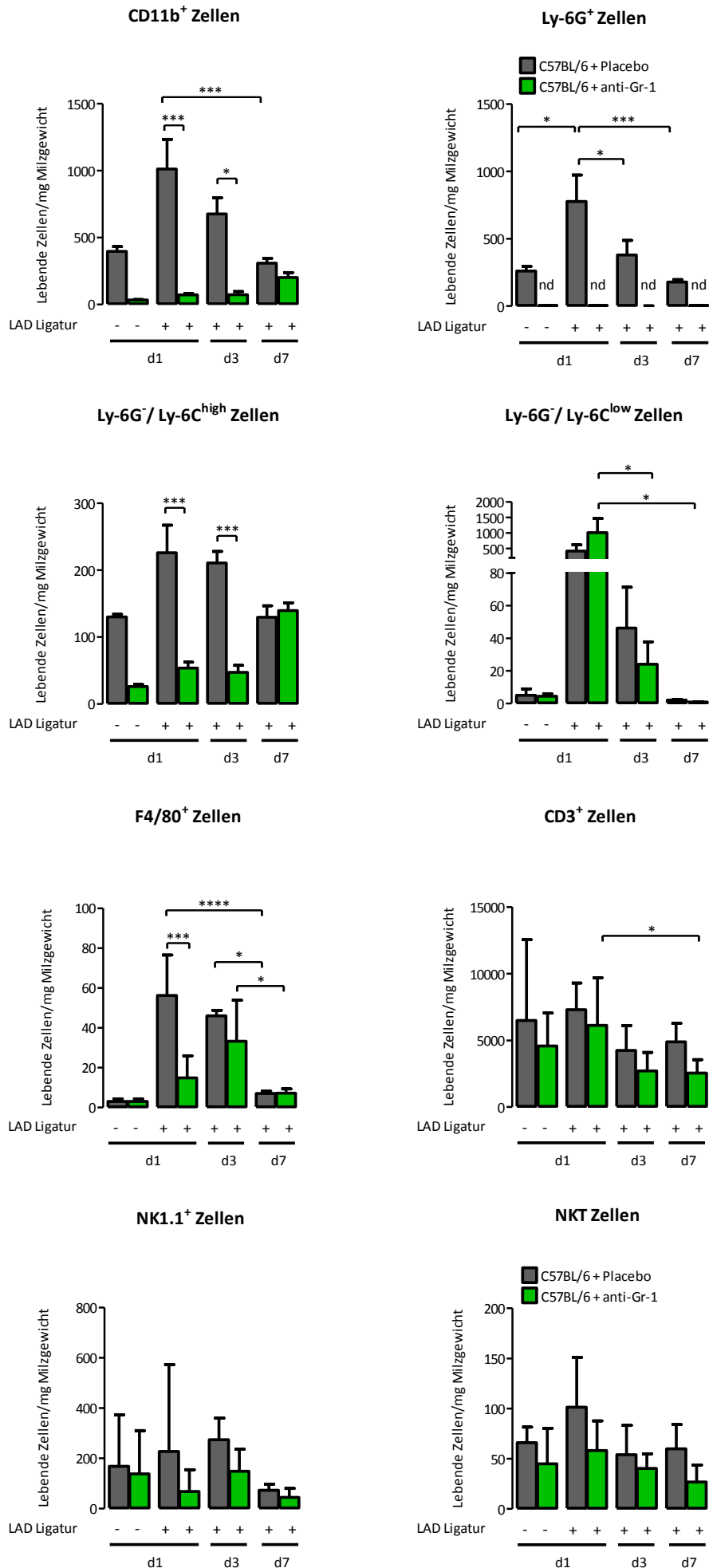
Nur bei Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren korrelierte die Induktion des Myokardinfarktes mit einem Anstieg der Infiltration von Entzündungszellen in das infarzierte Herzgewebe. Es konnten drei Tage nach OP ( $23632 \pm 3339$  Zellen) hoch signifikant mehr lebenden CD11b<sup>+</sup> Zellen im kardialen Infarktgewebe von Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren als an Tag 1 ( $3563 \pm 680$  Zellen) oder an Tag 7 nach OP ( $4130 \pm 979$  Zellen) nachgewiesen werden (Abbildung 3-17). Die mittlere Anzahl an CD11b<sup>+</sup> Zellen war signifikant vermindert im infarzierten Herzgewebe von anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren drei Tage nach OP im Vergleich zu infarzierten Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren ( $23632 \pm 3339$  Zellen vs.  $1360 \pm 343$  Zellen).

Die mittlere Anzahl an lebenden Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen pro mg Herzgewicht sowie an inflammatorischen Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten war deutlich höher in der C57BL/6 + Placebo + LAD Gruppe an Tag 3 verglichen mit Tag 1 und Tag 7 (Anhang Tabelle 12; Abbildung 3-17). Reparative Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten waren an Tag 3 und Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 am stärksten ins infarzierte Herz von Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren eingewandert.

Bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren konnten praktisch keine Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen im Herzgewebe nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 12; Abbildung 3-17; Abbildung 3-18). Ebenfalls konnten signifikant weniger Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten ( $9642 \pm 3095$  Zellen vs.  $1323 \pm 211$  Zellen) sowie Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten ( $2154 \pm 573$  Zellen vs.  $290 \pm 62$  Zellen) im Herzgewebe von anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren drei Tage nach Infarktinduktion im Vergleich zur C57BL/6 + Placebo + LAD Gruppe detektiert werden (Abbildung 3-17). Lebende F4/80<sup>+</sup> Zellen infiltrierten marginal weniger ins infarzierte Herzgewebe von anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren verglichen mit Placebo-behandelten LAD Tieren (Anhang Tabelle 12; Abbildung 3-17).

Bei Placebo-behandelten C57BL/6 Tieren stieg die mittlere Anzahl an NK1.1<sup>+</sup> Zellen an Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 und die mittlere Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie NKT Zellen an Tag 7 im Vergleich zu Tag 1 und Tag 3 nach Infarkt OP (Anhang Tabelle 12; Abbildung 3-17). Drei Tage nach Infarktinduktion waren signifikant weniger NK1.1<sup>+</sup> Zellen bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 LAD Tieren nachweisbar, verglichen mit der Placebo-behandelten LAD Gruppe ( $218 \pm 29$  Zellen vs.  $36 \pm 10$  Zellen).

Es konnten hoch signifikant weniger NKT Zellen im infarzierten Gewebe von anti-Gr-1-behandelten Tieren an Tag 7 im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 12; Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-19: FACS Analyse von Milzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt. PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-7 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*, p<0,05. nd, nicht detektierbar.

Die Induktion des Myokardinfarktes war mit einem Anstieg der Inflammationszellzahl im Milzgewebe der operierten Tiere verbunden (Abbildung 3-19). Erst ab Tag 7 nach OP nahm die Anzahl an lebenden CD11b<sup>+</sup> Zellen und Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen pro mg Milzgewicht bei Placebo-behandelten LAD Tieren im Vergleich zu Tag 1 entscheidend ab. Zusätzlich war die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen bei Placebo-behandelten LAD Tieren mit  $776,9 \pm 195,9$  Zellen pro mg Milzgewicht an Tag 1 signifikant höher als an Tag 3 nach OP und maßgeblich höher als bei Placebo-behandelten SHAM Tieren an Tag 1 (Anhang Tabelle 13).

Bei anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren nahm die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Milzgewebe ab Tag 7 signifikant ab im Vergleich zu Tag 1 und Tag 3. Es konnten ebenfalls keine Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen im Milzgewebe von anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren detektiert werden (Abbildung 3-19). Zusätzlich waren auch weniger CD11b<sup>+</sup> Zellen und Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten an Tag 1 und an Tag 3 nach Infarkt OP bei anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren in der Milz nachweisbar (Anhang Tabelle 13; Abbildung 3-19).

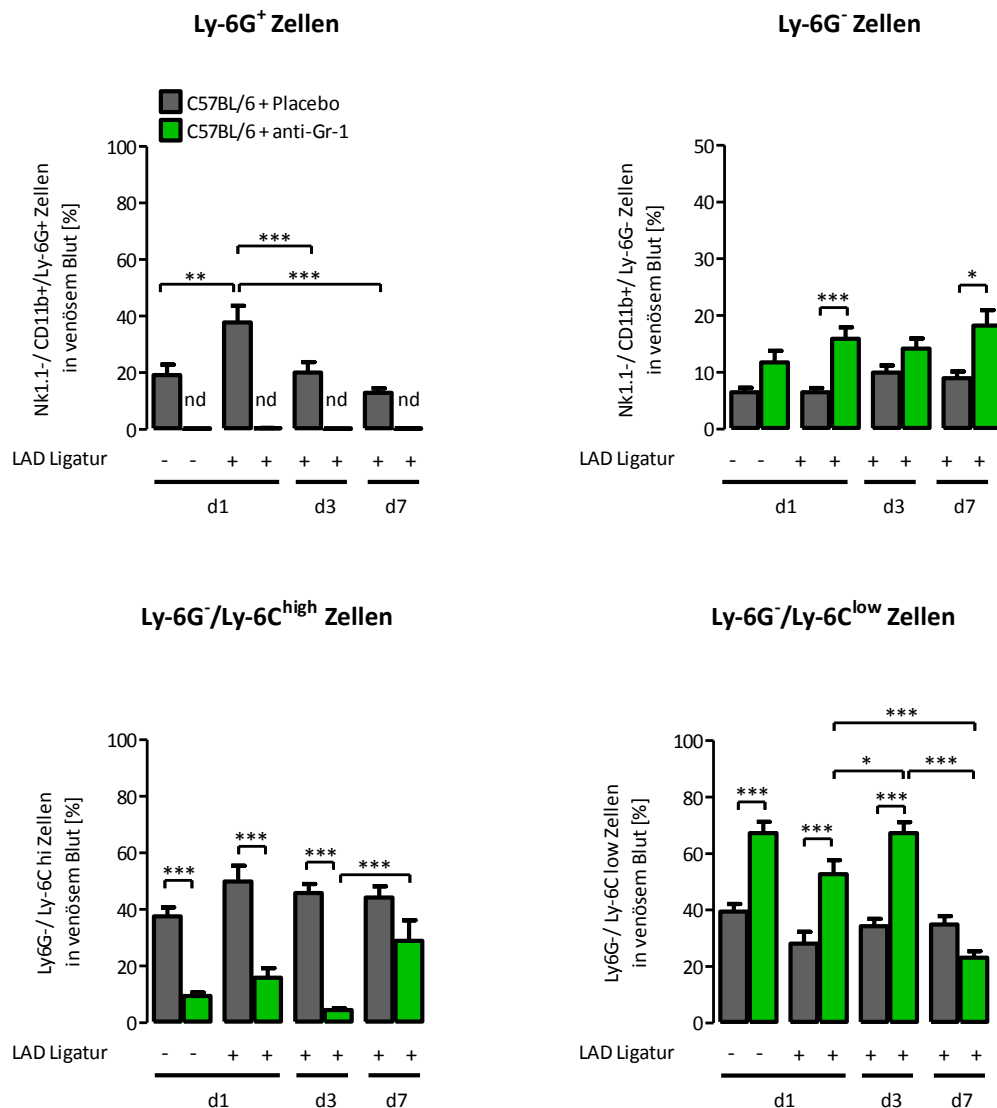
Es konnten deutlich weniger F4/80<sup>+</sup> Zellen pro mg Milzgewicht an Tag 7 als an Tag 3 bei der anti-Gr-1-behandelten LAD Gruppe und weniger F4/80<sup>+</sup> Zellen an Tag 7 als an Tag 1 und an Tag 3 bei der Placebo-behandelten LAD Gruppe ermittelt werden. Ein Tag nach Infarktinduktion waren signifikant weniger lebende F4/80<sup>+</sup> Zellen im Milzgewebe von anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren zu finden ( $56 \pm 10$  Zellen vs.  $15 \pm 4$  Zellen).

Anti-Gr-1-behandelte LAD Tiere hatten sieben Tage nach OP deutlich weniger CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Milzgewebe als an Tag 1. NK1.1<sup>+</sup> Zellen, CD3<sup>+</sup> T-Zellen und NKT Zellen waren nur marginal weniger nachweisbar im Milzgewebe der anti-Gr-1-behandelten LAD Tiere (Anhang Tabelle 13; Abbildung 3-19).

Ein Tag nach Infarkt OP betrug der prozentuale Anteil an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen in venösem Blut bei Placebo-behandelten LAD Tieren  $37,8 \pm 5,9$  % und war höher als in Placebo-behandelten SHAM Tieren ( $19,2 \pm 3,7$  %) und höher als an Tag 3 ( $20,1 \pm 3,7$  %).



und Tag 7 ( $13,0 \pm 1,5$ ) nach Infarkt OP (Abbildung 3-20). Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen waren auch im venösen Blut von anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren so gut wie nicht nachweisbar (Anhang Tabelle 14; Abbildung 3-20). Dies spricht für die effektive Depletion mittels anti-Gr-1 Antikörper beim verwendeten Applikationsregime.



**Abbildung 3-20: FACS Analyse von venösem Blut bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt. Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=5-15 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05. nd, nicht detektierbar.

Bei anti-Gr-1-behandelten, LAD-ligierten Tieren zirkulierten an Tag 1 und an Tag 7 deutlich mehr Ly-6G<sup>-</sup> Zellen als bei Placebo-behandelten, LAD-ligierten Tieren.

Signifikant weniger Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Zellen zirkulierten im venösen Blut von anti-Gr-1-behandelten Tieren an Tag 1 und an Tag 3 nach OP verglichen mit Placebo-behandelten Tieren (Abbildung 3-20). Mutmaßlich kompensatorisch zirkulierten mehr Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Zellen im venösen Blut von anti-Gr-1-behandelten Tieren an Tag 1 und an Tag 3 nach OP verglichen mit Placebo-behandelten Tieren.

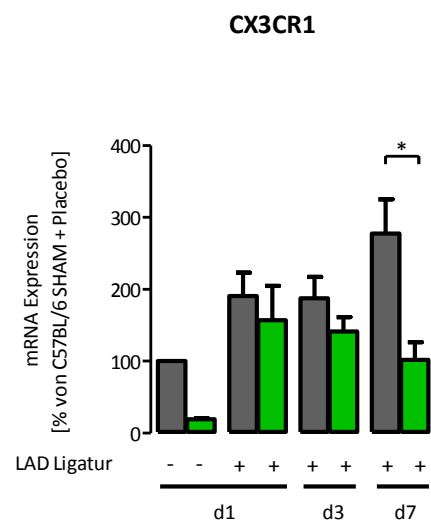
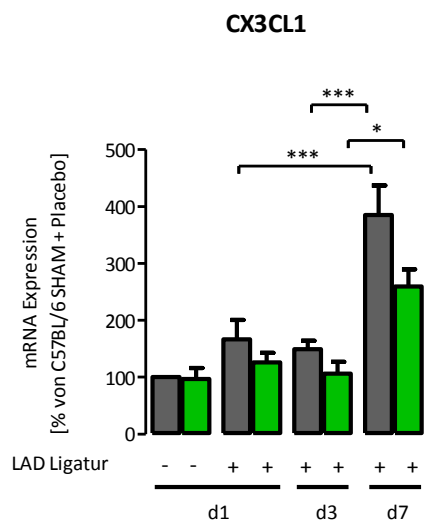
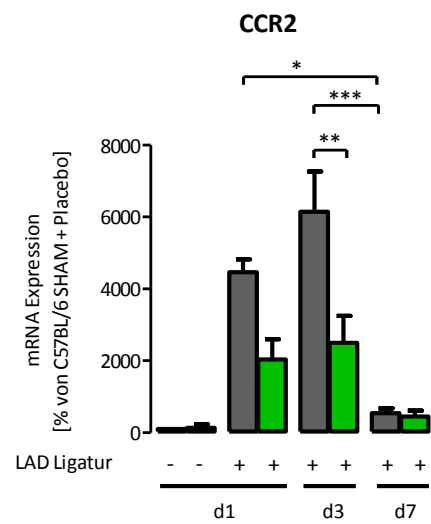
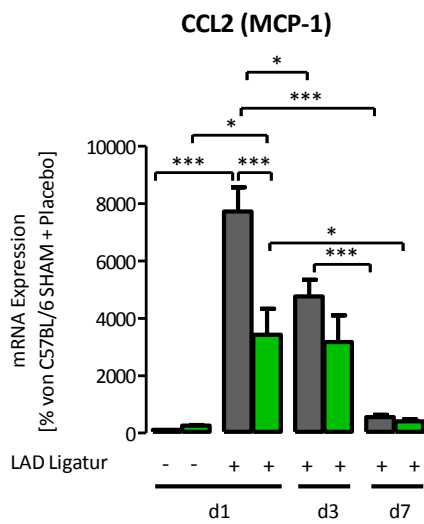
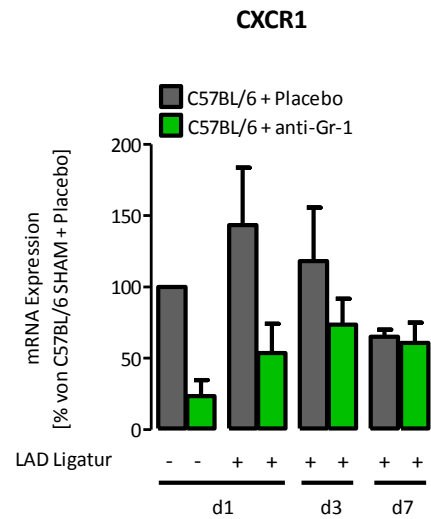
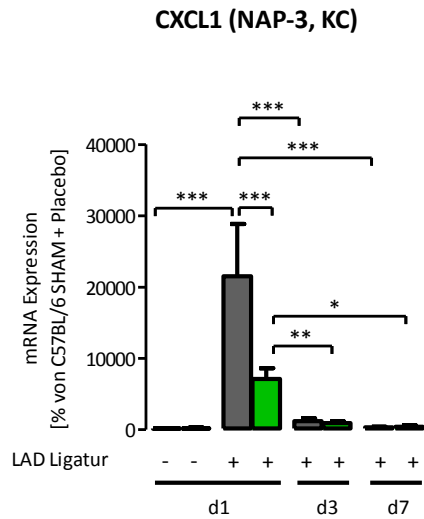
Sieben Tage nach Infarkt OP konnten mehr Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Zellen im venösen Blut von anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Tag 3 nachgewiesen werden. Andererseits war der prozentuale Anteil an Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Zellen bei anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren an Tag 3 signifikant höher als an Tag 1 und an Tag 7, sowie an Tag 7 deutlich geringer als an Tag 1 (Anhang Tabelle 14; Abbildung 3-20).

### **3.3.3 Depletion von Neutrophilen führt zu einer verminderten Monozyten-Chemotaxis nach Myokardinfarkt**

Zur Überprüfung der schon mittels FACS Analyse detektierten Veränderung der Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis und damit verbundenen verminderten Zellrekrutierung nach anti-Gr-1 Behandlung wurden die mRNA-Expressionslevel von relevanten Mediatoren und deren Rezeptoren *via* real-time PCR gemessen.

In Abbildung 3-21 ist die kardiale mRNA Expression der Chemokine CXCL1, CCL2, CX3CL1 und der Rezeptoren CXCR1, CCR2, CX3CR1 in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 + Placebo + SHAM, wurde auf 100 % gesetzt) an Tag 1, 3 und 7 nach OP dargestellt.

LAD-ligierte Tieren besaßen ein CXCL1 mRNA Expressionsmaximum an Tag 1. Das mRNA Expressionslevel von CXCL1, einem für die Aktivierung und Mobilisierung von Neutrophilen wichtigen Chemokin, war ein Tag nach Infarkt OP signifikant vermindert im Herzgewebe von anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren ( $21529,0 \pm 7324,0$  % vs.  $7113,0 \pm 1496,0$  %). Es konnte zudem ein marginal geringeres CXCR1 mRNA Expressionslevel bei anti-Gr-1-behandelten und LAD-ligierten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten LAD Tieren identifiziert werden (Abbildung 3-21).

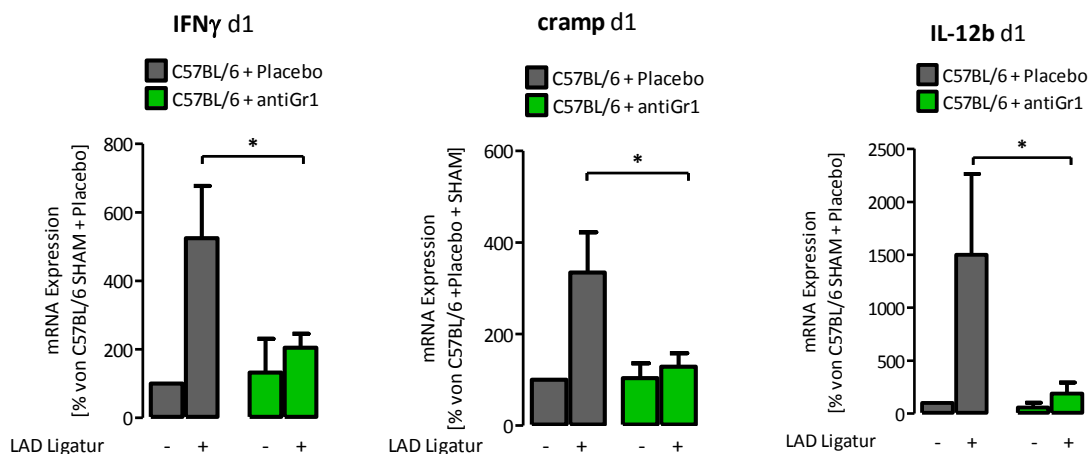


### Abbildung 3-21: Kardiale mRNA Expressionsanalyse bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse der Chemokine CXCL1, CXCR1, CCL2, CCR2, CX3CL1, CX3CR1 an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

CCL2, ein wichtiges Chemokin für die Monozyten-Chemotaxis, war ebenfalls ein Tag nach Infarkt OP deutlich vermindert exprimiert bei anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten LAD Tieren ( $7722,0 \pm 847,5$  % vs.  $3430,0 \pm 899,2$  %). Komplementär dazu war auch das mittlere mRNA Expressionslevel von CCR2 drei Tage nach OP maßgeblich geringer bei anti-Gr-1-behandelten LAD Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten LAD Tieren ( $6153,0 \pm 1109,0$  % vs.  $2499,0 \pm 752,0$  %).

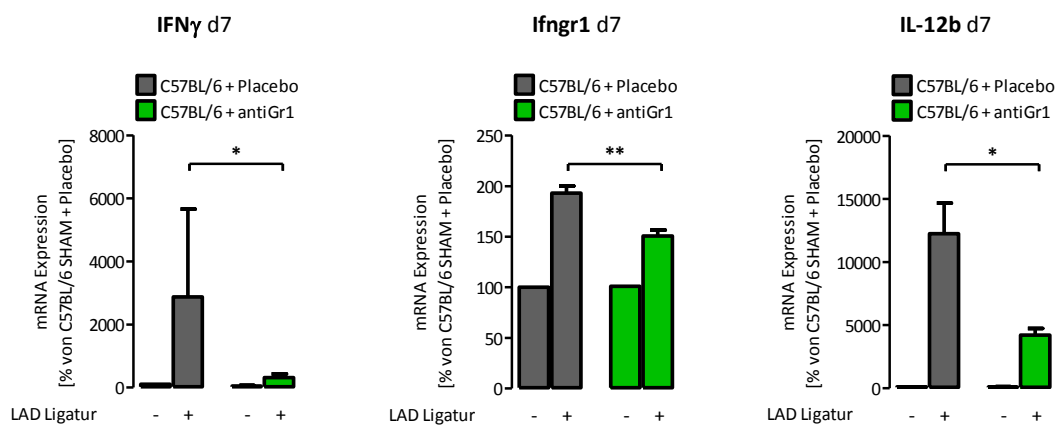
Anti-Gr-1-behandelte, LAD-ligierte Tieren besaßen ein CCL2 mRNA Expressionsmaximum an Tag 1 im Vergleich zu Tag 7 und im Vergleich zu anti-Gr-1-behandelten, SHAM-operierten Tieren. Signifikant erhöhte CCL2 Expressionslevel bei Placebo-behandelten Tieren an Tag 1 im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren und Tag 3 nach Infarkt OP, sowie an Tag 1 und Tag 3 im Vergleich zu Tag 7 konnten identifiziert werden (Anhang Tabelle 15; Abbildung 3-21). Sieben Tage nach Infarktinduktion war auch die CCR2 Expression wieder eindeutig verringert bei Placebo-behandelten Tieren. Das CX3CL1 mRNA Expressionsmaximum wurde bei LAD-ligierten Tieren an Tag 7 erreicht (Anhang Tabelle 15; Abbildung 3-21). Das mittlere Expressionslevel von CX3CR1, dem Fraktalkinrezeptor auf der Oberfläche von reparativen Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten, war sieben Tage nach Infarkt OP signifikant vermindert im Herzgewebe von anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren ( $277,7 \pm 47,7$  % vs.  $101,8 \pm 24,7$  %).



### Abbildung 3-22: IFN- $\gamma$ , cramp und IL-12b mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren ein Tag nach OP

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse von IFN- $\gamma$ , cramp und IL-12b an d1 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*, p<0,05.

Zusätzlich konnten signifikant geringere Expressionslevel an IFN- $\gamma$ , cramp („cathelicidin-related antimicrobial peptid“) und Interleukin-12b einen Tag nach Infarkt OP sowie entscheidend geringere Expressionslevel an IL-12b und IFN- $\gamma$  und Interferon-gamma Rezeptor 1 sieben Tage nach Infarktinduktion bei anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren ermittelt werden (Anhang Tabelle 16, Abbildung 3-22 und 3-23).



### Abbildung 3-23: IFN- $\gamma$ , Ifngr1 und IL-12b mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren an Tag 7 nach OP

Graphische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse von IFN- $\gamma$ , Ifngr1, IL-12b an d7 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) in C57BL/6 Tieren entweder mit Placebo (grau) oder anti-Gr-1 Antikörper (grün) behandelt; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-6 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

#### 3.3.4 Rekonstitutionsversuche bei Gr-1<sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarkt

Um die exakte Rolle von Neutrophilen und Monozyten nach Myokardinfarkt in Hinblick auf Überleben, linksventrikuläre Funktion und Zellinfiltration genauer unterscheiden zu können, wurden Rekonstitutionsversuche durchgeführt: anti-Gr-1-behandelte Tiere wurden entweder mit Neutrophilen oder mit Monozyten rekonstituiert oder mit Cathelicidin behandelt. Bei gleichzeitiger Fortführung der anti-Gr-1 Behandlung erhielten die Tiere einen Tag nach Infarkt OP zusätzlich entweder intravenös Neutrophile (zuvor aus dem Knochenmark von C57BL/6 Tieren gewonnen) oder intravenös Monozyten (zuvor aus dem venösem Blut von C57BL/6 Tieren gewonnen) oder subkutan

Cathelicidin injiziert (synthetisch hergestellt). Es konnten jedoch weder Neutrophile rekonstituiert, noch vermehrte Monozytenzahlen nachgewiesen werden. Auch bei Cathelicidin-behandelten Tieren konnte keine Veränderung der Neutrophilen-Chemotaxis erwirkt werden. Weiterhin konnte keine Veränderung beim Überleben nach Myokardinfarkt oder bezüglich der LV Funktion durch die zusätzliche Behandlung mit Neutrophilen oder Monozyten oder mit Cathelicidin bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Neutrophilen-spezifischen anti-Gr-1 Antikörper festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Behandlung mit anti-Gr-1 nicht nur basal die spezifischen Zellen, sondern auch die experimentell wieder zugeführten Neutrophilen oder Monozyten depletiert und so eine effektive Rekonstitution verhinderte.

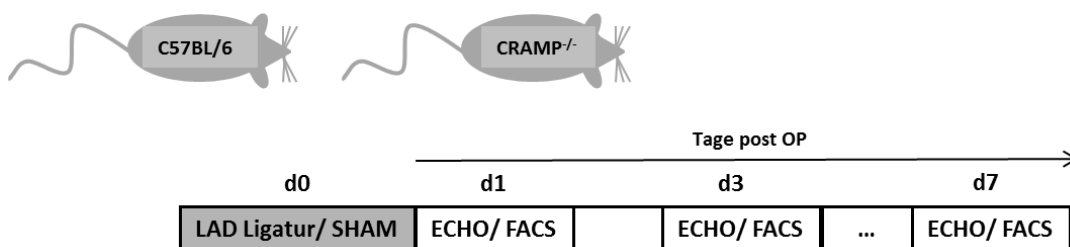
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine antikörpervermittelte Ablation von Gr-1<sup>+</sup> Zellen zu einer signifikant erhöhten Mortalität bei verschlechterter linksventrikulärer Funktion nach Myokardinfarktinduktion führt. Die Behandlung von C57BL/6 Tieren mit anti-Gr-1 führte zu einer effizienten Eliminierung der Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen in Blut, Milz und Herzgewebe, sowie zu einer deutlich verminderten Rekrutierung von Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten, NK1.1<sup>+</sup> und NKT Zellen im Herzgewebe nach Myokardinfarkt. Weiterhin konnten eindeutig weniger Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der Milz von anti-Gr-1-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren bestimmt werden. Im Blut sank zusätzlich auch die Anzahl an inflammatorischen Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten. Komplementär dazu war auch die Monozyten-Chemotaxis bei anti-Gr-1-behandelten Tieren entscheidend reduziert. Verminderte mRNA Expressionslevel an CXCL1, CCL2 und CX3CL1 und entsprechender Zellrezeptoren führten zu einem eingeschränkten Zellinflux an Neutrophilen und Monozyten ins infarzierte Myokard. Zusätzlich konnten signifikant geringere Cathelicidin, IFN- $\gamma$ , Interferon-gamma Rezeptor 1 und IL-12b mRNA Expressionslevel bei anti-Gr-1-behandelten Tieren festgestellt werden. Rekonstitutionsversuche mit Neutrophilen, Monozyten oder Cathelicidin bei Gr-1<sup>+</sup> Zell-depletierten Mäusen nach Myokardinfarktinduktion führten zu keinem Anstieg der Zellzahl. Dies höchstwahrscheinlich aufgrund der Depletion der zugeführten Zellen bei gleichzeitiger Applikation des anti-Gr-1 Antikörpers. Weiterhin konnte auch kein Anstieg der Zellinfiltration sowie keine Verbesserung der LV Funktion oder eine Steigerung der Überlebensrate erreicht werden.

### 3.4. Die Rolle von Cathelicidin bei der Pathogenese des Myokardinfarktes

Der antikörpervermittelte Eingriff in die Zellmobilisierung nach Myokardinfarkt und genetisch ausgeschaltete Rekrutierungen offenbarten eine signifikante Verminderung der Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis in den vorangegangenen Kapiteln. Deshalb sollte die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis und davon abhängige Reparaturmechanismen nach Myokardinfarkt noch genauer untersucht werden. Cathelicidin ist ein granuläres Peptid, welches u.a. von Neutrophilen sezerniert wird, sobald diese aus dem Blutgefäß ins Gewebe emigrieren. Es dient zur Rekrutierung von weiteren Neutrophilen und Monozyten. Bei CRAMP Knock-out Tieren ist die Produktion des Cathelicidins ausgeschaltet.

#### 3.4.1 Cathelicidinmangel führt zu einer erhöhten Mortalitätsrate, verstärktem „cardiac remodeling“ und Verschlechterung der LV Funktion

An Tag 1, 3 und 7 nach OP erfolgte bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren die Durchführung eines Herzultraschalls (Abbildung 3-24). Die Ejektionsfraktion ein Tag nach SHAM Operation betrug bei C57BL/6 Tieren 67,5 % und bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren 64,6 % (Abbildung 3-25, A).

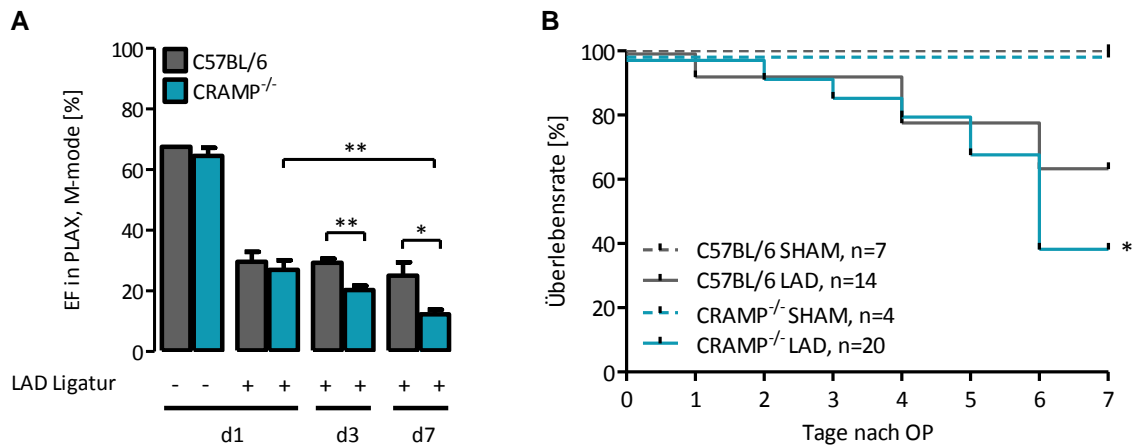


#### Abbildung 3-24: Versuchsablauf C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Mäuse

C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere wurden entweder LAD-ligiert oder SHAM-operiert (d0). Anschließend wurden an Tag (d) 1, 3, 7 nach OP Versuche (ECHO/FACS) durchgeführt.

Die Induktion des Myokardinfarktes war assoziiert mit der Abnahme der Ejektionsfraktion. CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere hatten sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 nach Infarktoperation eine deutlich verschlechterte Herzpumpfunktion im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Abbildung 3-25, A; d3, 29,3 ± 1,3 % vs. 20,3 ± 1,4 %; d7, 25,1 ± 4,4 % vs. 12,3 ± 1,5 %). Zusätzlich war die Ejektionsfraktion bei infarzierten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an Tag 7 signifikant schlechter als an Tag 1 nach OP. Die Überlebensrate in der CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Gruppe betrug sieben Tage nach OP 41 % und war eindeutig schlechter

als in der C57BL/6 LAD Gruppe mit 64 %. SHAM-operierte Tiere überlebten zu 100 % (Abbildung 3-25, B). Sieben Tage nach Infarktinduktion konnte sowohl bei C57BL/6 Tieren als auch bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren die Abnahme der relativen Wanddicke des linken Ventrikels (RWT) sowie die Zunahme des LV Masse Index im Vergleich zu den jeweils SHAM-operierten Tieren beobachtet werden (Abbildung 3-26, A).

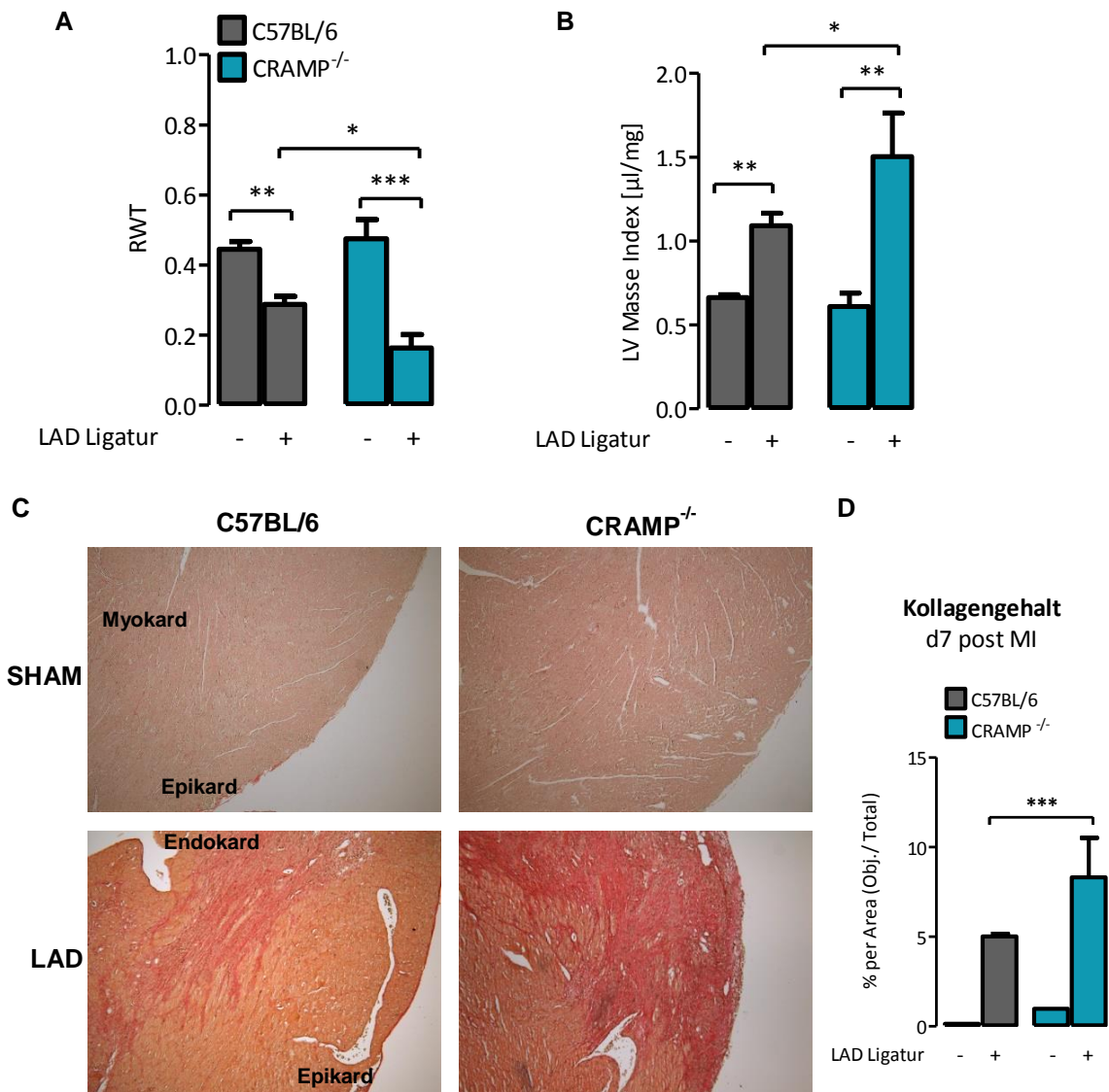


**Abbildung 3-25: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

**A**, Grafische Darstellung der Ejektionsfraktion in Prozent in der PLAX in der M-mode Darstellung an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-15 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05. **B**, Überlebensrate in Prozent; n=4-20; Log-rank (Mantel-Cox) Test; \*, p<0,05.

Infarktoperierte CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere zeigten ein verstärktes „cardiac remodeling“. Einerseits nahm die RWT im Vergleich zu LAD-ligierten C57BL/6 Tieren signifikant ab. Andererseits war der mittlere LV Masse Index maßgeblich erhöht im Vergleich zur C57BL/6 LAD Gruppe (Abbildung 3-26, B;  $1,1 \pm 0,1 \mu\text{l}/\text{mg}$  vs.  $1,5 \pm 0,3 \mu\text{l}/\text{mg}$ ). Abbildung 3-26, C und D zeigt die Fibrosebildung im Herzgewebe sieben Tage nach Operation. Der mittlere prozentuale Kollagenanteil bezogen auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels - als Marker für die Fibrosebildung - war signifikant erhöht im infarzierten Herz von CRAMP<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu infarzierten C57BL/6 Kontrolltieren ( $5,0 \pm 0,2 \%$  vs.  $8,3 \pm 2,2 \%$ ).





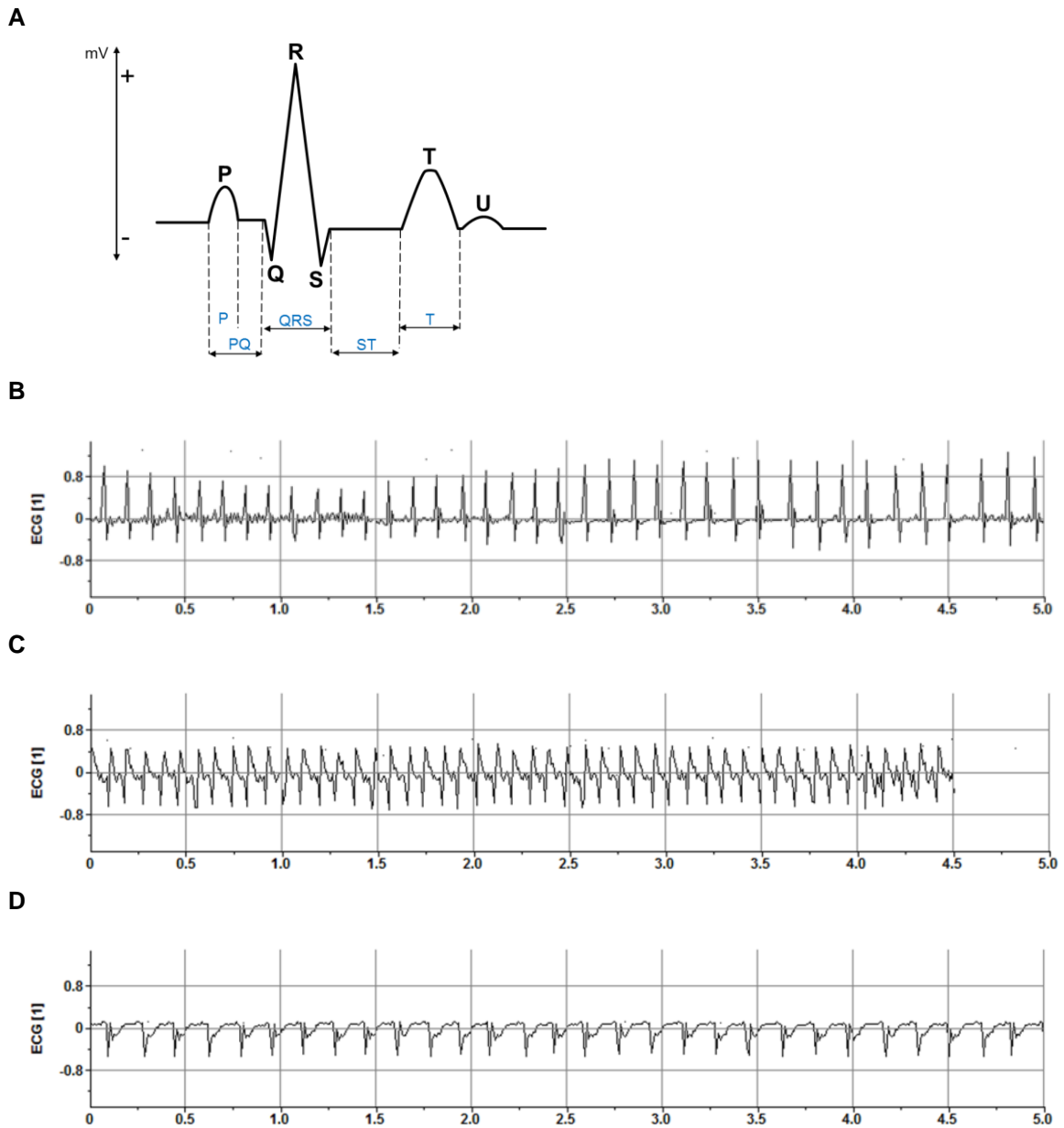
**Abbildung 3-26: „Cardiac remodeling“ bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

**A**, Relative Wanddicke des linken Ventrikels („relative wall thickness“, RWT); Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=2-10$  Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*,  $p<0,001$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*,  $p<0,05$ . **B**, LV Masse Index in  $\mu\text{l}/\text{mg}$  an d7 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau); Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=2-9$  Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*,  $p<0,001$ ; \*,  $p<0,05$ . **C**, Sirius Rot Färbung von Herzparaffinschnitten an d7 nach OP; 10-fach Vergrößerung. **D**, Kollagengehalt, kalkuliert in Prozent pro Herzareal bezogen auf Gesamtfläche des linken Ventrikels (% per Area/ Total); Mittelwert  $\pm$  SEM;  $n=3-5$  Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*,  $p<0,001$ .

### 3.4.2 Induktion des Myokardinfarktes führt zu einer pulslosen elektrischen Aktivität mit Herzkreislaufstillstand bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

Zur genaueren Analyse von malignen Herzrhythmusstörungen nach Myokardinfarkt wurden die Tiere mit einem EKG-Transmitter ausgestattet. Vor Induktion des Myokardinfarktes konnte eine normale Erregungsableitung von Vorhof und Kammer

mittels der implantierten EKG-Transmitter aufgezeichnet werden. Beim akuten Myokardinfarkt an Tag 1 nach LAD Ligatur konnte eine ST-Streckenhebung sowie eine PQ Zeitverlängerung identifiziert werden (Abbildung 3-27).



**Abbildung 3-27: Elektrokardiogramm**

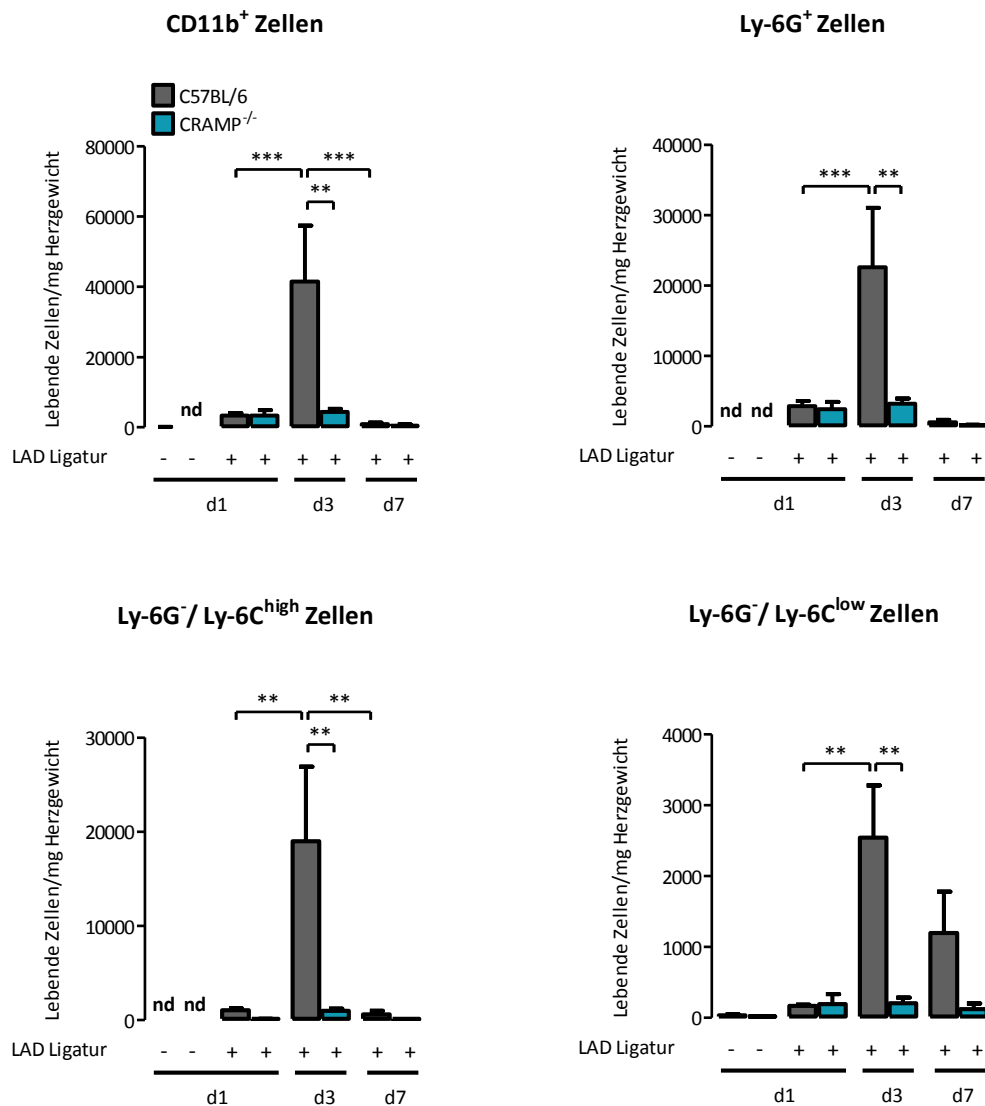
**A**, Schematische Darstellung eines EKGs. Die P-Welle zeigt der Erregung der Vorhöfe. Die PQ-Zeit entspricht der Summe der Vorhoferregung. Der QRS-Komplex repräsentiert die Ventrikeldepolarisation. Die QT-Zeit stellt die Zeit von Beginn der Ventrikeldepolarisation bis zum Ende der Repolarisation dar. Die ST-Strecke entspricht der Ventrikeldepolarisation. Die T-Welle entspricht der Ventrikelrepolarisation. **B**, Vor Operation (repräsentatives EKG einer C57BL/6 Maus), normale Erregung von Vorhof und Kammer erkennbar. **C**, 1d nach LAD Ligatur (repräsentatives EKG einer C57BL/6 Maus), ST-Streckenhebung bei akutem MI. **D**, 7d nach LAD Ligatur (repräsentatives EKG einer C57BL/6 Maus); Langsame Rhythmusstörung (PEA) führt zum Versterben, sowohl bei C57BL/6 als auch bei CRAMP-defizienten Tieren.

Sieben Tage nach Myokardinfarktinduktion kommt es sowohl bei C57BL/6 Tieren als auch bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren zu einer bradykarden Herzrhythmusstörung. Diese Form der langsamen Herzfrequenzstörung wird PEA (pulslose elektrische Aktivität) genannt. Die Erregungsabläufe am infarzierten Herzen werden dabei immer langsamer bzw. finden zwischen den Erregungen immer längere Abstände statt, so dass die elektrische Aktivität keine mechanische Reaktion des Herzens bewirken kann und es zum Herzkreislaufstillstand kommt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Erregungsableitungen zwischen C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup>-Tieren nach Myokardinfarkt detektieren.

### **3.4.3 Verminderter Zellinflux bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt**

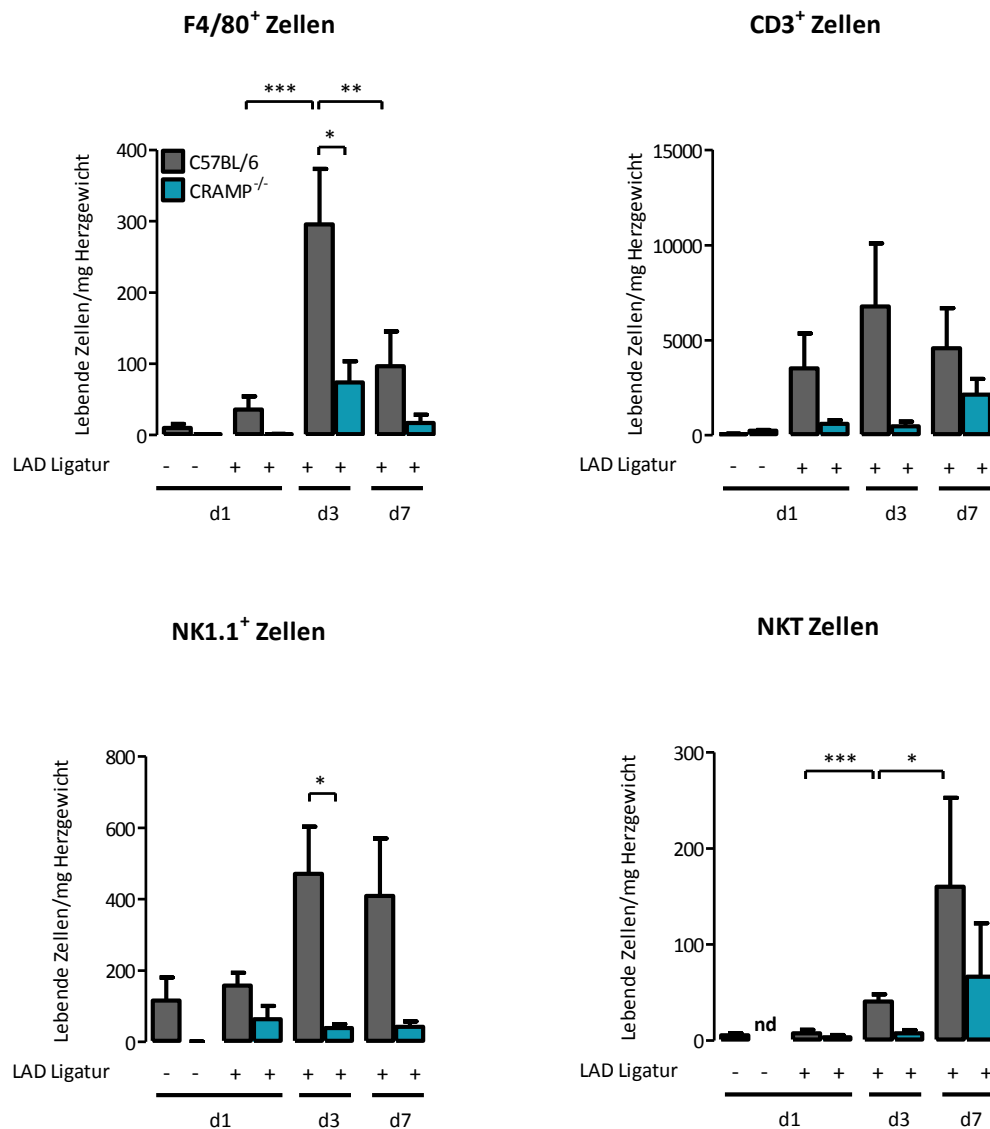
Die Zellinfiltration ins Myokard sowie der Anteil an Inflammationszellen im Milzgewebe und im venösen Blut wurden mittels FACS an Tag 1, 3 und 7 nach OP untersucht. Für die Zellfärbung wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1 und F4/80 verwendet (siehe „gating“ Strategie unter Kapitel 2.2.8.2).

Bei C57BL/6 Tieren war die Myokardinfarktinduktion mit einem Anstieg der Inflammationszellinfiltration in das infarzierte Herzgewebe verbunden. Signifikant mehr lebenden CD11b<sup>+</sup> Zellen, sowie Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten infiltrierten das Myokardinfarktgewebe von C57BL/6 Tieren drei Tage nach OP im Vergleich zu Tag 1 und Tag 7 nach OP (Anhang Tabelle 18; Abbildung 3-28). Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen und Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten infiltrierten an Tag 3 stärker das infarzierte Myokardinfarktgewebe von C57BL/6 Tieren als an Tag 1. Bei CRAMP-defizienten LAD Tieren konnte kein Anstieg der Inflammationszellinfiltration innerhalb des Beobachtungszeitraums identifiziert werden. Stattdessen war die mittlere Anzahl an CD11b<sup>+</sup> Zellen (41487 ± 15918 Zellen vs. 4337 ± 913 Zellen) sowie an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen (22575 ± 8450 Zellen vs. 3232 ± 703 Zellen), inflammatorischen Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten (18996 ± 7881 Zellen vs. 965 ± 234 Zellen) und reparativen Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten (2542 ± 739 Zellen vs. 205 ± 82 Zellen) im kardialen Infarktareal von CRAMP-defizienten Tieren signifikant vermindert drei Tage nach OP im Vergleich zu C57BL/6 Tieren (Abbildung 3-28).



**Abbildung 3-28: FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

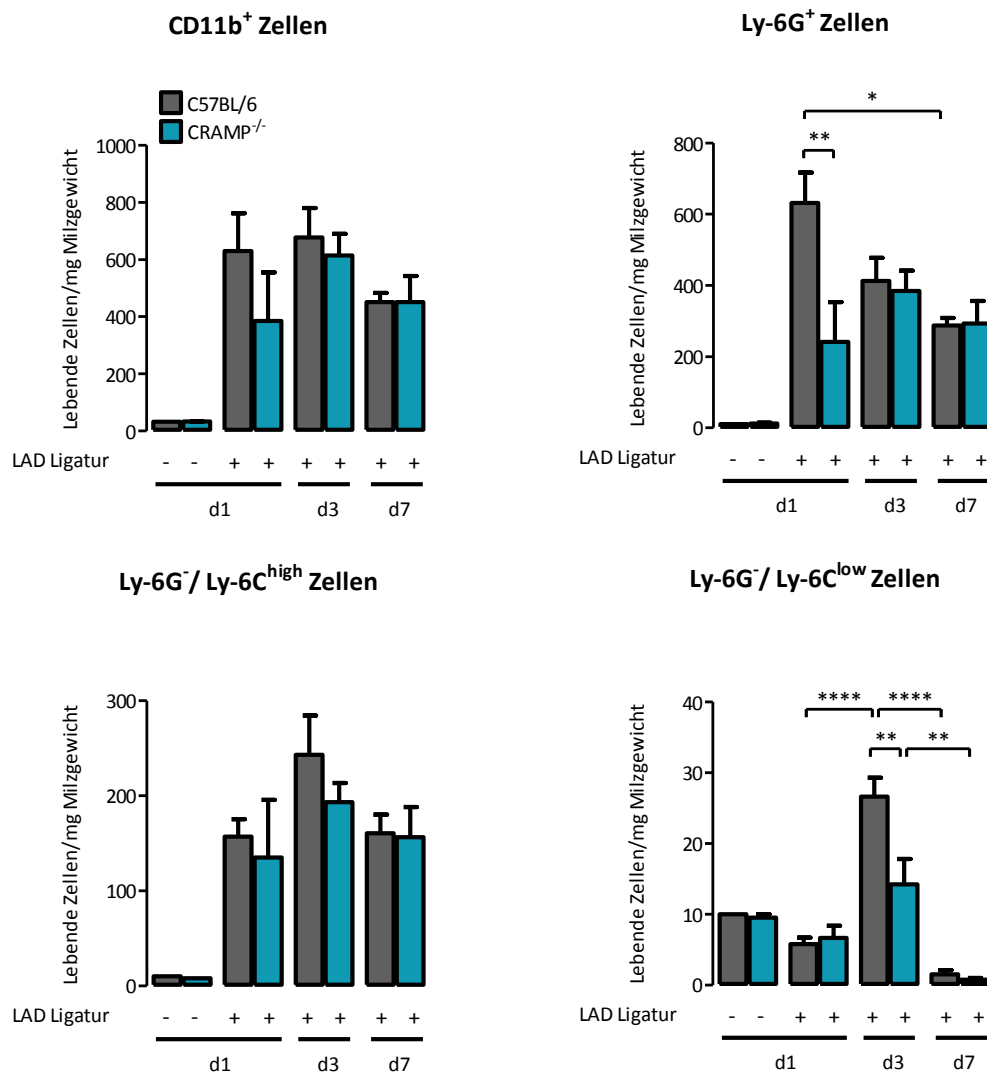
Grafische Darstellung der FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau). PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-12 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01. nd, nicht detektierbar.



**Abbildung 3-29: FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau). PO-PRO-1<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup> Zellen und PO-PRO-1<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD11b<sup>-</sup>/ NK1.1<sup>+</sup>/ CD3<sup>+</sup> NKT Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-12 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05. nd, nicht detektierbar.

Es konnten deutlich mehr F4/80<sup>+</sup> Makrophagen bei C57BL/6 LAD Tieren an Tag 3 verglichen mit Tag 1 und Tag 7 nach OP nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 18; Abbildung 3-29). Drei Tage nach Infarktinduktion waren signifikant weniger F4/80<sup>+</sup> Zellen und NK1.1<sup>+</sup> Zellen bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren detektierbar, verglichen mit der C57BL/6 LAD Gruppe. Bei infarktoperierten C57BL/6 Tieren stieg zudem die mittlere Anzahl an NKT Zellen an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1 und noch einmal an Tag 7 im Vergleich zu Tag 3.

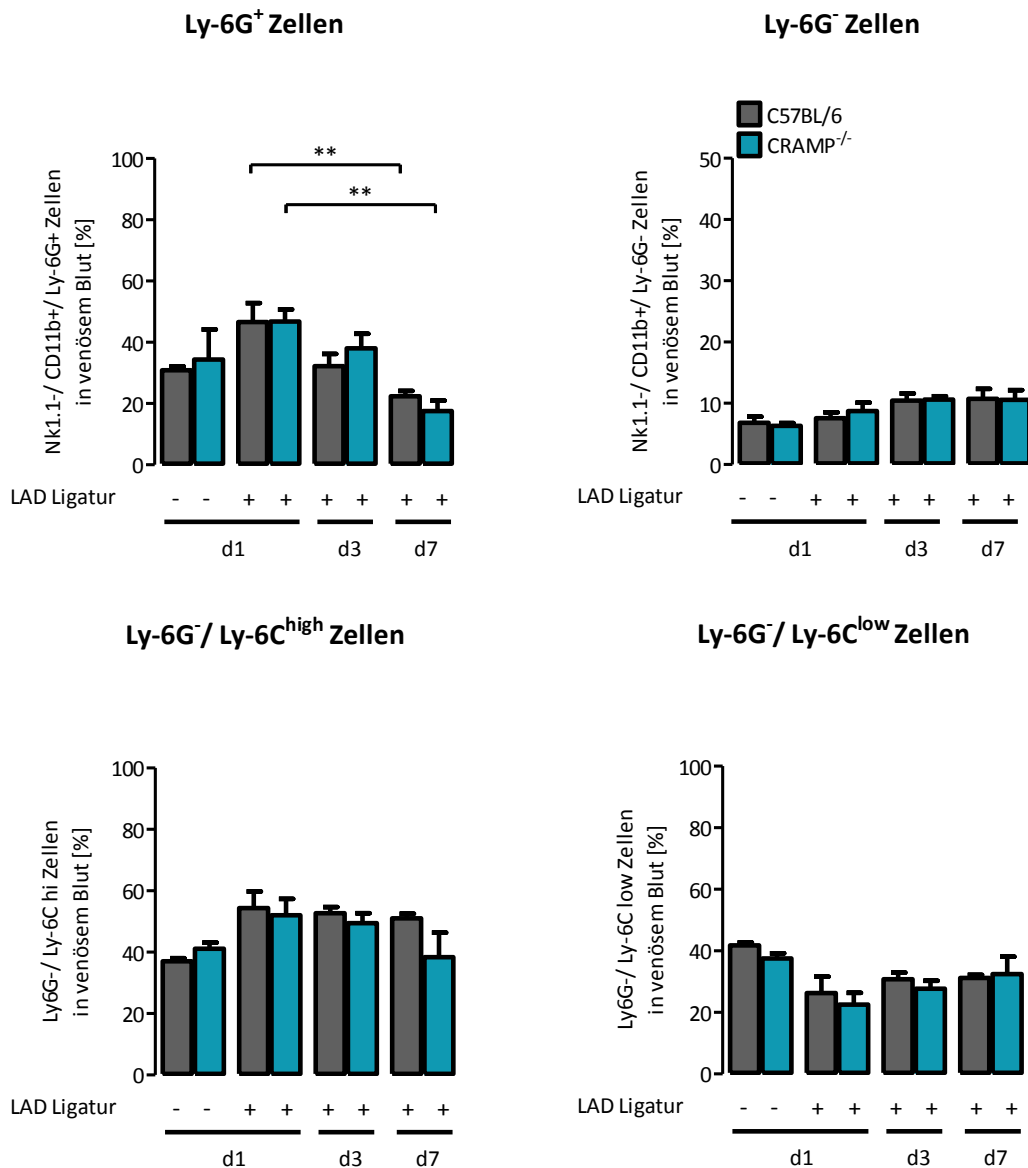


**Abbildung 3-30: FACS Analyse von Milzgewebe bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau). PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

Die Myokardinfarktinduktion war zu Beginn mit einer Zunahme der myeloiden Entzündungszellzahl im Milzgewebe der operierten Tiere verbunden (Abbildung 3-30). Anschließend, ab Tag 7 nach OP nahm die Anzahl an lebenden Ly-6G<sup>+</sup> Zellen pro mg Milzgewicht bei C57BL/6 LAD Tieren im Vergleich zu Tag 1 signifikant ab. Die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen pro mg Milzgewicht an Tag 1 nach Infarkt OP war bei C57BL/6 LAD Tieren entscheidend höher als bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (Abbildung 3-30; 632  $\pm$  86 Zellen vs. 242  $\pm$  112 Zellen). Bei CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren nahm die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Milzgewebe ab Tag 7 im Vergleich zu Tag 3 signifikant

ab. Drei Tage nach Infarkt OP konnten ebenfalls mehr Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Milzgewebe von C57BL/6 Tieren im Vergleich zu Tag 1 und Tag 7 nachgewiesen werden. Die mittlere Anzahl an Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Zellen pro mg Milzgewicht an Tag 3 nach Infarkt OP war bei C57BL/6 LAD Tieren eindeutig höher als bei CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren ( $27 \pm 3$  Zellen vs.  $14 \pm 4$  Zellen).



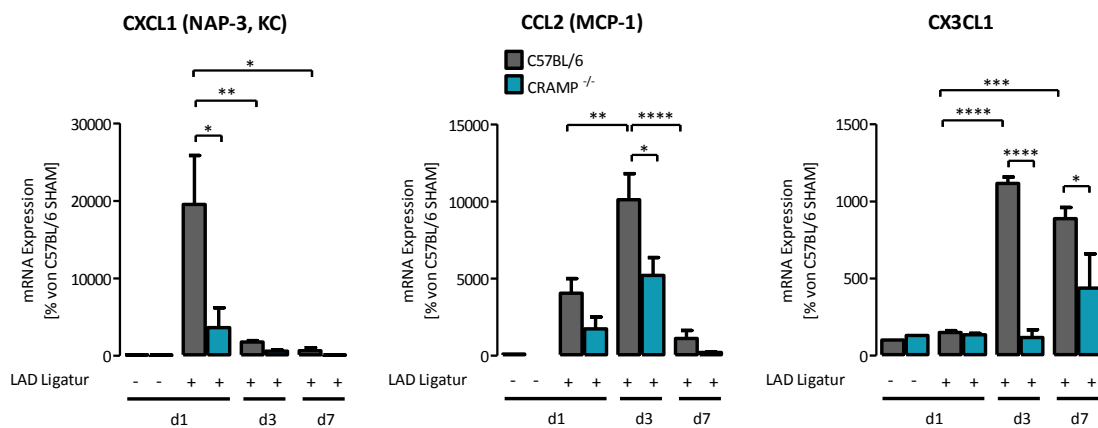
### Abbildung 3-31: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau). Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>+</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-12 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*, p<0,01.

Ein Tag nach Infarkt OP betrug der prozentuale Anteil an Ly-6G<sup>+</sup> Zellen in venösem Blut von C57BL/6 Tieren  $46,6 \pm 6,2$  % und war signifikant höher als an Tag 7 ( $22,4 \pm 1,7$  %) nach Infarkt OP (Abbildung 3-31). Einen vergleichbaren, prozentualen Anteil an Ly-6G<sup>+</sup> Zellen mit  $46,8 \pm 3,9$  % konnte im venösem Blut von CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren an Tag 1 festgestellt werden. Ab Tag 7 nahm auch bei CRAMP-defizienten Tieren der prozentuale Anteil an Ly-6G<sup>+</sup> Zellen wieder ab im Vergleich zu Tag 1 ( $17,5 \pm 3,4$  %). In Bezug auf Ly-6G<sup>-</sup> Zellen ließen sich keine Unterschiede nachweisen.

### 3.4.4 Verminderte Neutrophilen-Chemotaxis, Monozyten-Chemotaxis und IL-12-abhängiges „IFN- $\gamma$ -signaling“ bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt

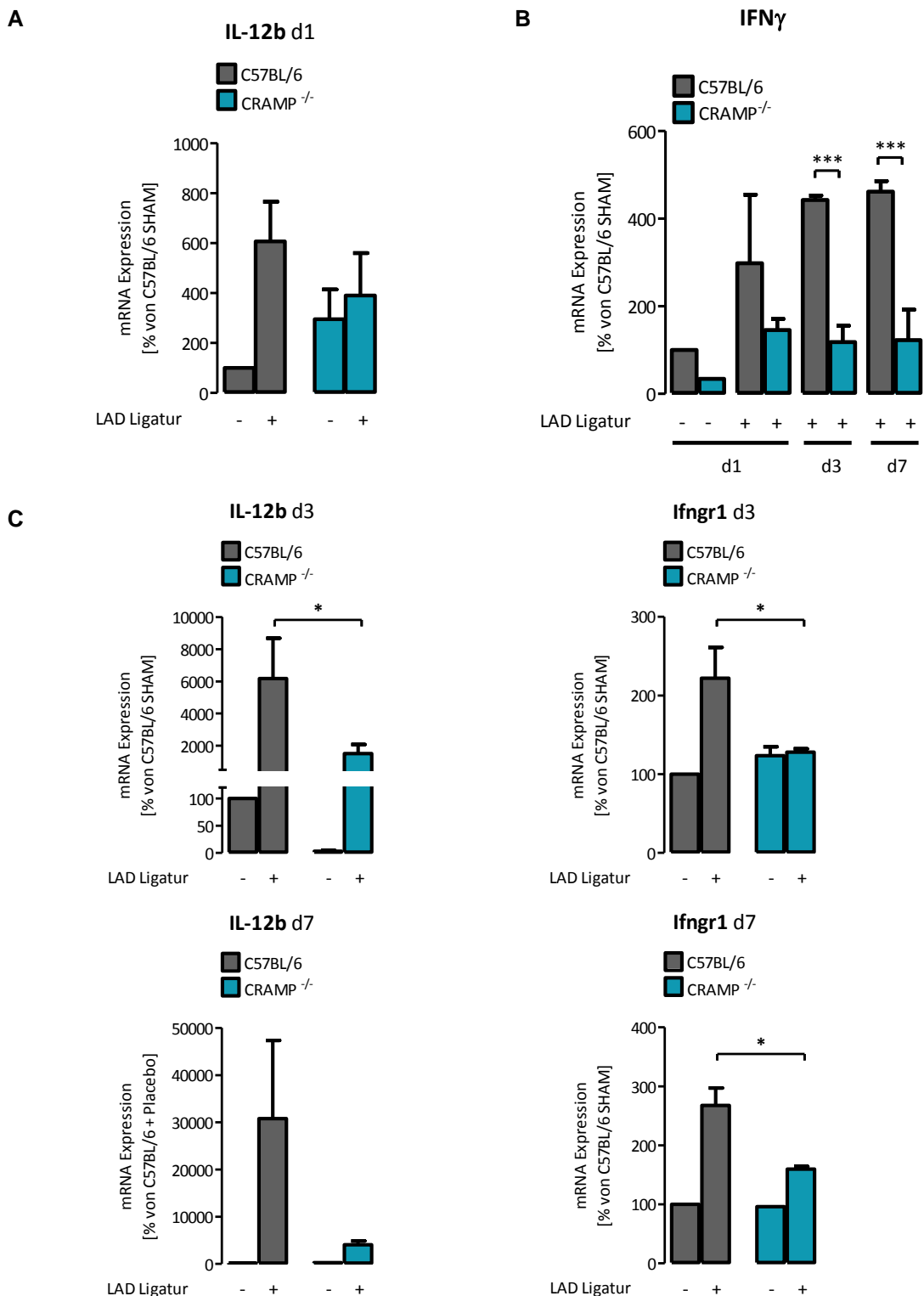
Zum Nachweis der Modifikationen der Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis und der damit verbundenen, abweichenden Zellrekrutierung nach Myokardinfarkt wurde die mRNA Expression von entscheidenden Mediatoren bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Mäusen mittels real-time PCR untersucht. Abbildung 3-32 zeigt die mRNA Expressionslevel der Chemokine CXCL1, CCL2, CX3CL1 in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM, wurde auf 100 % gesetzt) an Tag 1, 3 und 7 nach OP.



**Abbildung 3-32: Kardiale mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**  
Graphische Darstellung der kardialen mRNA Expressionsanalyse der Chemokine CXCL1, CCL2, CX3CL1 an d1 nach SHAM Operation (-) oder an d1, d3, d7 nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau); Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

LAD-ligierte C57BL/6 Tieren besaßen ein CXCL1 mRNA Expressionsmaximum an Tag 1 verglichen mit Tag 3 und Tag 7 nach OP. Das mittlere Expressionslevel von CXCL1, wichtig für die Neutrophilen-Chemotaxis, war einen Tag nach Infarkt OP signifikant vermindert im Herzgewebe von CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu C57BL/6 Tieren ( $19534,0 \pm 6328,0$  % vs.  $3628,0 \pm 2583,0$  %).





**Abbildung 3-33: mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

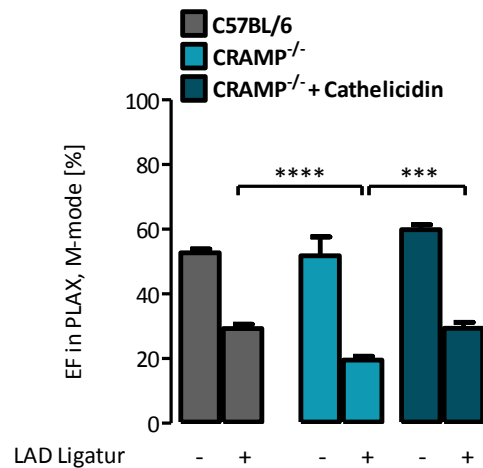
**A**, Graphische Darstellung der kardialen IL-12b mRNA Expression ein Tag nach SHAM Operation (-) und nach LAD Ligatur (+) bei C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (blau); Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns. **B**, IFN- $\gamma$  mRNA Expressionsanalyse an d1, d3, d7 nach OP; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-5 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*, p<0,001. **C**, Ifngr1 und IL-12b mRNA Expressionsanalyse an Tag 3 und Tag 7 nach OP; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*, p<0,05.

CCL2, ein wichtiges Chemokin für die Monozyten-Chemotaxis, war drei Tage nach Infarkt OP deutlich vermindert exprimiert bei CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren ( $10116,0 \pm 1690,0$  % vs.  $5206,0 \pm 1161,0$  %). Weiterhin konnte bei C57BL/6 LAD-ligierten Tieren ein CCL2 mRNA Expressionsmaximum an Tag 3 im Vergleich zu Tag 1 und Tag 7 nach OP festgestellt werden. Das mittlere Expressionslevel von CX3CL1, ein wichtiger Mediator für die Chemotaxis von reparativen Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten, war drei Tage und sieben Tage nach Infarkt OP signifikant vermindert im Herzgewebe von CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Anhang Tabelle 21; Abbildung 3-32). An Tag 3 und Tag 7 stieg bei C57BL/6 LAD Tieren die CX3CL1 mRNA Expression im Vergleich zu Tag 1. Zusätzlich wurde die Expression von IFN- $\gamma$  bei Cathelicidin-defizienten Mäusen überprüft. Das IFN- $\gamma$  mRNA Expressionslevel war bei CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren an Tag 3 und Tag 7 nach Infarkt OP eindeutig verringert im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Anhang Tabelle 23; Abbildung 3-33, B). Die mittleren Expressionslevel von IL-12b und Ifngr1 waren ebenfalls entscheidend vermindert im Herzgewebe von CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tieren im Vergleich zu C57BL/6 LAD Tieren (Anhang Tabelle 22; Abbildung 3-33, C). Die verringerte myokardiale Infiltration an Monozyten/Makrophagen und Nk1.1<sup>+</sup> Zellen sowie die reduzierte Expression von IL-12b und Ifngr1 bestätigen die Verminderung der IL-12- und IFN- $\gamma$  abhängigen, wechselseitigen Aktivierung/Rekrutierung zwischen diesen Zellen in CRAMP-defizienten Tieren.

#### **3.4.5 Rekonstitution des Wildtyp-Phänotypus bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt**

CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere sollten mit Cathelicidin behandelt werden, um eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotypus in Bezug auf Zellinfiltration und linksventrikulärer Funktion zu erreichen. Die Tiere wurden ein Tag nach Infarkt OP subkutan mit synthetisch hergestelltem Cathelicidin behandelt (siehe Abbildung 2-6 unter Kapitel 2.2.6). Der aussagekräftigste Effekt des Cathelicidin Knock-outs war an Tag 3 nach OP feststellbar. Wildtyp C57BL/6 LAD Tieren besaßen an diesem Tag den maximalen Zellinflux an myeloiden Zellen, CRAMP<sup>-/-</sup> LAD Tiere hingegen hatten eine signifikant verminderte linksventrikuläre Leistung (Abbildung 3-25), deutlich weniger infiltrierte Neutrophile und Monozyten im infarzierten Herzgewebe (Abbildung 3-28), verringerte IFN- $\gamma$  Expression (Abbildung 3-33) sowie eine signifikant verminderte Monozyten-Chemotaxis (Abbildung 3-32) infolge der genetischen CRAMP-Defizienz. Aus diesem Grund wurde an Tag 3 nach Infarkt OP ebenfalls eine FACS Analyse und ein Herzultraschall bei Cathelicidin-

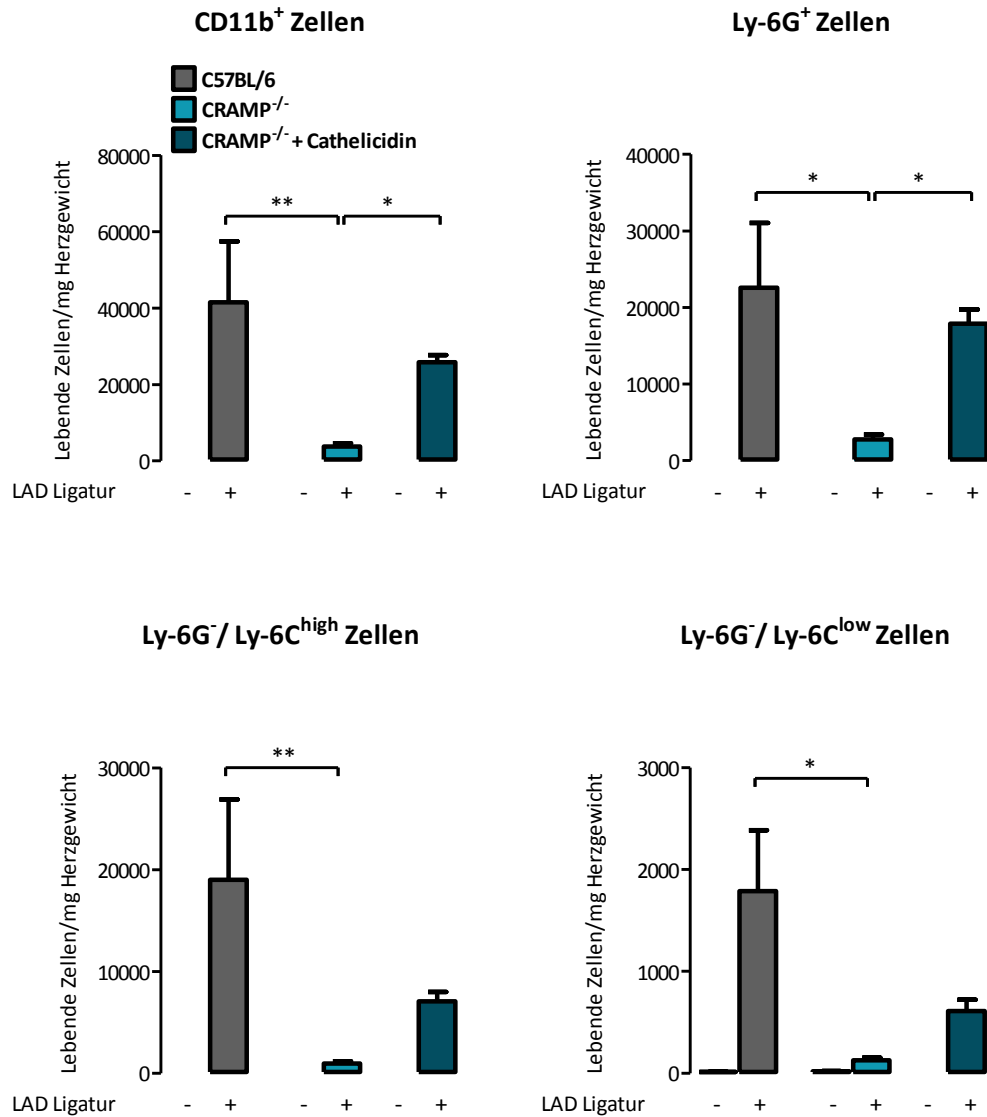
behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere durchgeführt. Die Behandlung mit Cathelicidin führte zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotypus - die LV-Funktion bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren konnte durch die zusätzliche Gabe von Cathelicidin signifikant verbessert werden. Drei Tage nach Infarkt OP betrug die Ejektionsfraktion bei Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren  $29,4 \pm 1,8 \%$ , deutlich höher als bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren mit  $19,5 \pm 1,2 \%$  (Abbildung 3-34).



**Abbildung 3-34: LV Funktionsanalyse bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP**

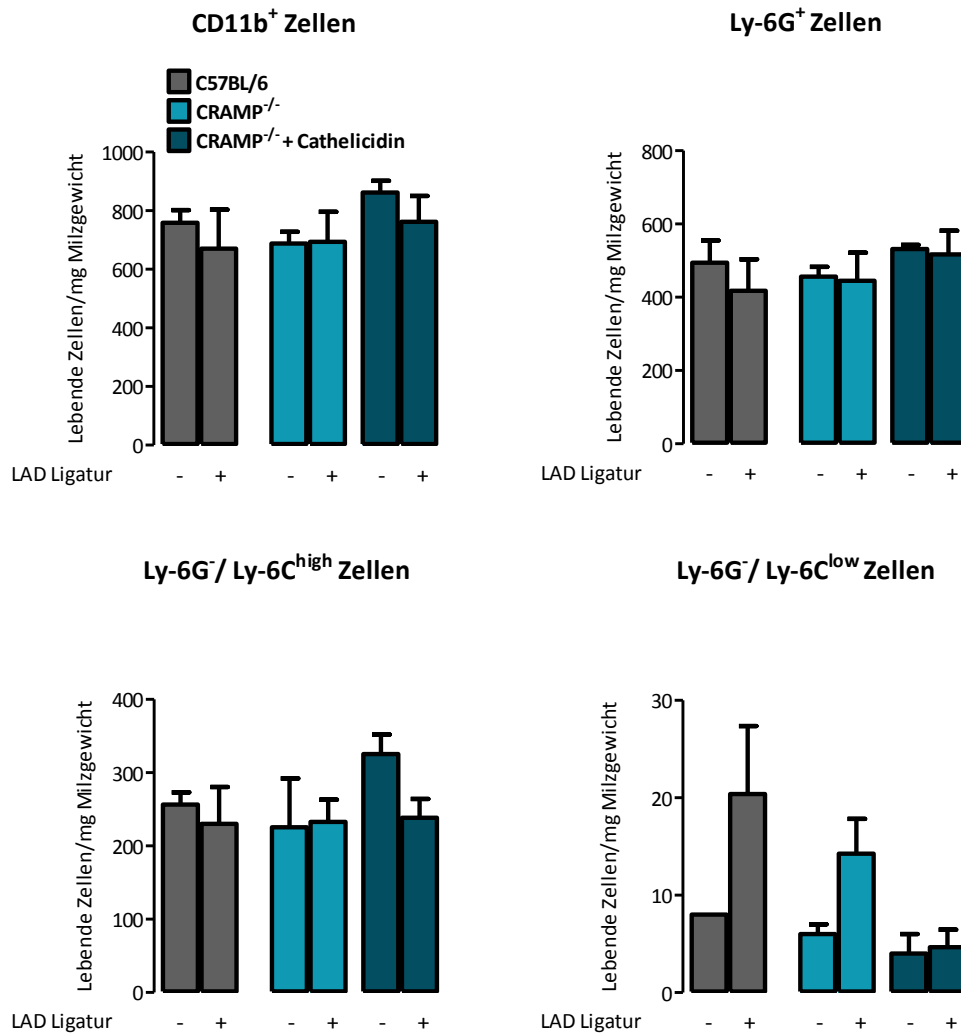
Grafische Darstellung der EF in Prozent in der PLAX in der M-mode Darstellung an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren sowie mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-15 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001.

Weiterhin bewirkte die Behandlung mit Cathelicidin bei LAD-ligierten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren eine Wiederherstellung der Neutrophilen-Chemotaxis und eine Rekonstitution von myeloiden Zellen im Myokard. Bei Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren konnte drei Tage nach Infarktinduktion signifikant mehr CD11b<sup>+</sup> Zellen (CRAMP<sup>-/-</sup> LAD,  $3745 \pm 851$  Zellen vs. CRAMP<sup>-/-</sup> + Cathelicidin LAD,  $25800 \pm 1926$  Zellen) und Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen (CRAMP<sup>-/-</sup> LAD,  $2775 \pm 655$  Zellen vs. CRAMP<sup>-/-</sup> + Cathelicidin LAD,  $17889 \pm 1840$  Zellen) pro mg Herzgewicht detektiert werden als bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (Abbildung 3-35). Und es konnten marginal mehr Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Infarktgewebe von Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren verglichen mit CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt werden (Anhang Tabelle 25; Abbildung 3-35). Neutrophile geben Cathelicidin bekanntermaßen bei Emigration aus dem Blutgefäß ins Gewebe frei und rekrutieren damit wiederum Neutrophile und Monozyten.



**Abbildung 3-35: Herz-FACS Analyse der Zellinfiltration bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP**

Grafische Darstellung der FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (hellblau) sowie mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (dunkelblau). PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten wurden analysiert; Mittelwert ± SEM; n=2-13 Tiere; One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test), Dunn`s multiple comparison Test; \*\*, p<0,01; \*, p<0,05.

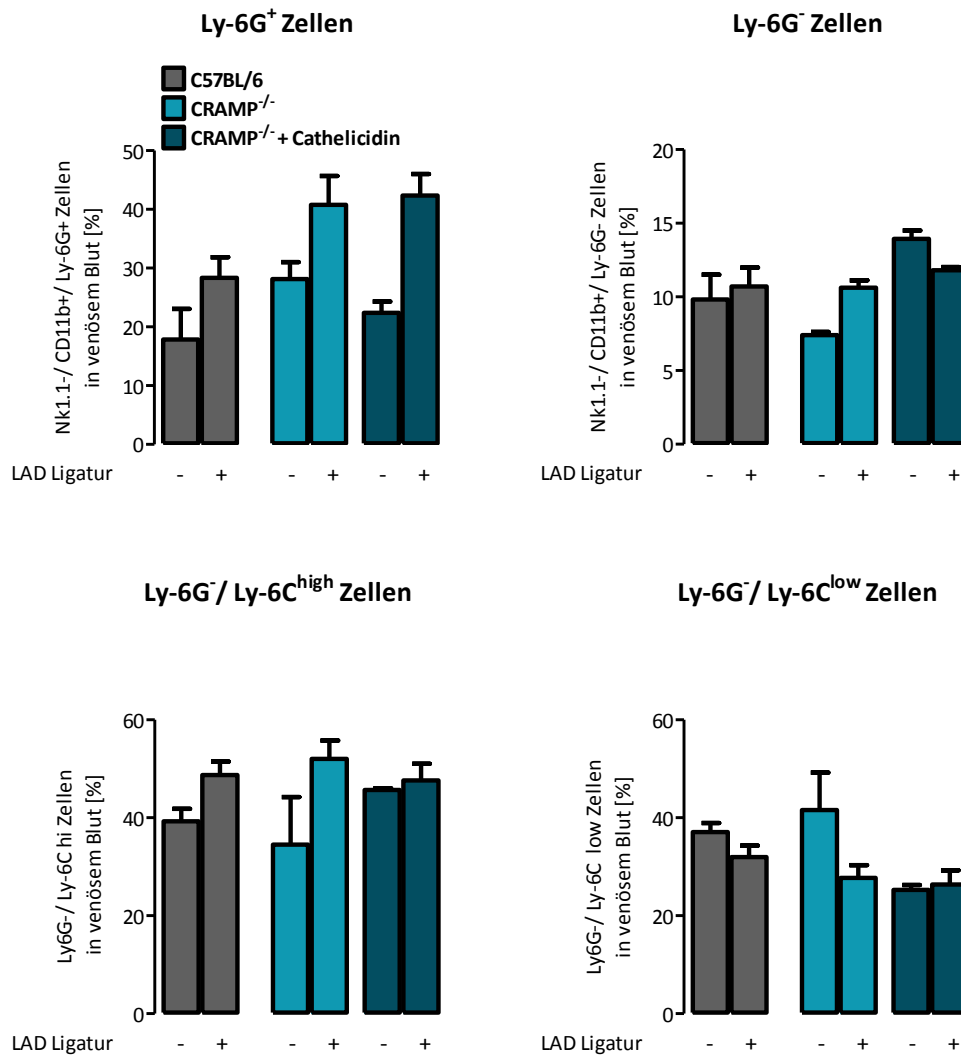


**Abbildung 3-36: FACS Analyse von Milzgewebe bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (hellblau) sowie mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (dunkelblau). PO-PRO-1/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1/ CD45<sup>+</sup>/ CD3<sup>-</sup>/ CD11b<sup>+</sup>/ Ly-6G<sup>-</sup>/ Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten wurden analysiert; Mittelwert ± SEM; n=2-8 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

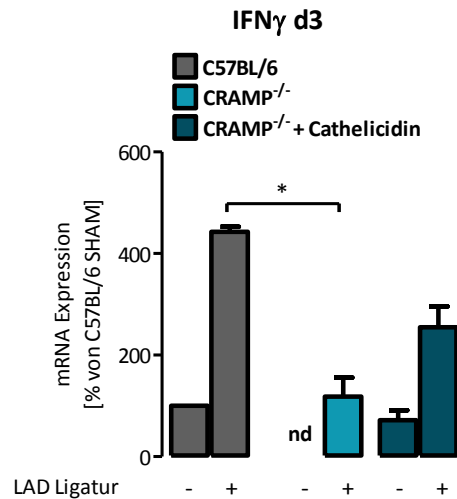
Im Milzgewebe und im venösen Blut konnten - nach experimenteller Cathelicidin-Behandlung - keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Cathelicidin-vermittelten Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis detektiert werden (Anhang Tabelle 26 und 27; Abbildung 3-36 und Abbildung 3-37).

Darüber hinaus konnte jedoch ein marginaler Anstieg an kardialer IFN- $\gamma$  mRNA bei Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren verglichen mit CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt werden (Anhang Tabelle 28; Abbildung 3-38).



**Abbildung 3-37: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP**

Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von C57BL/6 (grau) und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (hellblau) sowie mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren (dunkelblau). Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert ± SEM; n=2-13 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.



**Abbildung 3-38: IFN- $\gamma$  mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP**

Graphische Darstellung der kardialen IFN- $\gamma$  mRNA Expressionsanalyse an d3 nach SHAM Operation (-) oder LAD Ligatur (+) von C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren sowie mit Cathelicidin-behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=1-3 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*, p<0,05.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Cathelicidin-Defizienz im Vergleich zu C57BL/6 Tieren zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate, einem verstärktem „cardiac remodeling“ und einer Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion nach Myokardinfarktinduktion führt. Der Mangel an Cathelicidin resultierte in einer deutlich verminderten Zelleinwanderung an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten, sowie F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und NK1.1<sup>+</sup> Zellen ins infarzierte Myokard. Zusätzlich konnten weniger Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile und Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten im Milzgewebe von CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren detektiert werden. Ergänzend konnte eine eindeutig verminderte Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu C57BL/6 Tieren nach Herzinfarkt festgestellt werden. Signifikant geringere CXCL1, CCL2 und CX3CL1 mRNA Expressionslevel führten zu einer verminderten Rekrutierung entsprechender Zielzellen. Zusätzlich zeigten CRAMP-defiziente Tiere ein geringeres kardiales IFN- $\gamma$  mRNA Expressionslevel nach Myokardinfarkt und sowie ein beeinträchtigtes „IFN- $\gamma$ -signaling“ - gemessen an den signifikant geringeren IL-12b und Ifn $\gamma$ 1 mRNA Expressionslevel.

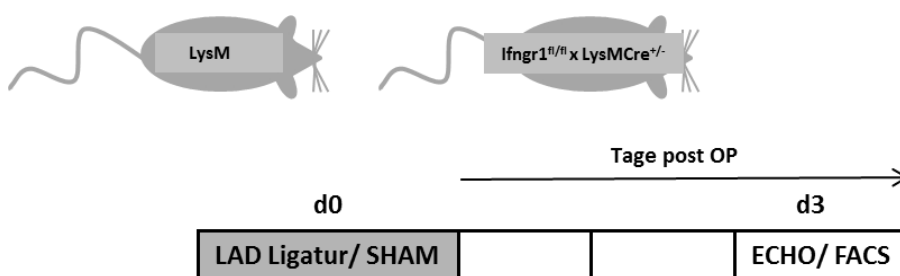
Die Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotypus bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt war über Behandlung mit synthetischem Cathelicidin möglich und führte zu einem Anstieg der myeloiden Zellinfiltration ins infarzierte Herzgewebe sowie zu einer Verbesserung der LV-Funktion.

### 3.5 Effekte der *Ifngr1*-Defizienz auf LV Funktion und Zellrekrutierung nach Myokardinfarkt

Sowohl bei anti-Gr-1 behandelten als auch bei CRAMP-defizienten Tieren mit Herzinfarkt wurden signifikant geringere *Ifngr1* und  $\text{IFN-}\gamma$  mRNA Expressionslevel im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren gemessen. Daher sollte der Einfluss der *Ifngr1*-Defizienz auf Herzfunktion und Zellinfiltration nach Myokardinfarkt weiter definiert werden. *Ifngr1* wird vorrangig von Makrophagen exprimiert und bindet als Untereinheit des Interferon-gamma Rezeptors spezifisch  $\text{IFN-}\gamma$ .

#### 3.5.1 *Ifngr1*-Defizienz führt zu einer Verschlechterung der systolischen Herzleistung nach Myokardinfarkt

An Tag 3 nach OP erfolgte bei *LysM* und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren die Durchführung eines Herzultraschalls (Abbildung 3-39). Die Ejektionsfraktion drei Tage nach SHAM Operation betrug bei *LysM* Tieren 51,9 % und bei *Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren 55,9 %.

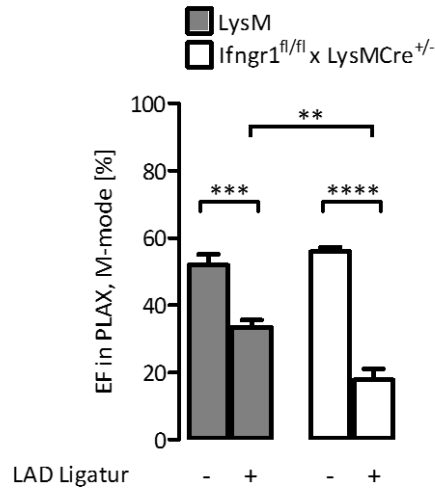


#### Abbildung 3-39: Versuchsablauf *LysM* und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tiere

*LysM* und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tiere wurden entweder LAD-ligiert oder SHAM-operiert (d0). Anschließend wurde an Tag (d) 3 nach OP Versuche (ECHO/FACS) durchgeführt.

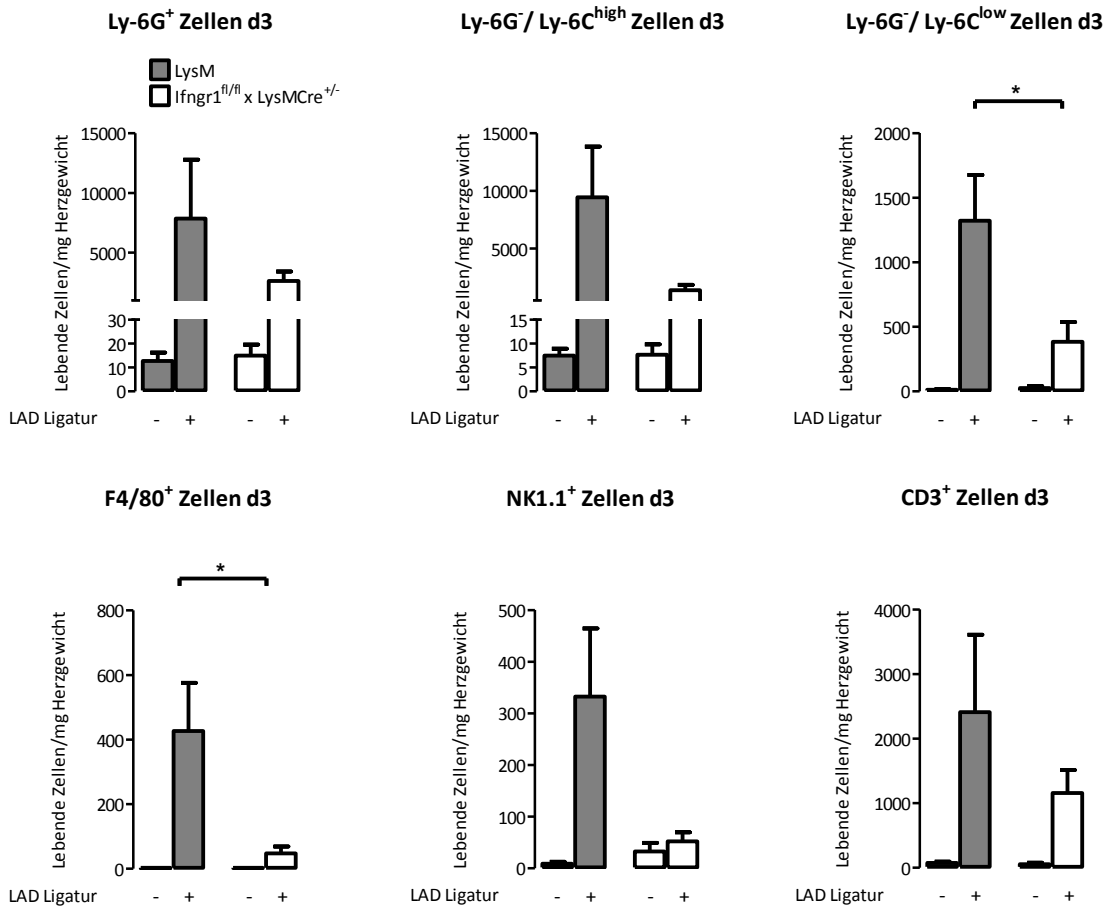
Die Induktion des Myokardinfarktes war mit einer Abnahme der Ejektionsfraktion verbunden. *Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tiere hatten zudem drei Tage nach Infarktoperation eine signifikant verschlechterte Herzpumpfunktion im Vergleich zu *LysM* Tieren (Abbildung 3-40;  $33,4 \pm 2,1$  % vs.  $17,8 \pm 3,2$  %).





**Abbildung 3-40: Kardiale Funktion bei LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren an d3**  
 Grafische Darstellung der Ejektionsfraktion in Prozent in der PLAX in der M-mode Darstellung an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) von LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren; Mittelwert ± SEM; n=3-6 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*\*\*\*, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001; \*\*, p<0,01.

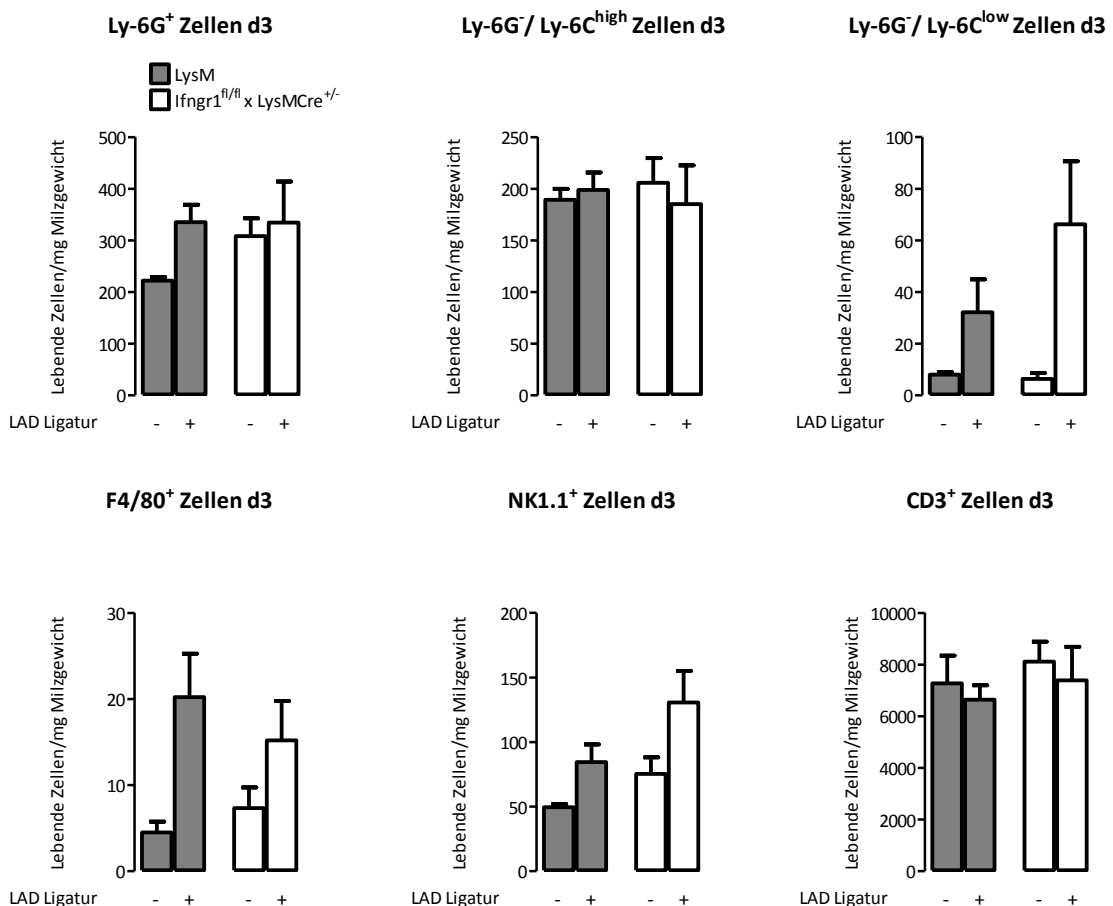
### 3.5.2 Verminderte Zellinfiltration bei Ifngr1-defizienten Tieren nach Myokardinfarkt



### Abbildung 3-41: Kardiale FACS Analyse der Zellinfiltration bei LysM und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren an d3

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Herzgewebe an d3 nach SHAM Operation (-) oder an d3 nach LAD Ligatur (+) bei LysM (grau) und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren (weiß). PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; \*, p<0,05.

Die Zellinfiltration ins Myokard sowie der Anteil an Inflammationszellen im Milzgewebe und im venösen Blut wurden mittels FACS an Tag 3 nach OP untersucht. Für die Zellfärbung wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper gegen PO-PRO-1, CD45, CD3, CD11b, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1 und F4/80 verwendet (siehe „gating“ Strategie unter Kapitel 2.2.8.2). Die Myokardinfarktinduktion war mit einem Anstieg der Inflammationszellinfiltration in das infarzierte Herzgewebe assoziiert. Signifikant weniger lebenden Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten (LysM LAD, 1322  $\pm$  355 Zellen vs. *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* LAD, 383  $\pm$  154 Zellen), sowie F4/80<sup>+</sup> Makrophagen (LysM LAD, 427  $\pm$  149 Zellen vs. *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* LAD, 48  $\pm$  21 Zellen) infiltrierten das Myokardinfarktgewebe von *Ifngr1*-defizienten *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren drei Tage nach OP im Vergleich zu LysM Tieren (Abbildung 3-41).

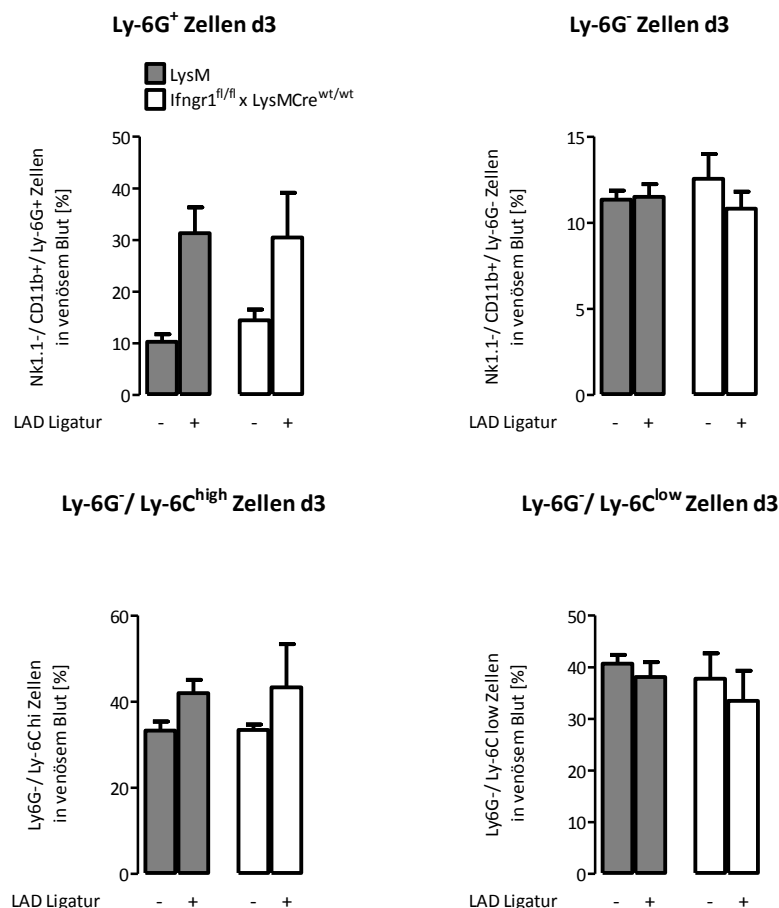


### Abbildung 3-42: FACS Analyse von Milzgewebe bei LysM und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren an d3

Grafische Darstellung der FACS Analyse von Milzgewebe an d3 nach SHAM Operation (-) oder an d3 nach LAD Ligatur (+) bei LysM (grau) und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren (weiß). PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophile, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> inflammatorische Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>low</sup> reparative Monozyten, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen, PO-PRO-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=3-9 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

Bei Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten, NK1.1<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen ließen sich marginale Verminderungen im Myokardinfiltrationsverhalten detektieren.

Im Milzgewebe und im venösen Blut konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen LysM Tieren und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren detektiert werden (Anhang Tabelle 31 und 32; Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43).



### Abbildung 3-43: FACS Analyse von venösem Blut bei LysM und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren an d3

Grafische Darstellung der FACS Analyse von venösem Blut an d3 nach SHAM Operation (-) oder nach LAD Ligatur (+) bei LysM (grau) und *Ifngr1<sup>fl/fl</sup>* x *LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren (weiß). Der prozentuale Anteil an NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>+</sup>, NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>, NK1.1<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>/Ly-6G<sup>-</sup>/Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Zellen wurden analysiert; Mittelwert  $\pm$  SEM; n=2-13 Tiere; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

---

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass eine *lfngr1*-Defizienz zu einer signifikanten Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion nach Myokardinfarkt führt. Der Mangel an *lfngr1* resultierte weiterhin in einer verminderten Zelleinwanderung an *Ly-6C<sup>low</sup>* Monozyten sowie *F4/80<sup>+</sup>* Makrophagen ins infarzierte Myokard.

## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die präzisen Kontrollmechanismen der Zellrekrutierung und die spezifischen Effektorfunktionen von Inflammationszellen im murinen Myokardinfarktmodell zu untersuchen. Über Mausmodelle zur gezielten Zelldepletion sowie unter Verwendung systemischer Knock-outs konnten die Bedeutung der myeloiden Zellen bei der Pathogenese des MI und das Zusammenspiel der Zellen mit wichtigen Inflammationsmediatoren weiter analysiert werden. Hierbei konnten neue Erkenntnisse über den Einfluss der Zellen und Mediatoren auf den Inflamationsverlauf sowie auf das Postinfarkt-Überleben und die Herzfunktion nach MI gewonnen werden.

### 4.1 Die Bedeutung von LysM<sup>+</sup> myelomonozytären Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes

Zunächst sollte die Funktion aller myelomonozytären Zellen beim Myokardinfarkt näher untersucht werden. Dafür wurde das LysM<sup>iDTR</sup> Mausmodell zur selektiven Depletion von LysM<sup>+</sup> Zellen gewählt.

In einem murinen Wundheilungsmodell konnte mit Hilfe der LysM<sup>iDTR</sup> Maus bereits erfolgreich die DTX-vermittelte Makrophagenablation durchgeführt werden [106].

Bei Angiotensin II (AT II)-vermittelter vaskulärer Dysfunktion im Hypertonus-Mausmodell hatte die Depletion von myelomonozytären Zellen einen schützenden Effekt und konnte die Manifestation arterieller Hypertonie signifikant vermindern [107]. Gefäßinfiltrierende, proinflammatorische Monozyten und Makrophagen, nicht jedoch Neutrophile, waren verantwortlich für die Entwicklung von vaskulärer Dysfunktion und oxidativem Stress bei ATII-induziertem Bluthochdruck. Die Depletion von LysM<sup>+</sup> Zellen konnte den durch ATII-induzierten Anstieg des Blutdrucks erfolgreich abschwächen. Weiterhin konnte die durch ATII Behandlung hervorgerufene inflammatorische, zellabhängige Zunahme von oxidativem Stress sowie der Entkopplung von NO-Synthasen (iNOS, engl. inducible nitric oxide synthase und eNOS, engl. endothelial nitric oxide synthase) in der Gefäßwand ebenfalls durch die Ablation von LysM<sup>+</sup> Monozyten signifikant verringert werden [119]. Die Rekonstitution von Monozyten in LysM-depletierten Tieren führte wieder zum Anstieg des ATII-induzierten Blutdrucks [107].

Orientiert an diesen Ergebnissen wurde die Rolle der LysM<sup>+</sup> myelomonozytären Zellen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes untersucht.

Frantz *et al.* konnten bereits zeigen, dass eine kontinuierliche LysM-Zelldepletion vor und nach MI einen negativen Einfluss auf die Infarktheilung hat [64]. Mittels

pharmakologischer Ablation durch liposomales Clodronat konnte die Monozyten/Makrophageninfiltration in das infarzierte Myokard reduziert werden. Dies führte zu einer erhöhten Mortalität sowie zum Auftreten von Thromboembolien nach MI. Die genetische LysM-Zellablation über wiederholte DTX Applikation (täglich, Beginn fünf Tage vor MI-Induktion bis Tag 4 nach MI) bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren führte ebenfalls zur Bildung von Thromben im linken Ventrikel. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gestörte Rekrutierung von myeloiden Zellen potenziell pathophysiologische Mechanismen auslösen, welche in einer linksventrikulären Thrombusentstehung nach Myokardinfarkt resultieren [64].

In der vorliegenden Dissertation konnte bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren ebenfalls ein signifikant reduziertes Überleben nach MI - nach Administration von DTX in einem kurzen Applikationsregime vor Infarktinduktion - nachgewiesen werden. Dieses Regime erzielte jedoch - nach drei-tägiger „high-dose“ DTX Behandlung und anschließender LAD Ligatur - weder im peripheren Blut noch im Myokard eine wesentliche Auslöschung der LysM<sup>+</sup> Zellen.

Im Gegensatz zum Hypertonus-Mausmodell konnten beim Myokardinfarkt-Mausmodell keine signifikanten Unterschiede zwischen LysM Kontrolltieren und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren in Hinblick auf die myokardiale Zellinfiltration sowie der LV-Funktion detektiert werden. Anders als beim Hypertonus-Mausmodell führte die genetische LysM<sup>+</sup> Depletion nicht zu einer Verbesserung der Dysfunktion, sondern ging mit einer bedeutenden Zunahme der kardialen Fibrosierung und Zunahme der Sterblichkeit nach MI einher.

Lysozym M wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten gebildet. Da diese Zellpopulationen verschiedene Überlebens- und Neubildungszeiten besitzen, kann der DTR unter Kontrolle des LysM-Promotors ebenfalls unterschiedliche Expressionsraten - abhängig vom Zelltyp und von den Zelleigenschaften - aufweisen. [104, 105]. Aus diesem Grund konnte es zu Abweichungen bei den untersuchten Zellpopulationen kommen. Eine nur teilweise und nicht signifikante Ablation der LysM<sup>+</sup> Zellen in diesem Depletionsmodell erlaubt jedoch keine sichere Aussage, wie viele Zellen tatsächlich depletiert wurden.

Bei dem verwendeten Applikationsregime im Myokardinfarktmodell konnten ein Tag nach MI bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren dennoch marginal weniger Gr-1<sup>+</sup> Neutrophile sowie eine signifikant geringere CXCL1 mRNA Expression nachgewiesen werden.

Kompensatorisch und möglicherweise aufgrund schnellerer Neubildungsrate, stieg die Anzahl an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen tendenziell im infarzierten Gewebe von LysM<sup>iDTR</sup> Tieren im Vergleich zu LysM Kontrolltieren an. Möglicherweise sind auch residente Zellen an der erhöhten Makrophagenanzahl beteiligt.

Es ist bekannt, dass - über die Produktion von entweder IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$  und IL-10 - M1 beziehungsweise M2 Makrophagen im Myokard den inflammatorischen Prozess, die Wundheilung sowie die Fibrosierung nach MI beeinflussen [120]. Darüber hinaus wird das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  zusätzlich in Verbindung mit Heilungsmechanismen, aber auch mit Gewebsfibrosierung sowie „cardiac remodeling“ und Herzversagen nach Myokardinfarkt genannt. Umgekehrt führte die Hemmung von TGF- $\beta$  zu einer vermehrten Sterblichkeit und LV Dilatation nach MI [121].

Es waren jedoch bei den Analysen der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Expressionsunterschiede der IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  oder IL-10 mRNA Level zwischen LysM<sup>iDTR</sup> und LysM Tieren nach MI nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen sich ebenfalls auf die nicht signifikante Auslöschung der Inflammationszellen unter dem verwendeten Depletionsregime zurückführen.

Mit Hinblick auf zukünftige Untersuchungen könnte die „Evan's blue“ Färbung histologischer Herzschnitte innerhalb 24h nach Induktion des Herzinfarktes einen genaueren Aufschluss über die Infarktgröße, das Fibrorestadium und die Narbenbildung nach Myokardinfarkt geben. Möglicherweise könnten Unterschiede in diesem frühen Stadium *via* histologischer Untersuchungen eher detektiert werden, während die Infarktschäden noch zu gering sind, um eine Reduktion der systolischen LV Funktion anzuzeigen. Es ist bekannt, dass die kardiale Ischämie Ursache für das Absterben des Myokardgewebes nach Infarkt ist und Zellen schon innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach Beginn der Ischämie sterben [122].

Es konnten in diesem Teil der Arbeit Hinweise geliefert werden, dass myelomonozytäre LysM<sup>+</sup> Zellen essentiell an der Inflammationsantwort nach Myokardinfarkt beteiligt sind (**Hypothese 1**). Entzündungs- und Reparationsmechanismen, welche über LysM<sup>+</sup> Zellen mediiert werden, sind notwendig für das Überleben nach Myokardinfarkt. LysM<sup>+</sup> Neutrophile und Makrophagen spielen zudem eine entscheidende Rolle bei der Fibrosierung sowie bei der Expression von inflammatorischen Mediatoren - nachweisbar an signifikant geringeren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Expressionsraten bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren - nach Myokardinfarkt.

Zur weiteren Analyse des Infiltrationsverhaltens und der Funktion von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen beim Herzinfarkt wurden anschließend spezifischere Ablationsmodelle und Knock-out Modelle gewählt. Aufgrund der tendenziell geringeren Neutrophileninfiltration bei depletierten LysM<sup>iDTR</sup> Tieren ein Tag nach MI wurden

insbesondere Neutrophile und deren Einfluss auf die Monozytenrekrutierung ins infarzierte Myokard genauer untersucht.

#### **4.2 IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ vermitteln die myelomonozytäre Zellrekrutierung beim Myokardinfarkt**

Myokardinfarktpatienten weisen eine erhöhte Aktivierung und Infiltration von Leukozyten sowie erhöhte Level an proinflammatorischen Zytokinen im Plasma und im Myokard auf [123-125]. Die Wechselwirkung von verschiedenen Zytokinen untereinander und deren Wirkung auf die Inflammationszellen leisten einen wichtigen Beitrag bei der Pathogenese des MI [32].

In der vorliegenden Arbeit war die kardiale mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bei LysM<sup>iDTR</sup> Tieren, verglichen mit LysM Tieren, nach DTX Behandlung und Infarktinduktion signifikant vermindert. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  beim MI näher untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das Überleben nach Myokardinfarktinduktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  abhängt. Sowohl die IFN- $\gamma$ -Defizienz als auch die TNF- $\alpha$ -Defizienz hatte einen pathogenen Effekt auf die Infarktheilung und resultierten in einer systolischen Dysfunktion sowie einer defekten Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis.

Die klinische Anwendung von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  zur therapeutischen Behandlung von chronischer Herzinsuffizienz führte zu widersprüchlichen Ergebnissen und hatte mehrheitlich ebenfalls einen negativen Effekt bezüglich des Behandlungserfolges sowie der Mortalitätsrate [126].

Torzewski *et al.* konnten überdies zeigen, dass die chronisch-entzündliche Kardiomyopathie und die Myokarditis bei IFN- $\gamma$ -überexprimierenden Mäusen über TNF- $\alpha$  vermittelt wird [127]. TNF- $\alpha$  ist demnach an der Entstehung von chronischer Herzinsuffizienz beteiligt und transgene SAP-IFN- $\gamma$  Mäuse - mit einem hohen Serumlevel an IFN- $\gamma$  - entwickelten spontan eine chronische Kardiomyopathie [128]. Charakteristische kardiale Infiltrationen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Mac2<sup>+</sup> Makrophagen und CD11c<sup>+</sup> DCs konnten bei SAP-IFN- $\gamma$  Mäusen beobachtet werden. Untersuchungen mittels Herzultraschall zeigten auch hier eine verschlechterte systolische Funktion sowie LV-Dilatationen - in dem Fall aufgrund der erhöhten IFN- $\gamma$  Konzentration im Blut. Die IFN- $\gamma$ -vermittelte Kardiotoxizität war weiterhin mit erhöhten kardialen Expressionslevel an TNF- $\alpha$ , IL-12 und MCP-1 assoziiert. Möglicherweise wurde die TNF- $\alpha$  Synthese durch IFN- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen vermittelt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden SAP-IFN- $\gamma$  Mäuse mit TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt.



Dies führte zu einer signifikant verminderten Zellinfiltration von CD11c<sup>+</sup> DCs und F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, zu einer verbesserten LV-Funktion und zu einer geringeren Sterblichkeit, verglichen mit transgenen SAP-IFN- $\gamma$  Mäusen [127].

IFN- $\gamma$  gilt erfahrungsgemäß als wirksamer Mediator für die TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen [129]. Aus Tiermodellen ist weiterhin bekannt, dass IFN- $\gamma$  bei der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und bei der Differenzierung der Monozyten hin zu einem Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten/M1 Makrophagen Phänotyp, eine wichtige Rolle spielt [130-132]. Darüber hinaus konnte bei Kindern mit eingeschränkter IFN- $\gamma$  Produktion auch eine verminderte Neutrophilenmobilität sowie eine reduzierte NK-Zellaktivität beobachtet werden [133].

IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  haben demzufolge einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung und Rekrutierung von Inflammationszellen. Dies ließ sich im Rahmen dieser Arbeit anhand der signifikant verminderten Zellmigration von Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, inflammatorischen Ly-6C<sup>high</sup> und reparativen Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten ins Herzgewebe von IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren bestätigen und wurde über Detektion einer signifikant verminderten CXCL1 und CCL2 mRNA Expression komplementiert.

Mittels FACS Analyse konnte zudem festgestellt werden, dass ein Tag nach SHAM Operation CD3<sup>+</sup> T-Zellen und NK1.1<sup>+</sup> Zellen sowohl bei C57BL/6 Tieren, aber auch bei IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren im Herzgewebe nachweisbar waren. Verglichen mit der basalen Neutrophilen- und Monozytenanzahl waren die basalen Werte der T- und NK-Zellen tendenziell höher. Im Gegensatz zu IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren konnte im infarzierten Herzgewebe von C57BL/6 Tieren bereits ein Tag nach Myokardinfarktinduktion ein tendenzieller Anstieg an CD3<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. CD3<sup>+</sup> Zellen schließen gamma:delta T-Zellen mit ein, welche theoretisch fähig sind IFN- $\gamma$  zu einem frühen Zeitpunkt nach MI zu produzieren (siehe Kapitel 4.6).

Weiterhin mobilisiert CXCL1 neben Neutrophilen auch T-Zellen. Sie besitzen den entsprechenden Rezeptor für das Chemokin [8]. Der nachweisliche Anstieg des CXCL1 Expressionslevels könnte eine Erklärung für die zeitige Expansion der CD3<sup>+</sup> T-Zellen nach MI bei WT C57BL/6 Tieren liefern.

NK1.1<sup>+</sup> Zellen wanderten hingegen erst ab Tag 3 nach MI vermehrt ins Herzgewebe ein. CC Chemokine (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES) induzierten die NK-Zell Chemotaxis *in vitro* [134]. Die erhöhte Expression von CCL2/MCP-1 ab Tag 3 bei C57BL/6 Tieren könnte demnach mitverantwortlich für die vermehrte Infiltration von NK1.1<sup>+</sup> Zellen ins infarzierte Herzgewebe sein.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten einer Studie von Yan *et al.* überein. Ein Tag nach permanenter Ligatur konnte im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren ein

signifikanter Anstieg an T-Zellen im Herzgewebe festgestellt werden, wogegen die NK-Zellinfiltration erst ab Tag 3 signifikant zunahm. Neutrophile erreichten nach permanenter Ligatur ebenfalls an Tag 3 ihr Infiltrationsmaximum [135]. In dieser Studie wurde zudem die Expression von zellspezifischen Zytokinen und Chemokinen untersucht. Die IL-12p35 (IL-12A) Expression war ein Tag nach permanenter Ligatur signifikant erhöht im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren, wohingegen IFN- $\gamma$  ab Tag 3 nach MI eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu SHAM-operierten Tieren aufwies. Maximale IFN- $\gamma$  Expressionslevel im infarzierten Myokard wurden an Tag 7 und Tag 14 festgestellt. Komplementär dazu stieg die Anzahl an infiltrierenden, IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> Zellen und erreichten ihr Maximum ebenfalls an Tag 7 und Tag 14. Zusätzlich stieg die Expression des T<sub>reg</sub> Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 und die Anzahl an Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen kontinuierlich bis Tag 14 nach MI an [135]. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen können zu T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub> oder T<sub>reg</sub> Zellen differenzieren [136]. Die Kommunikation zwischen Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort hat hierbei einen entscheidenden Einfluss. Proinflammatorische M1 Makrophagen, welche über IFN- $\gamma$  stimuliert werden, produzieren dabei IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$  und sind an der T<sub>H1</sub> Polarisierung von T-Zellen beteiligt. Antiinflammatorische M2 Makrophagen hingegen sezernieren IL-10 und unterstützen die T<sub>H2</sub> Polarisierung von T-Zellen [120].

Bei den zytokinefizienten Tieren in der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte ein signifikant reduziertes „IFN- $\gamma$ -signaling“ zwischen Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen - abhängig von der IL-12b und Ifngr1 Expression - festgestellt werden.

Die IFN- $\gamma$  Signalübertragung zur Beeinflussung der Genregulation läuft über den Jak-Stat-Signalweg ab. Verschiedene Stimuli (u.a. IL-12, TNF- $\alpha$ ) induzieren dabei eine Stat1 Serin-Phosphorylierung zur Aktivierung der Target-Gen-Transkription [131].

IFN- $\gamma$  dirigiert das Wachstum, die Reifung/Differenzierung und Rekrutierung vieler verschiedener Zelltypen [130]. Der immunmodulatorische Effekt von IFN- $\gamma$  scheint besonders zu einem späteren Zeitpunkt nach Beginn der Inflammation entscheidend zu sein. Dabei koordiniert IFN- $\gamma$  den Übergang von der angeborenen zur adaptiven Immunantwort über die Leukozytenmobilisierung mittels Hochregulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren Zytokinen. Zu diesen zählen IL-12 (aktiviert NK-Zellen, vermittelt die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Zellen zu einem T<sub>H1</sub> Phänotypus), CXCL10/IP-10 (Chemoattraktant für Monozyten und T-Zellen), CCL2 (Chemoattraktant für Monozyten/Makrophagen), CCL3 und CCL4 (Chemoattraktant für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen), CCL5 (Chemoattraktant für CD4<sup>+</sup> T-

Zellen und Monozyten/Makrophagen) sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel) [131].

IFN- $\gamma$  und Stickstoffmonoxid, welche an der Entzündungsquelle produziert wurden, verursachten eine lokale Erweiterung des Blutgefäßes. Zusätzlich emigrieren spezifische Leukozyten-Subpopulationen - abhängig vom spezifischen Zytokin/Chemokin Milieu - vom Blutkreislauf ins Gewebe. Dies wird über die Interaktion zwischen Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothel vermittelt [130].

Bei Myokardinfarkt, Arteriosklerose, oxidativem Stress und vaskulärer Dysfunktion scheint die Wechselwirkung zwischen Monozyten und NK-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese zu haben [94]. Im Hypertonus-Mausmodell beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die ATII-induzierte vaskuläre Dysfunktion von IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen sowie von der wechselseitigen Aktivierung von NK-Zellen und Monozyten abhängig ist. Wobei IFN- $\gamma$  an der vaskulären Monozyteninfiltration und Inflammation bei arteriellem Hypertonus beteiligt ist [137]. Bei AT II-infundierten IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen infiltrierten weniger NK-Zellen sowie CD11b<sup>+</sup> myelomonozytäre Zellen in die arteriellen Gefäße im Vergleich zu Wildtyp Tieren [137].

Als Hauptproduzenten für IFN- $\gamma$  gelten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T-bet<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK-Zellen. Die IFN- $\gamma$  Produktion in NK-Zellen und T-Zellen wird maßgeblich durch die Zytokine IL-12 und IL-18 (sezerniert von APCs wie Makrophagen) kontrolliert [138, 139]. Fraglich ist, ob CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen IFN- $\gamma$  exklusiv produzieren. Andere Zelltypen, wie NKT-Zellen oder APCs sezernieren ebenfalls IFN- $\gamma$  [140, 141].

Bei I/R Schaden scheint die spezifische Entzündungskaskade von der IFN- $\gamma$  Produktion nach frühzeitiger CD4<sup>+</sup> T-Zellaktivierung abhängig zu sein. IFN- $\gamma$  wird demnach von aktivierten T-Zellen, möglicherweise aber auch von APCs wie Makrophagen und Dendritischen Zellen gebildet [84]. Die IFN- $\gamma$  Produktion durch APCs könnte wichtig für die Selbstaktivierung oder die Aktivierung von Zellen in räumlicher Nähe sein [141, 142].

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass IFN- $\gamma$  maßgeblich am Inflammationsverhalten myeloider Zellen nach Myokardinfarkt beteiligt ist (**Hypothese 4**). Für das Überleben und die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt wird ein intaktes „IFN- $\gamma$ -signaling“ benötigt.

Zur weiterführenden Analyse des „IFN- $\gamma$ -signaling“ zwischen myeloiden und lymphoiden Inflammationszellen beim Myokardinfarkt wurde das Interferon-gamma Rezeptor 1 (Ifng1) KO Modell verwendet. Erste Untersuchungsergebnisse bezüglich des

Leukozyten-Infiltrationsverhaltens und der systolischen Funktion bei *Ifngr1*-defizienten Tieren nach MI werden im Kapitel 4.5 diskutiert.

### **4.3 Der überlebenswichtige Einfluss von Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes**

Aufgrund der Detektion einer verminderten Neutrophilenmigration ins infarzierte Herzgewebe - sowohl nach Ablation von *LysM*<sup>+</sup> Zellen bei *LysM*<sup>iDTR</sup> Tieren als auch bei *IFN-γ*- und *TNF-α*-Defizienz in Knock-out Tieren - sollte die Funktion der Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen bei der Pathogenese des Myokardinfarktes ausführlicher untersucht werden.

Die anti-Gr-1 antikörpervermittelte Neutrophilendepletion führte zu einer verminderten myokardialen Inflammationszellrekrutierung und resultierte in einer erhöhten Mortalität sowie systolischen Dysfunktion nach MI. Zusätzlich konnte ein verändertes „*IFN-γ*-signaling“ anhand reduzierter *IFN-γ*, *Ifngr1* und *IL-12b* mRNA Expressionslevel - infolge der *Ly-6G*<sup>+</sup> Neutrophilenablation - festgestellt werden.

In einer vergleichbaren Studie konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Neutrophilen *via* anti-*Ly-6G* Antikörper-Behandlung ebenfalls zu einer beeinträchtigten kardialen Funktion, verminderter *Ly-6C*<sup>high</sup> Monozytenanzahl in Blut und Herzgewebe sowie zu einer reduzierten *IL-12* und *IFN-γ* Expression nach MI führte [57]. Neutrophile scheinen in diesem Zusammenhang die Heilung nach MI über Polarisierung der Makrophagen hin zu einem reparativen Phänotypus über „neutrophil gelantase-associated lipocalin“ zu mediieren [57].

Nach akutem Herzinfarkt erreicht die Monozyteninfiltration ihren Höhepunkt an Tag 3 [45]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei Placebo-behandelten Kontrolltieren bestätigt werden. Bei anti-Gr-1-behandelten Tieren hingegen ließ sich ab Tag 3 nach MI eine eingeschränkte neutrophilenabhängige Monozyteninfiltration detektieren. Aufgrund fehlender Neutrophiler im Blut, in der Milz und im Herzgewebe setzte die Rekrutierung und Aktivierung der Monozyten über die neutrophilenvermittelte Chemotaxis aus. Dies konnte zusätzlich über signifikant verringerte *CXCL1*, *CCL2* und *CX3CL1* mRNA Expressionslevel infolge der *Ly-6G*<sup>+</sup> Neutrophilendepletion bestätigt werden.

Das Chemokin *CCL2* (*MCP-1*) aktiviert Monozyten über den Rezeptor *CCR2* und dirigiert die Zellen damit zur entsprechenden Inflammationsstelle. Bei Arteriosklerose und Angina Pectoris ließ sich eine erhöhte *MCP-1* Expression nachweisen [143]. Demgegenüber wiesen *CCR2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Monozyteninfiltration vier Wochen nach Myokardinfarktinduktion auf [144]. Weiterhin ist bekannt, dass

CX3CL1/CX3CR1 die Chemotaxis von zirkulierenden Monozyten sowie von Lymphozyten induziert [145, 146]. Auch in arteriosklerotischen Läsionen konnte die verstärkte Expression von CX3CL1 (Fraktalkin) sowie von dem Fraktalkin-Rezeptor (CX3CR1) detektiert werden. CX3CR1 Knock-out Tiere hingegen offenbarten eine verminderte Atherogenese [147].

Es ist bekannt, dass Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten beschädigtes Gewebe beseitigen und die Inflammation unterstützen. Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten fördern anschließend die Infarktheilung über Myofibroblasten-Akkumulation, Angiogenese und Beseitigung von Kollagen [45]. Falls dieser Mechanismus jedoch erheblich gestört ist - weil nicht ausreichend Monozyten zum Infarktgewebe rekrutiert wurden - kommt es zu einer gestörten Beseitigung von nekrotischem Gewebe und zur Ausbreitung des Narbengewebes in der „remote zone“ mit Verlust der Herzfunktion in diesem Areal.

Aus diesem Grund konnte in der vorliegenden Dissertationsarbeit - durch Ausschaltung der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis - bei anti-Gr-1-behandelten Tieren eine Verschlechterung der systolischen Funktion sowie eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate nach MI festgestellt werden.

Rekonstitutionsversuche mit Neutrophilen oder Monozyten aus dem venösen Blut von Wildtyp C57BL/6 Mäusen über Schwanzvenenapplikation blieben in der vorliegenden Dissertationsarbeit ergebnislos. Die zeitlich um wenige Stunden versetzte Gabe von Neutrophilen/Monozyten und anschließender anti-Gr-1 Applikation einen Tag nach MI-Induktion führte jedoch weder zu einer signifikanten Verbesserung der LV Funktion oder des Überlebens nach Infarkt, noch zu einem Anstieg der kardialen Neutrophilen- oder Monozyteninfiltration. Dies spricht für die hohe Effektivität des anti-Gr-1 Antikörpers gegenüber Gr-1<sup>+</sup> Zellen, auch denen die experimentell wieder zugeführt wurden.

Alternativ könnte zukünftig ein Mausstamm verwendet werden, welcher die Cre-Rekombinase unter transkriptioneller Kontrolle des Ly-6G Promotors besitzt. Durch Kreuzung dieser Ly-6G-Cre Maus mit einer iDTR Maus kann die Ly-6G-Cre<sup>iDTR</sup> Maus generiert werden - zur selektiven Depletion von ausschließlich Ly-6G<sup>+</sup> Zellen nach Administration von DTX [148].

Eine essentielle Rolle von Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen für das Überleben, „cardiac repair“ und die LV Funktion sowie für die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis nach Myokardinfarkt (**Hypothese 2**) konnte bestätigt werden. Nicht vollends geklärt werden konnte, ob die Verschlechterung der LV Funktion und die gesteigerte Mortalität abhängig von der Neutrophileninfiltration und -aktivität, von der Monozyteninfiltration und -aktivität oder von beiden gemeinsam abhängig sind.

Sowohl der antikörpervermittelte Eingriff in die Zellmobilisierung, als auch genetisch ausgeschaltete Aktivierungsmechanismen nach Myokardinfarkt zeigten eine signifikante Reduktion der Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis. Zusätzlich konnten Nachweise erbracht werden, dass insbesondere die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis notwendig für das Überleben und das „cardiac remodeling“ nach MI ist. Dieser Prozess hängt wesentlich von Neutrophilen-stämmigen granulären Proteinen ab [149, 150]. Die Freisetzung von granulozytären Enzymen - wie Cathelicidin - ist eine typische Reaktion von Neutrophilen und Monozyten beim Kontakt mit CXC und CC Chemokinen während des Zellrekrutierungsprozesses.

Einen Tag nach Myokardinfarkt OP resultierte die anti-Gr-1-Behandlung in signifikant verminderten Cathelicidin mRNA Expressionslevel. Zur Determinierung der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis über Cathelicidin und davon abhängige Reparaturmechanismen nach Myokardinfarkt, wurden anschließend Cathelicidin-defiziente Tiere bezüglich ihrer Inflammationszellinfiltration sowie LV Funktion nach MI untersucht.

#### **4.4 Die essentielle Funktion von Cathelicidin bei der Monozyten-Chemotaxis, beim „cardiac remodeling“ und Überleben nach Myokardinfarkt**

Nachdem festgestellt wurde, dass fehlende Entzündungszellen - speziell Neutrophile und Monozyten - einen negativen Effekt auf Überleben, EF und „cardiac remodeling“ nach Myokardinfarkt haben und die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis dabei eine entscheidende Rolle spielt, wurde anschließend der zelluläre Aktivierungsprozess genauer determiniert.

Wantha *et al.* konnten zeigen, dass dieser Prozess von granulozytären Proteinen aus Neutrophilen, speziell über Cathelicidin (human: LL37, murin: CRAMP), entscheidend beeinflusst wird [149, 150]. Neutrophile Granulozyten tragen zur Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen bei. Aktivierte Neutrophile sezernierten das granuläre Peptid Cathelicidin (CRAMP) an entzündetem Endothel großer Arterien und förderten damit die Adhäsion von klassischen Monozyten [149]. Cathelicidin beschleunigte in diesem Zusammenhang die Atherogenese über verstärkte Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten. Ein Mangel an CRAMP bei Mäusen konnte die Anzahl an Makrophagen sowie die Größe von arteriosklerotischen Läsionen reduzieren [150]. Welche spezifische Funktion Cathelicidin bei der Chemotaxis zwischen Neutrophilen und Monozyten nach Myokardinfarkt (akutes Inflammationsmodell) hat, wurde mittels CRAMP<sup>-/-</sup> Mausmodell untersucht.

Es konnte in Erweiterung zu den Ergebnissen bei Arteriosklerose (chronisches Inflammationsmodell) der Arbeitsgruppe von Oliver Soehnlein [149, 150] ein nachteiliger Effekt der CRAMP-Defizienz auf das Überleben und die LV-Funktion nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden. Dabei wurden neben der funktionalen Verschlechterung infolge der CRAMP-Defizienz, ebenso verstärkte Fibrose und „adverse cardiac remodeling“ detektiert.

Ventrikuläres „remodeling“ - auch im nicht infarzierten Ventrikel - äußert sich in Fibrose, Hypertrophie und Ventrikeldilatation. Strukturelle Veränderungen gehen mit der Verminderung der Ejektionsfraktion einher. Fibrotisches Gewebe ist nicht mehr in der Lage rhythmisch zu kontrahieren sowie effiziente elektrische Signale zu produzieren und diese weiter zu leiten. Beides sind jedoch wichtige Kriterien für die Funktionalität des Myokards und können somit zu Arrhythmien, LV Dysfunktion und schließlich zu Herzinsuffizienz und zum Tod führen [151].

Über die Implantation von EKG Transmittern sollten verschiedene Formen von Arrhythmien sowie Blutdruckänderungen mit möglichem letalem Ausgang detektiert werden. Nach Myokardinfarktinduktion entwickelten sowohl C57BL/6 Tiere als auch CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere PEAs, was letztendlich zum Tod führte. Dieser Progress fand jedoch bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren viel eher statt als bei C57BL/6 Tieren. Sowohl der signifikant erhöhte LV Masse Index als auch die verminderte relative Wanddicke des linken Ventrikels sprechen zusätzlich für ein verstärktes „cardiac remodeling“ sieben Tage nach MI infolge der CRAMP-Defizienz.

Es sollte weiter untersucht werden, ob ein dilatierter Ventrikel oder ausgedünnte Myokardwände ausschlaggebend für die nachteilige Remodellierung sowie eine erhöhte Mortalität nach MI sind.

Über die Applikation von synthetischem Cathelicidin war eine Rekonstitution des Wildtyp-Phänotypus - Anstieg der myeloiden Zellinfiltration ins infarzierte Herzgewebe sowie Verbesserung der systolischen Herzfunktion - bei Cathelicidin-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt möglich.

Die Neutrophilenrekonstitution könnte in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls mittels Zelltransferexperimenten aus Wildtyptieren (C57BL/6) in CRAMP<sup>-/-</sup> Tiere erreicht werden und damit die These stützen, dass der Monozyteninflux von Neutrophilen abhängig ist. Es sollte dabei getestet werden, ob die Rekrutierung von Monozyten über die intravenöse Injektion von Neutrophilen bei CRAMP-defizienten Tieren nach MI wiederhergestellt werden kann. Der Neutrophilentransfer müsste demnach den Monozyteninflux sowie die Verbesserung der systolischen Funktion und des Überlebens

ebenfalls wieder etablieren können. Eine intakte Neutrophilenfunktion ist dafür notwendig.

Neutrophile geben Cathelicidin bei der Emigration aus dem Blutgefäß ins Gewebe frei. Dies dient wiederum der Anlockung von Neutrophilen, aber auch zur Rekrutierung der Monozyten ins Zielgewebe. Die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis *via* Cathelicidin war jedoch bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren ausgeschaltet. Im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen konnte bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren kein Anstieg an myelomonozytären Zellen an Tag 3 nach MI detektiert werden. Da Neutrophile Cathelicidin erst bei Gewebemigration sezernieren, war hingegen - vor Emigration - im Blutkreislauf kein Unterschied bezüglich der Neutrophilen- und Monozytenpopulationen zwischen CRAMP<sup>-/-</sup> und C57BL/6 nachweisbar.

Die limitierte Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis äußerte sich bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren in einer signifikant verminderten Zelleinwanderung an Ly-6G<sup>+</sup> Neutrophilen, Ly-6C<sup>high</sup> und Ly-6C<sup>low</sup> Monozyten sowie F4/80<sup>+</sup> Makrophagen und NK1.1<sup>+</sup> Zellen ins infarzierte Myokard - parallel zu geringeren CXCL1, CCL2 und CX3CL1 mRNA Expressionslevel. Dies spricht dafür, dass Cathelicidin essentiell für die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen sowie von Neutrophilen benötigt wird. Dass die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis beim Myokardinfarkt durch Cathelicidin (CRAMP) mediiert wird (**Hypothese 3**), konnte somit bestätigt werden.

Inwieweit die Chemokine CXCL1, CCL2 sowie CX3CL1 und deren interagierende Rezeptoren mit der zellulären Cathelicidin Expression korrespondieren, sollte weiter untersucht werden. Beispielsweise über eine funktionale Rekonstitution der Neutrophilen mittels Knochenmarkstransfer in anti-Gr-1-behandelten und LAD-ligierten C57BL/6 Mäusen unmittelbar nach Induktion des MI. Alternativ könnten Neutrophile aus dem Blut über Dichtegradienten (Histopaque), „MACS beads“ oder Negativselektion (Stemcell, „magnetic beads“) gewonnen werden. Unbehandelte Wildtyp C57BL/6 Mäuse oder CRAMP<sup>-/-</sup> Mäuse sollten dabei als Spender dienen und anschließend die Infarktgröße, die LV-Funktion sowie FACS Analysen und mRNA Expressionsuntersuchungen der rekonstituierten Tiere ausgewertet werden. Man würde erwarten, dass auf diese Weise die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis und entsprechende zelluläre Aktivierungsmechanismen wieder hergestellt werden können.

Die Interaktion zwischen Neutrophilen und Monozyten über Cathelicidin scheint essentiell notwendig für die Aktivität und die Migration dieser Immunzellen nach MI. Sowohl die Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen-Defizienz als auch der über Cathelicidinmangel-vermittelte Monozytendefizit führten zu einer chemotaktischen und systolischen



Dysfunktion und war mit einem Anstieg der Mortalität nach MI assoziiert. Zusätzlich konnte bei beiden Modellen gezeigt werden, dass die Anzahl an infiltrierenden Monozyten nach Myokardinfarkt von einer vorausgehenden, funktionierenden Neutrophileninfiltration abhängig ist und von dieser reguliert wird.

Weiterhin wird Cathelicidin benötigt, um NK-Zellen über die intakte Monozyten/Makrophagen-Aktivität ins infarzierte Myokard zu rekrutieren. Auch im CRAMP-defizienten Mausstamm konnte ein vermindertes „IFN- $\gamma$ -signaling“ nachgewiesen werden. Signifikant geringere mRNA Level an IFN- $\gamma$ , IL-12b und Ifngr1 - erforderlich für eine gegenseitige Aktivierungsschleife zwischen Monozyten und NK-Zellen - bei CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren unterstützen diese These.

#### **4.5 Die Monozyten/Makrophageninfiltration nach Myokardinfarkt ist abhängig vom Ifngr1 auf LysM<sup>+</sup> Zellen**

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Dissertation lieferten Hinweise, dass das Überleben und die LV Funktion nach MI essentiell von der IFN- $\gamma$  Expression und damit assoziierten myelomonozytären Zellrekrutierungen im Herzgewebe nach MI abhängig ist. Aus diesem Grund sollte weiter geklärt werden, wie dieser Rekrutierungsmechanismus im Detail funktioniert. Neben geringeren IFN- $\gamma$  Expressionslevel sowie verminderter Neutrophilen/Monozyteninfiltration konnten auch signifikant geringere Ifngr1 und IL-12b mRNA Expressionslevel nach Myokardinfarkt gemessen werden. Diesbezüglich sollte ein konditionales Ifngr1 Knock-out Mausmodell dazu dienen, einen Zusammenhang zwischen der IFN- $\gamma$  Expression und der Neutrophilen- sowie der Monozyten/Makrophagen-Aktivität und dessen Zellinfiltrationsverhalten im infarzierten Myokard herzustellen.

IL-12 und IL-18 stimulieren Leukozyten zur IFN- $\gamma$  Produktion. IFN- $\gamma$  wiederum aktiviert Monozyten/Makrophagen. Diese sind imstande den IFN- $\gamma$  Rezeptor zu exprimieren. Der heterodimere IFN- $\gamma$ -Rezeptor-Komplex besteht aus zwei Ligand (IFN- $\gamma$ )-bindenden Ifngr1 Ketten assoziiert mit zwei Signal-transferierenden Ifngr2 Ketten [131]. IFN- $\gamma$  bindet demnach spezifisch an die Ifngr1 Kette - der funktionalen Untereinheit des IFN- $\gamma$  Rezeptors.

IFN- $\gamma$  KO und Ifngr1 KO Mäuse zeigen keine Entwicklungsdefizite. Das Immunsystem dieser Tiere entwickelt sich gleichermaßen normal [152]. Jedoch scheinen IFN- $\gamma$ - und Ifngr1-defiziente Tiere anfälliger für bakterielle, parasitäre und virale Infektionen zu sein [153, 154]. Ifngr1-defiziente Patienten weisen ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen auf [155, 156]. Bei Kindern mit eingeschränkter IFN-

$\gamma$  Produktion konnte zudem eine verminderte Neutrophilenmobilität und NK-Zellaktivität beobachtet werden [133].

Die Eliminierung des *lfngr1* auf myelomonozytären  $\text{LysM}^+$  Zellen, konnte durch die Generierung von *lfngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Mäusen erreicht werden. In der vorliegenden Dissertation führte die *lfngr1*-Defizienz auf  $\text{LysM}^+$  Zellen drei Tage nach MI zu einer Verschlechterung der LV Funktion sowie zu einer signifikant verringerten Infiltration von  $\text{Ly-6C}^{\text{low}}$  Monozyten und  $\text{F4/80}^+$  Makrophagen ins infarzierte Herzgewebe. Der intakte *lfngr1* auf  $\text{LysM}^+$  Zellen scheint demnach notwendig für die Monozyten/Makrophageninfiltration zu sein und erklärt die Abhängigkeit der Monozyten-Chemotaxis von der  $\text{IFN-}\gamma$  Expression.

Ob ein kompensatorischer Mechanismus die  $\text{IFN-}\gamma$  Produktion in *lfngr1*-defizienten Mäusen reguliert, sollte in zukünftigen Experimenten noch evaluiert werden. Weiterhin sollte *via* FACS Analyse untersucht werden, wie die Rekrutierung von  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen im Myokard an Tag 1, Tag 7 und an Tag 10 nach MI bei *lfngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Tieren reguliert ist. Es ist bekannt, dass speziell  $\text{CD4}^+$  Zellen sowie  $\text{NK1.1}^+$  Zellen als primäre Quelle von  $\text{IFN-}\gamma$  *in vivo* fungieren. Normalerweise erreichen diese Zellpopulationen ihr Infiltrationsmaximum im Myokard sieben Tage nach MI [135].

Als „proof of concept“ Experiment könnten Neutrophile und Monozyten aus Wildtyp C57BL/6 Tieren in *lfngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* transferiert werden, um zu überprüfen, welcher Zelltypus in der Lage ist wieder eine intakte Zellrekrutierung und Chemotaxis sowie eine verbesserte LV Funktion herzustellen. Möglicherweise ist eine einzelne Zellpopulation allein nicht ausreichend für die Wiederherstellung in diesem Mausmodell, bzw. um die komplette Defizienz des Zytokins/Rezeptors zu kompensieren, sondern verschiedene, potentiell produzierende und aktivierte Zellen in Wechselwirkung zueinander [137].

Zusätzlich könnten *CRAMP<sup>-/-</sup>* Mäuse mit Neutrophilen aus Wildtyp C57BL/6 und/oder aus *lfngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup>* Mäusen rekonstituiert werden, um zu detektieren, ob ein funktioneller *lfngr1* in Kombination mit fehlender neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis *via* Cathelicidin wichtig für das Überleben, die systolische Funktion und die myelomonozytäre Infiltration ins infarzierte Myokard ist.

Die vorläufigen Untersuchungen zeigten, dass das Fehlen von *lfngr1* auf  $\text{LysM}^+$  Zellen bei Mäusen zu einer erheblichen Beeinträchtigung der linksventrikulären Herzfunktion sowie zu einer verminderten Zelleinwanderung an Monozyten/Makrophagen ins infarzierte Myokard führt. Das intakte „ $\text{IFN-}\gamma$ -signaling“ wird für die Inflammationsantwort und das Überleben nach MI benötigt. Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass das inflammatorische Verhalten myeloider Zellen nach Myokardinfarkt von der *lfngr1*

Expression und somit von einem funktionalen „IFN- $\gamma$ -signaling“ abhängig ist (**Hypothese 5**).

Histologische Untersuchungen oder intrazelluläre FACS Färbungen und Analysen - mit speziellem Fokus auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen, NK Zellen sowie NKT Zellen, aber auch myelomonozytäre Zellen - würden die zelluläre Quelle von IFN- $\gamma$  aufdecken. Alternativ, um den Zelltypus zu detektieren, welcher für die Bildung von IFN- $\gamma$  im infarzierten Myokard hauptverantwortlich ist, könnte die GREAT („interferon-gamma reporter with endogenous poly A transcript“) Maus verwendet werden. Dabei handelt es sich um eine IFN- $\gamma$  Reportermaus (offizielle Stammbezeichnung B6.129S4-*Ifng*<sup>tm3.1Lky/J</sup>).

Als potenzielle Quelle für die Produktion von IFN- $\gamma$  im infarzierten Myokard kämen T-Zellen sowie NK-Zellen in Frage. CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie NK1.1<sup>+</sup> Zellen waren schon basal im Herzgewebe von SHAM-operierten C57BL/6 Tieren vorhanden. Beide Lymphozytenpopulationen sind potenzielle Produzenten von IFN- $\gamma$  und interagieren über IL-12, IL-18 mit Monozyten/Makrophagen. Ob möglicherweise Neutrophile oder Monozyten/Makrophagen als Produzenten für IFN- $\gamma$  an Tag 1 nach Infarkt in Frage kommen, lässt sich mit Hilfe der GREAT Maus überprüfen.

Interferone allgemein werden von Leukozyten und Fibroblasten gebildet. Fibroblasten produzieren jedoch in erster Linie IFN- $\beta$ , welches beim Fibrose „signaling“ von Bedeutung ist. Inwieweit Fibroblasten auch in der Lage wären zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach MI als IFN- $\gamma$  Produzenten zu agieren, müsste gegebenenfalls überprüft werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die entsprechenden Zellen zwar in der Lage sind IFN- $\gamma$  mRNA zu bilden, aber auch, ob die mRNA in das funktionale Protein synthetisiert werden kann. Dies wäre anhand der Western Blot Methode möglich.

#### **4.6 Weitere Fragestellungen hinsichtlich der IFN- $\gamma$ Produktion nach Myokardinfarkt**

Neutrophile, Monozyten, Dendritische Zellen und Lymphozyten infiltrieren sequenziell das infarzierte Myokard [25, 29]. Neben konventionellen alpha:beta CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnten auch gamma:delta T-Zellen, NKT Zellen sowie B-Zellen frühzeitig im infarzierten Herzgewebe detektiert werden [135]. Zur Identifizierung des IFN- $\gamma$ -produzierenden Zelltypus bei Initiation und Pathogenese des MI können die GREAT (IFN- $\gamma$  Reporter) Mäuse benutzt werden.

Die Zellen, welche im Herzgewebe vorkommen und für eine frühe IFN- $\gamma$  Produktion verantwortlich sein könnten, sind NK-Zellen/ILCs, T-Zellen (speziell CD3<sup>+</sup>  $\gamma$ : $\delta$  T-Zellen), NKT Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, möglicherweise auch Endothelzellen oder Fibroblasten.

#### **4.6.1 Fibroblastenaktivierung führt mutmaßlich nicht zur IFN- $\gamma$ Sezernierung nach Myokardinfarkt**

Fibroblasten sind - als Hauptproduzenten von extrazellulären Matrixproteinen - der vorherrschende Zelltyp im kardialen Interstitium [157]. Während der Inflammationsphase nach Myokardinfarkt aktivieren sie, unter Regulation von ROS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, Inflammasome (zytosolische Proteinkomplexe in Neutrophilen und Makrophagen) sowie die Freisetzung von Chemokinen. Während der Proliferationsphase bei der Infarktheilung kommt es zur Myofibroblastenaktivierung und -differenzierung sowie zur Expression von kontraktile Proteinen ( $\alpha$ -SMA, engl. alpha-smooth muscle actin). Als wichtige Mediatoren während dieses Prozesses werden AT II, TGF- $\beta$ , PDGFs, FGFs und IL-10 benannt. Aktivierte Myofibroblasten („TGF- $\beta$ /Smad3 signaling“) produzieren Matrixproteine, Proteasen (MMPs) sowie deren Inhibitoren (TIMPs) zur Regulierung des Matrixmetabolismus [158]. Während der Maturationsphase nach Myokardinfarkt kommt es zur Apoptose der Myofibroblasten und das zelluläre Granulationsgewebe wird durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt [159]. Zusätzlich ist die Neovaskularisierung essentiell für die Versorgung der heilenden Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen. Angiogene Wachstumsfaktoren und Modulatoren - wie VEGF, TGF- $\beta$ , MCP-1, IL-8, IP-10 - werden nach MI freigesetzt [159]. CXCL10/IP-10 inhibiert die Wachstumsfaktoren-induzierte Fibroblastenmigration und verhindert exzessives, fibrotisches „remodeling“ im infarzierten Herzgewebe [30].

*In vitro* reagierten kardiale Fibroblasten auf Hypoxie mit der Differenzierung zu einem proinflammatorischen und fibrogenen Phänotyp, charakterisiert durch erhöhte Zytokinexpression (v.a. TNF- $\alpha$ ) und erhöhte Kollagensynthese [160, 161], wogegen IFN- $\gamma$ , IL-10 und IL-1 $\beta$  nicht detektiert werden konnten [160]. Fibroblasten kommen demnach als frühzeitige IFN- $\gamma$  Produzenten nach MI kaum in Betracht.

#### **4.6.2 Dendritische Zellen als potentielle Stimulatoren der IFN- $\gamma$ Produzenten**

Dendritische Zellen (DCs) gelten als immunprotektive Regulatoren während der Postinfarktheilung indem sie die Homöostase der Monozyten/Makrophagen kontrollieren

[77]. DCs können - als Antigen-präsentierende Zellen - T-Zellen zur IFN- $\gamma$  Produktion stimulieren [162]. Sie präsentieren zudem Antigene gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, welche ihrerseits die immunologischen Effektormechanismen von zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen sowie NK-Zellen regulieren können [163].

In der Maus existieren zwei verschiedene Subpopulationen: lymphoide und myeloide DCs. IL-12 konnte die IFN- $\gamma$  Produktion bei lymphoiden DCs stimulieren, jedoch nicht bei myeloiden DCs [164].

Plasmazytoide DCs konnten in Atheromen der Karotis lokalisiert sowie als Produzenten von IFN- $\alpha$  identifiziert werden. Die Plaqueinstabilität korrelierte dabei mit der IFN- $\alpha$ -Konzentration [165].

Inwiefern DCs an der Stimulierung der frühzeitigen IFN- $\gamma$  Produktion nach MI beteiligt sind, sollte in zukünftigen Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

#### **4.6.3 $\gamma$ : $\delta$ T-Zellen als potentiell zeitige IFN- $\gamma$ Produzenten beim Myokardinfarkt**

Untergruppen von Lymphozyten vereinen Eigenschaften der angeborenen und erworbenen Immunität - zu ihnen zählen NK-Zellen sowie  $\gamma$ : $\delta$  (gamma:delta) T-Zellen.  $\gamma$ : $\delta$  T-Zellen könnten schon zu einem frühen Zeitpunkt als Hauptproduzenten für IFN- $\gamma$  in Frage kommen.

Der klassische T-Zellrezeptor (TCR-beta, engl. T cell receptor-beta) - verantwortlich für die Erkennung von Antigenfragmenten, welche an MHC-II Komplexe auf APCs gebunden sind - wird von T-Zellen exprimiert. Die Bindung von TCR-beta an Antigenpeptide und dem MHC-II Komplex führen zur Aktivierung und Differenzierung der entsprechenden T-Zelle. T-Zellen erkennen Antigene über den CD3-assoziierten heterodimeren T-Zellrezeptor. Die Mehrheit der reifen T-Zellen exprimiert einen  $\alpha$ : $\beta$  Rezeptor, welcher die Peptide, die an der Oberfläche von APCs gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen über MHC I oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen über MHC II präsentiert werden, erkennt [166].

Eine weitere Subpopulation der CD3<sup>+</sup> Zellen exprimiert jedoch einen alternativen TCR, bestehend aus  $\gamma$  und  $\delta$  Kette. Diese werden während der T-Zellreifung im Thymus gebildet.  $\gamma$ : $\delta$  T-Zellen sind in der Lage Antigene direkt zu erkennen, ohne Notwendigkeit der vorherigen Antigenpräsentation oder Prozessierung [167]. Sie besitzen zudem die Fähigkeit, direkt ins Gewebe zu migrieren - möglicherweise mittels spezifischer „pathogen-encoded antigens“ im entsprechenden Zielgewebe oder über „self-molecules“ [80]. Weiterhin sind  $\gamma$ : $\delta$  T-Zellen dafür bekannt, dass sie Antigene, welche nach einer Gewebsverletzung freigesetzt werden, schnell erkennen können. Diese Eigenschaft

prädestiniert sie für eine Beteiligung an der frühzeitigen Immunantwort nach ischämischer Verletzung [168].

$\gamma\delta$  T-Zellen werden über TLRs und Stimulation mit IL-23/IL-1 $\beta$  aktiviert [80]. Die Signalübertragung verläuft wie bei den klassischen T-Zellen über den CD3-Komplex. Die Effektorfunktionen der  $\gamma\delta$  T-Zellen (zytotoxische Aktivität, Zytokinproduktion) sind ähnlich denen der klassischen T-Zellen [166]. 1 - 10 % der CD3<sup>+</sup> peripheren Blutlymphozyten sind  $\gamma\delta$  T-Zellen. In anderen Organen, beispielsweise im Dünndarmepithel umfasst die Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen einen höheren Anteil [169]. Intraepitheliale  $\gamma\delta$  T-Zellen besitzen, ähnlich wie NK-Zellen, ebenfalls Eigenschaften der adaptiven und der angeborenen Immunantwort. Trotz gemeinsamer Vorläuferzellen bilden sie Rezeptoren, welche sich von den  $\alpha\beta$  Rezeptoren der T-Zellen der erworbenen Immunität unterscheiden und erkennen auch keine APCs sondern möglicherweise die Zielmoleküle direkt [8].

Aktivierte, humane  $\gamma\delta$  T-Zellen sind in der Lage proinflammatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , zu produzieren [170, 171]. Des Weiteren exprimieren sie TLR3, welche einen ko-stimulatorischen Effekt auf die TCR-aktivierte IFN- $\gamma$  Produktion haben. TLRs sind als „pattern recognition receptors“ zentrale Regulatoren der angeborenen Immunität. Sie werden üblicherweise von Zellen der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen und dendritischen Zellen sowie von Epithelzellen exprimiert und initiieren weiterhin die Aktivierung des adaptiven Immunsystems [166].

Weitere spezialisierte Funktionen bezüglich der Regulierung der Fibrogenese sowie bei der Wundheilung werden den  $\gamma\delta$  T-Zellen zugeschrieben [172, 173]. Zusätzlich sind  $\gamma\delta$  T-Zellen, ebenso wie Neutrophile, in der Lage Cathelicidin zu produzieren [174]. Humane  $\gamma\delta$  T-Zellen können sich gegenüber klassischen  $\alpha\beta$  T-Zellen wie APCs verhalten [175]. In muriner Haut kommen dendritische epidermale T-Zellen (DETC) vor, welche ebenfalls den  $\gamma\delta$  TCR exprimieren [176-178].

Als wichtige frühzeitige Quelle für die IFN- $\gamma$  Produktion bei Tumormunität wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen identifiziert. Eine genetische  $\gamma\delta$  T-Zell-Defizienz resultierte hier in einer verminderten IFN- $\gamma$  Produktion [179].

IFN- $\gamma$  - wichtig für die Entwicklung einer effektiven adaptiven Immunantwort - sorgt vorrangig für eine Balance zwischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zytokinen.  $\gamma\delta$  T-Zellen regulieren demnach die Effektorfunktionen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen [179].

$\gamma\delta$  T-Zell-defiziente Mäuse waren vor „LV adverse remodeling“ geschützt und wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren reduzierte Infarktgrößen auf sowie eine höhere Überlebensrate und verbesserte systolische Funktion 28d nach MI [180]. Zusätzlich konnte bei TCR $\gamma\delta$ -KO Mäusen eine verringerte CD45<sup>+</sup> Leukozyteninfiltration

(Makrophagen, Neutrophile, T-Zellen) detektiert werden. Die IFN- $\gamma$  Produktion war bei TCR $\gamma\delta$ -KO Mäusen jedoch nicht beeinträchtigt.

$\gamma\delta$  T-Zellen produzieren zudem IL-17A. Dieses Zytokin hatte einen proapoptischen Effekt auf Kardiomyozyten in einem I/R Mausmodell. Bei IL-17A KO Mäusen konnten eine verminderte Neutrophileninfiltration, eine reduzierte Infarktgröße sowie eine verbesserte ventrikuläre Funktion im Vergleich zu Wildtyp-Tieren detektiert werden [181].

#### **4.6.4 „Innate lymphocyte cells“ als potentiell zeitige IFN- $\gamma$ Produzenten beim Myokardinfarkt**

An der Grenze zwischen angeborener und erworbener Immunantwort könnten ebenso ILCs („innate lymphocyte cells“) als IFN- $\gamma$  Produzenten in der Frühphase nach MI in Frage kommen. Anders als B- und T-Zellen exprimieren ILCs keine antigenspezifischen Rezeptoren. ILCs unterstützen die Inflammationsantwort, sind aber auch an der Wundheilung und der Gewebsreparatur beteiligt. Mit Hinblick auf ihre phänotypischen und funktionalen Eigenschaften - besonders ihre Zytokinproduktion und Transkriptionsfaktorexpression - werden sie in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Gruppe 1 ILCs exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet und produzieren - nach IL-12 oder IL-18 Stimulation - IFN- $\gamma$ . Als zytotoxische ILCs werden auch NK-Zellen angesehen [93, 182, 183].

$\gamma\delta$  T-Zellen sowie ILCs könnten demnach als zeitige IFN- $\gamma$  Produzenten nach akutem Myokardinfarkt fungieren. Dies sollte *via* GREAT Mausmodell überprüft werden, sowie deren Kommunikation mit myeloiden Zellen näher definiert werden.

#### **4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Standardtherapie bei akutem Herzinfarkt ist eine möglichst rasche Reperfusion mittels Ballon-Katheter-gestützter Gefäßerweiterung und anschließender Stentimplantation oder gegebenenfalls eine pharmakologische Thrombolyse. Abhängig vom Zeitpunkt nach Auftreten des Myokardinfarktes, können diese Therapien größere Schäden am Myokard verhindern. Häufig bleibt die Prognose jedoch schlecht und Patienten entwickeln eine systolische Dysfunktion mit LV-Dilatation, welche zu Herzinsuffizienz und zum Tod führen kann. Aus diesem Grund sollen neue

therapeutische Ansätze entwickelt werden, welche die Infarktheilung in geeigneter Weise unterstützen und zur Verbesserung der klinischen Prognose beitragen.

Anhand der Resultate dieser Dissertationsarbeit konnte das für die Infarktheilung wichtige Zusammenspiel von myeloiden Zellen (insbesondere Neutrophile, Monozyten/Makrophagen) und interagierenden Chemokinen und Zytokinen sowie granulozytären Peptiden weiter analysiert werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis und dem „IFN- $\gamma$ -signaling“ nach MI ließ sich dabei herstellen (Abbildung 4-1).

Mittels Myokardinfarkt-Mausmodell konnte bestätigt werden, dass die Neutrophilen- und Monozyteninfiltration sowie deren Aktivität über die Chemokine CXCL1, CCL2 und CX3CL1 reguliert werden. Chemokine sind initial in der Lage die Funktion von Endothelzellen und Fibroblasten zu beeinflussen [184]. Endothelzellen und residente kardiale Mastzellen werden wiederum als potenzielle Quellen für eine erste Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie CCL2/MCP-1 und CXCL8/IL-8, genannt [65, 185]. CCL2/MCP-1 ist dabei chemotaktisch wirksam für Monozyten/Makrophagen sowie für DCs, T-Zellen und NK-Zellen [8, 186]. Der CCR2 Rezeptor wird jedoch hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen exprimiert.

Wie in der vorliegenden Arbeit dargelegt, ist die Sezernierung von CCL2/MCP-1 sowie CX3CL1/CX3CR1 nachweislich essentiell für die Monozyten-Chemotaxis nach MI.

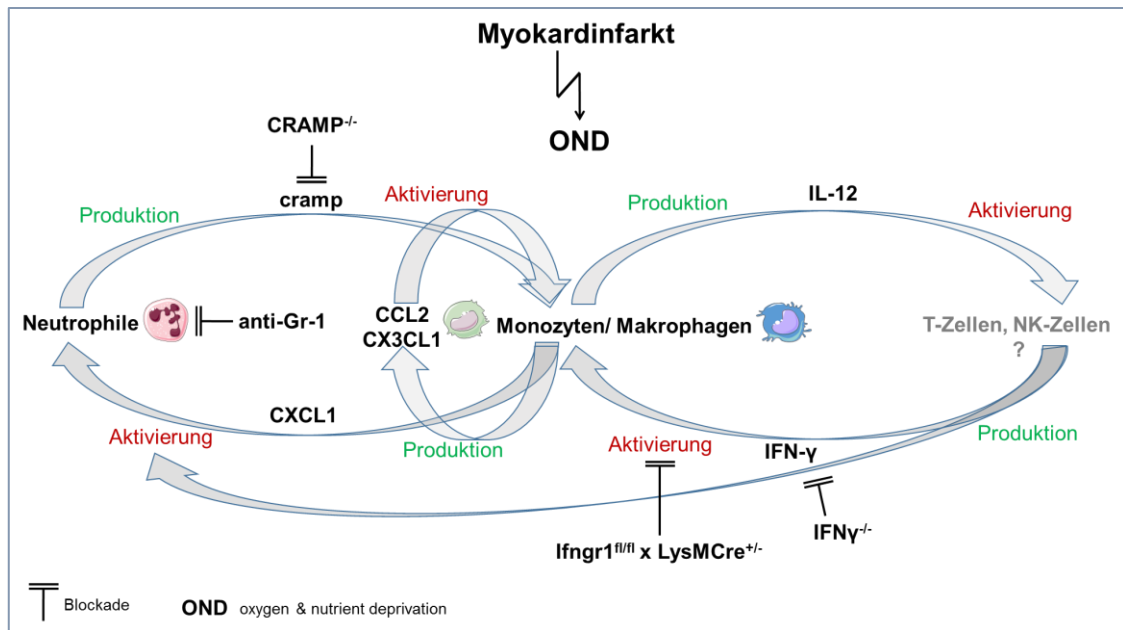
CXC Chemokine sind überdies potentiell chemotaktisch für Neutrophile, T-Zellen und NK-Zellen. CXCL1 (NAP-3, KC) wird hierbei von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen erzeugt und aktiviert vornehmlich Neutrophile. Hinweise für die CXCL1-abhängige Neutrophilenrekrutierung ins infarzierte Myokard ließen sich auch im verwendeten Mausmodell bestätigen.

Weiterhin mobilisiert und aktiviert CXCL1 auch T-Zellen. In zukünftigen Versuchen sollte deshalb überprüft werden, ob über diesen Rekrutierungsmechanismus aktivierte T-Zellen - speziell  $\gamma\delta$  T-Zellen - schon zu einem frühen Zeitpunkt nach MI IFN- $\gamma$  produzieren. Darüber hinaus werden IFN- $\gamma$  produzierende  $T_H1$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen über CX3CL1/CX3CR1 rekrutiert [43] und könnten somit als später IFN- $\gamma$ -produzierender Zelltyp - ab Tag 7 nach Myokardinfarktinduktion - dienen.

Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten sezernieren ebenso CXCL8/IL-8. Genauere Untersuchungen, ob IL-8 frühzeitig nach MI von gewebsständigen Makrophagen produziert wird und anschließend zur T-Zellaktivierung sowie zur IFN- $\gamma$  Produktion führt, sind nötig. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob für die IFN- $\gamma$  Sezernierung *via* T-



Zellen/NK-Zellen - abgesehen von der IL-12/IL-18 Stimulierung über Monozyten/Makrophagen - weitere Zytokine oder Chemokine in Frage kommen.



**Abbildung 4-1: Zusammenhang zwischen der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis und dem „IFN- $\gamma$ -signaling“ nach Myokardinfarkt**

Nach Myokardinfarkt wird die Neutrophilen- und Monozyteninfiltration über die Chemokine CXCL1, CCL2 und CX3CL1 dirigiert. Weiterhin wird die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis essentiell über das granuläre Peptid Cathelicidin reguliert. Die Monozyten/Makrophagen-Aktivität wird über IFN- $\gamma$  in einer positiven „feedback“ Schleife gesteuert - abhängig von der IL-12 Produktion sowie von der Ifngr1 Expression in Monozyten/Makrophagen. IFN- $\gamma$  aktiviert zudem Neutrophile - bei IFN- $\gamma$ -Defizienz werden signifikant weniger Neutrophile ins infarzierte Myokard rekrutiert.

Der über Antikörper medierte Eingriff in die Zellmigration sowie genetisch ausgeschaltete Mechanismen der Zellaktivierung resultierten in der vorliegenden Dissertation in einer signifikant reduzierten Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis über neutrophilstämmige granuläre Proteine (Cathelicidine) reguliert wird. Sowohl die Gr-1<sup>+</sup> Neutrophilen-Defizienz als auch die über Cathelicidinmangel provozierte Monozyten-Defizienz führten zu einer chemotaktischen sowie systolischen Funktionsstörung nach MI.

Ferner ließ sich nachweisen, dass proinflammatorische Zytokine die myelomonozytäre Zellmobilisierung beim MI steuern. Die Monozyten/Makrophagen-Aktivität wird hierbei über IFN- $\gamma$  in einer positiven „feedback“ Schleife reguliert und ist abhängig von der IL-12 Produktion sowie von der Ifngr1 Expression in Monozyten/Makrophagen. Belegt werden konnte zudem, dass IFN- $\gamma$  Neutrophile aktiviert - bei IFN- $\gamma$ -Defizienz werden signifikant weniger Neutrophile ins infarzierte Myokard rekrutiert. Welche Zellpopulation für den

zeitigen Anstieg des IFN- $\gamma$  Level im infarzierten Myokard verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. In Vorversuchen konnten weder CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen, noch NK1.1<sup>+</sup> Zellen an d1 nach MI als Produzenten von IFN- $\gamma$  im GREAT Mausmodell identifiziert werden. Ob diese eventuell zu einem späteren Zeitpunkt (d7 nach MI) als Produzenten fungieren, sollte noch untersucht werden.

Die hier generierten Daten lassen auf eine essentielle Rolle der Neutrophilen, der Monozyten sowie IFN- $\gamma$  beim Postinfarkt-Überleben und beim „cardiac remodeling“ schließen. Inwiefern eine Translation der Ergebnisse aus dem Mausmodell für immunmodulatorische Therapieanwendungen in der Klinik in Frage käme, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwierig zu beantworten. Weiterführende, humane Untersuchungen sind ebenfalls nötig, um die Rolle der unterschiedlichen Inflammationszellen näher zu klassifizieren und somit die Prognose von Myokardinfarkt Patienten zu verbessern und die Heilung nach MI zu fördern.

Methoden zur Reduktion der inflammatorischen Beschädigung des Myokards nach MI und damit verbundenen funktionalen Störungen müssen die potentiell positiven Effekte des zeitigen Neutrophileninflux ins infarzierte Myokard mit berücksichtigen. Therapeutische Strategien, welche myelomonocytaire Zellen (Neutrophile, Monozyten/Makrophagen) betreffen und die Verhinderung von Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt erzielen, sollten zudem die Zelldiversität, den Zeitpunkt der Zellinfiltration und die Gewebelokalisierung mit einbeziehen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Myeloide Zellen sind sowohl an der initialen Entzündungsreaktion als auch am anschließenden Heilungsprozess nach Myokardinfarkt (MI) beteiligt. Das Zusammenspiel zwischen diesen Zellen und Inflammationsmediatoren bleibt jedoch bisher unzureichend geklärt.

Über Mausmodelle zur gezielten Zelldepletion sowie unter Verwendung systemischer Knock-outs sollte der kardioprotektive oder partiell negative Einfluss von myeloiden Immunzellen (Neutrophile, Monozyten/Makrophagen) und interagierenden Mediatoren (Interferon-gamma, Tumornekrosefaktor-alpha, Cathelicidin) bei der Pathogenese des MI näher untersucht werden. Des Weiteren sollte die Charakterisierung der unterschiedlichen Effekte auf den Inflammationsverlauf und auf den funktionalen Phänotyp - abhängig vom Zeitpunkt nach MI - dazu dienen, neue immunregulatorische Therapieoptionen für die klinische Anwendung zu erschließen.

Durchflusszytometrische und molekularbiologische Analysen konnten Hinweise liefern, dass myelomonozytäre Lysozym M positive (LysM<sup>+</sup>) Zellen essentiell an der Inflammationsantwort nach MI beteiligt sind. Anhand von echokardiografischen sowie histologischen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die Entzündungs- sowie Reparatonsmechanismen, welche über LysM<sup>+</sup> Neutrophile und Monozyten/Makrophagen mediert werden, notwendig für das „cardiac remodeling“ und die kardiale Funktion nach MI sind. Der antikörpervermittelte Eingriff in die Zellmobilisierung sowie genetisch ausgeschaltete Aktivierungsmechanismen nach MI zeigten eine signifikante Reduktion der Neutrophilen- und Monozyten-Chemotaxis sowie eine verminderte Expression an Inflammationsmarkern. Des Weiteren hängt die neutrophilenabhängige Monozyten-Chemotaxis essentiell von neutrophilstämmigen granulären Proteinen (Cathelicidinen) ab - sowohl die „granulocyte differentiation antigen-1“ (Gr-1<sup>+</sup>) Neutrophilen-Defizienz als auch der über Cathelicidinmangel herbeigeführte Monozytendefizit führten zu einer chemotaktischen sowie systolischen Dysfunktion und war mit einem Anstieg der Mortalität nach MI assoziiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) die myelomonozytäre Zellrekrutierung beim MI vermitteln. Das inflammatorische Verhalten myeloider Zellen nach MI ist hierbei von der Ifngr1 Expression in myelomonozytären Zellen und von einem funktionalen „IFN- $\gamma$ -signaling“ abhängig. Es konnte zudem ein direkter Zusammenhang zwischen der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis und dem „IFN- $\gamma$ -signaling“ nach MI hergestellt werden. Welche Zellpopulation für den

zeitigen Anstieg des IFN- $\gamma$  Level im infarzierten Myokard verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Möglicherweise kommen insbesondere gamma:delta T-Zellen oder „innate lymphocyte cells“ in Frage.

Anhand der Resultate dieser Dissertation konnte das für die Infarktheilung wichtige Zusammenspiel von myelomonozytären Zellen, Chemokinen, Zytokinen sowie granulozytären Peptiden weiter analysiert werden. Die gewonnenen Untersuchungsergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Myokardinfarktes in Hinblick auf die immunmodulatorische Funktion myeloider Zellen sowie interagierender Mediatoren bei.

Ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach geeigneten Therapiemöglichkeiten nach MI stellt die gezielte Verminderung der inflammatorischen Beschädigung des Myokards und damit verbundene Reduktion von pathophysiologischen Veränderungen dar. Strategien, welche myelomonozytäre Zellen betreffen, müssen zudem die Zelldiversität, den Zeitpunkt der Zellinfiltration und die Gewebelokalisierung mit einbeziehen. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit sollten zukünftige therapeutische Methoden zur Verhinderung von Herzinsuffizienz nach MI den potentiell positiven Einfluss der zeitigen Neutrophileninfiltration ins infarzierte Myokard mit berücksichtigen.

## Summary

Myeloid cells are involved in the initial injury as well as in the later healing mechanisms of myocardial infarction (MI). However, the exact interactions between these cells and inflammatory mediators remain insufficiently understood. The aim of the study was to investigate the cardio protective or in part adverse role of myeloid immune cells (lysozyme M positive, granulocyte-receptor 1 positive cells) and interacting mediators (interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, cathelicidin) on cardiac injury and healing by using mouse models for targeted cell depletion and systemic knock-outs. Depending on the time point after induction of MI different effects on the inflammatory processes and on the functional phenotype should be characterized in order to find new immunoregulatory therapeutic possibilities for clinical application.

Flowcytometric and molecular analyses have shown that myeloid LysM<sup>+</sup> cells are involved in the inflammatory response after MI. It was also shown by echocardiographic and histological investigations that inflammatory processes and repair mechanisms - mediated by LysM<sup>+</sup> neutrophils and monocytes/macrophages - are necessary for cardiac remodeling and cardiac function after MI. The antibody mediated intervention in cell mobilization as well as genetically knocked out activation mechanisms resulted in a significant reduction of the neutrophil and monocyte chemotaxis as well as a reduced expression of inflammatory markers. After MI neutrophils are required for the monocyte chemotaxis. Additionally, the neutrophil dependent monocyte chemotaxis essentially relies on neutrophil-bound granular proteins. Both Gr-1<sup>+</sup> neutrophil deficiency and monocyte deficiency caused by the lack of cathelicidin led to chemotactic as well as systolic dysfunction and was associated with an increase in mortality. Moreover, it has been shown that inflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) mediate the myeloid cell recruitment and play an essential role in survival and cardiac remodeling following MI. The inflammatory behavior of myeloid cells depends on the *lfngr1* expression in myeloid cells and on a functional IFN- $\gamma$  signaling. In addition, a direct link between the neutrophil dependent monocyte chemotaxis and the IFN- $\gamma$  signaling according to MI could be established. The cell population which is responsible for the early increase of the IFN- $\gamma$  level in the infarcted myocardium still has to be detected - possibly  $\gamma\delta$  T-cells or ILCs are in charge of it.

The interplay between myeloid cells, chemokines, cytokines and granulocytic peptides, which is important for infarct healing, could be further analyzed. The results of this

investigation contribute to a better understanding of the pathogenesis of MI with regard to the immunomodulatory function of myeloid cells as well as interacting mediators. Therapeutic methods to improve post-MI heart failure and targeting myeloid cells must include tissue localization, cell diversity and timing. The data of this study indicate that therapeutic strategies to oppose the inflammatory injury in MI must consider as well the potentially beneficial effect of the early neutrophil influx into the infarcted myocardium.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Tillmann, B.N., *Atlas der Anatomie*. 2010, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 708.
2. Zilles, K. and B.N. Tillmann, *Anatomie*. 2010: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. Steffel, J. and T. Luscher, *Herz-Kreislauf*. Vol. 2. 2010: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. <http://www.servier.de/medical-art>.
5. Tirziu, D., F.J. Giordano, and M. Simons, *Cell communications in the heart*. *Circulation*, 2010. **122**(9): p. 928-37.
6. Lang, F. and P. Lang, *Basiswissen Physiologie*. Vol. 2. 2007: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
7. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Vol. 8. 2011: Springer.
8. Janeway, C.A., *Immunologie*. Vol. 5. 2005: Spektrum Akademischer Verlag.
9. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Vol. 3. 2011: Spektrum Akademischer Verlag.
10. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. Vol. 31. 2010: Springer.
11. Pape, H.C., A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. Vol. 7. 2014: Thieme.
12. Mendis, S., P. Puska, and B. Norrving, *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. 2011. p. 166.
13. *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. *Lancet*, 2015. **385**(9963): p. 117-71.
14. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#IX>.
15. Libby, P., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski, *Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum"*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **67**(9): p. 1091-103.
16. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Lifestyle effects on hematopoiesis and atherosclerosis*. *Circ Res*, 2015. **116**(5): p. 884-94.

17. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. Science, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
18. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
19. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.
20. Hansson, G.K., *The heroic era of cardiac care*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 963-963.
21. Hausenloy, D.J., *Signalling pathways in ischaemic postconditioning*. Thromb Haemost, 2009. **101**(4): p. 626-34.
22. Tavazzi, L., *Clinical epidemiology of acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1999. **138**(2 Pt 2): p. S48-54.
23. Libby, P., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski, *Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(5): p. 553-62.
24. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. Circulation, 1990. **82**(3 Suppl): p. II2-12.
25. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
26. Dutta, P. and M. Nahrendorf, *Monocytes in myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1066-70.
27. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart*. Circ Res, 2013. **112**(12): p. 1624-33.
28. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. Pharmacol Res, 2008. **58**(2): p. 88-111.
29. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.
30. Bujak, M., et al., *Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction*. Circ Res, 2009. **105**(10): p. 973-83.
31. Frantz, S., J. Bauersachs, and G. Ertl, *Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 474-81.



32. van der Laan, A.M., M. Nahrendorf, and J.J. Piek, *Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response*. Heart, 2012. **98**(18): p. 1384-90.
33. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. Circ Res, 2005. **96**(8): p. 881-9.
34. Kempf, T., et al., *Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(4): p. 361-9.
35. Majmudar, M.D., et al., *Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice*. Circulation, 2013. **127**(20): p. 2038-46.
36. Shinagawa, H. and S. Frantz, *Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages*. Curr Heart Fail Rep, 2015. **12**(3): p. 247-54.
37. Klocke, R., et al., *Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(1): p. 29-38.
38. Kolk, M.V., et al., *LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction*. J Vis Exp, 2009(32).
39. Gao, E., et al., *A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse*. Circ Res, 2010. **107**(12): p. 1445-53.
40. Adler, N., L.L. Camin, and P. Shulkin, *Rat model for acute myocardial infarction: application to technetium-labeled glucoheptonate, tetracycline, and polyphosphate*. J Nucl Med, 1976. **17**(3): p. 203-7.
41. Patten, R.D. and M.R. Hall-Porter, *Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(2): p. 138-44.
42. Frangogiannis, N.G., *Chemokines in ischemia and reperfusion*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 738-47.
43. Boag, S.E., E. Andreano, and I. Spyridopoulos, *Lymphocyte Communication in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury*. Antioxid Redox Signal, 2017.
44. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 498-511.

45. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
46. Frangogiannis, N.G., et al., *Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion*. Circulation, 1998. **98**(7): p. 699-710.
47. Frangogiannis, N.G., L.H. Michael, and M.L. Entman, *Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb)*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 89-100.
48. Dutta, P., et al., *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 325-9.
49. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
50. Soehnlein, O. and L. Lindbom, *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(6): p. 427-39.
51. Akpek, M., et al., *Relation of neutrophil/lymphocyte ratio to coronary flow to in-hospital major adverse cardiac events in patients with ST-elevated myocardial infarction undergoing primary coronary intervention*. Am J Cardiol, 2012. **110**(5): p. 621-7.
52. Ma, Y., A. Yabluchanskiy, and M.L. Lindsey, *Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013. **6**(1): p. 11.
53. Ma, X.L., et al., *Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium*. Circulation, 1993. **88**(2): p. 649-58.
54. Kubes, P., M. Jutila, and D. Payne, *Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2510-9.
55. Briaud, S.A., et al., *Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H60-7.
56. Faxon, D.P., et al., *The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct*

- angioplasty: the results of the HALT-MI study*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(7): p. 1199-204.
57. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2016.
58. van den Borne, S.W., et al., *Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction*. Cardiovasc Pathol, 2009. **18**(1): p. 37-43.
59. Ducharme, A., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 55-62.
60. Lindsey, M.L., et al., *Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H232-9.
61. Cooper, P.R., L.J. Palmer, and I.L. Chapple, *Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe?* Periodontol 2000, 2013. **63**(1): p. 165-97.
62. de Boer, O.J., et al., *Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction*. Thromb Haemost, 2013. **109**(2): p. 290-7.
63. Savchenko, A.S., et al., *VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice*. Blood, 2014. **123**(1): p. 141-8.
64. Frantz, S., et al., *Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction*. FASEB J, 2013. **27**(3): p. 871-81.
65. Frangogiannis, N.G., et al., *Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(12): p. 2567-76.
66. Courties, G., et al., *In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(15): p. 1556-66.

67. Usher, M.G., et al., *Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(9): p. 3350-64.
68. Weber, K.T., et al., *Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(1): p. 15-26.
69. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. Science, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
70. Cortez-Retamozo, V., et al., *Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 296-308.
71. Rickard, A.J., et al., *Deletion of Mineralocorticoid Receptors From Macrophages Protects Against Deoxycorticosterone/Salt-Induced Cardiac Fibrosis and Increased Blood Pressure*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 537-U180.
72. Fraccarollo, D., et al., *Immediate mineralocorticoid receptor blockade improves myocardial infarct healing by modulation of the inflammatory response*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 905-14.
73. Fraccarollo, D., et al., *Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2011. **123**(4): p. 400-8.
74. Panizzi, P., et al., *Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(15): p. 1629-38.
75. Kameda, K., et al., *Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling*. Eur Heart J, 2003. **24**(24): p. 2180-5.
76. Hinkel, R., et al., *Heme Oxygenase-1 Gene Therapy Provides Cardioprotection Via Control of Post-Ischemic Inflammation: An Experimental Study in a Pre-Clinical Pig Model*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(2): p. 154-65.
77. Anzai, A., et al., *Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling*. Circulation, 2012. **125**(10): p. 1234-45.
78. Dobaczewski, M., et al., *CCR5 Signaling Suppresses Inflammation and Reduces Adverse Remodeling of the Infarcted Heart, Mediating Recruitment of Regulatory T Cells*. American Journal of Pathology, 2010. **176**(5): p. 2177-2187.

79. 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.
80. Hofmann, U. and S. Frantz, *Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2015. **116**(2): p. 354-67.
81. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
82. Jiang, S. and C. Dong, *A complex issue on CD4(+) T-cell subsets*. *Immunol Rev*, 2013. **252**(1): p. 5-11.
83. Mosmann, T.R., L. Li, and S. Sad, *Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns*. *Semin Immunol*, 1997. **9**(2): p. 87-92.
84. Yang, Z., et al., *Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes*. *Circulation*, 2006. **114**(19): p. 2056-64.
85. Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson, *Adaptive immunity and atherosclerosis*. *Clin Immunol*, 2010. **134**(1): p. 33-46.
86. Loetscher, P., et al., *Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes*. *FASEB J*, 1994. **8**(13): p. 1055-60.
87. Dairaghi, D.J., et al., *RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression*. *J Immunol*, 1998. **160**(1): p. 426-33.
88. Luther, N., et al., *Innate Effector-Memory T-Cell Activation Regulates Post-Thrombotic Vein Wall Inflammation and Thrombus Resolution*. *Circ Res*, 2016. **119**(12): p. 1286-1295.
89. Tyznik, A.J., J.C. Sun, and M.J. Bevan, *The CD8 population in CD4-deficient mice is heavily contaminated with MHC class II-restricted T cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(4): p. 559-65.
90. 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.
91. Sobirin, M.A., et al., *Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1037-47.

92. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
93. Jiao, Y., et al., *Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 426.
94. Knorr, M., T. Munzel, and P. Wenzel, *Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 295.
95. Yokoyama, W.M., S. Kim, and A.R. French, *The dynamic life of natural killer cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 405-29.
96. Shereck, E., et al., *Human natural killer cells in health and disease*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(5): p. 615-23.
97. Tripp, C.S., S.F. Wolf, and E.R. Unanue, *Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3725-9.
98. Aranha, F.C., et al., *Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigote and macrophage infection*. Scand J Immunol, 2005. **62**(4): p. 334-41.
99. Atochina, O. and D. Harn, *LNFPIII/LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(9): p. 1041-9.
100. Soderquest, K., et al., *Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes*. Blood, 2011. **117**(17): p. 4511-8.
101. Yan, X., et al., *Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **114**(4): p. 637-49.
102. Whitman, S.C., et al., *Depletion of natural killer cell function decreases atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor null mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1049-54.
103. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *Identification of natural killer cells in human atherosclerotic plaque*. Atherosclerosis, 2005. **180**(2): p. 423-7.
104. Clausen, B.E., et al., *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice*. Transgenic Res, 1999. **8**(4): p. 265-77.

105. Buch, T., et al., *A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration*. Nat Methods, 2005. **2**(6): p. 419-26.
106. Goren, I., et al., *A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 132-47.
107. Wenzel, P., et al., *Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction*. Circulation, 2011. **124**(12): p. 1370-81.
108. Mekada, K., et al., *Genetic differences among C57BL/6 substrains*. Exp Anim, 2009. **58**(2): p. 141-9.
109. Nizet, V., et al., *Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection*. Nature, 2001. **414**(6862): p. 454-7.
110. Dalton, D.K., et al., *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1739-42.
111. Pasparakis, M., et al., *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
112. Löffler, G., *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Vol. 7. 2008: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
113. Daley, J.M., et al., *Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(1): p. 64-70.
114. Jasmin, J.F., et al., *Caveolin-1 deficiency exacerbates cardiac dysfunction and reduces survival in mice with myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1274-81.
115. Wang, X., et al., *Donor myocardial infarction impairs the therapeutic potential of bone marrow cells by an interleukin-1-mediated inflammatory response*. Sci Transl Med, 2011. **3**(100): p. 100ra90.
116. Zavadzkas, J.A., et al., *Direct regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase following myocardial infarction causes changes in survival,*

- cardiac function, and remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(4): p. H1656-66.
117. Müller, H.-J., *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. 2001: Spektrum Akademischer Verlag.
118. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
119. Kossmann, S., et al., *Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II*. J Biol Chem, 2014. **289**(40): p. 27540-50.
120. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
121. Sallam, A., *Die Hemmung von Transforming growth factor (TGF) aggraviert Mortalität und linksventrikuläre Dilatation nach Myokardinfarkt*, in 2009, Universität Würzburg: .
122. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
123. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 241-6.
124. van der Laan, A.M., et al., *A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction*. Am Heart J, 2012. **163**(1): p. 57-65 e2.
125. Blum, A., et al., *Levels of T-lymphocyte subpopulations, interleukin-1 beta, and soluble interleukin-2 receptor in acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1994. **127**(5): p. 1226-30.
126. Balakumar, P. and M. Singh, *Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in heart failure: future directions*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. **99**(6): p. 391-7.
127. Torzewski, M., et al., *Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon gamma-overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor-alpha*. Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 73-81.



128. Reifenberg, K., et al., *Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice*. Am J Pathol, 2007. **171**(2): p. 463-72.
129. Ma, J., et al., *Regulation of macrophage activation*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2334-46.
130. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
131. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
132. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
133. Davies, E.G., D. Isaacs, and R.J. Levinsky, *Defective immune interferon production and natural killer activity associated with poor neutrophil mobility and delayed umbilical cord separation*. Clin Exp Immunol, 1982. **50**(2): p. 454-60.
134. Loetscher, P., et al., *Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 322-7.
135. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 24-35.
136. Marchant, D.J., et al., *Inflammation in myocardial diseases*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 126-44.
137. Kossmann, S., et al., *Angiotensin II-induced vascular dysfunction depends on interferon-gamma-driven immune cell recruitment and mutual activation of monocytes and NK-cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1313-9.
138. Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton, and C.A. Biron, *A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 985-93.
139. Pien, G.C., et al., *Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4787-91.
140. Carnaud, C., et al., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4647-50.

141. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
142. Gessani, S. and F. Belardelli, *IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance*. Cytokine Growth Factor Rev, 1998. **9**(2): p. 117-23.
143. Aukrust, P., et al., *Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 485-91.
144. Sager, H.B., et al., *Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure*. Circ Res, 2016. **119**(7): p. 853-64.
145. Pucci, S., et al., *CX3CR1 receptor polymorphisms, Th1 cell recruitment, and acute myocardial infarction outcome: looking for a link*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 451349.
146. Chapman, G.A., et al., *The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium*. Eur J Pharmacol, 2000. **392**(3): p. 189-95.
147. Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 333-40.
148. Hasenberg, A., et al., *Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes*. Nat Methods, 2015. **12**(5): p. 445-52.
149. Wantha, S., et al., *Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes*. Circ Res, 2013. **112**(5): p. 792-801.
150. Doring, Y., et al., *Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice*. Circ Res, 2012. **110**(8): p. 1052-6.
151. van den Borne, S.W., et al., *Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 273-82.
152. Huang, S., et al., *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1742-5.
153. Pearl, J.E., et al., *Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse*. Cell Immunol, 2001. **211**(1): p. 43-50.

154. Kamijo, R., et al., *Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1435-40.
155. Jouanguy, E., et al., *Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2658-64.
156. Roesler, J., et al., *Listeria monocytogenes and recurrent mycobacterial infections in a child with complete interferon-gamma-receptor (IFNgammaR1) deficiency: mutational analysis and evaluation of therapeutic options*. Exp Hematol, 1999. **27**(9): p. 1368-74.
157. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.
158. Chen, W. and N.G. Frangogiannis, *Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(4): p. 945-53.
159. Bonaventura, A., F. Montecucco, and F. Dallegri, *Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury*. Eur J Clin Invest, 2016. **46**(6): p. 590-601.
160. Shivakumar, K., et al., *Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2653-8.
161. Tamamori, M., et al., *Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides*. Cell Biol Int, 1997. **21**(3): p. 175-80.
162. Han, J.W., et al., *Vessel wall-embedded dendritic cells induce T-cell autoreactivity and initiate vascular inflammation*. Circ Res, 2008. **102**(5): p. 546-53.
163. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
164. Ohteki, T., et al., *Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1981-6.
165. Niessner, A., et al., *Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha*. Circulation, 2006. **114**(23): p. 2482-9.

166. Beetz, S., et al., *Innate immune functions of human gammadelta T cells*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 173-82.
167. Carding, S.R. and P.J. Egan, *The importance of gamma delta T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 98-108.
168. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
169. Hayday, A.C., *[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 975-1026.
170. Garcia, V.E., et al., *Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1328-35.
171. Wang, L., et al., *Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6195-201.
172. Jameson, J. and W.L. Havran, *Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing*. Immunol Rev, 2007. **215**: p. 114-22.
173. Workalemahu, G., et al., *Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 153-7.
174. Agerberth, B., et al., *The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3086-93.
175. Brandes, M., K. Willmann, and B. Moser, *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells*. Science, 2005. **309**(5732): p. 264-8.
176. Hayday, A. and R. Tigelaar, *Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 233-42.
177. Havran, W.L. and J.M. Jameson, *Epidermal T cells and wound healing*. J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5423-8.
178. Sharp, L.L., et al., *Dendritic epidermal T-cell activation*. Crit Rev Immunol, 2005. **25**(1): p. 1-18.
179. Gao, Y., et al., *Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 433-42.

180. Yan, X., et al., *Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Am Heart Assoc, 2012. **1**(5): p. e004408.
181. Liao, Y.H., et al., *Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(4): p. 420-9.
182. Moretta, L. and F. Locatelli, *Innate lymphoid cells in normal and disease: An introductory overview*. Immunol Lett, 2016. **179**: p. 1.
183. Artis, D. and H. Spits, *The biology of innate lymphoid cells*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 293-301.
184. Frangogiannis, N.G. and M.L. Entman, *Chemokines in myocardial ischemia*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(5): p. 163-9.
185. Kumar, A.G., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 693-700.
186. Liu, J., H. Wang, and J. Li, *Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword*. Clin Med Insights Cardiol, 2016. **10**: p. 79-84.

**7 ANHANG****Abkürzungsverzeichnis**

ACE	engl. angiotensin-converting enzyme
ACh	Acetylcholin
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
APC	engl. antigen-presenting cell
APC (FACS)	Allophycocyanin
ATII	Angiotensin II
B-Mode	engl. brightness modulation
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CD	engl. cluster of differentiation
CCL	Chemokinligand
CCR	Chemokinrezeptor
cDNA	engl. complementary DNA
Ct	engl. cycle threshold
CRAMP	Cathelicidin
d	Tag
DAMP	engl. damage-associated molecular pattern
DC	engl. dendritic cell
dd	doppelt destilliert
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DTX	Diphtherietoxin
ECHO	Echokardiogramm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase, engl. endothelial nitric oxide synthase
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FAM	6-Carboxy-Fluorescein

---

FCS	fötales Kälberserum, engl. Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. forward scatter
g	Gramm, Beschleunigung
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
Gr	engl. granulocyte differentiation antigen
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HO	Hämoxxygenase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
iDTR	induzierbarer Diphterietoxinrezeptor
IFN	Interferon
lfngR	Interferon-gamma-Rezeptor
IL	Interleukin
ILC	engl. innate lymphocyte cell
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
IP	engl. interferon gamma-induced protein
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRF	engl. interferon regulatory factor
i.v.	intravenös
IVS	engl. inter ventricular septum
Jak	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KO	Knock-out
l	Liter
LAD	engl. left anterior descending coronary artery
LysM	Lysozym M
LV	linksventrikulär, linker Ventrikel
LVAW	engl. LV anterior wall
LVEDV	engl. LV end-diastolic volume
LVESV	engl. LV end-systolic volume
LVID,d	engl. LV internal diameter, diastole
LVID,s	engl. LV internal diameter, systole

---

LVPW	engl. LV posterior wall
MACS	engl. magnetic activated cell sorting
MCP	engl. monocyte chemoattractant protein
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	engl. major histocompatibility complex
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MR	engl. myeloid mineralocorticoid receptor
mRNA	engl. messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAP	engl. neutrophil-activating protein
nd	nicht detektierbar
NETs	engl. neutrophil extracellular traps
NF-κB	engl. nuclear factor-kappa B
ng	Nanogramm
NGAL	engl. neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	engl. nitric oxide
ns	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAMP	engl. pathogen-associated pattern
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
RWT	engl. relative wall thickness
PE	Phycoerythrin
PLAX	engl. parasternal long axis
qRT-PCR	quantitative PCR mit vorangegangener reversen Transkription



---

RNA	engl. ribonucleic acid
ROS	engl. reactive oxygen species
rpm	engl. rounds per minute
PRR	engl. pattern-recognition receptor
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAX	engl. parasternal short axis
s.c.	subkutan
SEM	engl. standard error of the mean
SSC	engl. sideward scatter
Stat	engl. signal transducers and activators of transcription
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T-bet	engl. T-box transcription factor
TBP	engl. TATA-box binding protein
TCR	engl. T-cell receptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor, engl. transforming growth factor
TLR	engl. toll-like receptor
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub> Zellen	regulatorische T-Zellen
UV	Ultraviolett
% v/v	Volumenprozent
VCAM	engl. vascular cell adhesion molecule
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
% w/w	Masseprozent

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Herzanatomie.....	2
Abbildung 1-2: Koronararterien .....	3
Abbildung 1-3: Atherogenese [7].....	9
Abbildung 1-4: Inflammationsantwort und Leukozytenrekrutierung nach MI [43] ...	14
Abbildung 2-1: Behandlungsregime LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Mäuse .....	37
Abbildung 2-2: Behandlungsregime Placebo (PBS) oder mit anti-Gr-1 Antikörper behandelter C57BL/6 Mäuse.....	37
Abbildung 2-3: Herstellung monoklonaler Antikörper über Hybridomzellen [112] ..	38
Abbildung 2-4: Versuchsaufbau der Geräte für die SHAM oder LAD Operation ....	41
Abbildung 2-5: Versuchsaufbau für SHAM oder LAD Operation .....	41
Abbildung 2-6: Behandlungsregime Cathelicidin-behandelter CRAMP <sup>-/-</sup> Mäuse ....	43
Abbildung 2-7: Echokardiografische Aufnahmen .....	44
Abbildung 2-8: Auswertung echokardiografischer Aufnahmen.....	45
Abbildung 2-9: FACS „gating“ Strategie von Herzgewebe, Milzgewebe aus C57BL/6, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> , TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> , anti-Gr-1- oder Placebo-behandelten Tieren und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	48
Abbildung 2-10: FACS „gating“ Strategie von Herzgewebe aus LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	49
Abbildung 2-11: FACS „gating“ Strategie von venösem Blut aus C57BL/6, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> , TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> , anti-Gr-1- oder Placebo-behandelten Tieren und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	50
Abbildung 3-1: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	57
Abbildung 3-2: Sirius Rot Färbung von Herzparaffinschnitten bei LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	58

---

Abbildung 3-3: Durchflusszytometrische Analyse der myelomonozytären Zellinfiltration bei LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	59
Abbildung 3-4: Chemokin mRNA Expressionsanalyse bei LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	61
Abbildung 3-5: IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ mRNA Expressionsanalyse bei LysM und LysM <sup>iDTR</sup> Tieren .....	62
Abbildung 3-6: Versuchsablauf C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse .....	64
Abbildung 3-7: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren .....	65
Abbildung 3-8: Durchflusszytometrische Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren.....	67
Abbildung 3-9: FACS Analyse der Zellinfiltration von Milzgewebe bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren.....	69
Abbildung 3-10: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren .....	70
Abbildung 3-11: Chemokin mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren.....	71
Abbildung 3-12: mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> , TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren .	72
Abbildung 3-13: Depletionskontrolle von venösem Blut nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7.....	73
Abbildung 3-14: Depletionskontrolle von Herzgewebe nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7.....	74
Abbildung 3-15: Depletionskontrolle von Milzgewebe nicht-operierter C57BL/6 Tiere an Tag 7.....	74
Abbildung 3-16: Kardiale Funktion und Überlebensrate bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren .....	76

---

Abbildung 3-17: FACS Analyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren .....	78
Abbildung 3-18: Repräsentative FACS Plots .....	78
Abbildung 3-19: FACS Analyse von Milzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren .....	81
Abbildung 3-20: FACS Analyse von venösem Blut bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren .....	82
Abbildung 3-21: Kardiale mRNA Expressionsanalyse bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren .....	85
Abbildung 3-22: IFN- $\gamma$ , <i>cramp</i> und IL-12b mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren ein Tag nach OP .....	86
Abbildung 3-23: IFN- $\gamma$ , <i>Ifngr1</i> und IL-12b mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei Placebo- und anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren an Tag 7 nach OP .....	86
Abbildung 3-24: Versuchsablauf C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Mäuse .....	88
Abbildung 3-25: Kardiale Funktion und Mortalitätsrate bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	89
Abbildung 3-26: „Cardiac remodeling“ bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	90
Abbildung 3-27: Elektrokardiogramm .....	91
Abbildung 3-28: FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	93
Abbildung 3-29: FACS Analyse der myokardialen Zellinfiltration bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	94
Abbildung 3-30: FACS Analyse von Milzgewebe bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	95
Abbildung 3-31: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	96

---

Abbildung 3-32: Kardiale mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren .....	97
Abbildung 3-33: mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6 und CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren ...	98
Abbildung 3-34: LV Funktionsanalyse bei C57BL/6, CRAMP <sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP .....	100
Abbildung 3-35: Herz-FACS Analyse der Zellinfiltration bei C57BL/6, CRAMP <sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP ....	101
Abbildung 3-36: FACS Analyse von Milzgewebe bei C57BL/6, CRAMP <sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP .....	102
Abbildung 3-37: FACS Analyse von venösem Blut bei C57BL/6, CRAMP <sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin-behandelten CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP .....	103
Abbildung 3-38: IFN- $\gamma$ mRNA Expressionsanalyse von Herzgewebe bei C57BL/6, CRAMP <sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP <sup>-/-</sup> Tieren drei Tage nach OP .....	104
Abbildung 3-39: Versuchsablauf LysM und Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup> Tiere .....	105
Abbildung 3-40: Kardiale Funktion bei LysM und Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup> Tieren an d3 .....	106
Abbildung 3-41: Kardiale FACS Analyse der Zellinfiltration bei LysM und Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup> Tieren an d3.....	107
Abbildung 3-42: FACS Analyse von Milzgewebe bei LysM und Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup> Tieren an d3.....	108
Abbildung 3-43: FACS Analyse von venösem Blut bei LysM und Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup> Tieren an d3.....	108
Abbildung 4-1: Zusammenhang zwischen der neutrophilenabhängigen Monozyten-Chemotaxis und dem „IFN- $\gamma$ -signaling“ nach Myokardinfarkt.....	130

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte .....	26
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	27
Tabelle 3: Verwendete chirurgische Instrumente .....	28
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Lösungen .....	28
Tabelle 5: Verwendete Kits .....	31
Tabelle 6: Verwendete Antikörper/Zellmarker und gekoppelte Fluorochrome für die Durchflusszytometrie .....	32
Tabelle 7: Verwendet Primer für die qRT-PCR .....	33
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Software .....	33
Tabelle 9: Auflistung der durchflusszytometrisch analysierten Immunzellpopulationen im Herz- und Milzgewebe sowie in venösem Blut anhand der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper oder Zellmarker .....	49

## Anhang Tabellen

Anhang Tabellen mit Daten, Stichprobenanzahl (n) und statistischer Auswertung.

### Anhang Tabelle 1: Ejektionsfraktion bei LysM und LysM<sup>IDTR</sup> Tieren

Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX); Mittelwert  $\pm$  SEM.

	LysM SHAM	LysM LAD	LysM <sup>IDTR</sup> SHAM	LysM <sup>IDTR</sup> LAD
d7	55,7 $\pm$ 3% (n=7)	32,6 $\pm$ 1,4% (n=19)	55,1 $\pm$ 1,5% (n=9)	30 $\pm$ 1,9% (n=12)
d14	54 $\pm$ 3,7% (n=7)	29,7 $\pm$ 2,1% (n=11)	54,6 $\pm$ 3% (n=8)	23,8 $\pm$ 2,9% (n=11)
d21	53,6 $\pm$ 3,5% (n=5)	28,4 $\pm$ 2,6% (n=10)	52,4 $\pm$ 3,7% (n=6)	20,3 $\pm$ 3,2% (n=8)
d28	51,0 $\pm$ 2,4% (n=3)	27,0 $\pm$ 2,8% (n=7)	53,1 $\pm$ 5,6% (n=5)	17,0 $\pm$ 1,4% (n=6)

Two-way ANOVA; LysM LAD vs. LysM<sup>IDTR</sup> LAD, ns.

### Anhang Tabelle 2: Zellinfiltration ins Herzgewebe bei LysM und LysM<sup>IDTR</sup> Tieren

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM.

	LysM				LysM <sup>IDTR</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	188 $\pm$ 44 (n=7)	2174 $\pm$ 726 (n=9)	11427 $\pm$ 1312 (n=3)	2589 $\pm$ 1099 (n=8)	421 $\pm$ 92 (n=6)	1392 $\pm$ 263 (n=9)	17479 $\pm$ 6316 (n=4)	1859 $\pm$ 566 (n=7)
<b>CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup></b>	59 $\pm$ 15 (n=6)	1602 $\pm$ 542 (n=9)	6944 $\pm$ 1564 (n=5) ****	513 $\pm$ 250 (n=8)	103 $\pm$ 23 (n=6)	760 $\pm$ 128 (n=8)	9590 $\pm$ 3247 (n=4)	758 $\pm$ 388 (n=7)

		***				****	****	
<b>CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup></b>	124 ± 32 (n=7)	557 ± 190 (n=9)	2278 ± 339 (n=5)	1422 ± 606 (n=8)	294 ± 71 (n=6)	1281 ± 540 (n=9) *	4620 ± 2386 (n=3)	1635 ± 661 (n=8)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test. **CD11b<sup>+</sup>/ Gr-1<sup>+</sup>**: LysM LAD d1 vs. LysM LAD d3, \*\*\*, p<0,001; LysM LAD d3 vs. LysM LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; LysM<sup>iDTR</sup> LAD d1 vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001; LysM<sup>iDTR</sup> LAD d1 vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD; \*\*\*\*, p<0,0001. **CD11b<sup>+</sup>/ F4/80<sup>+</sup>**: LysM<sup>iDTR</sup> LAD d1 vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, \*, p<0,05.

### Anhang Tabelle 3: mRNA Chemokinexpression bei LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren an d1 nach OP

mRNA Expressionslevel in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (LysM SHAM); Mittelwert ± SEM.

	LysM SHAM	LysM LAD	LysM <sup>iDTR</sup> SHAM	LysM <sup>iDTR</sup> LAD
<b>CXCL1</b>	100,0 ± 0,0 % (n=4)	35077,0 ± 14571,0 % (n=5) *	826,1 ± 258,9 % (n=4)	12148,0 ± 4176,0 % (n=6)
<b>CXCR1</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	14879,0 ± 6796,0 % (n=3) *, #	12,3 ± 7,8 % (n=3)	1702,0 ± 1539,0 % (n=6)
<b>CCL2</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	3989,0 ± 910,9 % (n=6) *	471,5 ± 223,5 % (n=3)	10915,0 ± 2735,0 % (n=5) *
<b>CCR2</b>	100,0 ± 0,0 % (n=2)	2693,0 ± 646,7 % (n=5) **	1157,0 ± 651,1 % (n=2)	10181,0 ± 2223,0 % (n=4) *

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test. **CXCL1**: LysM SHAM vs. LysM LAD, \*, p<0,05; **CXCR1**: LysM SHAM vs. LysM LAD, \*, p<0,05; LysM LAD vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, #, p<0,05; **CCL2**: LysM LAD vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, \*, p<0,05; LysM<sup>iDTR</sup> SHAM vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, \*, p<0,01; **CCR2**: LysM LAD vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, \*\*, p<0,01; LysM<sup>iDTR</sup> SHAM vs. LysM<sup>iDTR</sup> LAD, \*, p<0,05.

### Anhang Tabelle 4: mRNA Zytokinexpression bei LysM und LysM<sup>iDTR</sup> Tieren

mRNA Expressionslevel in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (LysM SHAM); Mittelwert ± SEM.



	LysM		LysM <sup>IDTR</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>IFN-<math>\gamma</math> d1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=5)	590,0 $\pm$ 134,3 % (n=4) *, #	149,7 $\pm$ 34,8 % (n=2)	166,1 $\pm$ 34,5 % (n=4)
<b>IFN-<math>\gamma</math> d7</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=12)	880,7 $\pm$ 312,9 % (n=7) *, #	66,0 $\pm$ 34,0 % (n=7)	224,7 $\pm$ 29,6 % (n=6)
<b>TNF-<math>\alpha</math> d7</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=12)	365,8 $\pm$ 74,3 % (n=8) *, #	69,1 $\pm$ 9,6 % (n=7)	165,3 $\pm$ 38,0 % (n=7)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **IFN- $\gamma$  d1**: LysM SHAM vs. LysM LAD, \*, p<0,01; LysM LAD vs. LysM<sup>IDTR</sup> LAD, #, p<0,01; **IFN- $\gamma$  d7**: LysM SHAM vs. LysM LAD, \*, p<0,001; LysM LAD vs. LysM<sup>IDTR</sup> LAD, #, p<0,05; **TNF- $\alpha$  d7**: LysM SHAM vs. LysM LAD, \*, p<0,0001; LysM LAD vs. LysM<sup>IDTR</sup> LAD, #, p<0,01.

#### Anhang Tabelle 5: Ejektionsfraktion bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäusen

Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX); Mittelwert  $\pm$  SEM.

C57BL/6			IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>			TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>		
SHAM	LAD		SHAM	LAD		SHAM	LAD	
d3	d3	d7	d3	d3	d7	d3	d3	d7
52,9 $\pm$ 1,9 % (n=3)	30,3 $\pm$ 2,7 % (n=9) *, #, §	27,8 $\pm$ 3,7 % (n=6)	53,0 $\pm$ 4,6 % (n=4)	17,2 $\pm$ 3,2 % (n=8) ****	15,6 $\pm$ 8,2 % (n=2)	51,9 $\pm$ 1,4 % (n=2)	15,6 $\pm$ 2,7 % (n=8) ****	14,4 $\pm$ 0,9 % (n=5)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 SHAM d3 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, §, p<0,01; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> SHAM d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> SHAM d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001.

#### Anhang Tabelle 6: Zellinfiltration ins Herzgewebe von C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren

Anzahl der Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NKT, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM.

C57BL/6		IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>		TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>	
SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD

	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	7 ± 3 (n=6)	2101 ± 659 (n=13)	8793 ± 2773 (n=6) *, #	1124 ± 623 (n=7)	108 ± 59 (n=7)	2606 ± 476 (n=15)	3726 ± 914 (n=6)	287 ± 250 (n=3)	45 ± 14 (n=7)	2731 ± 686 (n=9)	3875 ± 745 (n=8)	451 ± 200 (n=6)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	12 ± 5 (n=6)	534 ± 149 (n=15)	7970 ± 2947 (n=7) *, #	2198 ± 1567 (n=6)	18 ± 5 (n=7)	838 ± 207 (n=17)	2472 ± 968 (n=7)	117 ± 65 (n=3)	18 ± 9 (n=7)	334 ± 88 (n=11)	1850 ± 703 (n=9)	397 ± 175 (n=6)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	36 ± 16 (n=6)	85 ± 22 (n=15)	1960 ± 767 (n=7) *, #	1194 ± 586 (n=5)	23 ± 10 (n=7)	46 ± 20 (n=17)	471 ± 217 (n=7)	63 ± 10 (n=3)	2 ± 1 (n=7)	45 ± 25 (n=11)	450 ± 174 (n=10)	906 ± 345 (n=4)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	12 ± 6 (n=5)	41 ± 21 (n=13) **	290 ± 97 (n=7)	143 ± 81 (n=4)	3 ± 2 (n=4)	17 ± 8 (n=14)	142 ± 70 (n=10)	19 ± 9 (n=3)	5 ± 3 (n=5)	16 ± 6 (n=9)	148 ± 74 (n=9)	51 ± 22 (n=3)
<b>NKT</b>	7 ± 2 (n=5)	9 ± 4 (n=13) ***	41 ± 10 (n=7)	160 ± 93 (n=5)	5 ± 4 (n=2)	11 ± 5 (n=14) **	42 ± 20 (n=9)	177 ± 20 (n=3)	9 ± 5 (n=5)	16 ± 8 (n=7) **	48 ± 12 (n=8)	152 ± 53 (n=6)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	145 ± 75 (n=4)	136 ± 33 (n=13) *, #	580 ± 206 (n=6) *, #	610 ± 243 (n=4) **	118 ± 50 (n=4)	60 ± 20 (n=14)	59 ± 27 (n=10)	210 ± 172 (n=3)	96 ± 37 (n=5)	100 ± 23 (n=9)	115 ± 60 (n=10)	111 ± 35 (n=6)
<b>CD3<sup>+</sup></b>	1284 ± 739 (n=5)	3748 ± 1977 (n=13) *	12629 ± 5892 (n=6) *, #	9240 ± 4854 (n=3)	847 ± 452 (n=4)	1592 ± 460 (n=14)	1742 ± 441 (n=10)	3005 ± 581 (n=3)	768 ± 446 (n=4)	1308 ± 264 (n=8)	2697 ± 479 (n=9)	2312 ± 693 (n=6)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,0001; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>

LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,0001; **F4/80<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*, p<0,01; **NKT**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, \*\*\*, p<0,001; IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d1 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01; TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01; **NK1.1<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, #, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,001; C57BL/6 LAD d7 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,001; **CD3<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD d3 vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01.

### Anhang Tabelle 7: Zellinfiltration ins Milzgewebe von C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren

Anzahl der Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NKT, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Milzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6				IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>				TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	134 $\pm$ 123 (n=2)	632 $\pm$ 86 (n=7) ****	413 $\pm$ 65 (n=7)	288 $\pm$ 21 (n=6)	836 $\pm$ 126 (n=2)	864 $\pm$ 172 (n=8)	580 $\pm$ 146 (n=4)	345 $\pm$ 131 (n=2)	529 $\pm$ 0 (n=2)	2145 $\pm$ 134 (n=4) *,#	597 $\pm$ 98 (n=6)	694 $\pm$ 55 (n=2)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	51 $\pm$ 41 (n=2)	157 $\pm$ 19 (n=7) *	243 $\pm$ 42 (n=7)	161 $\pm$ 20 (n=6)	147 $\pm$ 58 (n=2)	259 $\pm$ 35 (n=8)	298 $\pm$ 39 (n=5)	197 $\pm$ 57 (n=2)	63 $\pm$ 15 (n=2)	354 $\pm$ 41 (n=5)	396 $\pm$ 63 (n=7)	272 $\pm$ 60 (n=3)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	8 $\pm$ 3 (n=2)	6 $\pm$ 1 (n=9) *,#	27 $\pm$ 3 (n=8) *,#	2 $\pm$ 1 (n=4)	1 $\pm$ 1 (n=2)	6 $\pm$ 1 (n=7)	19 $\pm$ 3 (n=5)	1 $\pm$ 0 (n=2)	1 $\pm$ 1 (n=2)	36 $\pm$ 9 (n=5) *	52 $\pm$ 10 (n=7) ****	4 $\pm$ 1 (n=3)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	1 (n=1)	4 $\pm$ 1 (n=7)	7 $\pm$ 2 (n=5)	6 $\pm$ 2 (n=2)	11 $\pm$ 0 (n=2)	10 $\pm$ 3 (n=11)	15 $\pm$ 2 (n=8)	2 $\pm$ 0 (n=2)	7 $\pm$ 7 (n=3)	18 $\pm$ 7 (n=7)	21 $\pm$ 5 (n=7)	9 $\pm$ 3 (n=3)
<b>NKT</b>	59 (n=1)	94 $\pm$ 4 (n=7) **	72 $\pm$ 16 (n=5) *	60 $\pm$ 6 (n=2)	127 $\pm$ 32 (n=2)	113 $\pm$ 10 (n=11)	94 $\pm$ 20 (n=8)	73 $\pm$ 24 (n=2)	227 $\pm$ 44 (n=3)	406 $\pm$ 85 (n=7)	403 $\pm$ 129 (n=7)	256 $\pm$ 41 (n=3)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	66 (n=1)	75 $\pm$ 6 (n=7)	54 $\pm$ 8 (n=5)	62 $\pm$ 3 (n=2)	28 $\pm$ 13 (n=2)	47 $\pm$ 8 (n=11)	29 $\pm$ 3 (n=8) **	94 $\pm$ 27 (n=2)	51 $\pm$ 14 (n=3)	68 $\pm$ 11 (n=7) **	59 $\pm$ 6 (n=7)	113 $\pm$ 6 (n=3)

<b>CD3<sup>+</sup></b>	7616 (n=1)	10036 ± 457 (n=7)	6382 ± 301 (n=5) *	4498 ± 867 (n=2)	5766 ± 856 (n=2)	9385 ± 651 (n=11)	8286 ± 1332 (n=8)	5152 ± 1299 (n=2)	13771 ± 2099 (n=3)	14530 ± 1725 (n=7)	12028 ± 1428 (n=7)	10217 ± 1373 (n=3)
------------------------	---------------	----------------------	--------------------------	------------------------	---------------------	----------------------	-------------------------	-------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, \*\*\*\*, p<0,01; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,0001; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d7, #, p<0,0001; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, \*, p<0,05; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, #, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD d3 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d7, \*, p<0,05; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; **NKT**: C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,05; **NK1.1<sup>+</sup>**: IFNγ<sup>-/-</sup> LAD d3 vs. IFNγ<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01; **CD3<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d3 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,05.

#### Anhang Tabelle 8: Venöses Blut FACS von C57BL/6, IFNγ<sup>-/-</sup> und TNFα<sup>-/-</sup> Tieren

Prozentualer Anteil an Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>-</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen in venösem Blut; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6			IFNγ <sup>-/-</sup>			TNFα <sup>-/-</sup>		
	SHAM	LAD		SHAM	LAD		SHAM	LAD	
	d1	d1	d3	d1	d1	d3	d1	d1	d3
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	28,9 ± 2,2 % (n=4)	43,3 ± 6,3 % (n=8) *,#	21,7 ± 2,3 % (n=10)	20,3 % (n=1)	46,0 ± 6,5 % (n=6)	34,2 ± 9,1 % (n=4)	33,1 % (n=1)	72,6 ± 2,7 % (n=5) ****	34,9 ± 2,8 % (n=10)
<b>Ly-6G<sup>-</sup></b>	9,5 ± 1,7 % (n=5)	7,5 ± 1,0 % (n=10)	10,4 ± 0,9 % (n=13)	7,2 % (n=1)	10,7 ± 1,7 % (n=6)	8,6 ± 1,1 % (n=5)	8,6 % (n=1)	4,0 ± 1,0 % (n=5) **	9,6 ± 0,7 % (n=10)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	36,1 ± 1,2 % (n=4)	48,6 ± 5,5 % (n=8)	49,5 ± 3,2 % (n=10)	39,0 % (n=1)	48,4 ± 5,1 % (n=6)	63,6 ± 2,4 % (n=5)	48,5 % (n=1)	54,4 ± 5,9 % (n=5)	60,1 ± 2,9 % (n=10)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	41,8 ± 0,9 % (n=4)	36,0 ± 5,3 % (n=6) **	32,6 ± 1,9 % (n=8) *,#	43,5 % (n=1)	25,2 ± 3,7 % (n=6)	15,9 ± 1,0 % (n=5)	29,2 % (n=1)	17,9 ± 2,3 % (n=4)	20,2 ± 1,9 % (n=6)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, #, p<0,01; TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001; **Ly-6G<sup>-</sup>**: TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*, p<0,01; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d1, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. IFNγ<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. TNFα<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01.

**Anhang Tabelle 9: Kardiale mRNA Chemokinexpression bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren an d3 post OP**mRNA Expressionslevel in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM); Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6		IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>		TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>CXCL1</b>	100,0 % (n=1)	1674,0 $\pm$ 124,3 % (n=6) *,#	29,0 % (n=1)	802,0 $\pm$ 43,9 % (n=3)	0,1 % (n=1)	647,3 $\pm$ 74,8 % (n=3)
<b>CCL2</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=3)	10116,0 $\pm$ 1690,0 % (n=6) *,#	147,6 $\pm$ 50,5 % (n=4)	3307,0 $\pm$ 1134,0 % (n=6)	22,0 % (n=1)	912,4 $\pm$ 161,4 % (n=4)
<b>CX3CL1</b>	100,0 % (n=1)	668,8 $\pm$ 201,3 % (n=6)	130,0 % (n=1)	204,3 $\pm$ 41,7 % (n=3)	133,0 % (n=1)	183,0 $\pm$ 12,0 % (n=2)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CXCL1**: C57BL/6 LAD vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, #, p<0,001; **CCL2**: C57BL/6 LAD vs. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD vs. TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> LAD, #, p<0,001.

**Anhang Tabelle 10: Kardiale mRNA Zytokinexpression bei C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> und TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup> Tieren**

	C57BL/6		IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>		TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>IL-12b, d1</b>	100,0 % (n=1)	606,5 $\pm$ 159,5 % (n=2) *,#	32,8 $\pm$ 11,1 % (n=4)	273,0 $\pm$ 24,7 % (n=4)	9,0 $\pm$ 8,0 % (n=2)	96,3 $\pm$ 52,5 % (n=3)
<b>IL-12b, d3</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=2)	10744,0 $\pm$ 1856,0 % (n=6) *,#	0,0 % (n=1)	3432,0 $\pm$ 1900,0 % (n=3)	0,0 % (n=1)	876,0 $\pm$ 854,6 % (n=3)
<b>Ifngr1, d3</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=3)	354,7 $\pm$ 9,8 % (n=3) *,#	54,0 $\pm$ 17,0 % (n=2)	138,9 $\pm$ 44,4 % (n=7)	47,0 % (n=1)	98,0 $\pm$ 44,5 % (n=6)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **IL-12b, d1**: C57BL/6 LAD vs. IFN $\gamma^{-/-}$  LAD, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD vs. TNF $\alpha^{-/-}$  LAD, #, p<0,05; **IL-12b, d3**: C57BL/6 LAD vs. IFN $\gamma^{-/-}$  LAD, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD vs. TNF $\alpha^{-/-}$  LAD, #, p<0,05; **lfng1, d3**: C57BL/6 LAD vs. IFN $\gamma^{-/-}$  LAD, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD vs. TNF $\alpha^{-/-}$  LAD, #, p<0,01.

**Anhang Tabelle 11: EF bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX); Mittelwert  $\pm$  SEM.

C57BL/6 + Placebo				C57BL/6 + anti-Gr-1			
SHAM	LAD			SHAM	LAD		
d2	d2	d4	d6	d2	d2	d4	d6
54,6 $\pm$ 5,4 % (n=10) ****	29,3 $\pm$ 1,7 % (n=17)	28,4 $\pm$ 2,1 % (n=7)	25,9 $\pm$ 1,9 % (n=10) *	55,1 $\pm$ 3,0 % (n=8) ****	23,6 $\pm$ 1,8 % (n=19)	22,1 $\pm$ 2,7 % (n=6)	10,6 $\pm$ 1,5 % (n=5)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 + Placebo SHAM d2 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d2, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 + anti-Gr-1 SHAM d2 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d2, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 + Placebo LAD d6 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d6, \*, p<0,05.

**Anhang Tabelle 12: Zellinfiltration ins Herzgewebe bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NKT, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6 + Placebo				C57BL/6 + anti-Gr-1			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	56 $\pm$ 23 (n=3)	3563 $\pm$ 680 (n=9) ***	23632 $\pm$ 3339 (n=8) *,#	4130 $\pm$ 979 (n=5)	13 $\pm$ 4 (n=3)	326 $\pm$ 106 (n=9)	1360 $\pm$ 343 (n=10)	2963 $\pm$ 836 (n=5)
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	38 $\pm$ 19 (n=3)	2876 $\pm$ 535 (n=9) ***	16151 $\pm$ 2013 (n=8) ***	962 $\pm$ 519 (n=5)	0 (n=3)	1 $\pm$ 0 (n=9)	2 $\pm$ 1 (n=10)	31 $\pm$ 10 (n=6)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	13 $\pm$ 5 (n=3)	620 $\pm$ 158 (n=9) ***	9642 $\pm$ 3095 (n=8)	1768 $\pm$ 479 (n=3)	8 $\pm$ 4 (n=3)	279 $\pm$ 95 (n=9)	1323 $\pm$ 211 (n=10)	1117 $\pm$ 445 (n=3)

			*,#					
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	5 ± 1 (n=3)	49 ± 29 (n=9) *,#	2154 ± 573 (n=9) ***	1748 ± 206 (n=5)	5 ± 1 (n=3)	36 ± 13 (n=9)	290 ± 62 (n=8)	667 ± 182 (n=4)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	1 ± 1 (n=3)	27 ± 12 (n=9)	3466 ± 2735 (n=9)	375 ± 87 (n=6)	1 ± 0 (n=3)	11 ± 5 (n=9)	244 ± 103 (n=10)	239 ± 85 (n=4)
<b>NKT</b>	37 ± 24 (n=3)	100 ± 34 (n=9) ****	290 ± 96 (n=8) ****	942 ± 232 (n=4) ****	24 ± 20 (n=3)	47 ± 11 (n=7)	113 ± 41 (n=8)	128 ± 34 (n=4)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	35 ± 14 (n=3)	64 ± 22 (n=9) *	218 ± 29 (n=6) *	273 ± 151 (n=4)	23 ± 18 (n=3)	28 ± 9 (n=9)	36 ± 10 (n=9)	117 ± 36 (n=4)
<b>CD3<sup>+</sup></b>	228 ± 121 (n=3)	239 ± 73 (n=7) ****	2915 ± 859 (n=10) **	7843 ± 2269 (n=5)	118 ± 79 (n=3)	118 ± 25 (n=9)	1496 ± 468 (n=10)	3621 ± 1030 (n=4)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CD11b<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, #, p<0,001; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*, p<0,001; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, #, p<0,001; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, #, p<0,01; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; **NKT**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; **NK1.1<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*, p<0,05; **CD3<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*, p<0,01.

### Anhang Tabelle 13: Zellinfiltration ins Milzgewebe bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NKT, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Milzgewicht; Mittelwert ± SEM.

C57BL/6 + Placebo		C57BL/6 + anti-Gr-1	
SHAM	LAD	SHAM	LAD

	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	397 ± 36 (n=2)	1013 ± 221 (n=7) *,#	677 ± 122 (n=4) *	310 ± 35 (n=7)	34 ± 4 (n=2)	72 ± 12 (n=7)	73 ± 23 (n=5)	20 ± 36 (n=6)
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	261 ± 34 (n=2) *	777 ± 196 (n=7) *,#	380 ± 109 (n=4)	178 ± 19 (n=7)	3 ± 2 (n=2)	3 ± 2 (n=7)	1 ± 0 (n=5)	3 ± 1 (n=7)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	130 ± 4 (n=2)	226 ± 41 (n=7) ***	211 ± 17 (n=5) ***	130 ± 17 (n=5)	26 ± 3 (n=2)	54 ± 9 (n=7)	47 ± 11 (n=6)	140 ± 12 (n=4)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	5 ± 4 (n=2)	419 ± 201 (n=7)	46 ± 25 (n=4)	2 ± 0 (n=7)	5 ± 2 (n=2)	1014 ± 456 (n=6) *,#	24 ± 14 (n=5)	1 ± 0 (n=7)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	3 ± 1 (n=2)	56 ± 10 (n=4) *,#	46 ± 2 (n=2) *	7 ± 1 (n=5)	3 ± 1 (n=2)	15 ± 4 (n=7)	33 ± 10 (n=4)	7 ± 1 (n=5)
<b>NKT</b>	66 ± 11 (n=2)	101 ± 19 (n=7)	54 ± 15 (n=4)	60 ± 9 (n=7)	45 ± 25 (n=2)	58 ± 11 (n=7)	40 ± 7 (n=5)	27 ± 6 (n=7)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	169 ± 145 (n=2)	228 ± 131 (n=7)	275 ± 61 (n=2)	73 ± 9 (n=7)	139 ± 122 (n=2)	68 ± 33 (n=7)	149 ± 40 (n=5)	45 ± 13 (n=7)
<b>CD3<sup>+</sup></b>	6489 ± 4281 (n=2)	7289 ± 760 (n=7)	4250 ± 928 (n=4)	4896 ± 518 (n=7)	4584 ± 1747 (n=2)	6125 ± 1349 (n=7) *	2702 ± 621 (n=5)	2543 ± 382 (n=7)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CD11b<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, #, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*, p<0,05; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, #, p<0,001; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, #, p<0,05; **F4/80<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,0001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, #, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*, p<0,05; **CD3<sup>+</sup>**: C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*, p<0,05;



**Anhang Tabelle 14: Venöses Blut FACS bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**Prozentualer Anteil an Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>-</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen in venösem Blut; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6 + Placebo				C57BL/6 + anti-Gr-1			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	19,2 ± 3,7 % (n=6) **	37,8 ± 5,9 % (n=10) *,#	20,1 ± 3,7 % (n=10)	13,0 ± 1,5 % (n=6)	0,1 ± 0,03 % (n=8)	0,3 ± 0,2 % (n=10)	0,1 ± 0,03 % (n=15)	0,2 ± 0,04 % (n=7)
<b>Ly6G<sup>-</sup></b>	6,5 ± 0,8 % (n=5)	6,5 ± 0,7 % (n=11) ***	10,0 ± 1,2 % (n=8)	9,0 ± 1,2 % (n=6) *	11,7 ± 2,1 % (n=7)	15,9 ± 2,1 % (n=12)	14,2 ± 1,8 % (n=8)	18,2 ± 2,8 % (n=8)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	37,5 ± 3,2 % (n=6) ***	49,8 ± 5,6 % (n=10) ***	45,8 ± 3,1 % (n=9) ***	44,2 ± 4,0 % (n=5)	9,5 ± 1,1 % (n=8)	15,9 ± 3,4 % (n=10)	4,5 ± 0,5 % (n=15) ***	29,0 ± 7,2 % (n=5)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	39,5 ± 2,6 % (n=6) ***	28,2 ± 4,1 % (n=10) ***	34,3 ± 2,6 % (n=10) ***	34,8 ± 3,0 % (n=6)	67,3 ± 4,0 % (n=8)	52,7 ± 5,0 % (n=10) *,#	67,3 ± 3,9 % (n=15) ***	23,1 ± 2,4 % (n=7)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*\*, p<0,01; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, #, p<0,001; **Ly-6G<sup>-</sup>**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*, p<0,05; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*\*\*, p<0,001; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, #, p<0,001; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*\*\*, p<0,001.

**Anhang Tabelle 15: Kardiale mRNA Chemokinexpression bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**

mRNA Expressionslevel in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 + Placebo SHAM); Mittelwert ± SEM.

C57BL/6 + Placebo	C57BL/6 + anti-Gr-1
-------------------	---------------------

	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CXCL1</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3) ***	21529,0 ± 7324,0 % (n=2) *,#,\$	1169,0 ± 429,4 % (n=8)	313,0 ± 106,0 % (n=3)	163,5 ± 151,5 % (n=2)	7113,0 ± 1496,0 % (n=9) *,#	913,0 ± 245,9 % (n=7)	430,3 ± 144,6 % (n=4)
<b>CXCR1</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	143,4 ± 40,2 % (n=5)	118,3 ± 37,6 % (n=4)	65,0 ± 5,0 % (n=3)	23,33 ± 11,4 % (n=3)	53,8 ± 20,4 % (n=5)	73,7 ± 18,1 % (n=3)	60,7 ± 14,2 % (n=3)
<b>CCL2</b>	100,0 ± 0,0 % (n=2) ***	7722,0 ± 847,5 % (n=4) *,#,\$	4766,0 ± 575,5 % (n=6) ***	549,9 ± 76,1 % (n=8)	254,3 ± 11,4 % (n=4) *	3430,0 ± 899,2 % (n=7) *	3172,0 ± 931,1 % (n=4)	404,5 ± 62,6 % (n=4)
<b>CCR2</b>	100,0 % (n=1)	4462,0 ± 359,0 % (n=4) *	6153,0 ± 1109,0 % (n=6) *,#	541,8 ± 131,3 % (n=4)	131,5 ± 105,5 % (n=2)	2039,0 ± 566,1 % (n=6)	2499,0 ± 752,0 % (n=5)	452,0 ± 155,2 % (n=4)
<b>CX3CL1</b>	100,0 ± 0,0 % (n=2)	166,6 ± 34,2 % (n=5) ***	149,2 ± 14,8 % (n=6) ***	385,2 ± 51,9 % (n=6)	97,0 ± 19,0 % (n=2)	126,0 ± 17,1 % (n=5)	106,3 ± 21,0 % (n=6) *	259,8 ± 29,8 % (n=6)
<b>CX3CR1</b>	100,0 % (n=1)	190,7 ± 32,6 % (n=3)	187,4 ± 30,2 % (n=5)	277,7 ± 47,7 % (n=6) *	19,3 ± 1,7 % (n=4)	157,0 ± 47,8 % (n=5)	141,4 ± 20,0 % (n=5)	101,8 ± 24,7 % (n=6)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CXCL1**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, #, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, §, p<0,001; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3, \*, p<0,01; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, #, p<0,05. **CCL2**: C57BL/6 + Placebo SHAM d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d1, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d3, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, #, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, §, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 + anti-Gr-1 SHAM d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*, p<0,05; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*, p<0,05; **CCR2**: C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*, p<0,001; C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, #, p<0,01;

**CX3CL1:** C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*,  $p < 0,001$ ; C57BL/6 + Placebo LAD d3 vs. C57BL/6 + Placebo LAD d7, \*\*\*,  $p < 0,001$ ; C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d3 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*,  $p < 0,05$ ; **CX3CR1:** C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*,  $p < 0,05$ .

**Anhang Tabelle 16: Kardiale mRNA Zytokinexpression bei Placebo-behandelten und bei anti-Gr-1-behandelten C57BL/6 Tieren**  
mRNA Expression in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 + Placebo SHAM); Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6 + Placebo		C57BL/6 + anti-Gr-1	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>IFN<math>\gamma</math>, d1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=2)	524,6 $\pm$ 152,8 % (n=5) *	132,5 $\pm$ 98,5 % (n=2)	204,5 $\pm$ 41,0 % (n=6)
<b>cramp, d1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=4)	334,3 $\pm$ 88,0 % (n=7) *	103,8 $\pm$ 32,2 % (n=4)	128,7 $\pm$ 29,7 % (n=9)
<b>IL-12b, d1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=3)	1500,0 $\pm$ 763,1 % (n=4) *	60,0 $\pm$ 42,9 % (n=3)	189,6 $\pm$ 104,0 % (n=5)
<b>IFN<math>\gamma</math>, d7</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=3)	2874 $\pm$ 2784,0 % (n=2) *	48,1 $\pm$ 25,0 % (n=3)	317,1 $\pm$ 116,2 % (n=5)
<b>lfngr1, d7</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=2)	193,2 $\pm$ 7,0 % (n=6) **	101,0 % (n=1)	150,7 $\pm$ 5,8 % (n=3)
<b>IL-12b, d7</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=2)	12244,0 $\pm$ 2429,0 % (n=6) *	99,0 $\pm$ 29,0 % (n=2)	4203,0 $\pm$ 540,2 % (n=3)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **IFN $\gamma$ , d1:** C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*,  $p < 0,05$ ; **cramp, d1:** C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*,  $p < 0,05$ ; **IL-12b, d1:** C57BL/6 + Placebo LAD d1 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d1, \*,  $p < 0,05$ ; **IFN $\gamma$ , d7:** C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*,  $p < 0,05$ ; **lfngr1, d7:** C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*\*,  $p < 0,01$ ; **IL-12b, d7:** C57BL/6 + Placebo LAD d7 vs. C57BL/6 + anti-Gr-1 LAD d7, \*,  $p < 0,05$ .

**Anhang Tabelle 17: EF bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**

Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX); Mittelwert  $\pm$  SEM.

C57BL/6	CRAMP <sup>-/-</sup>
---------	----------------------

SHAM	LAD			SHAM	LAD		
d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
67,5 % (n=1)	29,6 ± 3,2 % (n=3)	29,3 ± 1,3 % (n=15) **	25,1 ± 4,4 % (n=5) *	64,6 ± 2,7 % (n=2)	26,9 ± 3,2 % (n=6) **	20,3 ± 1,4 % (n=11)	12,3 ± 1,5 % (n=4)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d7 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d7, \*, p<0,05; CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01.

#### Anhang Tabelle 18: Zellinfiltration ins Herzgewebe bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NKT, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6				CRAMP <sup>-/-</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	62 ± 19 (n=7)	3325 ± 678 (n=12) ***	41487 ± 15918 (n=7) *,#	910 ± 367 (n=7)	35 ± 0 (n=2)	3398 ± 1473 (n=5)	4337 ± 913 (n=6)	516 ± 300 (n=4)
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	16 ± 9 (n=7)	2858 ± 748 (n=10) ***	22575 ± 8450 (n=6) **	588 ± 316 (n=6)	12 ± 3 (n=2)	2433 ± 1046 (n=5)	3232 ± 703 (n=6)	146 ± 84 (n=4)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	13 ± 4 (n=7)	1036 ± 201 (n=7) **	18996 ± 7881 (n=7) *,#	585 ± 414 (n=6)	8 ± 1 (n=2)	94 ± 38 (n=4)	965 ± 234 (n=6)	59 ± 21 (n=4)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	32 ± 14 (n=7)	165 ± 21 (n=7) **	2542 ± 739 (n=9) **	1194 ± 586 (n=5)	14 ± 1 (n=2)	191 ± 141 (n=6)	205 ± 82 (n=7)	120 ± 81 (n=3)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	10 ± 6 (n=6)	36 ± 19 (n=15) ***	296 ± 78 (n=10) *,#	97 ± 49 (n=7)	1 ± 0 (n=2)	1 ± 1 (n=5)	74 ± 29 (n=5)	17 ± 12 (n=4)

<b>NKT</b>	6 ± 2 (n=6)	8 ± 4 (n=15) ***	41 ± 8 (n=9) *	160 ± 93 (n=5)	0 (n=2)	3 ± 3 (n=6)	8 ± 3 (n=5)	67 ± 56 (n=2)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	116 ± 65 (n=5)	159 ± 35 (n=11)	471 ± 132 (n=10) *	410 ± 161 (n=7)	1 ± 1 (n=2)	64 ± 37 (n=6)	39 ± 11 (n=6)	42 ± 15 (n=4)
<b>CD3<sup>+</sup></b>	61 ± 22 (n=4)	3514 ± 1845 (n=14)	6775 ± 3318 (n=12)	4582 ± 2097 (n=8)	241 ± 39 (n=2)	602 ± 191 (n=6)	468 ± 252 (n=6)	2144 ± 825 (n=4)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CD11b<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*, p<0,01; **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*, p<0,01; **F4/80<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,05; **NKT**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,05; **NK1.1<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*, p<0,05.

#### Anhang Tabelle 19: Zellinfiltration ins Milzgewebe bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen/mg Milzgewicht; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6				CRAMP <sup>-/-</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	32 (n=1)	631 ± 131 (n=9)	678 ± 104 (n=7)	451 ± 33 (n=6)	33 ± 1 (n=2)	386 ± 170 (n=6)	615 ± 76 (n=7)	451 ± 92 (n=3)
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	11 (n=1)	632 ± 86 (n=7) *,#	413 ± 65 (n=7)	288 ± 21 (n=6)	13 ± 3 (n=2)	242 ± 112 (n=6)	385 ± 56 (n=7)	293 ± 63 (n=3)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	10 (n=1)	157 ± 19 (n=7)	243 ± 42 (n=7)	161 ± 20 (n=6)	8 ± 0 (n=2)	135 ± 60 (n=6)	193 ± 20 (n=6)	156 ± 32 (n=3)

<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	10 (n=1)	6 ± 1 (n=9) ****	27 ± 3 (n=8) *,#	2 ± 1 (n=6)	10 ± 1 (n=2)	7 ± 2 (n=6)	14 ± 4 (n=8)	1 ± 0 (n=4)
----------------------------	----------	---------------------	---------------------	-------------	--------------	-------------	--------------	-------------

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,05; C57BL/6 LAD d1 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d1, #, p<0,01; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,01.

### Anhang Tabelle 20: Venöses Blut FACS bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

Prozentualer Anteil an Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>-</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen in venösem Blut; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6				CRAMP <sup>-/-</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>Ly-6G<sup>+</sup></b>	30,9 ± 1,3 % (n=3)	46,6 ± 6,2 % (n=7) **	32,2 ± 4,0 % (n=8)	22,4 ± 1,7 % (n=7)	34,4 ± 9,8 % (n=2)	46,8 ± 3,9 % (n=5) **	38,0 ± 4,8 % (n=6)	17,5 ± 3,4 % (n=4)
<b>Ly-6G<sup>-</sup></b>	6,8 ± 1,0 % (n=3)	7,5 ± 1,0 % (n=10)	10,4 ± 1,2 % (n=10)	10,7 ± 1,6 % (n=7)	6,3 ± 0,5 % (n=5)	8,7 ± 1,4 % (n=9)	10,6 ± 0,5 % (n=8)	10,6 ± 1,6 % (n=4)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	37,0 ± 1,0 % (n=3)	54,4 ± 5,4 % (n=6)	52,7 ± 2,0 % (n=10)	51,0 ± 1,6 % (n=7)	41,1 ± 2,0 % (n=2)	52,1 ± 5,3 % (n=5)	49,5 ± 3,2 % (n=7)	38,4 ± 8,0 % (n=3)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	41,8 ± 0,9 % (n=4)	26,3 ± 5,3 % (n=7)	30,8 ± 2,2 % (n=12)	31,2 ± 1,0 % (n=7)	37,5 ± 1,7 % (n=2)	22,6 ± 3,8 % (n=6)	27,7 ± 2,6 % (n=8)	32,4 ± 5,7 % (n=3)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, \*\*, p<0,01; CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d1 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*, p<0,01.

**Anhang Tabelle 21: Kardiale mRNA Chemokinexpression bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**mRNA Expression in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM); Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6				CRAMP <sup>-/-</sup>			
	SHAM	LAD			SHAM	LAD		
	d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
<b>CXCL1</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=7)	19534,0 $\pm$ 6328,0 % (n=5) *,#,\$	1791,0 $\pm$ 155,9 % (n=4)	657,7 $\pm$ 390,1 % (n=3)	31,0 % (n=1)	3628,0 $\pm$ 2583,0 % (n=3)	594,3 $\pm$ 160,4 % (n=3)	63,3 $\pm$ 15,5 % (n=4)
<b>CCL2</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=6)	4038,0 $\pm$ 964,5 % (n=9) **	10116,0 $\pm$ 1690,0 % (n=6) *,#	1110,0 $\pm$ 527,0 % (n=6)	6,0 % (n=1)	1746,0 $\pm$ 758,8 % (n=4)	5206,0 $\pm$ 1161,0 % (n=5)	203,3 $\pm$ 41,5 % (n=4)
<b>CX3CL1</b>	100,0 % (n=1)	150,9 $\pm$ 10,5 % (n=3) *,#	1117,0 $\pm$ 41,9 % (n=3) ****	887,7 $\pm$ 72,4 % (n=2) *	130,4 % (n=1)	135,3 $\pm$ 9,2 % (n=3)	117,0 $\pm$ 51,6 % (n=5)	437,7 $\pm$ 222,7 % (n=2)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **CXCL1**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,01; C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, #, p<0,05; C57BL/6 LAD d1 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d1, §, p<0,05; **CCL2**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*\*, p<0,01; C57BL/6 LAD d3 vs. C57BL/6 LAD d7, \*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, #, p<0,05; **CX3CL1**: C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d3, \*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d1 vs. C57BL/6 LAD d7, #, p<0,001; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*\*\*, p<0,0001; C57BL/6 LAD d7 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d7, \*, p<0,05.

**Anhang Tabelle 22: Kardiale mRNA Zytokinexpression bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren**mRNA Expression in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM); Mittelwert  $\pm$  SEM.

	C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>IL-12b, d3</b>	100,0 $\pm$ 0,0 % (n=2)	6181,0 $\pm$ 2499,0 % (n=6) *	3,0 $\pm$ 2,0 % (n=2)	1514,0 $\pm$ 553,0 % (n=8)

<b>Ifngr1, d3</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	222,0 ± 39,1 % (n=8) *	123,5 ± 11,5 % (n=2)	128,0 ± 4,2 % (n=9)
<b>IL-12b, d7</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	30785,0 ± 16578,0 % (n=6)	279,0 % (n=1)	4059,0 ± 841,2 % (n=4)
<b>Ifngr1, d7</b>	100,0 ± 0,0 % (n=3)	267,6 ± 29,6 % (n=7) *	96,0 % (n=1)	159,7 ± 4,6 % (n=3)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **IL-12b, d3**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05; **Ifngr1, d3**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05; **Ifngr1, d7**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05.

#### Anhang Tabelle 23: Kardiale IFN-gamma mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6 und CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren

mRNA Expression in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM); Mittelwert ± SEM.

C57BL/6				CRAMP <sup>-/-</sup>			
SHAM	LAD			SHAM	LAD		
d1	d1	d3	d7	d1	d1	d3	d7
100,0 % (n=1)	298,4 ± 156,5 % (n=5)	442,7 ± 9,9 % (n=3) ***	461,7 ± 24,0 % (n=3) ***	34,0 % (n=1)	145,5 ± 25,5 % (n=3)	118,0 ± 37,6 % (n=3)	122,5 ± 69,5 % (n=2)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 LAD d3 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d3, \*\*\*, p<0,001; C57BL/6 LAD d7 vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD d7, \*\*\*, p<0,001.

#### Anhang Tabelle 24: EF bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an Tag 3 nach OP

C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>		CRAMP <sup>-/-</sup> + Cathelicidin	
SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
52,7 ± 1,2 % (n=5)	29,3 ± 1,3 % (n=15) ****	51,8 ± 5,8 % (n=2)	19,5 ± 1,2 % (n=12) ***	59,9 ± 1,5 % (n=2)	29,4 ± 1,8 % (n=6)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*\*\*\*, p<0,0001; CRAMP<sup>-/-</sup> LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> + Cathelicidin LAD, \*\*\*, p<0,001.



**Anhang Tabelle 25: Zellinfiltration ins Herzgewebe bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an d3**Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert ± SEM.

	C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>		CRAMP <sup>-/-</sup> + Cathelicidin	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>CD11b<sup>+</sup></b>	43 ± 13 (n=4)	41487 ± 15918 (n=7) **	42 ± 14 (n=2)	3745 ± 851 (n=5) *	18 ± 2 (n=2)	25800 ± 1926 (n=5)
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	9 ± 3 (n=5)	22575 ± 8450 (n=6) *	13 ± 5 (n=2)	2775 ± 655 (n=5) *	11 ± 2 (n=2)	17889 ± 1840 (n=5)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	14 ± 7 (n=5)	18996 ± 7881 (n=7) **	11 ± 3 (n=2)	965 ± 234 (n=6)	6 ± 0 (n=2)	7055 ± 938 (n=6)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	14 ± 3 (n=5)	1788 ± 599 (n=13) *	18 ± 6 (n=2)	127 ± 28 (n=6)	1 ± 0 (n=2)	610 ± 113 (n=5)

One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test), Dunn`s multiple comparison Test; **CD11b<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*\*, p<0,01; CRAMP<sup>-/-</sup> LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> + Cathelicidin LAD, \*, p<0,05; **Ly-6G<sup>+</sup>**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05; CRAMP<sup>-/-</sup> LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> + Cathelicidin LAD, \*, p<0,05. **Ly-6C<sup>high</sup>**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*\*, p<0,01; **Ly-6C<sup>low</sup>**: C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05.

**Anhang Tabelle 26: Zellinfiltration ins Milzgewebe bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an d3**Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen/mg Milzgewicht; Mittelwert ± SEM; One-way ANOVA, Bonferroni`s multiple comparison Test; ns.

	C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>		CRAMP <sup>-/-</sup> + Cathelicidin	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
CD11b <sup>+</sup>	759 ± 43 (n=2)	670 ± 133 (n=5)	688 ± 41 (n=2)	694 ± 103 (n=8)	862 ± 40 (n=2)	762 ± 89 (n=6)
Ly6G <sup>+</sup>	495 ± 61 (n=2)	418 ± 86 (n=5)	456 ± 27 (n=2)	445 ± 77 (n=8)	532 ± 12 (n=2)	517 ± 64 (n=6)

Ly-6C <sup>high</sup>	257 ± 17 (n=2)	230 ± 50 (n=5)	226 ± 67 (n=2)	233 ± 30 (n=8)	326 ± 27 (n=2)	239 ± 26 (n=6)
Ly-6C <sup>low</sup>	8 ± 0 (n=2)	20 ± 7 (n=5)	6 ± 1 (n=2)	14 ± 4 (n=8)	4 ± 2 (n=2)	5 ± 2 (n=6)

**Anhang Tabelle 27: Venöses Blut FACS bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an d3**

Prozentualer Anteil an Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>-</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen in venösem Blut; Mittelwert ± SEM; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

	C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>		CRAMP <sup>-/-</sup> + Cathelicidin	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
Ly6G <sup>+</sup>	17,9 ± 5,2 % (n=5)	28,4 ± 3,5 % (n=11)	28,2 ± 2,9 % (n=2)	40,8 ± 4,9 % (n=7)	22,4 ± 1,9 % (n=2)	42,4 ± 3,7 % (n=5)
Ly6G <sup>-</sup>	9,8 ± 1,7 % (n=4)	10,7 ± 1,3 % (n=9)	7,4 ± 0,2 % (n=2)	10,6 ± 0,5 % (n=8)	14,0 ± 0,6 % (n=2)	11,8 ± 0,2 % (n=5)
Ly-6C <sup>high</sup>	39,3 ± 2,6 % (n=5)	48,7 ± 2,7 % (n=13)	34,5 ± 9,7 % (n=2)	52,0 ± 3,8 % (n=8)	45,7 ± 0,4 % (n=2)	47,6 ± 3,4 % (n=6)
Ly-6C <sup>low</sup>	37,1 ± 1,9 % (n=5)	32,0 ± 2,4 % (n=13)	41,6 ± 7,7 % (n=2)	27,7 ± 2,6 % (n=8)	25,3 ± 1,0 % (n=2)	26,4 ± 2,9 % (n=6)

**Anhang Tabelle 28: Kardiale IFN-gamma mRNA Expressionsanalyse bei C57BL/6, CRAMP<sup>-/-</sup> und mit Cathelicidin behandelten CRAMP<sup>-/-</sup> Tieren an d3**

mRNA Expression in Prozent im Vergleich zur Kontrolle (C57BL/6 SHAM); Mittelwert ± SEM.

C57BL/6		CRAMP <sup>-/-</sup>		CRAMP <sup>-/-</sup> + Cathelicidin	
SHAM	LAD	SHAM	LAD	SHAM	LAD
100,0 % (n=1)	442,7 ± 9,9 % (n=3) *	n.d.	118,0 ± 37,6 % (n=3)	71,5 ± 19,5 % (n=2)	254,7 ± 41,3 % (n=3)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; C57BL/6 LAD vs. CRAMP<sup>-/-</sup> LAD, \*, p<0,05.

**Anhang Tabelle 29: EF bei LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren an d3**

Ejektionsfraktion (EF) in Prozent in der parasternalen langen Achse (PLAX); Mittelwert  $\pm$  SEM.

LysM		Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup>	
SHAM	LAD	SHAM	LAD
51,9 $\pm$ 3,1 % (n=4) ***	33,4 $\pm$ 2,1 % (n=6) **	55,9 $\pm$ 1,3 % (n=3) ****	17,8 $\pm$ 3,2 % (n=5)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; LysM SHAM vs. LysM LAD, \*\*\*,  $p < 0,001$ ; LysM LAD vs. Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> LAD, \*\*,  $p < 0,01$ ; Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> SHAM vs. Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> LAD, \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ .

**Anhang Tabelle 30: Zellinfiltration ins Herzgewebe bei LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren an d3**

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Herzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM.

	LysM		Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
<b>Ly6G<sup>+</sup></b>	13 $\pm$ 4 (n=4)	7863 $\pm$ 4922 (n=8)	15 $\pm$ 5 (n=3)	2624 $\pm$ 795 (n=5)
<b>Ly-6C<sup>high</sup></b>	8 $\pm$ 1 (n=4)	9450 $\pm$ 4410 (n=6)	8 $\pm$ 2 (n=3)	1380 $\pm$ 472 (n=4)
<b>Ly-6C<sup>low</sup></b>	13 $\pm$ 6 (n=4)	1322 $\pm$ 355 (n=9) *	25 $\pm$ 17 (n=3)	383 $\pm$ 154 (n=5)
<b>F4/80<sup>+</sup></b>	1 $\pm$ 1 (n=4)	427 $\pm$ 149 (n=8) *	1 $\pm$ 0 (n=3)	48 $\pm$ 21 (n=5)
<b>NK1.1<sup>+</sup></b>	9 $\pm$ 4 (n=4)	333 $\pm$ 132 (n=8)	33 $\pm$ 17 (n=3)	52 $\pm$ 18 (n=4)
<b>CD3<sup>+</sup></b>	75 $\pm$ 19 (n=4)	2410 $\pm$ 1199 (n=9)	55 $\pm$ 24 (n=2)	1157 $\pm$ 355 (n=5)

One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; **Ly-6C<sup>low</sup>**: LysM LAD vs. Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> LAD, \*,  $p < 0,05$ ; **F4/80<sup>+</sup>**: LysM LAD vs. Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> LAD, \*,  $p < 0,05$ .

**Anhang Tabelle 31: Zellinfiltration ins Milzgewebe bei LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren an d3**

Anzahl der CD11b<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> Zellen/mg Milzgewicht; Mittelwert  $\pm$  SEM; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

	LysM		Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
Ly6G <sup>+</sup>	222 ± 7 (n=4)	335 ± 34 (n=9)	308 ± 35 (n=3)	335 ± 80 (n=5)
Ly-6C <sup>high</sup>	189 ± 11 (n=4)	199 ± 17 (n=9)	206 ± 24 (n=3)	185 ± 38 (n=5)
Ly-6C <sup>low</sup>	8 ± 1 (n=4)	32 ± 13 (n=9)	6 ± 2 (n=3)	66 ± 24 (n=5)
F4/80 <sup>+</sup>	5 ± 1 (n=4)	20 ± 5 (n=9)	7 ± 2 (n=3)	15 ± 5 (n=5)
NK1.1 <sup>+</sup>	50 ± 3 (n=2)	84 ± 14 (n=9)	75 ± 13 (n=3)	131 ± 25 (n=5)
CD3 <sup>+</sup>	7270 ± 1079 (n=3)	6641 ± 560 (n=9)	8110 ± 779 (n=2)	7386 ± 1299 (n=5)

**Anhang Tabelle 32: Venöses Blut FACS bei LysM und Ifngr1<sup>fl/fl</sup> x LysMCre<sup>+/-</sup> Tieren an d3**

Prozentualer Anteil an Ly-6G<sup>+</sup>, Ly-6G<sup>-</sup>, Ly-6C<sup>high</sup>, Ly-6C<sup>low</sup> Zellen in venösem Blut; Mittelwert ± SEM; One-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparison Test; ns.

	LysM		Ifngr1 <sup>fl/fl</sup> x LysMCre <sup>+/-</sup>	
	SHAM	LAD	SHAM	LAD
Ly6G <sup>+</sup>	10,3 ± 1,4 % (n=4)	31,3 ± 5,0 % (n=9)	14,5 ± 2,1 % (n=3)	30,5 ± 8,7 % (n=5)
Ly6G <sup>-</sup>	11,4 ± 0,5 % (n=4)	11,5 ± 0,7 % (n=9)	12,6 ± 1,4 % (n=3)	10,8 ± 1,0 % (n=5)
Ly-6C <sup>high</sup>	33,3 ± 2,1 % (n=4)	42,0 ± 3,1 % (n=9)	33,4 ± 1,3 % (n=3)	43,4 ± 10,0 % (n=5)
Ly-6C <sup>low</sup>	40,7 ± 1,7 % (n=4)	38,1 ± 3,0 % (n=9)	37,8 ± 4,9 % (n=3)	33,5 ± 5,8 % (n=5)

---

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Stefanie Finger, geboren am 10.02.1985 in Dresden, gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von myeloiden Zellen und deren Interaktion mit inflammatorischen Mediatoren bei der Pathogenese des Myokardinfarktes“ selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht. Ich erkläre zudem, dass die als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde. Weiterhin ist diese Arbeit bislang keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich als Dissertation vorgelegt worden.

---

(Stefanie Finger)

Mainz, den

**Danksagung**

***Curriculum Vitae***