

Aus dem Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Autoantigenspezifische CD4⁺ T-Zellen in ihrer kardioprotektiven Rolle nach
Myokardinfarkt im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Max Rickmer Rieckmann
aus Celle

Leipzig, 2019

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: **Prof. Dr. Walter Brehm**

Betreuer: **Prof. Dr. Gottfried Alber**

Gutachter: **Prof. Dr. Gottfried Alber**

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät Universität Leipzig

Prof. Dr. Bernhard Hiebl

Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie,

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 29.01.2019

Meinen Eltern und meiner Familie

für und durch die Erkenntnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht und Zielstellung.....	3
2.1. Der Myokardinfarkt	3
2.2. Pathophysiologie des Myokardinfarktes	4
2.3. T-Zellen	10
2.3.1. Die funktionelle Rolle der T-Zellen	10
2.3.2. Konventionelle T-Zellen	11
2.3.3. Regulatorische T-Zellen	14
2.3.4. Der T-Zell-Rezeptorkomplex	16
2.3.5. Genesis und Toleranz des T-Zell Kompartiments	19
2.3.6. T-Zellen im Myokardinfarkt.....	22
2.4. Antigenspezifität und Autoimmunität im Myokardinfarkt	23
2.5. Zielstellung der Studie	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Versuchsaufbau	25
3.2. Versuchstiere	25
3.3. Organentnahmen	26
3.4. Adoptiver CD4+ T-Zell Transfer	26
3.5. Fluorescence-Activated Cell Sorting	27
3.6. Experimenteller Herzinfarkt	31
3.7. Echokardiographie	33
3.8. Light-Sheet Fluorescence Microscopy	35
3.9. Statistische Analysen	35
4. Ergebnisse.....	36
4.1. TCR-M Akkumulation post-EMI in med-LN und Herz	36
4.2. TCR-M Aktivierung und Differenzierung zu Tregs post-EMI	40
4.3. Kardioprotektion post-EMI durch TCR-M in DO11.10-Empfängertieren	43
5. Diskussion.....	46
5.1. Wahl des Kandidatenantigens	46
5.2. Kritische Betrachtung der Analysemethoden.....	47
5.3. Interpretation der Daten	48
5.4. Vergleich der Tiermodelle	52
5.5. Vergleich der chirurgischen Modelle.....	53

5.6. Belastungseinschätzung	54
6. Zusammenfassung	56
7. Summary	58
8. Literaturverzeichnis	60
9. Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AIM	Autoimmunmyokarditis
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determining Region
cm	Zentimeter
DZ	Dendritische Zelle
EMI	Experimenteller Myokardinfarkt
et al.	et alii
FAC	Fractional Area Change
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
IL	Interleukin
I/R	Ischämie-Reperfusion
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
KA	kurze Achse
kg	Kilogramm
KM	Kardiomyosin
LSFM	Light-Sheet Fluorescent Microscopy
med-LN	Mediastinaler Lymphknoten
MI	Myokardinfarkt
min	Minute(n)
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
MYHCA	Myosin Heavy Chain Alpha

MΦ	Makrophagen
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OP	Operation
OVA	Ovalbumin
PSLA	Parasternale Lange Achse
RIVA	Ramus interventricularis anterior arteriae coronariae sinistrae
Sham	Negativkontrollgruppe nach Schein-Operation
si-LN	Lymphonodus subiliacus, Kniefaltenlymphknoten
Tcon	Konventionelle T-Zelle
TGF β	Transforming Growth Factor Beta
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
TCR-M	MYHCA ₆₁₄₋₆₂₉ -spezifische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
US	Ultraschall
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epidemiologische Entwicklung der kardiologischen Erkrankungen in den USA 1970-2006	3
Abbildung 2: Darstellung der Heilungsphasen nach MI	9
Abbildung 3: Kostimulatoren der Interaktion einer THF mit einer APZ	13
Abbildung 5: Zellcharakterisierung im FACS für die TCR-M Distributionsstudie	29
Abbildung 6: Zellcharakterisierung im FACS für den DO11.10 Transferversuches.....	30
Abbildung 7: Arbeitsschritte einer EMI-Operation	32
Abbildung 8: Echokardiographie des linken Ventrikels	35
Abbildung 9: Selektive TCR-M Akkumulation im infarzierten Herzen.....	37
Abbildung 10: LSFM-Aufnahmen der Herzen an Tag 7 post-EMI.....	38
Abbildung 11: LSFM-Aufnahmen der Herzen an Tag 49 post-EMI.....	39
Abbildung 12: TCR-M Aktivierung und Anhäufung der Tregs post EMI.....	42
Abbildung 13: Kardioprotektion durch im EMI-Kontext aktivierte CD4+ T-Zellen	45

1. Einleitung

Der akute Myokardinfarkt (MI) und seine Folgepathologien sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen (IBANEZ et al. 2018). Nachdem sich die akute Mortalität aufgrund maßgeblicher Fortschritte interventioneller Therapien, wie z.B. der Ballonangioplastie, stark reduzierte, steigt die Sterberate aufgrund der Folgeerkrankungen. Allen voran ist die Herzinsuffizienz zu nennen, welche 35 % der Patienten, die mit MI hospitalisiert wurden, entwickeln (GERBER et al. 2016). Die hierzu führenden Prozesse sind ätiologisch unzureichend verstanden, als entscheidender Faktor wird eine pathologisch persistierende Entzündung angenommen (LATET et al. 2015).

Charakterisiert durch akuten ischämischen Gewebsschaden, sterile Entzündung und kompensatorische sympathische Überstimulation beeinträchtigt der MI mit seinen hämodynamischen Defiziten ganze Organsysteme. Das irreversibel geschädigte Myokard, in seiner Unfähigkeit zur Myozytenregeneration, nekrotisiert und entwickelt fibrotisches Platzhaltergewebe, einer Narbenbildung vergleichbar (ERTL und FRANTZ 2005). Eine Neubetrachtung des Herzens als „heilende Wunde“ (BLANKESTEIJN et al. 2001) führte zu einer Reihe unabhängiger Studien, die sich mit den postinfarziellen regenerativen Prozessen auseinandersetzen. Dabei wurde die Bedeutung der kardiotropen adaptiven Immunität erkannt, welche bisher überwiegend in infektiösen Kontexten diskutiert wurde (EPELMAN et al. 2015, NUNES-SILVA et al. 2017).

Mit der Aufstellung der Klon-Selektionshypothese (BURNET 1959) dominierte zunächst ein pathozentristisches Modell die adaptive Immunität. Hierbei wurde das Verhalten der T-Zellen auf eine isolierte Betrachtung voneinander unabhängiger T-Zell-Klone und ihrer selektiven Spezifität ggü. einzelnen Antigenen zurückgeführt. Mittlerweile wird die adaptive Immunität allerdings in einem breiteren systematischen Kontext betrachtet. Anfänglich als “Netzwerkhypothese” bezeichnet (JERNE 1974), wurde die physiologische Autoreaktivität zwischen Lymphozytenklonen und körpereigenen Autoantigenen bereits vielfach nachgewiesen (HSIEH et al. 2004, VARELA und COUTINHO 1991). Hierbei reguliert das interagierende Kollektiv der Lymphozyten Wachstum, Homöostase und Regeneration (RAMOS 2012).

Infolgedessen richtete sich der Fokus auch auf T-Zellen, als Teil des erworbenen Immunsystems, neben B-Zellen und Antikörpern. CD4⁺ T-(Helfer)-Zellen, speziell deren Subpopulation der FoxP3⁺ (Forkhead Box Protein 3, Transkriptionsfaktor) regulatorischen T-Zellen (Tregs), wurde nach experimentellem Myokardinfarkt (EMI) eine heilungsfördernde Wirkung nachgewiesen (HOFMANN et al. 2012, TANG et al. 2012, WEIRATHER et al.

2014). Daraufhin sollten die mechanistischen Zusammenhänge erforscht werden. Hierbei herrscht noch kein Konsens darüber, welcher Stimulus im Rahmen der Entzündungsreaktion einen vorrangigen ursächlichen Einfluss auf die T-Zell-Aktivität und deren vermittelte Effekte nimmt: der Kontakt zu ihren zugehörigen Antigenen oder das Zytokinmilieu, in dem dies geschieht (“Zytokin-Hypothese”) (MARTINI et al. 2018). Mehrere Studien deuten allerdings darauf hin, dass die α -Isoform des Myosins bzw. Kardiomyosin (KM) eine grundlegende Rolle bei entzündlichen Herzerkrankungen spielt. Erstens weisen Herzinfarktpatienten einen stark erhöhten Titer von Anti-KM Antikörpern auf (O'DONOHUE et al. 2016). Zweitens führt bei prädisponierten Mausstämmen eine Injektion von in Adjuvans adsorbiertem KM zu einer T-Helfer-Zellen medierten Autoimmunmyokarditis (AIM) (SMITH und ALLEN 1991). Drittens entwickelt der von NINDL et al. (2012) etablierte transgene Mausstamm spontan ab einem Alter von 6 Wochen eine AIM, da dessen monoklonales T-Zell-Rezeptorrepertoire spezifisch auf ein besonders immunogenes Epitop des KM reagiert, einer Aminosäuren-sequenz der schweren Kette des α -Myosins: MYHCA₆₁₄₋₆₂₉.

Ebendieses transgene Mausmodell kam in dieser Arbeit zum Einsatz, um die Rolle KM-spezifischer T-Zellen in Heilungsprozessen nach EMI zu erforschen.

2. Literaturübersicht und Zielstellung

2.1. Der Myokardinfarkt

Fortschritte interventioneller Therapien, wie z.B. die Ballonangioplastie, führten zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität durch den MI (NAHRENDORF et al. 2010), trotzdem gilt dieser mit seinen Folgepathologien als die häufigste Todesursache in den Industrienationen (IBANEZ et al. 2018). Die wohl schwerwiegendste Folgeerkrankung stellt die Herzinsuffizienz dar, an welcher, nach Hospitalisation aufgrund MI, 35 % der PatientInnen erkranken. Die steigende Inzidenz der Herzinsuffizienz korreliert direkt mit der gestiegenen Überlebensrate nach MI (Abb. 1), wobei ein pathologischer Zusammenhang angenommen wird (GERBER et al. 2016).

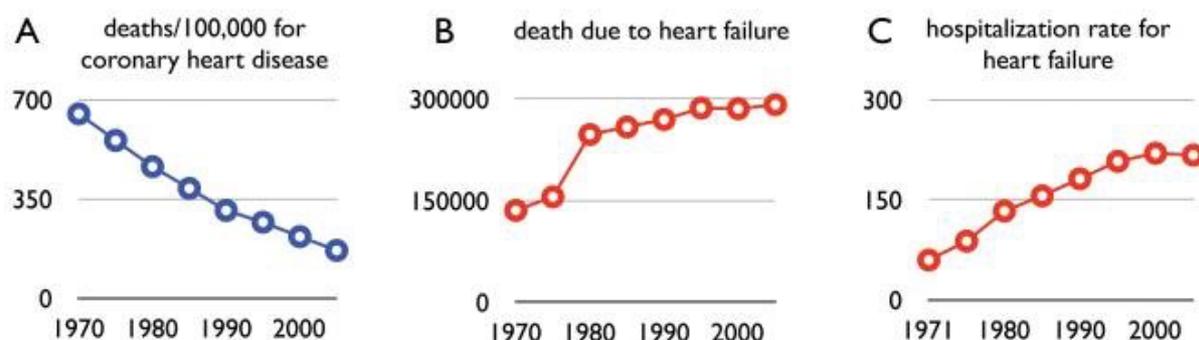


Abbildung 1: Epidemiologische Entwicklung der kardiologischen Erkrankungen in den USA 1970-2006

(A) Todesfälle pro 100 000 Bürger aufgrund koronarer Herzkrankheiten, Kohorte: Männer von 35-74 Jahren. (B) Todesfälle aufgrund Herzinsuffizienz. (C) Hospitalisationen pro 100 000 Bürger aufgrund Herzinsuffizienz, Kohorte: Alter > 65 Jahre. (NAHRENDORF et al. 2010)

Definitionsgemäß wird der MI durch ischämisch bedingte Nekrose von Kardiomyozyten charakterisiert. Das klinische Bild zeichnet sich durch Schmerzhaftigkeit in Brust und Oberbauch, Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen und perakute systolische Herzinsuffizienz aus. Weiterhin können Schweißausbrüche, Übelkeit oder Synkopen auftreten (IBANEZ et al. 2018). Klinisch sind im Blut messbare Biomarker aussagekräftig. Goldstandard zur Diagnosestellung ist die Messung frei zirkulierenden Troponins I, des Weiteren der MB-Isoform der Creatinkinase, beides herzspezifisch exprimierte intrazelluläre Enzyme, die nach Beschädigung der Myozyten in den Blutkreislauf gelangen. Dabei ist der Serumkonzentrationsverlauf des Troponins I, der 24 Stunden nach dem Einsetzen des MI sein Maximum findet, das pathognomonische Kriterium und unterscheidet den MI von anderen

kardiodestruktiven Prozessen (Hypertension, Infektion, Intoxikation) und dem normalen Zellenumbauprozessen und -mauserung (*turnover*). Bei letzteren kann es zu einem leicht erhöhten Troponin I Wert kommen, der allerdings 1 % des maximalen Referenzwertes nicht übersteigt, wohingegen der MI deutlich höhere Troponin I Werte erreicht (LANGHORN und WILLESEN 2016, THYGESEN et al. 2012). Der MI kann allerdings auch mit atypischen Symptomen auftreten, z.B. Palpitationen oder asymptomatisch, v.a. bei Frauen, diabetischen, geriatrischen und schwerkranken Patienten (THYGESEN et al. 2007).

Ätiologisch verursachen bei Menschen entzündliche Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose mit sekundärer intravasaler Thrombose den Großteil der Ischämien. In nur ca 20 % der Fälle liegen keine obstruktive Herzkranzgefäßerkrankungen vor (BUGIARDINI et al. 2006, REYNOLDS et al. 2011, ROE et al. 2000).

Bei Haussäugetieren liegen aufgrund einer geringeren Inzidenz atherosklerotischer Erkrankungen (DRIEHUYS et al. 1998, KIDD et al. 2000), der besseren kollateralen Herzkranzgefäßversorgung (VERDOUW et al. 1998, WILSON und SCHEEL 1982) und nicht zuletzt wegen der grobmaschigeren medizinischen Überwachung weniger Daten zur Inzidenz des MI vor. Dennoch geht man von weitestgehend ähnlichen pathophysiologischen Mechanismen aus, zumal Maus, Ratte, Kaninchen, Hund, Katze, Schwein, Schaf, Meerschweinchen und der Pavian als Modellorganismen für die Herzinfarktforschung verwendet werden (VERDOUW et al. 1998).

Neben klinischen Beschreibungen des MI bei Hunden und Katzen (DRIEHUYS et al. 1998, KIDD et al. 2000), sind sie seltenst auch bei Kühen (MACHIDA et al. 1991), Pferden (SCHWARZWALD et al. 2003) und dem Walross (GRUBER et al. 2002) dokumentiert.

2.2. Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Neben der Gefahr des plötzlichen Herztodes führt der MI nach der massiven Nekrose des Myokards zu einer pathophysiologischen Entzündungskaskade. Das Säugetiermyokard ist hierbei im adulten Status nicht mehr zur Regeneration befähigt und bildet fibrotisches Platzhaltergewebe aus, eine *restitutio ad integrum* ist bei dieser Defektheilung nicht möglich (ERTL und FRANTZ 2005, VAGNOZZI et al. 2018). Je nach Verlauf kann dieser Prozess entweder eine abgeschlossene Heilung zur Folge haben, oder zu einer chronisch aktiven Entzündung führen, die progressive pathologische Umbauprozesse („*Remodeling*“) zur Folge hat. Dies zeichnet sich durch pathologische molekulare und zelluläre Veränderungen wie Infarktexpansion, Myokardhypertrophie und -fibrose und Abnahme der Ventrikelwanddicke

im infarzierten Gebiet aus. Die Kollagenfibrillen werden nicht optimal vernetzt und unterliegen verstärkten Umbauprozessen, was durch die mechanische Belastung des Herzschlages zu einer Verschiebung zueinander führt. Dies resultiert letztendlich zu axialer Verlängerung der Infarkt Narbe und Ventrikeldilatation, bis hin zu einem kardialen Aneurysma, einer Aussackung der infarzierten Ventrikelwand. Chronische Entzündungszustände können weitere Apoptose/Nekrose der Kardiomyozyten nach sich ziehen. Chronische Kollagendeposition führt zur Beeinträchtigung der Kontraktilität und Erhöhung der Gewebesteifigkeit des Myokards. Letztendlich haben diese fortlaufenden Beeinträchtigungen die systolische und diastolische Dysfunktion zur Folge und führen final zur Herzinsuffizienz (FRANTZ et al. 2009, GERBER et al. 2016, LEE, W. W. et al. 2012, NIAN et al. 2004, PFEFFER und BRAUNWALD 1990, RAMOS et al. 2016).

Die dem Auftreten des *Remodelings* zu Grunde liegenden Mechanismen werden in einem Versagen der homöostatischen Regulation vermutet (FRANGOIANNIS 2015, LATET et al. 2015). An dieser Stelle wird näher auf die Heilungs- bzw. immunologischen Phasen eingegangen (Abb. 2):

Inflammatorische Phase

Die „inflammatorische Phase“ ist dabei die erste, ca. 3-4 Tage dauernde Periode. Sie zeichnet sich durch eine sterile Entzündung und Leukozyteninfiltration aus. Den ersten inflammatorischen Stimulus bilden dabei die von den nekrotischen Kardiomyozyten ausgestoßenen Alarmine, sog. „*Damage-Associated Molecular Patterns*“ (DAMP). Diese binden an Mustererkennungsrezeptoren bzw. „*Pattern Recognition Receptors*“ auf überlebenden Parenchymzellen und organständigen Leukozyten und stimulieren das angeborene Immunsystem. Klassische DAMPs sind dabei Adenosintriphosphat (ATP), Doppelstrang-RNA, Hitze-Schock Protein 60 & 70 und *High Mobility Group Box 1*, die v.a. an *Toll-like* Rezeptoren, *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor* und *Receptor for Advanced Glycation End-Products* binden.

Dies hat vielfältige Signalkaskaden zur Folge, besonders aber werden der Mitogen aktivierte Proteinkinase- und „*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells*“-Signaltransduktionsweg stimuliert.

Daraufhin wird ein breites Sortiment an proinflammatorischen Genen exprimiert, was in der Produktion von v.a. Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-18 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mündet, weiterhin Komplementfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen, wie „*Vascular Cell Adhesion Molecule*“, „*Intercellular Adhesion Molecule*“ und Selektine. Zusätzlich wird die Leukodiapedese und -migration durch Chemokine gefördert. Monozyten, T-Zellen und

neutrophile Granulozyten werden dabei dem Konzentrationsgradienten der Chemokine folgend gesteuert (ARSLAN et al. 2011, DE HAAN et al. 2013, MANN 2011, NEWTON und DIXIT 2012, NIAN et al. 2004).

Die Folge dieser komplexen Wechselwirkungen ist eine verstärkte Leukozyteninfiltration, die die Entzündungsreaktion in einem positiven Wirkungskreis weiter verstärkt und einem zeitlich fein abgestimmten Infiltrationsprofil folgt. Während die meisten neutrophilen Granulozyten am dritten Tag im Myokard präsent sind, liegt ihr relatives Maximum im Verhältnis zu der Gesamtheit der sich im Myokard befindlichen Leukozyten am 1. Tag und fällt danach stark ab (YAN et al. 2013). In dieser Anfangsphase kommt es nach Freisetzung von Proteasen und Oxidasen (*Reactive Oxygen Species*) durch die neutrophilen Granulozyten zum Zellabbau durch Nekrose und Apoptose, was die Freisetzung weiterer DAMPs nach sich zieht, nebst Phagozytose und proinflammatorischer Mediatoren durch Makrophagen (M Φ). Vermutliche Funktion dieses Prozesses ist die Zersetzung und Phagozytose der nekrotisierten zellulären Strukturen und Debris, da es nach experimenteller Ablation von M Φ zu erhöhtem Auftreten an Thrombembolien und Infarktexpansion kommt (FRANTZ et al 2013).

Proliferative Phase

Nach Bereinigung der Wunde von Zelltrümmern kann sich nun die zukünftige Narbe ausformen. In dieser „proliferativen Phase“ werden die proinflammatorischen Leukozyten durch die Einwanderung antiinflammatorischer Subtypen ersetzt, die heilungsfördernde Signalwege stimulieren und das Entstehen von Granulationsgewebe beeinflussen. Störungen in dieser Phase führen in der Regel zu persistierenden Entzündungszuständen, die fatale gesundheitliche Folgen haben (NATHAN und DING 2010, YANG et al. 2000).

Eine besondere Rolle nehmen die M Φ ein, welche sich aus anfangs v.a. gewebsständigen M Φ und dann im Laufe der Inflammation aus infiltrierenden Monozyten, welche vor Ort zu M Φ differenzieren, zusammensetzen (HEIDT et al. 2014). Der Ursprung dieser Monozyten liegt im Knochenmark und der Milz (SWIRSKI et al. 2009). Zur Einteilung in proinflammatorische und alternative/reparative Monozyten wird im Mausmodell in der Regel die Oberflächenexpression des Markers Lymphocyte Antigen 6 Complex (Ly6C) zur Hilfe gezogen (HORCKMANS et al. 2017). Während in der initialen inflammatorischen Phase noch proinflammatorische Monozyten (Ly6C^{hoch}) einwandern und zu M Φ der proinflammatorischen Polarisation differenzieren („M1“), kommt es nach ca. drei bis vier Tagen zur Expression eines anderen Chemokinprofils und Infiltration einer phänotypisch distinkten Subpopulation antiinflammatorischer Monozyten (Ly6C^{niedrig}) bzw. daraus entstehender reparativer M Φ („M2-Typ“) (NAHRENDORF et al. 2010). Deren Interaktionen scheinen eher zu Fibrozyten- und Endothelzellen-Stimulation zu führen, was die

namensgebende Proliferation des Narbengewebes bewirkt. Dieser Prozess wird vermutlich aufgrund der Phagozytose der nekrotischen Kardiomyozyten und apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch die M Φ verursacht (HORCKMANS et al. 2017). Jene schaffen folglich ein heilungsförderliche Zytokin- und Wachstumsfaktorenmilieu durch immunsuppressive Mediatoren, wie IL-10 (JUNG et al. 2017) und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) (HUYNH et al. 2002), und tragen zu Modifikation der extrazellulären Matrix durch Produktion von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren bei (FRANTZ et al. 2013, HILGENDORF et al. 2014). IL-10 und TGF- β werden auch von T-Helfer-Zellen sezerniert, die in diesen Prozess parallel oder sogar in Wechselwirkung mit den M Φ ähnliche Funktionen zu übernehmen scheinen (GROUX et al. 1997, OUYANG et al. 2011, WEIRATHER et al. 2014).

Gerade die extrazelluläre Matrix scheint an dieser Stelle eine wichtige Signalfunktion zu übernehmen. Sie bildet die allumfassende Vernetzung der Zellen in zweierlei Sinne. Einerseits ein permanentes strukturelles Gerüst bietend, ändert sich die extrazelluläre Matrix dynamisch in ihrer molekularen Zusammensetzung und dient als damit andererseits als Kommunikator entzündungsmodifizierender Signale durch Modifikation der Proteasen und Wachstumsfaktoren durch sog. matrizelluläre Proteine (FRANGOIANNIS 2012).

Die Auflösung der initialen Entzündungsreaktion hängt aber keineswegs lediglich von phagozytotischen Automatismen ab. Innerhalb der letzten Dekade substantiierte sich die Datenlage zur Involvierung der adaptiven Immunität nach MI, welche direkt immunsuppressiv einwirken kann. Deren Bedeutung scheint neben der Feinabstimmung sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Entzündungsantworten in der Entzündungsresolution und Stimulation der Heilungsprozesse zu liegen. Dabei gerieten v.a. Lymphozyten (HOFMANN und FRANTZ 2015, NUNES-SILVA et al. 2017) und speziell deren immunsuppressives, regulatorisches T-Zell-Subset (Treg) in den Fokus, die nach EMI eine heilungsförderliche Wirkung zeigen, indem sie u.a. die M1/M2 Polarisation der M Φ beeinflussen (HOFMANN et al. 2012, TANG et al. 2012, WANG et al. 2016, WEIRATHER et al. 2014).

Auf Phänomen der physiologischen Autoimmunität durch T-Zellen wird im Kapitel 2.3.5 und 2.4 genauer eingegangen.

Das Granulationsgewebe der für diese Phase namensgebende Proliferation wird durch Myofibroblasten und neoangiogene Endothelzellen gebildet (REN et al. 2002). Die Myofibroblasten entstehen dabei durch einen phänotypischen Wandel der kardialen Fibroblasten hin zu stark sekretorischen Zellen, welche maßgeblich an dem der Deposition neuen Kollagens und dem Wiederaufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (ALI et al. 2014). Myofibroblasten sind durch enthaltenes „ *α -Smooth Muscle Actin*“ zur

(Wund-)Kontraktion befähigt und bilden einen Mischtypen zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Die Transition hin zu den Myofibroblasten wird durch ein ganzes Netzwerk an Leukozyten reguliert, förderlich sind dabei u.a. TGF- β , IL4, IL-10, IL-13 und Osteopontin (SHINDE und FRANGOIANNIS 2014, VAN LINTHOUT et al. 2014).

Maturationsphase

Nach der ersten Woche beginnt die Wochen bis Monate dauernde Ausreifungsphase, in der sich die Wunde reorganisiert, das Granulationsgewebe kontrahiert, die Anzahl der Leukozyten graduell abnimmt und die Entzündungskaskade bei ungestörtem Ablauf ihr abschließendes Ende findet (TAKEMURA et al. 1998). Vor allem die extrazelluläre Matrix wird in dieser Phase in ihrer Komposition in einen ruhenden, dauerhaften Status überführt, indem die Kollagenfasern vernetzt und der mechanischen Belastung angepasst strukturiert werden (ZIMMERMAN et al. 2001). Die Anzahl der Myofibroblasten reduziert sich, indem sie in Apoptose übergehen oder in einen stoffwechsellaktiveren Zustand wechseln (REN et al. 2002). Die Regulierung dieser zur Homöostase führenden Vorgänge ist weitestgehend unbekannt. Fehlsteuerung an dieser Stelle könnte zu chronischem *Remodeling* und Fibrose des Myokards führen.

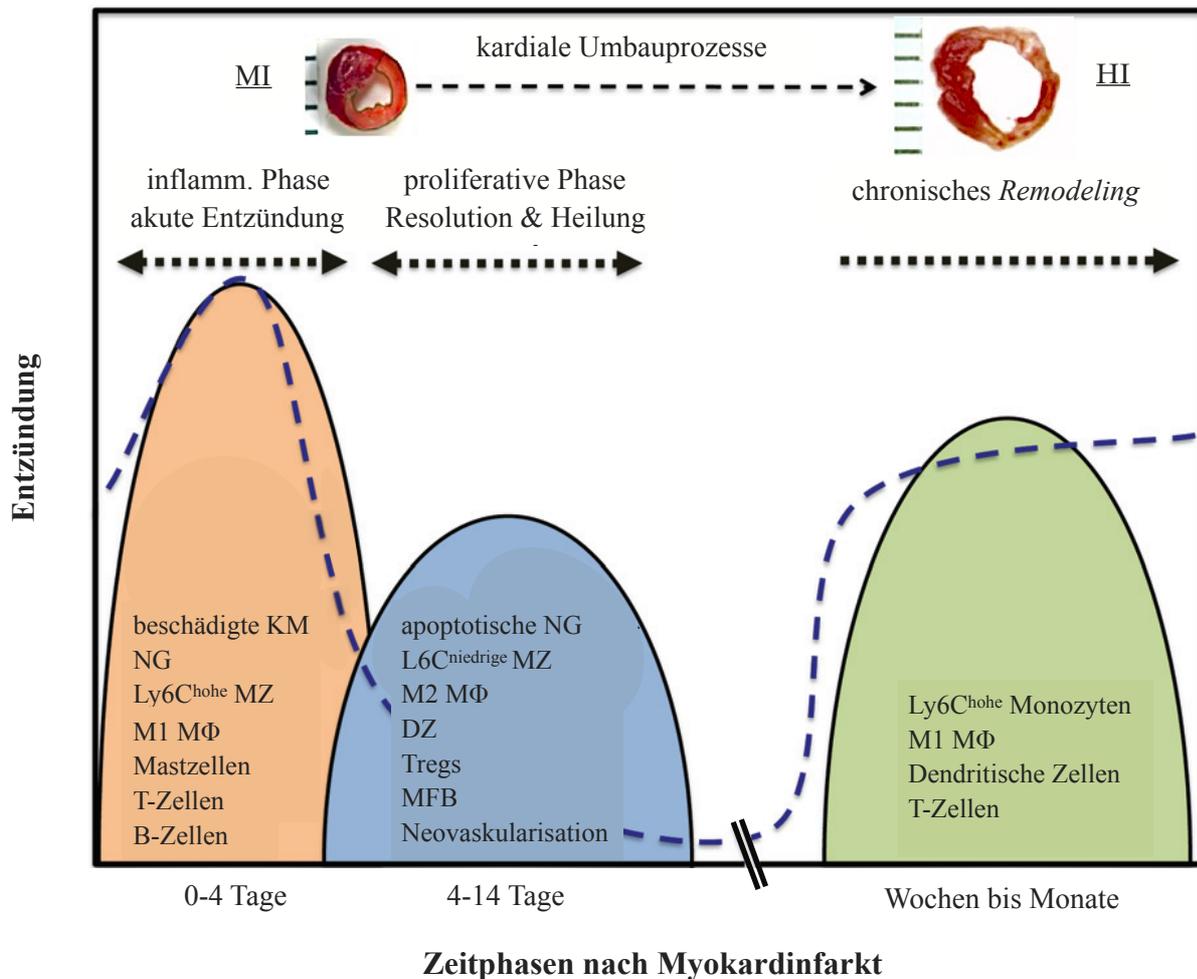


Abbildung 2: Darstellung der Heilungsphasen nach MI

Das Entzündungsgeschehen nach einem MI involviert je nach Zeitphase verschiedene Zellpopulationen. Die Aktivität der Leukozyten minimiert sich bei physiologischer Ausheilung nach der proliferativen Phase. Im Falle einer pathologisch persistierenden Entzündungsaktivität kommt es zum *Remodeling* mit typischer Beteiligung bestimmter Leukozytenpopulationen.

DZ=Dendritische Zellen, EZ=Endothelzellen, HI=Herzinsuffizienz, KM=Kardiomyozyten, MFB=Myofibroblasten, MZ=Monozyten, NG=Neutrophile Granulozyten. (modifiziert nach PRABHU und FRANGOIANNIS 2016)

2.3. T-Zellen

2.3.1. Die funktionelle Rolle der T-Zellen

Die T-Zellen bilden zusammen mit den B-Zellen das zelluläre adaptive Immunsystem, die Lymphozyten. Durch ihren T-Zell Rezeptor (TZR) sind sie in der Lage AG zu erkennen, die in Proteintaschen der *major-histocompatibility-complex*-Moleküle (MHC) auf Zelloberflächen in Form von Polypeptiden präsentiert werden (RUDOLPH et al. 2006). Hierbei unterscheidet man MHC-I, welche auf allen kernhaltigen Zellen vorzufinden sind, und MHC-II, die lediglich durch „professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen (APZ) in ihre Zellmembran eingefügt werden, also u.a. Dendritischen Zellen (DZ), Monozyten, MΦ und B-zellen.

Die erste Aktivierung der T-Zellen erfolgt meist in sekundären lymphatischen Organen, in welche die im Blutkreislauf “patrouillierenden” T-Zellen durch die Expression von L-Selektin (CD62L) einwandern (VAN DEN BROEK et al. 2018). Eine T-Zelle benötigt 2 Signale, um dort auf ein AG zu reagieren: einerseits das zugehörige AG, welches in dem MHC präsentiert wird und die Signaltransduktion über den TZR auslöst. Andererseits kann diese nur bei Vorhandensein einer Kostimulation durch die APZ ausgeführt werden, was als Bestätigung des Signals durch die Zielzelle dient. Die Kommunikation zwischen APZ und T-Zelle nimmt ungefähr 12 Stunden in Anspruch (MEMPEL et al. 2004). Die Kombination dieser Signale determiniert, welches zelluläre Programm die T-Zelle anschließend ausführt: Anergie, Apoptose oder Aktivierung. Dabei unterteilt man in aktivierende (z.B. CD28, CD278 [*inducible T-cell costimulator*, ICOS] und CD134 [OX40]) und suppressive Kostimulatoren (z. B. CD279 [*programmed cell death protein 1*, PD-1] und CD152 [*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4]) (SMITH-GARVIN et al. 2009). Eine ausbleibende Kostimulation durch CD28 führt die T-Zelle in die Anergie, einen Zustand der Inaktivität. Kommt hierbei noch eine suppressive Kostimulation wie durch PD-1 hinzu, geht die T-Zelle in Apoptose über. Hierdurch wird ungewollten autoaggressiven T-Zell-Reaktionen vorgebeugt (GANGULY et al. 2013). Bei aktivierender Kostimulierung proliferiert die T-Zelle und exprimiert ein von dem kostimulatorischen Signal abhängiges Chemokinrezeptorprofil. Dem Konzentrationsgradienten der jeweiligen Chemokine folgend, wandert die T-Zelle in das zugehörige (entzündete) Gewebe ein und führt je nach Typus ihre jeweiligen Funktionen aus (MASOPUST und SCHENKEL 2013).

T-Zellen, die zuvor noch keine Aktivierung erfahren haben, werden als “naiv” bezeichnet. Sie zeichnen sich durch eine geringe CD44- und eine hohe CD62L-Oberflächenexpression aus. Durch Aktivierung und Proliferation im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses regulieren sie den Oberflächenmarker CD44 hoch und CD62L herunter. Für die Dauer ihrer

Aktivität werden sie als “Effektorzellen“ bezeichnet. Aus diesem Kompartiment differenzieren sich in einem stochastischen Prozess die “Gedächtniszellen”. Die aktivierten interagierenden Effektor-T-Zellen durchlaufen einen kollektiven kommunikativen Prozess und ein Bruchteil der Zellen formt eine langlebige Subpopulation. Diese ermöglicht zukünftig eine schnellere Aktivierung und Proliferation dieses T-Zell-Klones (POLONSKY et al. 2018). Dabei identifiziert man unter Gedächtniszellen einerseits “zentrale Gedächtniszellen”, welche CCR7, CD44 und CD62L exprimierend durch die Lymphknoten zirkulieren (SALLUSTO et al. 1999). Nach Restimulation produzieren diese v.a. IL-2. Die “Effektor-Gedächtniszellen” andererseits, welche sich in peripheren Geweben finden und CD44, allerdings wenig CD62L und CCR7 exprimieren, produzieren nach Restimulation v.a. IFN- γ . Effektor-Gedächtniszellen, welche dauerhaft in bestimmten Geweben residieren, werden als “*tissue resident memory T cells*” bezeichnet und zeichnen sich durch zusätzliche CD69- und CD103-Expression aus (MUELLER et al. 2013).

Die Konfrontation mit dem zugehörigen Antigen und darauffolgende Ausdifferenzierung der Zellen wird als “*Priming*” bezeichnet.

Wenngleich T-Zellen *in situ* eine Vielzahl an feindifferenzierten Subtypen bilden und vielfältige Funktionen wahrnehmen, lassen sich in einem vereinfachenden Modell folgende verschiedene T-Zell-Phänotypen unterscheiden:

2.3.2. Konventionelle T-Zellen

In ihrer proinflammatorischen Funktion grenzt sich der Großteil der T-Zellen von den immunsuppressiven ab. Demzufolge fasst man diese Subtypen unter dem Sammelbegriff der *konventionellen T-Zellen* (Tcon) zusammen.

T-Helfer Zellen

CD4⁺ „*T-Helferzellen*“ (THZ) locken und beeinflussen über Zytokinsekretion und Zell-Zell-Kontakte andere Leukozyten und übernehmen eine wichtige Rolle bei der Koordination von Immunreaktionen. Durch die Expression des Korezeptors CD4 binden THZ nur an MHC-II⁺ Zellen (Abb. 3) (MALISSEN und BONGRAND 2015).

Erste phänotypische Unterschiede zwischen THZ wurden nach Isolation aus unterschiedlichen Mausstämmen beobachtet. Kultivierte THZ aus C57BL/6 Mäusen produzierten vornehmlich IFN- γ , TNF- α und IL-12, aus BALB/c Mäusen wurden v.a. IL-4, IL-5 und IL-13 sezernierende THZ gewonnen. Aufgrund dieser unterschiedlichen stammesabhängigen Zytokinprofile unterschied man anfangs dementsprechend die

Zellphänotypen in Th1- und Th2-Subtypen, welche letztendlich Extremformen der funktionellen T-Zell-Polarisation darstellen (MOSMANN et al. 1986). Th1-Zellen sind in der zellulären Immunantwort involviert, indem sie über ihre Ausschüttung von IL-2, IFN- γ und TNF- α u.a. M Φ aktivieren. Diese reagieren über IL-12, TNF- α und Hochregulierung ihrer kostimulatorischen Oberflächenmoleküle (CD40, CD80 und CD86) und der MHC-II. Die anschließenden Funktionen der M Φ hängen stark von dem Kontext ab, in dem sie aktiviert wurden. Dies reicht von der Phagozytose von Pathogenen oder infizierten Zellen bis hin zu homöostatischen Funktionen im Rahmen der Heilung (CHOO et al. 2017, FRANTZ, Stefan et al. 2013, GORDON und PLUDDMANN 2017, UNDERHILL und OZINSKY 2002, WEIRATHER et al. 2014). Vor allem die IFN- γ Ausschüttung durch die Th1 garantiert durch ein positives Feedback eine stabile zelluläre Immunreaktion (COSMI et al. 2014). Th2 lösen dahingegen eher eine humorale Immunantwort aus, indem sie mit B-Zellen kommunizieren. Dies geschieht sowohl über Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13), als auch direkt über Zell-Zell-Kontakte (CD40/CD40L). B-Zellen exprimieren das zu dem B-Zell- und THZ zugehörige Antigen auf einem MHC-II, wodurch die Bindung dieser beiden Zellen initiiert wird. Über die Interaktion des durch die B-Zelle exprimierten kostimulatorischen Proteins CD40 mit CD40L der THZ und dessen IL-2 Produktion wird die B-Zelle letztendlich stimuliert. Daraufhin durchläuft die B-Zelle Aktivierung, Proliferation, den Isotypen-Wechsel der produzierten Antikörper von IgM zu IgG, IgA oder IgE und die Ausdifferenzierung zur Plasmazelle. Hierdurch ist eine effektivere Bekämpfung und Opsonierung der Pathogene möglich. Die kommunikativen Prozesse zwischen THZ und B-Zellen laufen weitestgehend in den Keimzentren der Lymphknoten bzw. weißen Milzpulpa ab (KAWABE et al. 1994). Die in diesem Rahmen produzierten Zytokine (v.a. IL-4 und IL-10) hemmen die Th1-Antwort und M Φ -aktivierung (DUPAGE und BLUESTONE 2016).

Im Laufe der Zeit wurde die Charakterisierung dieser anfänglichen Th1/Th2 Dichotomie verfeinert und die Nomenklatur der unterschiedlichen THZ-Typen deren typischen Zytokinsekretionsmustern und Zellfunktionen angepasst, wodurch weitere Subtypen, wie Th3, Th9, Th17, Th22 und Thf (follikuläre THZ), identifiziert wurden (GOLUBOVSKAYA und WU 2016, HARRINGTON et al. 2005, ZHU und PAUL 2008).

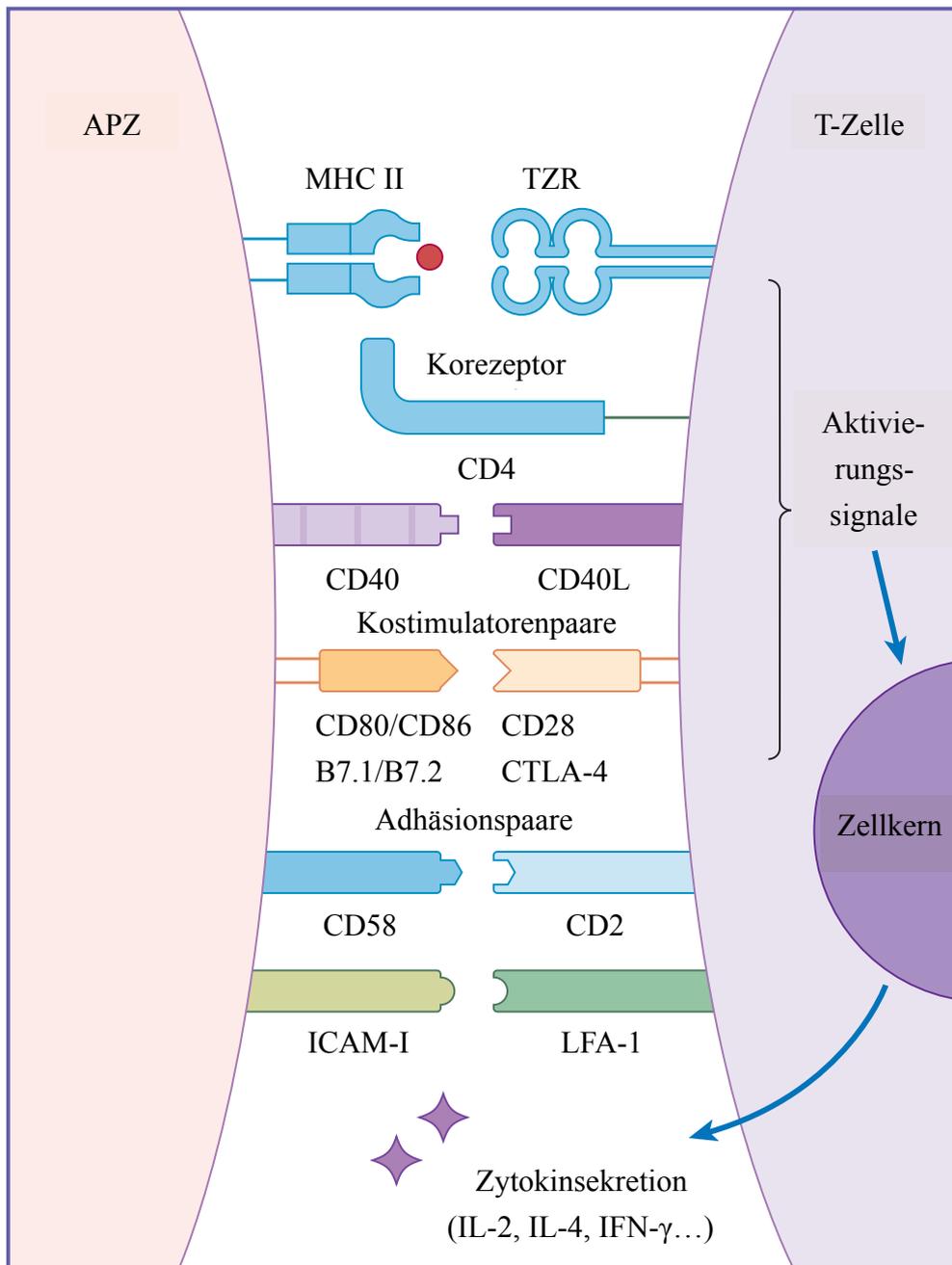


Abbildung 3: Kostimulatoren der Interaktion einer THF mit einer APZ

Neben MHC-II und TZR finden sich kostimulatorische (CD28, CTLA-4 und CD40L) und adhäsive (CD2 und LFA-1[Lymphocyte function-associated antigen 1]) Proteine auf der Zelloberfläche der T-Zellen. Nach Stimulation durch die jeweiligen Liganden führt die spezifische Genexpression im Zellkern letztendlich zu Sekretion von Zytokinen. ICAM-I=Intercellular cell adhesion molecule 1. (modifiziert nach ACTOR 2014)

Zytotoxische T-Zellen

Aufgrund (viraler) Infektionen, Zellschäden oder onkologischer Prozesse dysfunktionale Zellen werden durch CD8⁺ “*zytotoxische T-Zellen*” (ZTZ) im Zell-Zell-Kontakt zerstört.

Die Aktivierung und Reifung erfolgt durch die Erkennung des zugehörigen Antigens auf MHC-I, auf welche die ZTZ durch ihren Korezeptor restringiert sind. MHC-I kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor (MALISSEN und BONGRAND 2015). Auch hierbei muss das antigene Signal gleichzeitig über die Kostimulation durch die Zielzelle bestätigt werden. Diese erfolgt über Bindung von CD28 an CD80/86 der MHC-I exprimierenden Zelle. Anschließend schüttet die an die Zielzelle eng gebundene ZTZ Granula aus, welche Perforine, Granzyme und Granulysin enthalten (DOTIWALA et al. 2016, MARTIN et al. 1996). Das Perforin perforiert die Plasmamembran der Zielzelle enzymatisch und schafft einen Zugang für die Granzyme und Granulysin. Diese proapoptischen Proteasen diffundieren in das Zytosol der Zielzelle und lösen über Caspase-aktivierte DNAsen den programmierten Zelltod aus. Einen weiteren, rezeptormediierten Weg der Apoptoseinduktion stellt der Fas/FasL-Signalweg dar (SHARAPOVA et al. 2017). Sofern die Zielzelle den Todes-Rezeptor Fas exprimiert, kann die ZTZ über Expression des Fas-Liganden den “*death-inducing signaling complex*” aktivieren, wobei auch hier letztendlich eine Caspase-medierte Aktivierung der DNase zur Degradation der Zielzellen-DNA und Membranbläschenbildung führt (COLEMAN et al. 2001, SALVESEN 2002).

2.3.3. Regulatorische T-Zellen

Das regulatorische Subset der THZ supprimiert bzw. reguliert die zellulär medierte Immunantwort (JOSEFOWICZ et al. 2012, SCHULZE et al. 2016, WEIRATHER et al. 2014). Die Tregs verhindern v.a. überschießende immunologische Reaktionen, z.B. indem sie das Priming naiver T-Zellen durch APZ beeinflussen, indirekt über IL-10 und TGF- β , oder direkt über CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) und TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig- and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-domains*). Diese beiden immunsuppressiven Kostimulatoren üben eine regulatorische Funktion aus, indem sie bei Interaktion mit DZ deren IL-10 und TGF- β -Produktion anregen und CD80/86-Expression herunterregulieren (WING und SAKAGUCHI 2010, YU et al. 2009). Über CD39 und CD73 exprimieren Tregs 2 Ektoenzyme, die in den Adenosinstoffwechsel eingreifen (BORSELLINO et al. 2007, DEAGLIO et al. 2007). Neben der direkten Suppression anderer Leukozyten sind die Tregs an Signalkaskaden in Wachstums- und Heilungsvorgängen beteiligt, wie der oben erwähnten Polarisation von M Φ und Aktivierung von regenerativen

Signaltransduktionswegen (WEIRATHER et al. 2014). Die grundlegende Rolle der Tregs ließ sich in vielen Geweberegenerationsmodellen darstellen, wie z.B. in Myokard, Skelettmuskel, Lunge und ZNS. Einer der involvierten Mechanismen ist die Sekretion von Amphiregulin durch Tregs, welches auf die gewebeständigen Vorläuferzellen heilungsförderlich einwirkt (ARPAIA et al. 2015, BURZYN et al. 2013, HUI et al. 2017, RAPOSO et al. 2014).

Eine besondere Relevanz in autoimmunen Prozessen und Heilung erhalten Tregs durch die Beobachtung, dass Foxp3⁺ und Foxp3⁻ CD4⁺ T-Zell Subtypen verschiedene, wenn auch überlappende T-Zell-Rezeptor-Repertoires exprimieren. FoxP3⁺ T-Zellen reagieren dabei vermehrt und bei einem niedrigeren Aktivierungsschwellenwert als Foxp3⁻ auf Autoantigene. Dies führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Interaktion mit körpereigenen AG (HSIEH et al. 2004, NUNES-SILVA et al. 2017, PACHOLCZYK et al. 2006, PACHOLCZYK und KERN 2008).

1995 wurden Tregs erstmals als CD4⁺CD25⁺ immunsuppressive T-Zellen beschrieben (SAKAGUCHI et al. 1995). CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors und auf aktivierten T-Zellen, v.a. aber auf Tregs exprimiert. 2001 wurde der FoxP3 Transkriptionsfaktor bei dieser Zelllinie durch BENNETT et al. zur immunologischen Identifizierung entdeckt.

2.3.4. Der T-Zell-Rezeptorkomplex

Das TZR-Repertoire kann als Kollektiv praktisch alle existierenden AG erkennen. Dies ist über eine immense Zahl einzigartiger TZR möglich, die in ihrem Aufbau dem AG-bindenden Fragment der Antikörper ähneln. Bei dem im für die T-Zellen namensgebenden Thymus stattfindenden Prozess der *somatischen Rekombination* werden die für den TZR codierenden genetischen V-(Variable), D-(Diversity), und J-(Joining)-Segmente zufällig rekombiniert. Dieser Vorgang wird durch die Rekombinasen RAG1 und RAG2 („*recombinase activating gene*“) vermittelt (DAVIS 1990, SCHATZ und JI 2011). Der Organismus verfügt dabei jeweils über eine Vielzahl an VDJ-Segmenten, ähnlich einer Bibliothek an Vorlagen, aus der in einem stochastischen Prozess in jeder entstehenden T-Zelle eine Auswahl getroffen wird. Der Rest der nicht selektierten VDJ-Semente wird aus der DNA der jeweiligen Zelle entfernt. Die übrig gebliebenen Segmente bieten die Grundlage für die Proteinexpression des TZR. Das Resultat sind 10^{15} möglichen Rekombinationen bzw. einzigartige Rezeptoren. Allerdings besteht das TZR-Repertoire letztendlich aufgrund systematischer und selektiver Prozesse aus lediglich ca. 10^8 TZR (MADI et al. 2014). Die somatische Rekombination ist ein seltenes Beispiel der zielgerichteten DNA-Sequenzänderung in einer somatischen Zelle.

Der so entstandene TZR ist ein membranständiges heterodimeres Protein, das in einem Komplex aus Korezeptoren eingebettet ist. Neben CD3 und den ζ -Ketten finden sich Subtypspezifisch CD4 oder CD8 (Abb. 3) (MALISSEN und BONGRAND 2015, RUDOLPH et al. 2006).

Die AG-bindende Domäne („*Complementarity Determining Region*“, Abb. 4) des TZR ist aus zwei zu der Immunoglobulin-Superfamilie gehörigen Untereinheiten aufgebaut: entweder der α - und β -Kette oder der γ - und δ -Kette, letztere machen allerdings nur einen Bruchteil des TZR-Repertoires aus (DAVIS 1990).

Ihrerseits sind diese Ketten aus somatisch rekombinierten V(D)J Segmenten zusammengesetzt. Die α - und γ -Ketten bestehen jeweils aus V- und J-Segmenten, die β - und δ -Ketten aus V-, D- und J-Segmenten (Abb. 4).

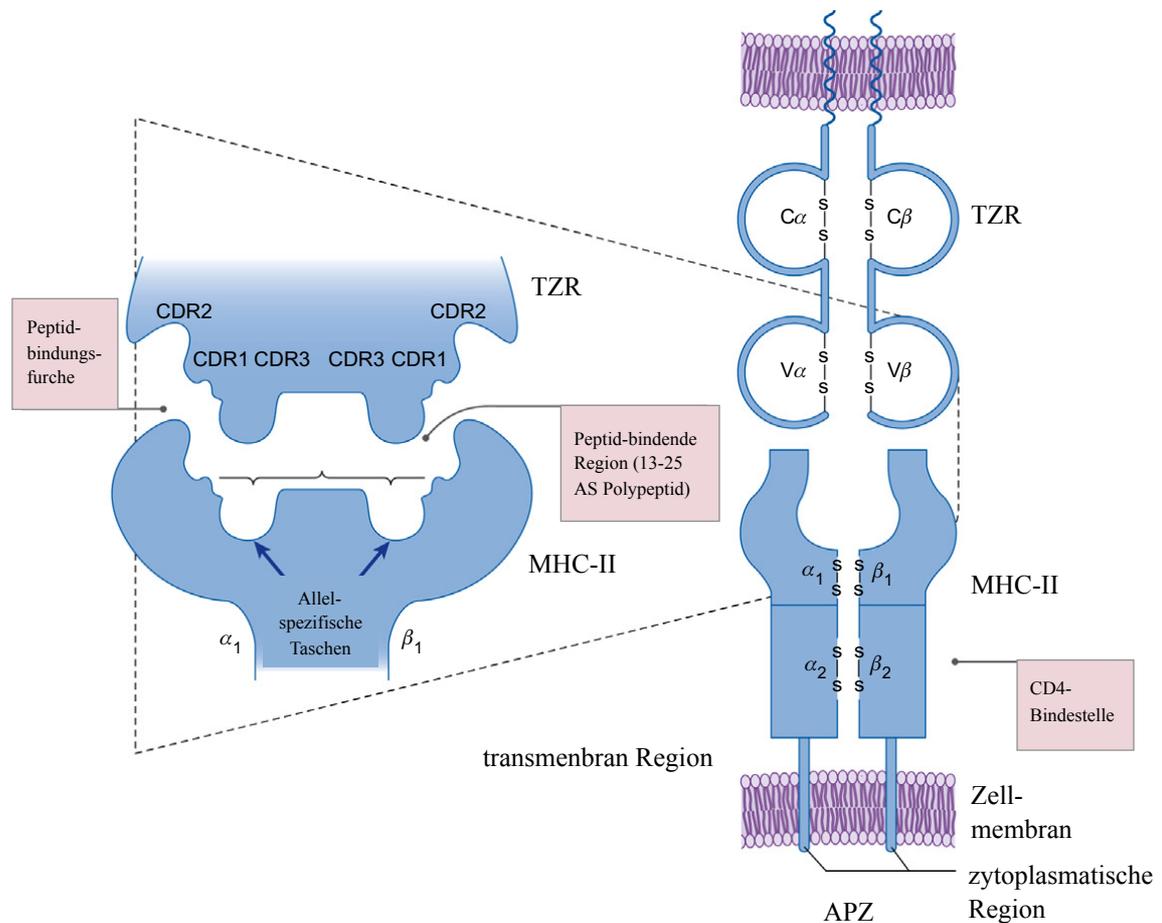
Das unveränderliche C(Constant)-Segment dient mit Transmembrandomänen der Verankerung in der Zelle, wo der TZR noch mit 4 weiteren Ketten des CD3-Molekülkomplexes assoziiert ist. Die CD3 γ -, CD3 δ -, und 2 CD3 ϵ -Ketten sind sich ähnelnde, evolutiv hochgradig konservierte Proteine, ebenfalls ein Teil der Immunoglobulin-Superfamilie und für eine effektive Weiterleitung der Signalkaskade nach TZR-Bindung zuständig (CALL et al. 2002).

Zusammen mit dem TZR und CD3 bildet die beiden ζ -Ketten/CD267, die ebenfalls die Signaltransduktion unterstützen, den TZR-Komplex.

Die Bindung zwischen TZR und zugehörigen AG zeichnet sich durch niedrige Affinität aus. Dies äußert sich in der „Degeneration“ der Selektivität, d.h. ein TZR kann mit unterschiedlichen Bindungsstärken mit einer Vielzahl verschiedener AG, das selbe AG wiederum mit mehreren TZR interagieren (SUN et al. 2017). Folglich beobachtet man ein multireaktives Verhalten des T-Zell-Kompartiments, welches maßgeblich von der jeweiligen Kostimulation und dem Zytokinmilieu abhängt.

MHC-II AG-Präsentierung

T-Helfer-Zelle

**Abbildung 4: Aufbau des T-Zell Rezeptors und des MHC-II**

Die Interaktion einer $CD4^+$ THZ mit einer APZ beruht auf der Affinität der nicht-kovalenten makromolekularen Bindung zwischen dem in der Peptidbindungsstelle des MHC-II präsentierten Epitop und den CDR des TZR. Wie hier zu sehen, ist der TZR aus jeweils einer α - und β -Kette aufgebaut, deren V-Domänen an den MHC-II binden. Die hypervariablen CDR3 Segmente des TZR tragen den größten Teil zu dessen Antigen-spezifität bei. Die $CD4$ -Bindungsstelle verursacht die Restriktion der THZ auf MHC-II Moleküle.

AS=Aminosäuren, CDR=Complementarity Determining Region/Antigen-bindende Domäne.
(modifiziert nach ACTOR 2014)

2.3.5. Genesis und Toleranz des T-Zell Kompartiments

Hämatopoetische Stammzellen besiedeln den Thymus und differenzieren dort zu den Progenitoren der T-Zellen, den „*early T-lineage progenitors*“ oder Thymozyten. Die daraus entstehenden unreifen T-Zellen durchlaufen im Zuge ihrer Ausreifung mehrere Stadien, welche über die Expression der Oberflächenmarker diskriminiert werden und während derer die V(D)J-Rekombination stattfindet. An dem Ende der *Thymopoese* wandert die ausgereifte T-Zelle aus der Medulla des Thymus über den Blutkreislauf in den gesamten Organismus. Mit dem Erreichen der Geschlechtsreife bildet sich der Thymus nach und nach zurück, sodass im Laufe des adulten Lebens immer weniger naive T-Zellen produziert werden, was die immunologische Situation des T-Zell-Kompartiments mit der Zeit umkehrt: in jungen Jahren besteht es vorwiegend aus naiven Zellen, denen wenige Gedächtniszellen und sehr wenige Effektorzellen gegenüberstehen. Dahingegen überwiegen im späten adulten Stadium die Effektorzellen, nebst weniger Gedächtniszellen und sehr wenigen naiven Zellen. Auch die Zahl der Lymphozyten nimmt im Alter durch die Involution des Thymus und des Knochenmarkes ab, auch als *altersbedingte Leukopenie* bezeichnet. Mäuse haben im Vergleich zum Menschen eine später einsetzende thymale Rückbildung (NIKOLICH-ZUGICH 2014). Die immunologischen Defizite, die mit dem Altern auftreten, werden auch als *Immunoseneszenz* bezeichnet (RAMOS et al. 2017).

Selektion und zentrale Toleranz

Die anfangs CD4/CD8-doppelnegativen Zellen befinden sich im Cortex des Thymus und durchlaufen die Rekombination für die β -Kette. Diese wird mit einer Vorläufer- α -Kette gepaart und auf ihre Funktionalität, ein Heterodimer zu bilden und sich auf der Zelloberfläche in die Korezeptoren einzufügen, überprüft (*β -Selektion*). Die Zellen, deren rekombinierte β -Kette dazu in der Lage ist, entwickeln sich weiter und rekombinieren die VJ-Segmente für die α -Kette, welche sich mit der β -Kette zu dem finalen Heterodimer zusammenfügt und in den TZR-Komplex integriert. Ab diesem Zeitpunkt sind sie CD4/CD8-doppelpositiv und können mit beiden MHC interagieren. Ist der entstandene $\alpha\beta$ -TZR funktional und geht eine Bindung mit MHC-I oder II ein, erhält die Zelle demzufolge Signale und proliferiert weiter, während ein dysfunktionaler TZR-Komplex aufgrund der Inaktivität zur Apoptose führt (*Positivselektion*) (STARR et al. 2003).

Daraufhin differenzieren sich die doppelpositiven Zellen in einfachnegative Zellen, abhängig an welche der beiden MHC-Klassen sie binden können und wandern in die Medulla des Thymus ein, wo die *Negativselektion* stattfindet (ZERRAHN et al. 1997). Hierbei werden unter Aktivierung des Expressionsfaktors Aire und Fezf2 auf den medullären Epithelzellen

und DZ die meisten periphere-Gewebe AG präsentiert, sodass die maturierenden und potentiell autoreaktiven T-Zellen mit Autoantigenen aus dem gesamten Organismus konfrontiert werden (MATHIS und BENOIST 2009, TAKABA et al. 2015). Alle Klone, die eine starke Affinität aufweisen und somit autoaggressives Potential innehaben, werden zur Apoptose gebracht. Klone mit mittlerer Affinität zu Autoantigenen werden vermutlich regulatorische T-Zellen, wobei eine niedrige bis nicht vorhandene Affinität zur Differenzierung zu Tcon führt. Die durch den 1-2 Wochen dauernden Prozess der medullären Negativselektion ausbleibende Autoaggression wird auch als *zentrale Toleranz* bezeichnet, wobei „natürliche“ Tregs entstehen, auch nTregs genannt (LEE, H. M. et al. 2012).

Am Ende der Selektionsprozesse verlassen ca. 1 - 2 % der ursprünglich entstandenen T-Vorläuferzellen den Thymus, der Rest wurde aufgrund dysfunktionaler TZR oder zu hoher Avidität ggü. Autoantigenen in den apoptotischen Zelltod geleitet. Das T-Zell Kompartiment eines Organismus ist somit optimalerweise frei von Autoaggressivität, die weitestgehend einzigen T-Zellen, die durch Autoantigene aktiviert werden, sind somit Tregs.

Periphere Toleranz, Deletion, Konversion, Suppression und Anergie

Trotz der Negativselektion kann es z.B. durch fehlende Expression eines Antigens im Thymus mit geringer Wahrscheinlichkeit zur Auswanderung von autoaggressiven Klonen kommen. Diese werden dann durch die *periphere Toleranz* reguliert, einem komplexen Prozess, der neben lokalen Tregs von tolerogenen APZ abhängt. So sind unreife DZ in der Lage, während sie AG aus den normalen Zellumbauprozessen nicht entzündeter Gewebe in sekundär lymphatischen Organen präsentieren, nach Bindung einer T-Zelle diese zu *deletieren*. Folglicherweise wird diese in Apoptose überführt oder über Stimulation von Kostimulatoren, wie PD-1 und CTLA-4, in eine induzierte Treg (iTreg) *konvertiert* (CHOO et al. 2017, SCHMITT und WILLIAMS 2013). CD272⁺DZ (B- and T-lymphocyte attenuator protein-positiv) scheinen hierfür prädisponiert zu sein (JONES et al. 2016). Sobald allerdings eine Entzündung auftritt, reifen die DZ und fördern eine aggressive Immunantwort (TAN und O'NEILL 2005, VAN DER BORGHT et al. 2017). Die maßgebliche Rolle der DZ bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz zeigt bei transgenen Mäusen die systemische Depletion von DZ mittels Diphteriatoxin, welche zu spontaner AIM führt (MÄNN et al. 2016).

Tregs sind direkt in der Lage, andere reaktive Lymphozyten in ihrer Aktivität zu hemmen und führen zur *Suppression*. Bei TZR-abhängiger Stimulation schütten sie u.a. IL-10 und TGF- β aus und beeinflussen auch direkt über Zell-Zell Kontakte. (LEVINE et al. 2014). IL-2, auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bekannt, wird durch die Tregs durch Hochregulation derer IL-2-Rezeptoren bzw. CD25 gebunden und aktiviert so nicht Tcon in der Umgebung. Weiterhin

erfolgt immunsuppressives Signaling seitens der Tregs über CTLA-4 und TIGIT (JOSEFOWICZ et al. 2012, YU et al. 2009).

Eine T-Zelle kann in den Zustand der Unstimulierbarkeit, der *Anergie*, überführt werden, indem sie an eine APZ über den TZR bindet, ohne über die entsprechenden auf der Zelloberfläche exprimierten Kostimulatoren aktiviert zu werden. Diese werden in erster Linie in einem inflammatorischen Kontext exprimiert, ein Mechanismus, der immunologische Aggressivität auf ein Entzündungsgeschehen begrenzt. Anergie wird v.a. durch AG ausgelöst, mit denen T-Zellen durchgehend konfrontiert werden, wie z.B. aus der Kommensalmikrobiota, Umweltantigenen oder Autoantigenen.

Diese vier Mechanismen führen einerseits zu einer austarierten Homöostase, die ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Reaktivität (wie z.B. gegen Pathogene) und Toleranz (wie gegen Autoantigene oder harmlose Umweltantigene, Nahrung, Kommensalmikrobiota und deren Stoffwechselprodukte) bewahren. Die Komplexität der Regulation macht sie andererseits anfällig für Störungen, sodass Autoimmunerkrankungen, allergische und chronisch-entzündliche Krankheiten vermutlich auf ein Zusammenbrechen der peripheren Toleranz zurückzuführen sind.

Welcher Mechanismus letztendlich bei einer der peripheren Toleranz unterliegenden T-Zelle ausgelöst wird, hängt von der Intensität der TZR-Bindung, der Effektivität und Zusammensetzung der Kostimulation und weiteren immunologischen Effekten, wie Stimulation durch TGF- β oder IL-10, ab (JOSEFOWICZ et al. 2012).

2.3.6. T-Zellen im Myokardinfarkt

Aufgrund der schieren Masse der Leukozyten des angeborenen Immunsystems beschränkte sich die Forschung anfangs größtenteils auf neutrophile Granulozyten und M Φ im Kontext des Myokardinfarktes. Dennoch hat man, obwohl sie nur einen Bruchteil der Zellen im Entzündungsgeschehen ausmachen, mittlerweile die Bedeutung der T-Zellen für die effektive Heilung post MI erkannt. Nachdem anfangs in kutanen Wundheilungsmodellen die Relevanz von Lymphozyten realisiert wurde (ASHCROFT et al. 2000), richtete man auch im kardiologischen Kontext die Aufmerksamkeit darauf (ERTL und FRANTZ 2005, FRANGOIANNIS et al. 2002). 2012 konnten RAMOS et al. Immunisierungseffekte bezüglich der Heilung ischämischer Herzschäden nachweisen und somit eine Beteiligung von Lymphozyten darstellen. HOFMANN et al. wiesen 2012 einen positiven Effekt von CD4⁺ T-Zellen auf das Überleben und die Heilung nach einem EMI im Mausmodell nach, wobei folgende Arbeiten das Treg-Kompartiment hauptverantwortlich für die heilungsförderlichen Effekte machten (TANG et al. 2012). WEIRATHER et al. zeigten 2014 in einem Depletionsexperiment, in dem die Tregs der Mäuse einen Diphtheriatoxinrezeptor exprimierten, dass das regulatorische T-Zell-Kompartiment mechanistisch für die vorteilhaften Effekte verantwortlich ist. Als heilungsförderliche Zytokine wurden v.a. TGF- β 1, IL-10 und IL-13 identifiziert. Sie polarisieren M Φ hin zu einem anti-inflammatorischen, Osteopontin und Transglutaminase Factor XIII sezernierenden Phänotyp, der Kollagendeposition und Wundstabilisation unterstützt. Zusätzlich reduzieren Tregs die leukozytäre Infiltration des infarzierten Myokards, v.a. vermindern sie die Quantität der Tcon und modifizieren deren Qualität durch Reduktion des proinflammatorischen TH1-Typs. Die Aktivierung der T-Zellen findet dabei in den Herz-drainierenden mediastinalen Lymphknoten statt.

Zudem modulieren Tregs Fibroblastenphänotyp und -funktion (SAXENA et al. 2014) und sind sogar in der Lage, eine gewisse regenerative Kapazität in den Kardiomyozyten zu stimulieren (ZACCHIGNA et al. 2018).

2.4. Antigenspezifität und Autoimmunität im Myokardinfarkt

Mit der nachgewiesenen Beteiligung von T-Zellen bzw. Tregs stellt sich die Frage nach dem bzw. den zugehörigen AG, welche den TZR-abhängigen Signalweg auslösen. Grundsätzlich sind alle im Herzen vorkommenden Antigene in der Lage, nach Präsentation durch MHC-II auf APZ T-Zellen zu aktivieren. Vermutlich reagiert auch eine Vielzahl an autoreaktiven T-Zellen bzw. Tregs im Zuge der Homöostase oder Entzündung auf einen ganzen Pool an Autoantigenen. Dennoch deutet sich mit der Kombination des pathologischen Auftretens der Herzinsuffizienz (durch eine persistierende Entzündung) und der Sonderrolle der T-Zellen in diesem herzspezifischen Prozess die Involvierung herzspezifischer Antigene an. 28 Gene werden im Herzen laut dem “*human protein atlas consortium*” spezifisch exprimiert, definiert als eine mindestens fünffach höhere Expression der zugehörigen mRNA Level im Myokard als in allen anderen Geweben des Körpers (UHLEN et al. 2015). Darunter befinden sich Gene für Sarcomer-Elemente (*Myosin Heavy Chain 6, Myosin Light Chain 4 & 7, Myosin Binding Protein C3, Alpha-Aktin 1, Troponin I3, Troponin T2*) und Rezeptoren (*Cholinergic Receptor Nicotinic Epsilon Subunit, Ryanodine Receptor 2*). Interessanterweise stellt das KM, welches ein Produkt des *Myosin Heavy Chain 6* ist, eine besondere Isoform des muskulären Myosins dar, von dessen β -Form es sich in lediglich 7 % seiner Aminosäuresequenz unterscheidet (LV und LIPES 2012). Es tritt aus infarziertem Myokard aus und ist folglich im Serum nachweisbar (LEGER et al. 1985, VAN DER BORGHT et al. 2017).

Bereits 1987 identifizierten NEU et al. das KM als Kandidatenantigen, da nach virusbedingter AIM herzspezifische Myosinantikörper zirkulieren und in Adjuvans adsorbiertes KM in prädisponierten Mausstämmen eine AIM auszulösen in der Lage ist. Diese AIM wird maßgeblich von CD4⁺ T-Zellen mediiert (SMITH und ALLEN 1991). PUMMERER et al. identifizierten 1996 die besonders immunogenen Aminosäuresequenzabschnitte des KM, MYHCA₆₁₄₋₆₄₃. Die zentrale Toleranz wird zudem noch durch die fehlende Expression von KM im menschlichen und murinen Thymus beeinträchtigt, was autoimmune Reaktionen begünstigt (LV und LIPES 2012). Im Herzen ist sowohl nach Entzündung als auch im physiologischen Ruhezustand eine Expression von MYHCA auf APZ nachweisbar, was für eine physiologische Autoreaktivität spricht (SMITH und ALLEN 1992), genauso wie das Vorhandensein von KM-AK bei gesunden Menschen und Nagern (O'DONOHUE et al. 2016). Im gesunden Herzen beeinflussen MYHCA-spezifische Tregs die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und werden nach EMI spezifisch aktiviert (VAN DER BORGHT et al. 2017).

Interessanterweise erweisen sich in mehreren experimentellen Modellen Lymphozyten von grundlegender, aber auch ambivalenter Bedeutung, was für die komplexe und milieuspezifische Rolle der Autoimmunität spricht (BOAG et al. 2015, KALLIKOURDIS et al. 2017, KEPPNER et al. 2018, MATHES et al. 2016, NEVERS et al. 2015). In dieser Arbeit stellt der Begriff „Autoimmunität“ einen Überbegriff dar und beinhaltet sowohl die physiologische Autoreaktivität als auch die pathologische Autoaggression.

2.5. Zielstellung der Studie

Zweck dieser Studie war die Aufklärung der Rolle Autoantigen-spezifischer T-Helfer-Zellen in der Heilung nach einem Herzinfarkt. Da MYHCA ein bedeutsames Kandidatenantigen autoimmuner Prozesse post-MI darstellt, sollten MYHCA₆₁₄₋₆₂₉ spezifische transgene T-Zellen (TCR-M) nach EMI in ihrem Verhalten charakterisiert werden. Dafür wurden die Verteilung der TCR-M im Mausekörper und deren Phänotyp untersucht, ferner der Einfluss auf Herzfunktionsparameter während der Heilung der Infarktschäden.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

Für die Untersuchung KM-spezifischer autoreaktiver T-Zellen wurde ein transgenes Mausmodell gewählt, welches sich durch ein monoklonales KM-spezifisches TZR-Repertoire auszeichnet. Die CD4⁺ T-Zellen dieses Stammes (TCR-M) wurden per adoptiven Zelltransfer vor Auslösung eines EMI durch permanente Ligatur eines Herzkranzgefäßes in Wildtyp (WT)- oder transgene DO11.10-Empfängemäuse übertragen. DO11.10 Mäuse wurden aufgrund ihres ebenfalls monoklonalen CD4⁺ TZR-Kompartiments gewählt. Dieses ist Ovalbumin-spezifisch, ein in der Maus nicht vorkommendes Antigen. Die Verteilung und Differenzierung der endogenen und transferierten T-Zellen wurde mittels *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) und *Light-Sheet Fluorescence Microscopy* (LSFM) analysiert. Echokardiographie wurde für die Identifikation des klinischen Phänotyps der Mäuse herangezogen. Die Auswertung der US-Daten wurde verblindet durchgeführt. Ausschlusskriterien wurden *a priori* bestimmt, abhängig von der Herzfrequenz während echokardiographischer Aufnahmen (Herzfrequenz zwischen 450 und 550 Schläge pro Minute) und FACS Ausbeuten, deren Zellzahl zu gering für belastbare Schlüsse sind. Ausreißer wurden nicht von statistischen Analysen ausgeschlossen. Alle Tierversuche wurden durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Halle (Saale), Aktenzeichen 42502-2-1331-MLU, Bewilligung am 8.10.2015) genehmigt und entsprachen den Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) (GUILLEN 2012, HENKE et al. 2015, VOIPIO et al. 2008). Für das Studiendesign und die Durchführung wurden die PREPARE-Richtlinien angewandt (SMITH et al. 2018), des Weiteren wurde sich bei Auswertung und Datenerfassung an den ARRIVE-Richtlinien (KILKENNY et al. 2010) orientiert.

3.2. Versuchstiere

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltung des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Konditionen bei 12 Stunden (6:00 bis 18:00 Uhr Tageszeit) hell-dunkel Zyklus gehalten. Das Standardfutter stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Mäuse wurden im Alter von 8-12 Wochen in die Versuche aufgenommen, TCR-M Donortiere waren maximal 6 Monate alt. Männliche WT-BALB/c-Mäuse wurden von Charles River (Wilmington, USA, Stamm Nr. 028) bezogen. TCR-M Mäuse (NINDL et al. 2012), die ausschließlich einen für Klasse-II-restriktives KM-Peptid (MYHCA₆₁₄₋₆₂₉) spezifischen transgenen TZR exprimieren,

entstammten der eigenen Zucht. Alle TCR-M exprimierten CD90.1 (Thy 1.1), während die T-Zellen aller anderen Stämme auf durch CD90.2 (Thy1.2) identifizierbar waren. DO11.10 Mäuse, welche sich ebenfalls durch ein monoklonales TZR spezifisch für Ovalbumin₃₂₃₋₃₃₉ auszeichnen, wurden von Jackson (Bar Harbor, USA, Stamm Nr. 003303) erworben. Alle Stämme teilten den selben BALB/c-Hintergrund, sodass sie das gleiche MHC-Profil aufwiesen. Dadurch wurde sichergestellt, dass die TCR-M in den Versuchen den gleichen MYHCA-Fragmenten ausgesetzt waren. Die Mäuse wurden in Gruppen von 2-6 Individuen und nach Transport mind. 7 Tage zur Gewöhnung an die neue Umgebung gehalten.

3.3. Organentnahmen

Nach zervikaler Dislokation und Ganzkörperperfusion mittels PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) wurden die Organe unmittelbar entnommen und in eiskalter BSS/BSA (steriler Hanks' Balanced Salt Solution mit Phenolrot [Biochrom] mit 1 % [Masse/Vol.] Bovinem Serum Albumin [Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland]) für die zeitnahen ex vivo Analysen bei 4°C in Röhrchen (Tube 10 mL 100x16PP, Sarstedt Pty Ltd, Mawson Lakes, USA) gelagert. Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle im Methodenteil beschriebenen Proben immer in gleichen Röhrchen aufbewahrt. Es wurden Herz, Milz und Kniefaltenlymphknoten (*Lymphonodi subiliaci*, si-LN) entnommen, weiterhin die mediastinalen, herzdrainierenden Lymphknoten (*Lymphonodi mediastinales craniales*, med-LN), welche sich kraniodorsal des Herzens parallel zu den *Venae cavae craniales* befinden. Normalerweise liegen 2-3 nebeneinander und sind nach EMI v.a. auf der rechten Körperseite vergrößert.

Für die THZ-Aufreinigung zwecks Zelltransfers wurden oberflächliche und tiefe Achsel-, des Weiteren Kniefalten-, Kiefer-, oberflächliche Hals-, Mediastinal- und Kniekehlen-Lymphknoten nebst der Milz extrahiert.

3.4. Adoptiver CD4⁺ T-Zell Transfer

Thy1.1⁺ TCR-M wurden einen Tag vor der Operation (OP) in syngene Thy1.2⁺ WT-Rezipienten transferiert. Hierfür wurden den Mäusen aseptisch Milz und Lymphknoten entnommen und in eiskaltem BSS/BSA gelagert. Zellsuspensionen wurden über Durchpressen der Lymphorgane durch einen 30 µm Filter (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) mittels eines 5 mL Spritzenkolbens (Inject, B. Braun) erzeugt. Das Filternetz wurde dabei mehrmals mit BSS/BSA gespült. Milzen unterliefen hiernach einen Erythrozytolyseschritt (RBC lysis buffer 10x concentrate, Biolegend, San Diego, USA) durch 2 minütige Inkubation in einfach konzentriertem Lysis Puffer (1:9 in PBS). Alle Zellsuspensionen wurden nun bei 300 G für 5 min zentrifugiert (3-18K Laborzentrifuge,

Sigma, Osterode am Harz, Deutschland), der Überstand abgegossen (wie auch nach allen folgenden Zentrifugationsschritten) und in frischem BSS/BSA resuspendiert. Anschließend durchliefen die CD4⁺ T-Zellen einen Negativselektionsprozess durch *Magnetic Cell Sorting* (MACS® CD4⁺ T cell Isolation Kit mouse, Miltenyi Biotec), bei dem alle sonstigen Zellpopulationen durch magnetisch gekoppelte Antikörper (*beads*) markiert und in einer Durchflusssäule in einem magnetischen Feld gebunden wurden. Der praktisch ausschließlich aus CD4⁺ Zellen bestehende Säulendurchfluss wurde aufgefangen, zentrifugiert (300 G, 5 min) und in sterilem PBS bei einer Konzentration von 2x10⁷ Zellen pro mL resuspendiert.

Jedes Empfängertier erhielt 5x10⁶ Zellen in 200µl intraperitoneal mittels einer 1mL Spritze (B.Braun, Melsungen, Deutschland) und 26 Gauge Kanüle (B.Braun). Die Phänotypisierung der TCR-M bezüglich Reinheit und der Zellpopulationsanteile (CD44⁺ und FoxP3⁺) zum Zeitpunkt der adoptiven Transfers und der Endpunktanalysen erfolgte mittels FACS, wobei die TCR-M über den Thy1.1 Oberflächenmarker diskriminiert wurden.

Um die antigenspezifischen Effekte der THZ im funktionalen Kontext post-EMI zu charakterisieren, wurden DO11.10 Empfängertieren 10⁷ THZ (TCR-M vs. DO11.10) unter Verwendung des gleichen Protokolls transferiert.

3.5. Fluorescence-Activated Cell Sorting

FACS-Immunphänotypisierungen wurde in Proben aus med-LN, si-LN, Milzen und in Kollagenase enzymatisch verdauten Herzen durchgeführt. Hierfür wurden die Herzen in Typ II Kollagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA, 1000 IU/mL, bei 37 °C für 30 min) inkubiert und anschließend zwecks Herstellung einer Zellsuspension in BSS/BSA durch einen 70 µm Filter (Miltenyi Biotec) passiert. Sekundärlymphatische Organe wurden nach Passage durch einen 30 µm Filter (Miltenyi Biotec) in BSS/BSA resuspendiert, während die Milzen zuvor einen extra Erythrozytolyse-Schritt mittels einfach konzentriertem RBC Lysis Buffer (Biolegend) durchliefen. Alle Proben wurden nach einem Zentrifugationsschritt (300 G, 5 min) in FACS-Puffer (PBS mit 1 % BSA [Masse/Vol.], 0.1 % [Masse/Vol.] Natriumazid und 1 mM EDTA) resuspendiert und jeweils zu 1x10⁵ Zellen in ein Loch einer 96-V-Loch-Platte (Mikrotestplatte 96 Well K, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Nach Zentrifugation (400 G, 3 min) folgte der FC-Rezeptor-Saturationsschritt mittels anti-Fc-Rezeptor-Antikörper (anti-CD16/CD32, clone 2.4G2, BD Pharmingen, San Jose, USA, 1:500 in FACS-Puffer) durch Zugabe von 50 µl pro Loch, welche 15 min bei 4 °C inkubierten. Anschließend wurden jeweils 50 µL der FACS-Fluorophor-Mischung, in der die in dem jeweiligen Versuch benötigten Fluorophore 1:100 gelöst waren, zugegeben und 15 min bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Sofern nicht anders erwähnt, wurden folgende

Oberflächenmarker von Biolegend (San Diego, USA) verwendet: anti-TCR β (clone H57-597), anti-TCR-V α 2 (clone B20.1), anti-CD4 (clone RM4-5 and GK1.5), anti-Thy1.1 (clone OX-7), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6G (clone 1A8), zusätzlich anti-CD45 (clone 30F11, BD Biosciences, San Jose, USA). Anschließend wurden die Platten nach Zugabe von 100 μ L FACS-Puffer zentrifugiert (400 G, 3 min) und die Zellen in Fixierungspuffer stabilisiert (True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set, Biolegend, 30 min, Raumtemperatur in Dunkelheit). Die Permeabilisierung der Zellmembran und intrazelluläre FoxP3-Markierung erfolgten über Zugabe von 100 μ L pro Loch an Permeabilisierungspuffer (True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set, Biolegend), anschließender Zentrifugation (400 G, 3 min) und Zugabe von 50 μ L pro Loch an Permeabilisierungspuffer mit darin 1:50 gelöstem anti-Foxp3 (clone 150D/E4 and FJK-16s, eBioscience, San Diego, USA, 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit). Nach Zugabe von 100 μ L Permeabilisierungspuffer und einem weiteren Zentrifugationsschritt (400 G, 3 min) wurden die Zellen in jeweils 100 μ L FACS-Puffer resuspendiert und in dem FACS-Gerät (Fortessa, BD) analysiert.

Für die TCR-M-Distributionsstudie und -Phänotypisierung wurde folgendes FACS-Diskriminierungsschema genutzt (Abb. 5): Nach morphologischer Charakterisierung der Einzelzellen bzw. Lymphozyten anhand ihrer Größe (*Forwardscatter-height/area* [FSC-H/A]) und Granularität bzw. Oberflächenunebenheit (*Sidescatter-width/area* [SSC-W/A]) wurden die Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker in die verschiedenen Zellpopulationen eingeteilt. Leukozyten exprimierten CD45 und wurden so von anderen Parenchym- und Stromazellen unterschieden, THZ exprimierten den TZR mit seiner β -Kette und CD4 als Korezeptor, die transferierten TCR-M waren Thy 1.1 und TZR α 2 (ein Subtyp der Alphakette) positiv. Demzufolge wurden TCR-M als CD45⁺CD4⁺ TCR β ⁺ Thy1.1⁺ TCRV α 2⁻ und endogene THZ (ENDO) als CD45⁺CD4⁺ TCR β ⁺ Thy1.1⁻ Einzelzellen definiert.

Für die DO11.10 Funktionalitätsstudie wurde folgendes FACS-Diskriminierungsschema genutzt (Abb. 6): Die morphologische Charakterisierung der Einzelzellen erfolgte ebenfalls anhand ihrer Größe (*Forwardscatter-height/area* [FSC-H/A]) und Granularität bzw. Oberflächenunebenheit (*Sidescatter-width* [SSC-W]); anschließend wurde über die Oberflächenmarkerexpression in Monozyten und M Φ einerseits, neutrophile Granulozyten andererseits und CD11b⁻ und Ly6G⁻ Doppelnegative eingeteilt. Letztere wurden nochmals in CD4⁺ (THZ) und CD4⁻ (größtenteils ZTZ) unterteilt. Demzufolge wurden Monozyten/M Φ als CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻, neutrophile Granulozyten (Neutro) als CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ und CD4⁺ T-Zellen als CD45⁺CD11b⁻TCR β ⁺CD4⁺ Einzelzellen definiert.

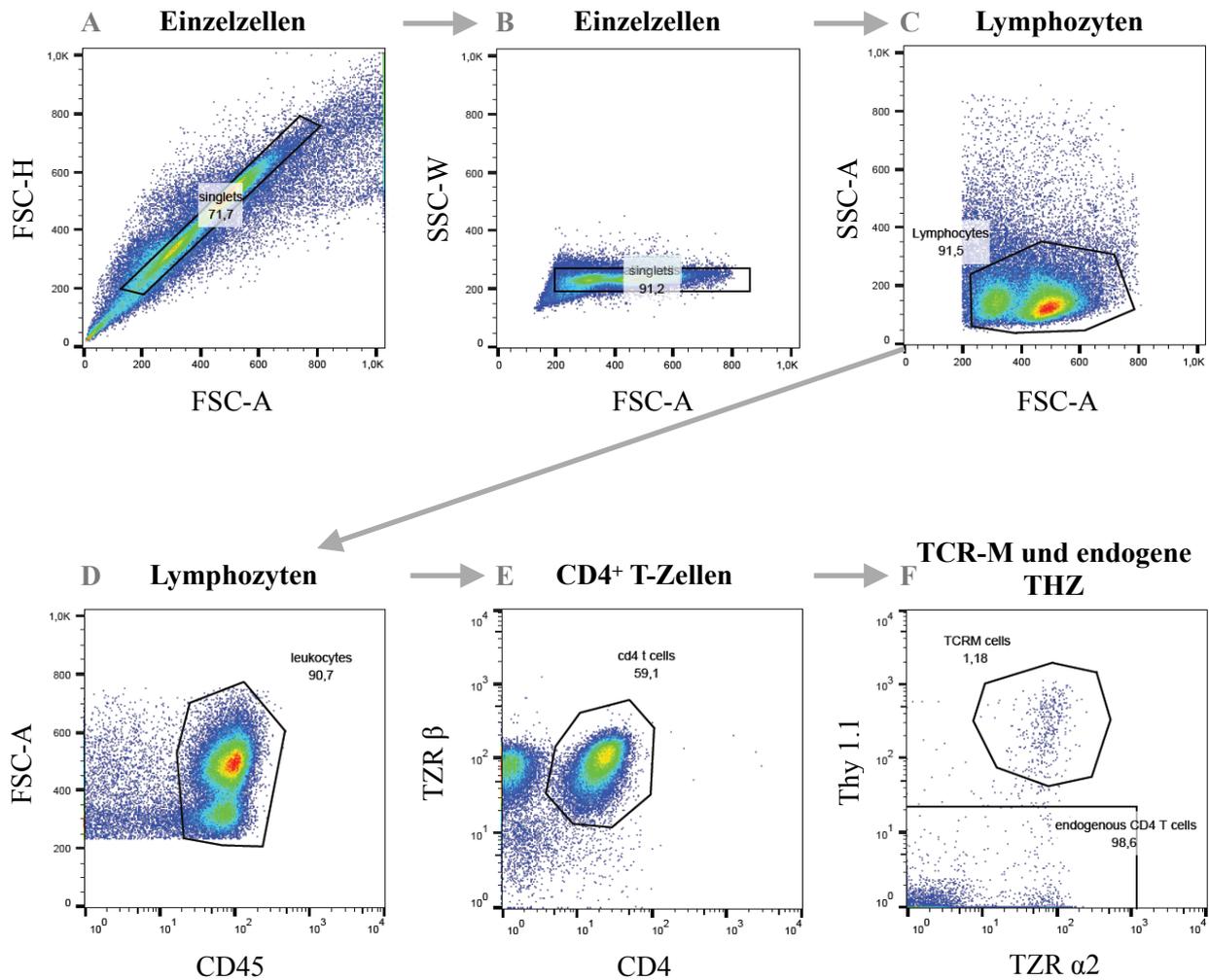


Abbildung 5: Zellcharakterisierung im FACS für die TCR-M Distributionsstudie

Exemplarische Analyse eines med-LN. (A-C) Morphologische Selektion der Einzelzellen und Lymphozyten über *Forwardscatter* (FSC) und *Sidescatter* (SSC) *Height, Width* und *Area*. (D) Zum Ausschluss von Zellfragmenten und nicht-Leukozyten wurden die vorab morphologisch eingeschlossenen Lymphozyten auf den Leukozytenmarker CD45 selektiert. (E) Selektion der THZ (CD4⁺). (F) Diskriminierung der TCR-M (Thy1.1⁺TZRα2⁺) vs. endogenen T-Zellen (Thy1.1⁻).

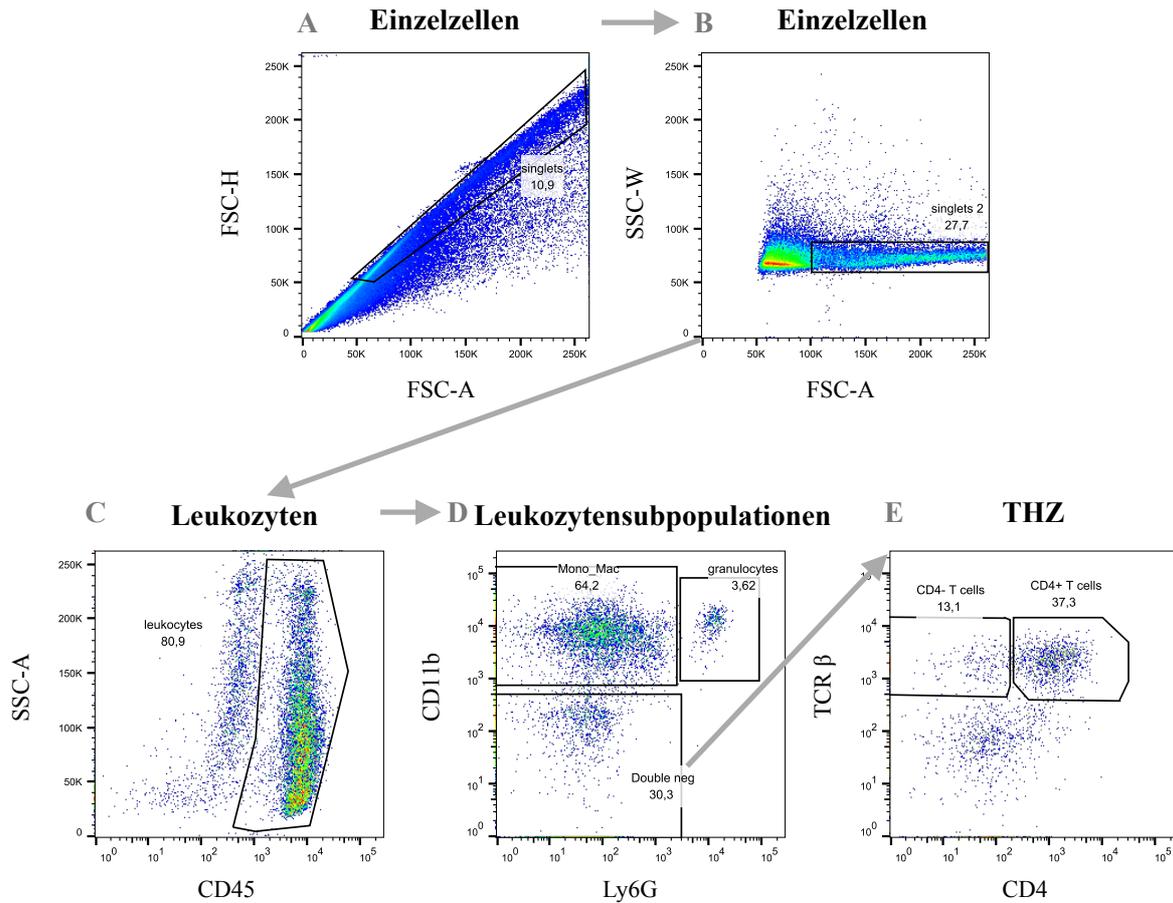


Abbildung 6: Zellcharakterisierung im FACS für den DO11.10 Transfersversuches

Exemplarische Analyse einer Herzinfarktgewebeprobe. (A-B) Morphologische Selektion der Einzelzellen über *Forwardscatter* (FSC) und *Sidescatter* (SSC) *Height*, *Width* und *Area*. (C) Selektion der Leukozyten (CD45⁺). (D) Diskriminierung der Monozyten/MΦ (CD11b⁺Ly6G⁻), Neutrophilen Granulozyten (CD11b⁺Ly6G⁺) und doppelnegativen (CD11b⁻Ly6G⁻) Leukozyten. (E) Analyse der doppelnegativen Zellen auf CD4 Expression.

3.6. Experimenteller Herzinfarkt

Die ungefähr 40 bis 60 min in Anspruch nehmende OP (Abb. 7) wurden unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die unter Isoflurananästhesie (Abb. 7A, Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland, anfänglich 4 %, Erhaltung bei 2,0-2,5 % Vol./Vol. O₂) befindlichen Mäuse wurden zur mechanischen Beatmung (Minivent, Havard Apparatus, Holliston, USA; 150-200 Atemzüge pro Minute, circa 100 µL Tidalvolumen pro 10 g Körpergewicht) mit einer 22 G Venenverweilkanüle (Vasofix Braunüle, B.Braun) ohne Mandrin intubiert (Abb. 7B). Hierfür wurde die OP-Lichtquelle von ventral auf die Luftröhre der in Rückenlage liegenden Maus gerichtet und somit die Glottis für eine orale Adspektion visualisiert. Bei respiratorischer Weitung der Stimmritze wurde der Tubus eingebracht. Anschließend wurde die Thorakotomie unter einem binokularen OP-Mikroskop (Stemi 305, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) nach Rasieren (Contura HS61, Wella, Darmstadt, Deutschland) und Desinfektion mit Braunoderm (B. Braun) des OP-Feldes (Abb. 7C) und Abdecken der Maus mittels eines OP-Tuches (Foliodrape, Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland) durchgeführt. Nach ca. 1,5 cm messender Hautinzision (Abb. 7D) zwischen Achselhöhle und Xyphoid wurden die Rumpfmuskeln mittels Fadenzügen unter sanfter Spannung zur Seite verlegt (Abb. 7E-F). Der 3. Interkostalraum wurde durch stumpfe Präparation eröffnet (Abb. 7G) und durch einen Mikroreaktor (Abb. 7H, modifizierter Goldstein Retractor, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) geweitet. Zur Schonung und Anfeuchtung der Lunge wurde diese durch ein in Ringerlactat (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) getränktes Schwammstück (Pro-ophta, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) aus dem Sichtfeld geschoben (Abb. 7I). Der EMI wurde über eine permanente Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der *Arteria coronaria sinister* durch 6/0 perma-Hand Seidenfaden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verursacht (Abb. 7J). Der Erfolg wurde durch Verblässen und Akinese des tributären Myokards bewertet. Bei der Kontroll-Operationsgruppe (Sham) fand die Ligatur nicht statt. Anschließend wurden Brustkorb (Abb. 7K) und Haut (Abb. 7L) nacheinander durch Einzelknopfhefte unter Verwendung von 5/0 bzw. 6/0 Prolene-Fäden vernäht (Ethicon). Die Isoflurankonzentration wurde auf 0,5 % reduziert und die Mäuse bei einsetzender Spontanatmung extubiert. Während der OP wurde die Körpertemperatur kontrolliert bei 36-38 °C mittels beheizter OP-Platte (Abb. 7B, Biomedical Instruments, Zöllnitz, Deutschland) und Infrarotlampe (Abb. 7C, Sanitas SIL 06, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) stabilisiert. Die Aufwachphase von ca. 5-20 min verbrachten die Mäuse unter der auf ihren Käfig gerichteten Rotlichtlampe und erhielten eine Stunde vor und für mindestens 3 Tage (alle 12 Stunden) nach der OP Buprenorphinhydrochlorid (0,1 mg/kg Körpergewicht subkutan, Buprenovet, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland). Das Buprenovet wurde 1:11 in PBS verdünnt.

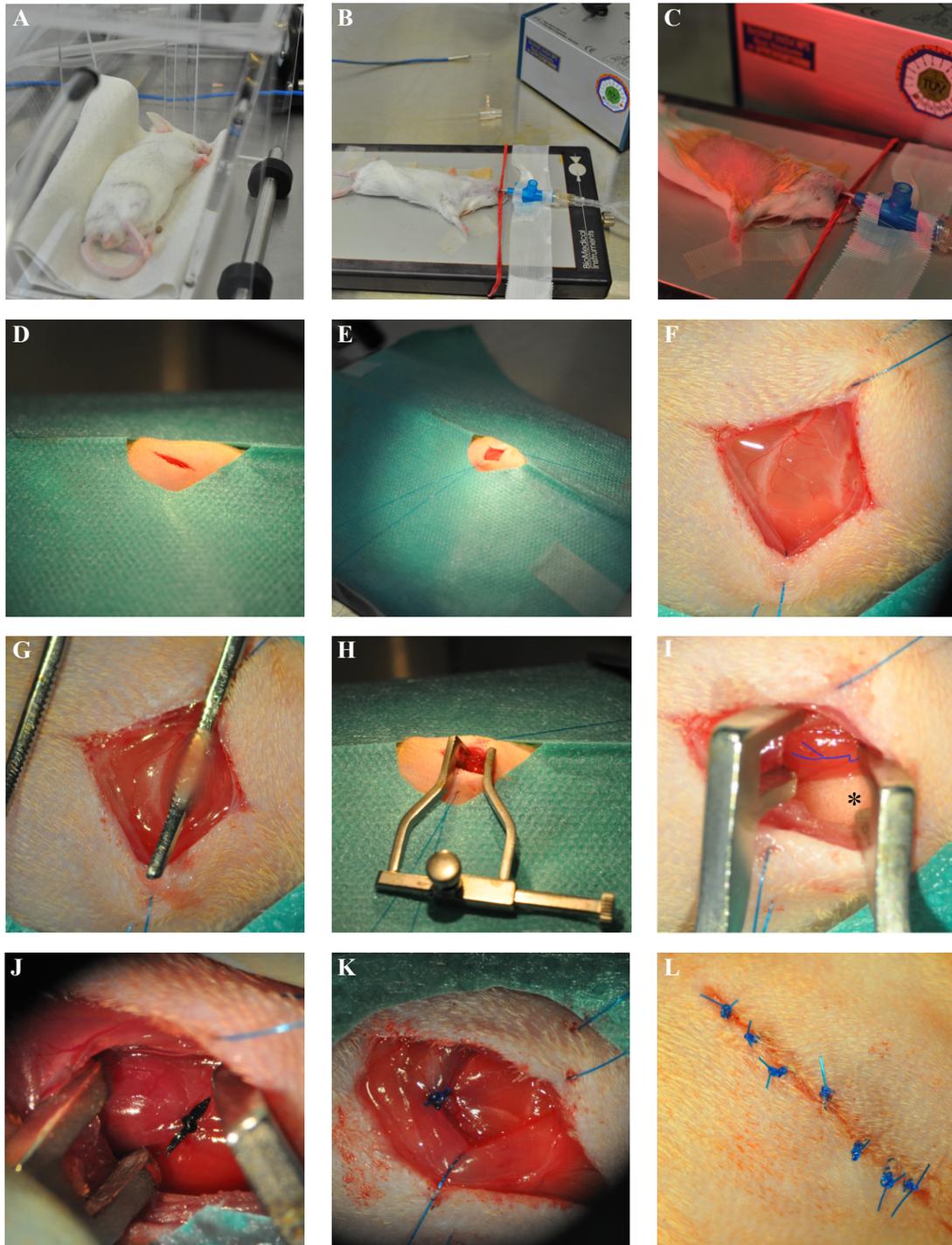


Abbildung 7: Arbeitsschritte einer EMI-Operation

(A) Narkoseeinleitung (B) Intubation und Anschluss an mechanische Ventilation (C) Vorbereitetes Operationsfeldes (D) Hautinzision (E) Verlegung der Rumpfmuskulatur durch Fadenzüge (F) Zugang zum 3. Interkostalraum (G) stumpfe Präparation des Zuganges (H) Einsetzen des Rippenspreizers (I) Deposition der Lunge mit feuchtem Schwamm (Stern), blau nachgezeichneter Verlauf des RIVA (J) Ligatur des RIVA (K) Rippen-Einzelhefte (L) Haut-Einzelhefte

3.7. Echokardiographie

Die Ultraschalluntersuchungen (US) wurden mit Hilfe eines Vevo 1100 Hochleistungsltraschallgerätes (VisualSonics, Amsterdam, Niederlande) und einem speziell für Mäuse entwickelten 30 MHz-Schallkopf durchgeführt. Die Mäuse wurden unter leichter Isofluran-Narkose (0,5 bis 1,5 % Vol./Vol. O₂) untersucht, nachdem sie initial über circa 30 Sekunden bei 4 % Isofluran anästhesiert wurden. Die Augen wurden mit medizinischer Augencreme feucht gehalten (Systane Nighttime, Alcon, Novartis, Nürnberg, Deutschland). Die Mäuse wurden auf einer erwärmten Platte (39 °C) mit Klebestreifen fixiert und über in der Platte verbaute Kontakte an ein EKG gekoppelt. Über eine rektale Temperatursonde wurde die Temperatur über die Untersuchungsdauer kontrolliert und mittels einer Rotlichtlampe zwischen 36 und 38 °C gehalten. Nach Rasur des lateroventralen Thorax wurde das Aufnahmegebiet mit Kopplungsgel (Parker, Fairfield, USA) benetzt und Bilder des linken Ventrikels aufgenommen. Die Analysen wurden unter Verwendung der Hersteller-Software Vevo® LAB 1.7.1 durchgeführt. Hierbei wurden auf der Papillarmuskelansatzebene auf der kurzen Achse (KA, Abb. 8A-F) im Querschnitt des linken Ventrikels oder auf der longitudinalen, parasternalen langen Achse (PSLA, Abb. 8G-I) des Herzens zwischen *Apex cordis* und der Aortenklappe Aufnahmen über mehrere Kontraktionszyklen gemacht. Von jeder Maus wurden pro Achse (PSLA oder KA) mindestens 2 Aufnahmen über mindestens 3 Kontraktionszyklen ausgewertet, hierbei wurden die Daten aus 2D-Bildern des *brightness modulation mode* (B-mode) analysiert.

Für die Messung der endsystolischen Fläche, der enddiastolischen Fläche und des *Fractional Area Change* (FAC) wurden am Punkt der maximalen Kontraktion und Dilatation jeweils die Endokardverläufe markiert, woraus die Herstellersoftware bei Ausmessung mehrerer Kontraktionszyklen die 3 erwähnten Parameter errechnet.

Für die Messung der Infarktgröße (in %) wurde in der PSLA der endokardiale Umfang des akontraktiven Gewebes ausgemessen und ein Quotient aus dessen Umfang geteilt durch den Gesamtumfang des Endokards gebildet:

$$\text{Infarktquotient} = \frac{\text{Umfang}^{\text{infarziertes Endokard}}}{\text{Umfang}^{\text{infarziertes Endokard}} + \text{Umfang}^{\text{gesundes Endokard}}}$$

Es wurden lediglich Mäuse mit einer Basalherzfrequenz zwischen 450 und 550 Schlägen pro Minute und über 36 °C Innenkörpertemperatur einbezogen. Eine Untersuchung dauerte im Schnitt ca. 25 min.

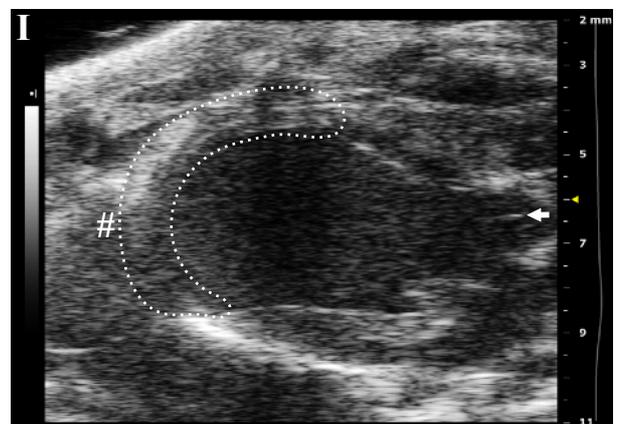
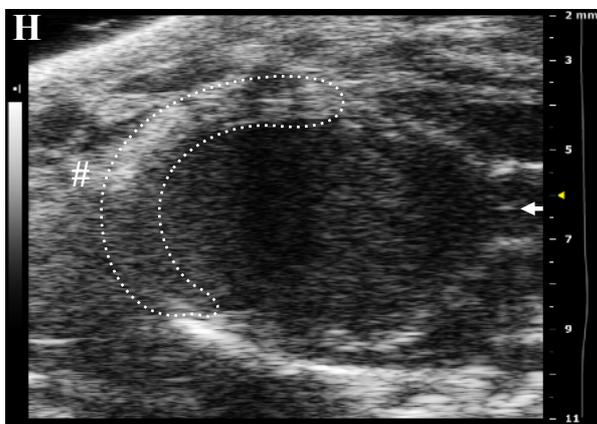
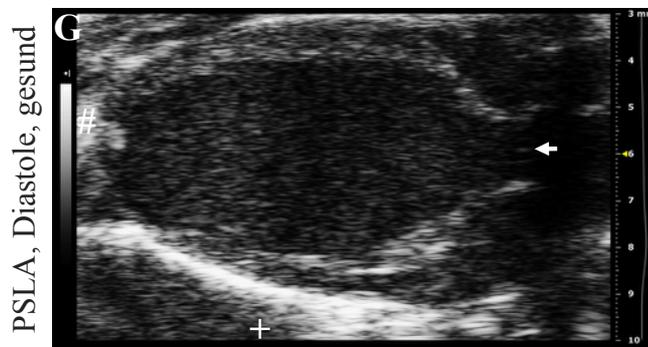
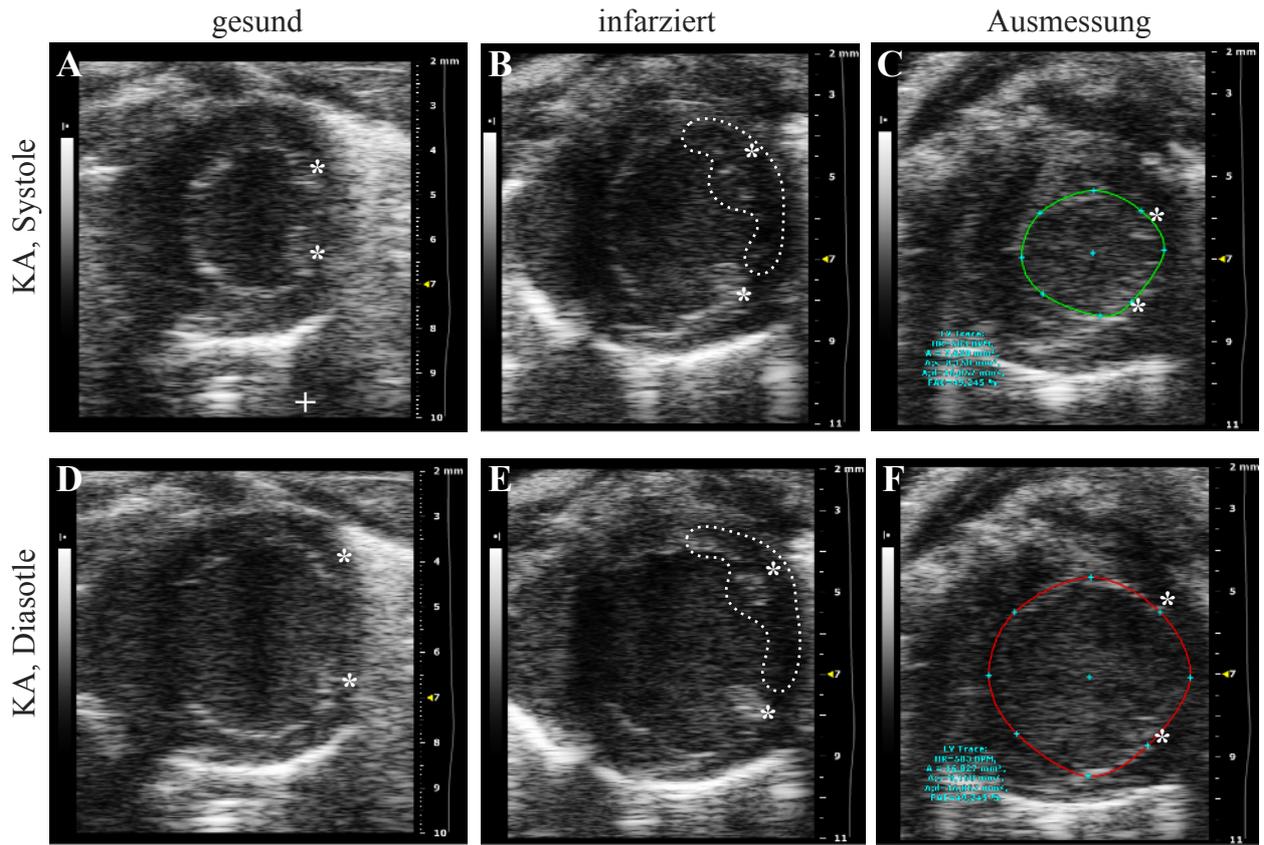


Abbildung 8: Echokardiographie des linken Ventrikels

Beispielbilder an Tag 7 nach Infarkt: (A-C) KA in der Systole: (A) gesund, (B) infarziert, (C) in Ausmessung. (D-F) KA in der Diastole: (D) gesund, (E) infarziert, (F) infarziert in Ausmessung. (G) PSLA gesund in der Diastole, (H) PSLA infarziert in der Diastole, (I) PSLA infarziert in der Systole. Sterne markieren Papillarmuskeln, Pfeile die Aortenklappe, Rauten die Herzspitze, Plus die dorsale Richtung und die gepunktete Linie das Infarktgebiet.

3.8. Light-Sheet Fluorescence Microscopy

Alle LSFM Aufnahmen wurden bei einem Kooperationspartner angefertigt (Prof. Katrin G. Heinze, Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland). Dieses Analyseverfahren (BREDE et al. 2012) wird in Schnittebenen eines morphologisch intakten, durch Inkubation in bleichenden Fixationslösungen transparenten Organes durchgeführt. Hierfür wurden ganze PBS-perfundierte Herzen in 4 % (Masse/Vol.) Formaldehyd (2 Stunden) fixiert und in 4 °C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Herzen in 15 % (Masse/Vol.) H₂O₂ in Methanol für 30 min gebleicht. Die das infarzierte Myokard infiltrierenden TCR-M-Zellen wurden durch Inkubation der Herzen mit Anti-Thy1.1 (Klon OX-7) in PBS-Tween-Puffer (0,05 % Vol./Vol.) für 5 Tage markiert. Nach dem Waschen und Dehydratisierungsverfahren wurden die Herzen mit 1:3 Benzylalkohol/Benzylacetat gereinigt. Sequentielle Mehrfarbenschichtbilder (1 mm Gesamt-Bilddicke, 5 µm-Intervall zwischen den Bildern) wurden unter Verwendung einer 5x-Objektivlinse abgebildet. Die grüne Autofluoreszenz des Myokards stellt morphologische Informationen dar. Angefärbte Thy1.1⁺ Zellen erscheinen in Magenta. Bilder wurden verarbeitet und mit der Imaris-Software (Bitplane, Zürich) analysiert.

3.9. Statistische Analysen

Die Graphen bestehen aus den Mittelwerten der jeweiligen Gruppen (Balken), dem Standardfehler des Mittelwertes und den aufgetragenen Individualwerten. Die Daten wurden in 2-5 unabhängigen Versuchsdurchläufen erhoben, mit Ausnahme der einmaligen FACS-Analyse für Abb. 13B.

Statistische Analysen wurden mit Graphpad Prism (Version 7.0d, Graphpad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Für Abb. 9,12 und 13B wurden als statistische Tests *two-way ANOVA* gefolgt durch die Šidák Korrektur durchgeführt, für Abb. 13C-F ungepaarte t-Tests. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. TCR-M Akkumulation post-EMI in med-LN und Herz

Um KM als im Herzinfarkt T-Zell aktivierendes Autoantigen zu identifizieren, wurden zuerst die postinfarzielle *in vivo* Verteilung und Aktivierungsprofile MYHCA₆₁₄₋₆₂₉-spezifischer transgener CD4⁺ T-Zellen untersucht.

In wilddypische Empfängertiere transferierte TCR-M (Abb. 9A) akkumulieren infarktspezifisch im Herzen und med-LN der Mäuse in der Hochphase der Wundheilung (Abb. 9B, Tag 7, EMI vs. Kontroll-OP $p < 0,001$ und $p < 0,05$, respektive). Dabei ist der Ort der stärksten Infiltration das infarzierte Herz (vs. EMI-med-LN $p < 0,01$, vs. EMI-si-LN/EMI-Milz $p < 0,0001$), gefolgt von dem infarzierten med-LN (vs. EMI-si-LN $p < 0,0001$ und EMI-Milz $p < 0,001$). In Milz und si-LN ist keine infarktbedingte Akkumulation zu beobachten. Bis zu der späteren chronischen Phase (Tag 49) haben sich die TCR-M gleichmäßig verteilt, was für einen selbstlimitierenden Ablauf der post-EMI Autoreaktivität ggü. KM spricht (Abb. 9C). In den Herzen sind abgesehen von einer Probe überhaupt keine TCR-M mehr detektierbar. Lediglich im med-LN zeigt sich eine minimale, nichtsignifikante Ansammlung an TCR-M.

Die LSM-Aufnahmen bestätigen die akute Akkumulation der TCR-M in dem Infarktgebiet an Tag 7 post-EMI (Abb. 10) und chronische Dispersion zu Tag 49 (Abb. 11) semiquantitativ.

Insgesamt ist bei TCR-M ein stark infarktspezifisches Verhalten zu beobachten, da sie in med-LN und v.a. den Herzen an Tag 7 post-OP akkumulieren. Allerdings findet dieser immunologische Prozess bis Tag 49 sein Ende, diese Entzündungsreaktion ist damit selbstlimitierend.

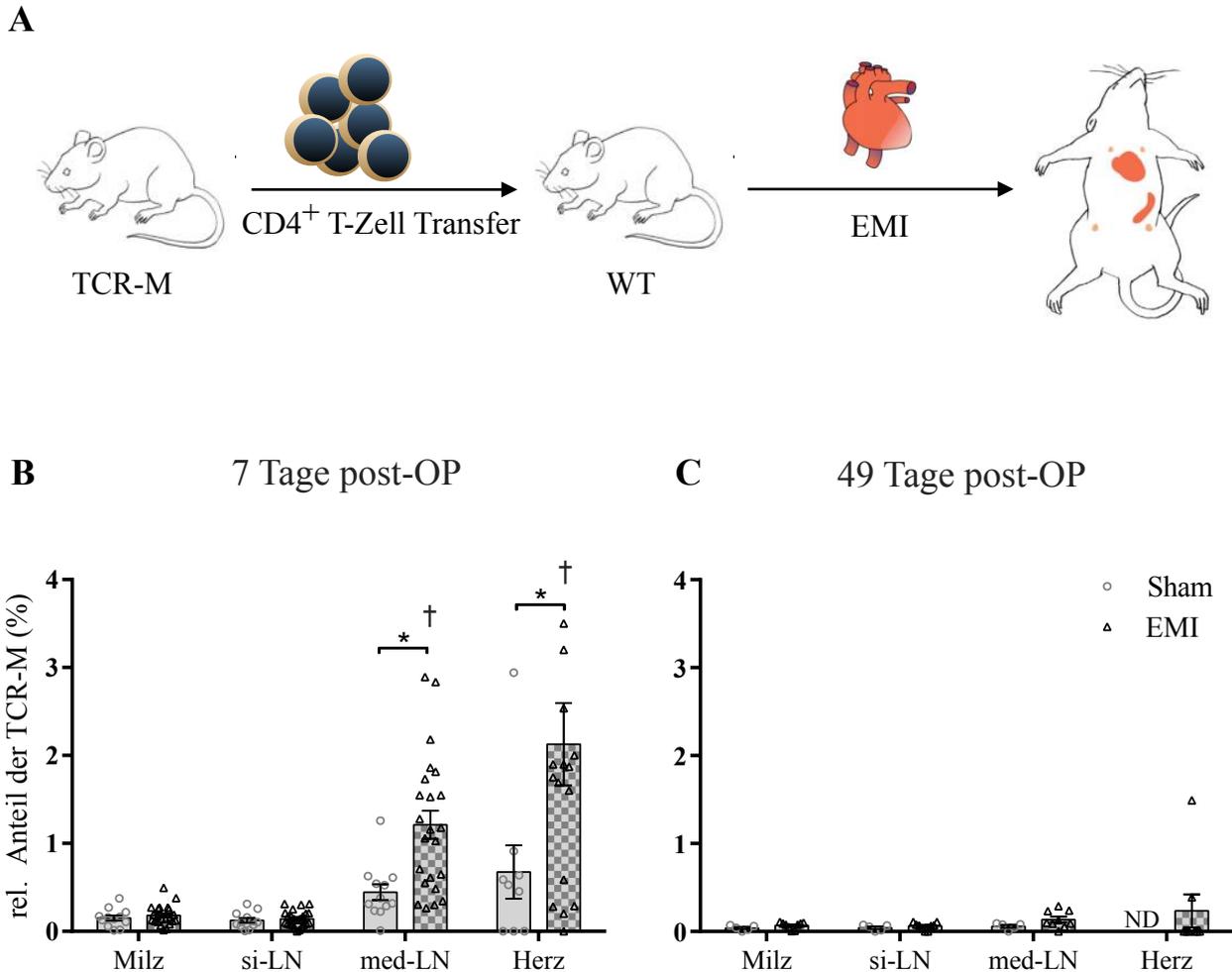


Abbildung 9: Selektive TCR-M Akkumulation im infarzierten Herzen

(A) Experimentelles Design. Thy1.1⁺ TCR-M wurden einen Tag vor den OPs (Kontrolle [Sham]/EMI) in Thy1.2⁺ Wildtyp (WT)-Empfängermäuse transferiert. Der relative Anteil der TCR-M an der THZ-Population in Milzen, subiliacalen Lymphknoten (si-LN), mediastinalen Lymphknoten (med-LN, Herz-drainierend) und im Herzen wurden an Tag 7 (B) und Tag 49 (C) post-OP durch FACS gemessen. In der EMI-Herz-Gruppe in (B) liegen 2 Einzelwerte oberhalb des Achsenmaximums, in Sham-Herzen an Tag 49 konnten keine TCR-M detektiert werden (ND). Gruppengrößen: EMI (n=7-23) und Sham (n=3-12), die Daten wurden in 2 (C) bis 5 (B) unabhängigen Versuchsdurchläufen erhoben. Das Symbol * indiziert einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte EMI vs. Sham innerhalb eines Organes, der Mittelwert der mit † markierten Gruppe ist signifikant unterschiedlich zu dem aller anderen EMI-Gruppen. Es wurde der *two-way ANOVA*-Test gefolgt durch die Šidák Korrektur durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

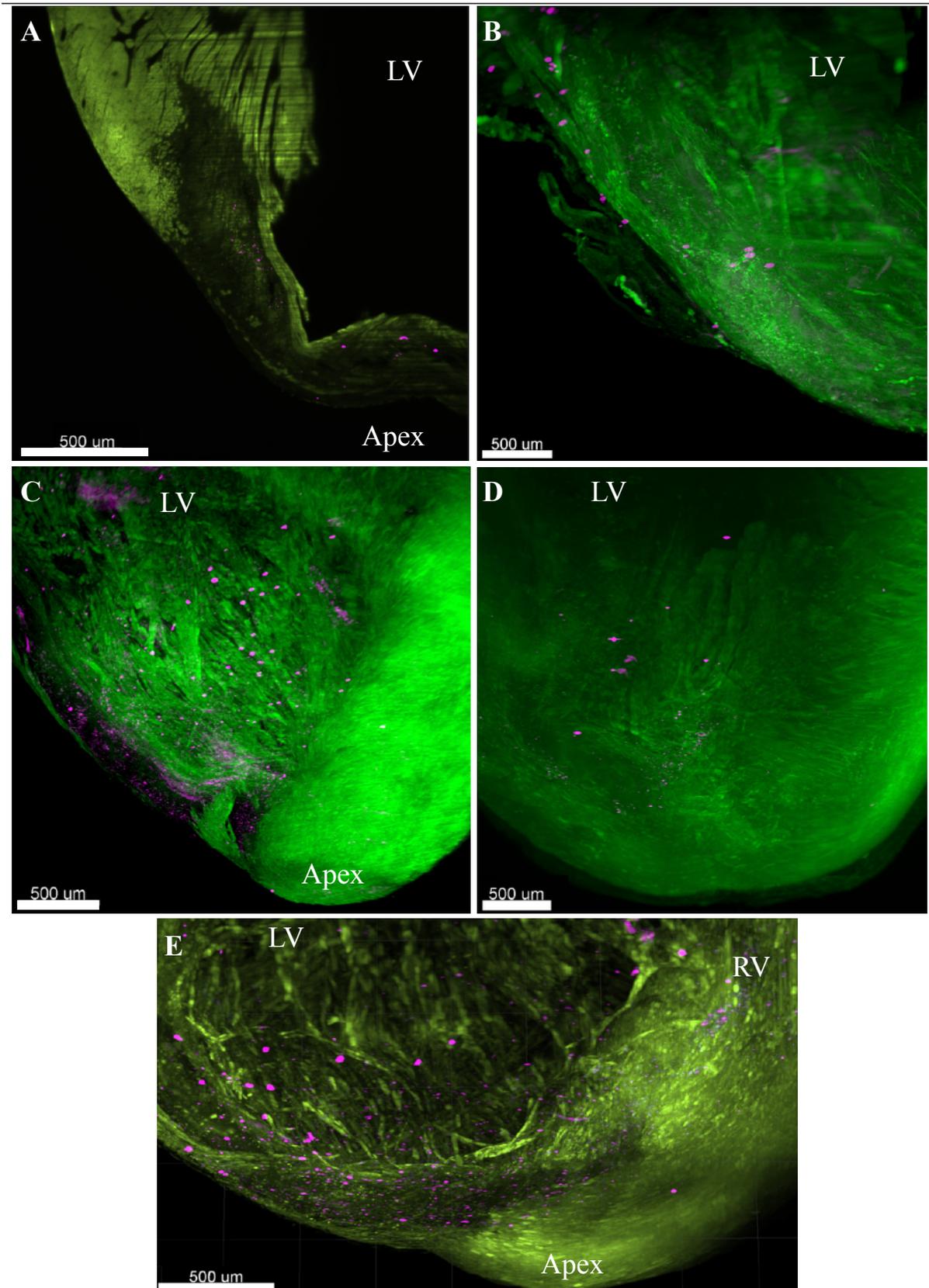


Abbildung 10: LSFM-Aufnahmen der Herzen an Tag 7 post-EMI

(A) Zweidimensionale Schnittaufnahme und (B-E) dreidimensionale Bildrekonstruktionen an Tag 7 post-EMI (n=4). LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel, Apex=Herzspitze. Grün=Autofluoreszenz des Gewebes, Magenta=TCR-M.

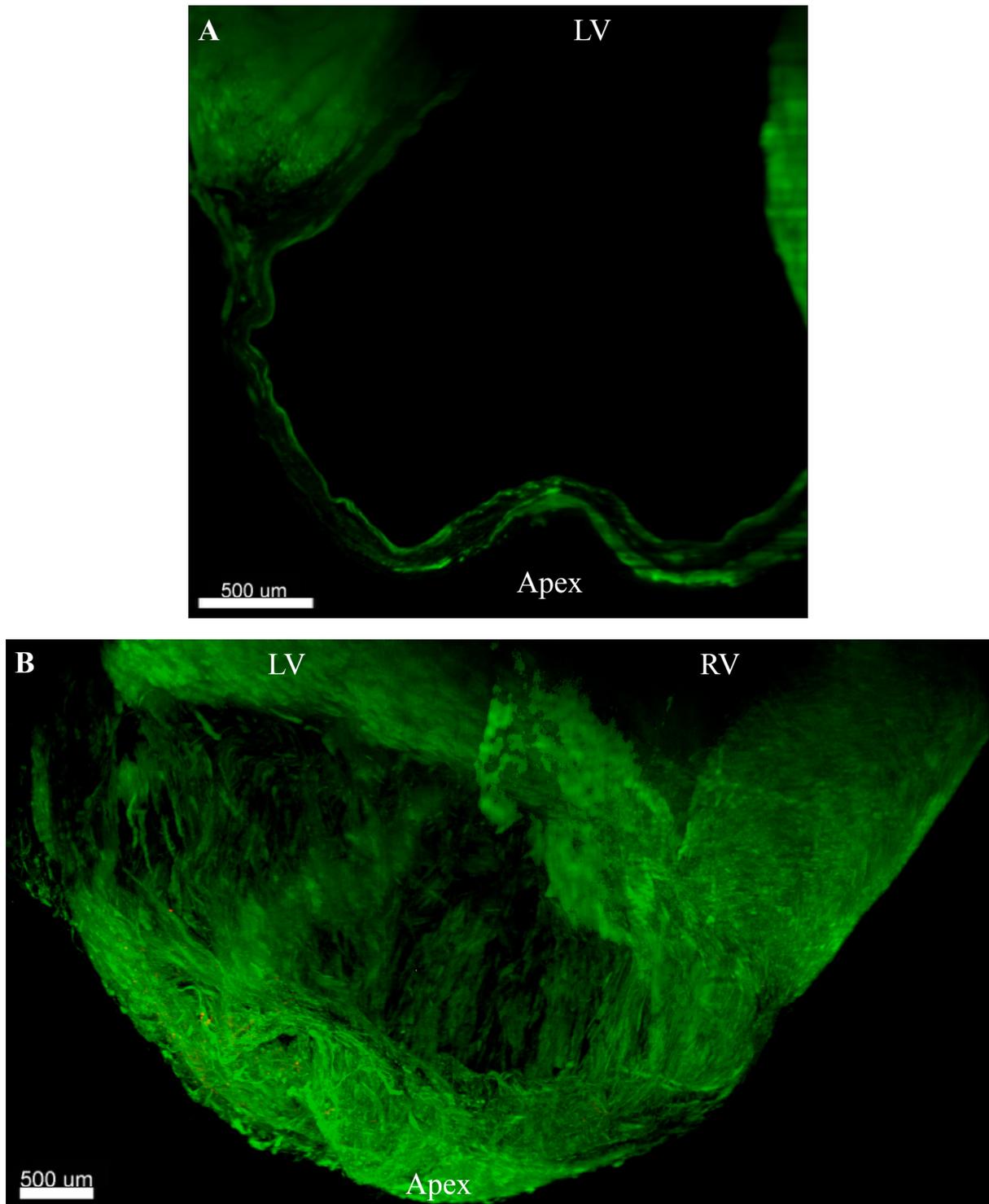


Abbildung 11: LSFM-Aufnahmen der Herzen an Tag 49 post-EMI

(A) Zweidimensionale Schnittaufnahme und (B) dreidimensionale Bildrekonstruktion eines infarzierten Herzens an Tag 49 post-OP (n=1). LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel, Apex=Herzspitze. Grün=Autofluoreszenz des Gewebes, Magenta=TCR-M.

4.2. TCR-M Aktivierung und Differenzierung zu Tregs post-EMI

Tag 7 wird häufig als Hochphase der Lymphozyten medierten Wundheilung beschrieben (YAN et al. 2013), weshalb die THZ in dieser akuten Phase phänotypisiert wurden. Hierfür wurden die CD44-Oberflächenexpression als Aktivierungsmarker und das intrazelluläre Aufkommen des FoxP3-Transkriptionsfaktors der TCR-M und ENDO im Vergleich zu deren Werten prä-Transfer (Abb. 12, dargestellt durch gepunktete Linien in den jeweiligen Graphen) untersucht.

Die CD44 Hochregulation war unter TCR-M im Vergleich zu der jeweiligen ENDO-Population nach Transfer in den EMI-Kontext in jedem Organ zu beobachten ($p < 0,0001$, Abb. 12A-C, $p < 0,001$ Abb. 12D). Durch die Nekrose der Kardiomyozyten und der Drainage der freigesetzten Antigene in den med-LN erklärbar, findet unter den Infarktgruppen in Herz und med-LN eine MYHCA-Stimulation der TCR-M durch APZ statt. Allerdings scheint auch ein Teil des KM in die Blutbahn zu gelangen, ersichtlich an der TCR-M-CD44 Hochregulation in EMI-si-LN und EMI-Milz. Alternativ könnten diese dort detektierten Zellen zuvor im med-LN aktiviert worden und dann in die Zirkulation übergegangen sein, sodass sich im ganzen Körper, v.a. aber im systemischen Kontrollorgan, der Milz, eine nennenswerte Anzahl an aktivierten TCR-M findet.

Lediglich in den Kontroll-OP-si-LN (Abb. 12B) zeigte sich keinerlei TCR-M-Aktivierung, was für eine Abwesenheit nennenswerter Stimuli spricht. Der Anteil der CD44⁺ TCR-M war auch in Kontroll-OP-Milzen (Trend) und Kontroll-OP-med-LN ($p < 0,05$) ggü. ihrer ENDO Kontrollgruppe erhöht (Abb. 12C). Zu den TCR-M-Kontroll-OP-Milz-Proben ist allerdings anzumerken, dass einige Ausreißer den Mittelwert anheben und viele Werte auf dem prä-Transfer Niveau liegen, wohingegen im med-LN alle Werte deutlich über dem Ausgangswert gemessen wurden.

Wie in Abb. 12C zu sehen, ist der CD44-Wert der TCR-M-Population in den Kontroll-OP-med-LN ggü. ihrem ENDO-Pendant signifikant erhöht ($p < 0,05$). Hier schien MYHCA-Präsentation und TCR-M-Stimulation unter physiologischen basalen Konditionen in den med-LN stattzufinden, was zu einer grundlegenden autoimmunen Aktivität in diesen Organen führte. Eventuell verursachte die Kontroll-OP selber einen milden Entzündungsreiz.

Aufgrund geringster TCR-M Detektion in Kontroll-OP-Herzen konnten keine Schlussfolgerungen bezüglich der TCR-M-Akkumulation oder -Aktivierung für diese Gruppe gezogen werden. Des Weiteren zeigten die ENDO-Populationen in keiner der Analysen eine distinkte Reaktion.

Das gleiche Muster stellte sich in dem Aufkommen an Tregs unter den TCR-M dar. In jedem untersuchten Organ der EMI-Gruppe fand sich im Vergleich zu dem jeweiligen ENDO-

Kompartiment eine stark erhöhte FoxP3⁺-TCR-M-Population (Abb. 12E $p < 0,01$, Abb. 12F $p < 0,0001$, Abb. 12G $p < 0,0001$, Abb. 12H $p < 0,001$). Im Herzen war ein mittlerer Anteil von 55,2 % der TCR-M FoxP3⁺, in starkem Kontrast zu 18,88 % in der ENDO-EMI Population (Abb. 12H). Die TCR-M waren einen Tag vor EMI im Mittel mit lediglich 8,8 % FoxP3⁺-Zellen transferiert worden. In Milz (Trend, $p=0,082$) und si-LN ($p < 0,05$) erweist sich der Anstieg des FoxP3⁺-TCR-M Kompartiments als infarktspezifisch. Der FoxP3⁺-TCR-M Anteil in Kontroll-OP-med-LN erreicht einen leicht höheren Wert als sein EMI-Pendant (Abb. 12G). Dies könnte für eine antigenspezifische tolerogene Stimulation in dem mediastinalen Lymphknoten selbst in Abwesenheit eines EMI sprechen.

Zusammenfassend rekrutiert und aktiviert der EMI als immunogenes Ereignis antigenspezifische THZ, während das polyklonale endogene T-Zell Kompartiment kaum Veränderungen zeigt. Von besonderer Bedeutung ist die starke Vergrößerung des Treg-Kompartiments der TCR-M durch den EMI. Auffällig ist eine basale immunologische Stimulation in Kontroll-OP-med-LN, die restlichen Kontrollgruppen verhielten sich unauffällig.

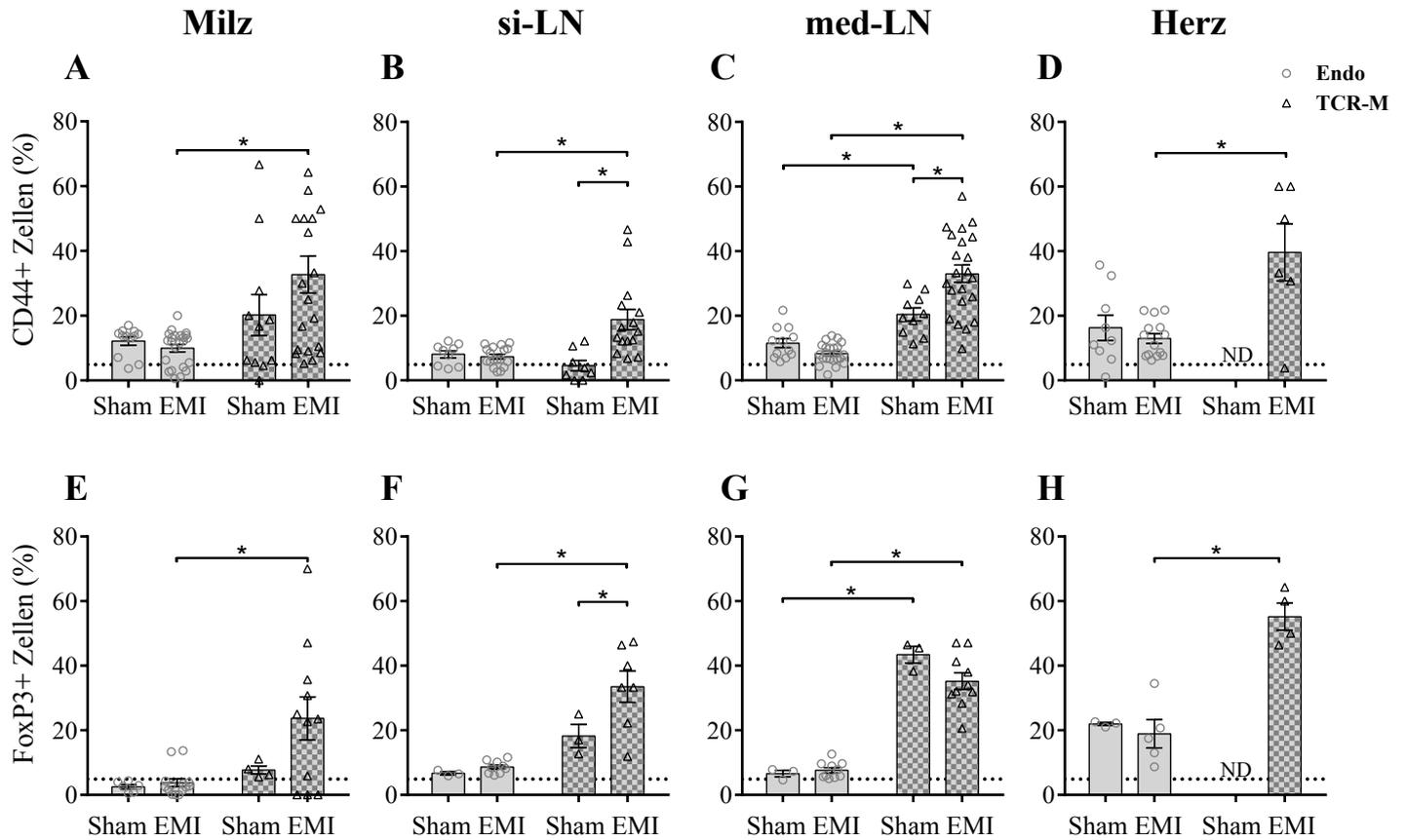


Abbildung 12: TCR-M Aktivierung und Anhäufung der Tregs post EMI

Relativer Anteil der CD44⁺ (A-D) und Foxp3⁺ Zellen (E-F) an den jeweiligen THZ-Kompartimenten der endogenen (ENDO) und TCR-M, an Tag 7 post-OP aus verschiedenen Organen extrahiert. In Kontroll(Sham)-Herzen konnten TCR-M nicht detektiert werden (ND). Die Punkt-Linien indizieren die jeweiligen Expressionen unter TCR-M vor den Transfers. Gruppengrößen: EMI (n=7-23) und Sham (n=3-12). Die Daten wurden in 2 (E-H) bis 5 (A-D) unabhängigen Versuchsdurchläufen erhoben. Das Symbol * indiziert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen, dafür wurde der *two-way ANOVA*-Test gefolgt durch die Šidák Korrektur durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4.3. Kardioprotektion post-EMI durch TCR-M in DO11.10-Empfängertieren

Um die vorherigen Beobachtungen auf ihre pathophysiologische Relevanz zu überprüfen, wurden kardiale Funktionsparameter post-EMI nach adoptivem Transfer MYHCA- und Ovalbumin (OVA)-spezifischer THZ (TCR-M und DO11.10, Abb. 13A) evaluiert. OVA-spezifische Zellen dienten dabei als Kontrolle, da OVA in der Maus nicht vorkommt und somit im EMI als Antigen für die Stimulation von T-Zellen keine Rolle spielt. Weiterhin wurden DO11.10 Mäuse als Empfängertiere genutzt, um konfundierende Einflüsse einer reaktiven endogenen THZ-Population auszuschließen.

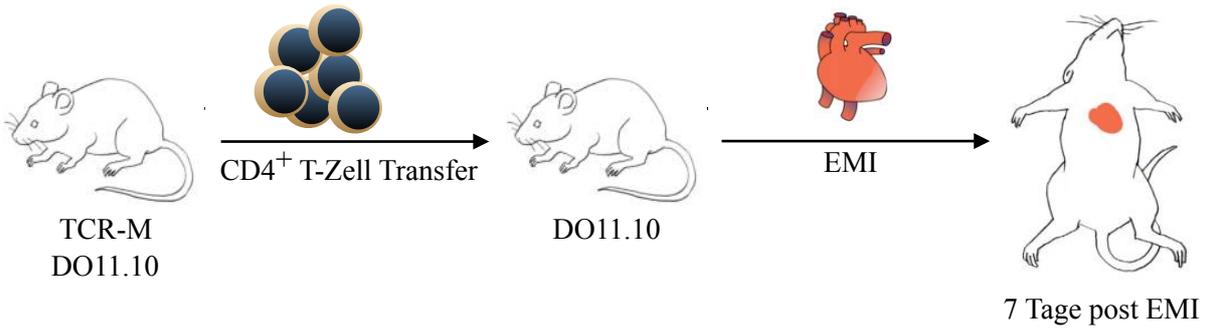
Die Leukozytenpopulationen im Infarktgewebe wurden mittels FACS verglichen. Dabei wiesen TCR-M-Empfänger höhere Werte an CD4⁺ T-Zell-Infiltration als die Kontrolltiere auf (Abb. 13B, $p < 0,001$), den Kardiotropismus der TCR-M aus Abb. 9B reproduzierend. Einen Hinweis auf eine Wechselwirkung der TCR-M mit Monozyten oder M Φ liefert der durch den TCR-M-Transfer relativ erniedrigte Anteil der Mono/Mac-Population (Abb. 13B, $p < 0,01$). Die Anteile neutrophiler Granulozyten zeigten keine Auffälligkeiten.

Echokardiographische Untersuchungen zeigten bessere systolische Funktionsparameter in Herzen, welche durch autoreaktive THZ infiltriert wurden: einerseits durch eine geringere mittlere endsystolische Fläche in der TCR-M Gruppe (Abb. 13C, Trend, $p=0,074$), andererseits durch den deutlich verbesserten *Fractional Area Change*, eine Messmethode für die Pumpleistung des Herzens (Abb. 13E, $p < 0,05$). Die enddiastolischen Flächen wiesen keine Unterschiede auf (Abb. 13D).

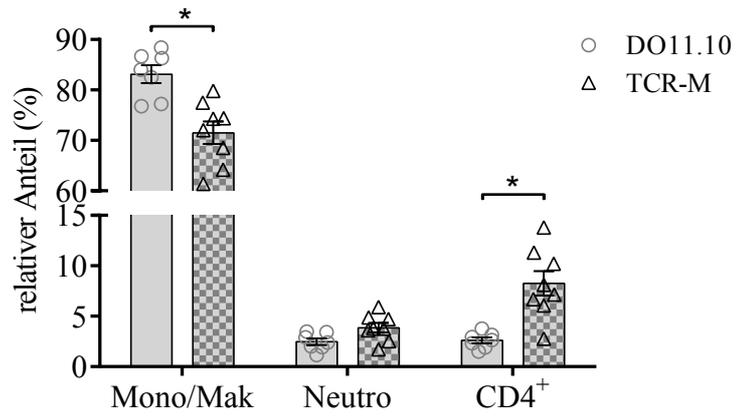
Bei dem Vergleich der Infarktquotienten beider Versuchsgruppen ergab sich kein Unterschied (Abb. 13F). Die augenscheinliche Aufteilung der TCR-M Probemenge in 2 Gruppen ist zufälliger Natur und korreliert nicht mit unterschiedlichen Herzfunktionsparametern.

Diese Daten legen nahe, dass KM-spezifische T-Zellen kardioprotektive Effekte im Kontext des EMI auf funktioneller Ebene bewirken, was eine protektive Autoimmunität suggeriert.

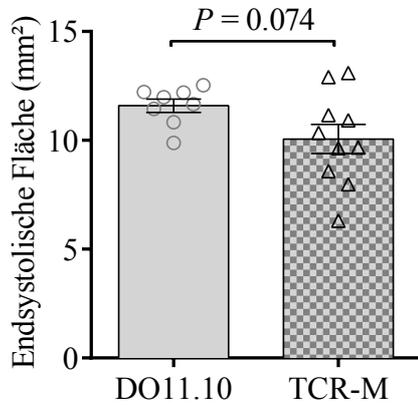
A



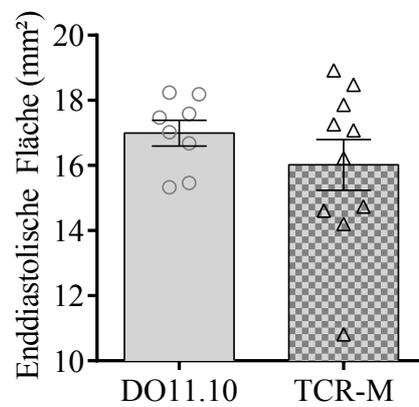
B



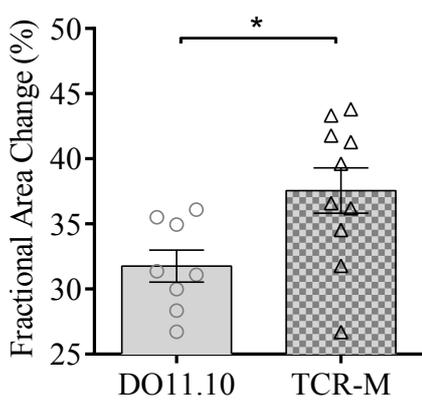
C



D



E



F

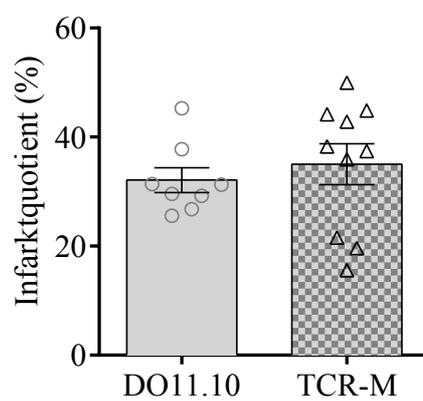


Abbildung 13: Kardioprotektion durch im EMI-Kontext aktivierte CD4⁺ T-Zellen

(A) Experimentelles Design: TCR-M und DO11.10 THZ wurden vor den EMI-OPs in DO11.10 Mäuse transferiert. Die kardialen Funktionsparameter wurden zum Hochpunkt der Heilungsphase (Tag 7) erhoben. (B) Die relativen Anteile verschiedener Subpopulationen an Leukozyten im Infarktgewebe wurden mittels FACS ermittelt. Monozyten und MΦ (Mono/Mak), Neutrophile Granulozyten (Neutro) und CD4⁺ T-Zellen. Endsystolische (C) und enddiastolische Fläche (D), sowie FAC (E), wurden auf der Papillarmuskelebene in der KA durch US erhoben, Infarktgröße (F) in der PSLA des linken Ventrikels. Gruppengrößen: TCR-M (n=8-10) und DO11.10 (n=7-9) Empfängertiere. Die Daten wurden in 2 unabhängigen Versuchsdurchläufen erhoben, mit Ausnahme von (B), welche aus einer FACS-Analyse stammen. Das Symbol * indiziert einen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen. Hierfür wurden für Abb. 13B der *two-way ANOVA*-Test gefolgt durch die Šidák Korrektur, für Abb. 13C-F ungepaarte t-Tests als statistische Tests durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

5. Diskussion

Mit der Reinterpretation der Prozesse nach dem Herzinfarkt als Heilung einer Wunde (BLANKESTEIJN et al. 2001, NUNES-SILVA et al. 2017) richtete sich der Fokus der Forschung bezüglich postinfarzieller Kardiomyopathien auf das Immunsystem. Nachdem zunächst das angeborene Immunsystem eingehend untersucht worden ist (NAHRENDORF et al. 2010), erkannte man bald die grundlegende Bedeutung des adaptiven für Heilung, Homöostase und *Remodeling* (HOFMANN und FRANTZ 2015). Neben B-Zellen und deren Antikörpern (KEPPNER et al. 2018) gerieten T-Zellen in das Zentrum der Aufmerksamkeit. 2012 wiesen HOFMANN et al. THZ, dann WEIRATHER et al. 2014 Tregs post-EMI eine heilungsförderliche Wirkung nach. Weitere Studien reproduzierten die Involvierung der Tregs im EMI (HUI et al. 2017, SAXENA et al. 2014, TANG et al. 2012, WANG et al. 2016, ZACCHIGNA et al. 2018, ZENG et al. 2016). Die vorteilhaften Effekte finden sich v.a. in der Wechselwirkung zwischen Tregs und Monozyten/M Φ , Fibroblasten oder Kardiomyozyten. Ob bei der T-Zell-Stimulation primär der Kontakt zu ihrem Antigen oder eher das dabei herrschende Zytokinmilieu in Form einer unspezifischen Beeinflussung eine Rolle spielt, ist Gegenstand aktueller Forschung (MARTINI et al. 2018). Mehrere Studien deuten allerdings auf Antigene als Hauptursache hin (siehe Kapitel 5.1).

Zielstellung dieser Arbeit stellte die Erforschung der Rolle Kardiomyosin-spezifischer T-Zellen in der Heilung des permanenten Myokardinfarktes am Mausmodell dar.

5.1. Wahl des Kandidatenantigens

Aufgrund der speziellen Rolle des KM als immunogenes Protein fiel die Wahl auf das MYHCA-spezifische TCR-M Mausmodell (NINDL et al. 2012). Neben dem Vorhandensein im Kreislauf nachweisbarer Anti-KM Autoantikörpern, sowohl bei MI-Patienten, als auch in geringem Maße bei gesunden Menschen und Nagern (O'DONOHUE et al. 2016), waren folgende Daten ausschlaggebend:

- KM wird als herzrestriktives Protein ausschließlich im Myokard exprimiert (UHLEN et al. 2015),
- gleichzeitig ist die zentrale Toleranz durch die fehlende Expression im Thymus beeinträchtigt (LV und LIPES 2012).
- KM wird konstitutiv von kardialen APZ exprimiert (SMITH und ALLEN 1992).
- Post-MI ist KM im Blutkreislauf nachweisbar und wird dabei vermehrt durch APZ im Herzen präsentiert (LEGER et al. 1985, VAN DER BORGHT et al. 2017).

- Mittels Immunisierung durch in Adjuvans adsorbiertem KM lässt sich eine AIM auslösen (NEU et al. 1987), welche THZ mediiert ist (SMITH und ALLEN 1991). Hierbei hat sich MYHCA als besonders immunogenes Polypeptid herausgestellt (PUMMERER et al. 1996).

Das hierdurch immunologisch außergewöhnliche MYHCA verursacht in dem TCR-M Mausstamm mit seinem monoklonalen MYHCA₆₁₄₋₆₂₉-spezifischen TZR-Repertoire eine spontane AIM ab einem Alter von 6 Wochen. Durch ihre Nachweisbarkeit via Oberflächenexpression von Thy1.1 in FACS analysierbar, wurden diese Zellen in Wildtyp-Thy1.2⁺ Empfängermause vor der experimentellen Auslösung eines Herzinfarktes transferiert. Somit war eine Charakterisierung der TCR-M vor und nach Transfer möglich.

5.2. Kritische Betrachtung der Analysemethoden

Die Echokardiographie stellt eine sehr aussagekräftige Messmethode dar, indem die Daten direkt funktionelle Parameter, das letztendliche Resultat pathophysiologischer Prozesse, des zirkulatorischen Organsystems darstellen. Neuere Hochleistungsschallgeräte sind mittlerweile in der Lage adäquate Bilder bei Herzfrequenzen von weit über 500 Schlägen pro Minute zu liefern (PISTNER et al. 2010). Als eine für Mäuse häufig verwendete Methode stützt sie sich auf eine breite Datenbasis und ermöglicht nicht-invasive longitudinale Studien (GAO et al. 2011). Als Einschränkung sind die mangelhafte Vergleichbarkeit der Messungen durch verschiedene Personen und, aufgrund der geringen murinen Herzgröße nebst hohen -frequenz, die geringe Toleranz ggü. Messfehlern zu nennen (GARDIN et al. 1995). Weiterhin sind auftretende Effektgrößenunterschiede bezüglich einzelner Ätiologien unspezifisch und lassen selten eine unmittelbare ursächliche Aussage zu.

Durchflusszytometrische Untersuchungen wie FACS ermöglichen einzelne Zellen und Zellpopulationen zu identifizieren und zu analysieren (COSSARIZZA et al. 2017). Abhängig von der technischen Ausrüstung des Gerätes sind unterschiedlich viele Flourophore einsetzbar, wobei bei steigender Anzahl gleichzeitig spektrale Überlappungen und somit ein höheres Hintergrundrauschen auftreten. Somit beeinträchtigt man mit zunehmender Anzahl an Markern bezüglich einer Zellpopulation die Möglichkeit, die Prävalenz anderer zu untersuchen. Demzufolge stellt der Entwurf eines FACS-Flourophorsortiments immer eine Abwägung zwischen Spezifität und Sensitivität der zu untersuchenden Zellen dar.

Da es in dieser Arbeit v.a. um Phänotypisierung vorbestimmter Leukozytenpopulationen ging, stellte FACS in Kombination mit Echokardiographie nach Einschätzung des Autors eine adäquate Messmethode dar.

Als zusätzliche Darstellung der TCR-M Akkumulation wurde die LSFM gewählt. Die morphologische Integrität des Myokards, bei gleichzeitiger Darstellung der myokardialen Verteilung der TCR-M, ist der große Vorteil dieser Messmethode, auch wenn sie in dieser Arbeit aufgrund der geringen Menge der analysierten Herzen eher als qualitativer Nachweis und Validierung der Beobachtungen diente.

5.3. Interpretation der Daten

Zum Höhepunkt der T-zellulären Infiltration, eine Woche nach EMI (YAN et al. 2013), zeigten sich sowohl in FACS als auch in LSFM eine Infarkt-selektive Akkumulation der TCR-M in med-LN und Herzen. Dies spricht für eine T-Zell/med-LN/Herz-Wirkachse, einem Kausalzusammenhang der T-Zell-Aktivität in jenen Organen. Die ablaufenden immunologischen Prozesse führen selbstlimitierend zu einer gleichmäßigen Dispersion der TCR-M über den ganzen Körper. Während sich das endogene T-Zell Kompartiment unauffällig verhält und keine Aktivierung post-EMI aufweist, werden die TCR-M sowohl im Herzen und med-LN, als auch herzfernen Orten infarktspezifisch aktiviert, was sich in einer erhöhten Oberflächenexpression des CD44-Markers äußert. Diese Aktivierung geht mit einer Vergrößerung des FoxP3⁺ TCR-M-Kompartimentes im Rahmen des EMI einher, im Herzen zu mehr als 55 % der transgenen T-Zell-Population.

Auch die TCR-M in med-LN der Kontroll-OP-Gruppe durchlaufen eine erhöhte Aktivierung und Vergrößerung des Tregs-Anteiles, was für eine konstitutive Präsentation der MYHCA-Autoantigene auf APZ und darauf folgende Stimulation der TCR-M spricht, ohne dass hierbei der Stimulus des EMI notwendig wäre. Diese unter physiologischen basalen Bedingungen ablaufenden kardialen immunologischen Prozesse in Form von KM-Präsentierung durch APZ wurden bereits durch SMITH und ALLEN 1992 beschrieben und könnten die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz indizieren. Da KM nicht im Thymus exprimiert wird und sich keine zentrale Toleranz ausbilden kann, unterliegt das Herz der erhöhten Gefahr einer autoaggressiven Immunreaktion (LV und LIPES 2012). Daher gilt anzunehmen, dass sowohl im gesunden Zustand, als auch in pathologischen Kontexten das Zusammenbrechen der peripheren Toleranz aktiv unterbunden werden muss, z.B. in Form einer Restriktion der Entzündungsreaktionen durch Autoantigen-spezifische regulatorische T-Zellen. Diese Annahme steht im Einklang mit der starken Vermehrung des Treg-Kompartiments unter den TCR-M nach EMI und in Kontroll-OP-Bedingungen. Ein besonders starker Auslöser für dieses Geschehen ist vermutlich der sterile Entzündungsreiz der massiven infarziellen Nekrose und Freisetzung der DAMPS, dem die Toleranzinduktion

als konträre Reaktion entgegensteht, um ein Entgleisen oder Persistieren der Entzündung zu verhindern.

Eine richtungsweisende Rolle scheinen dabei v.a. die DZ zu übernehmen, indem sie die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz ggü. Autoantigenen in unreifer Form und die Ausbildung von gewebespezifischen Immunantworten nach entzündungsbedingter Reifung bedingen (CHOO et al. 2017, MÄNN et al. 2016, VAN DER BORGHT et al. 2017 und 2018). Dabei laufen für die Heilung relevante Kommunikationsprozesse zwischen APZ und dem adaptiven Immunsystem ab. Dies zeigte sich schon in anderen eine immunologische Sonderstellung einnehmenden Organen, wie z.B. dem immunprivilegierten zentralen Nervensystem. So nehmen Astrozyten in Abwesenheit von Traumata suppressiven Einfluss auf T-Zell-Reaktivität und speziell autoreaktive myelin-basic-protein-spezifische Klone im Gehirn (SUN et al. 1997) und reduzieren die MHC-II Expression von M Φ und Mikroglia (HAILER et al. 1998).

In diesen Versuchen wurde nicht untersucht, ob die Vermehrung des Treg-Kompartiments der TCR-M auf eine vermehrte Proliferation der transferierten nTregs, ein vermehrtes Absterben der Tcon, oder einer Differenzierung zu iTregs nach antigenspezifischer Stimulation zurückzuführen ist. Hierfür sind weitere Experimente mit markierten Zellen notwendig, in denen die Proliferation der transferierten nTregs nachvollziehbar ist.

Diese Aktivierung und Konversion zum regulatorischen Phänotyp post-EMI wurde bereits durch andere Autoren beschrieben (SAXENA et al. 2014, TANG et al. 2012, WEIRATHER et al. 2014, ZENG et al. 2016). Hierbei differenzierten allerdings die endogenen THZ zu Tregs, deren mangelnde Reaktivität in diesen Experimenten durch die Anwesenheit der TCR-M erklärt werden kann. Diese gehen eine hochaffine Interaktion mit dem Autoantigen MYHCA₆₁₄₋₆₂₉ ein, wodurch das restliche Kompartiment der THZ eventuell eine veränderte Interaktionsdynamik mit diesem AG oder weiteren KM-abgeleiteten Polypeptiden aufweist. Durch *anti-idiotypische Interaktion* wäre dieses Phänomen erklärbar, bei der sich die Lymphozyten in ihrer Avidität gegenüber AG gegenseitig beeinflussen (ELIAS et al. 1999, VAZ und CARVALHO 2015). In weiteren Modellen der Autoimmunität in Organpathologien weisen Tregs ebenfalls heilungsförderliche Effekte auf, wie bei im zentralen Nervensystem (RAPOSO et al. 2014), in skelettalen Muskeln (BURZYN et al. 2013), im Darm (GROUX et al. 1997) und in den Lungen (ARPAIA et al. 2015, SCHULZE et al. 2016). Nichtsdestotrotz existieren auch widersprüchliche Studien, die eine destruktive Beteiligung der T-Zellen in immunologischen Prozessen aufzeigen, v.a. in chronischen Pathologien. Das gilt für Ischämie/Reperusionsmodelle (I/R) des Herzinfarktes (BOAG et al. 2015, MATHES et al. 2016), hämodynamische Stressmodelle (KALLIKOURDIS et al. 2017, LAROUMANIE et al. 2014, NEVERS et al. 2015) und Modelle postinfarzieller Herzinsuffizienz (BANSAL et al.

2017). Dies unterstreicht die milieuspezifische Rolle der Tregs, abhängig von den jeweiligen pathophysiologischen Rahmenbedingungen. Vermutlich ist die T-Zell-Aktivität zeit- und kontextabhängig, doch bedarf es an dieser Stelle weiterer Forschung, um jene Faktoren zu identifizieren, die letztendlich physiologische von destruktiven Immunmodulationen differenzieren.

Werden die TCR-M Zellen in DO11.10 Empfängertiere transferiert, welche lediglich ein monoklonales, in diesem Kontext irrelevantes, Ovalbumin-spezifisches T-Zell Kompartiment aufweisen, bewirken sie nach EMI die Erhaltung der Herzfunktionsparameter und der Kontraktilität des linken Ventrikels. Auch wenn an dieser Stelle keine mechanistischen Daten erhoben worden sind, könnten die heilungsförderlichen Effekte, neben parakriner Stimulation des Myokards durch die TCR-M, durch Treg-Beeinflussung der M Φ -polarisation zu erklären sein, wie schon WEIRATHER et al. 2014 zeigten. M Φ wirken wiederum auf den Entzündungsverlauf ein, über die Sekretion von Zytokinen (z.B. Osteopontin), Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β), anti-inflammatorischen Interleukinen (z.B. IL10) und Matrixmetalloproteinasen, ferner durch die Stimulation der Neovaskularisation (FRANTZ et al. 2013, NAHRENDORF et al. 2010). Einen Hinweis auf potentielle Involvierung der M Φ in dieser Versuchsreihe liefert das unterschiedliche Aufkommen an Monozyten/M Φ im Narbengewebe der TCR-M- und DO11.10-transferierten infarzierten Empfängertiere. Des Weiteren kommen TCR-M induzierte Beeinflussung der Fibroblastenaktivität hin zu einer stabilen und funktionalen Narbe (SAXENA et al. 2014) oder des extrazellulären purinergen Metabolismus in Frage. Post-nekrotisch freigesetzte Nukleotide (ATP) wirken proinflammatorisch. Durch Ektonukleotidasen, wie CD39 und CD73, werden sie zu Adenosin abgebaut, welches über Adenosin-Rezeptoren anti-inflammatorische Signalkaskaden stimuliert (BONNER et al. 2013, BORG et al. 2017, ELTZSCHIG et al. 2013).

Erstaunlicherweise wirken die gleichen TCR-M, die in infarzierten WT-Mäusen zu Tregs differenzieren und eine Erhaltung der Herzleistung post-EMI in DO11.10 Mäusen verursachen, in ihren Spendertieren letal, indem sie ab einem Alter von 6 Wochen eine AIM auszulösen in der Lage sind (NINDL et al. 2012). Demzufolge determiniert der EMI ein immunsuppressives bzw. -modulatorisches Milieu, welches die T-Zellen zu einem heilungsförderlichen anti-inflammatorischen Phänotyp polarisiert, unabhängig von Antigen-spezifität. Obwohl dessen Existenz in zwei Versuchsmodellen nachgewiesen wurde, können zur Zeit keine Aussagen über die genauen Ursachen dieses Milieu-Effektes getroffen werden. Einen vergleichbares heilungsförderliches Phänomen konnten 1999 MOALEM et al. und SCHWARTZ et al. nachweisen, welche Autoantigen-spezifische T-Zellen in Mäuse transferierten, denen unmittelbar zuvor eine Verletzung des zentralen Nervensystems (Sehnerv) zugefügt worden war. Die gleichen myelin-basic-protein-spezifischen T-Zellen, die

ansonsten eine experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis auszulösen in der Lage sind, wirkten hier protektiv und restringierten sekundäre Entzündungsschäden an Axonen. Weiterhin ist es möglich, dass die Differenzierung und Wirkungsweise von T-Zellen stark von der Anwesenheit weiterer T-Zell-Klone und deren anti-idiotypen Wechselwirkung untereinander abhängt (ELIAS et al. 1999, VAZ und CARVALHO 2015). Demzufolge kann das Verhalten der TCR-M in einem polyklonalen Kontext deutlich von ihrer Aktivität in den monoklonalen Spendertieren abweichen.

Bei einer Wiederholung der DO11.10 Versuche wäre ein Einschluss weiterer Versuchsgruppen wünschenswert, welche Wildtyp-T-Zellen aus den med-LN sowohl infarzierter als auch Kontroll-operierter Spendertiere im Transfer erhielten. Somit könnte der Effekt polyklonaler T-zellulärer Antworten und der Einfluss des EMI-bedingten *Primings* (und somit des Milieu-Effektes) auf die Heilung besser beurteilt werden.

Von besonderem Interesse ist die Kombination der oben ausgeführten Interpretation der Versuche. Auf der einen Seite gibt es starke Indizien eines Autoantigen-spezifischen Prozesses. Die Herz- und med-LN-spezifische Akkumulation und Differenzierung zu Tregs der TCR-M in den WT-Mäusen und die erhaltene Herzfunktion in den DO11.10 Mäusen bieten belastbare Daten. Auf der anderen Seite wird eine Autoantigen-unabhängige EMI-Milieu-spezifische Funktion der TCR-M gesehen, welche entweder durch den EMI *per se*, durch den Transfer, durch Einbettung in ein Repertoire anderer T-Zell-Klone oder durch ihre quantitative Reduktion im Vergleich zu ihrem Aufkommen in den Spendertieren beeinflusst wird. Die Dauer der Exposition der TCR-M ggü. dem MYHCA₆₁₄₋₆₂₉ scheint dahingegen nicht für den Umschwung ihres Phänotypes von letal zu heilungsförderlich verantwortlich zu sein. In den Spendertieren setzte eine TCR-M mediierte AIM schon ab einem Alter von 6 Wochen ein (NINDL et al. 2012), in den siebenwöchigen Langzeitversuchen dieser Arbeit limitierte sich deren Aktivität aber selbstständig.

Als Schlussfolgerung sind bezüglich der eingangs gestellten Frage, ob die T-Zell-Aktivierung im EMI-Geschehen primär durch den AG-Kontakt oder durch das Zytokinmilieu bestimmt wird, beide Szenarien als komplementär und grundlegend beteiligt anzusehen. Demzufolge sind einzelne T-Zell-Klone antigenspezifisch für den Entzündungsverlauf von grundlegender Bedeutung. Es ist jedoch hochgradig reduktionistisch, die komplexe Dynamik der T-Zell-Reaktivität außerhalb des Wechselwirkungsnetzwerkes des restlichen Organismus, speziell anderer Leukozyten und deren Interleukine, zu betrachten.

Zwar wird Tag 7 häufig als Hochphase der Lymphozyten-medierten Heilungsphase im Herzinfarkt berichtet (YAN et al. 2013), doch wären mehr Zeitpunkte der Immunophänotypisierung begrüßenswert, um ein zeitlich höher aufgelöstes Bild der

Polarisationsvorgänge und zellulären Mechanismen zu erforschen. Mit Tag 7 und 49 wurden zumindest zwei typische Zeitpunkte des Heilungsvorganges abgebildet, doch insbesondere die Wechselwirkung mit M Φ an Tag 3 bis 5 und die Kommunikation der T-Zellen mit Myelofibroblasten in den Wochen/Monaten nach EMI stellen Themen für zukünftige Forschungsarbeiten dar, wozu diese Studie anzuregen hofft.

Ein tieferes Verständnis der Differenzierung zwischen physiologischer und pathogener gewebespezifischer Autoimmunität ist eine der zentralen Herausforderungen der aktuellen immunologischen Forschung. Prospektiv wäre damit die gezielte Beeinflussung der Heilungsvorgänge und die Verhinderung chronisch-aktiver Entzündungsvorgänge möglich, wie z.B. der Herzinsuffizienz, aber auch weiterer Entitäten, wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder Allergien. Diese Arbeit fügt ihren Anteil zu der Beweislage hinzu und untermauert die besondere Rolle der regulatorischen T-Zellen in Autoantigen-spezifischen Prozessen.

5.4. Vergleich der Tiermodelle

Die Eigenarten der verschiedenen Spezies bergen jeweils abhängig von der Fragestellung Stärken und Schwächen. Hunde und Meerschweinchen weisen eine hohe Variabilität in der kollateralen Gefäßversorgung auf und entsprechen damit Menschen mit stark ausgeprägter Kollateralisierung, was allerdings auch variable Infarktgrößen im EMI mit sich bringt (MAXWELL et al. 1987, YAMAMOTO et al. 1984). Zudem wurden Hunde v.a. in älteren Studien häufig als Modelltiere herangezogen, was eine breite Basis an historischen Daten darstellt. Schweine, Hunde und Kaninchen entwickeln bei der Auslösung des EMI häufig letale intraoperative Arrhythmien, zusätzlich beanspruchen die Eingriffe im Vergleich zur Maus deutlich mehr Zeit, was letztendlich zu einem geringeren Umsatz an operierten Tieren führt (KUMAR et al. 2016, LINDSEY et al. 2018).

In der kardiovaskulären Forschung ist die Maus ein häufig verwendetes Modelltier, gestützt durch eine Vielzahl an Publikationen und etablierten Methoden (LINDSEY et al. 2018, LINDSEY et al. 2018). Während größere Spezies, wie Schweine oder Hunde, eine zum Menschen vergleichbare Herzgröße und -schlagfrequenz aufweisen, überzeugen Mäuse durch die einfachere und günstige Beschaffung, Haltung und Manipulation. Allen voran steht aber die Verfügbarkeit einer Vielzahl genetisch modifizierter Mausstämmen und profunder molekularbiologischer Kenntnisse, wie z.B. über leukozytäre Oberflächenmarker (DOEVENDANS et al. 1998, IYER et al. 2013). Besonders zu echokardiographischen Untersuchungen post-EMI wird die Maus häufig herangezogen (GAO et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein 2012 von NINDL et al. beschriebenes transgenes Mausmodell gewählt. Ursprünglich zur Identifikation der zur AIM führenden Mechanismen entwickelt, weist dieser Mausstamm ein monoklonales TZR-Repertoire auf, welches selektiv auf das Polypeptidfragment MYHCA₆₁₄₋₆₂₉ reagiert. Zugleich weist es den kongenen Oberflächenmarker CD90.1 (Thymocyte antigen 1.1. / Thy1.1) auf, welche in Wildtyp-Zelltransferempfängertieren (CD90.2) die Identifikation der transgenen Zellen im FACS ermöglicht. Damit ist das Modell sowohl in seiner Antigenpezifität als auch der Nachweisbarkeit der transferierten Zellen den üblichen Modellen überlegen, in welchen polyklonale und syngene T-Zellkompartimente (meist Splenozyten) transferiert wurden (MAISEL et al. 1998) oder die untersuchten Tiere vorab mit KM in Adjuvans immunisiert wurden (MYERS et al. 2013, PUMMERER et al. 1996).

5.5. Vergleich der chirurgischen Modelle

Neben pharmakologischen Methoden der Myokardschädigung, wie durch Isoproterenol (RAMOS et al. 2012) oder Kryotrauma (HUI et al. 2017), existieren mehrere Modelle des embolischen EMI. Grundsätzlich kann man zwischen I/R- oder permanenter Okklusion des Herzkranzgefäßes unterscheiden. I/R-Modelle entsprechen einem in der Klinik rechtzeitig reperfundierten Infarkt. Ein aufgrund logistischer Probleme oder Kontraindikationen zu spät oder überhaupt nicht behandelter MI wird mittels permanenter Okklusion simuliert (GHARACHOULOU et al. 2010). Das Vorhandensein eines *Reperfusionsschadens* nach interventioneller Ballonangioplastie bei MI-Patienten und tierexperimenteller Daten aus I/R-Versuchen deuten an, dass hierbei immunologisch und pathophysiologisch unterschiedliche Prozesse ablaufen (HAUSENLOY et al. 2017, MATHES et al. 2016). In dieser Arbeit wurde die permanente Ligatur des Herzkranzgefäßes als Modell gewählt. Hauptgrund hierfür sind konstant reproduzierbare Infarktgrößen. Außerdem tritt vermutlich bei der I/R eine akute IgM-abhängige Aktivierung des Komplementsystems im gesamten reperfundierten Gebiet auf (ZHANG et al. 2006). Die Involvierung dieser natürlichen Antikörper in ischämischen Schädigungen wird an dieser Stelle zwecks der Fokussierung auf T-Lymphozyten vernachlässigt.

Zum einen bieten größere Spezies, wie Kaninchen oder Schweine, die Möglichkeit, mit einem Ballonkatheter retrograd über das arterielle Gefäßsystem in eine Herzkranzarterie vorzudringen und dort entweder über eine temporäre Ballonokklusion I/R-schäden zu verursachen oder über das Platzieren einer faserbesetzten Spirale (*thrombogenic coil*) das Gefäß permanent zu verschließen (EDWARDS et al. 2002). Die technische Machbarkeit setzt allerdings das Vorhandensein eines C-Bogens und Erfahrung in kathetergestützten

Interventionen voraus, dennoch bildet diese minimalinvasive Technik aufgrund der realitätsnahen Emboliesimulation mit geringen prozeduralen Verletzungen v.a. in Großtiermodellen den Goldstandard. Zum anderen bildet bei Nagern die Thorakotomie mit anschließender temporalen oder permanenten Ligatur des RIVA der *Arteria coronaria sinister* am offenen Herzen das Standardmodell, da keine Ballonkatheter dieser geringen Größe existieren (IYER et al. 2016, SALTO-TELLEZ et al. 2004, VIRAG und LUST 2011, YTREHUS 2000). Wenngleich in dieser Arbeit unter größtmöglicher Schonung des Gewebes und wenig traumatischer Präparation des Zuganges ohne häufig in der Literatur beschriebene Fraktur der Rippen durchgeführt, bildet die Thorakotomie nach wie vor einen größeren chirurgischen Eingriff. Dies hat unspezifische, sterile Entzündungsreize in den manipulierten Geweben unabhängig von dem EMI zur Folge, welche potentiell ein Hintergrundrauschen in den Messmethoden erzeugen. Dem wurde über sorgfältige peri- und postoperative Analgesie, postoperative Flüssigkeitssubstitution und schonendes Handling der Mäuse entgegengekommen. Die in unseren FACS-Untersuchungen praktisch nicht vorhandene Nachweisbarkeit einer Leukozyteninfiltration in Kontroll-OP-Herzen und somit fehlender traumatischer unspezifischer Entzündung untermauert die Eignung dieses Modells mit einer günstigen *signal to noise ratio*.

5.6. Belastungseinschätzung

Je nach Ausmaß des EMI stellt der Versuch für die Mäuse eine mittlere bis hohe Belastung dar (HENKE et al. 2015). Ein maßgeblicher Teil des Schmerzes wird durch die Thorakotomie und große EMI verursacht, kleine Infarkte ziehen dahingegen vergleichsweise geringe Schmerzen nach sich, ungefähr in gleichem Maße wie die Kontroll-OP (FALLER et al. 2015). Demzufolge sind peri- und postoperative Analgesie unabdingbar. In dieser Arbeitsgruppe konnte eine postoperative Mortalitätsreduktion von circa 30 % auf 5-10 % über eine von Tag 1-3 post-OP andauernde Buprenorphingabe erzielt werden. Das Belastungsscoring in den hier diskutierten Versuchsreihen rangierte in dem Großteil der Fälle im mittleren Referenzbereich, nur in Ausnahmefällen war die Euthanasie eines Versuchstieres notwendig. Sofern Mäuse verendeten, wiesen diese pathomorphologische Charakteristiken eines Linksherzversagens vor. Ventrikelrupturen traten nicht auf.

In den ersten 3 Tagen post-OP verloren die Versuchstiere ca. 5-10 % ihres Körpergewichtes, was entweder an dem Eingriff und der damit verbundene Belastung oder an Futteraufnahme reduzierenden Nebenwirkungen durch das Buprenorphin liegen könnte, was bei mehreren Spezies berichtet wird (JACOBSON 2000, OLIVER et al. 2018). Weiterhin wird der mit dem subkutanen Verabreichen der Analgesie verbundene Stress mit Gewichtsverlust in

Verbindung gebracht (JIRKOF et al. 2015). Für zukünftige Versuche ist eine orale Applikation des Buprenorphins über das Trinkwasser oder das Futter zu bevorzugen (KALLIOKOSKI et al. 2011, MOLINA-CIMADEVILA et al. 2014).

6. Zusammenfassung

Max Rieckmann

Autoantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen in ihrer kardioprotektiven Rolle nach Myokardinfarkt im Mausmodell

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im November 2018

59 Seiten, 13 Abbildungen, 187 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Myokardinfarkt, Autoimmunität, T-Zellen, Antigen-spezifität, Toleranz, Tregs, permanente Ligatur, EMI, Maus

Einleitung: Jeder sechste Mann und jede siebte Frau in der westlichen Welt werden am Myokardinfarkt und seinen Folgepathologien sterben. Nach einem Infarkt ist das Herz nicht fähig die nekrotisierten Kardiomyozyten zu regenerieren, es findet lediglich eine Defektheilung statt. Das entstehende Platzhaltergewebe besteht aus Bindegewebe und ist Ziel fortlaufender Heilungs- und Umbauprozesse. Ob diese in einer stabilen funktionalen Narbe oder in einem Herzwandaneurysma mit sich verschlechternder Herzfunktion enden, hängt im Wesentlichen von dem physiologischen Abschluss des Entzündungsprozesses ab. Den ersten Schritt der Heilung stellt die sterile Entzündung dar, welche durch Proteolyse und Phagozytose die strukturelle Grundlage für die Proliferation des Narbengewebes schafft. Doch auch in späteren Heilungsphasen steuern immunologische Prozesse den regenerativen Ablauf und kommen im besten Fall mit der Ausheilung der Narbe zum Erliegen. Es kann allerdings auch zu einem pathologischen Persistieren dieser Entzündungsantwort kommen, was meist zu einer chronischen Verschlechterung der Organfunktion führt. In welche Richtung sich diese Entzündungsantwort entwickelt, scheint maßgeblich von der Art der Reaktivität des adaptiven Immunsystems auf das ausheilende Gewebe abzuhängen.

Nachdem Autoimmunität lange Zeit nur in ihrem pathologischen Kontext untersucht wurde, zeigten mehrere Wundheilungsmodelle die notwendige Beteiligung des adaptiven Immunsystems für eine physiologische Regeneration. Dabei reagieren heilungsförderliche Lymphozyten auf gewebespezifische Autoantigene. Dies zeigte sich auch durch die Aktivierung regulatorischer T-Helfer-Zellen nach einem experimentellen Myokardinfarkt (EMI) in Mäusen, die ihrerseits myokardiale Entzündungsprozesse, Heilung und *Remodeling* positiv modulieren. Ein Autoantigen, welches in diesem Kontext diskutiert wird, ist das Kardiomyosin. Es wird ausschließlich herzrestriktiv exprimiert und ist in der Lage immunstimulierend zu wirken.

Ziele der Untersuchung: In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz der Antigenspezifität bezüglich Kardiomyosin in immunologischen Heilungsprozessen untersucht. Dabei wurde im Speziellen auf die Beeinflussung der T-Zell-Reaktivität durch das Milieu des infarzierten Herzens eingegangen.

Tiere, Material und Methoden: Es wurden Kardiomyosin-spezifische Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Helfer-Zellen (TCR-M) in gesunde Thy1.2⁺ Wildtyp-BALB/c- und transgene Do11.10-Empfängermäuse transferiert. Einen Tag später wurde durch die Ligatur eines Herzkranzgefäßes ein permanenter Infarkt ausgelöst. An Tag 7 *post operationem* wurden die Qualität des Heilungsvorganges und die Herzfunktion mittels Echokardiographie beurteilt. An Tag 7 und 49 *post operationem* wurden die Organe (Herz, Mediastinallymphknoten, Kniefaltenlymphknoten und Milz) entnommen und das T-Zellkompartiment, sowie dessen organspezifische Abundanz mittels Durchflusszytometrie und *Light-Sheet Fluorescence Microscopy* (LSFM) charakterisiert. Die Experimente wurden mit 3-23 Mäusen pro Gruppe jeweils 2-5 Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Für die statischen Analysen wurden die Mittelwerte der Variablen mittels ungepaarter t-Tests (Vergleich zweier Mittelwerte) oder *two-way ANOVA* gefolgt durch die Šidák Korrektur (Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten) verglichen. Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse: Durchflusszytometrie und LSFM Analysen stellten eine erhöhte Akkumulation und Aktivierung der TCR-M in Herzen infarzierter Mäuse zur Hochphase des Heilungsprozesses (Tag 7) im Vergleich zur *Sham*-Gruppe (Kontroll-operierte Mäusen ohne Infarkt) dar. Dieses Phänomen konnte nicht an anderen untersuchten Orten im Körper (Milz, Kniefaltenlymphknoten) festgestellt werden. In den Mediastinallymphknoten kam es sowohl unter Kontroll-, als auch Infarktbedingungen zu einer Akkumulation und Aktivierung der TCR-M, was auf konstitutiv ablaufende autoimmune Prozesse hindeutet. In der chronischen Heilungsphase (Tag 49) verteilte sich diese Zellpopulation gleichmäßig auf die untersuchten Organe, was für eine selbstlimitierende Autoreaktivität post-EMI der T-Zellen spricht. Bemerkenswerterweise differenzierten transferierte TCR-M, die in ihren Spendertieren pathogen wirken und eine letale Autoimmunmyokarditis auslösen, in infarzierten Mäusen zu regulatorischen T-Zellen. Dort agieren sie kardioprotektiv, was letztendlich zum Erhalt der echokardiographisch erhobenen Herzfunktionsparameter führte.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Evidenz für die ursächliche Rolle des herzspezifischen Antigens Kardiomyosin in der postinfarziellen T-Zell-Reaktivität. Weiterhin wird der determinierende Einfluss des Infarktkontextes unabhängig von Antigenspezifität demonstriert. Dieser polarisiert T-Helfer-Zellen in ihrer Funktion zu regulatorischen T-Zellen und führt zu einer protektiven und heilungsförderlichen Autoimmunantwort.

7. Summary

Max Rieckmann

Autoantigen-specific CD4⁺ T cells in their cardio-protective role after myocardial infarction in a mouse model

Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in November 2018

59 pages, 13 figures, 187 citations

Keywords: Myocardial infarction, Autoimmunity, T cell, Antigen specificity, Tolerance, Tregs, Permanent ligation, EMI, Mouse

Introduction: Every sixth man and seventh woman in the western world will die of myocardial infarction and its consequential pathologies. After infarction, cardiomyocytes have a negligible regenerative capacity, thus only defect healing takes place. The resulting scar is mainly composed of fibrotic tissue and is under constant healing- and remodeling-processes. Whether these result in a stable scar or in an ventricular aneurysm with deteriorating heart function, depends mainly on the physiological completion of the inflammatory process. The first step consists of a sterile inflammation, which provides the structural foundation for proliferation of the scar tissue by proteolysis and phagocytosis of the necrotic tissue. But also in later healing phases, immunological processes direct the regeneration and cease optimally at its final stage. However, there can be a pathological persistence of those inflammatory responses, which normally leads to a gradual impairment of the organ function. Hereby, the reactivity of the adaptive immune system crucially defines, which quality these inflammatory responses develop.

After autoimmunity has for a long time been investigated only in its pathological occurrence, several wound healing models showed the obligatory involvement of the adaptive immune system for a physiological regeneration, whereas lymphocytes foster healing by recognition of tissue specific auto-antigens. Recent studies revealed, that experimental myocardial infarction (EMI) triggers the activation of CD4⁺ T cells in mice, which in turn modulate myocardial inflammation, healing and remodeling. Cardiac myosin is one of the triggering auto-antigens, which have been discussed in this context. Its expression is restricted to the heart and it is capable of stimulating an immune response.

Aim of the investigation: The present study addressed the relevance of antigen specificity towards cardiac myosin in the immunological healing process, and how T cell responses are fine-tuned in the injured myocardium milieu.

Animals, material and methods: Cardiac-myosin-specific Thy1.1⁺ CD4⁺ T cells (TCR-M) were adoptively transferred into healthy Thy1.2⁺ wildtype BALB/c- and DO11.10-recipient mice one day prior to EMI induction by ligation of a coronary artery. At day 7 *post operationem* the quality of the healing process has been assessed by echocardiography. At day 7 and 49 *post operationem*, the organs (heart, mediastinal lymph node, subiliacal lymph node and spleen) were harvested and the T-cell compartment and its abundance were analyzed by flow cytometry and Light-Sheet Fluorescence Microscopy. The experiments were conducted containing 3-23 mice per group in 2-5 independent sessions. For statistical analyses, the mean values of the variables have been compared by unpaired t-tests (comparison of 2 values) or two-way ANOVA followed by Šidák-correction (comparison of more than 2 values). A probability value of $p < 0.05$ has been accepted as statistical significant.

Results: Flow cytometry and light-sheet fluorescent microscopy analyses showed that TCR-M cells accumulate and get activated in the hearts of infarcted, but not of sham-operated animals, at the peak of healing process (day 7), whereas no TCR-M accumulation was observed in other non-cardiac sites (spleen, subiliacal lymphnode). In mediastinal lymph nodes, both sham- and EMI-groups showed an accumulation and activation of TCR-M, which points to constitutive autoimmune processes at this site. Notably, TCR-M dispersed evenly over the analyzed organs at later chronic remodeling phase (day 49), indicating that post-EMI T cell auto-reactivity is self-limiting. Most strikingly, TCR-M cells, which are pathogenic and drive lethal myocarditis in their donors, differentiate into regulatory T cells and promote cardioprotection when transferred into EMI-recipients, leading to preserved functional parameters.

Conclusion: These results provide evidence that post-MI T cell responses are largely driven by responses to cardiac myosin as a heart-specific antigen. Furthermore, beyond specificity, the data reveal that the unique MI-milieu dictates the phenotypic polarization of specific CD4⁺ T cells, favoring the development of protective autoimmune responses, that benefit self-maintenance.

8. Literaturverzeichnis

1. Actor JK. T Lymphocytes: Ringleaders of Adaptive Immune Function. *Introductory Immunology*: Elsevier; 2014. p. 42 - 58.
2. Ali SR, Ranjbarvaziri S, Talkhabi M, Zhao P, Subat A, Hojjat A, et al. Developmental heterogeneity of cardiac fibroblasts does not predict pathological proliferation and activation. *Circ Res*. 2014;115(7):625-35.
3. Arpaia N, Green JA, Molteni B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell*. 2015;162(5):1078-89.
4. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(5):292-300.
5. Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*. 2000;6(10):1147-53.
6. Bansal SS, Ismahil MA, Goel M, Patel B, Hamid T, Rokosh G, et al. Activated T lymphocytes are essential drivers of pathological remodeling in ischemic heart failure. *Circulation: Heart Failure*. 2017;10(3).
7. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-1.
8. Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001;173(1):75-82.
9. Boag SE, Das R, Shmeleva EV, Bagnall A, Egred M, Howard N, et al. T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia / reperfusion injury in patients. 2015;125(8):1-14.
10. Bonner F, Borg N, Jacoby C, Temme S, Ding Z, Fogel U, et al. Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. *Circ Res*. 2013;113(3):301-12.
11. Borg N, Alter C, Gorltdt N, Jacoby C, Ding Z, Steckel B, et al. CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming. *Circulation*. 2017;136(3):297-313.
12. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.

13. Brede C, Friedrich M, Jordan-Garrote AL, Riedel SS, Bäuerlein CA, Heinze KG, et al. Mapping immune processes in intact tissues at cellular resolution. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(12):4439-46.
14. Bugiardini R, Manfrini O, De Ferrari GM. Unanswered questions for management of acute coronary syndrome: risk stratification of patients with minimal disease or normal findings on coronary angiography. *Arch Intern Med*. 2006;166(13):1391-5.
15. Burnet FM. The clonal selection theory of acquired immunity 1959.
16. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A Special Population of regulatory T Cells Potentiates muscle repair. *Cell*. 2013;155(6):1282-95.
17. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*. 2002;111(7):967-79.
18. Choo EH, Lee JH, Park EH, Park HE, Jung NC, Kim TH, et al. Infarcted Myocardium-Primed Dendritic Cells Improve Remodeling and Cardiac Function After Myocardial Infarction by Modulating the Regulatory T Cell and Macrophage Polarization. *Circulation*. 2017;135(15):1444-57.
19. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):339-45.
20. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. 2014;85(1):36-42.
21. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol*. 2017;47(10):1584-797.
22. Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:475-96.
23. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:206039.
24. 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.
25. Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res*. 1998;39(1):34-49.
26. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med*. 2016;22(2):210-6.

27. Driehuys S, Van Winkle TJ, Sammarco CD, Drobatz KJ. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *J Am Vet Med Assoc.* 1998;213(10):1444-8.
28. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-63.
29. Edwards R, Yousef Z, Rakhit R, Wright M, Rosenthal E, Redwood S, et al. A model of closed chest regional myocardial infarction in the rabbit: A clinically relevant in vivo assay system of post-infarction remodelling. *Basic Research in Cardiology.* 2002.
30. Elias D, Tikochinski Y, Frankel G, Cohen IR. Regulation of NOD mouse autoimmune diabetes by T cells that recognize a TCR CDR3 peptide. *Int Immunol.* 1999;11(6):957-66.
31. Eltzschig HK, Bonney SK, Eckle T. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors. *Trends Mol Med.* 2013;19(6):345-54.
32. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):117-29.
33. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;66(1):22-32.
34. Faller KM, McAndrew DJ, Schneider JE, Lygate CA. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. *Exp Physiol.* 2015;100(2):164-72.
35. Frangogiannis NG. Extracellular matrix proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev.* 2012;92(2):635-88.
36. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol.* 2015;5(4):1841-75.
37. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53(1):31-47.
38. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):474-81.
39. 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 Journal.* 2013;27(3):871-81.
40. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):566-77.
41. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2011;1:71-83.

42. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA. Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res.* 1995;76(5):907-14.
43. Gerber Y, Weston SA, Enriquez-Sarano M, Berardi C, Chamberlain AM, Manemann SM, et al. Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective. *Circ Heart Fail.* 2016;9(1):e002460.
44. Gharacholou SM, Alexander KP, Chen AY, Wang TY, Melloni C, Gibler WB, et al. Implications and reasons for the lack of use of reperfusion therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: findings from the CRUSADE initiative. *Am Heart J.* 2010;159(5):757-63.
45. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016;8(3).
46. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol.* 2017;15(1):53.
47. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389(6652):737-42.
48. Gruber AD, Peters M, Knieriem A, Wohlsein P. Atherosclerosis with multifocal myocardial infarction in a Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens* Illiger). *J Zoo Wildl Med.* 2002;33(2):139-44.
49. Guillen J. FELASA Guidelines and Recommendations. *J Am Assoc Lab Anim.* 2012;51(3):311-21.
50. Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 1998;8(3):459-74.
51. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-32.
52. Hausenloy DJ, Botker HE, Engstrom T, Erlinge D, Heusch G, Ibanez B, et al. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations. *Eur Heart J.* 2017;38(13):935-41.
53. 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.
54. Henke J, Haberstroh J, Sager M, Becker K, Eberspächer E, Bergadano A, et al. Positionspapier zu Schmerztherapie bei Versuchstieren. In: GV-SOLAS, editor. http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest_Analgesie/

Schmerztherapie_Mai2015pdf: Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT); 2015. p. 72.

55. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, et al. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res.* 2014;114(10):1611-22.
56. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2012;125(13):1652-63.
57. Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2015;116(2):354-67.
58. 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. *Eur Heart J.* 2017;38(3):187-97.
59. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity.* 2004;21(2):267-77.
60. Hui SP, Sheng DZ, Sugimoto K, Gonzalez-Rajal A, Nakagawa S, Hesselson D, et al. Zebrafish Regulatory T Cells Mediate Organ-Specific Regenerative Programs. *Developmental Cell.* 2017;43(6):659-72.e5.
61. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002;109(1):41-50.
62. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal.* 2018;39(2):119-77.
63. Iyer RP, de Castro Bras LE, Cannon PL, Ma Y, DeLeon-Pennell KY, Jung M, et al. Defining the sham environment for post-myocardial infarction studies in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311(3):H822-36.
64. Iyer SS, Latner DR, Zilliox MJ, McCausland M, Akondy RS, Penalzoza-Macmaster P, et al. Identification of novel markers for mouse CD4(+) T follicular helper cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(12):3219-32.
65. Jacobson C. Adverse effects on growth rates in rats caused by buprenorphine administration. *Lab Anim.* 2000;34(2):202-6.
66. Jerne NK. Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris).* 1974;125C(1-2):373-89.

67. Jirkof P, Tourvieille A, Cinelli P, Arras M. Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Lab Anim.* 2015;49(3):177-87.
68. Jones A, Bourque J, Kuehm L, Opejin A, Teague RM, Gross C, et al. Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity.* 2016;45(5):1066-77.
69. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-64.
70. 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.
71. Kallikourdis M, Martini E, Carullo P, Sardi C, Roselli G, Greco CM, et al. T cell costimulation blockade blunts pressure overload-induced heart failure. *Nat Commun.* 2017;8:14680.
72. Kalliokoski O, Jacobsen KR, Hau J, Abelson KS. Serum concentrations of buprenorphine after oral and parenteral administration in male mice. *Vet J.* 2011;187(2):251-4.
73. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1(3):167-78.
74. Keppner L, Heinrichs M, Rieckmann M, Demengeot J, Frantz S, Hofmann U, et al. Antibodies aggravate the development of ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018.
75. Kidd L, Stepien RL, Amrheiw DP. Clinical findings and coronary artery disease in dogs and cats with acute and subacute myocardial necrosis: 28 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2000;36(3):199-208.
76. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
77. Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, et al. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;76:221-30.
78. Langhorn R, Willesen JL. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med.* 2016;30(1):36-50.
79. Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, Lairez O, Tortosa F, Vinel C, et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. *Circulation.* 2014;129(21):2111-24.

80. Latet SC, Hoymans VY, Van Herck PL, Vrints CJ. The cellular immune system in the post-myocardial infarction repair process. *International Journal of Cardiology*. 2015;179:240-7.
81. Lee HM, Bautista JL, Scott-Browne J, Mohan JF, Hsieh CS. A broad range of self-reactivity drives thymic regulatory T cell selection to limit responses to self. *Immunity*. 2012;37(3):475-86.
82. 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.
83. Leger JOC, Bouvagnet P, Pau B, Roncucci R, Leger JJ. Levels of ventricular myosin fragments in human sera after myocardial infarction, determined with monoclonal antibodies to myosin heavy chains. *European Journal of Clinical Investigation*. 1985;15(6):422-9.
84. Levine AG, Arvey A, Jin W, Rudensky AY. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1070-8.
85. Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Jr., Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H812-H38.
86. Lindsey ML, Kassiri Z, Virag JAI, de Castro Bras LE, Scherrer-Crosbie M. Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H733-H52.
87. Lv H, Lipes MA. Role of Impaired Central Tolerance to α -Myosin in Inflammatory Heart Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2012;22(5):113-7.
88. Machida N, Aohagi Y, Yamaga Y, Shimada A, Umemura T, Kagota K. Myocardial infarction secondary to a disseminated coagulopathy in a cow. *Cornell Vet*. 1991;81(2):129-35.
89. Madi A, Shifrut E, Reich-Zeliger S, Gal H, Best K, Ndifon W, et al. T-cell receptor repertoires share a restricted set of public and abundant CDR3 sequences that are associated with self-related immunity. *Genome Res*. 2014;24(10):1603-12.
90. Maisel A, Cesario D, Baird S, Rehman J, Haghighi P, Carter S. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circulation Research*. 1998;82(4):458-63.
91. Malissen B, Bongrand P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:539-61.
92. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res*. 2011;108(9):1133-45.

93. Männ L, Kochupurakkal N, Martin C, Verjans E, Klingberg A, Sody S, et al. CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin. *European Journal of Immunology*. 2016;46(8):2028-42.
94. Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J*. 1996;15(10):2407-16.
95. Martini E, Stirparo GG, Kallikourdis M. Immunotherapy for cardiovascular disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018;103(3):493-500.
96. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):309-20.
97. Mathes D, Weirather J, Nordbeck P, Arias-Loza AP, Burkard M, Pachel C, et al. CD4+Foxp3+T-cells contribute to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2016;101:99-105.
98. Mathis D, Benoist C. *Aire*. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):287-312.
99. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1987;21(10):737-46.
100. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 2004;427(6970):154-9.
101. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*. 1999;5(1):49-55.
102. Molina-Cimadevila MJ, Segura S, Merino C, Ruiz-Reig N, Andres B, de Madaria E. Oral self-administration of buprenorphine in the diet for analgesia in mice. *Lab Anim*. 2014;48(3):216-24.
103. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-57.
104. Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:137-61.
105. Myers JM, Fairweather D, Huber SA, Cunningham MW. Autoimmune myocarditis, valvulitis, and cardiomyopathy. *Curr Protoc Immunol*. 2013;Chapter 15:Unit 15 4 1-51.
106. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45.
107. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.

108. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol.* 1987;139(11):3630-6.
109. Nevers T, Salvador AM, Grodecki-Pena A, Knapp A, Velázquez F, Aronovitz M, et al. Left ventricular t-cell recruitment contributes to the pathogenesis of heart failure. *Circulation: Heart Failure.* 2015;8(4):776-87.
110. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(3).
111. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94(12):1543-53.
112. Nikolich-Zugich J. Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories. *J Immunol.* 2014;193(6):2622-9.
113. Nindl V, Maier R, Ratering D, De Giuli R, Zust R, Thiel V, et al. Cooperation of Th1 and Th17 cells determines transition from autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur J Immunol.* 2012;42(9):2311-21.
114. Nunes-Silva V, Frantz S, Ramos GC. Lymphocytes at the Heart of Wound Healing. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:225-50.
115. O'Donohoe TJ, Schrale RG, Ketheesan N. The role of anti-myosin antibodies in perpetuating cardiac damage following myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2016;209:226-33.
116. Oliver VL, Thurston SE, Lofgren JL. Using Cageside Measures to Evaluate Analgesic Efficacy in Mice (*Mus musculus*) after Surgery. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2018;57(2):186-201.
117. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
118. Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 2006;25(2):249-59.
119. Pacholczyk R, Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells. *Immunology.* 2008;125(4):450-8.
120. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81(4):1161-72.
121. Pistner A, Belmonte S, Coulthard T, Blaxall B. Murine echocardiography and ultrasound imaging. *J Vis Exp.* 2010(42).
122. Polonsky M, Rimer J, Kern-Perets A, Zaretsky I, Miller S, Bornstein C, et al. Induction of CD4 T cell memory by local cellular collectivity. *Science.* 2018;360(6394).

123. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res.* 2016;119(1):91-112.
124. Pummerer C, NN. Identification of Cardiac Myosin Peptides Capable of Inducing Autoimmune Myocarditis in BALB/c Mice. *J Clin Invest.* 1996.
125. Pummerer CL, Luze K, Grassl G, Bachmaier K, Offner F, Burrell SK, et al. Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *J Clin Invest.* 1996;97(9):2057-62.
126. Ramos GC. Inflammation as an animal development phenomenon. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:983203.
127. Ramos GC, Dalbó S, Leite DP, Goldfeder E, Carvalho CR, Vaz NM, et al. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: Oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. *Autoimmunity.* 2012;45(3):233-44.
128. Ramos GC, Hofmann U, Frantz S. Myocardial fibrosis seen through the lenses of T-cell biology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2016;92:41-5.
129. Ramos GC, van den Berg A, Nunes-Silva V, Weirather J, Peters L, Burkard M, et al. Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114(12):E2420-E9.
130. Raposo C, Graubardt N, Cohen M, Eitan C, London A, Berkutzki T, et al. CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *J Neurosci.* 2014;34(31):10141-55.
131. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(1):71-9.
132. Reynolds HR, Srichai MB, Iqbal SN, Slater JN, Mancini GB, Feit F, et al. Mechanisms of myocardial infarction in women without angiographically obstructive coronary artery disease. *Circulation.* 2011;124(13):1414-25.
133. Roe MT, Harrington RA, Prosper DM, Pieper KS, Bhatt DL, Lincoff AM, et al. Clinical and therapeutic profile of patients presenting with acute coronary syndromes who do not have significant coronary artery disease. The Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy (PURSUIT) Trial Investigators. *Circulation.* 2000;102(10):1101-6.
134. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:419-66.
135. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of

- a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
136. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.
137. Salto-Tellez M, Lim SY, El Oakley RM, Tang TPL, Almsherqi ZAM, Lim SK. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovascular Pathology.* 2004.
138. Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* 2002;38:9-19.
139. Saxena A, Dobaczewski M, Rai V, Haque Z, Chen W, Li N, et al. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 2014;307(8):H1233-H42.
140. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):251-63.
141. Schmitt EG, Williams CB. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013;4:152.
142. Schulze B, Piehler D, Eschke M, Heyen L, Protschka M, Kohler G, et al. Therapeutic expansion of CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells limits allergic airway inflammation during pulmonary fungal infection. *Pathog Dis.* 2016;74(4):ftw020.
143. Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR. Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends in Neurosciences.* 1999;22(7):295-9.
144. Schwarzwald CC, Hardy J, Buccellato M. High cardiac troponin I serum concentration in a horse with multiform ventricular tachycardia and myocardial necrosis. *J Vet Intern Med.* 2003;17(3):364-8.
145. Sharapova TN, Ivanova OK, Prasolov VS, Romanova EA, Sashchenko LP, Yashin DV. Innate immunity protein Tag7 (PGRP-S) activates lymphocytes capable of FasL-Fas-dependent contact killing of virus-infected cells. *IUBMB Life.* 2017;69(12):971-7.
146. Shinde AV, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;70:74-82.
147. Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim.* 2018;52(2):135-41.
148. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol.* 1991;147(7):2141-7.
149. Smith SC, Allen PM. Expression of myosin-class II major histocompatibility complexes in the normal myocardium occurs before induction of autoimmune myocarditis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(19):9131-5.
150. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:591-619.
151. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76.
152. Sun D, Coleclough C, Whitaker JN. Nonactivated astrocytes downregulate T cell receptor expression and reduce antigen-specific proliferation and cytokine production of myelin basic protein (MBP)-reactive T cells. *J Neuroimmunol.* 1997;78(1-2):69-78.
153. Sun Y, Best K, Cinelli M, Heather JM, Reich-Zeliger S, Shifrut E, et al. Specificity, Privacy, and Degeneracy in the CD4 T Cell Receptor Repertoire Following Immunization. *Front Immunol.* 2017;8:430.
154. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009;325(5940):612-6.
155. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, et al. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell.* 2015;163(4):975-87.
156. Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, et al. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998;82(11):1130-8.
157. Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol.* 2005;78(2):319-24.
158. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(1):232.
159. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(16):1581-98.
160. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction, Jaffe AS, Apple FS, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation.* 2007;116(22):2634-53.
161. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
162. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:825-52.

163. Vagnozzi RJ, Molkentin JD, Houser SR. New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications. *Circ Res.* 2018;123(2):159-76.
164. van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(6):363-73.
165. Van der Borgh K, Lambrecht BN. Heart macrophages and dendritic cells in sickness and in health: A tale of a complicated marriage. *Cellular Immunology.* 2018.
166. Van der Borgh K, Scott CL, Nindl V, Bouche A, Martens L, Sichien D, et al. Myocardial Infarction Primes Autoreactive T Cells through Activation of Dendritic Cells. *Cell Rep.* 2017;18(12):3005-17.
167. Van Linthout S, Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res.* 2014;102(2):258-69.
168. Varela FJ, Coutinho A. Second generation immune networks. *Immunol Today.* 1991;12(5):159-66.
169. Vaz NM, Carvalho CR. On the origin of immunopathology. *Journal of Theoretical Biology.* 2015;375:61-70.
170. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):121-35.
171. Virag JA, Lust RM. Coronary artery ligation and intramyocardial injection in a murine model of infarction. *J Vis Exp.* 2011(52).
172. Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, Hau J, Wolfensohn S, Care JWGoV. Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim.* 2008;42(1):1-11.
173. Wang YP, Xie Y, Ma H, Su SA, Wang YD, Wang JA, et al. Regulatory T lymphocytes in myocardial infarction: A promising new therapeutic target. *Int J Cardiol.* 2016;203:923-8.
174. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, et al. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res.* 2014;115(1):55-67.
175. Wilson JL, Scheel KW. Myocardial infarction in dogs with acute and gradual occlusion of the circumflex or right coronary arteries. *Anat Rec.* 1982;204(2):113-22.
176. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11(1):7-13.
177. Yamamoto H, Tomoike H, Shimokawa H, Nabeyama S, Nakamura M. Development of collateral function with repetitive coronary occlusion in a canine model reduces myocardial reactive hyperemia in the absence of significant coronary stenosis. *Circ Res.* 1984;55(5):623-32.

178. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsubishi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:24-35.
179. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2000;101(9):1019-26.
180. Ytrehus K. The ischemic heart--experimental models. *Pharmacol Res.* 2000;42(3):193-203.
181. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol.* 2009;10(1):48-57.
182. Zacchigna S, Martinelli V, Moimas S, Colliva A, Anzini M, Nordio A, et al. Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction. *Nat Commun.* 2018;9(1):2432.
183. Zeng Z, Yu K, Chen L, Li W, Xiao H, Huang Z. Interleukin-2/Anti-Interleukin-2 Immune Complex Attenuates Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction through Expansion of Regulatory T Cells. *J Immunol Res.* 2016;2016:8493767.
184. Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell.* 1997;88(5):627-36.
185. Zhang M, Alicot EM, Chiu I, Li J, Verna N, Vorup-Jensen T, et al. Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *J Exp Med.* 2006;203(1):141-52.
186. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557-69.
187. Zimmerman SD, Thomas DP, Velleman SG, Li X, Hansen TR, McCormick RJ. Time course of collagen and decorin changes in rat cardiac and skeletal muscle post-MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(4):H1816-22.

9. Danksagung

An erster Stelle danke ich aufrichtig und voller Freundschaft Dr. Gustavo Ramos, welcher mir die Welt der Wissenschaft und Immunologie eröffnete, *mit* dem ich jeden Tag lernen durfte und mir das epistemologische Rüstzeug aneignete.

Mein herzlicher Dank gilt Professor Stefan Frantz und Professor Ulrich Hofmann, welche mir in dem Forschungslabor der Kardiologie des hallenser Universitätsklinikums hervorragende Möglichkeiten und Strukturen geboten haben, um zu einem Wissenschaftler heranzuwachsen. Die Selbstverständlichkeit einer normalen Anstellung, der Unterstützung aller Weiterbildungen und Kongressbesuche, und des herzlichen, respektvollen menschlichen Umganges sind bei weitem kein Standard und haben mir immer ein Gefühl der Zugehörigkeit vermittelt.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Gottfried Alber herzlich für seine Betreuung, Ratschläge und speziell für seinen besonderen Einsatz der schnellen Optimierung und Korrektur des Manuskriptes grippalen Hürden zum Trotz, sodass die Arbeit im optimalen Zeitrahmen abgeschlossen werden konnte.

Spezieller Dank gilt Herrn Professor Burkhard Ludewig (Kantonsspital St. Gallen, Schweiz), der uns freundlicherweise die TCR-M Mäuse zur Verfügung stellte und damit diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Weiterer Dank gilt Professorin Katrin G. Heinze, deren Labor für uns die Light-Sheet Fluorescence Microscopy Aufnahmen anfertigte, und dem hallenser Laborteam, Susanne Koch und Claudia Pilowski, für ihre Hilfe und tatkräftige Unterstützung. An dieser Stelle möchte ich besonders meinem Sportsfreund Alex Navarrete Santos für seine stete Hilfe beim FACSen und seine unermüdliche gute Laune danken, „nothing to compensate“.

Ich danke Gottfried Alber, Vera, Gustavo, Uli, Robert, Daniel, Claudia, Berna und meinem Vater für fleißiges Korrekturlesen, was eine immunologische Arbeit auch für den Rest der Welt verständlich werden ließ.

Professor Bernhard Hiebl danke ich herzlich für steten Beistand und Beratung bezüglich versuchstierkundlicher Fragen, effiziente Unterstützung der Forschung und die Bereitschaft, für diese Arbeit ein Gutachten zu erstellen.

Abschließend danke ich vor allem meiner Liebe Vera, die mir das Leben erfüllt und meine Kraft gibt.