

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Azidose-vermittelte Immunmodulation kardialer myeloider Zellen
und die Rolle des Transkriptionsfaktors „inducible cAMP early
repressor“ (ICER) im Mausmodell des akuten Myokardinfarktes**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ursula Annabel Hartl
aus Wiesbaden

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 10.10.2025

Nachnutzungslizenz: CC BY-NC-ND 4.0

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Abbildungsverzeichnis	XIII
III.	Tabellenverzeichnis	XV
1	Einleitung	1
2	Literaturdiskussion	3
2.1	Akuter Myokardinfarkt.....	3
2.1.1	Epidemiologie.....	3
2.1.2	Klassifikation und Ätiologie.....	4
2.1.3	Pathophysiologie	4
2.1.4	Therapie	6
2.1.5	Komplikationen.....	7
2.1.6	Prävention	8
2.2	Kardiovaskuläre Immun- und Remodelingprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt.....	9
2.2.1	Inflammation und kardiales Remodeling nach akutem Myokardinfarkt.....	9
2.2.2	Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion	11
2.3	Diversität und Funktionen monozytärer Zellen in der myokardialen Ischämie	13
2.3.1	Klassifikation und Funktion der Monozyten	14
2.3.1.1	Subpopulationen humaner und muriner Monozyten.....	14
2.3.2	Makrophagen: Diversität jenseits des M1-M2-Modells	16
2.3.3	Makrophagen in der myokardialen Ischämie	20
2.4	Zelluläre pH-abhängige Signalwege.....	24
2.4.1	Der zelluläre Botenstoff cAMP und der Transkriptionsfaktor ICER.....	24
2.4.1.1	cAMP-abhängige Signalwege	25
2.4.1.2	ICER: Endogener Inhibitor CRE-vermittelter Transkription	26
2.4.1.3	Immunologische und kardiale Effekte von cAMP	27
2.4.1.4	Physiologische und pathologische Funktionen von ICER	28
2.4.2	Zelluläre Azidose als Ausdruck pathologischer Prozesse	29
2.4.3	pH-sensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren	31
2.4.3.1	GPR65	33
2.4.3.2	GPR132	34
2.5	Zielsetzung der Arbeit	35
3	Material und Methoden	37

3.1	Materialien	37
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	37
3.1.2	Kits und Assays	39
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	40
3.1.4	Antikörper und Primer.....	41
3.1.4.1	Durchflusszytometrie.....	41
3.1.4.2	Polymerasekettenreaktion.....	42
3.1.5	Geräte und Software	43
3.1.6	Allgemeine Puffer und Lösungen	46
3.1.6.1	Gewebepräparation und Organbad	46
3.1.6.2	Durchflusszytometrie.....	48
3.1.6.3	L-012-basierte Chemilumineszenz.....	49
3.1.6.4	RNA-Isolation	49
3.1.6.5	Isolation von Knochenmark	49
3.1.7	Anästhesie.....	50
3.2	Methoden	50
3.2.1	Rechtliche Voraussetzungen.....	50
3.2.2	Tierzucht und Versuchsgruppen.....	51
3.2.3	Tierexperimentelle Methoden	54
3.2.3.1	Versuchsprotokolle.....	54
3.2.3.2	Präoperatives Management, Anästhesie und Intubation	56
3.2.3.3	Myokardinfarktinduktion durch permanente Ligatur der LAD	58
3.2.3.4	Postoperatives Prozedere	60
3.2.3.5	Echokardiografie	60
3.2.3.6	Nicht-invasive Blutdruckmessung	64
3.2.3.7	Tötung der Versuchstiere und Organentnahme	65
3.2.3.8	Isometrische Tonusstudien zur Analyse der Gefäßfunktion	67
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	69
3.2.4.1	Einzelzell-RNA-Sequenzierung	69
3.2.4.1.1	Isolation und Aufbereitung CD45-positiver kardialer Zellen	69
3.2.4.1.2	RNA-Sequenzierung, Datenverarbeitung und -analyse	70
3.2.4.2	L-012-basierte Chemilumineszenz im Vollblut	70
3.2.4.3	Analyse zirkulierender Blutzellen	72
3.2.4.4	RNA-Analyse.....	72
3.2.4.4.1	RNA-Isolation.....	72
3.2.4.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit.....	73
3.2.4.4.3	RNA-Expressionsanalyse	73

3.2.4.5	Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	75
3.2.4.5.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Herzgewebe	76
3.2.4.5.2	Färbung der Herzzellen.....	77
3.2.4.5.3	Zielstrukturen und Gatingstrategie	77
3.2.5	Isolation und Transplantation monozytärer Zellen	80
3.2.6	Statistische Auswertung	81
4	Ergebnisse	83
4.1	Identifizierung azidosesensibler Genexpression nach einem akuten Myokardinfarkt.....	83
4.2	Auswirkungen einer myelomonozytären ICER-Deletion auf die kardiovaskuläre Funktion und die Inflammationsantwort nach akutem Myokardinfarkt.....	84
4.2.1	Physiologische Parameter	85
4.2.2	Überlebenszeitanalyse	85
4.2.3	Echokardiografie.....	86
4.2.4	Durchflusszytometrische Zellanalyse des Herzgewebes.....	89
4.2.5	Analyse zirkulierender Zellen	91
4.2.6	Einzelzellsequenzierung kardialer Monozyten nach LAD-Ligatur: Monozytärer Phänotyp nach akutem Myokardinfarkt.....	91
4.2.7	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut.....	93
4.2.8	Vaskuläre Funktion in isometrischen Tonusstudien	94
4.2.8.1	Endothelabhängige Vasodilatation als Reaktion auf Acetylcholin	94
4.2.8.2	Endothelunabhängige Vasodilatation als Reaktion auf Nitroglycerin	95
4.2.9	RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker.....	96
4.2.10	Restitution der myelomonozytären ICER-Expression durch Monozyten-Transplantation	98
4.3	Auswirkungen einer beeinträchtigten Azidose-Response-Signalgebung auf die kardiovaskuläre Funktion und Inflammationsantwort nach Myokardinfarkt.....	100
4.3.1	Echokardiografie.....	100
4.3.2	Durchflusszytometrische Zellanalyse des Herzgewebes.....	101
4.3.3	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut.....	103
4.3.4	RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker im Herzgewebe	103
5	Diskussion	105
5.1	Diskussion des Versuchsprinzips.....	105
5.1.1	Tierexperimentelle Modelle des Myokardinfarktes.....	105
5.1.2	Modelle der myelomonozytären Gendeletion	107

5.1.3	Limitationen des Versuchsprinzips	107
5.2	Diskussion der Ergebnisse	110
5.2.1	Azidose als regulatorischer Faktor der proinflammatorischen Makrophagenpolarisierung im postischämischen kardialen Remodeling	110
5.2.2	Beeinträchtigte kardiale Funktion durch myelomonozytäre ICER- Defizienz als Indiz für einen gestörten Übergang von proinflammatorischer zu reparativer Signalgebung nach Myokardinfarkt.....	112
5.2.3	pH-sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Remodelingprozess nach akutem Myokardinfarkt.....	115
5.2.3.1	Ungeklärte Bedeutung der Rolle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren im postischämischen kardialen Remodeling	117
6	Zusammenfassung.....	119
7	Summary (english)	121
8	Literaturverzeichnis	123
9	Danksagung.....	146
10	Tabellarischer Lebenslauf	147

I. Abkürzungsverzeichnis

°	Tropfen
°C	Grad Celsius
ACh	Acetylcholin
Adgre1	<i>Adhesion G-protein-coupled receptor E1</i> (Synonym: F4/80)
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AMP	Adenosinmonophosphat
ApoE	Apolipoprotein E
Arg1	Arginase 1
ASIC	<i>Acid-sensing ion channel</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Österreich
AT ₁ -I	Angiotensin-II-Rezeptor-1-Inhibitor
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophage</i>
B-Mode	<i>Brightness-Mode</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kalifornien
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-binding-protein</i>
CCL20	<i>CC-chemokine ligand 20</i>
CCR2	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>
CCR6	<i>C-C motif chemokine receptor 6</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CH	Schweiz

cm	Zentimeter
CM	Klassische Makrophagen
CO	<i>Cardiac output</i> (Herzzeitvolumen)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREM	<i>cAMP responsive element modulator</i>
CSE	Cholesterin-Synthese-Enzym
cTn	Kardiales Troponin
Ctsb	Cathepsin B
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i>
d	Day (Tag)
D	Deutschland
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DAPT	Duale antithrombozytäre Therapie
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
Emilin2	<i>Elastin microfibril interfacier 2</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fabp5	<i>Fatty Acid Binding Protein 5</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , hier: Synonym für Durchflusszytometrie
F _c	Konstanter Teil des Antikörpers (invariabel)
FCS	Fetal Calf Serum
FELASA	<i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
FGF-β / bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Fn1	Fibronektin 1
FS	<i>Fractional shortening</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
F7	Gerinnungsfaktor 7 (Synonym: FVII)
F10	Gerinnungsfaktor 10 (Synonym: FX)
g	Gramm
G	Gauge
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
GPR132	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor 132 (Synonym: G2A)
GPR4	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor 4
GPR65	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor 65 (Synonym: TDAG8)
GPR68	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor 68 (Synonym: OGR1)
Grn	Granulin
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-hydrolysierendes Protein
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - <i>Society for Laboratory Animal Science</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha</i>
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
Hz	Hertz
ICER	<i>Inducible cAMP early repressor</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor

IM	Intermediäre Makrophagen
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	Intraperitoneal
I α g	<i>Integrin alpha M (CD11b)</i>
I α 2b	<i>Integral membrane protein 2B</i>
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KH-Puffer	Krebs-Hepes-Puffer
L	Liter
L-012	8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H) Dion
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Lgals	Galektine
LPS	Lipopolysaccharide
Ltc ₄ s	Leukotrien C ₄ Synthase
LV	Linker Ventrikel
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVID	<i>Left ventricular internal diameter,</i> Innendurchmesser des linken Ventrikels
LysM	Lysozym M (Synonym: Lyz2)
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
M	Molar (mol/L)
M1	Makrophagen der Subklasse 1
M2	Makrophagen der Subklasse 2
MA	Massachusetts
MCP-1 / CCL2	<i>Monocyte chemoattractant protein-1 / C-C-chemokine-ligand-2</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>

ME	Maine
mg	Milligramm
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
miR-1	Micro-RNA-1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/L)
M-Mode	<i>Motion-Mode</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MO	Missouri
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	Messenger RNA
MS-1	<i>MS-1 high molecular weight protein</i>
Ms4a7	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 7</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADP ⁺ / NADPH/H ⁺	Oxidierter und reduzierter Form von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter	Natrium-Protonen-Antiporter
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCM	Nicht-klassische Makrophagen
NF-κB	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated b-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLD	Niederlande
nm	Nanometer
NO·	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase

ns	Nicht signifikant
NTG	Nitroglycerin
NY	New York
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Superoxidanion
OGR1	<i>Ovarian cancer G-protein coupled receptor 1</i> (Synonym: GPR68)
OH [·]	Hydroxylradikal
Olfml-3	<i>Olfactomedin-like Protein 3</i>
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PA	Pennsylvania
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PAR-1	<i>Protease Activated Receptor 1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	Perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDBu	Phorbol-12,13-Dibutyrat
PDE	Phosphodiesterase
Pdpn	Podoplanin
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
PKA	Proteinkinase A
PLAX	Parasternale lange Achse
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
Psap	Prosaposin
PSAX	Parasternale kurze Achse
psGPCR	<i>Proton-sensing G-protein-coupled receptor</i>
PTMA	Prothymosin alpha
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rho A	Ras-Homolog A
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT-PCR	Real-Time-PCR (auch qPCR: quantitative PCR)
s	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
sGC	Lösliche Guanylatzyklase
Spp1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i> (Synonym: Osteopontin)
SSC	<i>Sideward scatter</i>
SV	Schlagvolumen
T	Temperatur
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBP	TATA-Box Bindeprotein
TDAG8	<i>T cell death associated gene 8</i> (Synonym: GPR65)
TF	<i>Tissue Factor</i> (Gewebefaktor; Synonym: Faktor III, Gewebethromboplastin)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TierSchVersV	Tierschutzversuchstierverordnung
TIMD4	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TREM1/2	<i>Triggered receptor expressed in myeloid cells 1/2</i>
TRPV-1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
TSchG	Tierschutzgesetz
TX	Texas
UK	United Kingdom
USA	<i>United States of America</i>

V	Volumen
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIC	2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
VPR	<i>Volume Pressure Recording</i>
vs.	Versus
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
WA	Washington
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/L)
µm	Mikrometer

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Gegenüberstellung von STEMI und NSTEMI anhand der Ausdehnung des Infarktareals	5
Abbildung 2-2:	Phänotypisches Gleichgewicht der Makrophagen und kardiales Resultat	24
Abbildung 2-3:	Der cAMP-Signalweg (vereinfacht)	26
Abbildung 3-1:	Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle der einzelnen Studien	56
Abbildung 3-2:	Rahmenbedingungen der Operation	58
Abbildung 3-3:	Operative Ligatur der LAD	59
Abbildung 3-4:	Echokardiografie: Parasternale lange Achse, B-Mode.....	61
Abbildung 3-5:	Echokardiografie: Parasternale kurze Achse, B-Mode.....	62
Abbildung 3-6:	Echokardiografie M-Mode	63
Abbildung 3-7:	Schematische Darstellung der Organbadkonstruktion	68
Abbildung 3-8:	FACS-Gatingstrategie	79
Abbildung 4-1:	Genexpressionsanalysen aus Einzelzellsequenzierungen kardialer CD45 ⁺ -Leukozyten von Wildtyp-Versuchstieren (C57BL6/J).....	84
Abbildung 4-2:	Grafische Darstellung von Körpergewicht und systolischem Blutdruck der Versuchstiere (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-})	85
Abbildung 4-3:	Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}).....	86
Abbildung 4-4:	Echokardiografische Untersuchungsergebnisse (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}).....	87
Abbildung 4-5:	LVEF und LVEDV im zeitlichen Verlauf	89
Abbildung 4-6:	Durchflusszytometrische Analyse von kardialem Gewebe (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}).....	90
Abbildung 4-7:	Zirkulierende Zellen im Vollblut LAD- bzw. SHAM-operierter Versuchstiere (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}).....	91
Abbildung 4-8:	Genexpressionsanalyse kardialer CD45 ⁺ -Leukozyten aus ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-} und Wildtyp-Kontrollen.....	92
Abbildung 4-9:	Analyse der Expression protektiver und destruktiver Marker	93

Abbildung 4-10:	Detektion der PDBu-stimulierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in venösem Vollblut mittels L-012-basierter Chemilumineszenz (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-})	94
Abbildung 4-11:	ACh-induzierte Relaxation isolierter Aortensegmente von ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} und ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-} Versuchstieren.....	95
Abbildung 4-12:	NTG-induzierte Relaxation isolierter Aortensegmente von ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} und ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-} Versuchstieren.....	96
Abbildung 4-13:	RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker in Herz- und Aortengewebe (ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-})	97
Abbildung 4-14:	Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps durch Monozytentransfer	99
Abbildung 4-15:	Echokardiografische Untersuchungsergebnisse (GPR65 ^{wt/wt} /GPR65 ^{-/-} , GPR132 ^{wt/wt} /GPR132 ^{-/-})	101
Abbildung 4-16:	Durchflusszytometrische Analyse von kardialem Gewebe (GPR65 ^{wt/wt} /GPR65 ^{-/-})	102
Abbildung 4-17:	Detektion der PDBu-stimulierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in venösem Vollblut mittels L-012-basierter Chemilumineszenz (GPR65 ^{wt/wt} /GPR65 ^{-/-} , GPR132 ^{wt/wt} /GPR132 ^{-/-}).....	103
Abbildung 4-18:	RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker im Herzgewebe (GPR65 ^{wt/wt} /GPR65 ^{-/-} , GPR132 ^{wt/wt} /GPR132 ^{-/-})	104

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Überblick über die verschiedenen Monozytenpopulationen	16
Tabelle 2-2:	Charakteristika der proinflammatorischen und der reparativen Makrophagen	19
Tabelle 2-3:	Residente Makrophagen des Herzens	20
Tabelle 2-4:	Protonen-sensible G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	31
Tabelle 3-1:	Verwendete FACS-Antikörper	42
Tabelle 3-2:	Auflistung der in der RT-PCR verwendeten Primer	43
Tabelle 3-3:	Zusammensetzung des Krebs-Hepes-Puffers	47
Tabelle 3-4:	Zusammensetzung des Organbadpuffers	48
Tabelle 3-5:	Zusammensetzung des Git-Puffers	49
Tabelle 3-6:	Zusammensetzung der Narkosemedikation	50
Tabelle 3-7:	Zusammensetzung der Medikation zur Antagonisierung der Narkose	50
Tabelle 3-8:	Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 1	52
Tabelle 3-9:	Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 2.1 – 2.3	53
Tabelle 3-10:	Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 2.4	53
Tabelle 3-11:	Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 3	53
Tabelle 3-12:	Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 4	53
Tabelle 3-13:	Überblick über die durchgeführten Studien	55
Tabelle 3-14:	Interpretation der p-Werte	82

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen an erster Stelle der globalen Todesursachenstatistik ⁽¹⁾. Im Zeitraum von 1990 bis 2022 stieg die weltweite Zahl der jährlichen Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen von 12,4 auf 19,8 Millionen ⁽²⁾. Dabei gilt der akute Myokardinfarkt (AMI) als eine der Hauptursachen kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität ⁽²⁾. Durch Fortschritte in der Akutversorgung und die Optimierung pharmakologischer Therapieprinzipien hat sich die Prognose nach AMI mit einer 30-Tage-Überlebensrate von über 90 % in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert ⁽³⁾. Insuffiziente Reparaturmechanismen führen jedoch zu potenziell schweren strukturellen und funktionellen Veränderungen des Infarktareals und des umliegenden Gewebes ^(4, 5). Bei etwa einem Viertel der Patienten kommt es daher innerhalb von vier Jahren nach einem ersten Myokardinfarkt zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz ⁽⁶⁾.

Neben den ortsständigen Kardiomyozyten und Fibroblasten sind auch Zellen des Immunsystems an den postischämischen Umbauprozessen beteiligt ⁽⁷⁻⁹⁾. Insbesondere myeloide Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Steuerung von Entzündungs- und Fibroseprozessen im Rahmen des postischämischen kardialen Remodelings ^(9, 10).

Auch in weiteren Krankheitsmodellen rücken Monozyten und Makrophagen zunehmend in den Fokus pathophysiologischer Betrachtungen ^(11, 12). Sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) können in Abhängigkeit ihres Phänotyps einen Einfluss auf den Verlauf von Tumorerkrankungen nehmen. Vorarbeiten aus der Immunologie zeigen, dass die Ansäuerung des Tumormikromilieus über die Expression des Transkriptionsfaktors *Inducible cAMP Early Repressor* (ICER) eine funktionelle Polarisierung der TAM zu einem antiinflammatorischen Phänotyp bewirkt, was eine Förderung der Tumorprogression zur Folge hat. Eine selektive Deletion des ICER-Gens in myeloiden Zellen unterbindet diesen Pathomechanismus und eröffnet neue Therapiemöglichkeiten ⁽¹³⁾.

In diesem Zusammenhang lassen sich Parallelen zum pathophysiologischen Geschehen des akuten Myokardinfarkts ziehen. Die Myokardischämie geht ebenfalls mit einer Ansäuerung des betroffenen Gewebes und einer gesteigerten Immunzellinfiltration einher ^(8, 14). Die physiologische Bedeutung dieser pH-Absenkung

und potenzielle Auswirkungen auf die Polarisierung infiltrierender Makrophagen ist jedoch bislang unzureichend erforscht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses der postischämischen Gewebsazidose auf die myelomonozytäre Immunantwort im Mausmodell des akuten Myokardinfarktes. Im Zentrum steht die Rolle des Transkriptionsfaktors ICER als potenzieller Mediator pH-abhängiger Signalwege. Darüber hinaus wird die Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 65 und 132 (GPR65, GPR132) im Kontext der übergeordneten Regulation und Signalvermittlung des ICER-Stoffwechsels untersucht.

2 Literaturdiskussion

2.1 Akuter Myokardinfarkt

Einen durch akute Ischämie verursachten Myokardschaden bezeichnet man als akuten Myokardinfarkt ^(15, 16). Ein Myokardschaden äußert sich durch eine labordiagnostisch detektierte Dynamik des kardialen Troponins (cTn) mit Werten oberhalb der 99. Perzentile des oberen Referenzwertes. Für die Diagnose eines AMI muss zusätzlich mindestens ein klinisches Zeichen einer myokardialen Ischämie vorliegen. Hierzu gehören neben infarkttypischen Symptomen und Ischämie-assoziierten Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) auch die Entwicklung pathologischer Q-Zacken sowie der Nachweis einer myokardialen Ischämie in der Bildgebung. Diese Kriterien finden sich in der *Vierten Definition des Myokardinfarktes* von 2018 („*Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction*“ ⁽¹⁵⁾).

Der Verlust von vitalem Herzgewebe infolge eines Myokardinfarktes führt häufig zu einer Verschlechterung der systolischen Funktion und stellt somit einen entscheidenden Faktor für die Entwicklung einer (ischämischen) Herzinsuffizienz dar ⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

2.1.1 Epidemiologie

Der AMI stellt weltweit eine der häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen dar und trägt maßgeblich zur kardiovaskulären Mortalität bei ^(1, 21, 22). Bei 40- bis 79-Jährigen beträgt die Lebenszeitprävalenz für einen Herzinfarkt 4,7 %. In dieser Altersgruppe liegt die Prävalenz bei Männern deutlich über der der Frauen. Dieses Verhältnis kehrt sich ab einem Alter von 75 Jahren um ⁽²³⁻²⁵⁾.

Während in den 90er-Jahren noch ca. 85.000 Todesfälle pro Jahr in Deutschland auf einen Myokardinfarkt zurückzuführen waren, lag der Wert im Jahr 2015 bei ca. 49.000 ⁽²⁶⁾. Dies ist vor allem auf verbesserte diagnostische, therapeutische und präventive Möglichkeiten zurückzuführen. Dennoch stellt der AMI aufgrund der weiterhin hohen Prävalenz ein zunehmendes soziales und wirtschaftliches Problem für das Gesundheitswesen dar.

2.1.2 Klassifikation und Ätiologie

In der aktuellen Definition des Myokardinfarktes werden fünf Typen unterschieden ⁽¹⁵⁾: Typ 1 beschreibt einen durch Koronararterienthrombose ausgelösten Myokardinfarkt. Eine häufige Ursache hierfür ist die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque.

Kommt es durch ein Ungleichgewicht zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf zu einem Myokardinfarkt, spricht man vom Typ 2. Bei Typ 3 handelt es sich um einen ischämiebedingten Herztod, bei dem der Herzinfarkt erst *post mortem* als Todesursache festgestellt wird. Die Typen 4 und 5 umfassen Myokardinfarkte, welche im Zusammenhang mit ärztlichen Interventionen wie perkutanen koronaren Interventionen (PCIs) und Bypassoperationen auftreten.

Im klinischen Alltag ist für akute Myokardinfarkte die Unterscheidung zwischen STEMI (*ST-segment elevation myocardial infarction*) und NSTEMI (*non-ST-segment elevation myocardial infarction*) unter Berücksichtigung des Vorliegens von ST-Streckenhebungen im EKG besonders relevant ⁽²⁷⁾.

2.1.3 Pathophysiologie

Der Begriff Atherosklerose beschreibt einen chronischen inflammatorischen Prozess, der mit fibroproliferativen Intimaveränderungen großer und mittlerer Gefäße einhergeht. Hierbei spielen unter anderem die Ablagerung modifizierter Lipoproteine sowie die Rekrutierung von Immunzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle. Infolgedessen kommt es zu einer progredienten Akkumulation von fibrösem Gewebe mit konsekutiver Stenosierung des Gefäßlumens ⁽²⁸⁾.

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose gelten die arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus sowie Adipositas ^(29, 30).

Die Manifestation einer Atherosklerose an den Koronargefäßen wird als koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet. Bis zu einem Stenosegrad von 30 bis 50 % sind die betroffenen Patienten in der Regel asymptomatisch. Bei höhergradigen Stenosen von über 70 % kommt es – insbesondere unter Belastung – zu pektanginösen Beschwerden.

Bei weiterem Progress der Erkrankung können instabile Plaques mit dem Risiko der Plaqueruptur entstehen ⁽³¹⁾. Die Ruptur einer vulnerablen atherosklerotischen Plaque stellt die häufigste Ursache für einen AMI dar und verursacht eine akute

Minderversorgung des Myokards. Die Myozytennekrose äußert sich laborchemisch durch einen Anstieg der Herzmarker, insbesondere des kardialen Troponins (28, 32, 33). In Abhängigkeit der Ausdehnung des Infarktareals unterscheidet man anhand des elektrokardiografischen Bildes zwischen STEMI und NSTEMI. Hierbei ist ein STEMI Ausdruck eines transmuralen Infarktes, wohingegen bei einem NSTEMI nur die innere Schicht des Herzmuskels betroffen ist, da dieser von außen nach innen versorgt wird (siehe Abbildung 2-1).

Transmuraler Infarkt: STEMI

Subendokardialer Infarkt: NSTEMI

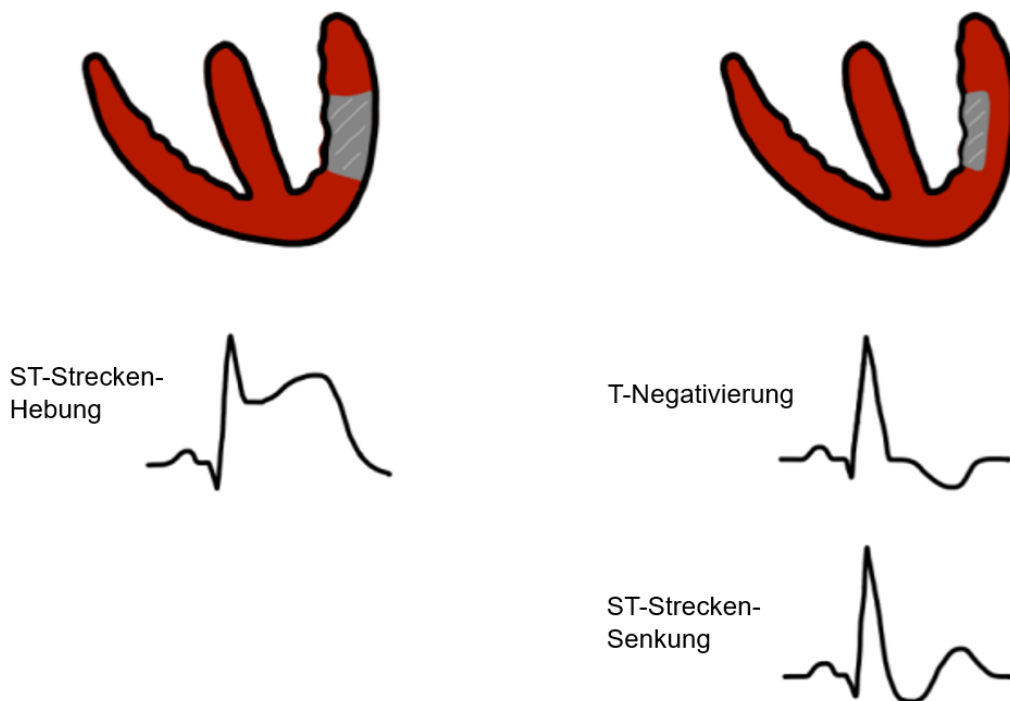


Abbildung 2-1: Gegenüberstellung von STEMI und NSTEMI anhand der Ausdehnung des Infarktareals. Oben: schematischer Längsschnitt durch die Herzspitze. Rot: Myokard, grau: Infarktareal. Unten: Typische EKG-Veränderungen bei STEMI (*ST-segment elevation myocardial infarction*, links) bzw. NSTEMI (*non-ST-segment elevation myocardial infarction*, rechts).

Weitere Faktoren, die den Schweregrad des Herzinfarktes beeinflussen, sind der Grad der Lumenverlegung, die Verschlussdauer, die Größe des Infarktareals sowie das Vorhandensein von Kollateralen (34).

Infolge eines Myokardinfarktes kommt es auf zellulärer und molekularer Ebene zu vielfältigen Prozessen, welche ein kardiales Remodeling zur Folge haben. Die

detaillierten Abläufe sind in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Das Infarktareal unterliegt hierbei einer zunehmenden Ausdünnung des Herzmuskels, wohingegen im primär nicht betroffenen Myokard unter anderem eine kompensatorische Hypertrophie zu verzeichnen ist ⁽³⁵⁾.

2.1.4 Therapie

Das Akutmanagement des Herzinfarktes mit oder ohne ST-Streckenhebungen im EKG beinhaltet die antithrombozytäre Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) und gegebenenfalls einem P2Y₁₂-Inhibitor. Unter bestimmten Voraussetzungen ist außerdem die Gabe von Sauerstoff, β -Adrenorezeptor-Antagonisten (Betablocker), Morphin und Tranquilizern möglich bzw. empfohlen ^(27, 36-39). Des Weiteren gehört die parenterale Antikoagulation zum Standardprocedere ⁽⁴⁰⁾.

In der Therapie des akuten Herzinfarktes ist die zeitnahe Reperfusion des minderversorgten Areals von höchster Bedeutung ⁽⁴¹⁾. Hierbei unterscheidet sich das Vorgehen in Abhängigkeit des Vorhandenseins von ST-Streckenhebungen im EKG. Sofern innerhalb von 120 Minuten die Durchführung einer kathetergestützten interventionellen Therapie möglich ist, stellt die primäre PCI das Verfahren der Wahl bei akutem ST-Hebungsinfarkt dar ⁽⁴²⁾. Sollte die angestrebte Zeitvorgabe in seltenen Fällen nicht realisierbar sein, so wird auf eine medikamentöse Fibrinolyse innerhalb von zwölf Stunden nach Symptombeginn zurückgegriffen. An diese sollte sich eine PCI anschließen ⁽⁴³⁾.

Bei Vorliegen eines NSTEMI wird eine frühelektive Koronarangiografie empfohlen. Der Zeitpunkt wird dabei in Abhängigkeit vom individuellen Risiko gewählt ⁽⁴⁴⁾.

In der Langzeittherapie nach abgelaufenem Myokardinfarkt nimmt die medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung eine zentrale Stellung ein. In den ersten 12 Monaten wird eine duale plättchenhemmende Therapie (*Dual Antiplatelet Therapy: DAPT*) mit ASS und einem P2Y₁₂-Inhibitor empfohlen. Durch eine DAPT werden die kardiovaskuläre Mortalität und das Risiko für einen Reinfarkt nach PCI signifikant gesenkt ^(45, 46). Darüber hinaus soll die Einnahme von ASS lebenslang erfolgen. Hierdurch kann die Gesamtmortalität nach einem AMI um bis zu 10 % gesenkt werden, wie Studien zur Sekundärprävention vaskulärer Erkrankungen zeigen ^(27, 38).

Weitere sekundärprophylaktische Maßnahmen nach abgelaufenem AMI sind unter 2.1.6 beschrieben.

2.1.5 Komplikationen

Nach einem Herzinfarkt kann es zu vielfältigen Komplikationen kommen, die in Anbetracht der potenziell lebensbedrohlichen Folgen eine angemessene medizinische Beachtung und Therapie erfordern.

Zu den Frühkomplikationen, die innerhalb der ersten Tage nach einem AMI auftreten können, zählen der plötzliche Herztod, lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen, die Entwicklung einer akuten Herzinsuffizienz durch Verlust vitalen kontraktiven Myokards bzw. durch die Entstehung einer akuten Mitralklappeninsuffizienz infolge eines Papillarmuskel- oder Sehnenfadenausrisches ^(28, 34, 47, 48). Bei etwa 5 – 6 % der STEMI-Patienten kommt es in Abhängigkeit der Infarktgröße zu einem kardiogenen Schock ⁽³⁴⁾. Des Weiteren sind Rupturen von Herzwand oder Ventrikelseptum als mögliche Komplikationen zu nennen.

Im weiteren Verlauf können ebenso Spätkomplikationen auftreten. Neben der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz stellen Ventrikulaneurysmen, arterielle Embolien, Reinfarkte und Perikarditiden mögliche mittel- und langfristige unerwünschte Ereignisse dar.

Neurohumorale Aktivierung und Entwicklung einer Herzinsuffizienz

Nach einem Herzinfarkt kommt es akut zu funktionellen, strukturellen und molekularen Veränderungen. Langfristig können diese Mechanismen durch ein maladaptives kardiales Remodeling zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen ^(18, 20, 35, 49). Hierbei kommt insbesondere der neurohumoralen Aktivierung mit Etablierung eines Teufelskreises eine wichtige Rolle zu. Durch die myokardiale Ischämie mit konsekutiver Nekrose von Herzmuskelzellen entwickelt sich eine systolische und diastolische Herzinsuffizienz. Das reduzierte Herzzeitvolumen hat eine Minderperfusion peripherer Organe zur Folge. Es resultiert eine kompensatorische Aktivierung neurohumoraler Systeme. Hierzu zählen insbesondere das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie die gesteigerte Synthese vasoaktiver Substanzen wie beispielsweise Endothelin und proinflammatorischer Zytokine ^(35, 50). Kurzfristig sollen diese Kompensationsmechanismen die kardiovaskuläre Homöostase aufrechterhalten. Langfristig hat die neurohumorale Aktivierung jedoch eine Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten sowie eine Zunahme des kollagenen

Bindegewebes im Myokard zur Folge. Hierdurch werden die bereits bestehenden Funktionsstörungen verstärkt und es resultiert ein „Circulus vitiosus“ (35, 50, 51).

2.1.6 Prävention

In der Prävention des Herzinfarktes unterscheidet man zwischen Primär- und Sekundärprävention. Mithilfe der Primärprävention soll das Auftreten eines Herzinfarktes verhindert werden. Grundlage hierfür ist insbesondere die Verhinderung des Auftretens bzw. Voranschreitens einer Atherosklerose. Modifizierbare Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Rauchen und erhöhtes LDL-Cholesterin stellen hierbei mögliche Ansatzpunkte dar (52).

Die Sekundärprävention setzt nach einem stattgehabten Myokardinfarkt an und verfolgt das Ziel der Verbesserung des klinischen Verlaufs und der Minimierung von Folgeschäden. Hierbei spielen insbesondere medikamentöse Therapieoptionen eine wichtige Rolle. Diese sollen das myokardiale Sauerstoffangebot verbessern, den Sauerstoffbedarf des Myokards reduzieren und den Progress der KHK verlangsamen (34). Neben der Thrombozytenaggregationshemmung kommt auch der frühzeitigen, aggressiven Senkung des Serum-LDL-Cholesterins, vor allem unter Einsatz von Statinen (Cholesterin-Synthese-Enzym (CSE)-Hemmer; genauer: HMG-CoA-Reduktase-Hemmer), eine entscheidende Rolle zu (53, 54). Verschiedene Studien zeigen, dass niedrigere Serum-LDL-Spiegel bei Patienten mit abgelaufenem Herzinfarkt mit einer geringeren Rate kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert sind (55, 56). Da die medikamentöse Senkung des Serum-LDL-Spiegels die Morbidität und Mortalität reduziert, wird für Patienten mit dokumentierter kardiovaskulärer Erkrankung eine Senkung des LDL-Cholesterins um mindestens 50 % des Ausgangswertes und auf < 55 mg/dl empfohlen (57, 58).

Darüber hinaus wird in der aktuellen Leitlinie die Gabe von Betablockern und RAAS-Inhibitoren zur Kardioprotektion und Einstellung des arteriellen Blutdrucks empfohlen (27).

Zusätzlich zu medikamentösen Maßnahmen ist in der Sekundärprävention eine Lebensstilanpassung mit Nikotinverzicht, körperlicher Aktivität und ausgewogener mediterraner Ernährung von essenziellem Wert (27, 34). Bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit und linksventrikulärer Ejektionsfraktion unter 35 % ist die primärprophylaktische Implantation eines ICDs (implantierbarer Kardioverter-

Defibrillator) empfohlen, um die Patienten vor einem plötzlichen Herztod zu schützen (27).

2.2 Kardiovaskuläre Immun- und Remodelingprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt

2.2.1 Inflammation und kardiales Remodeling nach akutem Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt ist die häufigste zu einer chronischen Herzinsuffizienz führende Form der akuten kardialen Schädigung (17, 49). Durch die Ischämie kommt es zur Nekrose myokardialer Zellen. Es schließen sich komplexe zelluläre und molekulare Umbau- und Adaptationsprozesse an, in die das angeborene Immunsystem maßgeblich involviert ist. Diese Umbauprozesse werden in ihrer Gesamtheit als „kardiales Remodeling“ bezeichnet und haben unter anderem die Bildung einer Infarktnarbe zur Folge. Ein adaptives Remodeling der Infarktzone sowie des primär nicht betroffenen Myokards ist erforderlich, um die durch den Infarkt entstandene Schwachstelle zu stärken und funktionelle Einbußen der Herzfunktion zu minimieren. Ein exzessives und maladaptives ventrikuläres Remodeling führt dagegen zu einer ungünstigen Ventrikelarchitektur und kann im Verlauf die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz bedingen (3, 19, 35, 59).

Die Umstrukturierung des infarzierten Gewebes gliedert sich in drei fließend ineinander übergehende Phasen: inflammatorische Phase, proliferative Phase und Abheilungsphase (60-63).

Durch den ischämischen Untergang myokardialer Zellen kommt es zur unmittelbaren Freisetzung von sogenannten *damage associated molecular patterns* (DAMPs), welche von *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRRs) erkannt werden. Diese finden sich beispielsweise auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und weiteren Immunzellen (21, 64, 65). In der Folge kommt es zu einer sterilen Entzündung, welche sich durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) auszeichnet. Hieran sind unter anderem residente Makrophagen, Kardiomyozyten, Mastzellen und kardiale Fibroblasten beteiligt. Zudem erfolgt eine Hochregulation der Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) (21, 62, 66). Durch diese Prozesse werden neutrophile Granulozyten, Monozyten und

Makrophagen rekrutiert und aktiviert, was eine Amplifikation der Entzündungsreaktion anstößt. Infolgedessen kommt es zum Abbau und zur Phagozytose von extrazellulärer Matrix (EZM) und von nekrotischen Zellen. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und weitere proteolytische Enzyme, welche insbesondere von Makrophagen und Fibroblasten gebildet werden, sind an diesem Schritt maßgeblich beteiligt. Die inflammatorische Phase erreicht etwa am dritten Tag ihren Höhepunkt (17, 21, 59, 62, 67-70). Etwa ab dem dritten Tag durchläuft ein Teil der neutrophilen Granulozyten den programmierten Zelltod, während ein weiterer Teil hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp polarisiert, welcher unter anderem in der Lage ist, Fibrinogen und Fibronectin zu bilden (21, 66). Außerdem kommt es zu einem phänotypischen Wechsel der initial proinflammatorischen Makrophagen zu einem antiinflammatorischen, reparativen Phänotyp (71). Somit vollzieht sich der Übergang in die proliferative Phase, die beim Menschen etwa zehn Tage andauert. Sie zeichnet sich durch ein antiinflammatorisches Mikromilieu aus, in welchem es zur Proliferation von Fibroblasten und zur Bildung von Granulationsgewebe kommt. So entsteht eine provisorische Matrix, welche mit den migrierenden Zellen über Oberflächenmoleküle kommuniziert und als Reservoir für diverse Wachstumsfaktoren dient (17, 59, 72, 73).

Während der Abheilungsphase entsteht in den folgenden Monaten ein reifendes Granulationsgewebe. Die provisorische Matrix wird unter Beteiligung des Plasminogen-Plasmin-Systems abgebaut (74). Durch die zelluläre Sekretion von Fibronectin und Kollagen bildet sich ein Narbengewebe, welches nur noch wenige Immunzellen enthält und aufgrund einer geringeren Expression des Strukturproteins Elastin deutlich weniger flexibel und beweglich ist als das umliegende gesunde Myokard (17, 75, 76).

Bei dem beschriebenen ventrikulären Remodeling handelt es sich um ein koordiniertes Zusammenspiel diverser Prozesse und Systeme, welche eine unmittelbare Auswirkung auf die Ventrikelmorphologie und Funktionalität des Herzens haben. Eine überschießende Entzündungsreaktion im Sinne eines maladaptiven Remodelings kann unter anderem zu einer Expansion des Infarktes mit der Entstehung eines ausgedehnten Areals reduzierter Kontraktilität führen. Kompensatorisch kommt es zur Hypertrophie des primär nicht-infarzierten, umliegenden Herzgewebes (77, 78). Dieser Kompensationsmechanismus kann langfristig jedoch nicht folgenlos aufrechterhalten werden. Durch den vermehrten Einbau von Kollagen kommt es nicht nur im Bereich der Infarktnarbe, sondern auch im umliegenden Gewebe zu einer Beeinträchtigung der

Kontraktilität. Allmählich entwickelt sich eine systolische und diastolische Funktionsstörung, die sich durch eine verminderte Pumpleistung, ein vergrößertes enddiastolisches Volumen und ein zunehmendes Vorwärtsversagen äußert ^(35, 79-81). Jedoch ist nicht nur eine übermäßige Entzündungsantwort, sondern auch die Unterdrückung der postischämischen Inflammationskaskade mit einer gesteigerten Mortalität assoziiert ^(82, 83). Das Verständnis für ein förderliches Gleichgewicht zwischen adaptivem und maladaptivem kardialen Remodeling ist Gegenstand aktueller Forschung und bietet die Möglichkeit der Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen und Zeitpunkte in der Prävention der ischämischen Herzinsuffizienz nach AMI.

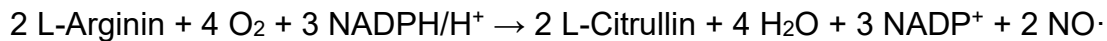
2.2.2 Oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion

Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder bereits etablierter koronarer Herzerkrankung zeigen neben den kardialen Manifestationen auch eine systemische Dysfunktion des vaskulären Endothels ⁽⁸⁴⁻⁸⁷⁾.

Das intakte Endothel bildet eine einlagige Schicht, welche die innerste Begrenzung zwischen Blutstrom und Gefäßwand darstellt und den Austausch von Stoffen zwischen Blut und Gewebe reguliert ^(87, 88). Darüber hinaus stellt das Endothel ein multifunktionales endokrines Organ dar, welches verschiedene metabolische und synthetische Funktionen erfüllt. Es ist an diversen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, zu denen unter anderem die Regulation des Gefäßtonus, die Steuerung der Hämostase sowie inflammatorische und immunologische Kaskaden gehören. Somit spielt das Endothel eine Schlüsselrolle in der vaskulären Homöostase ^(84, 87, 89, 90). Durch die balancierte Freisetzung vasoaktiver Faktoren wird im gesunden Organismus ein Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion aufrechterhalten ^(86, 87, 89, 91).

Im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen spielt der interzelluläre Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO \cdot) als wesentlicher Vasodilatator eine zentrale Rolle ⁽⁹²⁾. Dessen Synthese wird unter anderem durch mechanische Scherkräfte oder die Aktivierung membrangebundener Rezeptoren durch diverse chemische Stimuli wie Acetylcholin oder Histamin initiiert ^(84, 86, 87, 93). Die vaskuläre Synthese von NO \cdot wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert. Bei der Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin entsteht das Reaktionsprodukt NO \cdot . Kofaktoren der Reaktion sind

Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Tetrahydrobiopterin (BH₄) (84-87, 89, 94, 95).



NO \cdot diffundiert zügig von den Endothelzellen zu vaskulären glattmuskulären Zellen (*vascular smooth muscle cells*: VSMC) und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Der daraus resultierende Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration bewirkt die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen sowie die Phosphorylierung von Kaliumkanälen. In der Folge kommt es zur Relaxation der VSMC und folglich zur Vasodilatation (84, 86, 87, 89, 92, 96).

NO \cdot ist entscheidend an der Blutdruckregulation im humanen Organismus beteiligt. Darüber hinaus hemmt NO \cdot die Thrombozytenaggregation, begrenzt die Proliferation von VSMC und blockiert die Leukozytenmigration in das umliegende Gewebe. Somit stellt NO \cdot einen wichtigen protektiven Faktor in der vaskulären Homöostase dar (84, 97, 98).

Durch sein freies Radikal besitzt NO \cdot eine hohe Reaktivität. Dadurch kommt es unter anderem zur Reaktion von NO \cdot mit Superoxidanionen (O₂ \cdot^-), wobei Peroxynitrit (ONOO \cdot^-) entsteht (84, 85, 87, 89, 92). In höheren Konzentrationen hat Peroxynitrit zytotoxische Eigenschaften und kann oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA verursachen (84, 92).

Superoxidanionen und Peroxynitrit gehören zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS). Auch Hydroxylradikale (OH \cdot) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) gehören dieser Gruppe an (87, 95). ROS werden auch im gesunden Organismus unter aeroben Bedingungen in allen Zellen in geringen Mengen gebildet (95). Enzymatische Quellen für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies sind insbesondere die NADPH-Oxidase (Nox), die durch Kofaktor-Mangel entkoppelte NO-Synthase sowie die Xanthin-Oxidase. Darüber hinaus werden reaktive Sauerstoffspezies auch in der mitochondrialen Atmungskette generiert (84, 86, 89, 99, 100). Wie der Name bereits suggeriert, zeichnen sich reaktive Sauerstoffspezies durch ihre hohe Reaktivität aus. Ihnen kommt unter anderem bei der Abwehr mikrobieller Pathogene im Rahmen der angeborenen Immunantwort eine zentrale Rolle zu (85, 86, 95, 101, 102).

Bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und Rauchen kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts oxidativer und antioxidativer Metaboliten zugunsten der oxidativen Faktoren ^(84, 95). Diesen Zustand, in welchem die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies die körpereigenen antioxidativen Systeme überlastet, bezeichnet man als oxidativen Stress ^(95, 101). Dieser Zustand führt zu einer reduzierten vaskulären Bioverfügbarkeit von NO[·], was eine Beeinträchtigung der endothelialen Funktion zur Folge hat ⁽⁸⁷⁾. Hohe ROS-Konzentrationen haben einen proapoptotischen Effekt auf vaskuläre Endothelzellen und VSMCs ⁽⁸⁶⁾. Weitere Folgen sind eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation sowie eine gesteigerte Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand und somit die Initiierung einer atherosklerotischen Plaquebildung ^(89, 103, 104). Diesen vasokonstriktiven, proinflammatorischen, proliferativen und prothrombotischen Phänotyp des Endothels bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion ⁽⁸⁹⁾.

Oxidativer Stress und die endotheliale Dysfunktion spielen in der Pathogenese der Atherosklerose und vieler weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen wie KHK und Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle ^(86, 87, 90, 100, 103, 104). Darüber hinaus stellt die endotheliale Dysfunktion einen unabhängigen Prädiktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und Komplikationen dar ^(86, 89, 105, 106). So ist eine periphere endotheliale vasodilatatorische Dysfunktion mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko assoziiert ^(90, 104, 107, 108).

Die endotheliale Dysfunktion ist grundsätzlich ein reversibler Prozess: Eine Reduktion der Risikofaktoren, beispielsweise durch Antihypertensiva, antidiabetische Medikation, lipidsenkende Therapien oder eine Lebensstilmodifikation, kann erheblich zur Verbesserung der endothelialen Funktion beitragen. Dadurch lässt sich das Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Komplikationen signifikant senken ^(86, 89, 104).

Die therapeutische Modifikation der inflammatorischen und oxidativen Kaskaden, die zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beitragen, stellt somit ein zentrales Element aktueller kardiovaskulärer Forschungsprojekte dar.

2.3 Diversität und Funktionen monozytärer Zellen in der myokardialen Ischämie

Das Immunsystem stellt ein komplexes Netzwerk aus Zellen, Geweben und Organen dar, das den Körper vor Krankheiten und Infektionen schützt. Man unterscheidet

zwischen der angeborenen (unspezifischen) und der erworbenen (spezifischen) Immunantwort, welche auf vielfältige Weise ineinandergreifen.

Zum angeborenen Immunsystem gehören neben physikalischen und chemischen Abwehrmechanismen auch zelluläre und humorale Elemente. So schafft beispielsweise eine intakte Schleimhaut mitsamt aufgelagertem Mukus eine erste Barriere gegen pathogene Umweltfaktoren. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen vor allem phagozytierende Zellen wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, aber auch antigenpräsentierende Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die angeborene Immunabwehr stellt einen schnellen, aber weniger effektiven sowie unspezifischen Schutz gegen Krankheitserreger dar ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾.

Dagegen ermöglicht das erworbene Immunsystem die effektive, antigenspezifische Bekämpfung von Pathogenen. Es vereint zelluläre und humorale Mechanismen. B- und T-Lymphozyten stellen die wichtigsten zellulären Vertreter der adaptiven Immunantwort dar, während Immunglobuline die humorale Komponente abbilden ⁽¹¹²⁾. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, ist das angeborene Immunsystem an allen drei Phasen des kardialen Remodelings nach abgelaufener Myokardischämie beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus insbesondere auf myeloide Zellen und deren Rolle in der Pathogenese des akuten Myokardinfarktes gelegt.

2.3.1 Klassifikation und Funktion der Monozyten

Monozyten gehören zusammen mit Makrophagen und dendritischen Zellen zum mononukleären Phagozytensystem (MPS). Zellen des MPS lassen sich auf gemeinsame myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark zurückführen ^(113, 114).

Monozyten besitzen einen Durchmesser von ca. 10 – 20 µm und verfügen über einen großen nierenförmigen Kern. Sie machen etwa 4 – 8 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus. Nach einer Zirkulationsdauer von wenigen Tagen migriert ein Teil der Monozyten ins periphere Gewebe und differenziert sich zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Der andere Teil der Monozyten verbleibt im Blut und erfüllt dort die Rolle zirkulierender, phagozytierender Abwehrzellen ^(21, 59, 109, 115).

2.3.1.1 Subpopulationen humaner und muriner Monozyten

Monozyten sind eine heterogene Gruppe mononukleärer Leukozyten. Die genaue Charakterisierung erfolgt anhand der differentiellen Expression bestimmter

Oberflächenmoleküle (*cluster of differentiation*, CD). Humane Monozyten zeichnen sich durch die Expression von CD11b, CD11c und CD14 aus, während die murinen Vertreter durch die Expression von CD11b und CD115 gekennzeichnet sind ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾.

Derzeit werden anhand der Expression von CD14 und CD16 drei verschiedene Subgruppen humaner Monozyten unterschieden: klassische Monozyten (CM), intermediäre Monozyten (IM) und nicht-klassische Monozyten (NCM) ⁽¹²⁰⁾.

Klassische Monozyten weisen eine hohe CD14-Expression bei geringer CD16-Expression (CD14⁺⁺CD16⁻) auf und machen etwa 85 % der zirkulierenden Monozyten aus. Des Weiteren zeigt sich bei dieser Zellpopulation eine hohe Expression von CD62 und CCR2 (*C-C motif chemokine receptor 2*). Letztgenanntes Molekül ist ein Rezeptor für das proinflammatorisch wirkende Protein MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*; auch CCL2 = *C-C-chemokine-ligand-2*). Dies ermöglicht den klassischen Monozyten die Migration in entzündetes Gewebe, wo sie proinflammatorische Mediatoren wie TNF α und NO \cdot sezernieren oder sich zu Makrophagen bzw. dendritischen Zellen differenzieren ^(59, 116, 120-122).

CD16-positive Monozyten machen die verbleibenden 15 % der zirkulierenden Monozyten aus. Eine geringe CD14-Expression bei hoher CD16-Expression (CD14⁺CD16⁺⁺) ist charakteristisch für die Gruppe der nicht-klassischen Monozyten. Diese exprimieren weder CD62 noch CCR2, zeigen jedoch eine hohe CX3CR1-Expression und somit eine Fraktalkin-abhängige Migration in nicht-entzündete Gewebe ^(120, 123, 124). Nicht-klassische Monozyten scheinen jedoch auch an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt zu sein, wie Studien Fraktalkin-defizienter Mäuse nahelegen ⁽¹²⁵⁾.

Vertreter der dritten Subgruppe humaner Monozyten werden als intermediäre Monozyten bezeichnet. Diese exprimieren sowohl CD14 und CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺) als auch CCR2. Bislang herrscht Uneinigkeit darüber, ob es sich bei dieser Gruppe um eine eigene Entität oder um eine Differenzierungszwischenstufe klassischer und nicht-klassischer Monozyten handelt ⁽¹²⁶⁾.

Im Gegensatz zu den humanen Subtypen unterscheidet man den immunologischen Monozyten-Phänotyp im Mausorganismus anhand der Expression von Ly6C. Die Populationen werden dementsprechend als Ly6C^{high} und Ly6C^{low} bezeichnet ^(120, 127). Ly6C^{high}-Monozyten sind durch eine hohe CD62- und CCR2-Expression gekennzeichnet und ähneln damit den humanen klassischen Monozyten. Ly6C^{low}-Monozyten weisen dagegen eine eher geringe CCR2-Expression bei hoher CX3CR1-

Expression auf und zeigen damit eine Gemeinsamkeit mit den nicht-klassischen Monozyten im menschlichen Organismus ^(119, 120).

Tabelle 2-1 liefert einen Überblick über die humanen und murinen Monozytenpopulationen.

Spezies	Subtyp	Oberflächenmarker		Funktionen
Human	CM	CD14 ⁺⁺ , CD16 ⁻	CCR2 ^{high} , CD62L ⁺ , CX3CR1 ^{low}	Zu Beginn des Inflamationsprozesses: Phagozytose, inflammatorische Funktionen
	IM	CD14 ⁺⁺ , CD16 ⁺	CCR2 ^{low} , CD62 ^{low}	Phagozytose, Gefäßreparatur
	NCM	CD14 ⁺ , CD16 ⁺⁺	CCR2 ^{low} , CD62L ⁻ , CX3CR1 ^{high}	Eventuell am Ende des Inflamationsprozesses: Phagozytose, Gewebsreparatur, Angiogenese
Murin	Ly6C^{high}	Ly6C ⁺⁺ CD43 ⁺	CCR2 ^{high} , CD62L ⁺ , CX3CR1 ^{low}	Vergleichbar mit CM
	Ly6C^{low}	Ly6C ⁺ CD43 ⁺⁺	CCR2 ^{low} , CD62L ⁻ , CX3CR1 ^{high}	Vergleichbar mit NCM

Tabelle 2-1: Überblick über die verschiedenen Monozytenpopulationen im menschlichen und murinen Organismus unter Angabe ausgewählter Oberflächenmarker und der Funktion. CM = klassische Monozyten, IM = intermediäre Monozyten, NCM = nicht-klassische Monozyten. Verändert nach ^(119, 120).

2.3.2 Makrophagen: Diversität jenseits des M1-M2-Modells

Unter dem Einfluss chemotaktischer Signale wandern zirkulierende Monozyten aus dem Blut in periphere Gewebe ein, wo sie sich in Abhängigkeit von lokalen Signalen und Mikroumgebungen zu Gewebsmakrophagen differenzieren können. Diese reifen Makrophagen sind hochspezialisierte Zellen mit vielfältigen Aufgaben, die sich je nach Gewebe unterscheiden. Zu den Funktionen ortsständiger myokardialer Makrophagen gehört neben der Phagozytose abgestorbener Zellen auch die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine und somit die Regulation der Immunantwort ^(3, 62, 128, 129). Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen geht mit einer vermehrten

Expression der Marker CD68 und MHC-II (*major histocompatibility complex-II*) einher. Beim Menschen kommt es zudem zu einer Reduktion der CD14-Expression, während im murinen Organismus eine Hochregulation der F4/80-Expression zu beobachten ist⁽⁵⁹⁾. In Abhängigkeit des lokalen Mikromilieus entwickeln sich Makrophagen verschiedenen Phänotyps⁽¹³⁰⁻¹³⁴⁾. Diese unterscheiden sich unter anderem in den exprimierten Oberflächenmarkern, der Funktion sowie den produzierten und freigesetzten Faktoren⁽¹³⁵⁾.

Inspiziert vom Konzept der T-Helfer-1- (TH₁) und T-Helfer-2-Zellen (TH₂) stellten Mills et al. im Jahr 2000 das mittlerweile überholte Konzept der M1- und M2-Makrophagen vor⁽¹³⁶⁾. Diese dichotome Klassifikation wird dem gegenwärtigen Wissensstand über die phänotypische Diversität und Plastizität der myeloiden Zellen (Monozyten und Makrophagen) jedoch nicht mehr gerecht^(130, 137, 138). Die biotechnologischen Entwicklungen des letzten Jahrzehnts einschließlich der Möglichkeit von Einzelzellsequenzierungen haben gezeigt, dass das Differenzierungsprofil der Makrophagen sehr viel diverser ist und sich anhand der M1-M2-Klassifikation nicht ausreichend beschreiben lässt^(11, 139, 140). Stattdessen existieren Makrophagen innerhalb eines breiten Spektrums und passen ihre Funktionen dynamisch an die spezifischen Bedingungen des Gewebes im sogenannten „*microenvironment*“ an^(12, 139). Da das M1-M2-Modell auch in der gegenwärtigen Literatur noch regelhaft Anwendung findet, sollen die grundlegenden Annahmen hier dennoch kurz dargestellt werden.

Makrophagen vom M1-Typ werden häufig auch als (pro)inflammatorische oder klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet, ungeachtet der Tatsache, dass diese Begriffe nicht uneingeschränkt austauschbar sind. M2-Makrophagen bezeichnet man auch als reparative oder alternativ aktivierte Makrophagen. Auch hier werden die Begriffe in der Literatur fälschlicherweise häufig synonym verwendet^(21, 141).

In der vereinfachten Vorstellung entwickeln sich inflammatorische Makrophagen aus klassischen Monozyten, wohingegen die reparativen Makrophagen aus nicht-klassischen Monozyten hervorgehen⁽¹⁷⁾. Die Polarisation der Makrophagen wird *in vitro* durch unterschiedliche Zytokine induziert (siehe Tabelle 2-2).

Proinflammatorische Makrophagen fördern Entzündungsprozesse und den Abbau extrazellulärer Matrix durch vermehrte Phagozytose, gesteigerte Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies^(3, 59, 142). Zu den sezernierten Molekülen zählen in erster Linie proinflammatorische Zytokine wie IL-1,

IL-6 oder TNF α , Chemokine wie CXCL9/10 (*C-X-C motif chemokine ligand 9/10*) und auch MMPs (17, 21, 143-145). Die Energiegewinnung erfolgt bei eingeschränktem Citratzyklus und reduzierter oxidativer Phosphorylierung hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse. Diese metabolische Adaptation ist eine Reaktion auf das hypoxische Mikroklima. Hypoxie induziert die Aktivierung des *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α)-Pfades, wodurch die metabolische Umprogrammierung mit vermehrter anaerober Energiegewinnung angestoßen und die Expression proinflammatorischer Gene verstärkt wird (21, 146-149).

Am anderen Ende des phänotypischen Spektrums stehen die Makrophagen vom M2-Typ. Diese gewebereparativen Zellen fördern die Fibroblasten-vermittelte Synthese extrazellulärer Matrix und stimulieren Zellproliferation und Angiogenese (3, 59, 114, 150). Zu diesem Zweck sezernieren sie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, Chemokine wie beispielsweise CCL17/22/24 und Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder TGF- β (*transforming growth factor beta*) (17, 59, 144). Eine gesteigerte Aktivität der Arginase fördert ferner die Kollagensynthese und somit die Narbenbildung (17, 151). Die Energiegewinnung ist stark von der oxidativen Phosphorylierung abhängig (21, 146, 147, 152-154).

Innerhalb des M2-Phänotyps werden darüber hinaus vier Subtypen unterschieden, welche durch die Synthese unterschiedlicher Zytokinprofile voneinander abgrenzbar sind (21, 155-157). Auch hierin äußert sich die ungenügende Abbildung der phänotypischen Vielfalt der Makrophagen innerhalb der Dichotomie des M1-M2-Modells.

Die Charakteristika inflammatorischer und reparativer Makrophagen sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

	Proinflammatorische Makrophagen	Reparative Makrophagen
Alternative Bezeichnungen	<ul style="list-style-type: none"> • Veraltet: M1-Makrophagen • Klassisch-aktivierte Makrophagen 	<ul style="list-style-type: none"> • Veraltet: M2-Makrophagen • Alternativ-aktivierte Makrophagen
Vorläufer	CM	NCM
Induktion durch	IFN- γ , TNF α , LPS, TH ₁ -Zytokine, C-C Chemokine	Glukokortikoide, TH ₂ -Zytokine (IL-4, IL-13)

Syntheseprodukte	<ul style="list-style-type: none"> • Proinflammatorische Zytokine: IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, TNFα • Chemokine: CXCL9, CXCL10, CDCL11 • Matrix-Metalloproteinasen: MMP-1,2,7,9,12 	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflammatorische Zytokine: IL-10 • Chemokine: CCL17, CCL22, CCL24 • Wachstumsfaktoren: VEGF, TGF-β • Matrix-Metalloproteinasen
Marker	Fas-Ligand, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, MMPs, iNOS, NO \cdot , TNF α	Arginase I/II, CD163, FGF- β , IL-4R, IL-10, MS-1, TGF- β , VEGF
Funktion	Inflammation, EZM-Abbau	Stimulation von: EZM-Synthese, Zellproliferation, Angiogenese
Metabolismus	Glykolyse	Oxidative Phosphorylierung

Tabelle 2-2: Charakteristika der proinflammatorischen und der reparativen Makrophagen. Die mittlerweile überholte M1-M2-Klassifikation stellt lediglich zwei Extreme eines Kontinuums aktivierter Zustände dar. CM = klassische Monozyten, NCM = nicht-klassische Monozyten, LPS = Lipopolysaccharid, iNOS = induzierbare NO-Synthase, FGF- β = basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor, IL-4R = Interleukin-4-Rezeptor, MS-1 = *MS-1 high-molecular-weight-protein* (3, 17, 21, 59, 146).

Dass es sich bei der Anwendung des M1-M2-Modells um eine starke Vereinfachung handelt, demonstrierten auch Mouton et al. 2018 ⁽¹⁴⁶⁾. Sie führten eine Studie im Mausmodell durch, in welcher sie das Transkriptom kardialer Makrophagen untersuchten, welche zu verschiedenen Zeitpunkten nach AMI isoliert wurden. Die Autoren demonstrierten, dass die isolierten Makrophagen am ersten Tag nach AMI einen überwiegend proinflammatorischen Phänotyp und am siebten Tag einen vornehmlich reparativen Phänotyp aufwiesen. Allerdings fanden sich deutliche Überlappungen der Marker zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, sodass nicht von einer exklusiven Expression von M1- oder M2-Markern zu einem bestimmten Zeitpunkt gesprochen werden kann. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es sich bei M1- und M2-Makrophagen eher um ein phänotypisches Kontinuum als um zwei distinkte Polarisationszustände handelt ⁽¹⁴⁶⁾.

Im Gegensatz zur M1-M2-Klassifikation berücksichtigen neuere Ansätze, dass die spezifische Mikroumgebung, der Makrophagen beispielsweise im Rahmen eines Wundheilungsprozesses, einer Infektion oder eines Tumors ausgesetzt sind, den

Polarisierungszustand maßgeblich beeinflusst. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen erlauben hierbei eine zunehmend individuelle Beschreibung von Makrophagen-Subpopulationen innerhalb eines komplexen Netzwerkmodelles unter Berücksichtigung umweltspezifischer Faktoren.

2.3.3 Makrophagen in der myokardialen Ischämie

Die im Rahmen des kardialen Remodelings ablaufenden Inflammationsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt wurden bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Im folgenden Abschnitt wird unter Berücksichtigung des breiten phänotypischen Spektrums der Makrophagen auf die besondere Rolle dieser Zellen in der myokardialen Ischämie eingegangen. Zunächst sollte zwischen gewebständigen (residenten) sowie infiltrierenden Makrophagen unterschieden werden.

Residente Makrophagen des Herzens sind hochspezialisierte Zellen, die sich durch ihre starke F4/80-Expression von infiltrierenden Monozyten und den von diesen abstammenden Makrophagen unterscheiden ^(142, 146, 158). Anhand ihrer CCR2-Expression und anderer Marker lassen sie sich in vier Subgruppen einteilen (siehe Tabelle 2-3) ^(159, 160). Die Population CCR2-positiver Makrophagen leitet sich von Monozyten ab und wird vornehmlich durch die Rekrutierung zirkulierender Monozyten gespeist. Diese Makrophagen finden sich hauptsächlich im Bereich des Endokards. CCR2-negative Makrophagen stammen von erythro-myeloiden Vorläuferzellen der frühen Embryogenese ab und erhalten ihre Population durch Selbsterneuerung und lokale Proliferation aufrecht. Man findet sie überwiegend im Bereich des Myokards. Somit leitet sich nur ein geringer Anteil der kardialen Makrophagen von zirkulierenden Monozyten ab ^(21, 71, 159, 161, 162).

1	TIMD4 ⁺ LYVE1 ⁺ MHC-II ^{lo} CCR2 ⁻	Keine Repopulation durch zirkulierende Monozyten
2	TIMD4 ⁻ LYVE1 ⁻ MHC-II ^{hi} CCR2 ⁻	Teilweise Repopulation durch zirkulierende Monozyten
3, 4	MHC-II ^{hi} CCR2 ⁺	Vollständige Repopulation durch zirkulierende Monozyten

Tabelle 2-3: Residente Makrophagen des Herzens. Marker und Art der Repopulation ⁽²¹⁾. TIMD4 = *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4*, LYVE1 = *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*, MHC-II = *major histocompatibility complex-II*, CCR2 = *C-C motif chemokine receptor 2*.

Als unmittelbare Folge der akuten Minderdurchblutung des Myokards kommt es zu einem Absterben residenter Makrophagen. Innerhalb der ersten 24 Stunden führt dies zu einem kompletten Verlust dieser Population ^(17, 142). Die kompensatorische Rekrutierung von Monozyten beginnt innerhalb der ersten 30 Minuten und erfolgt zunächst aus der Blutzirkulation und anschließend aus dem Reservoir der Milz und des Knochenmarks ^(59, 163). Der initiale Gewebeschaden führt über einen Myd88-abhängigen Signalweg zur Aktivierung residenter CCR2-positiver Makrophagen ^(21, 159). Diese sezernieren daraufhin proinflammatorische Zytokine und Chemokine, was wiederum neutrophile Granulozyten und Monozyten anlockt. Bei den infiltrierenden Monozyten handelt es sich um Vertreter des inflammatorischen Subtyps (Ly6C^{high} [murin], CM [human]), welche in ihrer Ausdifferenzierung zu Makrophagen durch die inflammatorische Mikroumgebung geprägt werden. Dies führt zur Expression diverser proinflammatorischer Marker, welche früher insbesondere den M1-Makrophagen zugeordnet wurden ^(17, 164). Zeitgleich kommt es jedoch auch zu einer Suppression der Monozytenmigration durch CCR2-negative residente Makrophagen ^(21, 159). Das Verhindern einer übermäßigen Rekrutierung proinflammatorischer Zellen scheint also im Sinne einer physiologischen Regulation der zellulären Prozesse zu sein.

Proinflammatorisch differenzierte Makrophagen (früher: M1-Makrophagen) stellen dennoch den dominierenden Polarisierungszustand innerhalb der ersten drei bis fünf Tage nach AMI dar und tragen maßgeblich zur akuten Inflammation bei ^(21, 165). Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, erfolgt dies durch die Phagozytose nekrotischer Kardiomyozyten und apoptotischer Granulozyten sowie durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und matrixabbauender Proteinase. Dies bewirkt auch die Aktivierung residenter Fibroblasten, welche daraufhin ähnliche Botenstoffe sezernieren und zu einer Amplifikation der Entzündungsreaktion beitragen. Allerdings hat die entzündliche Mikroumgebung auch eine weitere myokardiale Schädigung mit konsekutiver Hemmung des Heilungsprozesses zur Folge ⁽¹⁶⁶⁾.

Nach einigen Tagen kommt es schließlich zur Auflösung des akuten Inflammationszustandes mit beginnender Gewebeheilung. Ly6C^{low}-Monozyten, welche durch CX3CR1-abhängige Signalwege rekrutiert werden, dominieren das zelluläre Aufgebot ^(21, 167). Makrophagen zeigen nun ein antiinflammatorisches, heilungsförderndes Genexpressionsprofil mit Stimulation von Matrixbildung, Zellproliferation und Angiogenese ⁽¹⁷⁾. Dies äußert sich unter anderem durch eine

vermehrte Expression von Kollagen I und Periostin, was zur Bildung von Narbengewebe beiträgt ⁽¹⁴⁶⁾.

Wie oben bereits angeklungen, herrscht Uneinigkeit über den genauen Differenzierungspfad der früher als M2-Makrophagen bezeichneten Zellpopulation. Einige Autoren beschreiben eine phänotypische Umschaltreaktion mit Wechsel der Polarisierung der inflammatorischen Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp und damit ein Kontinuum zwischen den verschiedenen Polarisierungszuständen ^(168, 169). In anderen Quellen wird dagegen die Abstammung der Makrophagen von verschiedenen Monozytenklassen (CM, NCM) beschrieben ^(167, 170, 171).

In einer Studie an neutrophilendefizienten Mäusen wurde eine erhöhte Anzahl an Makrophagen mit M2-ähnlichem Expressionsprofil beobachtet, was eine regulatorische Funktion der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der antiinflammatorischen Makrophagen-Differenzierung nahelegt ⁽¹⁷²⁾. Andere Autoren gehen von einer durch Phagozytose stimulierten Konversion der Makrophagen zum reparativen Phänotyp aus ⁽³⁾.

Auch im primär nicht-infarzierten Myokard kommt es im Rahmen eines ischämischen Myokardinfarktes zur Infiltration durch zunächst inflammatorische und anschließend reparative Immunzellen. Das Ausmaß der Immunzellinfiltration ist zwar deutlich geringer als im Infarktgebiet, allerdings persistieren Makrophagen und weitere Entzündungszellen im umliegenden Myokard wesentlich länger als im infarzierten Areal ^(59, 173, 174). Dadurch kommt es im Verlauf von Monaten und Jahren nach AMI zu den morphologischen und funktionellen kardialen Veränderungen, die unter 2.2.1 beschrieben sind.

Monozyten und Makrophagen sind somit an allen Phasen des kardialen Remodelings nach AMI beteiligt und unterliegen dabei einem dynamischen Anpassungsprozess an das umliegende Mikromilieu: M1-artige Makrophagen dominieren die initiale inflammatorische Reaktion, wohingegen M2-artige Makrophagen essenziell für die sich anschließende reparative Phase der Gewebeheilung sind.

Die anhaltende Aktivierung proinflammatorischer Makrophagen und die hiermit einhergehende fortlaufende Sekretion von Matrixproteasen und Aktivierung von Myofibroblasten bewirkt ein übermäßiges maladaptives Remodeling des kardialen Gewebes ⁽¹⁷⁾. Aber auch die Depletion zirkulierender Monozyten nach einem Myokardinfarkt hat eine beeinträchtigte Regeneration mit gesteigerter Mortalität zur Folge ^(82, 167). Dagegen korreliert eine Verschiebung des Verhältnisses

inflammatorischer und reparativer Makrophagen zugunsten der letztgenannten mit einer verbesserten linksventrikulären Funktion (siehe Abbildung 2-2) ^(17, 59).

Die Regulation der Makrophagenpolarisierung mit Förderung der reparativ differenzierten Subtypen scheint somit ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt zur Verbesserung des Outcomes von Patienten mit AMI zu sein. So konnte in einem murinen Infarktmodell gezeigt werden, dass die Applikation von langwirksamem Interleukin 4 zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl gewebereparativer (M2-) Makrophagen führt, wodurch das ungünstige kardiale Remodeling reduziert und eine verbesserte kardiale Regeneration und Funktion erreicht werden kann ⁽¹⁷⁵⁾. Auch die Behandlung mit Interleukin 10 oder die Inhibition der Interleukin 6-Signalgebung konnten im Mausmodell ähnliche Ergebnisse erzielen ^(176, 177). Des Weiteren zeigten Garlapati et al. kürzlich, dass die myelomonozytäre Deletion des Gerinnungsfaktors VII (F7) eine Zunahme reparativer Olfml-3⁺ (*olfactomedin-like Protein 3*)-Makrophagen bei gleichzeitiger Abnahme proinflammatorisch differenzierter TF⁺ (*tissue factor*) / TREM1⁺ (*triggered receptor expressed on myeloid cells 1*)-Makrophagen bewirkt und somit das inflammatorisch-reparative Gleichgewicht im postischämischen Remodeling beeinflusst ⁽¹⁷⁸⁾. Weitere Ansatzpunkte sind die CCR2-vermittelte Rekrutierung der Monozyten, die Behandlung mit Wachstumsfaktoren wie M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) oder die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, die in die Makrophagendifferenzierung involviert sind ^(59, 179). Bisher scheinen jedoch nur einzelne Subpopulationen der M1- bzw. M2-ähnlichen Makrophagen durch die verschiedenen Therapieansätze beeinflusst zu werden, was die Heterogenität und Plastizität der Entwicklung, des Phänotyps und der Funktion der Makrophagen erneut unterstreicht und die Notwendigkeit einer präzisen Beschreibung von Subpopulationen verdeutlicht.

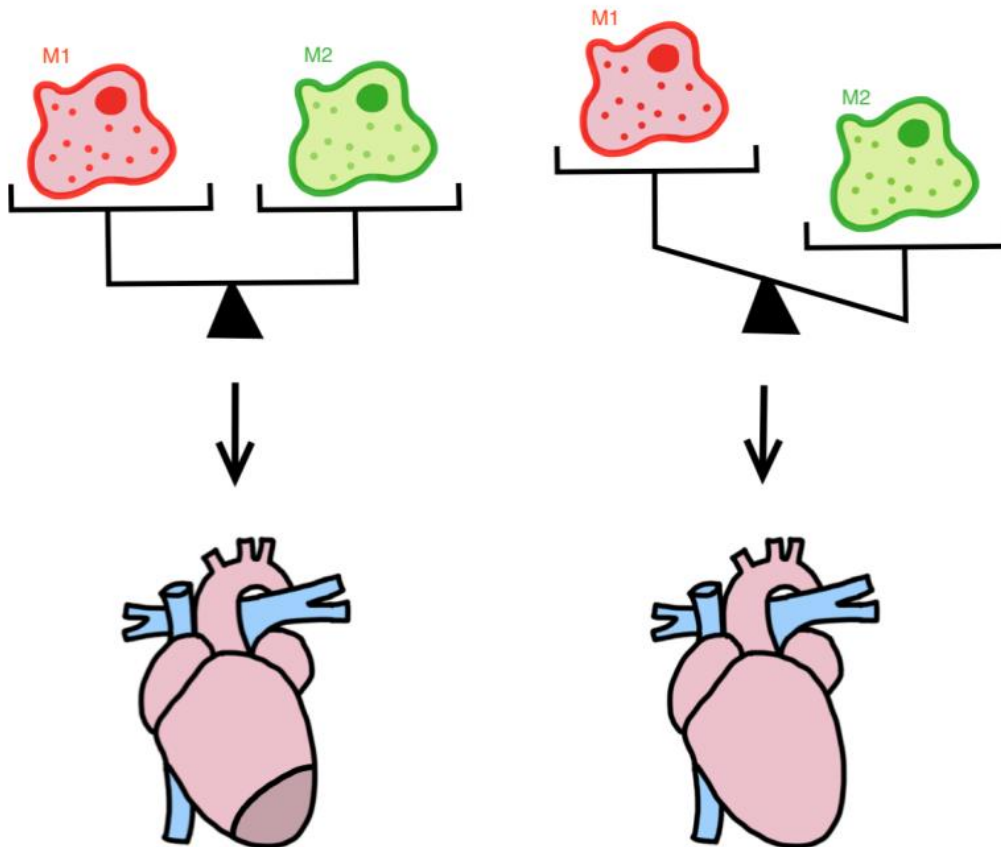


Abbildung 2-2: Phänotypisches Gleichgewicht der Makrophagen und kardiales Resultat. Die Gruppe der proinflammatorischen (in der Abbildung mit M1 bezeichnet) bzw. antiinflammatorischen (in der Abbildung mit M2 bezeichnet) Makrophagen subsumiert ein Spektrum unterschiedlicher Subpopulationen, welche sich in ihrem Genexpressionsprofil voneinander unterscheiden. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des reparativen (M2-)Phänotyps korreliert dabei mit einem besseren kardialen Outcome. Modifiziert nach ⁽²¹⁾.

2.4 Zelluläre pH-abhängige Signalwege

2.4.1 Der zelluläre Botenstoff cAMP und der Transkriptionsfaktor ICER

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) entsteht durch die Aktivität des Enzyms Adenylatcyclase aus Adenosinmonophosphat (AMP) und stellt einen essenziellen intrazellulären Botenstoff dar, der in vielfältige biologische Prozesse involviert ist ^(180, 181).

Bei ICER handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation der Expression cAMP-abhängiger Gene beteiligt ist ⁽¹⁸²⁾.

2.4.1.1 cAMP-abhängige Signalwege

Die Stimulation G_s-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch extrazelluläre neurohormonelle Signale führt über die Aktivierung von Adenylatcyclasen zu einer Synthese des sekundären Botenstoffs cAMP. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert daraufhin diverse Zielmoleküle und löst damit vielfältige zelluläre Reaktionen aus. Bei jedem Schritt der beschriebenen Signalkaskade steigt die Anzahl der Botenstoffe, was eine starke Signalamplifikation zur Folge hat ⁽¹⁸³⁻¹⁸⁵⁾.

Zielmoleküle der PKA sind unter anderem cAMP-empfindliche Transkriptionsfaktoren. Hierzu zählen Proteine aus der Gruppe der *cAMP response element-binding proteins* (CREB) und *cAMP responsive element modulators* (CREM). Phosphorylierte CREB und CREM binden an *cAMP response elements* (CRE) von Zielgenen und beeinflussen im Zusammenspiel mit weiteren regulatorischen Proteinen die Expression des Zielgens. Dadurch kommt es zu diversen Effekten in verschiedensten Zellen und Geweben ^(183, 186).

Eine endogene Regulation der cAMP-abhängigen Signalgebung erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDEs). Diese spalten cAMP zu seinem inaktiven Metaboliten AMP ⁽¹⁸⁷⁾.

Die beschriebene intrazelluläre Signalfolge ist in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt.

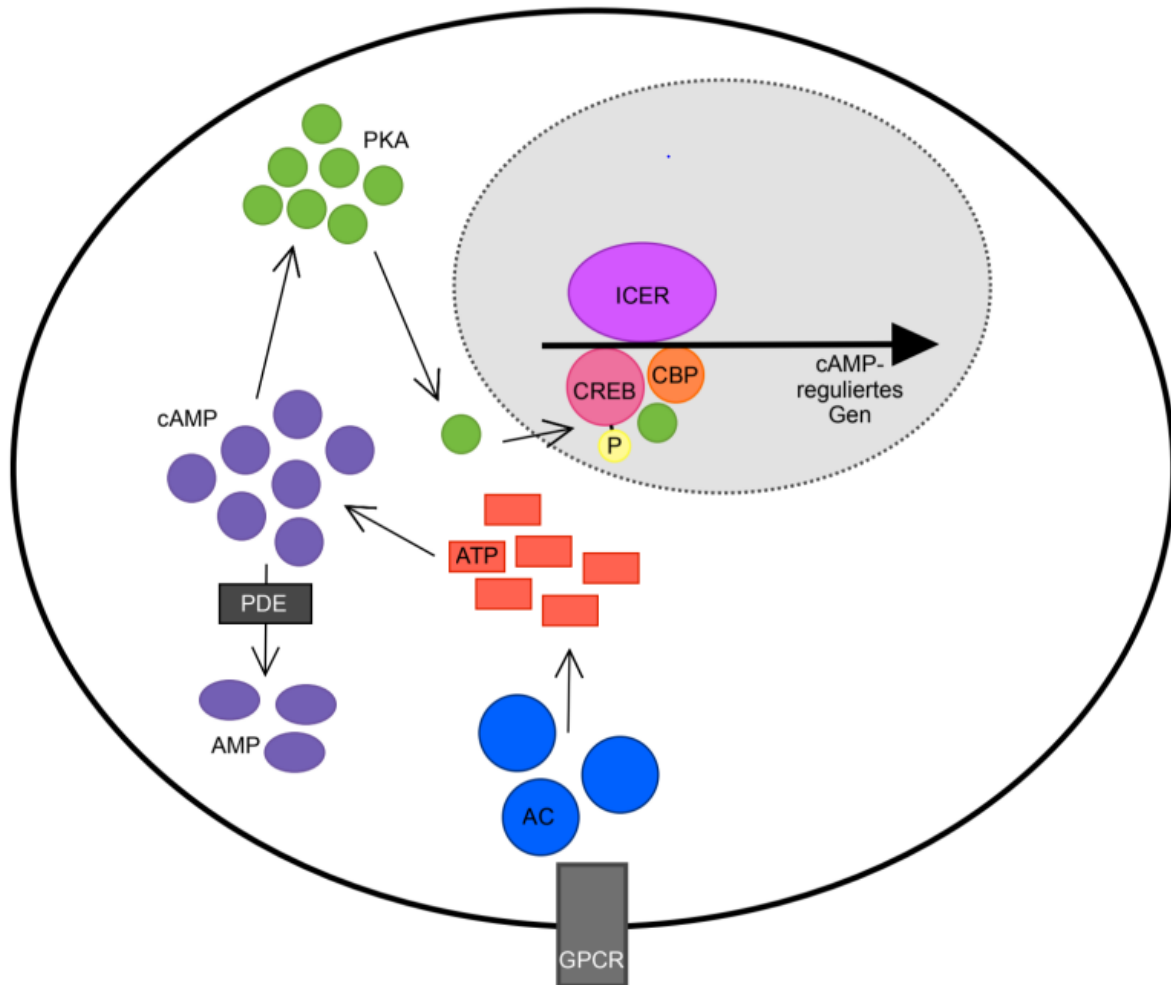


Abbildung 2-3: Der cAMP-Signalweg (vereinfacht): Die Stimulation G_s-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) führt zur Aktivierung von Adenylatcyclasen (AC). Diese initiieren die Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Der Anstieg der cAMP-Konzentration aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche verschiedene Transkriptionsfaktoren im Zellkern phosphoryliert (P). Dazu gehören Vertreter der CREB- (*cAMP response element-binding proteins*) und CREM-Familie (*cAMP responsive element modulators*). Diese interagieren mit transkriptionellen Co-Aktivatoren wie *CREB-binding-proteins* (CBP) und binden an *cAMP response elements* (CRE)-Sequenzen der Zielgene, um deren Expression positiv oder negativ zu beeinflussen. Das Ausmaß der Signalamplifikation ist in der Abbildung nicht dargestellt. Durch Phosphodiesterasen (PDE) wird cAMP zu AMP abgebaut (angelehnt an ⁽¹⁸³⁾).

2.4.1.2 ICER: Endogener Inhibitor CRE-vermittelter Transkription

ICER gehört zur Familie der CREB- und CREM-Transkriptionsfaktoren und besitzt vier Isoformen, die sich in ihrer Funktion nicht unterscheiden (ICER-I, ICER-I γ , ICER-II, ICER-II γ). Über spezielle DNA-Bindungsdomänen bindet ICER an CRE-Sequenzen in Promotorregionen verschiedener Gene und hemmt so deren Expression. Dadurch

vermittelt ICER die Antwort der Zelle auf verschiedene extrazelluläre Stimuli und kontrolliert die Dauer und Stärke der zellulären Reaktion auf cAMP (182, 188-191).

Hohe intrazelluläre cAMP-Spiegel induzieren die ICER-Expression durch Stimulation cAMP-sensibler Elemente im P2-Promotor des CREM-Gens. An diesen Sequenzen kommt es allerdings zu einer Konkurrenz mit anderen Vertretern der CREB-Familie, welche die ICER-Expression dämpfen. Es handelt sich somit um eine transiente Induktion der Genexpression (188, 192-194).

Eine Phosphorylierung durch *extracellular-signal regulated kinases* (ERK) bewirkt den Abbau des Transkriptionsfaktors über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (188, 195).

2.4.1.3 Immunologische und kardiale Effekte von cAMP

Der Botenstoff cAMP ist ein potenter Regulator angeborener und erworbener Immunzellfunktionen. Es wurde gezeigt, dass ein intrazellulärer Anstieg der cAMP-Konzentration zu einer Hemmung der Freisetzung inflammatorischer Faktoren wie TNF α , IL-17 und IFN γ und zu einer Förderung der Synthese antiinflammatorischer Faktoren wie IL-10 führt (183, 196-198). Diese entzündungshemmende Wirkung von cAMP zeigt sich auch in der Schwächung inflammatorischer monozytärer Funktionen durch Förderung der Polarisierung zum reparativen M2-Phänotyp (199). Die Steigerung der cAMP-Wirkung hat folglich ein immunschwächendes Potenzial, während die Unterdrückung cAMP-vermittelter Signale immunstimulierend wirkt. Diese Mechanismen werden unter anderem durch PDE-Hemmer genutzt (183, 200). Die Rolle vorgeschalteter Rezeptoren, insbesondere Azidose-wahnehmender GPCRs ist in Kapitel 2.4.3 näher beschrieben.

Eine hohe intrazelluläre cAMP-Konzentration stellt außerdem eine Schlüsselkomponente der inhibitorischen Funktion regulatorischer T-Zellen dar (201, 202). Darüber hinaus ist ein hoher cAMP-Spiegel essenziell für die Entwicklung einer immunologischen Selbsttoleranz durch negative Selektion reifender Thymozyten. Auch hier scheinen Azidose-wahnehmende GPCRs eine Rolle zu spielen (siehe Kapitel 2.4.3) (203).

Im Herzen kommt der cAMP-Signalgebung sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen eine regulatorische Rolle zu (204-206). Die kurzfristige Stimulation kardialer β_1 -Adrenorezeptoren hat eine cAMP-vermittelte Steigerung der myokardialen Kontraktilität zur Folge und übt somit kardioprotektive Effekte aus (191, 207). Chronisch erhöhte Katecholaminspiegel, wie sie bei Patienten mit Herzinsuffizienz

zu finden sind, führen dagegen zu einer langanhaltenden Stimulation cAMP-abhängiger Signalwege. Dies fördert die Apoptose von Kardiomyozyten sowie die Entwicklung einer kardialen Fibrose durch gesteigerte Proliferation von Fibroblasten (184, 188, 191, 192, 206).

2.4.1.4 Physiologische und pathologische Funktionen von ICER

ICER ist unter anderem an der Regulation neuroendokriner Systeme und des zirkadianen Rhythmus beteiligt (189).

Eine anhaltend hohe ICER-Expression führt zu einer persistierenden Suppression CREB-regulierter Genexpression (182). Dies hat in verschiedenen Zelltypen pathologische Konsequenzen und kann unter anderem zum neuronalen Zelltod und zur Apoptose von Kardiomyozyten führen (188, 191, 194). Wie in Kapitel 2.4.1.3 bereits angeklungen, führt ein erhöhter cAMP-Spiegel mit konsekutiv gesteigerter ICER-Expression zu einer Hemmung der *toll-like-receptor* (TLR)-vermittelten NF-κB-Aktivierung, was für die proinflammatorische Polarisierung von Makrophagen von Bedeutung ist (13, 208).

Auch am Herzen konnte eine Beteiligung von ICER an diversen pathophysiologischen Prozessen gezeigt werden. So führt eine Überexpression des Transkriptionsfaktors über endogene negative Feedbackmechanismen zu einer Reduktion Katecholamin-vermittelter kardialer Hypertrophie. Wie oben bereits erwähnt, hat ICER eine proapoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten, was durch eine Hemmung der Expression des antiapoptotischen Moleküls Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) zu erklären ist (188).

Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten zeigen eine dauerhaft erhöhte endogene ICER-Expression bei gehemmter Expression der Phosphodiesterase-3A (PDE-3A) (192, 209). Dem liegt ein pathologischer positiver Feedback-Mechanismus zugrunde: ICER hemmt die Expression der PDE-3A. Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration mit konsekutiver Aktivierung der PKA, was wiederum die ICER-Genexpression stimuliert. Eine Unterbrechung dieses Teufelskreises stellt einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt zur Reduktion der ICER-vermittelten kardiomyozytären Apoptose dar (191, 209).

Auch in der akuten myokardialen Ischämie zeigt sich ein ähnliches Muster. In einem Mausmodell des Myokardinfarktes detektierten Ma et al. eine höhere Expression der ICER- und CREB-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe, während sich die PDE-3A-

und Bcl-2-mRNA-Expression verringert zeigte. Diese AMI-induzierten und ICER-vermittelten Veränderungen der Genexpression ließen sich durch – insbesondere präischämische – therapeutische Applikation des Angiotensin-II-Rezeptor-1-Antagonisten (AT₁-I) Valsartan umkehren, was eine Verbesserung der kardialen Funktion nach AMI erbrachte ⁽¹⁹³⁾.

Des Weiteren beschrieben Bohn et al. eine pH-Abhängigkeit der ICER-Expression. So führt eine saure Tumormikroumgebung durch Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf Tumor-assoziierten Makrophagen zu einer cAMP-vermittelten Steigerung der ICER-Genexpression. Die hierdurch geförderte antiinflammatorische Differenzierung der TAM verhindert eine effiziente anti-Tumor-Immunantwort, was ein gesteigertes Tumorwachstum nach sich zieht. Bohn et al. zeigten, dass ein Makrophagen-spezifischer ICER-Knockout durch vermehrte inflammatorische Polarisierung der TAM eine effiziente Tumorkontrolle ermöglicht. Diese azidoseabhängigen Prozesse stehen in Zusammenhang mit einer erhöhten Expression der membranständigen Rezeptoren GPR132 und insbesondere GPR65. Eine Antagonisierung bzw. Unterbrechung der hierüber vermittelten Signalwege hat eine Beeinträchtigung der azidoseinduzierten Expression der ICER-mRNA zur Folge ⁽¹³⁾.

Bohn et al. zeigten außerdem, dass neben einer Tumor-assoziierten Laktatbildung auch andere pH-senkende Faktoren die Aktivierung azidosevermittelter Signalwege bewirken ⁽¹³⁾. Somit lassen sich diese Erkenntnisse unter Umständen auch auf andere Gewebe, in denen es durch verschiedenste Ursachen zu einer Ansäuerung des Milieus kommt, übertragen. Der Einfluss der ischämischen myokardialen Azidose auf die kardiale Expression von ICER ist bislang nicht untersucht.

2.4.2 Zelluläre Azidose als Ausdruck pathologischer Prozesse

Der physiologische pH-Wert des Blutes liegt etwa im Bereich von 7,35 bis 7,45 und wird innerhalb dieser Grenzen streng reguliert. Im Allgemeinen ist der interstitielle pH etwas niedriger als der des Blutes. Um Schwankungen des pH-Wertes auf ein Minimum zu beschränken, greifen vielfältige Prozesse komplex ineinander. Die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes ist dabei für die Funktionalität von zellulären, biochemischen und enzymatischen Prozessen von entscheidender Bedeutung ^(210, 211).

Viele pathologische Prozesse gehen mit einer Ansäuerung des extrazellulären Milieus einher und führen so zu einer weiteren Beeinträchtigung physiologischer Funktionen (212-215).

Auch die Funktion von Immunzellen wird durch eine extrazelluläre Azidose reguliert (216-218). Durch Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und Aktivierung entzündungstreibender Zellen wie neutrophiler Granulozyten und dendritischer Zellen, verstärkt eine Ansäuerung des Gewebes die ablaufenden inflammatorischen Prozesse. Paradoxerweise kann es jedoch auch zu einer Hemmung der Immunantwort mit reduzierter Aktivität inflammatorischer Zellen und Botenstoffe kommen (219-222).

Eine schwache bis moderate extrazelluläre Azidose wird in allen pathologischen Zuständen beobachtet, in denen es zu einer Beeinträchtigung der Blutversorgung kommt. Hierzu gehören Ischämie-assoziierte aber auch inflammatorische Prozesse, die unter anderem bei allergischem Asthma, Atherosklerose und malignen Tumoren festzustellen sind (210, 223).

Das Myokard ist eines der Azidose-anfälligsten Gewebe im Körper. Im Rahmen einer akuten Myokardischämie bewirkt die reduzierte oder unterbrochene Sauerstoffversorgung eine metabolische Transformation zugunsten der anaeroben Glykolyse. Die resultierende Akkumulation von Laktat führt zu einer intra- und extrazellulären Ansäuerung (224, 225).

Cobbe et al. untersuchten die Veränderungen des pH-Werts im Papillarmuskel von Hasen während einer kontrolliert induzierten Ischämie. Sie detektierten bereits innerhalb der ersten fünf Sekunden nach kompletter Unterbrechung der Blutversorgung eine Ansäuerung des myokardialen Gewebes. Nach einer Stunde war der pH-Wert bereits um etwa 1,4 Punkte abgefallen. Eine Reperfusion bewirkte eine schnelle Rückkehr zu physiologischen Werten. Unter den Umständen einer subtotalen Ischämie ging der pH-Abfall dagegen langsamer vonstatten und fiel insgesamt geringer aus (14).

Durch simultane extra- und intrazelluläre pH-Messungen zeigten Yan et al., dass die Ansäuerung des Myokards während der Ischämie insbesondere im extrazellulären Kompartiment stattfindet. Nichtsdestotrotz wurde auch ein Abfall des intrazellulären pH-Werts beobachtet. Dieser beeinflusst die Rate anaerober Glykolyse unter ischämischen und hypoxischen Bedingungen und wirkt sich auf die Reizentstehung und -weiterleitung am Herzen aus. Über weitere Ionenverschiebungen kommt es

darüber hinaus zu einer Änderung des Ruhemembranpotenzials, was unter Umständen für die Entstehung früher ventrikulärer Arrhythmien verantwortlich ist ⁽²²⁶⁾.

2.4.3 pH-sensitive G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Rezeptoren, welche durch Änderungen des pH-Wertes aktiviert werden, lassen sich in ionotrope und metabotrope Rezeptoren einteilen. Zur Gruppe der ionotropen pH-sensiblen Rezeptoren gehören der Calcium-permeable TRPV-1-Rezeptor (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) sowie der Natrium-permeable ASIC-Rezeptor (*acid-sensing ion channel*). Diese finden sich insbesondere auf peripheren sensorischen sowie zentralen Neuronen und spielen eine Schlüsselrolle bei der Transduktion nozizeptiver Signale. Die Aktivierung erfolgt bei starker Ansäuerung mit pH-Werten zwischen 4 und 6 ^(223, 227-229).

Die metabotropen (indirekt über intrazelluläre Signalwege wirkenden) pH-sensiblen Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*proton-sensing G-protein coupled receptors*: psGPCRs) und werden bereits bei physiologischem oder leicht saurem pH aktiviert. Derzeit sind vier verschiedene psGPCRs bekannt: GPR4 (G-Protein-gekoppelter Rezeptor 4), GPR132, OGR1 (*ovarian cancer G-protein coupled receptor 1*) und TDAG8 (*T cell death associated gene 8*, auch GPR65) ^(219, 230). Dabei weist GPR132 im Gegensatz zu den anderen drei psGPCR eine deutlich geringere pH-Sensitivität auf ^(223, 231-233).

In der Literatur alternativ verwendete Bezeichnungen sowie die Angabe der jeweils gekoppelten G-Proteine sind Tabelle 2-4 zu entnehmen.

Name	Weitere Bezeichnungen	Kopplung	pH _{max}
GPR4	GPR19	G_s , G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	6,8
GPR132	G2A	G _s , G _{12/13}	
OGR1	GPR68	G _s , G_{q/11}	6,8
TDAG8	GPR65	G_s , G _{12/13}	6,8

Tabelle 2-4: Protonen-sensible G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unter Angabe alternativer Bezeichnungen sowie des gekoppelten G-Proteins. Bezüglich des gekoppelten G-Proteins herrscht in der Literatur teilweise Uneinigkeit ^(203, 210, 219, 230, 234, 235). pH_{max} = pH-Wert, der zu einer maximalen Aktivierung des Rezeptors führt. Für GPR132 finden sich hierzu in der Literatur keine konkreten Angaben.

Die exakten Mechanismen der Protonenwahrnehmung sind noch unvollständig verstanden. Auf der extrazellulären Seite der transmembranären Rezeptoren befinden sich Histidin-Cluster, welche spezieübergreifend konserviert sind. Im unprotonierten Zustand kommt es über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Histidinen zu einer Verbindung zwischen Helix I und Helix VII. Im sauren Milieu führt eine Protonierung der Histidinreste zur Lösung dieser Wasserstoffbrückenbindungen, was dem Rezeptor den Übergang in eine aktive Konformation ermöglicht ^(120, 210, 233). Im humanen und murinen GPR132 sind diese spezifischen Histidine teilweise nicht konserviert, was eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe pH-Sensitivität des Rezeptors liefert ⁽²³³⁾.

Mit Ausnahme von GPR4 ist für alle psGPCRs eine konstitutive Aktivität beschrieben, welche unter anderem zu einer signifikanten basalen Hemmung CRE-vermittelter Genexpression führt ⁽²³⁶⁾. Insbesondere für TDAG8, aber in geringerem Ausmaß auch für GPR4 und OGR1, ist außerdem eine Glukokortikoid-vermittelte Steigerung der Rezeptorexpression bekannt. Somit besteht eine indirekte Beteiligung an Glukokortikoid-vermittelten antiinflammatorischen Prozessen ^(203, 237).

Für psGPCRs konnte eine Beteiligung an vielfältigen biologischen Prozessen gezeigt werden. Dazu gehören unter anderem Apoptose, Metastasierung maligner Tumore, Immunzellfunktion, Inflammation und Angiogenese ⁽²²⁰⁾. Beispielsweise zeigen Patienten mit koronarer Herzerkrankung verglichen mit gesunden Kontrollen eine geringere Expression von GPR4 in endothelialen Vorläuferzellen, was eine Beeinträchtigung der azidosevermittelten Neubildung von Blutgefäßen nach sich zieht ⁽²³⁸⁾.

Malignome gehen häufig mit einer Ansäuerung des Tumorgewebes einher. Dabei liegt der pH-Wert oft unter 7, teilweise sogar unter 6,5 ⁽²³⁹⁻²⁴²⁾. Eine hohe Proliferationsrate bei limitierter Blutversorgung führt dabei zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme der Tumorzellen mit konsekutiver Steigerung der anaeroben Glykolyse. In der Folge kommt es zur vermehrten Laktatproduktion, was mit einer Ansäuerung des Gewebes einhergeht. Auch die gesteigerte Expression des Natrium-Protonen-Antiporters (Na^+/H^+ -Antiporter) und weiterer Transportproteine trägt zur Ansäuerung der Tumormikroumgebung bei ^(219, 220, 243). Die Wahrnehmung der extrazellulären Ansäuerung spielt für die Onkogenese eine wichtige Rolle. Akut wirkt eine Azidose zytotoxisch und hemmt die Tumorzellproliferation ^(220, 244, 245). Eine chronische Ansäuerung des Gewebes führt dagegen zu chromosomalen Instabilitäten und

Genmutationen und treibt so die Tumorentstehung und -progression voran. Über einen gesteigerten Abbau extrazellulärer Matrix trägt die Azidose darüber hinaus zur Metastasierung bei. Die Aggressivität des Tumors wird durch die Selektion azidoresistenter Tumorzellen weiter gesteigert ^(219, 220, 246-249). Des Weiteren vermittelt das Tumor-assoziierte Laktat über die Aktivierung Protonen-wahrnehmender Rezeptoren eine antiinflammatorische Polarisierung der Makrophagen (siehe Kapitel 2.4.1.4). Diese Tumor-assoziierten Makrophagen können ebenfalls zu einem weiteren Tumorwachstum beitragen ^(222, 250).

Viele Malignome zeigen eine gesteigerte Expression Protonen-sensitiver G-Proteingekoppelter Rezeptoren. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression Protonen-wahrnehmender GPCRs mit einem schlechteren Überleben der Patienten assoziiert ist, was mit den oben beschriebenen Mechanismen in Einklang steht ⁽²¹⁹⁾.

Die Rolle des GPR132 wird insbesondere bezüglich des Mammakarzinoms kontrovers diskutiert. Insel et al. bezeichnen eine hohe Expression von GPR132 für das Hormonrezeptor-positive Mammakarzinom als positiven prognostischen Marker ⁽²¹⁹⁾. Dagegen beschreiben Chen et al. eine Assoziation der GPR132-Expression mit einer schlechteren Prognose und gesteigerten Metastasierungsrate ⁽²⁵⁰⁾.

Die Funktionen der psGPCRs sind somit vielschichtig und insbesondere vom betrachteten Gewebe abhängig. Nachfolgend wird genauer auf die bisherigen Erkenntnisse zur Funktion und Rolle von TDAG8 (im Folgenden GPR65) und GPR132 eingegangen.

2.4.3.1 GPR65

Der Rezeptor GPR65, der in der Literatur auch als TDAG8 bezeichnet wird, stimuliert je nach gebundenem G-Protein unterschiedliche zelluläre Signalwege. Über ein G_s-Protein wird der cAMP-Signalweg aktiviert, welcher in Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben ist. Bei Kopplung an ein G_{12/13}-Protein bewirkt die Rezeptoraktivierung die Stimulation der kleinen GTPase RhoA (Ras-Homolog A) ^(203, 223, 251).

Insbesondere Immunzellen wie Leukozyten und (kardiale) Makrophagen zeichnen sich durch eine starke GPR65-Expression aus, jedoch zeigen auch einige humane Karzinome eine Überexpression des Rezeptors ^(220, 221, 252, 253).

Initial wurde GPR65 als Rezeptor für das Lipid Psychosin beschrieben. Wang et al. zeigten jedoch, dass Psychosin und andere strukturähnliche Lysosphingolipide

antagonistisch an den psGPCRs GPR65, GPR4 und OGR1 wirken und somit einen inhibitorischen Effekt auf die pH-induzierte Aktivierung haben ⁽²⁰³⁾. Ishii et al. konnten diesen Effekt nicht reproduzieren, sodass die Rolle von Psychosin weiterhin unklar definiert ist ⁽²⁵²⁾.

Hingegen herrscht Einigkeit über die pH-Sensitivität des Rezeptors. Protonen wirken als typische Rezeptorliganden und führen über die Aktivierung des G_s-Proteins zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Aktivität erreicht bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7 ihr Maximum. Bei einem weiteren Anstieg der Protonenkonzentration kommt es wiederum zu einer sukzessiven Abnahme der Rezeptoraktivität ⁽²⁰³⁾.

Für GPR65 sind eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen Funktionen beschrieben. Die Stimulation des Rezeptors bewirkt die Aktivierung einer antiinflammatorischen cAMP-Signalgebung in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten und bedingt so eine Regulation der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α und IL-1 β ^(201, 221, 223, 251, 254). Dieser hemmende Effekt auf die inflammatorische Immunzellfunktion zeigt sich ebenfalls in GPR65-defizienten Mäusen, welche zu einer Exazerbation autoinflammatorischer Erkrankungen neigen ⁽²⁵⁴⁾. Außerdem weisen GPR65-defiziente Mäuse nach einem Schlaganfall höhere Level proinflammatorischer Mikroglia und eine reduzierte Expression von Wachstums- und Regenerationsmarkern auf, was mit einem größeren Infarktareal und vermehrten Beeinträchtigungen einhergeht ^(211, 255-257).

Die Beteiligung des Rezeptors GPR65 an den kardialen Remodelingprozessen nach einem akuten Myokardinfarkt wird in Kapitel 5.2.3 ausführlich diskutiert.

2.4.3.2 GPR132

GPR132 wird in der Literatur auch als G2A bezeichnet. Über die Signalwege, welche durch die Aktivierung des Rezeptors stimuliert werden, herrscht allerdings Uneinigkeit. Während Weiß et al. die gekoppelten Signalwege als „bisher undefiniert“ beschreiben ⁽²³⁰⁾, gehen Insel et al. von einer Kopplung an G_s- und G_{12/13}-Proteine aus ⁽²¹⁹⁾.

Wie bereits in Kapitel 2.4.3 beschrieben, weist der Rezeptor GPR132 nur eine geringe Sensitivität für pH-Schwankungen auf. Eine Rolle als Protonensensor in nativen Zellen konnte bislang nicht nachgewiesen werden ⁽²²³⁾. Chen et al. konnten allerdings eine Aktivierung von GPR132 durch Tumor-assoziiertes Laktat zeigen ⁽²⁵⁰⁾.

Darüber hinaus handelt es sich bei GPR132 um einen Rezeptor für oxidierte freie Fettsäuren. Dazu gehören Oxidationsprodukte der Linolsäure, welche unter oxidativem Stress vermehrt gebildet werden ^(231, 258-260). Oxidativer Stress führt somit zu einer verstärkten Produktion der Liganden, steigert aber auch die Expression des Rezeptors selbst ^(250, 261).

GPR132 wird primär von Immunzellen exprimiert und ist an deren Migration und Funktion, der Regulation von Autoimmunität und der lymphozytären Homöostase beteiligt ^(220, 262, 263). Darüber hinaus kommt GPR132 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu ^(231, 264).

Das Fehlen von GPR132 geht im Mausmodell mit einer abgeschwächten Inflammationsantwort einher. Osthues et al. konnten in einer Studie zu neuropathischem Schmerz nach Nervenverletzungen zeigen, dass GPR132-defiziente Mäuse eine reduzierte Anzahl CD45-positiver Immunzellen aufweisen. Dies betrifft insbesondere Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Zudem kommt es im Zusammenhang mit einem Fehlen von GPR132 zu einer verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren im Bereich der Nervenverletzung. Diese Effekte wurden von einer reduzierten mechanischen Hypersensitivität begleitet ⁽²⁶⁵⁾.

Le et al. zeigten außerdem, dass GPR132 entscheidend an der Regulation peripherer Lymphozyten beteiligt ist. Eine GPR132-Defizienz geht demnach mit der Entwicklung eines Autoimmunsyndroms mit spätem Beginn einher ⁽²⁶⁶⁾.

Die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Beteiligung von GPR132 an Rekrutierungsprozessen von Makrophagen werden in Kapitel 5.2.3 beleuchtet.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die ischämische Herzkrankheit und insbesondere die Herzinsuffizienz als Folge einer kardialen Ischämie stellt weltweit eine der Hauptursachen kardiovaskulärer Mortalität dar. Die akute Ischämie im Rahmen eines Myokardinfarktes wird von einer Ansäuerung des myokardialen Gewebes begleitet. Azidosesensitive G-Proteingekoppelte Rezeptoren wie GPR65 und GPR132 registrieren diesen Abfall des interstitiellen pH-Wertes und stoßen komplexe intrazelluläre Signalkaskaden an. Einen möglichen Vermittler dieser azidoseabhängigen zellulären Signalübertragungskette stellt der Transkriptionsfaktor ICER dar.

Myelomonozytäre Zellen sind zentrale Akteure im Prozess des kardialen Remodelings nach abgelaufenem Herzinfarkt. Die Bedeutung Azidose-aktivierter Signalgebung monozytärer Zellen im postischämischen Remodeling ist bislang jedoch unzureichend untersucht.

Die Ischämie-induzierte myokardiale Azidose könnte sich als therapeutischer Ansatzpunkt zur sekundärpräventiven Verbesserung des kardialen Outcomes nach einem akuten Myokardinfarkt erweisen. In der vorliegenden Arbeit wird daher die Bedeutung des Transkriptionsfaktors ICER und übergeordneter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren in der myelomonozytären Immunantwort im Mausmodell des akuten Myokardinfarktes untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller	Firmensitz
1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether (Isofluran)	Abbott Laboratories	Abbott Park, IL, USA
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
2-Propanol, Isopropanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
ACK Lysing Buffer (1x)	Lonza	Walkersville, MD, USA
Alzane® (Atipamezolhydrochlorid)	Zoetis GmbH	Berlin, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun SE	Melsungen, D
Aqua Resist, Wasserbad-Schutzmittel	VWR International GmbH	Poole, UK
BD FACST TM Lysing Solution	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, D
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer	Leverkusen, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Collagenase Typ II	Gibco TM , Thermo Scientific	Carlsbad, CA, USA
D(+)-Glukosemonohydrat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Direct PCR Lysis Reagent	Viagen	Los Angeles, CA, USA
DNase I grade II	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, D

Material und Methoden

Dorbene® vet (Medetomidinhydrochlorid) 1 mg/ml	Zoetis GmbH	Berlin, D
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline + CaCl ₂ + MgCl ₂)	Gibco™, Thermo Scientific	UK
Elektrodencreme	GE Medical Systems	Freiburg, D
Enthaarungscreme	Balea	Karlsruhe, D
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Ethanol ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Fentanyl 0,05 mg/ml	Panpharma GmbH	Trittau, D
Fetal Bovine/Calf Serum (FBS/FCS), hitzeinaktiviert	Gibco™, Thermo Scientific	UK
Flumazenil Hikma 0,1 mg/ml	Hikma Farmacêutica	Terrugem, Portugal
Guanidiniumthiocyanat (C ₂ H ₆ N ₄ S)	AppliChem GmbH	Darmstadt, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco™, Thermo Scientific	UK
HEPES PUFFERAN®	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Indometacin	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 %	B. Braun SE	Melsungen, D
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH	Darmstadt, D
L-012 (8-Amino-5-Chloro-7- Phenylpyrido [3,4-d] pyridazin- 1,4-(2H,3H) Dion)	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH	Neuss, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Magnesiumsulfatheptahydrat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Midazolam-hameln 1 mg/ml	Hameln pharma GmbH	Hameln, D
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA	Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D

Material und Methoden

Nitrolingual® Infusionslösung (Glyceroltrinitrat) 1 mg/ml	G. Pohl-Boskamp GmbH	Hohenlockstedt, D
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Merck KGaA	Darmstadt, D
Octenisept®, wässriges Wund- und Schleimhautantiseptikum	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, D
PDBu (Phorbol-12,13-dibutyrat)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Prostaglandin F2 α	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Roti® Aqua-Phenol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Roti®C/I	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Roti®Fair 10x PBS 7.4	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Temgesic® 0,3 mg/ml	Indivior Europe Limited	Dublin, Irland
Trypan blue solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, D
Sonosid® Ultraschallgel	Asid Bonz GmbH	Herrenberg, D
Zymosan A (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

3.1.2 Kits und Assays

Kit / Assay	Hersteller	Firmensitz
Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit	StemCell Technologies Canada Inc.	Vancouver, Kanada
Multi Tissue Dissociation Kit 2	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
QuantiTect® Probe RT-PCR Kit	QIAGEN	Hilden, D
REDTaq® ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems Life Tech.	Waltham, MA, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Firmensitz
1 ml Spritze Omnifix-F Luer, klar	B. Braun SE	Melsungen, D
1 ml Spritze, Tuberkulinspritze, grün	B. Braun SE	Melsungen, D
2 ml Spritze, Injekt Luer	B. Braun SE	Melsungen, D
24-well Platten, steril, Flachboden	Greiner AG	Kremsmünster, AT
5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, unsteril	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
5 ml Spritze, BD Discardit II	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, D
6-well Platten, Flachboden mit Deckel	Fisher Scientific	Schwerte, D
96-well BRANDplates - F - (pureGrade white)	BRAND GmbH + CO KG	Wertheim, D
96-well PCR Platte, unskirted, flat top, low profile	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, D
96-well Platten, Polystyrol, steril, U-shape	Greiner AG	Kremsmünster, AT
Adhesive Clear qPCR Seal; 140x77 mm	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, D
Cell Chip™	TECAN Austria	Grödig, AT
Cellstar™ Teströhrchen mit konischem Boden, steril; 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
FALCON® Cell Strainer 40 µm, steril, Nylon	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
FALCON® Cell Strainer 70 µm, steril, Nylon	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
Folded qualitative filter paper	VWR International GmbH	Darmstadt, D

Kanüle 26 G; 0,45x13 mm	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, D
MoliCare® Bed Mat; 40x60 cm	Paul Hartmann AG	Heidenheim, D
Pasteurpipetten, unsteril	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Petrischale, 94x16 mm, ohne Nocken, Polystyrol	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, D
Platindraht; Durchmesser 0,1 mm	Goodfellow Cambridge Limited	Huntingdon, UK
Prolene™ 8889H 6-0 C-1, 13 mm 3/8c, 75 cm	Johnson & Johnson Medical GmbH	Norderstedt, D
Prolene EH7469LG 8-0 BV 130-5, 6,5mm 3/8c, 75 cm	Johnson & Johnson Medical GmbH	Norderstedt, D
Safe-Lock Tubes; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, D
Schlinggazetupfer, unsteril	Fuhrmann GmbH	Much, D
Serologische Pipette	Greiner AG	Kremsmünster, AT
CELLSTAR®; 5, 10, 25, 50 ml		
Skalpell Feather® No. 11	PFM medical AG	Osaka, Japan
Skalpell Feather® No. 21	PFM medical AG	Osaka, Japan
Starguard® Protect Powder-Free Nitril Gloves; Größe S/M/L	Starlab International GmbH	Hamburg, D
SurPhob® Pipettenspitzen; 10 µl, 200 µl, 1250 µl	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, D
Vasofix® Safety Braunüle 22 G	B. Braun SE	Melsungen, D

3.1.4 Antikörper und Primer

3.1.4.1 Durchflusszytometrie

Name (<i>anti-mouse</i>)	Konjugat	Klon	Firma
B220	FITC	RA3-6B2	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CD11b	PerCP-Cyanide 5.5	M1/70	Thermo Fisher Scientific

			(Waltham, MA, USA)
CD16/CD32 (F_c-Rezeptor Block)	-	93	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CD45	APC efluor780	30-F11	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CD90.2	Super Bright 645	53-2.1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
F4/80	APC	BM8	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fixable Viability Dye	eflour 506	-	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ly6G	PE	1A8	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Ly6C	V450	AL-21	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
NK1.1	PE Cy7	PK136	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 3-1: Verwendete FACS-Antikörper unter Angabe des Oberflächenproteins, des Konjugats, des Klons und des Herstellers (Spalten von links nach rechts).

3.1.4.2 Polymerasekettenreaktion

Für die RT-PCR wurden folgende Primer aus dem TaqMan® Gene Expression Assay der Firma Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)) verwendet:

Name des Primers		Weitere Bezeichnungen	Gen
IL-1β	<i>Interleukin 1 beta</i>	IL-1beta, IL-1b, RP23-384K11.2	IL1B
IL-6	<i>Interleukin 6</i>	IL6, IFNB2	IL6

MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>	CCL2, SMC-CF, MCAF	CCL2
NOX-2	<i>NADPH Oxidase 2</i>	Nox2, Cybb, GP91-PHOX	CYBB
TBP (FAM-markiert)	<i>TATA-Box Binding Protein</i>	TBP1, GTF2D1, TFIID, Gtf2d, SCA17	TBP
TBP (VIC-markiert)	<i>TATA-Box Binding Protein</i>	TBP1, GTF2D1, TFIID, Gtf2d, SCA17	TBP
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>	TNFalpha, Tnf, Tnfa, Tnf-a, DIF, TNFSF2, Tnfsf1a	TNF
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>	CD106, Vcam1, Incam-100	VCAM1

Tabelle 3-2: Auflistung der in der RT-PCR verwendeten Primer inklusive vollständiger Bezeichnung, alternativer Bezeichnungen in der Literatur sowie Angabe des Gens.

3.1.5 Geräte und Software

Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Advanced Hot Plate Stirrer Magnetrührer	Heidolph Instruments	Schwabach, D
Advanced Plate Stirrer Magnetrührer	VWR International GmbH	Radnor, PA, USA
Attune NxT FACS, Acoustic focusing cytometer	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
GeneTouch™ Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, D
BD Rhapsody-Plattform	BD Life Sciences	Milpitas, CA, USA
Castroviejo Federschere, stark gebogen, 10mm	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Centrifuge Allegra® X-15R	Beckman Coulter	Brea, CA, USA

Material und Methoden

Centrifuge Himac CT15RE	Hitachi Koki Co., Ltd	Japan
Centrifuge minispin®, Rotor F-45-12-11	Eppendorf AG	Hamburg, D
CFX96 rt-pc-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
CODA™ Non-Invasive Blood Pressure System	Kent Scientific Corporation	Torrington, CT, USA
Dumont #5 Forceps Inox; 11 cm	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
EasySep™ Magnet	StemCell Technologies Canada Inc.	Vancouver, Kanada
Eppendorf Research® plus Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, D
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, D
Heizplatte EHE-3503-Cu-SWCR	FMI GmbH	Seeheim, D
Infrarot-Wärmelampe IR 175 R PAR38	Philips Lighting	Amsterdam, NLD
Kaltlichtlampe LED Modell F1	Photonic	Wien, AT
KS 260 basic Kreisschüttler	IKA-Werke	Staufen, D
Leica M50 Mikroskop	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar, D
Magnetrührstäbchen	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Mayo Scissors, gebogen, stumpf/stumpf	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
MiniVent Mouse Ventilator Type 845	Hugo Sachs Elektronik	March, D
MX400 Ultrasound Transducer	FUJIFILM, VisualSonics, Inc.	Toronto, Kanada
neoFuge® 8-6K	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, D

Material und Methoden

pH-Messgerät pHenomenal™	VWR International GmbH	Leuven, Belgien
PowerLab 8/35 with Octal Bridge Amp	ADInstruments	Sydney, Australien
pRadnoti 8 Chamber Tissue Organ Bath System	ADInstruments	Sydney, Australien
Präzisionswaage (1200 g / 0.001 g)	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Schere, gerade, spitz/spitz	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
Spark® Multimode Microplate Reader	TECAN	Männedorf, CH
Stainless Steel Beads 5 mm	QIAGEN	Hilden, D
Stereo-Zoom-Mikroskop MSZ5000-T-IL-TL	A. KRÜSS Optronic	Hamburg, D
Student Dumont #7 Inox	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
Surgical Scissors, gerade, spitz/stumpf, 14 cm	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
Temperaturkontrollmodul TKM 1.4	DeMeTec GmbH	Langgöns, D
Thermal cycler CFX Connect RT-PCR System	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Thermal Mixer with Blocks	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg, D
Tiefkühlschrank -86 °C	VWR International GmbH	Darmstadt, D
TissueLyser II	QIAGEN	Hilden, D
Vannas Spring Scissors Federschere, 3 mm Schneide	Fine Science Tools GmbH	Heidelberg, D
Ventilated Cabinet	Techniplast	Hohenpeißenberg, D
VetScan HM5	Abaxis, Inc.	Union City, CA, USA

Vevo 3100 Ultrasound System	FUJIFILM, VisualSonics, Inc.	Toronto, Kanada
Vortex Genie® 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, NY, USA
Vortex-Schüttler, lab dancer	VWR International GmbH	Darmstadt, D
Waage Optimo 2000	Werner Dorsch GmbH	Dieburg, D

Software

Software	Hersteller	Firmensitz
Attune™ NxT Software F4.2.1627.1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
BioRad CFX Maestro	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
CLC Genomics Workbench (v21.0.5)	QIAGEN	Hilden, D
Endnote X9.2 und 20.6	Clarivate Analytics	London, UK
FlowJo™ 10	Becton Dickson GmbH	Heidelberg, D
GraphPad Prism 9.5.0 und 10.4.1	GraphPad Software Inc.	La Jolla, CA, USA
LabChart Pro 8.1.16	ADInstruments	Sydney, Australien
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
PartekFlow	Partek, Inc.	St. Louis, MO, USA
SparkControl V 2.3 (2018)	TECAN	Männedorf, CH
VevoLab 5.6.1	FUJIFILM, VisualSonics, Inc.	Toronto, Kanada

3.1.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle genannten Puffer und Lösungen mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O, Aqua bidest.) angesetzt.

3.1.6.1 Gewebepräparation und Organbad

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS 1x)

Roti®Fair 10x PBS enthält NaCl 1,4 M, KCl 27 mM, Phosphat 0,1 mM

pH-Wert $7,4 \pm 0,05$

Ansatz in 1 L ddH₂O

Zur Gewebepräparation wurde der oben beschriebene Ansatz auf ein Zehntel verdünnt (PBS 1x).

Krebs-Hepes (KH) Puffer

Substanz	Stoffmengenkonzentration [mmol/l]	Massenkonzentration [g/l]
NaCl	98,93	5,782
KCl	4,69	0,35
CaCl ₂	3,29	0,366
MgSO ₄	2,46	0,296
NaHCO ₃	25	2,1
K ₂ HPO ₄	0,8	0,14
Na-HEPES	19,98	5,201
D-Glucose	12,21	2,2

Tabelle 3-3: Zusammensetzung des Krebs-Hepes-Puffers unter Angabe der Stoffmengen- sowie Massenkonzentrationen der einzelnen Stoffe.

V = 1 L

pH = 7,35

T = 4 °C

Organbadpuffer

Substanz	Stoffmengenkonzentration [mmol/l]	Massenkonzentration [g/l]
NaCl	98,93	5,782
KCl	4,69	0,35
CaCl ₂	3,29	0,366
MgSO ₄	2,46	0,296
NaHCO ₃	25	2,1
K ₂ HPO ₄	0,8	0,14

D-Glucose	12,21	2,2
-----------	-------	-----

Tabelle 3-4: Zusammensetzung des Organbadpuffers unter Angabe der Stoffmengen- sowie Massenkonzentrationen der einzelnen Stoffe.

+ 15 ml Indometacin-Lösung:	ddH ₂ O	15	ml
	Indometacin	17,875	mg
	NaOH 1M	5	°

V = 5 L

pH = 7,4

T = 37 °C

Glyceroltrinitratlösung

Nitrolingual® Infusionslösung 1 mg/ml	798	µl
ddH ₂ O	2702	µl

3.1.6.2 Durchflusszytometrie

PBS/FCS 2 % (V/V)

FCS Gold (hitzeinaktiviert)	20	ml
PBS 1x	980	ml

Enzymmix für die enzymatische Verdauung des Myokardgewebes

Collagenase Typ II	1	mg/ml
DNase I	50	µg/ml

je 1 ml pro Probe

Mastermix FACS-Antikörper

Die einzelnen Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungen gemeinsam in PBS/FCS (2 %) angesetzt:

B220	1:800
CD11b	1:200
F4/80	1:400
CD45	1:200
Ly6C	1:800
ViaDye	1:1000

CD90.2	1:200
Ly6G	1:200
Nk1.1	1:200

3.1.6.3 L-012-basierte Chemilumineszenz

Reaktionsansatz

	<u>Volumen pro Versuchstier</u>
PBS + CaCl ₂ (1 mM) + MgCl ₂ (1 mM)	2 ml
L-012	4 µl
Citrat-Vollblut (1:10)	40 µl

ROS-Stimulans

	<u>Volumen pro Versuchstier</u>
Zymosan A (1:2 verdünnt mit PBS)	10 µl
PDBu (1:10 verdünnt mit PBS)	10 µl

Je 200 µl des oben beschriebenen Reaktionsansatzes wurden mit 2 µl verdünnter Zymosan A- bzw. PDBu-Lösung versetzt.

3.1.6.4 RNA-Isolation

Git-Puffer

Substanz	Stoffmengenkonzentration [mol/l]	Massenkonzentration [g/l]
Guanidiniumthiocyanat	4	472,64
Natriumcitrat	0,025	7,352
N-Lauroylsarcosin	0,017	5

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des Git-Puffers unter Angabe der Stoffmengen- sowie Massenkonzentrationen der einzelnen Stoffe.

3.1.6.5 Isolation von Knochenmark

PBS/FCS 2 % (V/V)

FCS Gold (hitzeinaktiviert)	20 ml
PBS 1x	980 ml

3.1.7 Anästhesie

Narkose 100 µl pro 10 g Körpergewicht, i.p.

Wirkstoff	Volumen ad 4500 µl NaCl
Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml	500 µl
Midazolamhydrochlorid 5 mg/ml	1 ml
Fentanyl 0,05 mg/ml	1 ml

Tabelle 3-6: Zusammensetzung der Narkosemedikation

Antisedan 100µl pro 10g Körpergewicht, i.p.

Wirkstoff	Volumen ad 500 µl NaCl
Atipamezolhydrochlorid 5 mg/ml	500 µl
Flumazenil 0,1 mg/ml	5 ml

Tabelle 3-7: Zusammensetzung der Medikation zur Antagonisierung der Narkose

Analgesie

Buprenorphin (0,3 mg/ml): Einzeldosis: 100 µl (unverdünnt)

3.2 Methoden

3.2.1 Rechtliche Voraussetzungen

Alle tierexperimentellen Versuche wurden unter Beachtung des Tierschutzgesetzes (TSchG) und der Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV) durchgeführt und vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz in den Tierversuchsanträgen mit den Nummern G 20-1-051 und G 24-1-008 genehmigt. Die Versuche wurden unter wissenschaftlicher Leitung durch Univ.-Prof. Dr. med. Philip Wenzel durchgeführt und erfolgten unter Anwendung des 3R-Prinzips („Refine, Reduce, Replace“) nach Russell und Burch ⁽²⁶⁷⁾.

Alle Versuchstiere wurden täglich anhand eines standardisierten Punkteschemas hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes begutachtet und bewertet. Genauere Informationen hierzu finden sich in Kapitel 3.2.3.4.

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte entsprechend TSchG §4, §7 und §8 durch Überdosierung eines Narkosemittels (Isofluran inhalativ). Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 3.2.3.7 beschrieben.

Alle an den tierexperimentellen Versuchen beteiligten Labormitarbeiter verfügten über Kenntnisse und Fähigkeiten für tierexperimentelles Arbeiten gemäß der TierSchVersV Anlage 1 (Abschnitt 1 bis 3). Diese entsprechen einer Qualifikation von mindestens FELASA EU Funktion A (ehemals Kategorie B) und beinhalten jährliche Fortbildungen entsprechend TierSchVersV §3.

3.2.2 Tierzucht und Versuchsgruppen

Die Experimente wurden an männlichen Versuchstieren im Alter von 9 bis 14 Wochen durchgeführt. Die Versuchstiere stammen aus eigener Zucht der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. T. B. (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) und gründen sich auf einen genetischen *C57BL/6*-Hintergrund.

Die *C57BL/6* Mäuse sowie die Versuchstiere der GPR65- und GPR132-Experimente wurden ursprünglich von *The Jackson Laboratory* (ME, USA) bezogen. Die Versuchstiere der ICER-Experimente waren ursprünglich ein Geschenk von S. E. (Aging Neuroscience Research Team, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology) und N. K. (Department of Life Sciences, Toyo University) an unsere Kooperationspartner der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. T. B..

C57BL/6: Es handelt sich hierbei um einen der weltweit am häufigsten verwendeten Mausstämme für tierexperimentelle Forschung ⁽²⁶⁸⁾. Der *C57BL/6*-Inzuchtstamm zeichnet sich durch einen stabilen genetischen Hintergrund sowie einfache Zuchtbedingungen aus.

Crem^{fl/fl} Lyz2-Cre: Der Mausstamm weist einen selektiven Knockout des ICER-Gens in myeloiden Zellen auf und entsteht durch Kreuzung von *Lyz2-Cre* Mäusen mit *Crem^{fl/fl}* Mäusen. Hierbei nutzt man das *Cre/loxP*-System ⁽²⁶⁹⁻²⁷¹⁾. Bei *Lyz2-Cre* Versuchstieren unterliegt die Expression der *Cre*-Rekombinase der transkriptionellen Kontrolle des Lysozym 2 Gens (*Lyz2*, Synonym: *LysM*), welches überwiegend von Makrophagen und teilweise auch neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Somit stellt es einen Marker der Makrophagenaktivierung dar ⁽²⁷²⁻²⁷⁴⁾. Bei *Crem^{fl/fl}* Mäusen wird der intrinsische *P2* Promotor des *Crem*-Genlocus, welcher essenziell für die ICER-Expression ist, von *loxP*-Stellen (*locus of crossing-over, P1*) flankiert. *LoxP*-Stellen sind Erkennungssequenzen für die *Cre*-Rekombinase, welche DNA spezifisch an dieser Stelle spaltet und neu verknüpft. Sofern die *loxP*-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert sind, wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz entfernt und

abgebaut ^(269, 271). Durch die Expression der Cre-Rekombinase im gekreuzten Mausstamm (Crem^{fl/fl} Lys2-Cre) kommt es folglich zur Exzision des ICER-Promotors. Somit wird die ICER-Expression selektiv in myeloiden Zellen verhindert. Die Genexpression anderer CREM-Isoformen bleibt davon unbeeinflusst.

B6.129X1-Gpr65tm1Witt/J: Die Mäuse weisen eine homozygote Mutation im Gen *Gpr65* auf. Durch *in vitro* Substitution einer DNA-Sequenz des Exons 2 wird die Expression des Genproduktes verhindert (*targeted mutation; knockout*). Die Elimination des Genproduktes wird mittels RT-PCR von Milz- und Thymuszellen bestätigt. Das an der Stelle des Exons 2 insertierte Gen codiert für grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein, GFP*) und ermöglicht die Detektion von normalerweise GPR65-exprimierenden Zellen. GPR65-Knockout-Mäuse zeichnen sich durch eine gestörte pH-abhängige cAMP-Bildung aus ⁽²³³⁾.

B6.129X1(C)-Gpr132tm1Witt/J: Die Mäuse weisen eine homozygote Mutation im Gen *Gpr132* auf. Der Ersatz von 98 % des Exons 2 durch einen spezifischen Vektor verhindert die Expression des Genproduktes (GPR132, G2A). Dies wird mittels RT-PCR von Prä-B- und Prä-T-Zellen homozygoter Mutationsträger bestätigt. GPR132-Knockout-Mäuse zeigen eine normale B- und T-Zell-Differenzierung im jungen Alter. Mit zunehmendem Alter zeigt sich eine abnorme Vergrößerung lymphatischer Organe mit konsekutiv gesteigerter B- und T-Zell-Bildung. Der Mausstamm findet Verwendung als Modell für late-onset-Autoimmunität ⁽²⁶⁶⁾.

Studie 1

Versuchsgruppe	Tierstamm	Therapiearm
1	C57BL/6	SHAM
2	C57BL/6	LAD

Tabelle 3-8: Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 1 unter Angabe des Tierstamms und des Therapiearms. SHAM = Schein-Operation, LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*.

Studien 2.1 - 2.3

Versuchsgruppe	Tierstamm	Therapiearm
1	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-}	SHAM
2	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-}	LAD
3	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}	SHAM

4	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}	LAD
---	--	-----

Tabelle 3-9: Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 2.1 – 2.3 unter Angabe des Tierstamms und des Therapiearms. In Studie 2.3 wurden nur die Versuchsgruppen 2 und 4 untersucht. SHAM = Schein-Operation, LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*.

Studie 2.4

Versuchsgruppe	Tierstamm	Therapiearm
1	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-}	NaCl-I + LAD
2	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}	NaCl-I + LAD
3	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{+/-}	BM-Transfer + LAD

Tabelle 3-10: Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 2.4 unter Angabe des Tierstamms und des Therapiearms. NaCl-I = NaCl-Injektion, LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*, BM = Knochenmark (*bone marrow*): Monozyten-Transfer.

Studie 3

Versuchsgruppe	Tierstamm	Therapiearm
1	GPR65 ^{wt/wt}	SHAM
2	GPR65 ^{wt/wt}	LAD
3	GPR65 ^{-/-}	SHAM
4	GPR65 ^{-/-}	LAD

Tabelle 3-11: Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 3 unter Angabe des Tierstamms und des Therapiearms. SHAM = Schein-Operation, LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*.

Studie 4

Versuchsgruppe	Tierstamm	Therapiearm
1	GPR132 ^{wt/wt}	SHAM
2	GPR132 ^{wt/wt}	LAD
3	GPR132 ^{-/-}	SHAM
4	GPR132 ^{-/-}	LAD

Tabelle 3-12: Übersicht über die Versuchsgruppen der Studie 4 unter Angabe des Tierstamms und des Therapiearms. SHAM = Schein-Operation, LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*.

3.2.3 Tierexperimentelle Methoden

3.2.3.1 Versuchsprotokolle

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors ICER sowie pH-abhängiger Signalwege nach einem akuten Myokardinfarkt zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse unterschiedlicher Genotypen untersucht.

Zu Beginn der Studien stand die Operation der Versuchstiere. Hierbei erfolgte bei den Tieren der Experimentalgruppe die operative Induktion eines Myokardinfarkts durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA; LAD: *left anterior descending artery*). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden einer SHAM-Operation unterzogen. Die genaue Durchführung der operativen Prozeduren ist in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben.

Postoperativ wurden die Auswirkungen der Operation auf die kardiovaskuläre Funktion zu definierten Zeitpunkten genauer untersucht (siehe Abbildung 3-1). Dies umfasste die Quantifizierung der linksventrikulären Funktion mittels Echokardiografie sowie die Analyse der Gefäßfunktion anhand isometrischer Tonusstudien. Zudem wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Blut gemessen und die Immunzellinfiltration des Herzens mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Zur Analyse der Prozesse auf zellulärer Ebene wurde die Expression verschiedener Zielgene mittels Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Einzelzellanalyse kardialer Monozyten bzw. Makrophagen durch RNA-Sequenzierung. Ferner wurden Blutdruck und die Parameter eines großen Blutbildes erhoben.

In Studie 2.4 wurden den ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Versuchstieren unmittelbar vor der initialen Operation Monozyten von Tieren der Wildtypgruppe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) via Schwanzveneninjektion transferiert. In der Kontrollgruppe erfolgte die Injektion einer NaCl-Lösung.

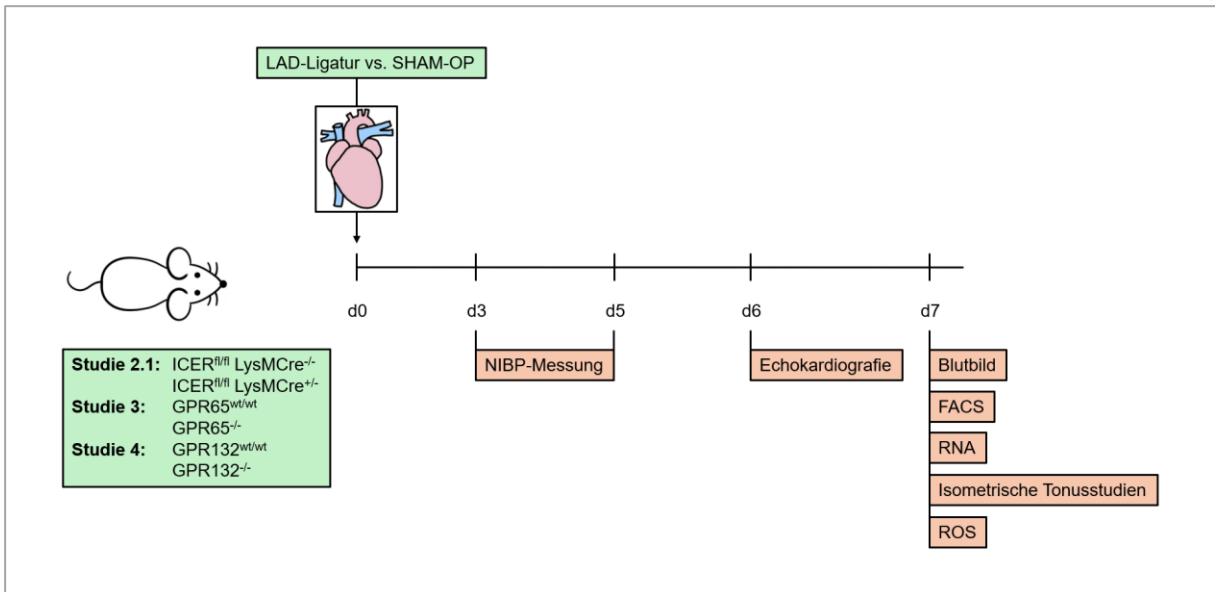
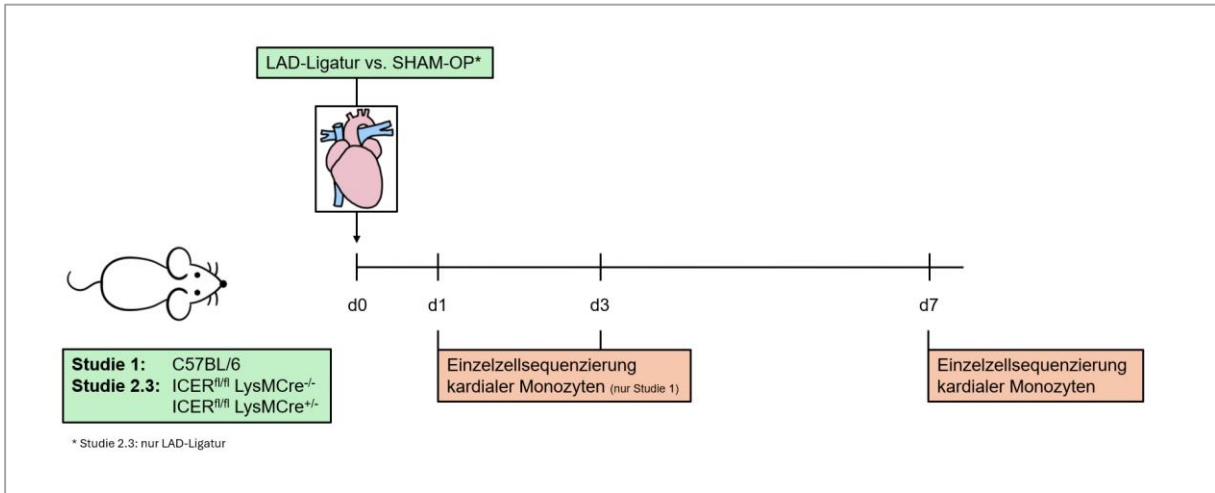
Tiere einer Versuchsgruppe wurden, sofern möglich, in gemeinsamen Käfigen gehalten. Der genaue zeitliche Ablauf der Experimente ist Abbildung 3-1 dargestellt.

Studie 1	C57BL6 (SHAM vs. MI): scRNA-Seq (d1, d3, d7)
Studie 2.1	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} vs. +/- (SHAM vs. MI, 7d)
Studie 2.2	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} vs. +/- (SHAM vs. MI, 28d)
Studie 2.3	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} vs. +/- (MI): scRNA-Seq (d7)
Studie 2.4	ICER ^{fl/fl} LysMCre ^{-/-} vs. +/- (MI, 7d): Monozyten-Transfer (d0)
Studie 3	GPR65 ^{wt/wt} vs. -/- (SHAM vs. MI, 7d)

Studie 4

GPR132^{wt/wt} vs. ^{-/-} (SHAM vs. MI, 7d)

Tabelle 3-13: Überblick über die durchgeführten Studien unter Angabe der Tierstämme, der Therapiearme und der Versuchsdauer. SHAM = Schein-Operation, MI = Myokardinfarkt (durch Ligatur der *left anterior descending artery*), scRNA-Seq = Einzelzell-RNA-Sequenzierung (*single-cell RNA-sequencing*), d = Tag.



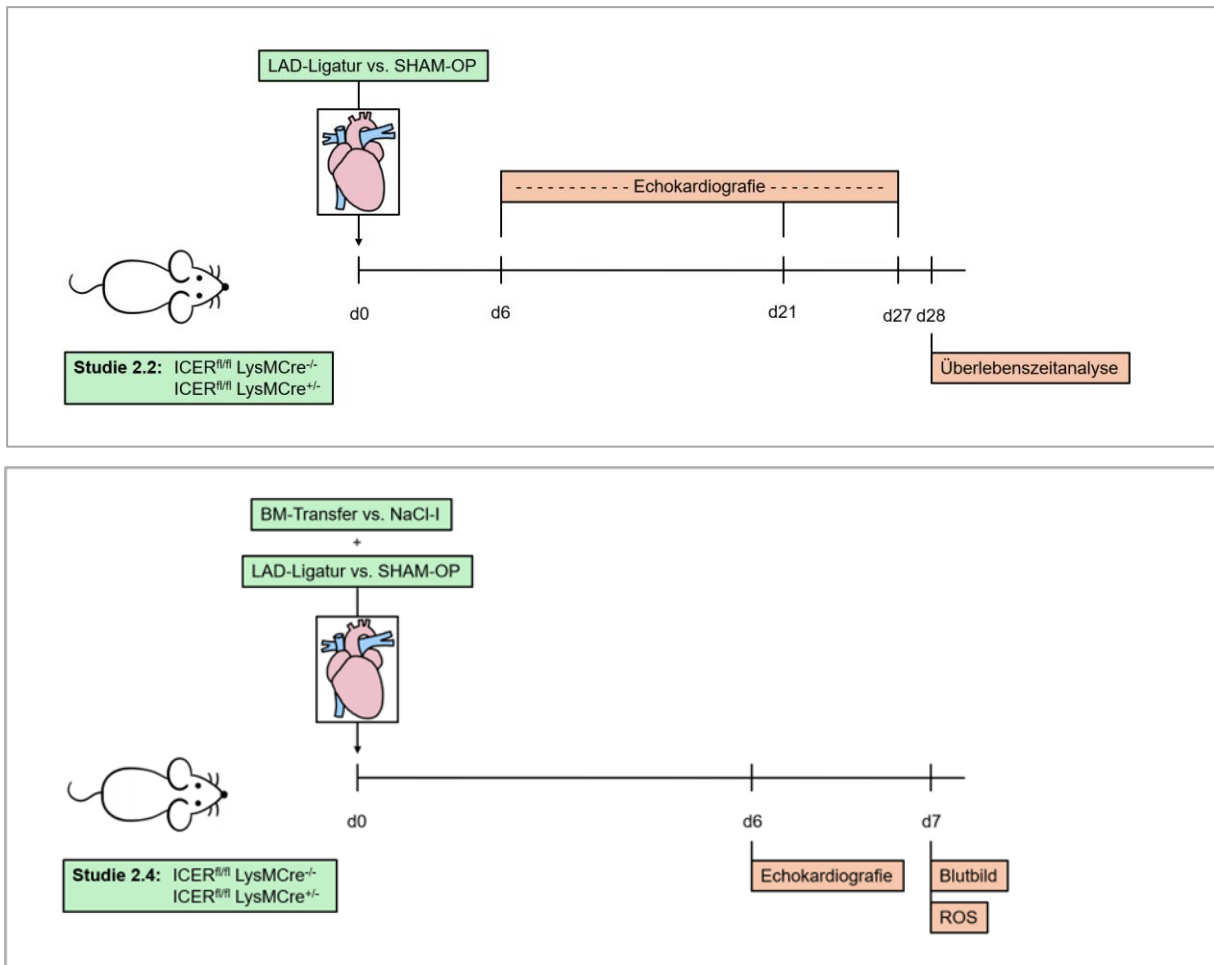


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle der einzelnen Studien. LAD = Ligatur der *left anterior descending artery*, SHAM = Schein-Operation, d = Tag, NIBP = *non-invasive blood pressure*, FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*, ROS = *reactive oxygen species*, BM = Knochenmark (*bone marrow*): Monozyten-Transfer, NaCl-I = NaCl-Injektion.

3.2.3.2 Präoperatives Management, Anästhesie und Intubation

Die Dosierung der Narkosemedikamente erfolgte gewichtsadaptiert. Hierfür wurden die Versuchstiere unmittelbar vor Einleitung der Narkose gewogen und das Gewicht dokumentiert. Die Dosierung der Narkosemittel wurde so gewählt, dass nach spätestens fünf Minuten eine ausreichende Narkosetiefe über einen Zeitraum von 50 bis 60 Minuten gewährleistet war. Nach intraperitonealer (i.p.) Injektion der Narkosemedikamente wurde die Maus in einen leeren Käfig gesetzt, in welchem sie die Zeit bis zum Anschlagen der Narkose ungestört verbrachte.

Um Augenschäden durch Austrocknung zu verhindern, wurde für die Dauer der Narkose Bepanthen-Augensalbe auf die geöffneten Augen der Mäuse aufgetragen.

Die Sicherstellung einer adäquaten Narkosetiefe erfolgte anhand der Beurteilung des Zwischenzehenreflexes ^(275, 276). Hierbei wurde mit einer stumpfen Pinzette ein Reiz zwischen den Zehengliedern der Hinterläufe gesetzt. Zeigte die Maus hierauf noch eine Reaktion im Sinne einer reflektorischen Beugereaktion der Hinterläufe, erfolgte eine erneute Prüfung des Reflexes nach zwei Minuten. Bei weiterhin bestehendem Zwischenzehenreflex wurde die Injektion von Narkosemittel mit 30 % der ursprünglichen Dosis wiederholt. Erst bei einem vollständigen Ausfall des Reflexes wurde mit dem weiteren Prozedere fortgefahren. Der intraoperative Wärmeerhalt wurde durch Fixieren der Maus auf einer Wärmeplatte mit konstanter Temperatur von 37 °C gewährleistet.

Vor Operationsbeginn wurde das Operationsfeld mithilfe eines elektrischen Rasierers sowie Enthaarungscreme von Haaren befreit und anschließend mit Hautdesinfektionsmittel gereinigt. Die Maus wurde auf der Wärmeplatte in Rückenlage gebracht und mit jeweils einem Stück Fixierpflaster an den vier Extremitäten sowie am Schwanz auf der Platte fixiert ⁽²⁷⁷⁾. Zur Erleichterung der Intubation wurden die Schneidezähne des Oberkiefers mit Zahnseide umschlungen und mit leichtem Zug nach kranial an der Platte fixiert ⁽²⁷⁸⁾. Für die Dauer der Intubation wurde die Wärmeplatte in 30 ° Kopfhochlage gebracht und eine flexible Kaltlichtleuchte von außen auf den Halsbereich der Maus gerichtet. Dies ermöglichte die Differenzierung von Ösophagus und Trachea. Weiterhin wurde die Zunge mit einer atraumatischen Pinzette mobilisiert und seitlich fixiert. Zum Erzielen einer optimalen Sicht auf die Stimmbandebene wurde der Unterkiefer mit einer als Laryngoskop dienenden Büroklammer leicht angehoben. Hierbei stellte sich die Glottis als helles, sich im Atemrhythmus regelmäßig öffnendes und schließendes Dreieck ventral des Ösophagus dar. Bei guter Sicht erfolgte nun die Intubation mit einer Venenverweilkanüle der Größe 22 G. Die in die Kunststoffkanüle zurückgezogene Nadel diente als Führungsstab und wurde nach vorsichtiger Passage der Stimmbänder vollständig entfernt. Anschließend wurde der Kunststoffaufsatz der Venenverweilkanüle mit einer Schere abgetrennt und die Kanüle mit dem Beatmungsgerät (MiniVent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik) konnektiert. Die Beatmung erfolgte mit einem Luftgemisch aus Raumluft und Sauerstoff (70-80 ml/min) bei einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Beatmungsfrequenz von 150/min ⁽²⁷⁷⁾. Während des gesamten Intubationsprozesses wurde mit höchster Vorsicht vorgegangen, um Verletzungen und reaktive Schwellungen im Rachen- und

Kehlkopfbereich zu verhindern. Bei fehlgeschlagener Intubation wurden maximal zwei weitere Intubationsversuche geduldet. Analog zur Beatmungsfrequenz erfolgende Thoraxexkursionen dienten als Indikator für eine erfolgreiche Intubation und Beatmung (277). Zur Gewährleistung einer adäquaten Narkosetiefe wurden dem Beatmungsgas für die Dauer der Operation zusätzlich 1,5 - 2,5 % Isofluran beigefügt.

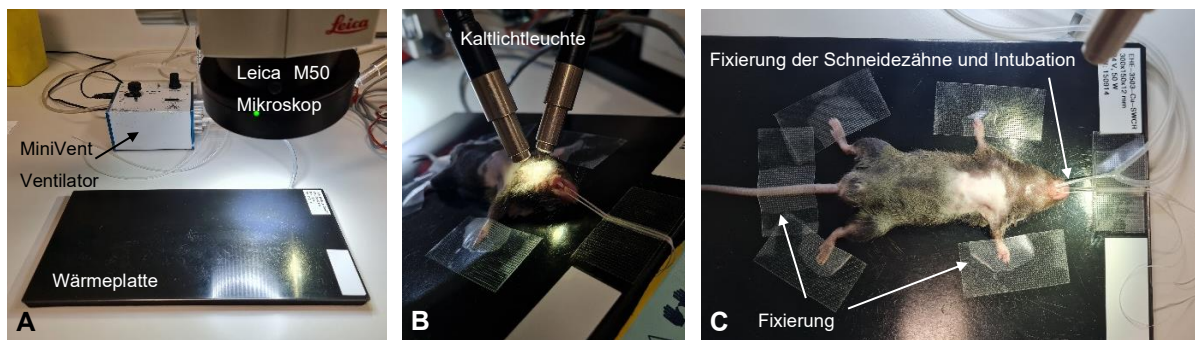


Abbildung 3-2: Rahmenbedingungen der Operation. **A:** Die Wärmeplatte wird unter dem Operationsmikroskop positioniert. Über das Ventilationsgerät MiniVent der Firma Hugo Sachs Elektronik wird die Beatmung gesteuert. **B:** Für die Intubation wird die auf der Wärmeplatte fixierte Maus in 30 ° Kopfhochlage gebracht und der Kehlkopf von außen mit einer Kaltlichtleuchte beleuchtet. **C:** Positionierung des narkotisierten Versuchstiers nach erfolgreicher Intubation.

3.2.3.3 Myokardinfarktinduktion durch permanente Ligatur der LAD

Die operative Induktion des Myokardinfarktes wurde nach einem modifizierten und standardisierten Protokoll von Tarnavski durchgeführt (279).

Unter mikroskopischer Sicht erfolgte zunächst ein 8-10 mm langer Hautschnitt auf Höhe des dritten bis vierten Interkostalraumes entlang des Rippenverlaufes von der linken vorderen Axillarlinie bis parasternal. Nach stumpfer Ablösung der Haut vom Unterhautfettgewebe wurden der große und der kleine Brustmuskel (Mm. pectoralis major et minor) stellenweise durchtrennt, sodass die Sicht auf die Rippen frei wurde. Die Eröffnung des Thorax erfolgte zwischen vierter und fünfter Rippe unter Schonung der umliegenden Gefäße sowie des Herzens und der Lunge. Durch jeweiliges Umschlingen der oberen und unteren Rippe mit einem Prolene-Faden der Stärke 6-0 wurde der Interkostalraum auf eine Größe von 6-8 mm gespreizt. Die Fäden wurden hierfür am Tisch fixiert. Es folgte die stumpfe Eröffnung des Herzbeutels. Bei Sicht auf das linke Herzohr und den linken Ventrikel wurde anschließend unter mikroskopischer Vergrößerung die LAD aufgesucht und mit einem Prolene-Faden der Stärke 8-0 etwa

1,5 mm unterhalb des linken Herzohres umschlungen und durch anschließendes Knoten mechanisch ligiert. Eine erfolgreiche Ligatur der LAD zeigte sich durch unmittelbares Abblassen des distal liegenden Myokards (insbesondere der Herzspitze) sowie eventuell auftretende Wandbewegungs- und Herzrhythmusstörungen. Nach erfolgreicher Ligatur der LAD wurden die Fäden zur Rippenspreizung entfernt und ein mehrschichtiger Wundverschluss mit einem Prolene-Faden der Stärke 6-0 durchgeführt. Hierfür wurde zunächst der Thorax durch Naht der Interkostalmuskulatur verschlossen, es folgte die Naht der Brustmuskeln und schließlich die Hautnaht mit anschließender Desinfektion des Operationsfeldes. Die Mäuse der Kontrollgruppe (SHAM-OP) wurden mit Ausnahme der LAD-Ligatur dem gleichen Protokoll unterzogen; somit erfolgte nach Eröffnen des Perikards ohne weitere Manipulation bereits der Wundverschluss.

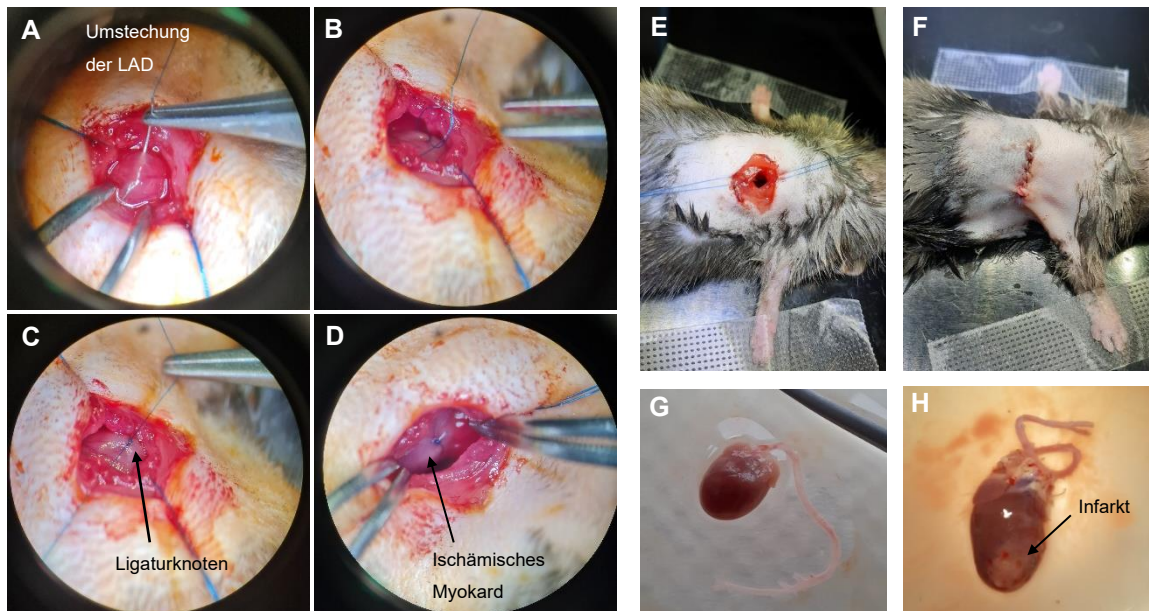


Abbildung 3-3: Operative Ligatur der LAD: A-D: Mikroskopische Sicht auf den linken Ventrikel nach Eröffnung der Thoraxwand. Nach dem Aufsuchen und der Umstechung der *left anterior descending artery* (LAD) erfolgt die mechanische Ligatur durch mehrere Knoten. Eine erfolgreiche Ligatur der LAD zeigt sich durch unmittelbares Abblassen des distal liegenden Myokards (D). E und F: Sicht auf das enthaarte und desinfizierte OP-Gebiet bei eröffnetem Thorax bzw. nach mehrschichtigem Thoraxwandverschluss und fortlaufender Hautnaht. G: Herz und Aorta eines SHAM-operierten Versuchstiers. H: Post mortem ist das Infarktareal am siebten Tag nach LAD-Ligatur gut abgrenzbar.

3.2.3.4 Postoperatives Prozedere

Unmittelbar nach Hautverschluss erfolgte die intraperitoneale Injektion eines Analgetikums (Buprenorphin, genaue Dosierung siehe Kapitel 3.1.7) sowie eines aus Atipamezol und Flumazenil zusammengesetzten Antidot-Gemisches (siehe Abschnitt 3.1.7). Bei suffizienter Spontanatmung und wiederkehrendem kräftigen Zwischenzehenreflex wurden die Tiere extubiert und in einen frischen Käfig gesetzt. Zur Vermeidung einer postoperativen Hypothermie wurde der Käfig durch eine Wärmeplatte sowie Bestrahlung mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Innerhalb von 30 bis 90 Minuten zeigten die Mäuse in der Regel ein normales Bewegungs- und Ernährungsverhalten. Die Mäuse wurden anschließend im *ventilated cabinet* unserer *Animal Facility* gehalten. Hierbei wurden die Tiere der Versuchsgruppe (LAD-Ligatur) und der Kontrollgruppe (SHAM-OP) in separaten Käfigen untergebracht.

Die Evaluation des Allgemeinzustandes der operierten Mäuse wurde im Anschluss täglich nach einem standardisierten Punkteschema (Belastungsscore) durchgeführt und dokumentiert. Die im Score beurteilten Belastungskriterien orientieren sich an den Empfehlungen des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte der GV-SOLAS (*Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science*)⁽²⁸⁰⁾.

Am ersten postoperativen Tag erfolgte bei den LAD-operierten Tieren regelhaft eine erneute Analgetikagabe (Buprenorphin i.p.). An den folgenden Tagen sowie bei den SHAM-operierten Mäusen wurde eine bedarfsgerechte Analgesie je nach erreichtem Punktwert im Belastungsscore durchgeführt. Bei Überschreiten eines vorab festgelegten Wertes im Belastungsscore wurden die Tiere vorzeitig aus dem Experiment genommen und getötet.

3.2.3.5 Echokardiografie

Zur Objektivierung der kardialen Funktion und Detektion morphologischer Veränderungen wurde am sechsten postoperativen Tag eine transthorakale Echokardiografie durchgeführt. Hierzu wurde ein Kleintierultraschallgerät der Firma Visual-Sonics (Vevo 3100 Ultrasound System) mit einem 20-46 MHz Schallkopf (MX400, Fujifilm, Kanada) verwendet.

Die Untersuchung erfolgte in Isofluran-Inhalationsnarkose. Zur Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere einzeln in eine Narkosekammer gesetzt, welche mit einem Gemisch aus Sauerstoff und 2,5 % Isofluran begast wurde. Die Aufrechterhaltung der

Narkose erfolgte durch Applikation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemischs mit 1,0 - 1,5 % Isofluran über einen die Schnauze bedeckenden Trichter.

Zum Schutz der in Narkose geöffneten Augen wurde Augensalbe aufgetragen. Die Maus wurde in Rückenlage mit jeweils einem Stück Fixierpflaster an den vier Extremitäten sowie am Schwanz auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert. Zum Temperaturmanagement erfolgte außerdem die Bestrahlung mittels Rotlichtlampe sowie die kontinuierliche Temperaturmessung über eine rektale Sonde.

Die Ableitung eines Elektrokardiogramms erfolgte über in die Platte integrierte Elektroden. Der Kontakt wurde mittels Elektrodengel an den Extremitäten hergestellt. Zur Optimierung der Untersuchungsbedingungen wurde der Thorax mit Enthaarungscreme enthaart und anschließend Ultraschallgel aufgetragen. Unter kontinuierlichem Monitoring von Herz-, Atemfrequenz und Körpertemperatur erfolgte anschließend die Akquirierung der Ultraschallaufnahmen.

Hierbei wurden zwei verschiedene Achsen jeweils im B-Mode (*Brightness-Mode*) sowie im M-Mode (*Motion-Mode*) untersucht. Dabei wurden die M-Mode-Aufnahmen jeweils aus den B-Mode-Aufnahmen konstruiert.

Zunächst erfolgte die Einstellung der parasternalen langen Achse (PLAX, siehe Abbildung 3-4). Diese bildet den linken Vorhof, den linken Ventrikel, die Herzspitze sowie die Aortenwurzel ab. In dieser Darstellung ist eine Beurteilung der Kontraktilität sowie der Myokarddicke der anterioren und posterioren Wand des linken Ventrikels gut möglich.

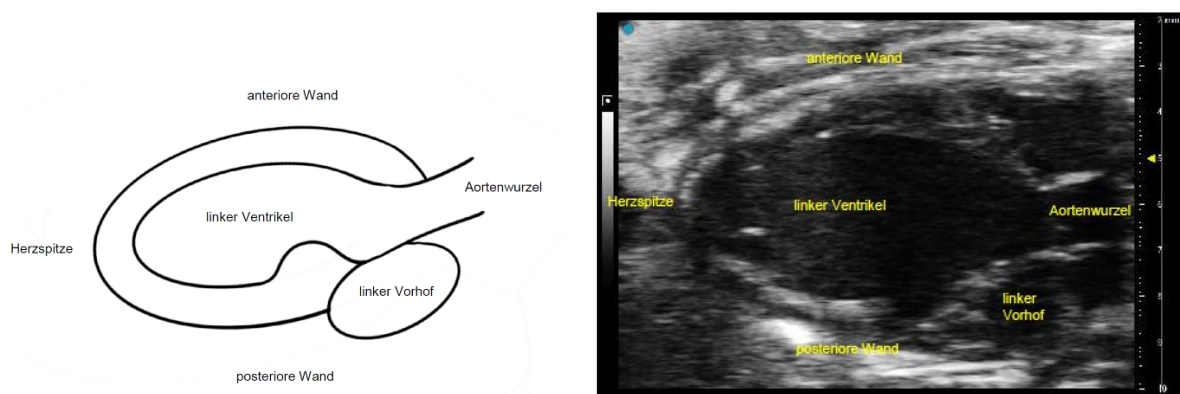


Abbildung 3-4: Echokardiografie: Parasternale lange Achse, B-Mode. Links: Schematische Darstellung der Strukturen in der parasternalen langen Achse. Rechts: Ultraschallaufnahme im physiologischen Zustand, PLAX, B-Mode.

In der parasternalen kurzen Achse (PSAX, siehe Abbildung 3-5) lassen sich der linke Ventrikel, der rechte Ventrikel und das interventrikuläre Septum darstellen. Es wurde eine standardisierte Schnittebene gewählt, in der sich die linksventrikulären Papillarmuskeln auf 2 und 4 Uhr einer imaginären Uhr projizieren. Diese Darstellung ist ebenfalls zur Beurteilung der Kontraktilität der Ventrikel geeignet.

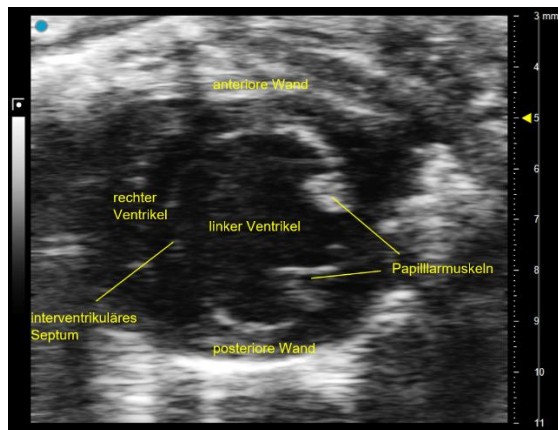
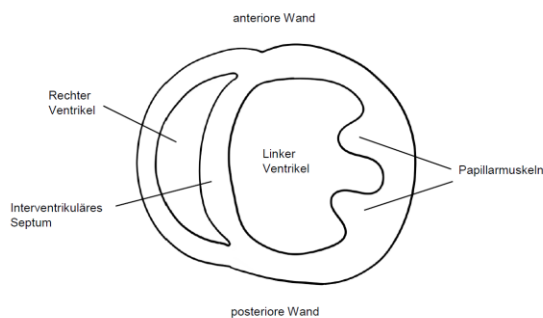


Abbildung 3-5: Echokardiografie: Parasternale kurze Achse, B-Mode. Links: Schematische Darstellung der Strukturen in der parasternalen kurzen Achse. Rechts: Ultraschallaufnahme im physiologischen Zustand, PSAX, B-Mode.

Im M-Mode wurde die systolische und diastolische Dicke der anterioren und posterioren Herzwand bestimmt und der endsystolische sowie enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels gemessen. Hierfür wurden jeweils 3 Herzzyklen analysiert und das Ergebnis als Mittelwert dieser Messungen dargestellt.

In der PLAX wurde auf eine streng horizontale Orientierung des linken Ventrikels im B-Bild geachtet, um eine Überschätzung der LV-Funktion durch schräge Anlotung zu vermeiden. Die M-Mode-Achse wurde papillarmuskelnah an die Stelle des größten anterior-posterioren Durchmessers gelegt.

In der PSAX wurde die M-Mode-Achse auf mittlerer Höhe des linken Ventrikels unmittelbar medial der Papillarmuskeln gelegt.

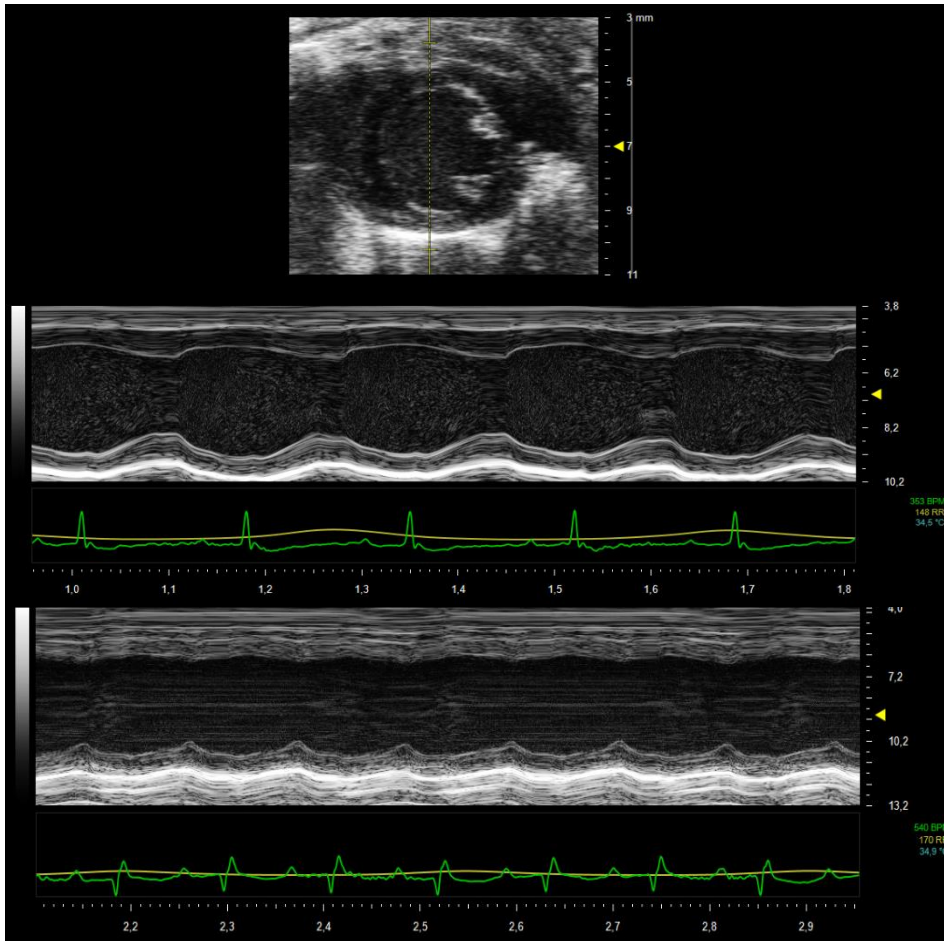


Abbildung 3-6: Echokardiografie M-Mode. Oben: Exemplarisches Ultraschallbild in der PSAX, B-Mode. Die gestrichelte gelbe Linie entspricht der Achse für die Erstellung des M-Modes. Mitte + unten: Exemplarische Darstellung des M-Modes aus der parasternalen kurzen Achse eines SHAM-operierten Kontrolltieres (Mitte) und eines Versuchstieres nach LAD-Ligatur (unten) im Vevo Imaging System.

An den gewonnenen Ultraschallbildern wurden anschließend direkte und indirekte Messungen vorgenommen. Zur Untersuchung der linksventrikulären systolischen Funktion erfolgte die Berechnung der Ejektionsfraktion (EF, in %) und des Fractional Shortenings (FS, in %). Hierzu wurden die folgenden, international verbreiteten Formeln aus der Formelsammlung der Ultraschallsoftware (Vevo Imaging Systems, Operator Manual ⁽²⁸¹⁾) verwendet:

$$EF [\%] = 100 * ((LVvol_d - LVvol_s) / LVvol_d)$$

$$FS [\%] = 100 * ((LVID_d - LVID_s) / LVID_d)$$

LVvol_d = linksventrikuläres diastolisches Volumen, LVvol_s = linksventrikuläres systolisches Volumen, LVID_d = diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser, LVID_s = systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser.

Weitere Parameter, die sich aus den Messungen direkt oder indirekt ableiten lassen, sind Wanddicke, linksventrikulärer Innendurchmesser (LVID), linksventrikuläres Volumen (LV-Volumen), linksventrikuläre Masse (LV-Masse), Schlagvolumen (SV) sowie Herzzeitvolumen (CO). Die Referenzwerte werden in der Literatur wie folgt angegeben, jedoch mit Hinweis auf erhebliche Variabilität ⁽²⁸¹⁾:

EF [%]:	55-86
FS [%]:	30-50
LV-Masse [mg]:	65-90
SV [μ l]:	40-70
CO [ml/min]:	20-35

3.2.3.6 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Die nicht-invasive Blutdruckmessung erfolgte zu vorab definierten Zeitpunkten (Tag 0, Tag 3, Tag 5) und zur jeweils gleichen Tageszeit, um Abweichungen durch zirkadiane Schwankungen des Blutdrucks zu minimieren. Es wurde das *CODA™ Non-Invasive Blood Pressure System* (Kent Scientific, CT, USA) verwendet, welches eine nicht-invasive Blutdruckmessung nach der *Volume Pressure Recording*-Methode (VPR-Methode) durchführt.

Hierfür wurden die Versuchstiere in Restrainern fixiert und anschließend zwei Blutdruckmanschetten auf den Schwanz aufgefädelt. Um möglichst stressfreie Bedingungen für das Versuchstier zu schaffen, wurden die Restrainer auf einer Wärmeplatte (35 - 38 °C) platziert und anschließend mit einer Wärmedecke abgedeckt. Zusätzlich wurde das Raumlicht ausgeschaltet. Laute Geräusche wurden während der gesamten Versuchsdauer vermieden. Zudem wurde vor Beginn der Messungen eine Adaptationszeit im Restrainer von mindestens fünf Minuten eingehalten und anschließend die Körpertemperatur an der Schwanzbasis mit einem Infrarotthermometer bestimmt. Bei ruhigem Verhalten der Versuchstiere und einer gemessenen Schwanztemperatur von über 32 °C wurde mit den Messungen begonnen.

Bei der VPR-Methode werden neben systolischem und diastolischem Blutdruck auch der arterielle Mitteldruck sowie Herzfrequenz, Blutvolumen und -fluss im Schwanz bestimmt. Dazu wird zunächst der *Occlusion Cuff* oberhalb des systolischen Blutdrucks aufgepumpt und somit der Blutfluss im Schwanz unterbunden. Während

der langsamen Deflation des *Occlusion Cuffs* wird der wiederkehrende Blutfluss über eine Detektion der Blutvolumenveränderung im Schwanz durch einen Sensor in der zweiten Manschette gemessen. Der Cuffdruck bei Beginn der Volumenzunahme entspricht dem systolischen Blutdruck, der Cuffdruck am Ende der Volumenzunahme ist dem diastolischen Blutdruck gleichzusetzen ⁽²⁸²⁾.

Insgesamt wurden pro Versuchstier jeweils 15 aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt und der Mittelwert dieser Messwerte berechnet. Bei einer Standardabweichung über 30 mmHg oder bei nicht verwertbaren Messungen (z.B. durch Bewegungsartefakte) wurde die Messung maximal zweimal wiederholt.

3.2.3.7 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden durch Inhalation des Narkosegases Isofluran in eine tiefe Narkose versetzt ^(283, 284). Bis zum Eintritt des Todes wurde diese konstant aufrechterhalten. Hierzu wurde ein Falcon mit einem in Isofluran getränkten Tupfer über den Kopf der Maus geführt.

Zunächst erfolgte die Befeuchtung des abdominellen und thorakalen Fells mit 80%iger Ethanollösung. Vor dem ersten Hautschnitt wurde die Narkosetiefe anhand des Ausfalls des Zwischenzehenreflexes überprüft (siehe auch Kapitel 3.2.3.2). Unter Schonung der Bauchorgane wurde das Abdomen mit einer spitzen Schere bis zur unteren Thoraxapertur eröffnet und der Schnitt anschließend entlang der untersten Rippe zu beiden Seiten erweitert. Vorsichtiges Abtrennen des Zwerchfells vom Thorax unter ventralem Zug am Xiphoid eröffnete die Thoraxhöhle von abdominal. Durch Punktion des noch schlagenden rechten Ventrikels und anschließende Entnahme der maximal möglichen Blutmenge wurde der Tod des Tieres durch Ausbluten herbeigeführt. Hierbei konnten zwischen 700 und 1100 µl Blut gewonnen werden, welches zur Gerinnungshemmung unmittelbar im Verhältnis 10:1 mit Natriumcitrat versetzt wurde. Für die Organentnahme wurde im Folgenden der Thorax durch laterale Durchtrennung der Rippen vollständig eröffnet. Durch Absetzen der beiden Lungenflügel wurde die Sicht auf den thorakalen Teil der Aorta optimiert. Die Bauchorgane wurden zu einer Seite mobilisiert. Hierbei wurde die Milz entnommen und in Krebs-Hepes-Puffer (KH-Puffer, Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.6.1) auf Eis gekühlt zwischengelagert. Magen und Dünndarmkonvolut wurden am Mesenterium abgetrennt und ein Teil der Leber zur besseren Sicht auf die Aorta ebenfalls mobilisiert. Es folgte die hilusnahe Abtrennung der Nieren, welche ebenfalls

in eiskühlem KH-Puffer gelagert wurden. Bei vollständiger Sicht auf die Aorta wurde diese mithilfe einer Rundschere von kaudal nach kranial aus dem periaortalen Fettgewebe herausgelöst, wobei jeglicher Zug am Gefäß vermieden wurde ⁽²⁸⁴⁾. Die Entnahme der Aorta erfolgte gemeinsam mit dem Herzen, welches im Anschluss abgesetzt wurde. Aorta und Herz wurden bis zur weiteren Verwendung ebenfalls in eiskaltem KH-Puffer zwischengelagert. Aus dem Herzen wurde das infarzierte Myokard herausgeschnitten und entweder unmittelbar für die durchflusszytometrische Analyse verwendet oder für spätere Untersuchungen eingefroren (siehe unten). Bei den SHAM-operierten Mäusen wurde ein entsprechender Teil des intakten Myokards verwendet. Die Aorten wurden vor der weiteren Verwendung in einer mit KH-Puffer gefüllten Petrischale auf Eis feinpräpariert. Hierbei wurde mithilfe einer feinchirurgischen Pinzette und einer Federschere unter mikroskopischer Sicht das periaortale Fettgewebe sowie die Adventitia unter absoluter Schonung des Gefäßes abpräpariert ⁽²⁸⁴⁾. Anschließend erfolgte die vorsichtige Spülung des Lumens mit einer KH-Puffer-gefüllten 1 ml-Spritze über eine 21 G Kanüle bis sich die Aorta vollständig blutleer darstellte. Je nach weiterer Verwendung wurde der thorakale Teil der Aorta mithilfe eines Rundkopfskalpells atraumatisch vom abdominalen Teil getrennt. Der thorakale Teil wurde in der Regel für die vaskuläre Relaxationsuntersuchung verwendet, während der abdominalen Teil zur späteren Verwendung eingefroren wurde.

Bei Verwendung für RNA-Expressionsanalysen wurden die entnommenen Organe auf einem Filterpapier passiv getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für die Knochenmarksisolation wurden die Beine der Versuchstiere so proximal wie möglich vom restlichen Körper abgetrennt, um die Integrität der Knochen zu wahren. In einer mit PBS-Puffer gefüllten Petrischale wurden Haut und Muskeln sorgfältig von den Knochen abpräpariert und diese im Anschluss mit 70%iger Ethanollösung gereinigt. Die Knochen wurden daraufhin auf Höhe des Kniegelenks durchtrennt und mit der durchtrennten Seite nach untenweisend in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß verbracht, in dessen Boden zuvor mit einer 26 G Kanüle eine kleine Öffnung gestochen worden war. Das 0,5 ml Eppendorfgefäß wurde anschließend in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß platziert und zur Gewinnung des Knochenmarks zentrifugiert (15 s, 10.000 G, 4 °C). Das Knochenmark wird durch die Zentrifugation aus dem Knochen

freigesetzt und setzt sich im 1,5 ml Falcon ab. Die nachfolgenden Schritte der Monozytenisolation sind in Kapitel 3.2.5 detailliert beschrieben.

3.2.3.8 Isometrische Tonusstudien zur Analyse der Gefäßfunktion

Bei der Organbadmethode werden isometrische Spannungsmessungen an isolierten Aortenringen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Durch Auswertung des Ansprechens auf vasoaktive Substanzen lassen sich Rückschlüsse auf die Intaktheit des vasokonstriktiven und vasodilatativen Apparates des untersuchten Gefäßes ziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige und -unabhängige Relaxationsfähigkeit von Aortensegmenten durch Hinzugabe von Acetylcholin (ACh) bzw. Nitroglycerin (NTG) untersucht.

Bei intaktem Endothel stimuliert ACh muskarinerge M₃-Rezeptoren. Dies führt über die Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutivem intrazellulärem Calciumanstieg zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und folglich zur Bildung des Vasodilatators NO ^(285, 286). In glatten Muskelzellen der Gefäßmedia führt die Stimulation muskarinergere Rezeptoren dagegen zur Vasokonstriktion, sodass es bei geschädigtem Endothel zur sogenannten paradoxen Vasokonstriktion kommt ^(287, 288). Eine unzureichende Relaxation nach ACh-Stimulation wird somit als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion gewertet.

Hingegen führt NTG über die direkte Freisetzung von NO zur Vasodilatation. So wird die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit des Gefäßes geprüft. Sofern die Media des untersuchten Gefäßes intakt ist, ist auch bei geschädigtem Endothel eine Relaxation nachweisbar.

Die Aorten wurden wie in Kapitel 3.2.3.7 beschrieben entnommen und präpariert. Anschließend wurden 3 - 5 mm lange Aortenringe aus der Aorta thoracica zwischen zwei trianguläre Drahtbügel eingespannt. Der untere Draht wurde an einem feststehenden Glashaken fixiert, während der obere mit einem isometrischen Kraftaufnehmer (*Transducer*) verbunden wurde. Hierüber erfolgten die Ableitung, Verstärkung und Weiterleitung der erhobenen Kraftänderungen an den angeschlossenen Computer. Durch die Software LabChart Pro (ADInstruments, Sydney, Australien) wurden die Signale digitalisiert und als absolute Messwerte sowie in Form einer Kurve visualisiert.

Die beschriebene Konstruktion wurde freihängend in einer doppelwandigen Glaskammer fixiert und von 25 ml Organbadpuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.6.1) umspült. Um ein Milieu wie im lebenden Organismus zu simulieren, wurde der Puffer mit einem Carbogen-Gasgemisch (95 % O₂, 5 % CO₂) begast und auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Dazu wurde die Wandung der Glaskammer mithilfe einer Pumpe und einem Heizdraht kontinuierlich mit 37 °C warmem Wasser umspült. Zur Hemmung der endogenen Prostaglandinsynthese enthielt der Organbadpuffer den unselektiven Cyclooxygenase-Hemmer Indometacin.

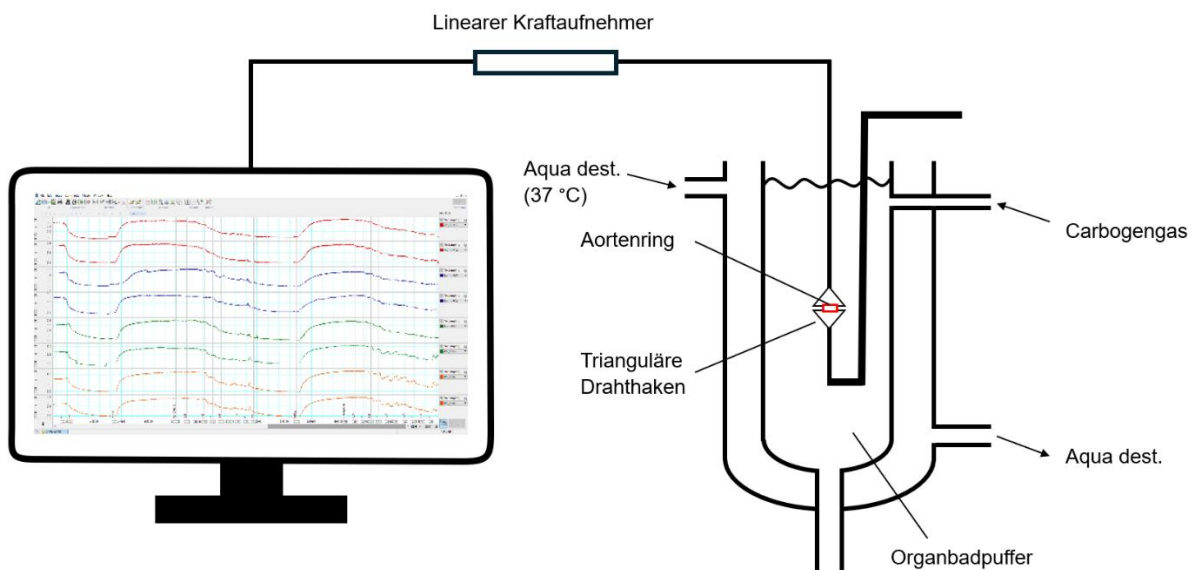


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der Organbadkonstruktion. Aortenring, eingespannt zwischen zwei triangulären Drahhaken. Ableitung der Änderung des Spannungszustandes von acht Aortenringen und Visualisierung auf dem Monitor.

Zunächst wurden die Aortenringe manuell vorgespannt, um den Zug, dem das Gefäß *in vivo* ausgesetzt ist, zu simulieren. Hierzu wurde im Abstand von sieben Minuten der Zug auf die Aortenringe um jeweils 0,2 g bis zu einem finalen Gewicht von 1,0 g erhöht. Der erreichte Spannungszustand diente als Nullwert (maximale Relaxation) für alle folgenden Messungen.

Durch zweimalige Applikation von 1 ml 2M KCl-Lösung wurde die generelle Kontraktionsfähigkeit der Gefäßmuskelzellen getestet. Nach Auswaschen mit Organbadpuffer und Wiedererreichen der Nulllinie wurde mit der Vorkontraktion für die folgende Relaxationsmessung begonnen. Hierzu wurde dem Organbadpuffer 5,5 µl

des vasokonstriktorisch wirkenden Prostaglandin F₂α (PGF₂α) hinzugegeben und gewartet, bis sich ein Plateau einstellte. Dieser Wert diente als Ausgangspunkt für die folgenden Relaxationsanalysen.

Zur Messung der ACh-Responsibilität wurde nun ACh in steigender Konzentration kumulativ hinzupipettiert. Die ACh-Konzentration innerhalb des Organbadpuffers nahm dadurch von 10⁻⁹ M bis 10^{-5,5} M zu. Zwischen den einzelnen ACh-Gaben wurde jeweils abgewartet, bis sich ein Plateau einstellte. Sofern sich keine Reaktion zeigte, wurde vor der Gabe der nächsten Dosis zwei Minuten abgewartet.

Anschließend wurde das ACh mit Organbadpuffer ausgewaschen, bis die Gefäßspannung wieder die Nulllinie und somit die maximale Relaxation erreichte.

Danach erfolgte die erneute Vorspannung mit PGF₂α wie oben beschrieben und anschließend die Messung der NTG-Responsibilität. Hierzu wurde analog zur ACh-Relaxation vorgegangen. Der Ansatz der Glyceroltrinitratlösung ist in Kapitel 3.1.6.1 beschrieben. Die NTG-Konzentrationen im Organbadpuffer lagen zwischen 10⁻⁹ M bis maximal 10^{-4,5} M.

Die durch ACh bzw. NTG erreichten Relaxationen wurden ins Verhältnis zur maximalen Relaxation (Nullwert) gesetzt und als prozentuale Werte angegeben. Diese wiederum wurden gegen die jeweilige Konzentration des Vasodilatators grafisch in Form von Relaxationskurven aufgetragen.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Einzelzell-RNA-Sequenzierung

3.2.4.1.1 Isolation und Aufbereitung CD45-positiver kardialer Zellen

Die Herzen wurden wie in Kapitel 3.2.3.7 beschrieben entnommen. Für die Sequenzierungsanalysen wurde ausschließlich das infarzierte Gewebe verwendet. Aus den SHAM-operierten Herzen wurde ein äquivalentes Gewebestück herausgeschnitten und analysiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. T. B. (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

Aus dem infarzierten Myokard wurden die CD45-positiven Zellen mittels enzymatischer Verdauung mit dem *Multi Tissue Dissociation Kit 2* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) unter Verwendung des *gentleMACS Dissociators* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) isoliert. Die homogenisierte Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) filtriert und in Zellisolationsspuffer

resuspendiert. Abgestorbene Zellen wurden durch *Dead Cell Removal Microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) entfernt. Dem schloss sich die Selektion CD45-positiver Zellen mittels *CD45-Microbeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) an. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit einem automatisierten Zellzähler der *BD Rhapsody-Plattform* (BD Life Sciences, Milpitas, USA) bestimmt. Nach dem Waschen der markierten Zellen wurde erneut die Zellzahl bestimmt und die Vitalität der Zellen überprüft. Im nächsten Schritt wurden bis zu 30.000 Zellen auf eine Kartusche geladen, um eine Einzelzellisolation zu ermöglichen. Die isolierte RNA wurde in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert, anschließend für die Bibliothekspräparation aufbereitet und einer Qualitätskontrolle gemäß der *Rhapsody-Pipeline* unterzogen. Die fertigen Einzelzellbibliotheken wurden für die *Next-Generation-Sequenzierung* versandt.

3.2.4.1.2 RNA-Sequenzierung, Datenverarbeitung und -analyse

Die Rohsequenzdaten der *Illumina NovaSeq 6000* (Novogene, Cambridge, UK) wurden nach dem Illumina-Standardprotokoll vorverarbeitet. Nach der Entfernung von Adaptersequenzen erfolgten die weiteren Analyseschritte mit *CLC Genomics Workbench* (Qiagen, Hilden, D) unter den Standardeinstellungen für RNA-Sequenzierungsanalysen.

Die Einzelzell-Sequenzierungsdaten wurden einer Qualitätskontrolle, Normalisierung und Clusterbildung unterzogen. Zelltypen wurden mithilfe von Referenzdatensätzen gruppiert und manuell verfeinert. Für die detaillierte Analyse der Makrophagen-Subtypen wurden diese separat untersucht und anhand spezifischer Gensignaturen weiter unterteilt. Eine umfassende Beschreibung der Analyseschritte findet sich in der 2024 publizierten Arbeit von Garlapati et al. ⁽¹⁷⁸⁾.

Die ursprünglichen Einzelzellmatrizen wurden mit der etablierten Pipeline der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. T. B. (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) unter Verwendung von PartekFlow (Partek, Inc., St. Louis, USA) analysiert. Das konkrete Vorgehen ist in diversen Publikationen der Arbeitsgruppe beschrieben ^(13, 289, 290).

3.2.4.2 L-012-basierte Chemilumineszenz im Vollblut

Die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies und reaktiven Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) im Vollblut der Versuchstiere basiert auf dem Prinzip

der Chemilumineszenz. Durch eine chemische Reaktion werden Elektronen eines Luminophors (z.B. Luminol) auf ein höheres Energieniveau angehoben. Fällt das Elektron auf ein niedrigeres Energielevel zurück, wird Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung frei. Diese Strahlung liegt im Bereich sichtbaren und ultravioletten Lichts und ist messbar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Luminophor L-012 (8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido-[3,4-d]-pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion) verwendet. Es handelt sich um ein Luminolanalogen, welches nach Kontakt mit ROS wie Hyperoxid, Peroxinitrit oder Wasserstoffperoxid Chemilumineszenz entwickelt ⁽²⁹¹⁻²⁹³⁾. Zur Stimulation der ROS-Bildung wurde entweder PDBu (Phorbol-12,13-Dibutyrat) oder Zymosan A verwendet.

PDBu weist eine Strukturähnlichkeit mit Diacylglycerin auf und ist daher in der Lage, über Aktivierung der Phosphokinase C und konsekutive Stimulation der NADPH-Oxidase die ROS-Synthese anzuregen ⁽²⁹⁴⁻²⁹⁶⁾. Das Maximum der PDBu-stimulierten ROS-Bildung wird nach 20 bis 25 Minuten erreicht ⁽²⁹¹⁾.

Bei Zymosan A handelt es sich um ein Polysaccharid aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. Oponiertes Zymosan A wird von Phagozyten aufgenommen und fungiert durch Aktivierung des Komplementsystems als Pyrogen. Somit lässt sich mit Zymosan A eine sterile Entzündung induzieren, in deren Folge es unter anderem zu einer NADPH-Oxidase 2 (Nox-2) induzierten ROS-Bildung kommt ⁽²⁹⁷⁾. Die durch Zymosan A ausgelöste ROS-Synthese zeichnet sich im Vergleich zur Stimulation mit PDBu durch eine langsamere Kinetik aus ⁽²⁹¹⁾.

Nach Zugabe des Stimulans lässt sich die Kapazität des Vollblutes zur Freisetzung von ROS (*respiratory burst*) ermitteln.

Je Probe wurden 4 µl L-012 in 2 ml PBS (versetzt mit Calcium- und Magnesiumchlorid) gelöst. Die Lösung wurde mit je 40 µl Citrat-antikoaguliertem Vollblut durch vorsichtiges Umschwenken gemischt. Durch Hinzugabe von 2 µl Zymosan A (1:2 verdünnt mit PBS) oder PDBu (1:10 verdünnt mit PBS) wurde die Reaktion gestartet. Genauere Informationen zur Herstellung des Reaktionsansatzes finden sich in Kapitel 3.1.6.3. Die Detektion der Chemilumineszenz wurde durch den *Spark® Multimode Microplate Reader* (TECAN, Erlangen, D) vorgenommen. Die Messung erfolgte bei 37 °C und in zeitlichen Abständen von jeweils fünf Minuten über eine Gesamtdauer von 85 Minuten. Pro Versuchstier wurden jeweils vier Blutproben analysiert und der Mittelwert der vier Messwerte gebildet.

3.2.4.3 Analyse zirkulierender Blutzellen

Venöses Blut der Versuchstiere wurde hinsichtlich hämatologischer Parameter untersucht. Die Antikoagulation erfolgte mittels Citrat (1:10). Mithilfe des VetScan HM5™ (Abaxis, Inc., CA, USA) wurde ein Differentialblutbild inklusive fünffacher Leukozytendifferenzierung erstellt.

3.2.4.4 RNA-Analyse

3.2.4.4.1 RNA-Isolation

In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA-Expression verschiedener Gene in Herz und Aorta untersucht. Hierzu wurde ein Teil des (infarzierten) Myokards bzw. der abdominelle Teil der Aorta analysiert.

Die RNA-Isolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der sauren Guanidinisothiocyanat-Phenol-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (107, 298, 299). Zunächst wurde das Gewebe zusammen mit einer 5 mm Stahlkugel in einem 2 ml Eppendorfgefäß in 600 µl Guanidinisothiocyanat-Puffer (Git-Puffer) aufgenommen. Es folgte die mechanische Zerkleinerung mithilfe des Tissue Lysers II (Qiagen, Hilden, D) durch 5-minütiges Zerstoßen bei einer Frequenz von 30 Hz, an die sich eine mindestens einstündige Lyse bei -20 °C anschloss. Hierbei macht man sich die chaotropen Eigenschaften des Git-Salzes zunutze, was eine Lyse der Zellmembran sowie die Denaturierung von Makromolekülen wie Proteinen und DNA zur Folge hat. Auch Nukleasen und andere Enzyme werden auf diese Weise inaktiviert (300).

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte im nächsten Schritt durch Hinzugabe von 600 µl wassergesättigtem Phenol. Da eine Trennung von DNA und RNA nur im sauren Milieu möglich ist, wurde die Probe durch Zugabe von 60 µl Natriumacetat (2M, pH 4,0) angesäuert. Nach guter Durchmischung mittels Vortexer wurden anschließend 300 µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) hinzugegeben, was die Bildung einer zweiten Phase zur Folge hat. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4 °C und 16.200 G für 20 Minuten zentrifugiert. DNA und Proteine reichern sich in der nun gebildeten unteren und mittleren Phase an, während RNA in der oberen wässrigen Phase zu finden ist. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, anschließend wurde ein äquivalentes Volumen eisgekühlten Isopropanols hinzugegeben. Die Fällung erfolgte bei -20 °C für mindestens eine Stunde. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 16.200 G, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und das entstandene Pellet in 80 % Ethanol resuspendiert. Es

schloss sich eine weitere Zentrifugation an (10 min, 16.200 G, 4 °C). Erneut wurde der Überstand entfernt und das verbleibende Pellet bei Raumtemperatur für 5 - 10 min getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gelöste RNA bei -80 °C gelagert.

3.2.4.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben zunächst schonend aufgetaut (30 min bei 4 °C, 5 min bei Raumtemperatur, 4 min bei 56 °C) und anschließend auf Eis gelagert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte durch spektralphotometrische Ermittlung der optischen Dichte gegen einen Leerwert (Wasser). Hierfür wurde in der vorliegenden Arbeit der *Spark® Multimode Microplate Reader* (TECAN, Erlangen, D) verwendet.

Nukleinsäuren und Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen von 260 bzw. 280 nm. Eine Absorption bei 230 nm wird als Ergebnis von Kontamination gewertet. Durch Bestimmung des 260/280-Quotienten sowie des 260/230-Quotienten kann somit die Reinheit der extrahierten RNA quantifiziert werden. Bei einem 260/280-Quotienten von etwa 2,0 bzw. einem 260/230-Quotienten von 2,0 - 2,2 kann von Reinheit der aufbereiteten RNA ausgegangen werden ⁽³⁰¹⁾. Bei Verunreinigung wurde die Probe erneut aufgereinigt. Die Proben wurden anschließend in RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 0,1 µg/µl bzw. 0,05 µg/µl verdünnt.

3.2.4.4.3 RNA-Expressionsanalyse

Mithilfe einer Real-Time-PCR (RT-PCR, auch quantitative PCR [qPCR] genannt) wurde die RNA-Expression diverser Gene in Herz und Aorta quantifiziert. Diese basiert auf dem Prinzip der gewöhnlichen Polymerasekettenreaktion, durch welche sich Nukleinsäuren exponentiell amplifizieren lassen. Zusätzlich wird bei der RT-PCR die amplifizierte Nukleinsäure in Echtzeit quantifiziert ⁽³⁰²⁾. Hierfür wurden auf der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Methode (FRET-Methode) basierende TaqMan-Sonden verwendet. Es handelt sich um kurze, zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotide, welche am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher gekoppelt sind. Im Ausgangszustand ist die Fluoreszenzemission gering. Wird allerdings während des PCR-Zyklus der gekoppelte Fluorophor durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase

hydrolytisch abgespalten, so führt dies zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Diese ist proportional zur amplifizierten Nukleinsäuremenge ^(303, 304).

Bei der Verwendung von RNA ist vor der Amplifikation zunächst ein weiterer Schritt notwendig, bei welchem die RNA durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird. Diese wird anschließend nach dem beschriebenen Schema vervielfältigt und quantifiziert.

Für die RT-PCR wurde das *QuantiTect™ Probe RT-PCR-Kit* von Qiagen (Hilden, D) verwendet, bei welchem alle beschriebenen Schritte (reverse Transkription, Amplifikation, Detektion des Fluoreszenzsignals) in einem Ansatz ablaufen (*One-Step-RT-PCR*). Die Primer und Sonden wurden als *TaqMan® Gene Expression Assays* von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, D) bezogen. Das Ansatzvolumen pro Well betrug 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz:

2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	5	µl
RNase freies Wasser	1,9	µl
Primer 1 (TBP)	0,5	µl
Primer 2	0,5	µl
QuantiTectProbeRT-Mix	0,1	µl
Probe	2	µl

RT-PCR-Programm:

Ablauf	Temperatur	Dauer
1. Reverse Transkription	50 °C	30 min
2. Initiale Hitzeaktivierung	95 °C	15 min
3. Primerhybridisierung	94 °C	15 s
4. Elongation	60 °C	1 min

Es wurden insgesamt 50 PCR-Zyklen durchgeführt (Schritte 3. und 4.).

Die RT-PCR wurde mit dem *CFX96 Real-Time-PCR Detection System* von BioRad (München, D) durchgeführt. Als Referenzgen diente das ubiquitär exprimierte und keiner Genregulation unterliegende *TATA-box-binding protein* (TBP). Die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode vorgenommen ⁽³⁰⁵⁾. Bei

der Auswertung wurde die RNA-Expression der Kontrollgruppe (Gruppe 1: Wildtyp-Versuchstiere, SHAM-operiert) als 100 % definiert. Es erfolgte die prozentuale Gegenüberstellung der RNA-Expression der Versuchsgruppen.

3.2.4.5 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mithilfe derer physikalische und molekulare Eigenschaften von Zellpopulationen auf Einzelzellebene charakterisiert werden können ⁽³⁰⁶⁾. Eine Unterform der Durchflusszytometrie stellt die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) dar, welche auf der Analyse von Lichtstreuung sowie der Detektion von Fluoreszenzsignalen beruht. Sie erlaubt die Charakterisierung von großen Probevolumina innerhalb von kurzer Zeit ⁽³⁰⁷⁾.

Zur Untersuchung der Expression spezifischer Zelloberflächenmoleküle wird eine Antigen-Antikörper-Interaktion genutzt. Die zu untersuchenden Zellen werden hierfür mit Antikörpern markiert, welche gegen spezifische Zielstrukturen gerichtet und ihrerseits an Fluoreszenzmarker gekoppelt sind.

Die fluoreszenzmarkierte Zellsuspension wird anschließend durch einen Mikrokanal an einer Laserquelle vorbeigeleitet. Dadurch werden die Elektronen des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau angehoben. Nach Beendigung des Laserimpulses fallen die angeregten Elektronen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück und emittieren dabei Photonenenergie einer charakteristischen Wellenlänge. Diese wird durch einen Photodetektor erfasst und ist proportional zur Menge oberflächengebundener Antikörper pro Zelle.

Zusätzlich kommt es zur Beugung und Streuung des Laserstrahls an der Zelloberfläche, was eine nähere Klassifizierung der Zellen ermöglicht ⁽³⁰⁸⁾. Hierfür befinden sich an definierten Positionen optische Detektoren, die das Streulicht registrieren. Aus dem Streuwinkel lassen sich Rückschlüsse auf Zellgröße und Binnenstruktur ziehen. Streulicht, welches in einem kleinen Winkel (0,5 bis 5 °) zur Ursprungsachse des Laserstrahls detektiert wird, wird als Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) bezeichnet. Die FSC-Intensität ist proportional zum Zelldurchmesser und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Größe der untersuchten Zellen ⁽³⁰⁷⁾.

Streulicht, welches in größerem Winkel (ca. 90 °) zur ursprünglichen Achse des Laserstrahls detektiert wird, wird als Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*, SSC)

bezeichnet und gibt Aufschluss über die Binnenstruktur (Granularität) der untersuchten Zelle.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über ein breites Anregungsspektrum und lassen sich daher bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen. Aufgrund der charakteristischen, farbstoffspezifischen Emissionswellenlängen ist es möglich, zeitgleiche Messungen mit verschiedenen Farbstoffen durchzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde (infarziertes) Myokardgewebe der Versuchstiere mittels FACS-Analyse untersucht. Hierfür wurde das *Attune NxT FACS Acoustic Focusing Cytometer* der Firma Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden ebenfalls von der Firma Thermo Fisher bezogen. Das Protokoll zur Herstellung und Färbung einer Einzelzellsuspension ist im Folgenden dargestellt.

3.2.4.5.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Herzgewebe

Die Entnahme der Herzen erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.7 beschrieben. Für die FACS-Analyse wurde das infarzierte Areal des Myokards verwendet. Aus den SHAM-operierten Herzen wurde ein äquivalentes Gewebestück herausgeschnitten und analysiert. Das Myokardgewebe wurde anschließend gewogen, was eine gewichtsadaptierte Auswertung der final detektierten Zellzahlen ermöglicht. Mithilfe einer Rasierklinge erfolgte nun die manuelle Zerkleinerung des Gewebes. Das zerkleinerte Gewebe wurde in 1 ml Collagenase- und DNase-Mix (Ansatz siehe Kapitel 3.1.6.2) aufgenommen und auf einem Thermalmixer inkubiert (30 min, 37 °C, 500 rpm). Nach jeweils 10 und 20 Minuten erfolgte zusätzlich die manuelle Durchmischung durch Umschwenken der Reaktionsgefäße. Nach 30 Minuten wurde die Suspension durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gepresst. Durch Spülen mit 5 ml PBS/FCS wurde die Verdauungsreaktion gestoppt. Nach Zentrifugation (6 min, 300 G, 4 °C) und anschließender Entfernung des Überstandes erfolgte die Erythrozyten-Lyse durch Inkubation mit 500 µl ACK-Lyse-Puffer (1 min, Raumtemperatur). Diese wurde durch Hinzugabe von 5 ml PBS/FCS abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des wässrigen Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet in 200 µl PBS/FCS gelöst. Nach Zählung der enthaltenen Zellen mithilfe des *Spark® Multimode Microplate Readers* der Firma TECAN (Männedorf, CH) wurde die gesamte Suspension mit FACS-Antikörpern gefärbt (siehe unten).

3.2.4.5.2 Färbung der Herzzellen

Die nach oben beschriebenen Protokoll hergestellte Einzelzellsuspension aus Herzgewebe wurde zunächst mit 50 µl F_c-Block inkubiert (10 min, 4 °C, dunkel), um eine unspezifische Bindung der FACS-Antikörper zu verhindern. Nach einmaligem Waschen mit 100 µl PBS/FCS (Zentrifugation 6 min, 300 G, 4 °C) wurden die Proben mit 50 µl des Antikörpergemischs (Mastermix, siehe Kapitel 3.1.6.2) für 15 min inkubiert (4 °C, dunkel). Nach erneutem Waschen wurden die Pellets in 200 µl PBS/FCS resuspendiert. Dem schloss sich die durchflusszytometrische Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellsuspensionen an.

3.2.4.5.3 Zielstrukturen und Gatingstrategie

Mithilfe der Auswertungssoftware FlowJo™ (Becton Dickson GmbH, Heidelberg, D) lassen sich die durchflusszytometrisch erhobenen Parameter (Lichtstreuung bzw. Fluoreszenzsignal) in Form von Streudiagrammen visualisieren. Die Darstellung erfolgt zweidimensional anhand jeweils zweier ausgewählter Parameter. Auf diese Weise identifizierte Zellcluster mit ähnlicher Expression von Oberflächenmolekülen können ausgewählt und in den folgenden Schritten genauer auf die Expression weiterer Antigene untersucht werden. Die Anzahl der detektierten Zellen innerhalb eines Gates lässt sich berechnen und gibt somit Aufschluss über die absolute sowie die relative Häufigkeit spezifischer Zellpopulationen im untersuchten Gewebe.

Zunächst werden die untersuchten Zellen anhand der detektierten Vorwärts- und Seitwärts-Streustrahlung nach Größe und Granularität vorsortiert (SSC vs. FSC, SSC-A vs. SSC-H, FSC-A vs. FSC-H). Dies ermöglicht den Ausschluss von Zelldebris und Doubletten (aneinanderhaftende Zellen). Zelldebris weist eine geringere Vorwärts-Streustrahlung auf als vitale Zellen und findet sich am linken unteren Rand des Diagramms. Anschließend erfolgt die Selektion vitaler Zellen durch Auftragung gegen einen Vitalitätsmarker.

Im Folgenden werden spezifische Zellcluster genauer typisiert. Hierfür wird jeweils das Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen das Oberflächenantigen von Interesse aufgetragen. Zunächst wird so die Population CD45-positiver Zellen identifiziert. In den folgenden Schritten werden dann weitere Subpopulationen anhand spezifischer Antigene definiert. Die im Folgenden genannten Oberflächenantigene dienen in der vorliegenden Arbeit der genaueren Klassifikation der Immunzellen:

- **CD45:** Transmembranär verankerte Tyrosinphosphatase auf der Oberfläche von Leukozyten; Pan-Leukozytenmarker (*leukocyte common antigen*), ermöglicht die Unterscheidung zwischen Leukozyten und anderen Immunzellen ^(309, 310).
- **B220:** CD45-Isoform; Pan-B-Zellmarker, insbesondere exprimiert von reaktiven B-Zellen ⁽³¹¹⁾.
- **CD90.2 (Thy-1.2):** Muriner Pan-T-Zellmarker (exprimiert von Thymozyten und peripheren T-Lymphozyten).
- **NK1.1 (*Killer cell lectin-like receptor B1*, CD161):** Transmembranärer Lektin Typ C-Rezeptor; Marker für natürliche Killerzellen.
- **CD11b (Mac-1, Integrin α -M):** Zelladhäsionsmolekül, welches die Adhäsion und Migration von Leukozyten reguliert; insbesondere exprimiert von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten ⁽³¹²⁾.
- **Ly6G und Ly6C:** Komponenten des myeloiden Differenzierungsantigens Gr-1; unterschiedlich starke Expression auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen; erlauben die Einteilung von Monozyten in spezifische Subpopulationen ⁽¹¹⁹⁾:
 - **Ly6G:** exprimiert von neutrophilen Granulozyten
 - **Ly6C:** exprimiert von neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und einigen Lymphozyten- und Monozytensubpopulationen ⁽³¹³⁾
 - Ly6C^{high}: „klassische Makrophagen“, proinflammatorische Aktivität
 - Ly6C^{low}: „nicht-klassische Makrophagen“, antiinflammatorische Aktivität, Gewebsintegrität ^(59, 314)
- **F4/80 (EMR-1: *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*):** Oberflächen-Glykoprotein der EGF-TM7-Familie, gehört zu den Adhäsions-GPCR; muriner Makrophagenmarker ⁽³¹⁵⁾.

Nacheinander wurden anhand der Expression der oben beschriebenen Oberflächenantigene B-Lymphozyten, T-Lymphozyten sowie NK-Zellen aus der CD45-positiven Zellpopulation identifiziert. Zur genaueren Charakterisierung der myeloiden Zellen wurden die bis dahin unklassifizierten Zellen durch Analyse der Expression von CD11b weiter spezifiziert. Aus den CD11b-positiven Zellen wurden die neutrophilen Granulozyten ausgeschlossen und die verbliebene CD11b⁺Ly6G-Population anhand der Expression von F4/80 und Ly6C genauer untersucht.

In Abbildung 3-8 ist die sukzessive Gatingstrategie dargestellt, welche den Analysen der vorliegenden Arbeit zugrunde gelegt wurde.

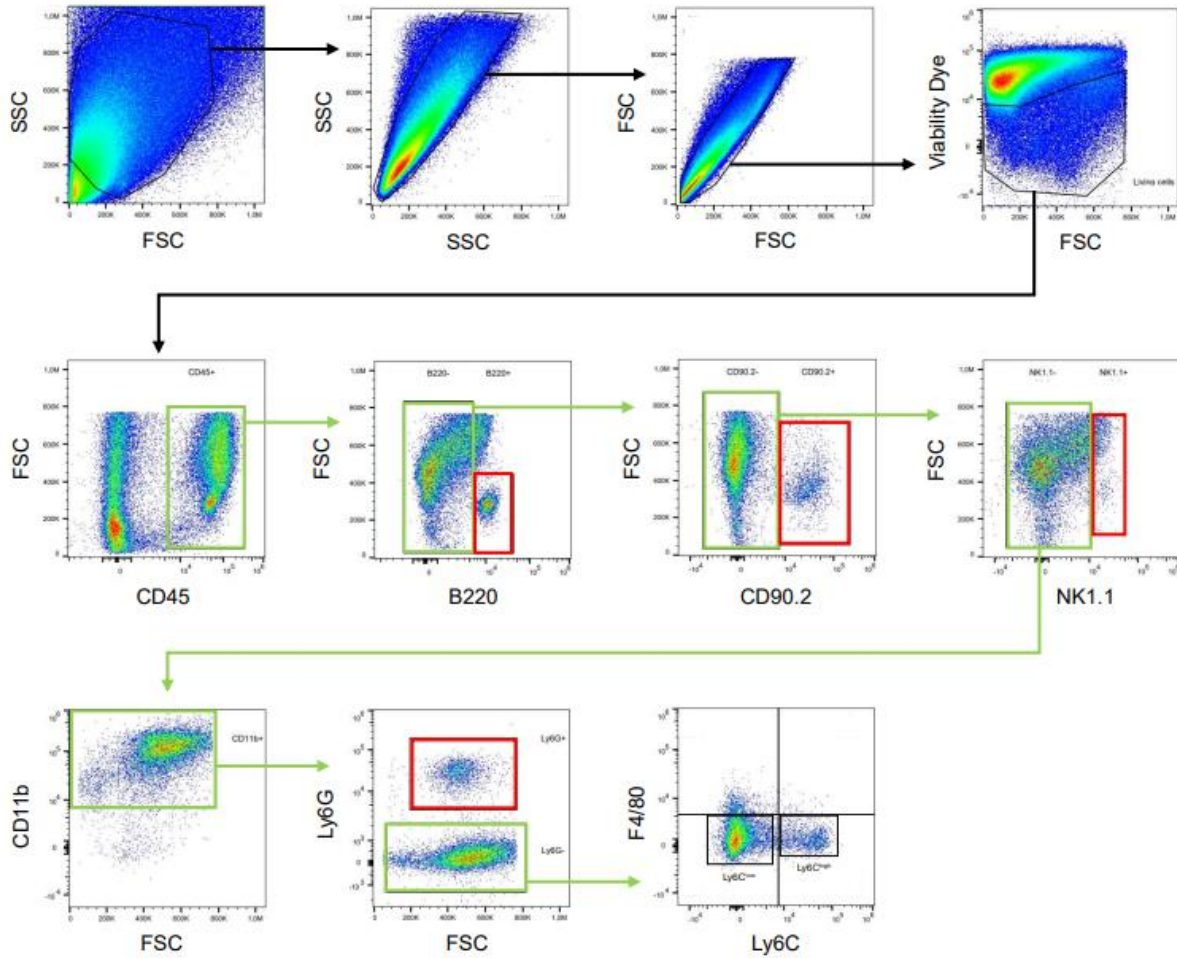


Abbildung 3-8: FACS-Gatingstrategie: Obere Zeile: Die ersten vier Gatingschritte dienen der Entfernung von Zelldebris und Dubletten (aneinanderhaftende Zellen) und der Selektion vitaler Zellen (ViaDye vs. FSC). Die schwarz umrandete Zellpopulation wird jeweils weiter analysiert. Der Rest der Zellen wird somit „ausgated“. Mittlere Zeile: Zunächst erfolgt die Selektion CD45-positiver Zellen (FSC vs. CD45). In den folgenden drei Schritten wird jeweils das Vorwärtsstreulicht gegen das Oberflächenantigen von Interesse aufgetragen. Dadurch werden die rot markierten Zellcluster identifiziert. Die für den untersuchten Marker negativen Zellen sind grün umrandet. Diese Zellpopulation wird im jeweils folgenden Gatingschritt genauer untersucht. Untere Zeile: Zur genaueren Analyse der myeloiden Zellen werden die folgenden Oberflächenmarker verwendet: CD11b, Ly6G, F4/80, Ly6C.

3.2.5 Isolation und Transplantation monozytärer Zellen

Für die Transplantation von Monozyten zwischen Versuchstieren unterschiedlichen Genotyps wurde zunächst das Knochenmark wie in Abschnitt 3.2.3.7 beschrieben isoliert. Für die Isolation monozytärer Zellen aus dem Knochenmark der Spendertiere wurde das *EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit* (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) verwendet ^(316, 317). Die Methode beruht auf dem Prinzip der negativen Selektion ⁽³¹⁸⁾. Dabei werden nicht-monozytäre Zellen zunächst mit Antikörpern markiert und anschließend durch magnetischen Zug entfernt, sodass eine monozytenreiche Suspension zurückbleibt. Die Monozyten bleiben dabei unmarkiert und funktionsfähig. Die Methode lässt sich schnell und einfach durchführen und erzielt durch die effektive Entfernung unerwünschter Zellpopulationen eine hohe Reinheit der Zielzellen.

Das isolierte Knochenmark wurde in 1 ml EasySep™ Puffer (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) gelöst und anschließend mit weiteren 5 ml Puffer durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gepresst und zentrifugiert (6 min, 300 G, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl Puffer resuspendiert und ein Fc- γ -Rezeptor-Block (EasySep™ Mouse FcR Blocker, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada; 100 µl pro Milliliter Probe) hinzugegeben. Daran schloss sich der Transfer der Proben in ein 5 ml Rundbodenröhrchen an. Im nächsten Schritt wurde der EasySep™ Antikörper-Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) nach Herstellerangaben vorbereitet und zur Knochenmarksuspension hinzugegeben (100 µl pro Milliliter Probe). Dieser enthält Antikörper gegen die Zelloberflächenmarker der zu entfernenden nicht-monozytären Zellen. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde eine Vermischung der Antikörper mit der Zellsuspension erreicht. Nach der Inkubation (5 min, 4 °C) wurden die zuvor mittels Vortexer gut durchmischten EasySep™ Dextran RapidSpheres™ (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) hinzugefügt (75 µl pro Milliliter Probe) und durch vorsichtiges Umschwenken und Pipettieren gut mit der Probensuspension vermischt. Um eine stabile Bindung der magnetischen Partikel an die Antikörper-markierten Zellen zu ermöglichen, schloss sich eine weitere Inkubationsperiode an (3 min, 4 °C). Die Zellsuspension wurde daraufhin mit Pufferlösung auf 2,5 ml aufgefüllt, vorsichtig durchmischt und im EasySep™ Magnet für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die markierten Zellen werden dabei durch die magnetischen Partikel an die

Röhrchenwand gezogen, während die unmarkierten Monozyten in der Suspension verbleiben. Die monozytenreiche Suspension wurde im nächsten Schritt in einer flüssigen Bewegung in ein neues 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Zur Steigerung der Reinheit der isolierten Monozyten schloss sich ein weiterer Separationsschritt im EasySep™ Magnet an (3 min, Raumtemperatur). Die aufgereinigte Monozytenfraktion wurde erneut in einer flüssigen Bewegung in ein 5 ml Röhrchen überführt.

10 µl der Probe wurden anschließend mit 90 µl Trypanblau gefärbt, um die aufgereinigten monozytären Zellen mithilfe des Spark® Multimode Microplate Readers der Firma TECAN (Männedorf, CH) zu zählen.

Den Versuchstieren wurden zu Versuchsbeginn einmalig 1×10^6 monozytäre Zellen injiziert. Hierzu wurde der Monozytensuspension ein entsprechendes Volumen entnommen und dieses anschließend zentrifugiert (6 min, 300 G, 4 °C) und in 150 µl 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert. Für die Schwanzveneninjektion wurden die Tiere in Restrainern fixiert und die Monozytenlösung über eine 1 ml Spritze mit aufgesetzter 26 G Kanüle übertragen.

Den beiden Kontrollgruppen (Wildtypkontrolle: ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}, Negativkontrolle: ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}) wurden anstelle der Monozytensuspension 150 µl isotone Kochsalzlösung injiziert. Der Monozyten- bzw. NaCl-Injektion schloss sich die operative LAD-Ligatur an. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mithilfe von GraphPad Prism 9 und 10 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA) vorgenommen.

Mit „n“ wird die Anzahl der untersuchten Versuchstiere beziffert. Sofern nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM: *standard error of the mean*) dargestellt.

Die Ergebnisse wurden zunächst hinsichtlich des Vorliegens einer Normalverteilung bzw. einer logarithmischen Normalverteilung untersucht. Hierzu wurde ein Shapiro-Wilk Test durchgeführt.

Einzelne statistische Ausreißer innerhalb einer Versuchsgruppe wurden durch das Statistikprogramm mithilfe der Grubbs-Methode identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde zum Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen eine ordinäre *one-way ANOVA (analysis of variance)* und post-hoc eine Tukey-Korrektur durchgeführt. Eine *two-way ANOVA* mit post-hoc durchgeführter Tukey-Korrektur kam bei mehr als zwei Versuchsgruppen und mehr als einem Messzeitpunkt zur Anwendung.

Lag keine Normalverteilung vor, wurden entweder ein t-Test mit anschließendem Mann-Whitney U-Test (bei Vergleich von zwei Versuchsgruppen) oder ein Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test (bei Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen) durchgeführt.

Die resultierenden p-Werte wurden wie folgt gekennzeichnet und interpretiert:

p-Wert	Interpretation	Kennzeichnung
$\leq 0,0001$	extrem signifikant	****
$\leq 0,001$	extrem signifikant	***
$\leq 0,01$	hoch signifikant	**
$\leq 0,05$	signifikant	*
$> 0,05$	nicht signifikant	ns

Tabelle 3-14: Interpretation der p-Werte

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung azidose-sensibler Genexpression nach einem akuten Myokardinfarkt

Zur Beschreibung der Inflammationsantwort sowie der Expression azidoseabhängiger Gene im zeitlichen Verlauf nach einer akuten myokardialen Ischämie erfolgte die Genexpressionsanalyse an Wildtyp-Versuchstieren (C57BL6/J; Studie 1). Hierzu wurden kardiale CD45-positive Leukozyten am ersten, am dritten sowie am siebten Tag nach operativer Myokardinfarktinduktion isoliert und durch eine RNA-Sequenzierung auf Einzelzellebene hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster untersucht. Als Kontrollgruppe dienten SHAM-operierte Wildtypmäuse.

In der frühen postischämischen Phase präsentiert sich ein verändertes Zellprofil als Ausdruck der beginnenden Umstrukturierung des infarzierten Gewebes. Insbesondere Granulozyten sowie eine Subpopulation der Makrophagen (in Abbildung 4-1 als *Makrophagen 1* bezeichnet) verzeichnen eine deutliche Zunahme. Die Untersuchung des Genexpressionsprofils dieser vorherrschenden Zellpopulationen zeigt, dass die ersten Tage nach MI durch eine proinflammatorische Signalgebung der Immunzellen gekennzeichnet sind. Bereits am siebten Tag hat sich diese Inflammation weitestgehend zurückgebildet. Stattdessen dominieren zu diesem Zeitpunkt weitere Makrophagen-Subpopulationen das zelluläre Bild (in Abbildung 4-1 als *Makrophagen 2, 3 und 4* bezeichnet).

Darüber hinaus wurden die Zellcluster hinsichtlich der Expression azidoseabhängiger Signalwege untersucht. Eine gesteigerte Expression findet sich insbesondere in der initialen inflammatorischen Phase bis zum dritten Tag. Zudem zeigt sich eine hohe Übereinstimmung dieser azidose-sensiblen Zellpopulationen mit den proinflammatorischen Zellclustern.

Einige der nach Myokardinfarkt expandierenden Granulozyten- und Makrophagenpopulationen, die durch eine verstärkte azidoseabhängige Signalgebung gekennzeichnet sind, weisen darüber hinaus eine erhöhte ICER-Expression auf (nicht abgebildet).

Ergebnisse

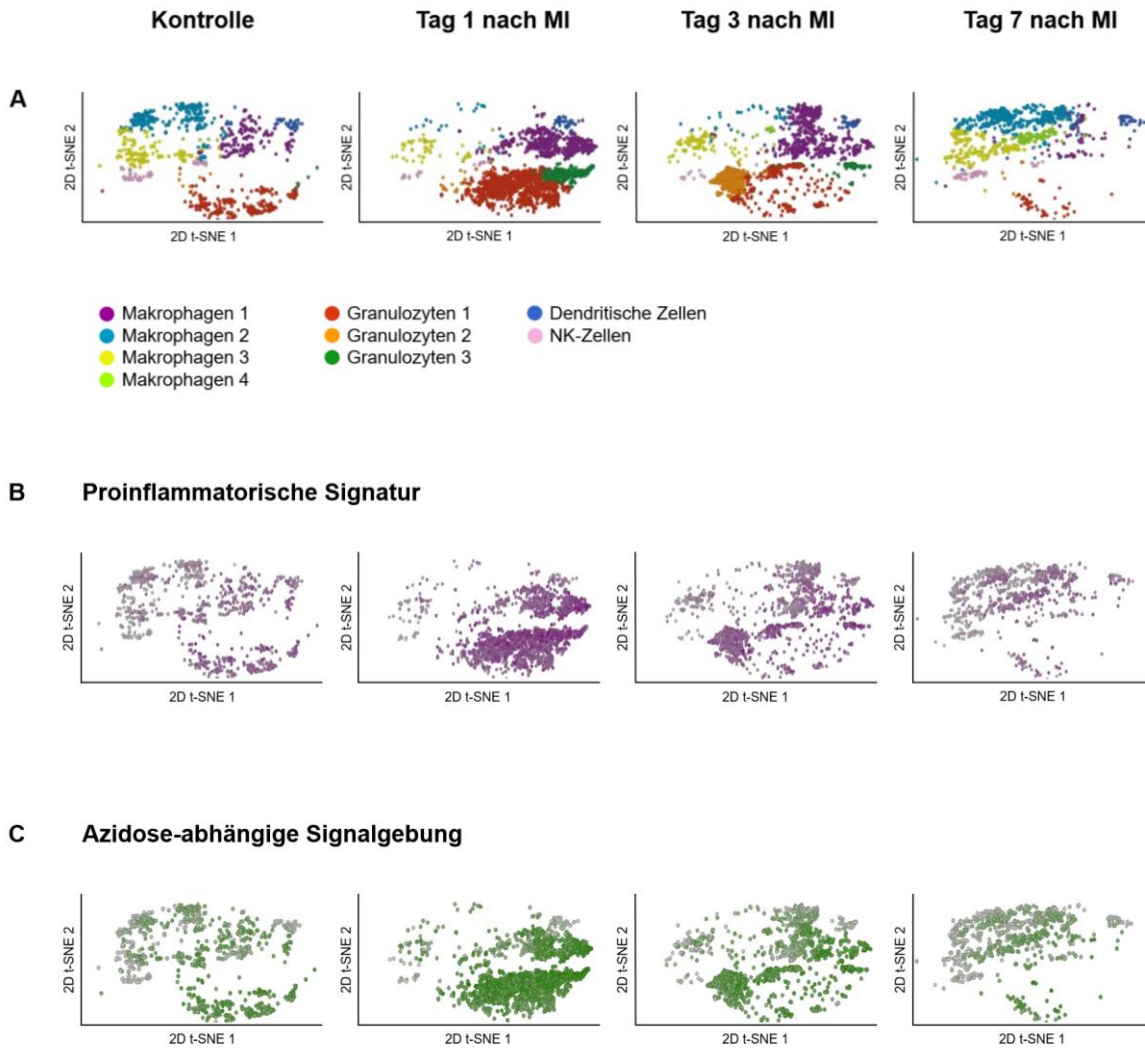


Abbildung 4-1: Genexpressionsanalysen aus Einzelzellsequenzierungen kardialer CD45⁺-Leukozyten von Wildtyp-Versuchstieren (C57BL6/J) mit Darstellung der Zellpopulationen an Tag 1, 3 und 7 nach LAD-Operation bzw. einen Tag nach SHAM-Operation (Kontrolle). A: t-SNE-Plots mit Darstellung der myelomonozytären Zellcluster im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt (MI). Veranschaulichung der Zellen mit proinflammatorischem Genexpressionsprofil (B) und der Expression azidoseabhängiger Gene in den einzelnen Populationen (C) n = 3.

4.2 Auswirkungen einer myelomonozytären ICER-Deletion auf die kardiovaskuläre Funktion und die Inflammationsantwort nach akutem Myokardinfarkt

Die Rolle von ICER im kardialen Remodeling nach einem akuten Herzinfarkt und insbesondere der Einfluss des Transkriptionsfaktors auf kardiale Immunzellen wurde in weiterführenden Studien untersucht. Hierzu wurden Mäuse mit myelomonozytärem

ICER-Knockout ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$) sowie eine Wildtyp-Kontrollgruppe ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}$) einer operativen LAD-Ligatur bzw. SHAM-Operation unterzogen. Hieraus ergeben sich die vier unter Abschnitt 3.2.2 in Tabelle 3-9 aufgeführten Versuchsgruppen der Studie 2.

Die Charakterisierung der postischämischen Remodelingprozesse erfolgte durch hochfrequente Kleintierechokardiografie, durchflusszytometrische Zellanalyse, Einzelzellsequenzierung kardialer Monozyten sowie durch RNA-Expressionsanalysen mittels RT-PCR.

4.2.1 Physiologische Parameter

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde bei Studieneinschluss erhoben. Zudem erfolgte die Messung des systolischen Blutdrucks am dritten postoperativen Tag. Hier präsentierten sich die Studiengruppen homogen ohne signifikante Unterschiede der erhobenen Parameter. Nach operativer Infarktinduktion zeigten sowohl die Gruppe der $ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}$ als auch die Versuchstiere in der $ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$ -Gruppe eine größere Spannweite der erhobenen systolischen Blutdruckwerte.

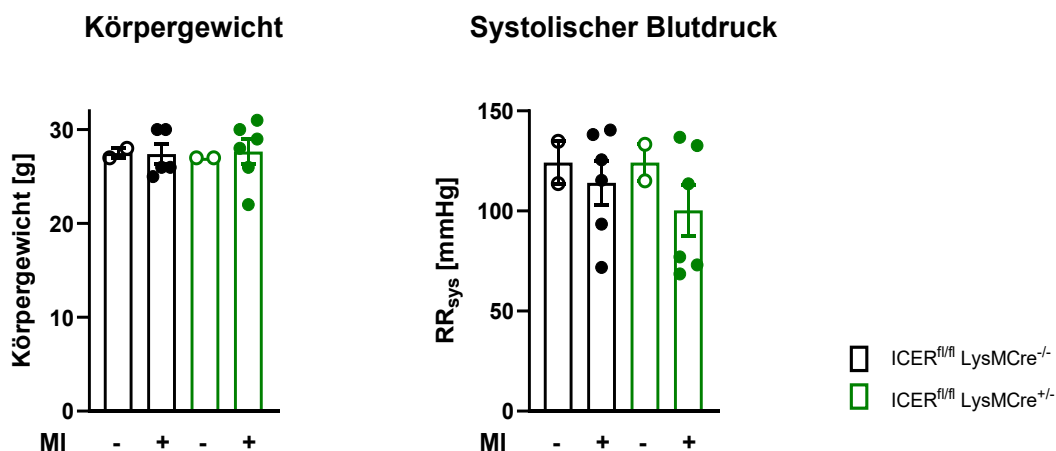


Abbildung 4-2: Grafische Darstellung von Körpergewicht und systolischem Blutdruck der Versuchstiere ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$). MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP), RR_{sys} = systolischer Blutdruck. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 2-6. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.2.2 Überlebenszeitanalyse

Während des gesamten Studienverlaufs wurde die Mortalität der Versuchstiere täglich erfasst. Die SHAM-operierten Mäuse zeigten bis zum Studienende (Tag 7) eine

Überlebensrate von 100 %. Nach LAD-Operation lag die Überlebensrate am siebten postoperativen Tag bei 81 % in der Wildtypgruppe ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}$) und bei 93 % in der Gruppe mit konditionalem ICER-Knockout ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$). Die myelomonozytäre Deletion des Transkriptionsfaktors ICER ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$) führte zu keinem signifikanten Unterschied der Überlebenszeit der Versuchstiere im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe.

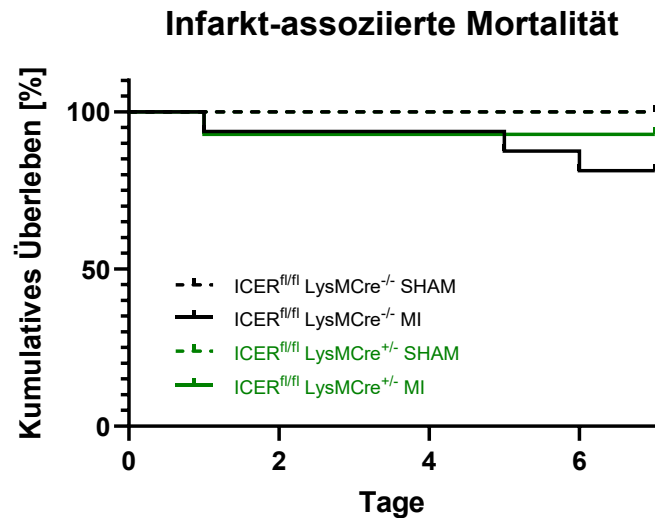


Abbildung 4-3: Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$) der LAD- bzw. SHAM-operierten Versuchstiere mit myelomonozytärer ICER-Deletion (grün), Kontrollgruppe (Wildtyp, schwarz). MI = Myokardinfarkt. n = 6-16, Log-rank (Mantel-Cox) Test. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Überlebenszeitkurven der Versuchsgruppen.

4.2.3 Echokardiografie

Mittels Kleintierechokardiografie wurde die kardiale Funktion der Versuchstiere am sechsten postoperativen Tag untersucht. Hierzu erfolgte die Einstellung der parasternalen langen sowie kurzen Achse (PLAX, PSAX) und die standardisierte Messung verschiedener Parameter. Das genaue Vorgehen und die verwendeten Formeln sind in Kapitel 3.2.3.5 detailliert aufgeführt.

Unabhängig vom Genotyp zeigten die LAD-operierten Versuchstiere am sechsten postoperativen Tag eine mit einer akuten postischämischen Herzinsuffizienz zu vereinbarende hochsignifikante Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion auf im Mittel 35 % ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}$) bzw. 27 % ($ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}$). Dies lässt auf eine effektive Operationstechnik schließen.

Im direkten Vergleich mit der LAD-operierten Wildtyp-Kontrollgruppe ($ICER^{fl/fl}$ $LysMCre^{-/-}$) fielen die $ICER^{fl/fl}$ $LysMCre^{+/-}$ -Mäuse durch eine beeinträchtigte kardiale Funktion mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion sowie reduziertem Herzzeitvolumen nach operativer Myokardinfarktinduktion auf. Dagegen blieben die Herzfrequenz und das linksventrikuläre enddiastolische Volumen von der myelomonozytären ICER-Deletion unbeeinflusst.

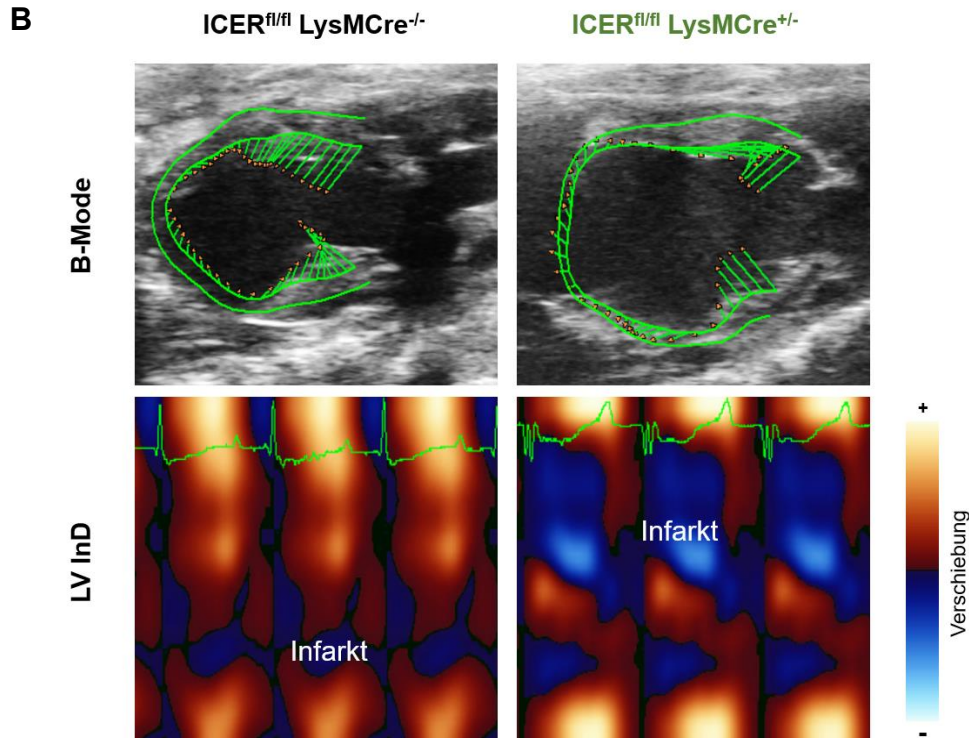
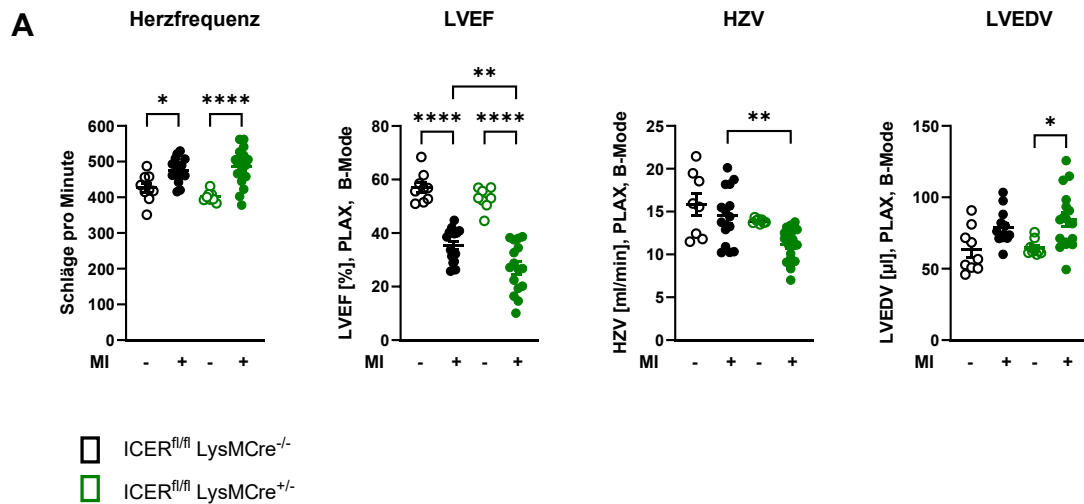


Abbildung 4-4: Echokardiografische Untersuchungsergebnisse ($ICER^{fl/fl}$ $LysMCre^{+/-}$): A: Darstellung von Herzfrequenz, linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF), Herzzeitvolumen (HZV) und linksventrikulärem enddiastolischem Volumen (LVEDV) der Versuchsgruppen; PLAX, B-Mode. MI =

Ergebnisse

Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 8-18, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$. **B:** Obere Zeile: Repräsentative echokardiografische Aufnahmen der LAD-operierten Versuchstiere (PLAX, B-Mode). Die grünen Pfeile visualisieren die Bewegung der endokardialen Wand des linken Ventrikels in der Systole. Untere Zeile: Farbcodierte Darstellung der linksventrikulären radialen Verschiebung (LV InD: *Left Ventricular Inward Displacement*; linksventrikuläre Einwärtsbewegung). Rote bzw. hellrote Areale zeichnen sich durch eine normale bzw. gesteigerte Kontraktibilität mit Verkürzung des Myokards in der Systole aus. Blaue Areale zeigen eine beeinträchtigte bzw. keine Kontraktion; in den hellblauen Arealen kommt es sogar zur Dehnung des Myokards in der Systole.

In Studie 2.2 wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 28 Tagen nach LAD-Ligatur bzw. SHAM-Operation nachbeobachtet und regelmäßigen echokardiografischen Kontrollen unterzogen. Der zeitliche Verlauf der LVEF sowie des LVEDV sind in Abbildung 4-5 grafisch dargestellt.

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion der Wildtyp-Kontrollgruppe zeigte sich auch vier Wochen nach dem ischämischen Ereignis stabil reduziert bei etwa 35 %. Die bereits am sechsten Tag detektierte Verschlechterung der systolischen Funktion der Versuchsgruppe 4 gegenüber der Wildtypgruppe blieb bis zum 21. Tag unverändert bestehen (LVEF 26 % vs. 35 %). Zum Ende des Beobachtungszeitraums zeigten die Tiere der ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-LAD-Gruppe eine mittlere Ejektionsfraktion von 23 % und somit eine weitere Verschlechterung der systolischen Funktion. Diese Progressionstendenz zeigt sich auch in einer Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens im Zeitverlauf.

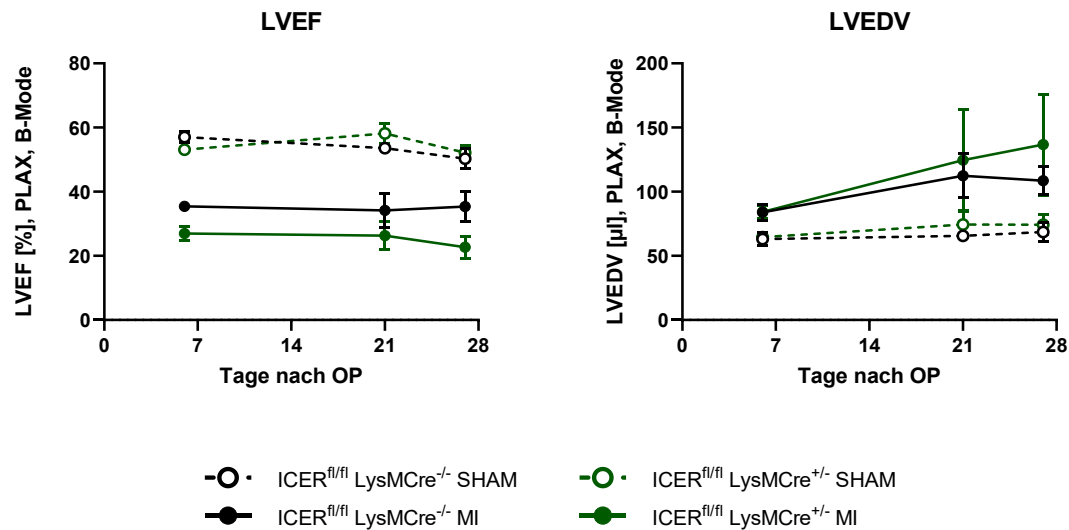


Abbildung 4-5: LVEF und LVEDV im zeitlichen Verlauf über 28 Tage nach operativer Myokardinfarktinduktion bzw. SHAM-OP (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}); PLAX, B-Mode. LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LVEDV = linksventrikuläres enddiastolisches Volumen, MI = Myokardinfarkt. Angabe als Mittelwert \pm SEM; $n_{d7} = 9-16$, $n_{d21, d28} = 3-5$.

4.2.4 Durchflusszytometrische Zellanalyse des Herzgewebes

Die Charakterisierung der kardial infiltrierenden Immunzellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen. Hierzu wurden kardiale Zellen wie in Kapitel 3.2.4.5.1 beschrieben aus dem Herzgewebe isoliert und analysiert.

Verglichen mit den SHAM-operierten Versuchstieren führte die operativ induzierte myokardiale Ischämie sowohl bei den ICER-kompromittierten Mäusen (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}) als auch in der Wildtypgruppe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) zu einer verstärkten Immunzellinfiltration des Myokards.

Im direkten Vergleich der LAD-operierten Versuchsgruppen zeigten die Versuchstiere mit konditionalem myelomonozytärem ICER-Knockout eine signifikant gesteigerte Infiltration CD45-positiver sowie CD11b-positiver Immunzellen. Die Quantifizierung pro- und antiinflammatorischer Monozyten (Ly6C^{high/low}) im kardialen Gewebe zeigte, dass es bei den ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Tieren nach LAD-Ligatur insbesondere zu einem Anstieg der proinflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten kommt, während bei den Ly6C^{low}-Monozyten keine signifikante Steigerung zu verzeichnen war.

Ergebnisse

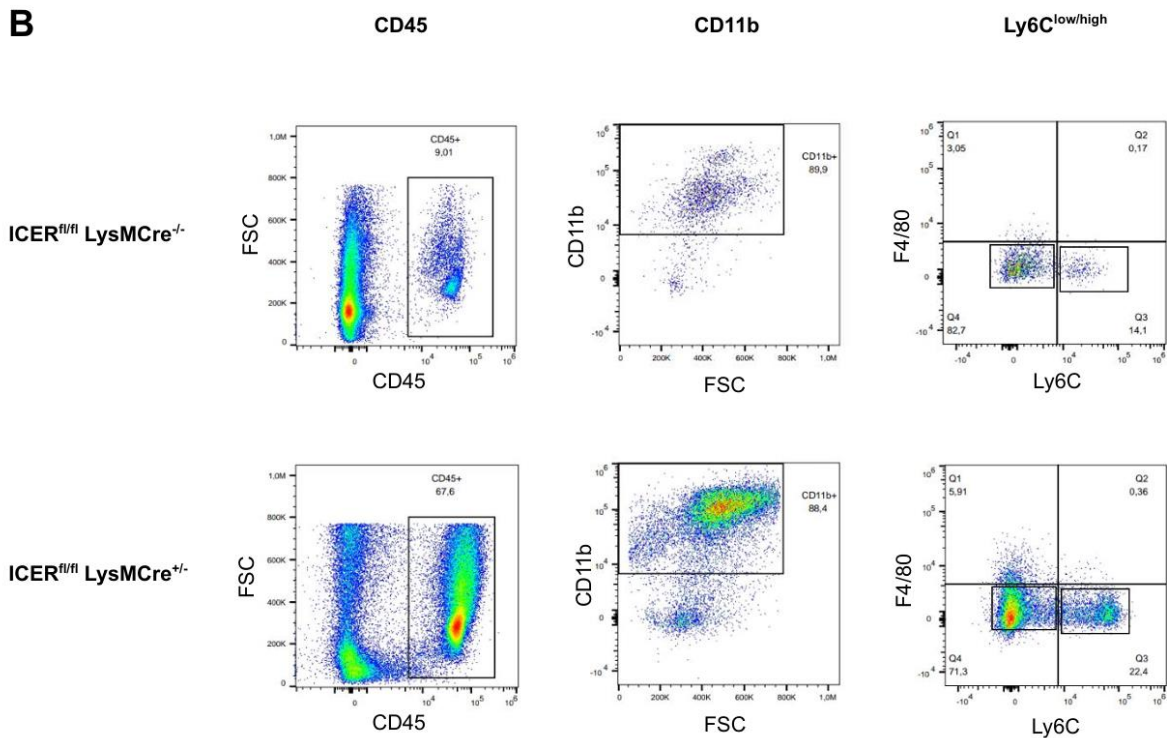
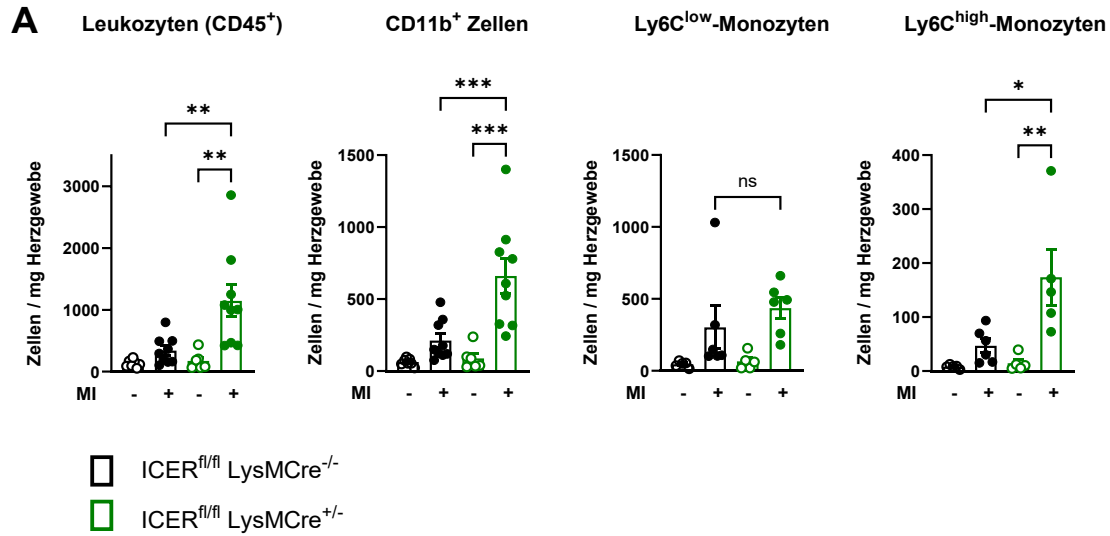


Abbildung 4-6: Durchflusszytometrische Analyse von kardialem Gewebe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}). A: Grafische Darstellung absoluter Zellzahlen von CD45-positiven Zellen, CD11b-positiven Zellen sowie von Ly6C^{low}- und Ly6C^{high}-Monozyten. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 5-9, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = p > 0,05, * = p \leq 0,05, ** = p \leq 0,01, *** = p \leq 0,001. **B:** Von links nach rechts: Repräsentative durchflusszytometrische Dotplots zur Darstellung CD45-positiver bzw. CD11b-positiver Immunzellen sowie Ly6C^{low}- (schwarzer Kasten in Q4) und Ly6C^{high}-Monozyten (schwarzer Kasten in Q3). Obere Reihe: ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-} LAD. Untere Reihe: ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} LAD.

4.2.5 Analyse zirkulierender Zellen

Zur Charakterisierung der durch die myokardiale Ischämie angestoßenen Veränderungen von im Blut zirkulierenden Zellen erfolgte die Untersuchung von venösem Vollblut. Hierzu wurde am siebten postoperativen Tag ein Blutbild mit Leukozytendifferenzierung erstellt. Die gesteigerte Infiltration von Immunzellen in das kardiale Gewebe der ICER-depletierten LAD-Versuchstiere zeigte kein eindeutiges Äquivalent im peripheren Blut. Abbildung 4-7 stellt die absoluten Zellzahlen der untersuchten Zellreihen dar. Für die prozentualen Anteile der Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen an der Gesamtzahl der Leukozyten zeigte sich ein ähnliches Bild (nicht dargestellt).

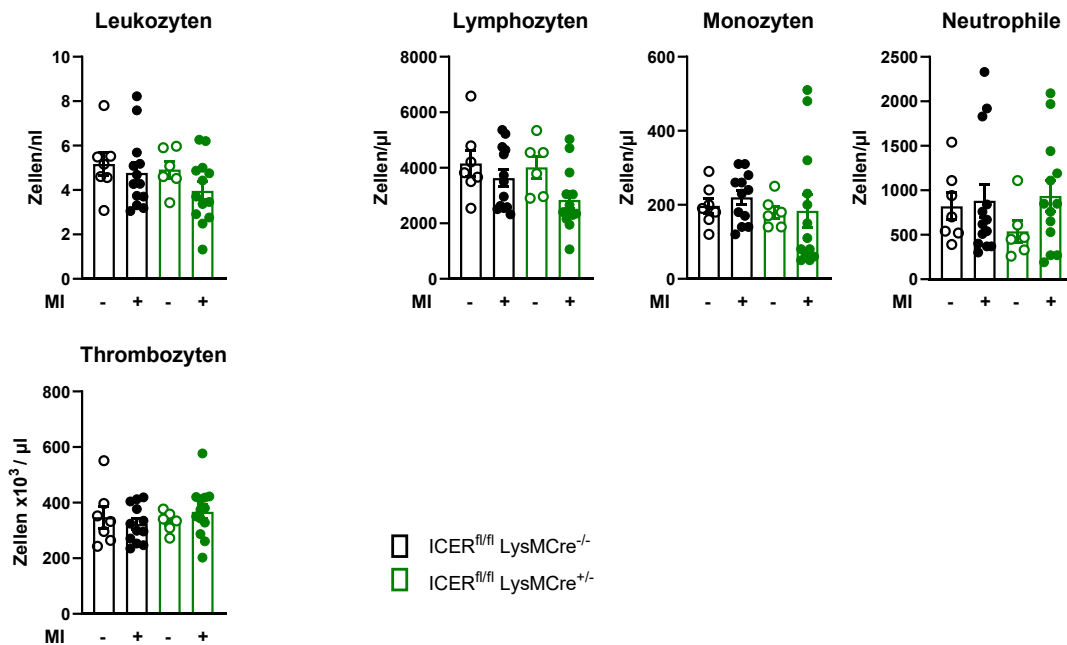


Abbildung 4-7: Zirkulierende Zellen im Vollblut LAD- bzw. SHAM-operierter Versuchstiere (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}). MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert ± SEM; n = 6-13, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.2.6 Einzelzellsequenzierung kardialer Monozyten nach LAD-Ligatur: Monozytärer Phänotyp nach akutem Myokardinfarkt

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors ICER im postischämischen kardialen Remodeling genauer zu charakterisieren, erfolgten Einzelzell-RNA-Sequenzierungsanalysen. Hierzu wurden kardiale CD45-positive Zellen sieben Tage

nach operativer LAD-Ligatur isoliert und durch Genexpressionsanalysen verschiedenen Clustern zugeordnet.

Abbildung 4-8 gibt eine Übersicht über die myokardialen Zellpopulationen der Monozyten und Makrophagen und ergibt sich aus der Vereinigung aller Sequenzierungsdaten der Studien 1 und 2.3 sowie weiterer Projekte der Arbeitsgruppe. Die einzelnen Zellcluster sind farblich codiert und mit Ziffern bezeichnet in einer UMAP dargestellt. Diese Zellpopulationen wurden hinsichtlich der Expression ausgewählter protektiver (Olfml-3, TREM2) bzw. destruktiver (TREM1, Fn1, F7) Marker untersucht. Die entsprechende Visualisierung zeigt Abbildung 4-9.

Die myelomonozytäre ICER-Deletion führt zu einer Verschiebung des Phänotyps von Monozyten und Makrophagen. Der direkte Vergleich der am siebten Tag nach LAD-Ligatur erhobenen Sequenzierungsdaten von ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Versuchstieren mit Wildtyp-Kontrollen zeigt insbesondere eine Reduktion der protektiven Cluster (Cluster 1, 7, 9 und 11; siehe Abbildung 4-8). Eine Zunahme proinflammatorischer Zellpopulationen ist nicht eindeutig nachzuweisen. In der Summe resultiert eine gesteigerte kardiale Entzündungsantwort.

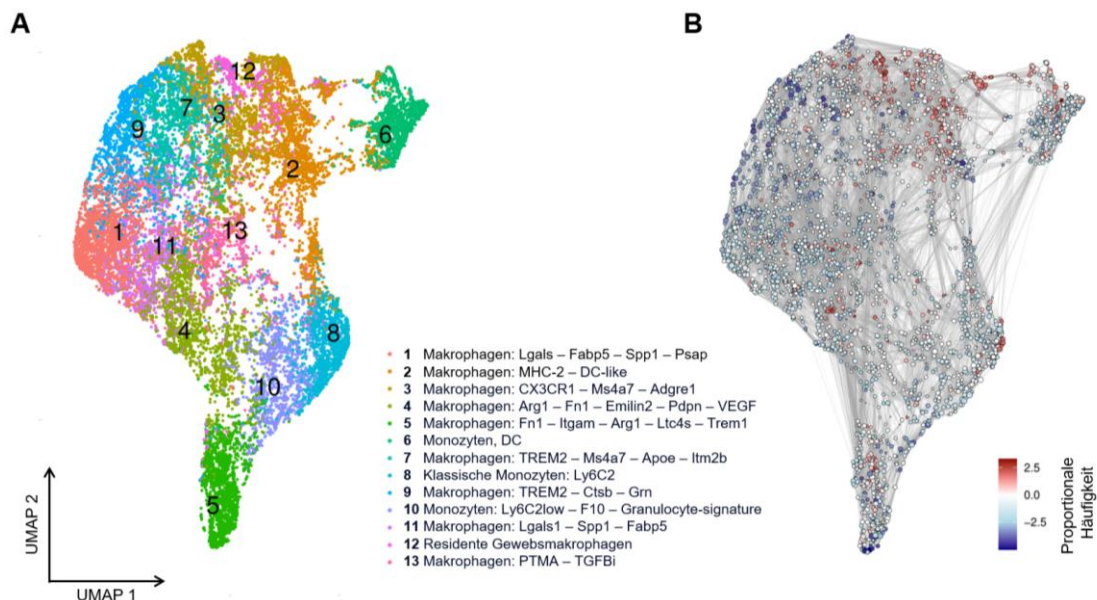


Abbildung 4-8: Genexpressionsanalyse kardialer CD45⁺-Leukozyten aus ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} und Wildtyp-Kontrollen sieben Tage nach permanenter LAD-Ligatur. **A:** Übersicht über die myokardialen Zellpopulationen der Monozyten und Makrophagen. Die Zuordnung zu den verschiedenen Zellclustern erfolgte anhand der Expression definierter Marker. **B:** UMAP-Visualisierung der Auswirkungen einer myelomonozytären ICER-Deletion auf das myokardiale Zellprofil: Vergleich von ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} mit

der Wildtyp-Kontrollgruppe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) am siebten Tag nach LAD-Ligatur. Jede Punktwolke repräsentiert eine spezifische Zellpopulation. Rote Punkte zeigen Zellpopulationen, die im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe vermehrt auftreten, während blaue Punkte Zellpopulationen markieren, die seltener anzutreffen sind. Die Farbintensität codiert die Stärke der Unterschiede (dunkel = stärker, hell = schwächer). Weiße Punkte stehen für Zellpopulationen ohne signifikante Veränderungen. Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt und erläutert. n = 3.

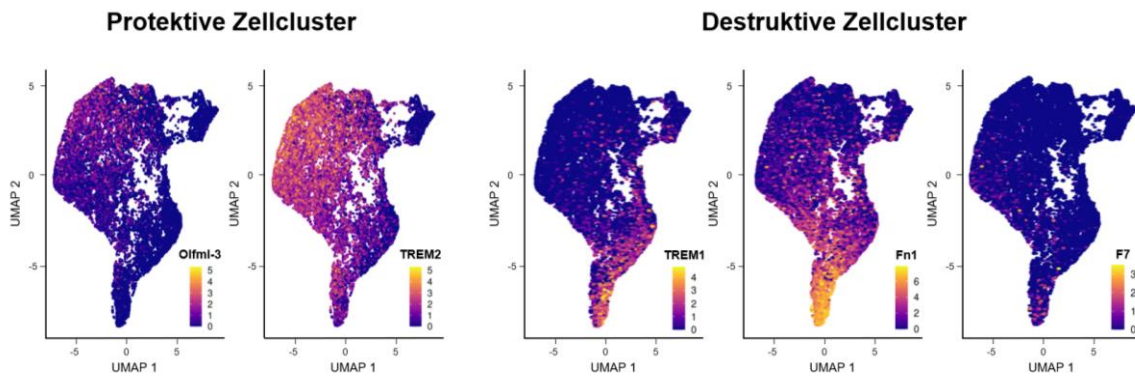


Abbildung 4-9: Analyse der Expression protektiver und destruktiver Marker: Untersuchung der CD45-positiven Zellen hinsichtlich der Expression ausgewählter protektiver (Olfml-3, TREM2) bzw. destruktiver (TREM1, Fn1, F7) Marker. Olfml-3 = *olfactomedin-like protein 3*, TREM1/2 = *triggered receptor expressed in myeloid cells 1/2*, Fn1 = Fibronectin 1, F7 = Gerinnungsfaktor 7.

4.2.7 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in venösem Vollblut wurde am siebten Tag nach LAD- bzw. SHAM-Operation mittels L-012-basierter Chemilumineszenz quantifiziert. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) zeigten die Tiere mit myelomonozytärer ICER-Deletion eine Steigerung der systemischen ROS-Bildung infolge der myokardialen Ischämie.

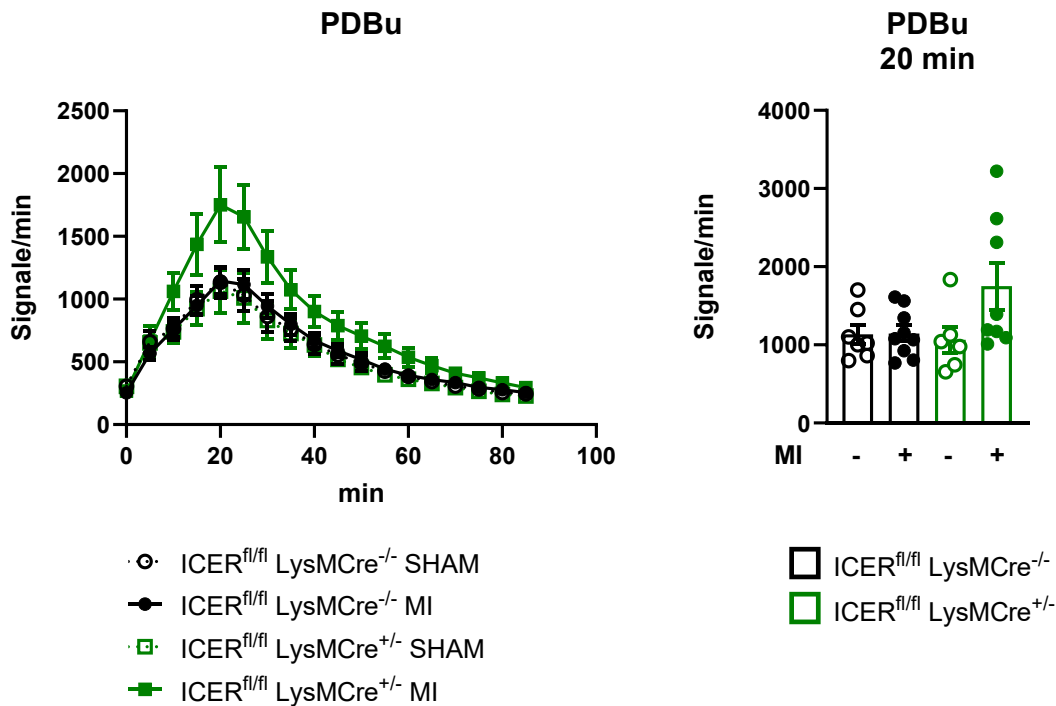


Abbildung 4-10: Detektion der PDBu-stimulierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in venösem Vollblut mittels L-012-basierter Chemilumineszenz (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}). Links: Darstellung der Messwerte über 85 Minuten nach Stimulation mit PDBu. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 7-9, Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Rechts: Messung 20 Minuten nach Stimulation mit PDBu. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 7-9, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.2.8 Vasculäre Funktion in isometrischen Tonusstudien

4.2.8.1 Endothelabhängige Vasodilatation als Reaktion auf Acetylcholin

Die vaskuläre Funktion wurde durch isometrische Spannungsmessungen an isolierten Aortenringen charakterisiert. Die Prüfung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit erfolgte durch Hinzugabe von Acetylcholin.

Erwartungsgemäß führte die operative Myokardinfarktinduktion in der Wildtyp-Kontrollgruppe zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion. Diese Tendenz konnte bei den Mäusen mit einem konditionalen Knockout von ICER in myeloiden Zellen (ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}) nicht nachgewiesen werden. Die ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Mäuse zeigten sieben Tage nach permanenter LAD-Ligatur keinen signifikanten Unterschied in der endothelabhängigen Vasodilatation im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Eine die beeinträchtigte kardiale Funktion begleitende endotheliale Dysfunktion konnte somit in keinem der Genotypen nachgewiesen werden.

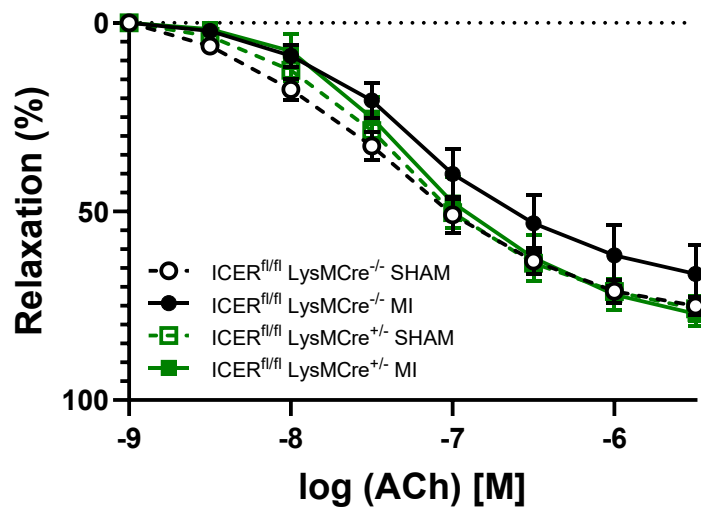


Abbildung 4-11: ACh-induzierte Relaxation isolierter Aortensegmente von ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-} und ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} Versuchstieren sieben Tage nach LAD-Ligatur bzw. SHAM-Operation. MI = Myokardinfarkt, ACh = Acetylcholin. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 5-10, Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.2.8.2 Endothelunabhängige Vasodilatation als Reaktion auf Nitroglycerin

Durch Hinzugabe von Nitroglycerin wurde die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Aortenringe geprüft. Die Versuchstiere mit kompromittierter ICER-Signalgebung zeigten eine unveränderte Gefäßantwort und somit keinen Hinweis auf eine glattmuskuläre Dysfunktion.

Ergebnisse

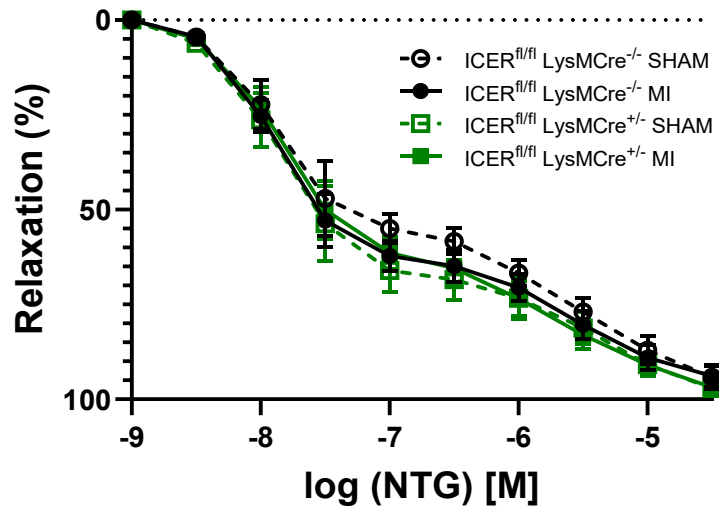


Abbildung 4-12: NTG-induzierte Relaxation isolierter Aortensegmente von ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-} und ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} Versuchstieren sieben Tage nach LAD-Ligatur bzw. SHAM-Operation. MI = Myokardinfarkt, NTG = Nitroglycerin. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 6-10, Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.2.9 RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker

Zur genaueren Charakterisierung der inflammatorischen Prozesse führten wir RT-PCR-Analysen von kardialem und aortalem Gewebe durch.

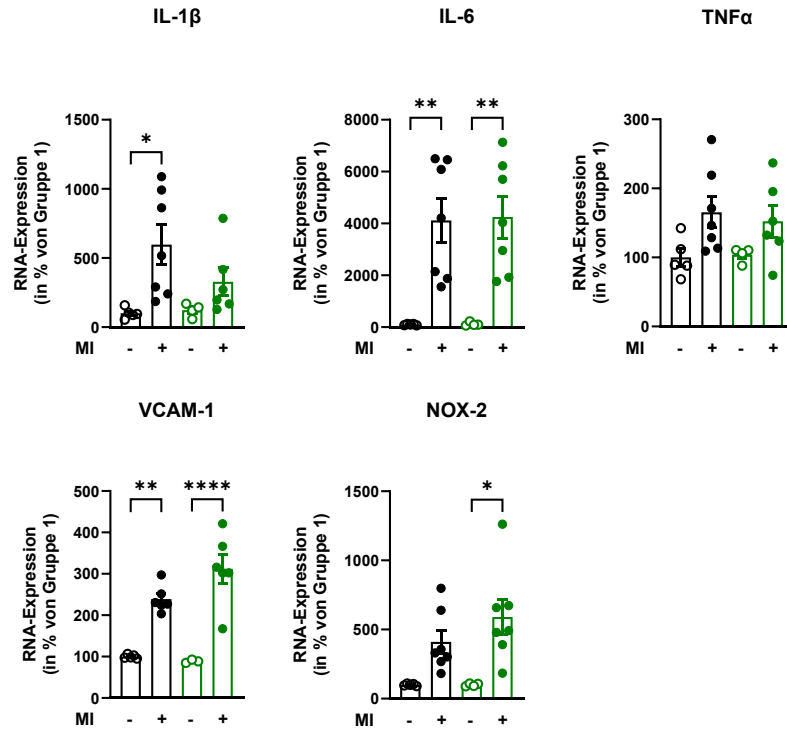
Die operative Infarktinduktion mittels permanenter LAD-Ligatur führte zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α im Herzwewebe. Auch die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 und der ROS-produzierenden NADPH-Oxidase (Nox-2) war im Infarktmodell gegenüber den SHAM-operierten Kontrolltieren signifikant gesteigert. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

Die Analyse der RNA-Expression monozytärer Adhäsionsmoleküle wie MCP-1 und VCAM-1 in aortalem Gewebe zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchstieren mit myelomonozytärer ICER-Deletion und den Wildtyp-Kontrollen. Auch hinsichtlich der Expression von Nox-2 konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen im Infarktmodell detektiert werden.

Ergebnisse

A: Herz

- ICER^{fl/fl} LysMCr^{e-/-}
- ICER^{fl/fl} LysMCr^{e+/-}



B: Aorta

- ICER^{fl/fl} LysMCr^{e-/-}
- ICER^{fl/fl} LysMCr^{e+/-}

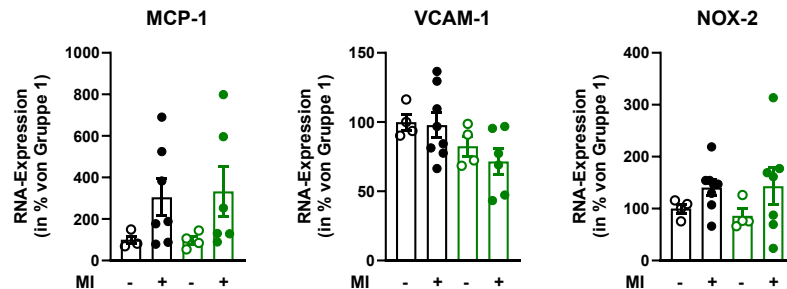


Abbildung 4-13: RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker in Herz- und Aortengewebe (ICER^{fl/fl} LysMCr^{e+/-}) sieben Tage nach LAD-Ligatur bzw. SHAM-OP. **A:** Expressionsanalyse von Interleukin 1β (IL-1β), Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNFα), *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und NADPH-Oxidase 2 (Nox-2) in kardialem Gewebe. **B:** Expressionsanalyse von *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), VCAM-1 und Nox-2 in Aortengewebe. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert ± SEM; n = 3-8, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test. ns = p > 0,05, * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001, **** = p ≤ 0,0001.

4.2.10 Restitution der myelomonozytären ICER-Expression durch Monozyten-Transplantation

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, zeigen die Versuchstiere mit myelomonozytärer ICER-Deletion eine gesteigerte kardiale Entzündungsantwort nach AMI. Dies geht mit einer Beeinträchtigung der kardialen Funktion sowie einer gesteigerten systemischen ROS-Bildung einher (siehe Abschnitt 4.2.3 und 4.2.7). In einer weiterführenden Studie wurde untersucht, ob der beschriebene Phänotyp der ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Versuchstiere nach LAD-Ligatur ursächlich auf das Fehlen ICER-kompetenter myelomonozytärer Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurden den ICER-kompromittierten Versuchstieren Monozyten ICER-kompetenter Mäuse (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) per Schwanzveneninjektion transplantiert. In den beiden Kontrollgruppen wurde jeweils NaCl-Lösung injiziert (Wildtypkontrolle: ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}, Negativkontrolle: ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}). Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in Abschnitt 3.2.5.

Der Transfer ICER-kompetenter Monozyten führte zu einer Wiederherstellung des kardialen Wildtyp-Phänotyps mit verbesserter systolischer und diastolischer Funktion (LVEF und LVEDV, siehe Abbildung 4-14A).

Darüber hinaus wurde auch die gesteigerte ROS-Bildung im Vollblut der Versuchstiere durch die Monozyten-Transplantation aufgehoben (siehe Abbildung 4-14B).

Ergebnisse

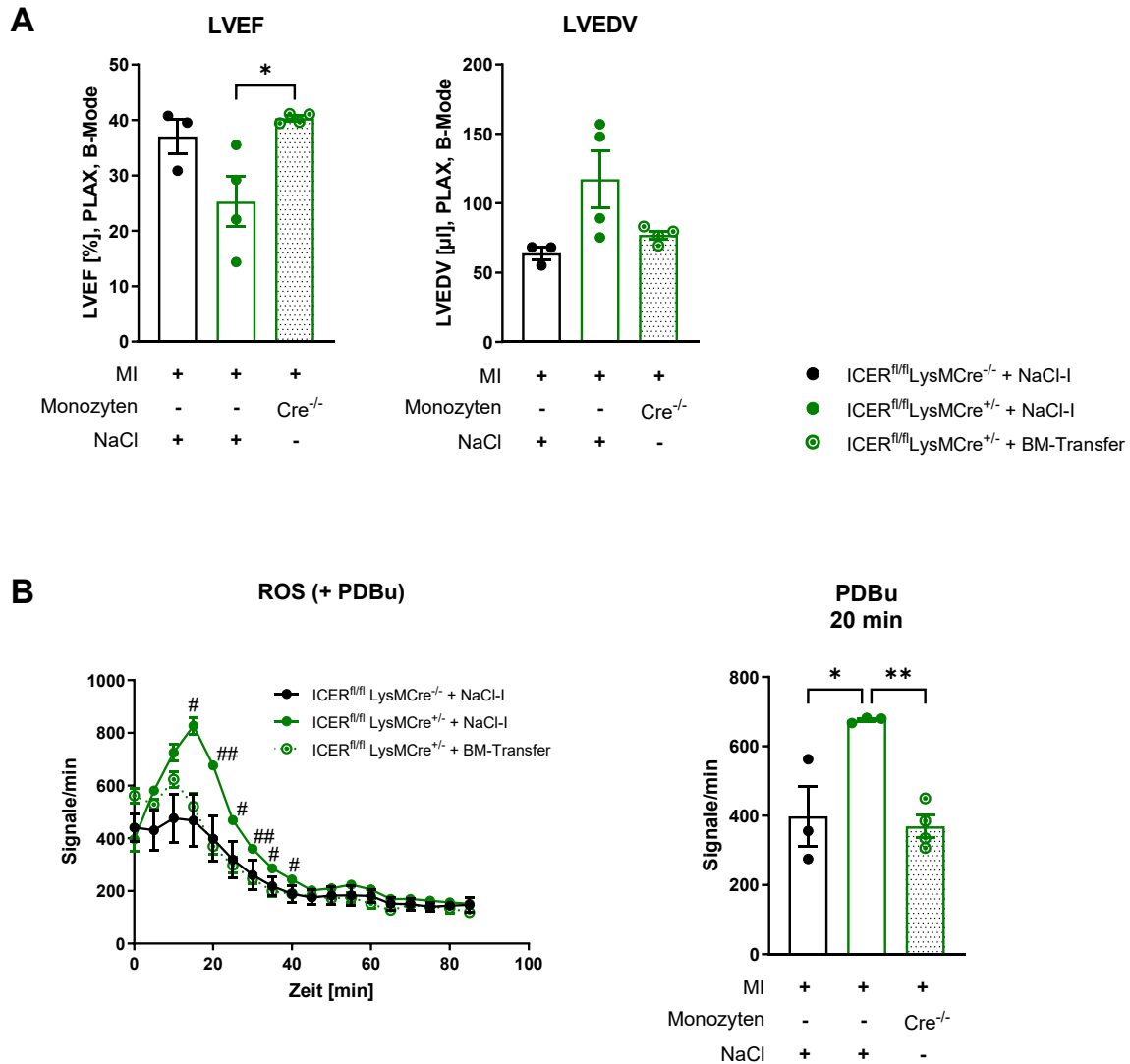


Abbildung 4-14: Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps durch Monozytentransfer. A: Darstellung von linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) und linksventrikulärem enddiastolischem Volumen (LVEDV) der Versuchsgruppen sechs Tage nach Monozyten-Transfer bzw. NaCl-Injektion und anschließender LAD-Ligatur; PLAX, B-Mode. MI = Myokardinfarkt (LAD-Ligatur), NaCl-I = NaCl-Injektion, BM = Knochenmark (*bone marrow*): Monozyten-Transfer. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 3-4, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$. **B:** PDBu-stimulierte ROS-Bildung im Vollblut der Versuchstiere. Links: Darstellung der Messwerte über 85 Minuten nach Stimulation mit PDBu. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 3-4, Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: # = $p \leq 0,05$ für ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} NaCl-I vs. ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} BM-Transfer, ## = $p \leq 0,01$ für ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} NaCl-I vs. ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-} BM-Transfer. Rechts: Messung 20 Minuten nach Stimulation mit PDBu. Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 3-4, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

4.3 Auswirkungen einer beeinträchtigten Azidose-Response-Signalgebung auf die kardiovaskuläre Funktion und Inflammationsantwort nach Myokardinfarkt

Wie in Abschnitt 4.1. dargestellt, konnten wir in Einzelzellsequenzierungsanalysen muriner kardialer Leukozyten nach operativer LAD-Ligatur eine gesteigerte Expression azidoseabhängiger Gene nachweisen. Arbeiten aus der Onkologie und Tumorbilogie haben die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren 65 und 132 (GPR65 und GPR132) als übergeordnete Steuerungs- und Vermittlungsfaktoren für den ICER-Stoffwechsel beschrieben ⁽¹³⁾.

Um die Bedeutung dieser azidosesensitiven Rezeptoren und Signalwege in der postischämischen Azidose des murinen Myokards genauer zu charakterisieren und eine mögliche Beeinflussung des ICER-Signalwegs zu untersuchen, führten wir vertiefende Studien mit GPR65- bzw. GPR132-defizienten Mäusen (GPR65^{-/-} bzw. GPR132^{-/-}) durch (Studie 3 und Studie 4). Nach operativer LAD-Ligatur bzw. SHAM-Operation wurde die kardiale Funktion und Inflammationsantwort unter anderem mittels hochfrequenter Kleintierechokardiografie, Durchflusszytometrie und RT-PCR-Analyse charakterisiert.

4.3.1 Echokardiografie

Am sechsten postoperativen Tag wurde die kardiale Funktion der Versuchstiere mittels Kleintierechokardiografie untersucht. Zur standardisierten Messung verschiedener Parameter erfolgte die Einstellung der parasternalen langen sowie kurzen Achse (PLAX, PSAX).

Es zeigte sich eine signifikante Beeinträchtigung der kardialen Funktion der LAD-operierten Versuchstiere gegenüber der SHAM-operierten Kontrollgruppe. Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine weitere Verschlechterung der kardialen Funktion durch die totale GPR65- bzw. GPR132-Depletion.

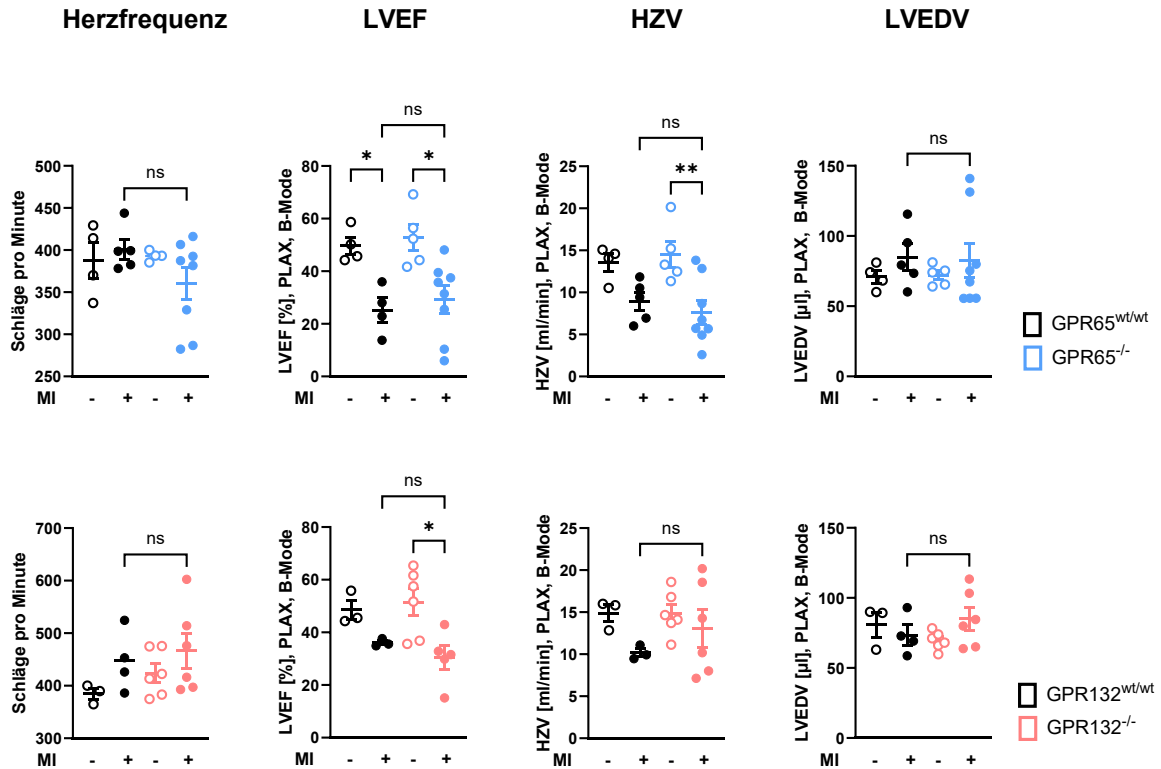


Abbildung 4-15: Echokardiografische Untersuchungsergebnisse (GPR65^{wt/wt}/GPR65^{-/-}, GPR132^{wt/wt}/GPR132^{-/-}): Darstellung von Herzfrequenz, linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF), Herzzeitvolumen (HZV) und linksventrikulärem enddiastolischem Volumen (LVEDV) der Versuchsgruppen: GPR65^{wt/wt} vs. -/- (obere Reihe), GPR132^{wt/wt} vs. -/- (untere Reihe), PLAX, B-Mode. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert ± SEM; n = 3-8, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = p > 0,05, * = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01.

4.3.2 Durchflusszytometrische Zellanalyse des Herzgewebes

Anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen wurde die Infiltration des kardialen Gewebes durch Immunzellen untersucht.

In den LAD-operierten Versuchsgruppen führte die myokardiale Ischämie zu einer gesteigerten Immunzellinfiltration. Verglichen mit den Wildtyp-Kontrolltieren zeigte die GPR65-depletierte Gruppe sieben Tage nach operativer LAD-Ligatur allerdings eine signifikant reduzierte Infiltration durch Leukozyten (mit Ausnahme der B-Lymphozyten). Dieser Trend ließ sich insbesondere bei pro- sowie antiinflammatorischen Monozyten (Ly6C^{high} und Ly6C^{low}), kardialen F4/80-positiven Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen nachweisen (dargestellt in Abbildung 4-16).

Ergebnisse

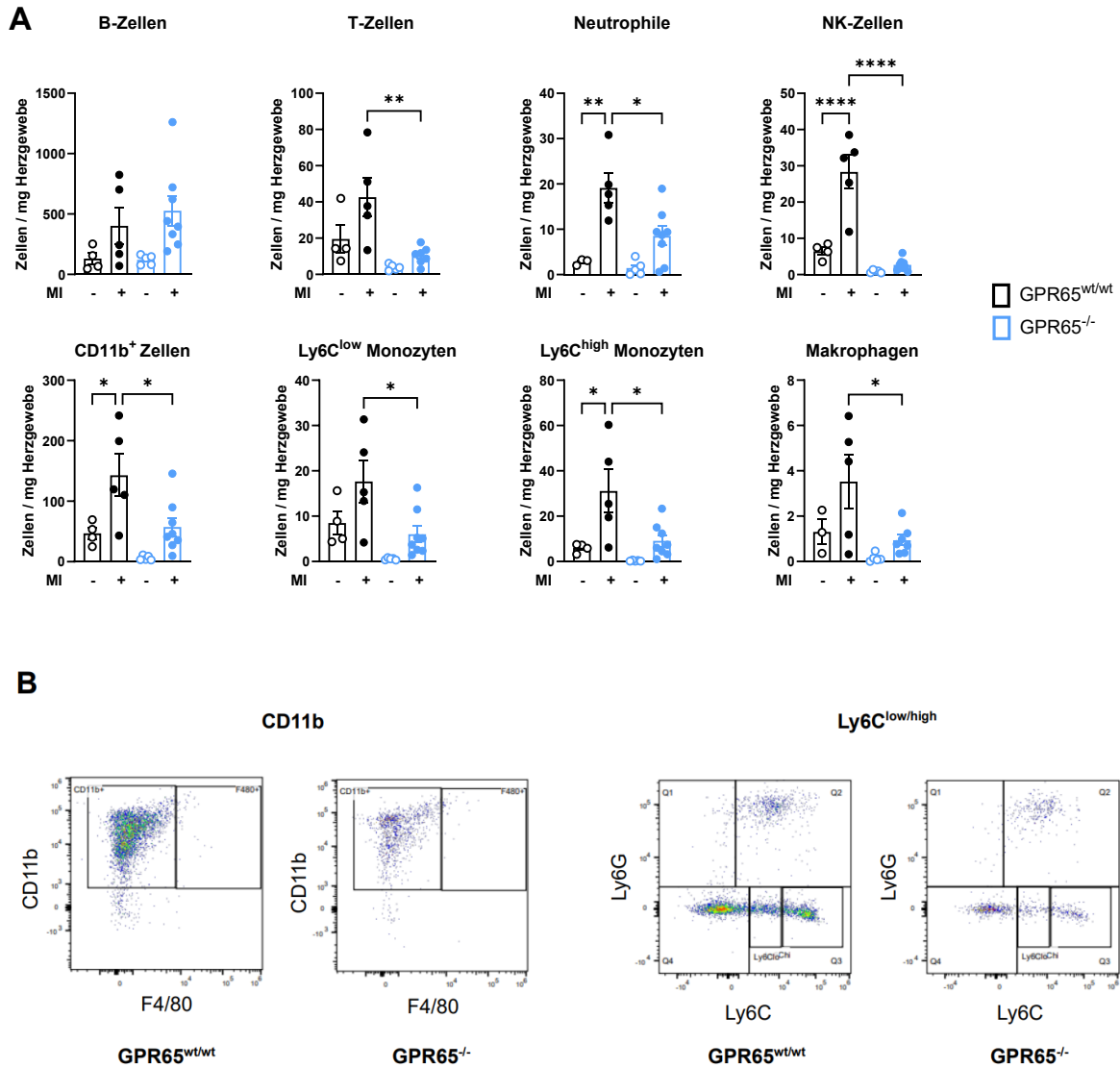


Abbildung 4-16: Durchflusszytometrische Analyse von kardialem Gewebe ($GPR65^{wt/wt}/GPR65^{-/-}$). **A:** Grafische Darstellung absoluter Zellzahlen von B220-positiven B-Lymphozyten, CD90.2-positiven T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD11b-positiven Zellen sowie von $Ly6C^{low-}$, $Ly6C^{high}$ -Monozyten und F4/80-positiven Makrophagen. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 4-8, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$. **B:** Versuchstiere sieben Tage nach operativer Ligatur der LAD: Auswahl repräsentativer durchflusszytometrischer Dotplots zur Darstellung CD11b-positiver sowie $Ly6C^{low-}$ (linker schwarzer Kasten in Q3) und $Ly6C^{high}$ -Monozyten (rechter schwarzer Kasten in Q3).

Die Versuchstiere mit totaler GPR132-Depletion zeigten in den durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls eine reduzierte Infiltration des kardialen Gewebes durch myeloide Immunzellen, jedoch ohne statistische Signifikanz (nicht abgebildet).

4.3.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies im Vollblut

Zur Quantifizierung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde venöses Vollblut der Versuchstiere am siebten postoperativen Tag mittels L-012-basierter Chemilumineszenz untersucht. Hierbei kam PDBu als ROS-Stimulans wie in Kapitel 3.2.4.2 beschrieben zum Einsatz.

Die GPR65-depletierten Versuchstiere zeigten nach LAD-Ligatur eine abgeschwächte ROS-Produktion (siehe Abbildung 4-17). Dagegen hatte die vollständige GPR132-Depletion keine signifikanten Auswirkungen auf die ROS-Antwort (nicht abgebildet).

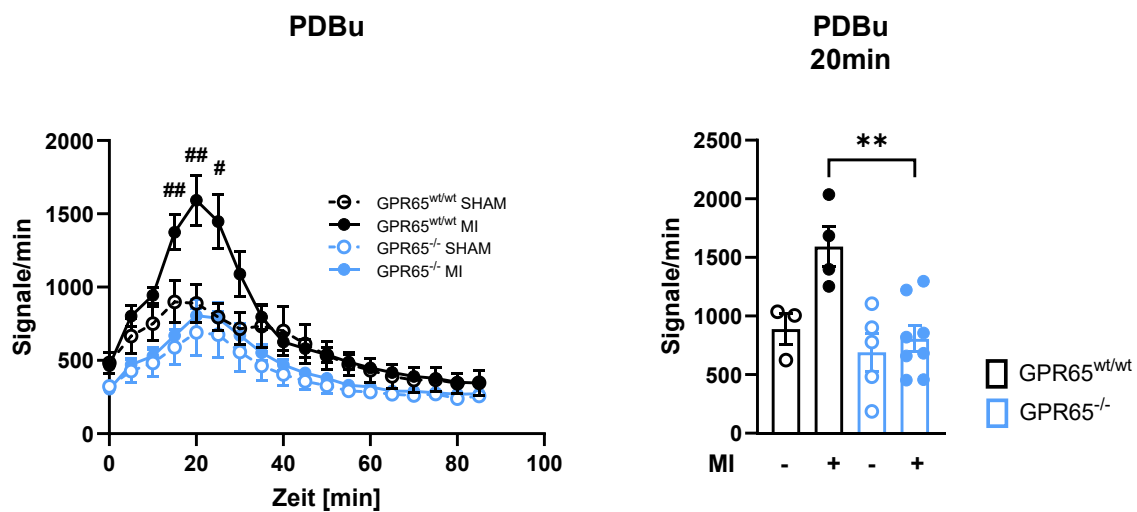


Abbildung 4-17: Detektion der PDBu-stimulierten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in venösem Vollblut mittels L-012-basierter Chemilumineszenz (GPR65^{wt/wt}/GPR65^{-/-}, GPR132^{wt/wt}/GPR132^{-/-}). Links: Darstellung der Messwerte über 85 Minuten nach Stimulation mit PDBu. Rechts: Messung 20 Minuten nach Stimulation mit PDBu. MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 3-8, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test: # = $p \leq 0,05$ für GPR65^{wt/wt} MI vs. GPR65^{-/-} MI, ## = $p \leq 0,01$ für GPR65^{wt/wt} MI vs. GPR65^{-/-} MI, ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

4.3.4 RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker im Herzgewebe

Mithilfe einer Real-Time-PCR wurde die RNA-Expression diverser Gene im kardialen Gewebe quantifiziert. Bei den Wildtyp-Versuchstieren (GPR65^{wt/wt} und GPR132^{wt/wt}) führte die LAD-Ligatur erwartungsgemäß zu einer gesteigerten Expression inflammatorischer Marker im Herzgewebe verglichen mit den Tieren, die einer SHAM-Operation unterzogen wurden. Diese signifikante Steigerung war weder in der Gruppe mit vollständigem GPR65-Knockout noch in der Gruppe mit vollständigem GPR132-

Knockout zu verzeichnen. So zeigte sich eine verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6, begleitet von einer reduzierten Expression des myeloiden Adhäsionsmoleküls MCP-1.

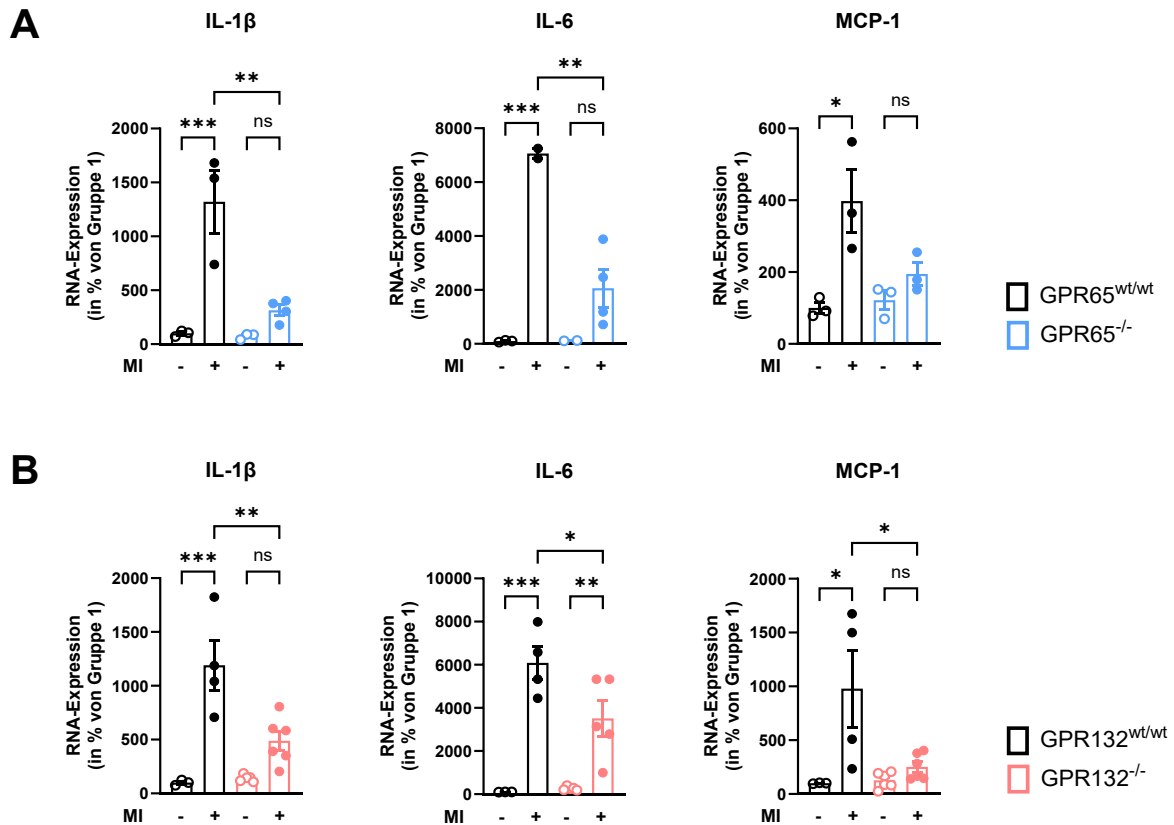


Abbildung 4-18: RNA-Expressionsanalyse inflammatorischer Marker im Herzgewebe (GPR65^{wt/wt}/GPR65^{-/-}, GPR132^{wt/wt}/GPR132^{-/-}) sieben Tage nach LAD-Ligatur bzw. SHAM-OP. Grafische Darstellung der Expression von Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) in Studie 3 (**A**: GPR65^{wt/wt} vs. -/-) bzw. Studie 4 (**B**: GPR132^{wt/wt} vs. -/-). MI = Myokardinfarkt (- = SHAM OP, + = LAD-OP). Angabe als Mittelwert \pm SEM; n = 3-6, Ordinary-one-way-ANOVA mit Tukey's multiple comparisons test. ns = p > 0,05, * = p \leq 0,05, ** = p \leq 0,01, *** = p \leq 0,001.

Die Ergebnisse sprechen für eine im Rahmen der vollständigen GPR65- bzw. GPR132-Depletion auftretende Beeinträchtigung der postischämischen kardialen Inflamationsantwort. Dies steht im Einklang mit der in Kapitel 4.3.2 dargestellten verminderten Infiltration proinflammatorischer und reparativer Immunzellen in das kardiale Gewebe der GPR65^{-/-} bzw. GPR132^{-/-}-Versuchstiere nach operativer Ligatur der LAD.

5 Diskussion

Die vorliegende Promotionsarbeit beleuchtet die Bedeutung des Transkriptionsfaktors ICER und übergeordneter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren vor dem Hintergrund der im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes auftretenden Gewebsazidose. Die Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte: Zunächst wird der Einfluss der Infarkt-induzierten Azidose auf die proinflammatorische Makrophagenpolarisierung und die Aktivierung pH-sensitiver Signalwege im Rahmen der frühen Entzündungsantwort betrachtet. Im zweiten Teil wird auf die funktionelle Relevanz des Transkriptionsfaktors ICER eingegangen, dessen Deletion in myelomonozytären Zellen mit einer prolongierten Entzündungsreaktion und einem gestörten Übergang zur Gewebereparatur einhergeht. Abschließend wird die Rolle der pH-sensitiven Rezeptoren GPR65 und GPR132 bei der postischämischen Immunzellrekrutierung und inflammatorischen Reaktion diskutiert.

5.1 Diskussion des Versuchsprinzips

5.1.1 Tierexperimentelle Modelle des Myokardinfarktes

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen weltweit an der Spitze der Todesursachenstatistik ⁽¹⁾. Aufgrund des maßgeblichen Anteils akuter Herzinfarkte an der kardiovaskulären Mortalität werden seit Jahrzehnten diverse Versuche zur Etablierung eines geeigneten Tiermodells des akuten Myokardinfarktes unternommen ⁽³¹⁹⁾. Im Laufe der Zeit hat sich hierbei die Maus als bevorzugtes Versuchstier etabliert. Neben Faktoren wie der großen Wurfgröße, vergleichsweise geringer Haltungskosten und kurzer Reproduktionsintervalle, stellt vor allem die breite Verfügbarkeit genetisch modifizierter Stämme einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Verwendung anderer Tierspezies dar ⁽²⁷⁷⁾.

Mausmodelle des AMI sollen die pathobiologischen und pathophysiologischen Prozesse, die im Rahmen einer myokardialen Ischämie beim Menschen ablaufen, möglichst realitätsgetreu imitieren, um zukünftige Therapieoptionen zu konzipieren und zu optimieren. Ein derart ideales Modell wurde bislang jedoch nicht entwickelt. Mausmodelle der Atherosklerose basieren zumeist auf der Fütterung einer speziellen fett- bzw. cholesterinreichen Diät oder einer genetischen Modifikation mit Auswirkungen auf den Cholesterinmetabolismus (z.B. Apolipoprotein-E-defiziente (ApoE^{-/-}) oder LDL-Rezeptor-defiziente (LDLR^{-/-}) Mausstämmen) ⁽³²⁰⁾. Diesen Modellen

gemein ist eine nur geringfügige Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien sowie die geringe Tendenz zur spontanen Plaqueruptur ⁽³²⁰⁻³²⁴⁾. Die fehlende Induzierbarkeit und schlechte Vorhersagbarkeit des Auftretens myokardialer Infarkte trägt darüber hinaus zur fehlenden Eignung dieser Modelle in der AMI-Forschung bei ⁽³¹⁹⁾.

Folglich haben sich operative Modelle zur Induktion eines Myokardinfarktes als wissenschaftlicher Standard etabliert. Auch hier wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Modelle beschrieben. Die kälteinduzierte Myokardschädigung durch Kryoverödung der LAD beruht auf einer nicht-ischämischen Genese und bildet somit nicht die Pathophysiologie eines Myokardinfarktes ab ⁽³²⁵⁻³²⁷⁾. Darüber hinaus kommt es durch den Kältereiz zu einer zusätzlichen starken Myokardschädigung mit pathophysiologischen Nebeneffekten, weshalb sich diese Methode nicht durchgesetzt hat ⁽³²⁸⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf die permanente LAD-Ligatur als Modell der myokardialen Ischämie zurückgegriffen. Die Myokardinfarktinduktion durch operative Ligatur einer Koronararterie wurde erstmals im Jahr 1954 von Johns und Olson beschrieben und seither stetig weiterentwickelt ⁽³²⁹⁻³³³⁾. Die vollständige und permanente Ligatur der *left anterior descending artery* führt zu einer sofortigen Ischämie des Gewebes unterhalb der Ligaturebene und stellt zusammen mit der temporären LAD-Ligatur im Ischämie-Reperfusion-Modell gegenwärtig das meistgenutzte Myokardinfarktmodell dar ⁽³³³⁻³³⁵⁾. Die Vorteile der operativen Koronarligatur liegen unter anderem in der Präzision bezüglich der Lokalisierung und Ausprägung des Infarktareals und in der unmittelbaren Terminierbarkeit des Auftretens des Myokardinfarktes ⁽³¹⁹⁾.

In der vorliegenden Arbeit wurde die permanente LAD-Ligatur mit einem primären Beobachtungszeitraum von sieben Tagen gewählt. Dieser Entschluss beruht auf der Annahme, dass sich die elementaren inflammatorischen Prozesse einschließlich der Umschaltung von inflammatorischer zu antiinflammatorisch-reparativer Signalgebung innerhalb der ersten Tage der Myokardischämie vollziehen. Zur Beurteilung des Langzeit-Phänotyps wurde darüber hinaus eine Studie mit einem Nachbeobachtungszeitraum von 28 Tagen durchgeführt.

5.1.2 Modelle der myelomonozytären Gendeletion

Myelomonozytäre Zellen sind zentrale Akteure im Prozess des kardialen Remodelings nach einer myokardialen Ischämie. Um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors ICER in der myelomonozytären Immunantwort des akuten Myokardinfarktes zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das LysM-Cre/loxP-System zur selektiven Deletion des Transkriptionsfaktors ICER in myelomonozytären Zellen verwendet. Die zugrunde liegende Cre/loxP-Rekombinationstechnologie ist ein weit verbreitetes Werkzeug zur selektiven Deletion ausgewählter Gene in definierten Zellpopulationen bzw. Geweben *in vivo* ^(270, 336). Alternative Methoden der selektiven Gendeletion wie das Flp-FRT-System (*Flippase-flippase recombination target*-System) haben sich unter anderem aufgrund der geringeren Effizienz der Rekombinase-Aktivität nicht durchgesetzt ⁽²⁶⁹⁾. Die zugrunde liegende Funktionsweise der Cre/loxP-Technik zur Ausschaltung spezifischer Gene ist in Abschnitt 3.2.2 detailliert beschrieben.

Im LysM-Cre-System wird die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Lysozym M-Promotors exprimiert. Lysozym M (LysM, Synonym: Lys2) ist ein myelomonozytärer Marker, welcher von murinen Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird ^(273, 274). Somit resultiert eine selektive Deletion des Zielgens in den genannten Zellreihen ohne Beeinflussung weiterer Zelltypen oder Gewebe, was die Untersuchung der ICER-Signalgebung in myelomonozytären Zellen ermöglicht ⁽²⁷³⁾. Ein weiterer Vorteil der LysM-Cre-vermittelten Gendeletion ist die Zuverlässigkeit und Stabilität des entstehenden Knockouts durch weitestgehende Unabhängigkeit von äußeren Einflüssen.

5.1.3 Limitationen des Versuchsprinzips

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit müssen einige Einschränkungen berücksichtigt werden. Bei der Einordnung der Ergebnisse ist zu beachten, dass eine Übertragung der im Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen trotz weitreichender Analogien zwischen humanem und murinem Organismus nicht uneingeschränkt möglich ist. So unterscheiden sich humane und murine Monozyten in ihrer Einteilung in Subpopulationen und in der Expression spezifischer Marker: Die Einteilung von murinen Monozyten in zwei Subpopulationen (Ly6C^{low} und Ly6C^{high}) anhand des Oberflächenantigens Ly6C findet beim Menschen kein unmittelbares Äquivalent ^(59, 116, 120, 127). Stattdessen unterscheidet man drei

humane Monozyten-Subpopulationen anhand der differentiellen Expression von CD14 und CD16 ^(119, 126, 127). Des Weiteren liefern Einzelzellsequenzierungen Hinweise auf eine vierte Population, was eine größere Diversität der humanen Monozyten nahelegt als früher angenommen ⁽³³⁷⁾. Dies kann die Translation von im murinen Organismus gewonnenen Studienergebnissen auf den humanen Kontext einschränken.

Darüber hinaus stellt die operative LAD-Ligatur lediglich ein Modell zur Imitation eines Myokardinfarktes dar. Typ-1-Myokardinfarkte entstehen beim Menschen in der Regel infolge einer atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankung. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle weisen jedoch keinen atherosklerotischen Phänotyp auf, sondern basieren auf einer mechanisch induzierten, okklusiven Ischämie. Zudem beschrieben Zimmer et al. im Jahr 1990, dass die resultierenden Infarkte teilweise stark in ihrer Größe variieren und dass kleine bis mittelgroße Infarkte überraschend geringe hämodynamische Auswirkungen auf den Organismus haben ⁽³³⁸⁾. Eine reproduzierbare Infarktgröße ist für die nachfolgenden Analysen allerdings essenziell. Aufgrund der anatomischen Variabilität des Gefäßverlaufs der LAD ist dies trotz der Verwendung eines standardisierten Operationsprotokolls nicht immer möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Infarktgröße daher durch visuelle Kontrolle anhand des Ablassens des Myokards als Reaktion auf die Gefäßligatur überprüft. Darüber hinaus wurde die kardiale Funktion mittels echokardiografischer Untersuchungen quantifiziert und Ausreißer von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Narkose und die Thorakotomie stellen für die Versuchstiere einen nicht zu vernachlässigenden Stressor und Inflammationsreiz dar. Um Operations- und Narkose-assoziierte Störvariablen zu eliminieren, wurden die Tiere der Kontrollgruppen einer SHAM-Operation unterzogen. Zudem wurden durch die präoperative Enthaarung mit einem elektrischen Rasierer und die zusätzliche Verwendung einer Enthaarungscreme mit anschließender gründlicher Hautdesinfektion die Voraussetzungen für ein keimarmes Operationsfeld geschaffen. Auch das standardisierte postoperative Analgesieprotokoll diente dazu, die oben genannte Limitation zu minimieren. Die intraperitoneale Injektion der Narkosemedikamente wurde gewichtsadaptiert durchgeführt, um auch geringfügige Fehldosierungen sowie eine ergebnisverzerrende Toxizität der Anästhetika auszuschließen. Darüber hinaus erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose durch Beatmung mit einem Sauerstoff-Isfluran-Gemisch, was eine schnelle Narkosebeendigung mit einer Rekonvaleszenzzeit von wenigen Minuten

gewährleistete. Zur Vermeidung von Störeffekten durch eine postoperative Hypothermie wurden die Käfige aller Tiere nach der Operation vorübergehend auf Wärmeplatten gelagert und zusätzlich mit Rotlichtlampen gewärmt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollten darüber hinaus einige Limitationen der verwendeten Methode zur myelomonozytären ICER-Deletion beachtet werden. Monozyten und Makrophagen zeichnen sich durch ihre enorme Heterogenität und Plastizität aus und lassen sich daher nicht durch einen einzelnen spezifischen Marker charakterisieren. Trotz erheblicher Bemühungen zur Etablierung Monozyten- und Makrophagen-spezifischer Knockout-Mausstämme, weisen alle derzeit verfügbaren Stämme Einschränkungen hinsichtlich ihrer Deletionseffizienz oder der spezifischen Zielgenauigkeit für Monozyten und Makrophagen auf ⁽²⁷³⁾. In der vorliegenden Arbeit wurde das LysM-Cre/loxP-System zur selektiven Deletion des Transkriptionsfaktors ICER in myelomonozytären Zellen verwendet. LysM ist ein Marker für myelomonozytäre Zellen und somit nicht Makrophagen-spezifisch: Neben murinen Monozyten und Makrophagen exprimieren auch Granulozyten LysM ^(273, 274). Dies sollte bei der Einordnung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Alternative Zielstrukturen des Cre/loxP-Systems zur spezifischen Gendeletion in Monozyten bzw. Makrophagen sind unter anderem Csf1r-Cre (Zielstruktur CD115), CD11b-Cre, F4/80-Cre oder CX3CR1-Cre. Diese weisen jedoch entweder eine geringere Deletionseffizienz der Cre-Rekombinase oder eine ungenügende Spezifität für die Zielzellen auf, sodass sie derzeit nicht als Mittel der Wahl eingesetzt werden ^(273, 274, 339).

Des Weiteren sind toxische *off-target*-Effekte der Cre-Rekombinase durch unspezifische Interaktion von Cre mit genomischer DNA beschrieben. Für LysM-Cre finden sich hierfür in der Literatur jedoch keine Hinweise ^(269, 273, 340). Um darüber hinaus das Risiko unerwünschter Effekte durch die Expression der Rekombinase zu minimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine heterozygote Cre-Expression gewählt. Zum Ausschluss potenzieller Cre-assoziiierter Störvariablen wurde zudem sowohl im LAD- als auch im SHAM-operierten Versuchsaarm eine Cre-negative Kontrollgruppe (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) etabliert.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Azidose als regulatorischer Faktor der proinflammatorischen Makrophagenpolarisierung im postischämischen kardialen Remodeling

Die koronare Herzerkrankung und der akute Myokardinfarkt tragen maßgeblich zur kardiovaskulären Mortalität bei ⁽²¹⁾. Durch Fortschritte in der Akutversorgung und die Optimierung pharmakologischer Therapieprinzipien hat sich die Prognose nach AMI mit einer 30-Tage-Überlebensrate von über 90 % in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert ⁽³⁾. Dennoch belegte die Herzinsuffizienz nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2023 den ersten Platz der häufigsten Hauptdiagnosen in deutschen Krankenhäusern ⁽³⁴¹⁾. Die Verhinderung der Entwicklung einer postischämischen Herzinsuffizienz stellt somit einen besonderen Fokus aktueller Forschungsvorhaben dar. Das kardiale Remodeling als Folge eines Myokardinfarktes bietet hierbei vielfältige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, kommt es nach AMI zu charakteristischen Inflammationsprozessen unter Beteiligung des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Zur genaueren Charakterisierung der zellulären Veränderungen und insbesondere der Rolle azidoseabhängiger Signalwege und des Transkriptionsfaktors ICER führten wir Einzelzellsequenzierungsanalysen kardialer CD45-positiver Zellen im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt durch. In Übereinstimmung mit der Literatur bestätigen unsere Ergebnisse die Beteiligung unterschiedlicher Zellpopulationen in den verschiedenen Stadien des kardialen Remodelings (siehe Abbildung 4-1). Makrophagen am Tag 1 unterscheiden sich hierbei deutlich in ihrem Phänotyp von allen anderen Zeitpunkten, während die Makrophagen an Tag 3 und Tag 7 dem Phänotyp des Ausgangszustandes ähnlicher sind. Diese Erkenntnis wurde bereits von Mouton et al. beschrieben ⁽¹⁴⁶⁾.

In der frühen postischämischen Phase dominieren proinflammatorische Prozesse, welche dem Abbau und der Phagozytose von extrazellulärer Matrix und nekrotischen Zellen dienen ^(21, 59). Die in diversen Publikationen beschriebene initiale Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen spiegelt sich in unseren am ersten Tag nach AMI erhobenen Sequenzierungsanalysen wider. Auch die beginnende Apoptose der Neutrophilen ab dem dritten Tag lässt sich in unseren Sequenzierungsdaten nachvollziehen ⁽²¹⁾.

Durch den Nachweis von Makrophagenpopulationen mit unterschiedlichem Genexpressionsprofil unterstreichen unsere Daten darüber hinaus die phänotypische Diversität der Makrophagen. Auch Mouton et al. analysierten die Transkriptionsprofile muriner Makrophagen am ersten, dritten und siebten Tag nach Myokardinfarkt und fanden überlappende Profile der verschiedenen Populationen. Dabei exprimiert kein Makrophagencluster ausschließlich M1- bzw. M2-typische Marker, was die Vorstellung eines phänotypischen Kontinuums der unterschiedlichen Polarisierungszustände unterstreicht. Die funktionelle Plastizität von Makrophagen wird wesentlich durch Signale aus ihrer Mikroumgebung gesteuert. Abhängig von lokalen Stimuli wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Interaktionen oder metabolischen Bedingungen können Makrophagen in verschiedene Aktivierungszustände übergehen, die von proinflammatorischen (M1-ähnlichen) bis hin zu reparativen und antiinflammatorischen (M2-ähnlichen) Profilen reichen ^(12, 136, 138, 139). Ein in diesem Zusammenhang bislang wenig beachteter, jedoch zunehmend an Bedeutung gewinnender Faktor ist die Gewebsazidose. Eine Ansäuerung des interstitiellen Gewebes ist Ausdruck vieler pathologischer Zustände ^(210, 219). Wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, kommt es auch im Rahmen der akuten Minderperfusion des Myokards zu einem raschen, insbesondere das extrazelluläre Kompartiment betreffenden, pH-Abfall ^(14, 225). Diese saure Mikroumgebung könnte nicht nur einen chemotaktischen Reiz für die Einwanderung myeloider Zellen darstellen, sondern auch aktiv zur Polarisierung infiltrierender Makrophagen beitragen. Auf diese Weise beeinflusst die Azidose potenziell das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zelltypen und damit die Ausprägung der postischämischen Immunantwort sowie den weiteren Verlauf des kardialen Remodelings. Die vorliegende Promotionsarbeit beleuchtet erstmalig die Rolle azidoseabhängiger Prozesse in myelomonocytyären Zellen im zeitlichen Verlauf nach einem akuten Myokardinfarkt. Ein Verständnis dieser Mechanismen kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung von ischämiebedingten Herzschäden beitragen.

Daher untersuchten wir die anhand von Genexpressionsprofilen identifizierten Zellcluster der Wildtyp-Versuchstiere hinsichtlich der Expression azidoseabhängiger Signalwege (siehe Abbildung 4-1). Wir beobachteten, dass insbesondere bis zum dritten Tag nach der Myokardinfarktinduktion eine verstärkte Aktivierung azidoseabhängiger Signalwege auftritt. Zellpopulationen, die diese initiale Zunahme der Azidose-Signalgebung zeigten, wiesen zusätzlich ein überwiegend

proinflammatorisches Profil auf. Es ist daher davon auszugehen, dass die Wahrnehmung der Infarkt-induzierten Gewebsazidose und die daraus folgende Aktivierung azidoseabhängiger Signalwege an der Entstehung und Regulation der proinflammatorischen Umgebung und der Initiation der postischämischen inflammatorischen und regenerativen Prozesse nach einem Myokardinfarkt beteiligt sind.

5.2.2 Beeinträchtigte kardiale Funktion durch myelomonozytäre ICER-Defizienz als Indiz für einen gestörten Übergang von proinflammatorischer zu reparativer Signalgebung nach Myokardinfarkt

Wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt, stellt die postischämische Azidose im Myokard einen potenziell bedeutsamen Faktor dar, der die Polarisierung von Makrophagen beeinflusst und somit die Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt steuert. In diesem Zusammenhang rückt der Transkriptionsfaktor ICER in den Fokus, dessen Expression in verschiedenen Zelltypen pH-abhängig reguliert wird. Vorarbeiten aus der Onkologie und Tumorbologie zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende Makrophagen (BMDM: *bone marrow-derived macrophages*) eine höhere Expression von ICER-mRNA aufweisen, sofern sie in einem sauren Medium kultiviert werden ⁽¹³⁾. Bohn et al. beschreiben darüber hinaus, dass die saure Mikroumgebung von Tumoren durch GPCRs auf Tumor-assoziierten Makrophagen wahrgenommen wird und über eine Steigerung der Adenylatzyklase-Aktivität zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel führt. In der Folge lässt sich eine gesteigerte ICER-Expression in TAM detektieren, was zu einer antiinflammatorischen Polarisierung dieser Zellpopulation führt. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten antiinflammatorisch differenzierter Makrophagen hat ein gesteigertes Tumorstadium zur Folge. Die inflammatorische Differenzierung von TAMs ist für eine effiziente Tumorkontrolle folglich essenziell ⁽¹³⁾.

Auch in kardiovaskulären Fragestellungen kommt dem Transkriptionsfaktor ICER eine entscheidende Rolle zu. ICER wird durch erhöhte cAMP-Spiegel induziert und wirkt als starker Repressor von Genen, welche CRE enthalten und somit auf cAMP-abhängige Signale reagieren ^(192, 193). Studien haben gezeigt, dass die Expression von ICER im Herzen nach einem Myokardinfarkt zunimmt ^(192, 193). Dies steht im Einklang mit den von uns erhobenen Sequenzierungsanalysen (siehe Abschnitt 4.1). Myers et al. zeigten, dass eine derartige Steigerung der ICER-Expression eine Unterdrückung

von micro-RNA-1 (miR-1) bewirkt, was über die Beeinflussung von Ionenströmen zu einer Verlängerung der Aktionspotenzialdauer und damit zu einem erhöhten Risiko für Arrhythmien führt ⁽³⁴²⁾. Darüber hinaus ist bekannt, dass ICER die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 unterdrückt, was die Apoptose von Kardiomyozyten fördert und zur Verschlechterung der Herzfunktion beiträgt ^(188, 191, 193). Die Bedeutung von ICER im Zusammenhang mit der postischämisch auftretenden myokardialen Azidose ist dagegen bislang unzureichend erforscht. Obwohl ICER in verschiedenen zellulären Kontexten untersucht wurde, gibt es derzeit keine spezifischen Studien, die die Folgen einer selektiven Deletion von ICER in myelomonozytären Zellen wie Monozyten und Makrophagen detailliert beschreiben. Daher untersuchten wir die Auswirkungen einer myelomonozytären ICER-Deletion auf die kardiale Inflamationsantwort nach Myokardinfarkt.

Anhand von RNA-Sequenzierungsanalysen erstellten wir ein Profil der myelomonozytären Zellcluster im Myokard. Zur Einteilung der Zellen in distinkte Cluster und zur weiteren Interpretation der Genexpressionsprofile orientierten wir uns an Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Garlapati et al. 2024 ⁽¹⁷⁸⁾). Die Expression der Marker Olfml-3 und TREM2 ist mit einer protektiven Rolle im postischämischen Remodeling assoziiert. Olfml-3 ist am interzellulären Zusammenspiel beteiligt und spielt eine wesentliche Rolle in der Angiogenese ⁽¹⁷⁸⁾. TREM2-positive Makrophagen, die in der späten Phase nach Myokardinfarkt vermehrt auftreten, gelten als antiinflammatorische Populationen, die zu einem adaptiven Remodeling beitragen ^(178, 343, 344). Zellpopulationen mit erhöhter Expression von TREM1, Fn1 und F7 wurden hingegen als proinflammatorisch und destruktiv eingestuft. TREM1- und Fn1-positive Makrophagen sind eng mit einem maladaptiven Remodeling nach Myokardinfarkt verknüpft, während der Gerinnungsfaktor VII über ein TF-FVIIa-PAR2-Signaling die proinflammatorische Polarisierung von Makrophagen begünstigt und zur Entstehung einer kardialen Fibrose beiträgt ⁽¹⁷⁸⁾.

Unsere Daten belegen, dass die fehlende ICER-Expression in Monozyten und Makrophagen zu einer Verschiebung des Phänotyps dieser Zellen führt (siehe Abbildung 4-8). Hierbei kommt es insbesondere zu einer Abnahme derjenigen Cluster, welche sich durch die Expression protektiver Gene auszeichnen (Cluster 1, 7, 9 und 11 in Abbildung 4-8, siehe auch Abbildung 4-9). Eine Zunahme proinflammatorischer Zellpopulationen ist zwar nicht eindeutig nachzuweisen – durch die signifikante

Reduktion der reparativen Zellcluster kommt es in der Summe dennoch zu einer gesteigerten kardialen Entzündungsantwort nach MI.

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass die myelomonozytäre Deletion von ICER zu einem maladaptiven kardialen Remodeling nach AMI führt, da der fehlende ICER-gesteuerte Übergang von einer proinflammatorischen zu einer reparativen Makrophagenpolarisierung den Reparaturprozess im postischämischen Myokard behindert. Die Beurteilung der kardialen Funktion mittels hochfrequenter Kleintierechokardiografie unterstützt diese Annahme: ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Versuchstiere zeigen eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Auswurfleistung (siehe Abbildung 4-4). Diese führt jedoch nicht zu einer Abnahme des Gesamtüberlebens am siebten Tag (siehe Abbildung 4-3). Auch über einen längeren Nachbeobachtungszeitraum von 28 Tagen zeigt sich dieser Phänotyp mit eingeschränkter Pumpfunktion bei unverändertem Gesamtüberleben stabil ohne Hinweise auf eine Erholung der kardialen Funktion (siehe Abbildung 4-5). Diese Beobachtung unterstützt unsere Hypothese, dass das Fehlen der ICER-Expression die initiale Inflammationsreaktion nach AMI nicht beeinflusst, jedoch den Übergang zu reparativen Signalwegen behindert. Langfristig könnte dies zu einer verstärkten Fibrosierung des Herzmuskels führen, da ICER unter anderem an zellulären Prozessen wie Apoptose und Differenzierung beteiligt ist ⁽¹⁸⁸⁾. Auch die in Abschnitt 4.2.4 dargestellten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen stützen diese Annahme: Während es infolge des AMI zu einer signifikanten Zunahme der Ly6C^{high} Monozyten im ischämischen Myokard kommt, bleibt ein entsprechender Anstieg der reparativen Ly6C^{low}-Monozyten aus (siehe Abbildung 4-6). Der proinflammatorische Phänotyp der ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Versuchstiere drückt sich außerdem durch eine gesteigerte systemische ROS-Bildung aus (siehe Abbildung 4-10).

Konsistent mit vorherigen Veröffentlichungen zeigen sowohl die Tiere der Kontrollgruppe als auch die ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Gruppe eine nach LAD-Ligatur gesteigerte Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α im Herzgewebe ⁽²¹⁾. Dass der beschriebene proinflammatorische Phänotyp der ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Tiere nicht auf eine absolute Zunahme proinflammatorischer Zytokine und Prozesse, sondern auf eine fehlende Umschaltung zur reparativen Signalgebung zurückzuführen ist, wird durch RNA-Expressionsanalysen inflammatorischer Marker untermauert: Zwischen den beiden Genotypen (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-} und ICER^{fl/fl}

LysMCre^{+/-}) konnten keine Unterschiede in der Expression ausgewählter proinflammatorischer Marker festgestellt werden (siehe Abbildung 4-13).

Einschränkend ist anzumerken, dass der beschriebene Phänotyp im Kontrast zur intakten endothelialen Funktion steht: In isometrischen Tonusstudien zeigten die Versuchstiere mit myelomonozytärer ICER-Deletion keine Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation.

Um zu überprüfen, ob der oben beschriebene Phänotyp auch ursächlich auf das Fehlen ICER-kompetenter myelomonozytärer Zellen zurückzuführen ist, wurden den ICER-kompromittierten Versuchstieren Monozyten ICER-kompetenter Mäuse (ICER^{fl/fl} LysMCre^{-/-}) per Schwanzveneninjektion transplantiert. Dies führte zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps mit verbesserter kardialer Funktion und reduzierter systemischer ROS-Bildung. Somit ist anzunehmen, dass die beschriebenen Veränderungen der ICER^{fl/fl} LysMCre^{+/-}-Tiere tatsächlich auf dem Fehlen ICER-kompetenter Monozyten beruhen.

Abweichend von unseren Ergebnissen zeigt eine Studie von Ma et al., dass die Behandlung mit Valsartan nach AMI zu einer Reduktion der ICER-Expression führt, was mit einer Verbesserung der Herzfunktion einhergeht ⁽¹⁹³⁾. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ICER eine Schlüsselrolle im postischämischen Remodeling spielt und als potenzielles therapeutisches Target für die Verbesserung der kardialen Funktion nach MI dienen könnte. Weitere Studien sind erforderlich, um die genauen Mechanismen und die therapeutische Relevanz der ICER-Modulation in diesem Kontext zu verstehen.

5.2.3 pH-sensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Remodelingprozess nach akutem Myokardinfarkt

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, kommt es im Rahmen einer akuten Myokardischämie zu komplexen zellulären Prozessen, die eine Reorganisation des Infarktareals zur Folge haben. Insbesondere im Rahmen der initialen Inflammationsantwort kommt es zu einer Ansäuerung des myokardialen Gewebes (siehe Kapitel 2.4.2). Bislang ist die spezifische Funktion der psGPCRs im postischämischen Myokard noch unzureichend erforscht.

Nagasaka et al. untersuchten die Rolle des Rezeptors GPR65 im Mausmodell des akuten Myokardinfarkts ⁽²⁵¹⁾. Sie zeigten, dass es nach einem Infarkt zu einer Steigerung der GPR65-Expression im Myokard kommt. Diese Hochregulation

beschränkt sich auf das Infarktareal und ist im umliegenden, nicht-infarzierten Myokard sowie im Myokard der Kontrolltiere nicht nachweisbar. Der deutlichste Anstieg war in der frühen postischämischen Phase detektierbar. GPR65-defiziente Mäuse zeigten bei gleicher Infarktgröße eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe signifikant schlechtere Herzfunktion und eine gesteigerte Mortalität. Zudem fand sich eine erhöhte Expression von CCL20 (*CC-chemokine ligand 20*), dem Liganden für CCR6 (*C-C motif chemokine receptor 6*), welche mit einer gesteigerten Infiltration CCR6-exprimierender T-Zellen einherging ⁽²⁵¹⁾. Diese sezernieren unter anderem die Zytokine IL-17A und IFN- γ , welche am kardialen Remodeling nach einem Myokardinfarkt beteiligt sind. Eine exzessive IL-17A-Freisetzung ist mit einer gesteigerten Apoptoserate sowie vermehrter Fibrosierung des Gewebes assoziiert ^(345, 346). In der Zusammenschau der Erkenntnisse von Nagasaka et al. scheint GPR65 durch die Hemmung der Infiltration CCR6-positiver, IL-17A-produzierender T-Zellen zur Kardioprotektion im Remodelingprozess nach AMI beizutragen ⁽²⁵¹⁾.

Eine vergleichbare kardioprotektive Funktion konnten Russell et al. auch für den Rezeptor GPR68 nachweisen ⁽²²⁴⁾. Sie demonstrierten, dass sich die kardiale GPR68-Expression vornehmlich auf das subepikardiale murine Myokard konzentriert. Im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes kommt es zu einer weiteren Akkumulation GPR68-positiver Zellen im Subepikard. Diese GPR68-exprimierenden Kardiomyozyten bilden eine protonensensitive zelluläre „Pufferzone“, die das Infarktareal umgibt und das vitale Myokard vom ischämischen, sauren Infarktkern abschirmt. Die überlebenden subepikardialen Kardiomyozyten in unmittelbarer Nähe eines großen transmuralen Infarkts zeigten ausnahmslos hohe GPR68-Expressionslevel. Folglich scheint der Rezeptor GPR68 durch eine azidosevermittelte Aktivierung zur Förderung des Kardiomyozyten-Überlebens im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes beizutragen ⁽²²⁴⁾.

Auch für GPR132 ist eine Beteiligung an der Rekrutierung von Entzündungszellen und der ablaufenden Inflammationskaskade beschrieben. Kern et al. postulierten, dass der GPR132-Rezeptor für die chemotaktische Rekrutierung und Positionierung von Makrophagen in einer proinflammatorischen Mikroumgebung von entscheidender Bedeutung ist ⁽²⁵⁸⁾. In einem Zymosan-induzierten Inflammationsmodell zeigten GPR132-Knockout-Mäuse eine reduzierte Anzahl proinflammatorischer M1-Makrophagen im entzündeten Gewebe bei insgesamt unveränderter Gesamtzahl der

Makrophagen. Die Aktivierung von GPR132 allein war jedoch nicht ausreichend, um eine M1-Polarisierung nativer Makrophagen zu induzieren ⁽²⁵⁸⁾.

5.2.3.1 Ungeklärte Bedeutung der Rolle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren im postischämischen kardialen Remodeling

Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes stellen einen entscheidenden regulatorischen Faktor für zelluläre Prozesse und Stoffwechselaktivitäten dar ⁽²²³⁾. In diesem Zusammenhang zeigten Bohn et al., dass neben der pH-abhängigen Expression des Transkriptionsfaktors ICER auch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR132 und insbesondere GPR65 unter sauren Bedingungen vermehrt exprimiert werden ⁽¹³⁾. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurden GPR65 und GPR132 in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Beide Rezeptoren gehören zur Gruppe der Protonensensoren, die extrazelluläre pH-Veränderungen detektieren und an der Steuerung inflammatorischer Signalwege beteiligt sind (siehe Abschnitt 2.4.3). Vorangehende Studien weisen auf eine zentrale Rolle von GPR65 in der postischämischen Immunantwort hin und unterstreichen dessen protektive Funktion durch Suppression inflammatorischer Prozesse (siehe Abschnitt 5.2.3) ^(221, 251, 254).

Dagegen resultierte das Fehlen von GPR132 in einer von Osthues et al. durchgeführten Studie zu Nervenverletzungen in einer abgeschwächten Inflammationsantwort mit reduzierter Infiltration CD45-positiver Immunzellen und verringerter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren im geschädigten Gewebe ⁽²⁶⁵⁾.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Mäuse mit vollständigem GPR65- bzw. GPR132-Knockout einer permanenten Ligatur der LAD unterzogen. Die in Abschnitt 4.3 beschriebenen Ergebnisse unserer Studien legen nahe, dass eine Unterbrechung der Azidosewahrnehmung durch Fehlen von GPR65 bzw. GPR132 zu einer Beeinträchtigung der inflammatorischen Antwort und Zellrekrutierung im postischämischen kardialen Remodeling führt. In durchflusszytometrischen Analysen detektierten wir eine signifikant reduzierte Immunzellinfiltration in das infarzierte Myokard, begleitet von einer verminderten Expression des für die Rekrutierung von Immunzellen wichtigen Adhäsionsmoleküls MCP-1. Darüber hinaus zeigten die GPR65- bzw. GPR132-defizienten Versuchstiere eine reduzierte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6 bei ausbleibender Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies im Blut nach MI (siehe Abbildung 4-16, Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18).

Die fehlende zelluläre und humorale Entzündungsreaktion nach AMI lässt eine Beteiligung der untersuchten Rezeptoren an der Initiation der postischämischen Inflammationsprozesse vermuten. Diese Annahme deckt sich mit der in Abschnitt 5.2.1 diskutierten Rolle azidosensibler Signalwege in der frühen Phase nach AMI.

Entgegen unseren Erwartungen zeigten die GPR65^{-/-}- und GPR132^{-/-}-Versuchstiere eine unbeeinträchtigte kardiale Funktion. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese ambivalenten Ergebnisse ist, dass ein konstitutioneller Knockout die zelltypspezifischen Funktionen der Rezeptoren überdeckt. Die Wirkung dieser Rezeptoren könnte insbesondere in spezifischen Immunzellsubtypen – etwa myelomonozytären Zellen – eine größere Relevanz für die postischämische Entzündungsreaktion besitzen. Vor diesem Hintergrund erscheinen weiterführende Untersuchungen mit konditionalen Knockout-Modellen, vergleichbar mit unseren Vorexperimenten zur ICER-Deletion in myeloiden Zellen, sinnvoll.

Die oben beschriebenen Ergebnisse fielen in Studie 3 (GPR65^{wt/wt} vs. GPR65^{-/-}) deutlicher aus als in Studie 4 (GPR132^{wt/wt} vs. GPR132^{-/-}). Dieser Unterschied lässt sich vermutlich durch die unterschiedliche Sensitivität beider Rezeptoren gegenüber pH-Veränderungen erklären: GPR65 gilt in der Literatur als eines der Schlüsselmoleküle für die Wahrnehmung von pH-Änderungen, während GPR132 eine deutlich geringere Affinität für pH-Schwankungen aufweist und daher als weniger relevant für die direkte Wahrnehmung eines sauren Milieus betrachtet wird ^(223, 258).

Die dennoch nachweisbare Expression von GPR132 im ischämischen Myokard könnte auf eine alternative, azidoseunabhängige Rolle dieses Rezeptors hinweisen. Studien belegen, dass GPR132 primär als Rezeptor für bestimmte Signallipide fungiert ^(231, 258) und an immunologischen Prozessen wie der Leukozytenmigration beteiligt ist ⁽²⁶⁵⁾. Die dem zugrunde liegenden konkreten Signalwege sind bislang jedoch nur unzureichend verstanden und erfordern weitere Untersuchung.

Aufgrund der ausgeprägteren funktionellen Relevanz und pH-Sensitivität von GPR65 erscheinen Folgeexperimente mit einem gewebsspezifischen Knockout, beispielsweise in myelomonozytären Zellen, besonders vielversprechend. Ein derartiger Ansatz könnte helfen, die Rolle von GPR65 im azidosevermittelten inflammatorischen Remodeling nach Myokardinfarkt gezielter aufzuklären und potenzielle zelltypspezifische Effekte besser zu differenzieren.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach AMI ist das Resultat eines komplexen pathophysiologischen Geschehens, das durch eine initiale ischämische Schädigung, eine anschließende Entzündungsreaktion und ein strukturelles sowie funktionelles kardiales Remodeling geprägt ist ⁽⁵⁹⁾. Obwohl zentrale Mechanismen dieses Prozesses bereits beschrieben wurden, sind viele molekulare und zelluläre Abläufe, insbesondere im Kontext der Immunantwort und ihrer Steuerung, noch unzureichend verstanden. Ein tieferes Verständnis dieser Vorgänge ist entscheidend, um neue therapeutische Ansätze zu identifizieren, die gezielt in das postischämische Remodeling eingreifen und so die Progression zur Herzinsuffizienz verhindern.

Die vorliegende Promotionsarbeit beleuchtet erstmalig die Rolle azidoseabhängiger Prozesse in myelomonozytären Zellen im zeitlichen Verlauf nach einem akuten Myokardinfarkt. Die Untersuchungen erfolgten in einem durch permanente Ligatur der LAD induzierten Mausmodell des Myokardinfarktes.

Wir beobachteten eine zeitlich begrenzte Aktivierung azidoseabhängiger Signalwege in kardialen myeloiden Zellen, welche infolge des Myokardinfarktes auftrat und mit einem überwiegend proinflammatorischen Immunprofil der entsprechenden Zellen assoziiert war. Die infarktbedingte Gewebsazidose und die Aktivierung azidosegesteuerter Prozesse scheinen somit wesentlich zur proinflammatorischen Umgebung und zur Initiierung postischämischer Reparaturprozesse beizutragen.

ICER ist ein pH-abhängig regulierter Transkriptionsfaktor, dessen Expression unter sauren Bedingungen zunimmt ⁽¹³⁾. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine myelomonozytäre Deletion von ICER den Phänotyp von Monozyten und Makrophagen verändert und dadurch das postischämische kardiale Remodeling maßgeblich beeinflusst. ICER-defiziente Mäuse wiesen eine signifikant beeinträchtigte kardiale Funktion und eine gesteigerte Infiltration proinflammatorischer Ly6C^{high}-Monozyten in das ischämische Myokard auf. RNA-Sequenzierungsanalysen zeigten eine Reduktion protektiver Makrophagencluster im infarzierten Myokard, während der physiologisch erwartete Anstieg reparativer Ly6C^{low}-Monozyten ausblieb. Die Expression proinflammatorischer Marker im kardialen Gewebe blieb unverändert. Diese Befunde stützen die Annahme, dass die Deletion von ICER in myeloiden Zellen die initiale Inflammationsreaktion nach einem Myokardinfarkt nicht wesentlich beeinflusst, jedoch den Übergang zu reparativen Signalwegen stört. Der ausbleibende

ICER-vermittelte Übergang von einer proinflammatorischen zu einer reparativen Makrophagenpolarisierung erschwert somit die funktionelle Erholung des postischämischen Myokards.

Darüber hinaus belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine gestörte Wahrnehmung der postischämischen Azidose durch fehlende Expression der übergeordneten Rezeptoren GPR65 bzw. GPR132 eine Beeinträchtigung der inflammatorischen Antwort und Zellrekrutierung im postischämischen kardialen Remodeling zur Folge hat.

7 Summary (english)

Heart failure is the final result of a pathophysiologic cause of events including an initial ischemic injury, followed by an inflammatory response and subsequent maladaptive remodeling which alters ventricular size and function. Although central mechanisms of this process have previously been described, many molecular and cellular pathways, particularly in the context of the immune response and its regulation, remain insufficiently understood. A greater understanding of the exact processes is crucial to identify novel therapeutic targets for the prevention of heart failure after MI.

This doctoral thesis offers a novel perspective on acidosis-dependent pathways in myelomonocytic cells following acute myocardial infarction. Our studies were conducted in a mouse model of myocardial infarction induced by permanent ligation of the left anterior descending artery.

Myocardial infarction caused a temporary activation of acidosis-dependent pathways in cardiac myeloid cells that strongly coincided with a proinflammatory transcriptional profile. Apparently, ischemia-induced tissue acidification as well as acidosis-signaling contribute to a proinflammatory microenvironment and the initiation of postischemic tissue repair.

Acidic pH stimulates the expression of transcription factor ICER in macrophages ⁽¹³⁾. Our findings suggest that the myelomonocytic cell-specific knockout of ICER modifies the phenotype of monocytes and macrophages and therefore affects cardiac remodeling following MI. Cardiac function was significantly impaired in ICER-deficient mice, accompanied by an augmented infiltration of proinflammatory Ly6C^{high} monocytes into the infarcted myocardium. RNA-sequencing studies revealed a diminution of protective macrophage clusters whereas we were not able to detect the anticipated physiological increase in reparative Ly6C^{low} monocytes following myocardial infarction in ICER-deficient mice. Furthermore, the cardiac expression of proinflammatory markers remained unaltered. These findings suggest that a myeloid cell-specific deletion of ICER does not substantially affect the initial inflammatory response following AMI but interferes with the transition from proinflammatory to reparative macrophage polarization and therefore hampers functional post-MI recovery.

Moreover, our results demonstrate that impaired sensing mechanisms for extracellular acidification, due to the lack of expression of upstream receptors GPR65 and GPR132,

respectively, compromise the inflammatory response and cell recruitment during post-ischemic cardiac remodeling.

8 Literaturverzeichnis

1. Mensah GA, Roth GA, Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(20):2529-32.
2. Mensah GA, Fuster V, Murray CJL, Roth GA. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. *J Am Coll Cardiol.* 2023;82(25):2350-473.
3. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2008;130(2):147-58.
4. Jiang H, Fang T, Cheng Z. Mechanism of heart failure after myocardial infarction. *J Int Med Res.* 2023;51(10):3000605231202573.
5. Frantz S, Hundertmark MJ, Schulz-Menger J, Bengel FM, Bauersachs J. Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies. *Eur Heart J.* 2022;43(27):2549-61.
6. Gho J, Schmidt AF, Pasea L, Koudstaal S, Pujades-Rodriguez M, Denaxas S, et al. An electronic health records cohort study on heart failure following myocardial infarction in England: incidence and predictors. *BMJ Open.* 2018;8(3):e018331.
7. Frangogiannis NG. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(3):240-5.
8. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, Ryabov V. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol.* 2021;12:664457.
9. Molitor M, Rudi WS, Garlapati V, Finger S, Schüler R, Kossmann S, et al. Nox2+ myeloid cells drive vascular inflammation and endothelial dysfunction in heart failure after myocardial infarction via angiotensin II receptor type 1. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1):162-77.
10. Zuo W, Sun R, Ji Z, Ma G. Macrophage-driven cardiac inflammation and healing: insights from homeostasis and myocardial infarction. *Cell Mol Biol Lett.* 2023;28(1):81.
11. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol.* 2015;6:263.
12. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, Novyzedlak R, Cecrdlova E, Foley LK, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clin Sci (Lond).* 2023;137(15):1067-93.
13. Bohn T, Rapp S, Luther N, Klein M, Bruehl TJ, Kojima N, et al. Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nat Immunol.* 2018;19(12):1319-29.
14. Cobbe SM, Poole-Wilson PA. The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischaemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1980;12(8):745-60.
15. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(18):2231-64.

16. Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, et al. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):39.
17. O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:101.
18. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8.
19. Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, et al. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and early afterload reducing therapy study. *Ann Intern Med*. 2001;134(6):451-8.
20. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006;367(9507):356-67.
21. Kim Y, Nurakhayev S, Nurkesh A, Zharkinbekov Z, Saparov A. Macrophage Polarization in Cardiac Tissue Repair Following Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5).
22. Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality From Ischemic Heart Disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2019;12(6):e005375.
23. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2013;56(5):650-5.
24. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016;4(13):256.
25. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603.
26. Fleck E. Deutscher Herzbericht 2017: Immer weniger Herzinfarkt-Tote dank Fortschritten der modernen Herz-Medizin. *DGK Pressemitteilungen* 2018.
27. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2023;44(38):3720-826.
28. Tibaut M, Mekis D, Petrovic D. Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2017;14(3):150-9.
29. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021;42(34):3227-337.
30. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927-46.
31. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66.

32. Muzyk P, Twerenbold R, Morawiec B, Ayala PL, Boeddinghaus J, Nestelberger T, et al. Use of cardiac troponin in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Kardiol Pol.* 2020;78(11):1099-106.
33. Adamson PD, Hunter A, Madsen DM, Shah ASV, McAllister DA, Pawade TA, et al. High-Sensitivity Cardiac Troponin I and the Diagnosis of Coronary Artery Disease in Patients With Suspected Angina Pectoris. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2018;11(2):e004227.
34. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet.* 2017;389(10065):197-210.
35. Weil J, Schunkert H. Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Clin Res Cardiol.* 2006;95 Suppl 4.
36. Hofmann R, James SK, Jernberg T, Lindahl B, Erlinge D, Witt N, et al. Oxygen Therapy in Suspected Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2017;377(13):1240-9.
37. Bonin M, Mewton N, Roubille F, Morel O, Cayla G, Angoulvant D, et al. Effect and Safety of Morphine Use in Acute Anterior ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(4).
38. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373(9678):1849-60.
39. Ibanez B, Macaya C, Sánchez-Brunete V, Pizarro G, Fernández-Friera L, Mateos A, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation.* 2013;128(14):1495-503.
40. Eikelboom JW, Anand SS, Malmberg K, Weitz JI, Ginsberg JS, Yusuf S. Unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin in acute coronary syndrome without ST elevation: a meta-analysis. *Lancet.* 2000;355(9219):1936-42.
41. Boersma E. Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and in-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients. *Eur Heart J.* 2006;27(7):779-88.
42. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003;361(9351):13-20.
43. Pinto DS, Kirtane AJ, Nallamothu BK, Murphy SA, Cohen DJ, Laham RJ, et al. Hospital delays in reperfusion for ST-elevation myocardial infarction: implications when selecting a reperfusion strategy. *Circulation.* 2006;114(19):2019-25.
44. O'Donoghue M, Boden WE, Braunwald E, Cannon CP, Clayton TC, de Winter RJ, et al. Early invasive vs conservative treatment strategies in women and men with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis. *Jama.* 2008;300(1):71-80.
45. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001;358(9281):527-33.

46. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345(7):494-502.
47. Frampton J, Ortengren AR, Zeitler EP. Arrhythmias After Acute Myocardial Infarction. *Yale J Biol Med.* 2023;96(1):83-94.
48. Janis G, Khianey S, Joshi S, Herzog E. Acute complications of myocardial infarction. *Echocardiography in Acute Coronary Syndrome: Diagnosis, Treatment and Prevention.* 2009:269-318.
49. Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation.* 2008;118(20):2057-62.
50. Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(1):30-8.
51. Metra M, Teerlink JR. Heart failure. *Lancet.* 2017;390(10106):1981-95.
52. Caldwell M, Martinez L, Foster JG, Sherling D, Hennekens CH. Prospects for the Primary Prevention of Myocardial Infarction and Stroke. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2019;24(3):207-14.
53. Navarese EP, Kowalewski M, Andreotti F, van Wely M, Camaro C, Kolodziejczak M, et al. Meta-analysis of time-related benefits of statin therapy in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2014;113(10):1753-64.
54. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9753):1670-81.
55. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-72.
56. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937-52.
57. Katzmann JL, Tünnemann-Tarr A, Laufs U. [European dyslipidemia guidelines 2019 : What is new?]. *Herz.* 2019;44(8):688-95.
58. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020;41(1):111-88.
59. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2020;116(6):1101-12.
60. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(11-12):1907-39.

61. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1841-75.
62. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):733-44.
63. Visan I. Myocardial infarct inflammation. *Nat Immunol*. 2018;19(2):99.
64. Silvis MJM, Kaffka Genaamd Dengler SE, Odille CA, Mishra M, van der Kaaij NP, Doevendans PA, et al. Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Front Immunol*. 2020;11:599511.
65. Zuurbier CJ, Abbate A, Cabrera-Fuentes HA, Cohen MV, Collino M, De Kleijn DPV, et al. Innate immunity as a target for acute cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1131-42.
66. Daseke MJ, 2nd, Valerio FM, Kalusche WJ, Ma Y, DeLeon-Pennell KY, Lindsey ML. Neutrophil proteome shifts over the myocardial infarction time continuum. *Basic Res Cardiol*. 2019;114(5):37.
67. Saporov A, Ogay V, Nurgozhin T, Chen WCW, Mansurov N, Issabekova A, et al. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. *Inflamm Res*. 2017;66(9):739-51.
68. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):15.
69. Daskalopoulos EP, Hermans KC, Blankesteyn WM. Cardiac (myo)fibroblast: Novel strategies for its targeting following myocardial infarction. *Curr Pharm Des*. 2014;20(12):1987-2002.
70. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12).
71. Poller WC, Nahrendorf M, Swirski FK. Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2020;126(8):1061-85.
72. Barker TH, Engler AJ. The provisional matrix: setting the stage for tissue repair outcomes. *Matrix Biol*. 2017;60-61:1-4.
73. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):4563-8.
74. Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Heymans S, Moons L, Collen D, et al. Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction. *Am J Pathol*. 2000;156(6):1865-73.
75. Mizuno T, Mickle DA, Kiani CG, Li RK. Overexpression of elastin fragments in infarcted myocardium attenuates scar expansion and heart dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2819-27.
76. González-Santamaría J, Villalba M, Busnadiego O, López-Olañeta MM, Sandoval P, Snabel J, et al. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2016;109(1):67-78.

77. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128(4):388-400.
78. Xie M, Burchfield JS, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: therapies: part 2 of 2. *Circulation*. 2013;128(9):1021-30.
79. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1988;78(1):186-201.
80. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail*. 1995;1(2):169-77.
81. González A, López B, Ravassa S, San José G, Díez J. The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross-linking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(9):1421-32.
82. Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schäfer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, et al. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *Faseb j*. 2013;27(3):871-81.
83. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*. 2007;170(3):818-29.
84. Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med*. 2008;40(3):180-96.
85. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-4.
86. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673-8.
87. Khazaei M, Moien-Afshari F, Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. 2008;15(1):49-67.
88. Irie S, Tavassoli M. Transendothelial transport of macromolecules: the concept of tissue-blood barriers. *Cell Biol Rev*. 1991;25(4):317-33, 40-1.
89. Higashi Y. Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Vascular Endothelial Dysfunction-Related Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10).
90. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
91. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
92. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
93. Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, et al. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*. 2001;173(1):113-8.

94. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):64-76.
95. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96(1):60-8.
96. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res.* 2000;87(9):825-30.
97. Zeng C, Villar VA, Yu P, Zhou L, Jose PA. Reactive oxygen species and dopamine receptor function in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2009;31(2):156-78.
98. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9.
99. Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, et al. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation.* 2011;124(12):1370-81.
100. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med.* 1999;189(11):1699-706.
101. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999;99(15):2027-33.
102. Kossmann S, Hu H, Steven S, Schönfelder T, Fraccarollo D, Mikhed Y, et al. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. *J Biol Chem.* 2014;289(40):27540-50.
103. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(7):1149-60.
104. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
105. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation.* 1998;97(16):1536-9.
106. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101(9):948-54.
107. Gauthier ER, Madison SD, Michel RN. Rapid RNA isolation without the use of commercial kits: application to small tissue samples. *Pflugers Arch.* 1997;433(5):664-8.
108. Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, Bayo Jimenez MT, et al. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7092151.

109. Murphy K, Weaver C. Janeway immunologie: Springer-Verlag; 2018.
110. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine*. 2010;28:C2-C13.
111. Kagnoff MF. Mucosal immunology: new frontiers. *Immunology today*. 1996;17(2):57-9.
112. Carroll MC. Complement and humoral immunity. *Vaccine*. 2008;26:I28-I33.
113. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006;66(2):605-12.
114. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 1994;55(3):410-22.
115. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*. 2001;70(4):478-90.
116. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
117. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172(7):4410-7.
118. Mildner A, Marinkovic G, Jung S. Murine Monocytes: Origins, Subsets, Fates, and Functions. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5).
119. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-e80.
120. Arfvidsson J, Ahlin F, Vargas KG, Thaler B, Wojta J, Huber K. Monocyte subsets in myocardial infarction: A review. *Int J Cardiol*. 2017;231:47-53.
121. Olingy CE, San Emeterio CL, Ogle ME, Krieger JR, Bruce AC, Pfau DD, et al. Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. *Sci Rep*. 2017;7(1):447.
122. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. 2013;39(3):599-610.
123. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med*. 2003;197(12):1701-7.
124. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-72.
125. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008;117(13):1642-8.

126. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-31.
127. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*. 2010;115(3):e10-9.
128. Li W, Hsiao HM, Higashikubo R, Saunders BT, Bharat A, Goldstein DR, et al. Heart-resident CCR2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through TLR9/MyD88/CXCL5 signaling. *JCI Insight*. 2016;1(12).
129. Chen B, Brickshawana A, Frangogiannis NG. The Functional Heterogeneity of Resident Cardiac Macrophages in Myocardial Injury(CCR2(+) Cells Promote Inflammation, Whereas CCR2(-) Cells Protect). *Circ Res*. 2019;124(2):183-5.
130. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-40.
131. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. 1992;176(1):287-92.
132. Kodolja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdts S. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*. 1998;160(3):1411-8.
133. Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology*. 1999;67(5-6):222-6.
134. Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol*. 1998;161(4):1983-8.
135. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(21):4111-26.
136. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
137. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123-47.
138. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
139. Nahrendorf M, Swirski FK. Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. *Circ Res*. 2016;119(3):414-7.
140. van der Vorst EPC, Weber C. Novel Features of Monocytes and Macrophages in Cardiovascular Biology and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(2):e30-e7.

141. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
142. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res*. 2014;115(2):284-95.
143. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*. 2019;10:1462.
144. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453-61.
145. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther*. 2013;139(1):32-40.
146. Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Rivera Gonzalez OJ, Flynn ER, Freeman TC, Saucerman JJ, et al. Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. *Basic Res Cardiol*. 2018;113(4):26.
147. Liu Y, Xu R, Gu H, Zhang E, Qu J, Cao W, et al. Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res*. 2021;9(1):1.
148. Aarup A, Pedersen TX, Junker N, Christoffersen C, Bartels ED, Madsen M, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Macrophages Promotes Development of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(9):1782-90.
149. Cheng Y, Feng Y, Xia Z, Li X, Rong J. ω -Alkynyl arachidonic acid promotes anti-inflammatory macrophage M2 polarization against acute myocardial infarction via regulating the cross-talk between PKM2, HIF-1 α and iNOS. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(12):1595-605.
150. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol*. 2000;204(1):19-28.
151. Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, et al. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog*. 2008;4(3):e1000023.
152. O'Neill LA, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 2016;213(1):15-23.
153. Langston PK, Shibata M, Horng T. Metabolism Supports Macrophage Activation. *Front Immunol*. 2017;8:61.
154. Galván-Peña S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014;5:420.
155. Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. 2019;106(2):345-58.
156. Xu JY, Xiong YY, Lu XT, Yang YJ. Regulation of Type 2 Immunity in Myocardial Infarction. *Front Immunol*. 2019;10:62.

157. Hu W, Lin J, Lian X, Yu F, Liu W, Wu Y, et al. M2a and M2b macrophages predominate in kidney tissues and M2 subpopulations were associated with the severity of disease of IgAN patients. *Clin Immunol.* 2019;205:8-15.
158. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, et al. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS One.* 2012;7(5):e36814.
159. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, et al. Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res.* 2019;124(2):263-78.
160. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med.* 2018;24(8):1234-45.
161. Dick SA, Macklin JA, Nejat S, Momen A, Clemente-Casares X, Althagafi MG, et al. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction. *Nat Immunol.* 2019;20(1):29-39.
162. Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A, Ballesteros I. Specialized functions of resident macrophages in brain and heart. *J Leukoc Biol.* 2018;104(4):743-56.
163. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbatov R, Kim JK, Ueno T, et al. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ Res.* 2013;112(6):891-9.
164. Yap J, Cabrera-Fuentes HA, Irei J, Hausenloy DJ, Boisvert WA. Role of Macrophages in Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).
165. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2018;122(1):113-27.
166. Liu S, Chen J, Shi J, Zhou W, Wang L, Fang W, et al. M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. *Basic Research in Cardiology.* 2020;115(2):22.
167. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-47.
168. Crane MJ, Daley JM, van Houtte O, Brancato SK, Henry WL, Jr., Albina JE. The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS One.* 2014;9(1):e86660.
169. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69.
170. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-70.
171. Mentkowski KI, Euscher LM, Patel A, Alevriadou BR, Lang JK. Monocyte recruitment and fate specification after myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2020;319(5):C797-C806.

172. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *European Heart Journal*. 2016;38(3):187-97.
173. Lee WW, Marinelli B, van der Laan AM, Sena BF, Gorbатов R, Leuschner F, et al. PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(2):153-63.
174. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res*. 2016;119(7):853-64.
175. Shintani Y, Ito T, Fields L, Shiraishi M, Ichihara Y, Sato N, et al. IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):6877.
176. Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(3):33.
177. Jing R, Long TY, Pan W, Li F, Xie QY. IL-6 knockout ameliorates myocardial remodeling after myocardial infarction by regulating activation of M2 macrophages and fibroblast cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(14):6283-91.
178. Garlapati V, Luo Q, Posma J, Aluia M, Nguyen TS, Grunz K, et al. Macrophage-Expressed Coagulation Factor VII Promotes Adverse Cardiac Remodeling. *Circ Res*. 2024;135(8):841-55.
179. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-9.
180. Taskén K, Skålhegg BS, Taskén KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1997;31:191-204.
181. Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):710-8.
182. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*. 1993;75(5):875-86.
183. Raker VK, Becker C, Steinbrink K. The cAMP Pathway as Therapeutic Target in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2016;7:123.
184. Delaunay M, Osman H, Kaiser S, Diviani D. The Role of Cyclic AMP Signaling in Cardiac Fibrosis. *Cells*. 2019;9(1).
185. Dessauer CW. Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol*. 2009;76(5):935-41.
186. Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:355-77.

187. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:481-511.
188. Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response to beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res.* 2003;93(1):12-22.
189. Borlikova G, Endo S. Inducible cAMP early repressor (ICER) and brain functions. *Mol Neurobiol.* 2009;40(1):73-86.
190. Mioduszevska B, Jaworski J, Kaczmarek L. Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system--a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J Neurochem.* 2003;87(6):1313-20.
191. Yan C, Miller CL, Abe J. Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circ Res.* 2007;100(4):489-501.
192. Schulte JS, Fehrmann E, Tekook MA, Kranick D, Fels B, Li N, et al. Cardiac expression of the CREM repressor isoform CREM-Ib Δ C-X in mice leads to arrhythmogenic alterations in ventricular cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(2):15.
193. Ma D, Fu L, Shen J, Zhou P, Gao Y, Xie R, et al. Interventional effect of valsartan on expression of inducible cAMP early repressor and phosphodiesterase 3A in rats after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol.* 2009;602(2-3):348-54.
194. Jaworski J, Mioduszevska B, Sánchez-Capelo A, Figiel I, Habas A, Gozdz A, et al. Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro. *J Neurosci.* 2003;23(11):4519-26.
195. Yehia G, Schlotter F, Razavi R, Alessandrini A, Molina CA. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and targets inducible cAMP early repressor to ubiquitin-mediated destruction. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35272-9.
196. Erdogan S, Aslantas O, Celik S, Atik E. The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Res Vet Sci.* 2008;84(1):18-25.
197. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(2):127-32.
198. Wall EA, Zavzavadjian JR, Chang MS, Randhawa B, Zhu X, Hsueh RC, et al. Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP95-p105. *Sci Signal.* 2009;2(75):ra28.
199. Bystrom J, Evans I, Newson J, Stables M, Toor I, van Rooijen N, et al. Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood.* 2008;112(10):4117-27.
200. Page CP, Spina D. Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 2011(204):391-414.
201. Onozawa Y, Fujita Y, Kuwabara H, Nagasaki M, Komai T, Oda T. Activation of T cell death-associated gene 8 regulates the cytokine production of T cells and macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2012;683(1-3):325-31.

202. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
203. Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, et al. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45626-33.
204. Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel PA. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):437-42.
205. Surinkaew S, Aflaki M, Takawale A, Chen Y, Qi XY, Gillis MA, et al. Exchange protein activated by cyclic-adenosine monophosphate (Epac) regulates atrial fibroblast function and controls cardiac remodelling. *Cardiovasc Res*. 2019;115(1):94-106.
206. Wang X, Dhalla NS. Modification of beta-adrenoceptor signal transduction pathway by genetic manipulation and heart failure. *Mol Cell Biochem*. 2000;214(1-2):131-55.
207. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res*. 2003;93(10):896-906.
208. Harzenetter MD, Novotny AR, Gais P, Molina CA, Altmayr F, Holzmann B. Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J Immunol*. 2007;179(1):607-15.
209. Ding B, Abe JI, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, et al. Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation*. 2005;111(19):2469-76.
210. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2003;425(6953):93-8.
211. Glitsch MD. Recent advances in acid sensing by G protein coupled receptors. *Pflugers Arch*. 2024.
212. Swenson ER. Metabolic acidosis. *Respir Care*. 2001;46(4):342-53.
213. Reeh PW, Steen KH. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res*. 1996;113:143-51.
214. Imenez Silva PH, Camara NO, Wagner CA. Role of proton-activated G protein-coupled receptors in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022;323(2):C400-c14.
215. Ward TT, Steigbigel RT. Acidosis of synovial fluid correlates with synovial fluid leukocytosis. *Am J Med*. 1978;64(6):933-6.
216. Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol*. 2001;69(4):522-30.
217. Martínez D, Vermeulen M, Trevani A, Ceballos A, Sabatté J, Gamberale R, et al. Extracellular acidosis induces neutrophil activation by a mechanism dependent on activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *J Immunol*. 2006;176(2):1163-71.

218. Jancic CC, Cabrini M, Gabelloni ML, Rodríguez Rodrigues C, Salamone G, Trevani AS, et al. Low extracellular pH stimulates the production of IL-1 β by human monocytes. *Cytokine*. 2012;57(2):258-68.
219. Insel PA, Sriram K, Salmerón C, Wiley SZ. Proton-sensing G protein-coupled receptors: detectors of tumor acidosis and candidate drug targets. *Future Med Chem*. 2020;12(6):523-32.
220. Justus CR, Dong L, Yang LV. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol*. 2013;4:354.
221. Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, et al. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol*. 2009;182(5):3243-51.
222. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513(7519):559-63.
223. Okajima F. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell Signal*. 2013;25(11):2263-71.
224. Russell JL, Goetsch SC, Aguilar HR, Coe H, Luo X, Liu N, et al. Regulated expression of pH sensing G Protein-coupled receptor-68 identified through chemical biology defines a new drug target for ischemic heart disease. *ACS Chem Biol*. 2012;7(6):1077-83.
225. Williamson JR, Schaffer SW, Ford C, Safer B. Contribution of tissue acidosis to ischemic injury in the perfused rat heart. *Circulation*. 1976;53(3 Suppl):I3-14.
226. Yan GX, Kléber AG. Changes in extracellular and intracellular pH in ischemic rabbit papillary muscle. *Circ Res*. 1992;71(2):460-70.
227. Aoki H, Mogi C, Okajima F. Ionotropic and metabotropic proton-sensing receptors involved in airway inflammation in allergic asthma. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:712962.
228. Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*. 2005;451(1):143-50.
229. Morales-Lázaro SL, Simon SA, Rosenbaum T. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol*. 2013;591(13):3109-21.
230. Weiß KT, Fante M, Köhl G, Schreml J, Haubner F, Kreutz M, et al. Proton-sensing G protein-coupled receptors as regulators of cell proliferation and migration during tumor growth and wound healing. *Exp Dermatol*. 2017;26(2):127-32.
231. Vangaveti V, Baune BT, Kennedy RL. Hydroxyoctadecadienoic acids: novel regulators of macrophage differentiation and atherogenesis. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2010;1(2):51-60.
232. Radu CG, Yang LV, Riedinger M, Au M, Witte ON. T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(1):245-50.

233. Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1632-7.
234. Jing Z, Xu H, Chen X, Zhong Q, Huang J, Zhang Y, et al. The Proton-Sensing G-Protein Coupled Receptor GPR4 Promotes Angiogenesis in Head and Neck Cancer. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152789.
235. Alexander SP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Overview. *Br J Pharmacol*. 2017;174 Suppl 1(Suppl Suppl 1):S1-s16.
236. Martin AL, Steurer MA, Aronstam RS. Constitutive Activity among Orphan Class-A G Protein Coupled Receptors. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138463.
237. He XD, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, et al. Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415(4):627-31.
238. Ouyang S, Li Y, Wu X, Wang Y, Liu F, Zhang J, et al. GPR4 signaling is essential for the promotion of acid-mediated angiogenic capacity of endothelial progenitor cells by activating STAT3/VEGFA pathway in patients with coronary artery disease. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):149.
239. Korenchan DE, Flavell RR. Spatiotemporal pH Heterogeneity as a Promoter of Cancer Progression and Therapeutic Resistance. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
240. Anemone A, Consolino L, Arena F, Capozza M, Longo DL. Imaging tumor acidosis: a survey of the available techniques for mapping in vivo tumor pH. *Cancer Metastasis Rev*. 2019;38(1-2):25-49.
241. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. 2004;4(11):891-9.
242. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*. 1989;49(23):6449-65.
243. Lebelo MT, Joubert AM, Visagie MH. Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Arch Pharm Res*. 2019;42(10):833-47.
244. Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene*. 1999;18(21):3199-204.
245. Smallbone K, Maini PK, Gatenby RA. Episodic, transient systemic acidosis delays evolution of the malignant phenotype: Possible mechanism for cancer prevention by increased physical activity. *Biol Direct*. 2010;5:22.
246. Pillai SR, Damaghi M, Marunaka Y, Spugnini EP, Fais S, Gillies RJ. Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metastasis Rev*. 2019;38(1-2):205-22.
247. Fais S, Venturi G, Gatenby B. Microenvironmental acidosis in carcinogenesis and metastases: new strategies in prevention and therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2014;33(4):1095-108.

248. Xiao H, Li TK, Yang JM, Liu LF. Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5205-10.
249. Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, et al. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(4):411-25.
250. Chen P, Zuo H, Xiong H, Kolar MJ, Chu Q, Saghatelian A, et al. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(3):580-5.
251. Nagasaka A, Mogi C, Ono H, Nishi T, Horii Y, Ohba Y, et al. The proton-sensing G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) shows cardioprotective effects against myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):7812.
252. Ishii S, Kihara Y, Shimizu T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9083-7.
253. Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal*. 2005;17(12):1466-76.
254. Onozawa Y, Komai T, Oda T. Activation of T cell death-associated gene 8 attenuates inflammation by negatively regulating the function of inflammatory cells. *Eur J Pharmacol*. 2011;654(3):315-9.
255. Wang T, Zhou G, He M, Xu Y, Rusyniak WG, Xu Y, et al. GPR68 Is a Neuroprotective Proton Receptor in Brain Ischemia. *Stroke*. 2020;51(12):3690-700.
256. Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Yamane N, Tosaka M, et al. The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model. *Sci Rep*. 2020;10(1):17193.
257. Fan YY, Li Y, Tian XY, Wang YJ, Huo J, Guo BL, et al. Delayed Chronic Acidic Postconditioning Improves Poststroke Motor Functional Recovery and Brain Tissue Repair by Activating Proton-Sensing TDAG8. *Transl Stroke Res*. 2024;15(3):620-35.
258. Kern K, Schäfer SMG, Cohnen J, Pierre S, Osthues T, Tarighi N, et al. The G2A Receptor Controls Polarization of Macrophage by Determining Their Localization Within the Inflamed Tissue. *Front Immunol*. 2018;9:2261.
259. Obinata H, Hattori T, Nakane S, Tatei K, Izumi T. Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A. *J Biol Chem*. 2005;280(49):40676-83.
260. Wang D, Strandgaard S, Iversen J, Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine, oxidative stress, and vascular nitric oxide synthase in essential hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(2):R195-200.
261. Hattori T, Obinata H, Ogawa A, Kishi M, Tatei K, Ishikawa O, et al. G2A plays proinflammatory roles in human keratinocytes under oxidative stress as a receptor for 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Invest Dermatol*. 2008;128(5):1123-33.
262. Murakami N, Hashidate T, Harayama T, Yokomizo T, Shimizu T, Nakamura M. Transcriptional regulation of human G2A in monocytes/ macrophages: involvement of c/EBPs, Runx and Pu.1. *Genes Cells*. 2009;14(12):1441-55.

263. Bolick DT, Skaflen MD, Johnson LE, Kwon SC, Howatt D, Daugherty A, et al. G2A deficiency in mice promotes macrophage activation and atherosclerosis. *Circ Res.* 2009;104(3):318-27.
264. Parks BW, Srivastava R, Yu S, Kabarowski JH. ApoE-dependent modulation of HDL and atherosclerosis by G2A in LDL receptor-deficient mice independent of bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):539-47.
265. Osthues T, Zimmer B, Rimola V, Klann K, Schilling K, Mathoor P, et al. The Lipid Receptor G2A (GPR132) Mediates Macrophage Migration in Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. *Cells.* 2020;9(7).
266. Le LQ, Kabarowski JH, Weng Z, Satterthwaite AB, Harvill ET, Jensen ER, et al. Mice lacking the orphan G protein-coupled receptor G2A develop a late-onset autoimmune syndrome. *Immunity.* 2001;14(5):561-71.
267. Díaz L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispín JC, Alemán G, et al. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Rev Invest Clin.* 2020;73(4):199-209.
268. Bryant CD. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1245:31-3.
269. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017;7(1):1-12.
270. Friedel RH, Wurst W, Wefers B, Kühn R. Generating conditional knockout mice. *Methods Mol Biol.* 2011;693:205-31.
271. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018;34(4):147-59.
272. Keshav S, Chung P, Milon G, Gordon S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med.* 1991;174(5):1049-58.
273. Shi J, Hua L, Harmer D, Li P, Ren G. Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol Biol.* 2018;1784:263-75.
274. Wen JH, Li DY, Liang S, Tang JX. Is LysM-Cre a good candidate Cre for knocking out *Atg5* gene in mice? *Front Immunol.* 2022;13:964496.
275. Navarro KL, Huss M, Smith JC, Sharp P, Marx JO, Pacharinsak C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. *ILAR Journal.* 2021;62(1-2):238-73.
276. Fleischmann T, Jirkof P, Henke J, Arras M, Cesarovic N. Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. *Lab Anim.* 2016;50(4):264-74.
277. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics.* 2004;16(3):349-60.
278. Das S, MacDonald K, Chang HY, Mitzner W. A simple method of mouse lung intubation. *J Vis Exp.* 2013(73):e50318.

279. Tarnavski O. Mouse surgical models in cardiovascular research. *Methods Mol Biol.* 2009;573:115-37.
280. Dülsner A, Hack R, Krüger C, Manthey T, Paulin N, Pils M, et al. Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch.
281. VisualSonics Vevo 2100 Imaging System, Operator Manual. 2001-2008.
282. Kent Scientific Corporation. CODA Non-Invasive Blood Pressure System, Owner's Manual For High Throughput. Torrington, CT2016.
283. Marquardt N, Feja M, Hünigen H, Plendl J, Menken L, Fink H, et al. Euthanasia of laboratory mice: Are isoflurane and sevoflurane real alternatives to carbon dioxide? *PLoS One.* 2018;13(9):e0203793.
284. Robbins N, Thompson A, Mann A, Blomkalns AL. Isolation and excision of murine aorta; a versatile technique in the study of cardiovascular disease. *J Vis Exp.* 2014(93):e52172.
285. Schmidt RF, Lang F, Brandes R. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie.* Springer-Lehrbuch. 32. Auflage ed. Berlin2019. p. 263.
286. Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1551-7.
287. Weidinger F, Frick M. Mechanismen und Bedeutung der Endothelfunktion bei koronarer Herzkrankheit. *Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology.* 2000;7(1):2-8.
288. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315(17):1046-51.
289. Johann K, Bohn T, Shahneh F, Luther N, Birke A, Jaurich H, et al. Therapeutic melanoma inhibition by local micelle-mediated cyclic nucleotide repression. *Nat Commun.* 2021;12(1):5981.
290. Klein M, Brühl TJ, Staudt V, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, et al. Tick Salivary Sialostatin L Represses the Initiation of Immune Responses by Targeting IRF4-Dependent Transcription in Murine Mast Cells. *J Immunol.* 2015;195(2):621-31.
291. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radical Biology and Medicine.* 2004;36(1):101-11.
292. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, et al. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic Res.* 2004;38(3):259-69.
293. Albert M, Furst U. Quantitative Detection of Oxidative Burst upon Activation of Plant Receptor Kinases. *Methods Mol Biol.* 2017;1621:69-76.
294. Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshöfer T, et al. Activation of Protein Kinase C α and/or ϵ Enhances Transcription of the Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Molecular Pharmacology.* 1998;53(4):630-7.

295. Zielonka J, Lambeth JD, Kalyanaraman B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1310-4.
296. Stein J, Steven S, Bros M, Sudowe S, Hausding M, Oelze M, et al. Role of Protein Kinase C and Nox2-Derived Reactive Oxygen Species Formation in the Activation and Maturation of Dendritic Cells by Phorbol Ester and Lipopolysaccharide. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4157213.
297. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:765-92.
298. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
299. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
300. ITW Reagents Division. Analytik & Assays - Isolierung von Nukleinsäuren [Internet]. Zitiert am: 13.01.2022. URL: https://www.itwreagents.com/germany/de/nab_analytik-und-assays.
301. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note. 2015;52646.
302. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
303. New England Biolabs GmbH. qPCR (Real-Time PCR) und RT-qPCR [Internet], Letzte Aktualisierung: 03.01.2022. Zitiert am 20.01.2022. URL: <https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/qpcr-real-time-pcr-und-rt-qpcr/>.
304. QUIAGEN. For quantitative, real-time one-step RT-PCR using sequence-specific probes. *QuantiTect® Probe RT-PCR Handbook.* 2011.
305. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
306. Universitätsmedizin Mainz FaACF, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Prinzip der Durchflußzytometrie [Internet]. Letzte Aktualisierung: 20.02.2020. Zitiert am 21.10.2022. URL: [https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflussszytometrie/prinzip-der-durchflussszytometrie.html#:~:text=Die%20Durchflussszytometrie%20\(FACS%20steht%20f%C3%BCr,in%20einem%20Fl%C3%BCssigkeitsstrom.](https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflussszytometrie/prinzip-der-durchflussszytometrie.html#:~:text=Die%20Durchflussszytometrie%20(FACS%20steht%20f%C3%BCr,in%20einem%20Fl%C3%BCssigkeitsstrom.)
307. Quint S. Durchflussszytometrie nach dem Prinzip der Räumlich Modulierten Fluoreszenz 2015.
308. Rahman M. Introduction to flow cytometry. *AbD serotec.* 2006;7.
309. Knapp W, Dörken B, Rieber P, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGK. CD Antigen 1989. *Blood.* 1989;74(4):1448-50.
310. Thomas ML. Positive and negative regulation of leukocyte activation by protein tyrosine phosphatases. *Seminars in Immunology.* 1995;7(4):279-88.

311. Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Dorfman DM. The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol.* 2005;36(1):51-7.
312. Springer T, Galfré G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol.* 1979;9(4):301-6.
313. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol.* 2008;83(1):64-70.
314. Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A.* 2012;81(4):343-50.
315. Lin HH, Stacey M, Stein-Streilein J, Gordon S. F4/80: the macrophage-specific adhesion-GPCR and its role in immunoregulation. *Adv Exp Med Biol.* 2010;706:149-56.
316. STEMCELL Technologies Inc. EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit [Internet]. Catalog #19861. Document #10000005282, Version 02. Zitiert am 07.02.2025. URL: https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000005282-PIS_02.pdf2022.
317. Mysore V, Tahir S, Furuhashi K, Arora J, Rosetti F, Cullere X, et al. Monocytes transition to macrophages within the inflamed vasculature via monocyte CCR2 and endothelial TNFR2. *J Exp Med.* 2022;219(5).
318. Houthuys E, Movahedi K, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Brouckaert P. A method for the isolation and purification of mouse peripheral blood monocytes. *J Immunol Methods.* 2010;359(1-2):1-10.
319. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74(1):29-38.
320. Goloroush P, Yellon DM, Davidson SM. Mouse models of atherosclerosis and their suitability for the study of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(6):73.
321. Véniant MM, Withycombe S, Young SG. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1567-70.
322. Wilson RB, Hartroft WS. Pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Arch Pathol.* 1970;89(5):457-69.
323. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis.* 1985;57(1):65-73.
324. Chu G, Haghghi K, Kranias EG. From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *J Card Fail.* 2002;8(6 Suppl):S432-49.
325. van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(3):H1291-300.
326. Ciulla MM, Paliotti R, Ferrero S, Braidotti P, Esposito A, Gianelli U, et al. Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats. *J Surg Res.* 2004;116(1):91-7.

327. Taylor CB, Davis CB, Jr., Vawter GF, Hass GM. Controlled myocardial injury produced by a hypothermal method. *Circulation*. 1951;3(2):239-53.
328. Kolk MV, Meyberg D, Deuse T, Tang-Quan KR, Robbins RC, Reichenspurner H, et al. LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction. *J Vis Exp*. 2009(32).
329. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954;140(5):675-82.
330. Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*. 1978;20(4):308-14.
331. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):H2147-54.
332. Reichert K, Colantuono B, McCormack I, Rodrigues F, Pavlov V, Abid MR. Murine Left Anterior Descending (LAD) Coronary Artery Ligation: An Improved and Simplified Model for Myocardial Infarction. *J Vis Exp*. 2017(122).
333. Gao E, Koch WJ. A novel and efficient model of coronary artery ligation in the mouse. *Methods Mol Biol*. 2013;1037:299-311.
334. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res*. 2010;107(12):1445-53.
335. Wang BJ, Chaudhry HW. Pop-Out Myocardial Infarction Induction in Mice. *Methods Mol Biol*. 2024;2803:137-44.
336. Rashbrook VS, Brash JT, Ruhrberg C. Cre toxicity in mouse models of cardiovascular physiology and disease. *Nat Cardiovasc Res*. 2022;1:806-16.
337. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335).
338. Zimmer HG, Gerdes AM, Lortet S, Mall G. Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22(11):1231-43.
339. Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods*. 2014;408:89-100.
340. Song AJ, Palmiter RD. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends Genet*. 2018;34(5):333-40.
341. Statistisches Bundesamt, Rainer Radtke. Häufigste Hauptdiagnosen in Krankenhäusern in Deutschland nach Fallzahl im Jahr 2023 [Internet]. Statista. Statista GmbH, gbe-bund.de. Zitiert am: 04.04.2025. URL: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/238099/umfrage/anzahl-von-krankenhausfaelle-bei-den-10-haeufigsten-vollstationaeren-diagnosen/2024>.
342. Myers R, Timofeyev V, Li N, Kim C, Ledford HA, Sirish P, et al. Feedback mechanisms for cardiac-specific microRNAs and cAMP signaling in electrical remodeling. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2015;8(4):942-50.

343. Jung SH, Hwang BH, Shin S, Park EH, Park SH, Kim CW, et al. Spatiotemporal dynamics of macrophage heterogeneity and a potential function of Trem2(hi) macrophages in infarcted hearts. *Nat Commun.* 2022;13(1):4580.
344. Zhang K, Wang Y, Chen S, Mao J, Jin Y, Ye H, et al. TREM2(hi) resident macrophages protect the septic heart by maintaining cardiomyocyte homeostasis. *Nat Metab.* 2023;5(1):129-46.
345. Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito H, Ito K, et al. Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and $\gamma\delta$ T cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(5):e004408.
346. Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, et al. IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(10):1105-16.

9 Danksagung

11 Tabellarischer Lebenslauf

Tabellarischer Lebenslauf

Tabellarischer Lebenslauf