

Die Rolle der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) bei der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt in der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Désirée Borg aus Herdecke

Düsseldorf, Dezember 2013

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jürgen Schrader Korreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2014

Zusammenfassung

Nach wie vor zählt der Herzinfarkt zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Auslöser ist dabei der plötzliche Verschluss eines der Herzkranzgefäße, wodurch das nachgeschaltete Gewebe nicht mehr mit Blut versorgt wird und abstirbt. Als Folge wandern Immunzellen in das geschädigte Areal ein und initiieren eine Reihe von reparativen Mechanismen, die schließlich die Bildung einer stabilen Infarktnarbe bewirken.

Eine Gruppe von Signalmolekülen mit immunmodulatorischer Funktion sind extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside, deren Konzentration durch ein komplexes System von Kanälen, Transportern und Ektoenzymen reguliert wird. Innerhalb dieses purinergen Signalsystems kommt insbesondere der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) ein wichtige Rolle zu, da dass von ihr gebildete Adenosin eine hemmende Wirkung auf eine Vielzahl von inflammatorischen Prozessen hat. Der Einfluss der CD73 auf die Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt wurde bislang noch nicht untersucht und sollte in dieser Arbeit am Ischämie/Reperfusions (I/R)-Modell in der Maus im Detail charakterisiert werden.

- Es wurde zunächst eine Methode entwickelt und validiert, mit der es erstmalig möglich ist, residente Immunzellen aus dem Herzgewebe effektiv zu isolieren. Dabei zeigte sich, dass bereits im gesunden Mäuseherz 2.3±0.9·10³ Leukozyten/mg Herzgewebe enthalten sind, wobei der größte Teil aus myeloischen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) besteht.
- Durchflusszytometrische Messungen zeigten, dass CD73 im gesunden Herzen hauptsächlich auf T-Zellen vorkommt. Dagegen wird die CD39 (die ATP zu AMP hydrolysiert, dem Substrat der CD73) im hohen Maße auf myeloischen Zellen exprimiert. Drei Tage nach I/R steigt das CD73-Expressionsniveau insbesondere auf Granulozyten (~2.8-fach) und T-Zellen (~1.3-fach) signifikant an. Während im gesunden Herzen auf die Gesamtmasse bezogen die koronaren Endothelzellen 90% aller CD73-exprimierenden Zellen bilden, machen Leukozyten 3 Tage nach I/R etwa 2/3 der gesamten CD73⁺-Zellen aus.
- Mittels Genexpressionsanalysen konnte erstmals ein umfassender Überblick über die Expression aller wesentlichen purinergen Rezeptoren, Transporter und weiterer Ektoenzyme an Immunzellen aus dem Blut und dem Herzen gewonnen werden. Dabei zeigte sich, dass der A_{2B}-Adenosinrezeptor erst im Herzen nach I/R exprimiert wird, während er auf den entsprechenden Immunzellen im Blut nicht bzw. kaum vorkommt.
- Global CD73-defiziente Mäuse zeigen nach I/R eine deutlich eingeschränkte Pumpleistung im Vergleich zu Kontrolltieren (Ejektionsfraktion: 38±7% vs. 53±3%, 28 Tage nach I/R). Die funktionelle Beeinträchtigung geht mit der Persistenz von Immunzellen im Herzen, einem pro-inflammatorischen Phänotyp eingewanderter Monozyten und APCs sowie einer erhöhten Expression von entzündungsfördernden Zytokinen im Herzgewebe einher.
- T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse weisen nach I/R ähnliche funktionelle Einschränkungen auf wie global CD73-defiziente Tiere. In beiden Genotypen kam es darüber hinaus zur Bildung einer unreifen, instabilen Narbe in der Infarktregion.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass CD73 nach Infarkt auf eingewanderten T-Zellen und Granulozyten hochreguliert wird und das Herz damit vor einer unkontrollierten Entzündungsreaktion schützt. Das von der CD73 auf T-Zellen gebildete Adenosin ist demzufolge ein wichtiger Modulator der Wundheilung nach Herzinfarkt.

Summary

Myocardial infarction is still one of the leading causes of death in the industrial nations. It is usually caused by sudden occlusion of a coronary artery resulting in inadequate blood supply and hence in death of cardiac tissue. As a consequence, immune cells infiltrate into the affected area and initiate reparative mechanisms finally leading to the formation of a stable infarct scar.

A group of signalling molecules with immunomodulatory properties are extracellular nucleotides and nucleosides, whose concentrations are regulated by a complex system of channels, transporters, and ectoenzymes. Within this purinergic signalling system, the ecto-5'-nucleotidase (CD73) is known to play an important role, since CD73-generated adenosine mediates suppressive effects on multiple inflammatory processes. The impact of CD73 on the inflammatory reaction after myocardial infarction has not yet been investigated. Therefore, the present study aimed to characterize in detail the role of CD73-mediated inflammation in a mouse model of ischemia/reperfusion (I/R).

- A method was elaborated and validated which enabled for the first time the effective isolation of resident immune cells from cardiac tissue. It could be shown that the healthy, unstressed heart contained $2.3\pm0.9\cdot10^3$ leukocytes/mg heart tissue, the most prominent fraction being myeloid antigen-presenting cells (APCs).
- Flow cytometry analysis revealed that CD73 in the healthy heart was mainly expressed on T cells, whereas the ectonucleotidase CD39 (which hydrolyses ATP to AMP, the substrate of CD73) was found in high levels on myeloid cells. Three days after I/R, CD73 expression levels significantly increase on granulocytes (~2.8 fold) and T cells (~1.3 fold). While in the healthy heart coronary endothelial cells account for 90% of the CD73 expressing cells, 3 days after I/R CD73 associated with leukocytes comprised 2/3 of the total cardiac CD73.
- Gene expression analysis provided a fist comprehensive overview on the expression of various purinergic receptors, transporters and additional ectoenzymes on immune cells from blood and heart. It was shown, that the adenosine A_{2B} receptor was first expressed in the heart after I/R, while almost no expression was found on respective immune cells in the blood.
- Cardiac function of global CD73-deficient mice more severely declined after I/R compared with wildtype controls (ejection fraction: 38±7% vs. 53±3%, 28 days after I/R). The functional impairment was accompanied by the persistence of immune cells in the heart, a pro-inflammatory phenotype of infiltrating monocytes and APCs, and an increased expression of pro-inflammatory cytokines in cardiac tissue.
- Functional impairment as observed in CD73^{-/-} mice was found to be similar in magnitude in T cell specific CD73^{-/-} mice. In both genotypes, an immature scar formation was observed in the infarct area.

The findings provide evidence, that CD73 is upregulated on cardiac granulocytes and T cells after myocardial infarction, thereby protecting the heart from an uncontrolled inflammatory response. Thus, adenosine formed by CD73 on T cells plays an important role in the healing process after myocardial infarction.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Florian Bönner*, Nadine Borg*, Sandra Burghoff, Jürgen Schrader (2012)

Resident Cardiac Immune Cells and Expression of the Ectonucleotidase Enzymes CD39 and CD73 after Ischemic Injury

PLoS One, 7, e34730 (* equally contributing authors)

Florian Bönner, Nadine Borg, Christoph Jacoby, Sebastian Temme, Zhaoping Ding, Ulrich Flögel, Jürgen Schrader (2013)

Ecto-5'-Nucleotidase on Immune Cells Protects From Adverse Cardiac Remodeling *Circ Res*, **113**, 301-312

Weitere Publikationen:

Ulrich Flögel, Sandra Burghoff, Peter L. E. M. van Lent, Sebastian Temme, Lisa Galbarz, Zhaoping Ding, Ali El-Tayeb, Sandra Huels, Florian Bönner, Nadine Borg, Christoph Jacoby, Christa E. Müller, Wim B. van den Berg, Jürgen Schrader (2012) Selective Activation of Adenosine A_{2A} Receptors on Immune Cells by a CD73-Dependent Prodrug Suppresses Joint Inflammation in Experimental Rheumatoid Arthritis *Sci Transl Med*, **4**, 146ra108

Christoph Jacoby, Nadine Borg, Philipp Heusch, Martina Sauter, Florian Bönner, Reinhard Kandolf, Karin Klingel, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel (2013) Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by ¹⁹F MRI in vivo *MAGMA*, [Epub ahead of print]

Sebastian Temme, Christoph Jacoby, Zhaoping Ding, Florian Bönner, Nadine Borg, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel (2013)

Technical Advance: Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive ¹⁹F MRI *Journal of Leukocyte Biology*, jlb-0113032, [Epub ahead of print]

Abkürzungsverzeichnis

A_1R	Adenosinrezeptor 1
A _{2A} R	Adenosinrezeptor 2A
A _{2B} R	Adenosinrezeptor 2B
A ₃ R	Adenosinrezeptor 3
ABC	antibody binding capacities, Antikörperbindestellen
ADA	Adenosin-Desaminase
ADK	Adenosin-Kinase
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
ALP	alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
APC (Fluorophor)	Allophycocyanin
APCs	antigenpräsentierende Zellen
ART	ADP-Ribosyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units
AZ	Adenvlatzyklase
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
cADPR	zvklische ADP-Ribose
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNT	konzentrativer Nukleosidtransporter
Ct	cycle threshold
Cx	Connexin
CX3CL1	Chemokin (mit C-X3-C Motiv) Ligand 1
Cv	Cvanin-Farbstoff
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4' 6-Diamidin-?'-nhenvlindol-dihvdrochlorid
DC	dendritische Zelle
diu	durchschnittlicher Wanddurchmesser des linken Ventrikels
FDV	enddiastolisches Volumen
EF	Fiektionsfraktion
EKG	Flektrokardiogramm
FLISA	enzyme linked immunosorbent assay
FNPP	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterase
ENT	äguilibrativer Nukleosidtransporter
FSV	endsystolisches Volumen
EACS	fluorescence activated cell sorting Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocvanat
flox	flanked by lorP
HOX Foxn3	forkhard hor Protein 3
FS	fractional shortoning fraktionelle Verbürzung
GPCR	G-Protein-gekonnelter Rezentor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G Protein	Guaninnuklaatid hindandas Protain
	Hank's Ralanced Salt Solution
прээ	11unk s Dalancea sall solullon

HPLC	high performance liquid chromatography
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN	Interferon
IL-	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i> , linke Koronararterie
LVM	linksventrikuläre Masse
Ly6c	Lymphozytenantigen 6c
Ly6g	Lymphozytenantigen 6g
MACS	magnetic cell separation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1
MEI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger Rihonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
n d	nicht detektierbar
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-vR	nukleärer Faktor <i>v</i> B
NKn46	natural killer cell n46-related protein
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NTPDasen	Nukleosid-Trinhosnhat-Dinhosnhohydrolasen
P7X	Nukleotid-Rezentor P2X
P2V	Nukleotid-Rezentor P2V
Dany	Pannevin
DRS	nhosnhatgenufferte Salzlösung
DCP	Polymerasekettenreaktion
DE	Dhycoerythrin
I L DerCD	Peridinin-Chlorophyll
DI C	Phospholipase C
T LC DND	Purin Nuklaasid Phasmhorylasa
aDT DCD	quantitative real time DCP
QKI-FCK DANTES	regulated on activation normal T call expressed and secreted
RANIES	region of interest
ROS	region of interest
RUS PT	Paumtemperatur
SD	Standardabweichung
SD	side seatter
SU	Schlagvolumen
J V TCE	transforming growth factor
	tissue nonspecifie alkaline phosphatase
TNE	Tumornakrosofaktor
Trag	regulatorische T. Zellen
LIDD	Uridindinhosphot
	Uridintrinhosphat
VECE	Unununphospilat vaslaulärar andathalialar Waahatumafaltar
V EUF WT	vaskulatet enuomenalet wächstumstäktör Wildtym
	w natyp
u-SIVIA	u-smooth muscle actin

Inhaltsverzeichnis

Zu	samı	nenfassu	ng	I
Su	mma	ry		II
Pu	blika	tionen		III
Ab	kürz	ungsverz	zeichnis	IV
Inł	haltsy	verzeichn	js	VI
1	Ein	leitung		1
1	1.1	Der Herz	zinfarkt	1
1	.2	Die Wun	dheilung nach Herzinfarkt	2
		1.2.1	Phase 1: Ischämische Kardiomvozytenschädigung	
		1.2.2	Phase 2: Entzündungsreaktion	5
		1.2.3	Phase 3: Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen	8
		1.2.4	Phase 4: Ausreifung der Infarktnarbe	9
		1.2.5	Regulation der Immunantwort nach Herzinfarkt	10
1	.3	Das puri	nerge Signalsystem	11
		131	Freisetzung von Nukleotiden	12
		1.3.1	Nukleotid-Rezentoren (P2-Rezentoren)	13
		133	Extrazellulärer Nukleotidabbau durch Ektoenzyme	15
		1.3.3.1	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase CD39	15
		1.3.3.2	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (ENPPs)	16
		1.3.3.3	CD38 und CD157	16
		1.3.3.4	ADP-Ribosyltransferasen (ART)	17
		1.3.4	CD73 – ein Schlüsselenzym bei der Bildung von	
			extrazellulärem Adenosin	17
		1.3.5	Adenosinrezeptoren und ihre Funktionen	18
		1.3.5.1	A ₁ -Rezeptor (A ₁ R)	19
		1.3.5.2	A_{2A} -Rezeptor $(A_{2A}R)$	20
		1.3.5.3	A_{2B} -Rezeptor ($A_{2B}R$)	20
		1.3.5.4	A ₃ -Rezeptor (A ₃ R)	21
		1.3.6	Adenosinabbau und -aufnahme in die Zelle	21
1	.4	Zielsetzu	ing	23
2	Ma	terial		24
- ~	171a		nd Annorotypon	T-2
4	2.1	Chomilto	lion Engume und Verbrauchemeterialion	24
4	2.2	Antikörn		23
4	2.3 D	тааМар	- <u>A</u> seave	23 76
2	2.4	Software	-ASSays	20
2		Southard	·	41
3	Me	thoden		28
3	3.1	Versuchs	stiere und Haltungsbedingungen	28
				X 7 X

	3.1.1	Global und T-zellspezifische CD73 ^{-/-} Mäuse	28
3.2	Zellisoli	erung	30
	3.2.1	Isolierung von Zellen aus dem Mäuseherz (Protokoll 1)	30
	3.2.2	Isolierung von Zellen aus dem Herzen (Protokoll 2)	31
	3.2.3	Isolierung von Zellen aus dem Blut	32
3.3	Durchflu	usszytometrische Zellanalyse	32
	3.3.1	Bestimmung von Oberflächenmolekülen	33
	3.3.2	Intrazelluläre Färbung von Foxp3	33
	3.3.3	Analyse und Auswertung durchflusszytometrischer Daten	34
	3.3.4	Quantifizierung der Antigendichte auf der Zelloberfläche	35
3.4	Untersu	chung des Einflusses der Kollagenase-Behandlung auf die	2.5
	Ektoenz	zym-Expression	35
3.5	Zellsortı	erung	36
	3.5.1	Dichtegradientenzentrifugation	36
	3.5.2	Magnetische Zellsortierung (MACS)	37
2.6	5.5.5 C	Durchnusszytometrische Zensortierung (FACS)	37
3.6	Genexp	DNA L 1	39
	3.6.1	RNA-Isolierung	40
	3.6.3	Quantitative real-time PCR (aRT-PCR)	40 41
	3.6.4	Quantifizierung der mRNA-Expression von CD45	
37	Zvtokini	messungen	43
017	371	Gewinnung von Blutplasma und Präparation der Herzen	43
	3.7.2	Isolierung von zytoplasmatischen Proteinen aus dem	15
		Herzgewebe	44
	3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)	44
	3.7.4	Zytokinmessung mittels <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	45
	3.7.5	Zytokinmessung mittels Bio-Plex-System	45
3.8	Induktio	n des Herzinfarkts (Ischämie/Reperfusions-Modell)	46
3.9	¹ H-Mag	netresonanztomographie (MRT)	47
	3.9.1	MRT-Messung	48
	3.9.2	Bestimmung morphologischer und funktioneller Parameter	49
	3.9.3	Wandbewegungsanalyse	50
3.10	Histolog	yie	52
	3.10.1	Siriusrot-Färbung	52
	3.10.2	Bestimmung von Kollagen I und III mittels	
		Polarisationsmikroskopie	52
3.11	Statistik		54
4 Ero	gebnisse		
· •••	Resident	te Immunzellen im Herzen der Maus	
+.1 1 0	Everage	ion von CD72 und CD20 auf regidenten kerdielen Immungeller	33
4.2	Express	ion von CD/5 und CD59 auf residenten kardialen immunzellen	39

4.3	Immunz Myokar	ellinfiltration und Expression der Ektonukleotidasen im Herzen nac dinfarkt	h 62	
4.4	Expressi	ion von CD73 und CD39 auf nicht-Immunzellen im Herzen und Blut.	66	
4.5	Expressi	ion von CD73 und CD39 auf Immunzellen 14 Tage nach I/R	68	
4.6	6 Ouantita	Ouantitative Analyse verschiedener Gene des purinergen Systems		
47	Die funk	tionelle Rolle der CD73 im Heilungsprozess nach I/R	77	
,	471	Die Herzfunktion von CD73 ^{$-/- Mäusen nach I/R$}		
	4.7.2	Ouantitative und qualitative Analyse der Immunzellinfiltration		
		in CD73 ^{-/-} -Mäusen nach Herzinfarkt	78	
	4.7.3	Zytokinspiegel im Herzen und Serum nach I/R	85	
	4.7.4	Der Heilungsprozess in T-zellspezifischen CD73 ^{-/-} -Mäusen	88	
	4.7.4.1	Charakterisierung der T-zellspezifischen CD73 ^{-/-} -Mäuse	88	
	4.7.4.2	Die Herzfunktion von T-zellspezifischen CD73 ^{-/-} Mäusen nach I/F	t 90	
	4.7.4.3	Qualitative Analyse des Narbengewebes nach I/R	96	
5]	Diskussion .		98	
5.1	Resident	te Immunzellen im gesunden Mäuseherzen	98	
	5.1.1	Isolation von Immunzellen aus dem Herzen	98	
	5.1.2	Funktion der residenten Immunzellen	101	
5.2	Das puri	nerge Signalsystem im gesundem Herzen	103	
	5.2.1	Die Freisetzung von Nukleotiden aus der Zelle	103	
	5.2.2	P2-Rezeptoren	104	
	5.2.3	Abbau von extrazellulären Nukleotiden zu Adenosin	105	
	5.2.4	Adenosinrezeptoren, -abbau und -transport	108	
5.3	Das puri	nerge Signalsystem im Herzen nach I/R	109	
	5.3.1	CD73 wird nach Infarkt insbesondere auf Granulozyten und T- Zellen hochreguliert	110	
	5.3.2	Der A_{2B} -Rezeptor auf Leukozyten im Herzen nach I/R.	111	
	5.3.3	Die Regulation von CD39 auf APCs und Endothelzellen	113	
	5.3.4	ATP-Transporter, -Rezeptoren und Nukleotid-abbauende		
		Ektoenzyme nach I/R auf Granulozyten	113	
	5.3.5	Regulation des P2X7-Rezeptors sowie NAD ⁺ -abbauender		
		Enzyme nach I/R in kardialen APCs	116	
	5.3.6	Zusammenfassende Darstellung des extrazellulären Purin- Stoffwechsels im Herzen nach I/R	117	
54	Die Roll	e der CD73 im Heilungsprozess nach Herzinfarkt	121	
5.7	5 4 1	Die Modulation der Entzündungsreaktion nach I/R durch CD73	121	
	542	CD73 auf T-Zellen ist ein wichtiger Modulator der	121	
	0	Wundheilung nach Herzinfarkt	126	
6 ¹	Literaturve	rzeichnis	129	
7 1	Danksagun	σ		
 8	Eidesstattli	s che Erklärung		

Einleitung

1.1 Der Herzinfarkt

Das Herz ist ein muskulöses Hohlorgan, das durch rhythmische Kontraktionen Blut durch den gesamten Körper pumpt und so alle Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen beliefert. Um diese enorme Leistung zu vollbringen, muss der Herzmuskel selbst ausreichend mit Blut versorgt werden. Dies erfolgt über die Koronararterien, die direkt oberhalb der Aortenklappe entspringen, sich kranzförmig um das gesamte Herz legen und sich in der Peripherie immer weiter verästeln (Abbildung 1A). Entsprechend ist das Myokard stark kapillarisiert, so dass Sauerstoff und Nährstoffe nur geringe Diffusionsstrecken überwinden müssen und eine stetige Versorgung der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) gewährleistet ist [1]. Kommt es aber zu einer Verengung oder gar zum kompletten Verschluss eines der Koronargefäße, wird das nachgeschaltete Versorgungsgebiet nur noch unzureichend bzw. gar nicht mehr durchblutet (Ischämie). Das Herzmuskelgewebe in dem betroffenen Areal stirbt infolge des Sauerstoffmangels ab und es kommt zum Herzinfarkt [2].

Die häufigste Ursache für einen koronaren Gefäßverschluss ist eine fortgeschrittene Arteriosklerose, die mit einer chronischen Entzündung der Gefäßwand einhergeht. Bei dieser Krankheit akkumulieren Lipide, Immunzellen, glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix infolge einer primären endothelialen Dysfunktion. Letztlich kommt es zu einer Einengung des Gefäßlumens, was den Blutfluss kritisch einschränkt [3]. Entzündungsprozesse innerhalb dieser arteriosklerotischen Läsion können den gesamten Plaque destabilisieren, so dass seine dünne fibröse Kappe reißt [4]. Dadurch wird ein sogenannter thrombogener Kern freigelegt und kommt mit vorbeiströmendem Blut in Kontakt. Als Folge bildet sich ein Thrombus, der die gesamte Koronararterie verschließen kann und folglich zum Herzinfarkt führt [3].

Seit Jahren belegen ischämische Herzkrankheiten den ersten Platz auf der Liste der häufigsten Todesursachen weltweit [5]. In Deutschland verursachen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, darunter auch der Myokardinfarkt, mehr Todesfälle und Kosten als jede andere Krankheit [6,7]. Die anhaltend hohe Sterbeziffer ist umso bemerkenswerter, da in den letzten 40 Jahren gute Fortschritte bei der Behandlung des akuten Herzinfarkts erzielt wurden [8]. So konnte die Überlebensrate insbesondere durch eine frühzeitige Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes (Reperfusion) deutlich gesteigert werden [9]. Allerdings besteht dabei die Gefahr, dass der entstandene Gewebeschaden und der Verlust von kontraktilen Herzmuskelzellen zu einer dauerhaften Leistungseinschränkung des Herzens führen [10,11]. Obwohl immer mehr

Patienten die akute Phase nach Infarkt überleben, nimmt die Häufigkeit einer Infarktbedingten Herzinsuffizienz zu [11,12]. Das Ausmaß der funktionellen Einschränkung ist dabei stark vom Heilungsverlauf nach Infarkt abhängig [13,14]. Wie nachfolgend erläutert, umfasst die myokardiale Heilung mehrere Prozesse, die nahtlos ineinander übergehen und im Idealfall zu einer stabilen Infarktnarbe und Erhalt einer möglichst hohen Kontraktilität des Herzens führen.

1.2 Die Wundheilung nach Herzinfarkt

Die Wundheilung nach Infarkt kann in vier Phasen unterteilt werden (Abbildung 1B) [15]. Unmittelbar nach Verschluss der Koronararterie kommt es zum Ischämie-bedingten Zelluntergang von Kardiomyozyten innerhalb des koronaren Versorgungsgebietes (Phase 1). Die nekrotischen Herzmuskelzellen setzen intrazelluläre pro-inflammatorische und chemoattraktive Moleküle frei und lösen somit eine Entzündungsreaktion aus. Nachfolgend wandern Immunzellen in das geschädigte Myokardgewebe ein und entfernen tote Zellen sowie Matrixdebris (Phase 2). In der darauffolgenden Proliferationsphase sezernieren aktivierte Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wodurch einerseits akute Entzündungsprozesse gehemmt und andererseits Fibroblasten sowie Endothelzellen zur Proliferation angeregt werden. Dies führt zum Um- und Neuaufbau der extrazellulären Matrix sowie zur Bildung von neuen Blutgefäßen (Phase 3). In den nachfolgenden Wochen bildet sich schließlich eine kollagenreiche, stabile Infarktnarbe aus (Phase 4) [15,16].

1.2.1 Phase 1: Ischämische Kardiomyozytenschädigung

Herzmuskelzellen benötigen ständig Sauerstoff, um über oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien genügend Energie für die Zellhomöostase und die Kontraktion zu bilden [17,18]. Werden Kardiomyozyten aufgrund des Verschlusses einer Koronararterie nicht mehr mit Blut versorgt, fehlt Sauerstoff für die Atmungskette und die mitochondriale Bildung von ATP kommt zum Erliegen [19]. Die rasche Ischämie-bedingte Abnahme der zellulären ATP-Konzentration stimuliert jedoch einen anderen Stoffwechselweg zur Energiegewinnung: die anaerobe Glykolyse [20,21]. Allerdings kann dieser Mechanismus die aerobe Energieproduktion nur unzureichend kompensieren, da die ATP-Ausbeute vergleichsweise gering ist und wichtige Enzyme der anaeroben Glykolyse bereits wenige Minuten nach Beginn einer Ischämie durch anfallende Stoffwechselprodukte gehemmt werden [22-24].



Abbildung 1: Die Heilung nach Herzinfarkt. (A) Skizze des Herzens einschließlich eines Gefäßverschlusses der linken Koronararterie auf Grund einer arteriosklerotischen Läsion. (B) Histologische und schematische Darstellung des gesunden Herzens und der verschiedenen Heilungsphasen nach Infarkt. Links: Querschnitt durch das gesamte Herz einer Maus, Mitte: Infarktbereich des menschlichen Herzens in 200-facher Vergrößerung, Rechts: schematische Darstellung der wichtigsten Prozesse der verschiedenen Heilungsphasen. Unmittelbar

nach Verschluss einer Koronararterie werden Kardiomyozyten (KM) nekrotisch oder apoptotisch (Phase 1). Immunzellen, wie Granulozyten und inflammatorische Monozyten infiltrieren das infarzierte Myokardgewebe und entfernen tote Zellen und Debris (Phase 2). In der anschließenden Proliferationsphase wandern reparative Monozyten ein und sezernieren zusammen mit Makrophagen anti-inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine. Es entstehen neue Blutgefäße und Fibroblasten bauen eine neue extrazelluläre Matrix auf (Phase 3). Schließlich bildet sich eine kollagenreiche Narbe (Phase 4). Modifiziert nach [16,25-27].

Folglich führt eine länger anhaltende Ischämie zu einer kontinuierlichen Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration [28]. Die reduzierte Energieversorgung und die Anhäufung von anaeroben Stoffwechselprodukten aufgrund des gestörten Blutflusses führen zu Veränderungen des zytosolischen Ionenhaushaltes und schließlich zum Zelltod [28]. Diese zellschädigenden Prozesse beginnen unmittelbar nach Einsetzen der Ischämie mit dem Absinken des intrazellulären pH-Wertes durch Akkumulation von Laktat und Protonen, die aus der Glykolyse bzw. ATP-Hydrolyse entstehen [29,30]. Um der Übersäuerung der Kardiomyozyten entgegenzuwirken, werden Protonen über den Na⁺/H⁺-Austauscher aus der Zelle heraus transportiert [31]. Die ansteigende intrazelluläre Na²⁺-Konzentration bewirkt wiederum eine Aktivierung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschmechanismus, wodurch Na²⁺ aus der Zelle geschleust wird und Ca²⁺ einströmt [31-33]. Der Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt zur Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen Proteasen, die den Zelluntergang durch den Abbau von wichtigen Proteinen des Zytoskeletts, des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien einleiten [34-37].

Wird der Blutfluss nicht wiederhergestellt, stirbt das unterversorgte Gewebe zwangsläufig ab. Durch eine frühzeitige Öffnung der verschlossenen Koronararterie kann das ischämische Herzareal wieder mit dem für die ATP-Bildung benötigten Sauerstoff und Substraten versorgt werden, Stoffwechselprodukte wie H⁺ werden abtransportiert und der extrazelluläre pH-Wert normalisiert sich [38]. Eine frühzeitige Reperfusion reduziert daher eine irreversible Gewebeschädigung, rettet noch lebensfähiges Myokard und begrenzt das Infarktareal [39]. Auf der anderen Seite kann die Reperfusion jedoch auch zu einer zusätzlichen Schädigung des Organs führen [40]. Die Ursachen für diesen sogenannten Reperfusionsschaden sind vielfältig: 1) Die schnelle Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes führt zu einem großen H⁺-Konzentrationsgradienten an der Zellmembran, wodurch es zum schnellen Efflux von intrazellulären Protonen kommt. Wie bereits oben beschrieben, zieht dies einen massiven Na⁺- und Ca²⁺-Einstrom nach sich und Proteasen werden verstärkt aktiviert [33]. 2) Durch die erneute Zufuhr von Sauerstoff und die Aktivierung der aeroben Energiegewinnung entstehen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die Lipide, Proteine und DNA oxidieren und die Zelle somit schädigen können [41]. 3) Der Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺

und ROS bewirkt die Öffnung einer großen, nicht-selektiven Pore in der Mitochondrienmembran (*mitochondrial permeability transition pore*), durch die u.a. Protonen frei diffundieren können. Dies führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, so dass die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen kommt und der zelluläre ATP-Mangel weiter verstärkt wird [42]. Alle diese Vorgänge können zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose führen [43]. Innerhalb der ersten 24 h nach Infarkt sterben Kardiomyozyten hauptsächlich aufgrund von Nekrose, während der Zelltod in den darauffolgenden zwei Tagen zunehmend durch Apoptose ausgelöst wird [44]. Nekrotische Zellen schütten ihren gesamten Zellinhalt in das umliegende Gewebe aus und setzten dabei intrazelluläre Gefahrensignale (*damageassociated molecular patterns*, DAMPs) frei. Diese endogenen Moleküle lösen eine Entzündungsreaktion aus, die aufgrund der fehlenden Beteiligung von pathogenen Erregern als "sterile Entzündung" bezeichnet wird [45]. Auch apoptotische Zellen können proinflammatorische Signalmoleküle, wie z.B. ATP, freisetzen, und tragen daher ebenfalls zur Rekrutierung von Immunzellen bei [46].

1.2.2 Phase 2: Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt wird durch verschiedene, sich teilweise überlappende Signalwege initiiert [16,47]. Freigesetzte DAMPs und Fragmente der extrazellulären Matrix stimulieren sowohl das Komplementsystem als auch *Toll-like* Rezeptoren [48,49]. Beide Prozesse führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, wodurch die Expression von Chemokinen, Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen eingeleitet wird [50,51]. Einige aktivierte Komplementfaktoren wirken zudem selbst chemotaktisch [52]. Auch reaktive Sauerstoffspezies, die während der Ischämie/Reperfusion (I/R) gebildet werden, induzieren die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen über die Aktivierung von NF- κ B oder vermitteln die Bildung des sogenannten Inflammasoms [53,54]. Bei dem Inflammasom handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der durch Aktivierung von Caspase-1 die Prozessierung und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β bewirkt und somit die Entzündungsreaktion nach I/R befördert [55].

Es ist noch nicht vollständig geklärt, welche Zelltypen im Einzelnen über die oben beschriebenen Mechanismen zur Einleitung der Entzündung nach Herzinfarkt beitragen [47]. Bislang wurden im Wesentlichen residente Fibroblasten [56], Endothelzellen [57] und Mastzellen [58] als Initiatoren der Entzündungsreaktion beschrieben. So konnte in *in vivo* und *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass die Aktivierung dieser Zellen durch Stimuli wie ROS, Matrixfragmente oder Komplementfaktoren zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induziert [56,58-61]. Dies führt zur Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut in das Infarktareal, wobei zunächst neutrophile Granulozyten und nachfolgend Monozyten und Lymphozyten einwandern (Abbildung 2) [62-64].



Abbildung 2: Schematischer Zeitverlauf der Immunzellinfiltration nach Herzinfarkt in der Maus. Dargestellt ist die Kinetik nach permanenter Ligatur der linken Koronararterie. Abbildung ist zusammengestellt und modifiziert nach [63,64].

Die Infiltration von Leukozyten in das geschädigte Herzmuskelgewebe erfolgt über einen mehrstufigen Prozess, bei dem Leukozyten über verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie Selektine und Integrine, an aktivierte Endothelzellen im ischämischen Bereich des Herzens anhaften und schließlich durch die Gefäßwand in das Myokardgewebe einwandern [16,61,65]. Anschließend migrieren sie entlang eines chemotaktischen Gradienten Richtung nekrotischer Zellen [66,67].

Die ersten Immunzellen, die in den Entzündungsort einwandern sind neutrophile Granulozyten. Sie akkumulieren bereits eine Stunde nach Beginn der Reperfusion im Infarktgebiet [68] und können dort tote Zellen und Debris phagozytieren, Matrix-degradierende Enzyme (Matrix-Metalloproteasen, MMPs) freisetzen und somit zur Beseitigung von zerstörten Matrix- und Zellbestandteilen beitragen [16,69]. Auf der anderen Seite setzen die eingewanderten Granulozyten auch eine Vielzahl toxischer Metabolite frei, die umliegende Kardiomyozyten, vaskuläre Endothelzellen und die extrazelluläre Matrix schädigen können. Dazu zählen insbesondere reaktive Sauerstoffspezies und verschiedene proteolytische Enzyme [70]. Die Schädigung der Endothelzellen durch ROS führt zu einer Einschränkung der Barrierefunktion der Blutgefäßwand, so dass Immunzellen leichter in das Herzgewebe einwandern können [71,72]. Darüber hinaus sezernieren aktivierte Granulozyten chemotaktische Proteine, die zusätzliche Immunzellen anlocken und die Entzündungsreaktion weiter befördern [73].

Monozyten akkumulieren bereits einen Tag nach Infarkt im Herzgewebe und wandern somit nur kurz nach den Granulozyten ein [63]. Sowohl in der Maus als auch im Menschen können Monozyten auf Grund verschiedener Oberflächenmarker und Funktionen in mehrere Untergruppen eingeteilt werden [74]. In der Maus werden pro-inflammatorische Ly6c^{high}exprimierende und reparative Ly6c^{low}-Monozyten unterschieden [63]. Unmittelbar nach Infarkt führt das vermehrt vorhandene Chemokin CCL2 (MCP-1) in den ischämischen Bereichen des Herzens zur Chemotaxis und Infiltration von inflammatorischen Ly6c^{high}-Monozyten [63,75]. In der späten Proliferationsphase (siehe Abschnitt 1.2.3) sinkt die Anzahl dieser Zellen und reparative Ly6c^{low}-Monozyten wandern über einen CX3CL1-vermittelten Mechanismus in das Myokardgewebe ein [63]. Monozyten differenzieren hier zu reifen Makrophagen, die ebenfalls in zwei phänotypisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können. In der inflammatorischen Phase nach Herzinfarkt dominieren zunächst entzündungsfördernde, klassisch aktivierte (M1)-Makrophagen, während in der späteren Proliferationsund Reifungsphase reparative, alternativ aktivierte (M2)-Makrophagen überwiegen [76].

Pro-inflammatorische und reparative Monozyten/Makrophagen tragen auf unterschiedliche Weise zum Heilungsprozess nach Infarkt bei. Ly6c^{high}-Monozyten zeichnen sich durch eine hohe Expression von TNF- α und Proteasen, wie beispielsweise MMPs aus [63]. Auch M1-Makrophagen schütten in hohem Maße pro-inflammatorische Zytokine aus, produzieren zusätzlich Stickstoffmonoxid und bilden reaktive Sauerstoffspezies [77]. Die beiden Zelltypen sind daher zusammen an der Beseitigung von toten Kardiomyozyten, Granulozyten und Debris sowie am Abbau der extrazellulären Matrix und des Kollagennetzwerkes beteiligt. Ly6c^{low}-Monozyten bilden den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und M2-Makrophagen exprimieren Arginase sowie die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β [63,77]. Reparative Monozyten und Makrophagen vermitteln somit den Neuaufbau der extrazellulären Matrix und fördern die Zellproliferation, Kollagenbildung und Angiogenese [63,77].

Während das angeborene Immunsystem wie oben beschrieben sehr schnell nach Infarkt aktiviert wird, setzt das erworbene Immunsystem erst später ein. Die Infiltration von T-Lymphozyten beginnt zwar bereits in den ersten Tagen nach Infarkt, erreicht aber erst nach etwa einer Woche ihren Höhepunkt und nimmt letztlich in der Proliferationsphase wieder ab [64,78]. Die Funktion der T-Zellen im Heilungsprozess nach Herzinfarkt ist noch weitgehend unerforscht. T-Zellen können im Wesentlichen in zwei Hauptpopulationen eingeteilt werden: in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen [79,80]. Beide werden erst durch die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells; APCs), wie dendritischen Zellen und Makrophagen, aktiviert. Bei einer infektiösen Entzündung nehmen die APCs eingedrungene Pathogene oder Erregerbestandteile auf, degradieren sie und präsentieren die erzeugten Peptidfragmente über MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle auf der Zelloberfläche. Der MHC/Peptid-Komplex wird von T-Zellen erkannt, wodurch diese aktiviert werden. T-Helferzellen sezernieren daraufhin eine Reihe von Zytokinen, die zur Aktivierung oder Rekrutierung von weiteren Immunzellen führen. Aktivierte zytotoxische T-Zellen können Zytokine und zytotoxische Moleküle freisetzen oder töten direkt die von ihnen erkannte Zelle [79,80]. An der sterilen Entzündung nach I/R sind zwar keine pathogenen Antigene beteiligt, trotzdem werden T-Zellen offenbar nach Herzinfarkt aktiviert [81]. Verschiedene Studien aus den letzten Jahren deuten daraufhin, dass kardiale Autoantigene zur Aktivierung der T-Zellen führen können [81,82]. Die Aktivierung von T-Helferzellen und insbesondere regulatorischen T-Zellen (Treg), eine Untergruppe der T-Helferzellen, befördert die Heilung nach Infarkt [81,83]. Im Gegensatz dazu weisen in vitro Experimente daraufhin, dass zytotoxische T-Zellen Kardiomyozyten schädigen [84]. Die diesen Prozessen zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang aber weitgehend unbekannt.

1.2.3 Phase 3: Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen

Nachdem Granulozyten und Monozyten/Makrophagen Zelldebris sowie nekrotische Kardiomyozyten beseitigt haben, wird in dem geschädigten Infarktareal ein neues, stabiles und stark vaskularisiertes Ersatzgewebe aufgebaut [16]. Die Bildung dieses sogenannten Granulationsgewebe wird insbesondere durch Makrophagen/Monozyten, Myofibroblasten und proliferierende Endothelzellen vermittelt [16].

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, akkumulieren in der Proliferationsphase reparative Ly6c^{low} Monozyten, M2-Makrophagen und T-Zellen im Infarktbereich. Diese Zellen sezernieren einerseits anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , und vermitteln somit den Übergang von der Entzündungs- zur Proliferations- und Heilungsphase [78,85]. Auf der anderen Seite befördern die von ihnen freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren die Fibroblastenproliferation und die Angiogenese [16]. Beispielsweise

stimuliert TGF- β zusammen mit bestimmten Matrixproteinen unter dem Einfluss von mechanischem Stress die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [56,86]. Diese exprimieren im Gegensatz zu normalen Fibroblasten α -smooth muscle actin (α -SMA) und sind zur Kontraktion befähigt [87]. Zusätzlich wandern sie in das Infarktgebiet ein und werden dort durch Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Proliferation und Produktion von Matrixproteinen angeregt, um das geschädigte Herzgewebe durch eine stabile Narbe zu ersetzen [56]. So sezernieren aktivierte Myofibroblasten Prokollagene, die im Myokardgewebe durch Prokollagen-Peptidasen zum endgültigen Kollagen umgewandelt werden [88]. Bereits zwei Tage nach Herzinfarkt beginnen Myofibroblasten im Infarktareal Kollagen Typ III zu synthetisieren [89]. Dieses bildet ein lockeres Netzwerk, welches mechanisch nicht sehr stabil ist, dem Herzmuskel aber eine gewisse Elastizität verleiht [90]. Im weiteren Verlauf der Wundheilung wird Kollagen III durch dicht-gepacktes Kollagen I ersetzt, wodurch das Infarktareal zugfester und mechanisch stabiler wird [89,90].

Neben der Synthese von Matrixproteinen wird in der Proliferationsphase auch die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) stimuliert [16,91]. Dieser Prozess wird durch Wachstumsfaktoren wie VEGF oder den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF) initiiert, die u.a. von Monozyten und Makrophagen sezerniert werden [63,92]. Zusätzlich können Makrophagen die Angiogenese auch über MMPs befördern, da diese Komponenten die extrazelluläre Matrix degradieren und somit matrix-gebundene, proangiogenetische Faktoren freisetzen können [77]. Die Mikrogefäße bilden sich ausgehend von intakten Gefäßen im Infarktrandbereich, durchziehen das gesamte Granulationsgewebe und versorgen die an der Wundheilung beteiligten Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen [93].

1.2.4 Phase 4: Ausreifung der Infarktnarbe

Während der Reifungsphase nimmt die Zellzahl und Kapillardichte innerhalb der sich bildenden Infarktnarbe ab, da Immunzellen, Endothelzellen und die meisten Myofibroblasten in Apoptose übergehen [91,94]. Gleichzeitig steigt die Aktivität der Lysyloxidase – ein Enzym, das die Quervernetzung von fibrillärem Kollagen katalysiert [95]. Durch diese Querverbindungen bildet sich ein dicht gepacktes, widerstandsfähiges und reißfestes Narbengewebe im Infarktgebiet aus [96,97]. Das geschädigte Areal wird hiermit stabilisiert und das Herz vor einer Ruptur bewahrt. Auf der anderen Seite nimmt jedoch die Steifigkeit des Ventrikels zu, was letztlich zu einer verringerten Kontraktilität und folglich zu einer eingeschränkten Pumpfunktion führt [96].

1.2.5 Regulation der Immunantwort nach Herzinfarkt

Wie bereits oben beschrieben, dient die Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt dazu, tote Zellen und Matrixdebris zu entfernen und die Bildung einer stabilen Narbe zu initiieren. Eine überschießende oder verlängerte Immunantwort kann aber zu einem zusätzlichen Gewebeschaden und damit zu einer weiteren Einschränkung der Herzfunktion führen [98]. Eine exzessive Infiltration von Immunzellen hat beispielsweise einen verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix zur Folge, wodurch die Gefahr einer Ruptur der Herzwand besteht [99]. Zudem stört die Persistenz von Immunzellen offenbar den Aufbau eines stabilen Narbengewebes, woraus eine erhöhte Dilatation des Ventrikels resultieren kann [98,100,101]. Wird die Immunantwort nicht rechtzeitig reduziert, kann sich die Entzündungsreaktion auch in das nicht-infarzierte Myokardgewebe ausweiten und dort zu einer gesteigerten Fibrosierung und einer verschlechterten Pumpfunktion des Herzens führen [102-104]. Für eine erfolgreiche Wundheilung nach Infarkt ist somit eine strikte Regulation der Immunantwort von zentraler Bedeutung.

Die Hemmung und Auflösung der Entzündung nach Herzinfarkt ist ein aktiver Prozess, der die Rekrutierung, Differenzierung und Aktivierung von reparativen Immunzellen sowie die Freisetzung von anti-inflammatorischen Mediatoren erfordert [98]. Auf zellulärer Ebene spielt insbesondere die Polarisierung von Makrophagen zum M2-Phänotyp sowie die Infiltration von inhibitorischen Monozyten und regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle [98]. Auf molekularer Ebene wird vermutet, dass pro-inflammatorische Signalkaskaden, ähnlich wie bei anderen Entzündungsprozessen, durch eine Vielzahl von sezernierten Proteinen (z.B. Zytokine, Chemokine) und intrazellulären Mediatoren gehemmt werden. Direkte experimentelle Nachweise für die Beteiligung dieser Faktoren bei der Wundheilung nach kardialer I/R stehen jedoch noch aus [98]. Das genaue Verständnis dieser protektiven Mechanismen ist aber essentiell für die Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Therapien nach Myokardinfarkt [47,98].

Eine Gruppe von Molekülen, die bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der Modulation von Entzündungsreaktionen spielt, sind extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside [105]. Insbesondere Adenosin ist aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung von entscheidender Bedeutung für die Hemmung von inflammatorischen Prozessen [106]. Unser Wissen über die Wirkung dieser endogenen Purinverbindungen auf den Wundheilungsverlauf nach Herzinfarkt ist allerdings unvollständig. Das nächste Kapitel gibt zunächst einen Überblick über die Bildung, den Abbau und die Funktionen der extrazellulären Purinverbindungen sowie die an diesen Prozessen beteiligten Ektoenzymen und Rezeptoren.

1.3 Das purinerge Signalsystem

Innerhalb der Zelle fungieren Nukleotide und Nukleoside (Strukturformeln in Abbildung 3) als Grundbausteine von Nukleinsäuren und erfüllen zentrale Funktionen im Stoffwechsel und der Signaltransduktion [107]. Adenosin ist Bestandteil von Nukleinsäuren, ATP, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Adenosintriphosphat (ATP) ist mit seinen energiereichen Phosphorsäureanhydridbindungen bekanntlich ein wichtiger Energieträger und -lieferant. Ein weiteres Nukleotid ist das NAD⁺ – ein Koenzym, das als Elektronenakzeptor an einer Reihe von zellulären Redoxreaktionen beteiligt ist. So wird NAD⁺ im Rahmen der Glykolyse oder der Fettsäureoxidation zu NADH reduziert, welches wiederum als Elektronenüberträger in der Atmungskette dient [107].



Abbildung 3: Strukturformeln einiger Adenin-Nukleotide und Adenosin. ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, NAD⁺ = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid.

Nukleotide und Nukleoside können aber auch extrazellulär gebildet werden und fungieren dort in einer Reihe von physiologischen Prozessen als Signalmoleküle [108-110]. Der purinerge Stoffwechsel- und Signalweg ist ein komplexes System und umfasst eine Vielzahl von Kanälen, Transportern, Enzymen und Rezeptoren, die in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt werden (siehe auch Abbildung 4). Die Freisetzung der Nukleotide ATP und NAD⁺ kann sowohl passiv durch lytische Prozesse als auch aktiv über nicht-lytische Mechanismen erfolgen (Abschnitt 1.3.1). Die extrazellulären Nukleotide können P2-Rezeptoren aktivieren und so vorrangig pro-inflammatorische Signalkaskaden auslösen (Abschnitt 1.3.2). Daneben unterliegen die Nukleotide einem ständigen Abbau durch membranständige Ektoenzyme, die sowohl ATP als auch NAD⁺ kaskadenförmig zu Adenosin umsetzen (Abschnitt 1.3.3 und 1.3.4). Adenosin bindet an P1-Rezeptoren und vermittelt je nach Rezeptorsubtyp entzündungshemmende oder -fördernde Effekte (Abschnitt 1.3.5). Alternativ kann Adenosin im Extrazellularraum enzymatisch abgebaut oder durch Transporter wieder in die Zelle aufgenommen werden, wo es dann zu Nukleotiden aufgebaut werden kann (Abschnitt 1.3.6).



Abbildung 4: Das purinerge Signalsystem. Dargestellt sind die Transporter, Rezeptoren und Ektoenzyme, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Für die Beschreibung der einzelnen Proteine siehe folgende Abschnitte.

1.3.1 Freisetzung von Nukleotiden

Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die extrazellulären Konzentrationen der beiden Nukleotide ATP und NAD⁺ gering. Im Plasma beträgt die Konzentration von NAD⁺

ca. 0.1-0.3 μ M und ist damit mehr als 1000-fach geringer als die entsprechende intrazelluläre Konzentration von etwa 0.3 mM [111-113]. Noch deutlicher ist der Unterschied beim ATP: Im Extrazellularraum beträgt die Konzentration nur 1-10 nM [114-116], intrazellulär dagegen etwa 1-10 mM [117-120]. Der Efflux von ATP aus der Zelle heraus ist unter basalen Bedingungen niedrig und wurde in verschiedenen Zelltypen *in vitro* auf etwa 20-200 fmolmin⁻¹ pro 10⁶ Zellen geschätzt [121].

Im Gegensatz zu basalen Bedingungen werden bei pathologischen Zuständen, wie der Ischämie oder Entzündung, hohe Mengen an Nukleotiden in den Extrazellularraum ausgeschüttet. Dazu tragen einerseits nekrotische Zellen bei, da ihr gesamter Zellinhalt durch den Verlust der Membranintegrität in das Interstitium austritt [45]. Andererseits können Nukleotide auch durch kontrollierte Prozesse aus apoptotischen oder aktivierten Zellen freigesetzt werden [120,122]. Der Transport über die Zellmembran erfolgt hierbei über Connexin- oder Pannexin-Halbkanäle [123,124], wobei auch andere Mechanismen wie die Freisetzung über Anionenkanäle oder Vesikel diskutiert werden [125,126]. Ein Halbkanal besteht jeweils aus 6 Connexinen oder 6 Pannexinen (z.B. bei Pannexin-1), die in der Membran eine zentrale Pore ausbilden [127,128]. Membrandepolarisation, Veränderungen intrazellulärer oder extrazellulärer Ionenkonzentrationen, mechanischer Stress sowie posttranslationale Modifikationen bewirken die Öffnung des Kanals, wodurch Ionen und Moleküle kleiner als 1-2 kDa passieren können [129]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Connexin (Cx)- oder Pannexin (Panx)-Kanäle durchlässig sind für ATP (z.B. Cx26, Cx30, Cx36, Cx37, Cx43, Panx1), während für NAD⁺ bislang nur der Transport durch Cx43-Kanäle nachgewiesen wurde [129,130]. Beispielsweise setzen aktivierte Immunzellen, wie Granulozyten und T-Zellen, ATP über Pannexin-1 oder Cx43 frei [124,131]. Makrophagen und Monozyten können ATP zudem über Cx37 ausschleusen [130].

1.3.2 Nukleotid-Rezeptoren (P2-Rezeptoren)

Im Extrazellularraum können Nukleotide an P2-Rezeptoren binden, die nahezu von allen Zelltypen exprimiert werden [115]. Diese Nukleotid-Rezeptoren werden in zwei Untergruppen eingeteilt: P2X-Rezeptoren (Liganden-aktivierte Ionenkanäle) und P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) [132].

Mensch und Maus exprimieren sieben verschiedene P2X-Rezeptoren (P2X1-7), die alle spezifisch durch ATP aktiviert werden, sich aber in ihrer Ligandenaffinität unterscheiden

[133]. Bei der Bindung von ATP ändert sich die Konformation des Rezeptors, so dass sich eine intrinsische Pore öffnet, durch die Ca²⁺ und Na⁺ ein- und K⁺-Ionen ausströmen können [134,135]. Dies verursacht die Depolarisation der Plasmamembran, einen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration und führt daher letztlich zur Induktion diverser Signalwege [136]. Immunzellen exprimieren hauptsächlich die Rezeptoren P2X1, P2X4, P2X5 und P2X7 und ihre Aktivierung vermittelt insbesondere entzündungsfördernde Effekte [115,137]. So führt beispielsweise die Stimulation des P2X7-Rezeptors auf Makrophagen zur Aktivierung des Inflammasoms und der darauffolgenden Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 [138,139]. Darüber hinaus stimulieren P2X7-, P2X1- und P2X4-Rezeptoren die Aktivierung von T-Zellen [140,141], während der P2X1-Rezeptor auf Granulozyten die Chemotaxis befördert [142].

In Säugetieren wurden bislang acht verschiedene P2Y-Rezeptoren identifiziert, die im Gegensatz zu den P2X-Rezeptoren durch verschiedene Purin- oder Pyrimidinnukleotide aktiviert werden (siehe Tabelle 1). Genau wie bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs) führt die P2Y-Rezeptorstimulierung zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, das daraufhin in seine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert [136]. Beide Komponenten können nun mit anderen Proteinen interagieren und so diverse Signalkaskaden auslösen [136]. Die P2Y-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer α -Untereinheit, wodurch verschiedene Signale weitergegeben werden (siehe Tabelle 1). So führt die Stimulation von P2Y-Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellpopulationen oftmals zu entzündungsfördernden Effekten [143].

Rezeptor	Ligand	G _α -Klasse	Zielproteine/weitergegebene Signale
P2Y1	ADP, ADP-Ribose	G _{q/11}	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
P2Y2	ATP, UTP	G _{q/11}	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
	ATP, UTP	G _o	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung, Rac-GTPase (+)
	ATP, UTP	G ₁₂	RhoA-GTPase (+)
P2Y4	UTP (ATP, UDP)	$G_{q/11,}G_{o}$	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
P2Y6	UDP, UTP	G _{q/11}	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
P2Y11	ATP	G _{q/11}	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
	ATP, NAD $^+$	Gs	Adenylatzyklase (+), erhöhte cAMP-Produktion
	UTP (NAD $^{+}$)	G _o	PLC-unabhängige Ca ²⁺ -Freisetzung
P2Y12	ADP	G _i	Adenylatzyklase (-), verringerte cAMP-Produktion
P2Y13	ADP, ATP	G _{i/o}	Adenylatzyklase (-), verringerte cAMP-Produktion
			PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung
P2Y14	UDP-Glukose	G _{i/o}	PLC (+), Ca ²⁺ -Freisetzung

Tabelle 1: P2Y-Rezeptoren mit nachgeschalteten Signalwegen [110,136,144]. PLC = Phospholipase C. (+) = wird stimuliert, (–) = wird gehemmt.

Die Stimulation des P2Y6-Rezeptors auf Makrophagen führt beispielsweise zur Sekretion des Monozyten-Chemoattraktor-Proteins-1 (MCP-1), das die Rekrutierung von Immunzellen zum Entzündungsort vermittelt [145,146]. Makrophagen exprimieren zudem u.a. P2Y1- und P2Y4-Rezeptoren, deren Funktion jedoch noch weitgehend unbekannt ist [143]. Erste Untersuchungen weisen daraufhin, dass eine Aktivierung von P2Y1-Rezeptoren die Phagozytosekapazität steigert [147], während der P2Y4-Rezeptor die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen befördern könnte [148]. Der P2Y2-Rezeptor ist dagegen insbesondere an der gerichteten Chemotaxis von Granulozyten beteiligt [149].

1.3.3 Extrazellulärer Nukleotidabbau durch Ektoenzyme

Extrazelluläre Nukleotide können durch membranständige Ektoenzyme abgebaut werden, so dass die Dauer und das Ausmaß der P2-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion letztlich auch von dem Vorkommen und der Aktivität dieser Enzyme bestimmt werden [150].

1.3.3.1 Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase CD39

Die Familie der Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDasen) umfasst 8 Mitglieder, die mit unterschiedlicher Präferenz sowohl Nukleotidtri- (z.B. ATP, UTP) als auch -diphosphate (z.B. ADP, UDP) hydrolysieren [151,152]. Die NTPDasen 1-3 und 8 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während die NTPDasen 4-7 in intrazellulären Organellen lokalisiert sind [153]. NTPDase 5 und 6 können jedoch auch als Exoenzyme sezerniert werden [154,155].

Die NTPDase 1 wird auch als CD39 bezeichnet und hydrolysiert im Gegensatz zu den anderen membranständigen NTPDasen extrazelluläres ATP direkt zu AMP, ohne dass nennenswerte Mengen des Zwischenprodukts ADP entstehen [151,153]. Interessanterweise wird CD39 vor allem in der Nähe von P2Y-Rezeptoren exprimiert und ist somit vermutlich für die Regulation der Aktivierung dieser Rezeptoren von entscheidender Bedeutung [156]. Durch die Modulation der purinergen Signaltransduktion spielt die CD39 insbesondere bei der Kontrolle von Immunantworten eine wichtige Rolle [157]. So ist die Entzündungsreaktion in CD39-defizienten Mäusen bei verschiedenen inflammatorischen Krankheitsmodellen, wie der chronischen Darmerkrankung (Colitis) oder bei I/R in der Leber, stärker ausgeprägt als bei wildtypischen Mäusen [105,158,159].

1.3.3.2 Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (ENPPs)

Die Familie der ENPPs besteht aus sieben Mitgliedern, von denen ENPP1-3 bekanntermaßen extrazelluläre Nukleotide hydrolysieren können [150]. ENPP1 (auch CD203a oder PC-1) und ENPP3 (auch CD203c) sind in der äußeren Seite der Zellmembran verankert, während die Isoform 2 als Proenzym sezerniert wird und erst nach proteolytischer Spaltung aktiviert wird [150]. ENPP1 hydrolysiert ATP zu AMP und Pyrophosphat oder aber zu ADP und Phosphat, abhängig davon, wie das ATP-Substrat an das katalytische Zentrum bindet [160]. ENPP3 katalysiert ebenfalls den Abbau von ATP zu AMP, jedoch mit geringer Effizienz als die Isoform 1 [161]. Prinzipiell spalten diese Ektoenzyme aber auch die Pyrophosphat- und Phosphodiesterbindungen von einer Vielzahl weiterer Substrate [153]. Dazu zählen beispiels-weise NAD⁺ und ADP-Ribose, die beide zu AMP abgebaut werden [162-165].

1.3.3.3 CD38 und CD157

Extrazelluläres NAD⁺ kann auch durch die beiden multifunktionellen Ektoenzyme CD38 und CD157 (auch BST-1 genannt) abgebaut werden [166]. Einerseits fungieren beide Enzyme als ADP-Ribosylzyklase und setzten somit NAD⁺ zu zyklischer ADP-Ribose (cADPR) um [166,167]. Andererseits verfügen sie über eine cADPR-Hydrolase-Aktivität, durch die cADPR schnell weiter zu ADP-Ribose (ADPR) gespalten wird [167,168]. Darüber hinaus hydrolysiert CD38 extrazelluläres NAD⁺ auch direkt zu ADPR (NAD⁺-Glykohydrolase-Aktivität) [166]. ADPR kann durch ENPPs abgebaut werden (siehe 1.3.3.2) oder an P2Y1-Rezeptoren binden [169]. cADPR wird dagegen in die Zelle aufgenommen, bindet dort an Calciumkanäle (Ryanodinrezeptoren) und bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum [170].

Die beiden NAD⁺-abbauenden Ektoenzyme unterscheiden sich in ihrer enzymatischen Aktivität: Diese ist im Falle von CD157 etwa 400-fach niedriger als die von CD38 und erfordert entweder einen niedrigen pH-Wert oder hohe Zn²⁺- bzw. Mn²⁺-Konzentrationen [167,171]. Zusätzlich zu ihren enzymatischen Eigenschaften können CD38 und CD157 auch als Rezeptoren fungieren, wobei CD38 das Adhäsionsmolekül CD31 bindet, der Ligand von CD157 jedoch noch unbekannt ist [172,173].

1.3.3.4 ADP-Ribosyltransferasen (ART)

Eine weitere Klasse von Ektoenzymen, die extrazelluläres NAD⁺ als Substrat verwenden, sind Mono-ADP-Ribosyltransferasen (ART) [166]. Diese Enzyme katalysieren die Übertragung der ADP-Ribosegruppe von NAD⁺ auf eine spezifische Aminosäure eines Zielproteins, welches daraufhin gewöhnlich seine Funktion ändert. Im Gegensatz zu CD38 und CD157 wird die ADPR folglich nicht freigesetzt, sondern zur posttranslationalen Modifikation verwendet [166]. Im Menschen werden vier verschiedene ART (ART1, 3, 4, 5) exprimiert, während in der Maus sechs verschiedene Mitglieder vorkommen (ART1, 2a, 2b, 3, 4, 5) [174]. Davon sind ART1-4 in der Zellmembran verankert, während ART5 sezerniert wird [175]. Für ART3 und ART4 konnte bislang keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, so dass diese beiden Proteine möglicherweise andere Funktionen erfüllen [176]. In der Maus werden die beiden ART2-Isoformen auf verschiedenen Leukozytenpopulationen exprimiert und sind an der Regulation von Immunantworten beteiligt [166,177]. Auf T-Zellen vermittelt ART2 beispielsweise die ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors, wodurch dieser aktiviert wird und die Apoptose der Zelle einleitet [178].

1.3.4 CD73 – ein Schlüsselenzym bei der Bildung von extrazellulärem Adenosin

Wie bereits oben beschrieben, kann sowohl extrazelluläres ATP als auch NAD⁺ mittels verschiedener Ektoenzyme zu AMP hydrolysiert werden, so dass die beiden Abbauwege an dieser Stelle zusammenlaufen. Das gebildete AMP kann durch die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) weiter zu Adenosin dephosphoryliert werden [153,179]. Bei der CD73 handelt es sich um ein Glykoprotein, dass als Dimer über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert ist [180]. Jedes Monomer besteht aus zwei verschiedenen Domänen: Die N-terminale Domäne bindet zwei Zinkionen, die für die katalytische Aktivität wichtig sind, während die C-terminale Domäne die Bindestelle für das Nukleotid-Substrat enthält [181,182]. Das bevorzugte Substrat der CD73 ist AMP mit einem K_m-Wert von 1-50 μ M [179,183]. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Ektonukleotidase auch NAD⁺ zu Adenosin abbauen kann [184]. Allerdings ist die Hydrolyse deutlich weniger effizient als bei AMP [184], so dass fraglich ist, ob dieser Abbau unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt.

Neben CD73 können auch alkalische Phosphatasen (ALP) extrazelluläres AMP zu Adenosin abbauen. In Mensch und Maus sind vier verschiedene ALP bekannt, wovon die gewebeunspezifische Form TNAP (*tissue nonspecific alkaline phosphatase*, auch als ALP1 bezeichnet) am weitesten verbreitet ist und unter anderem in Leber, Knochen und Niere exprimiert wird [153]. Alkalische Phosphatasen sind jedoch wesentlich unspezifischer als CD73 und hydrolysieren ein weites Spektrum an Phosphatverbindungen, wie z.B. ATP, ADP, AMP und cAMP [150]. Zudem ist der K_m-Wert der ALP für die AMP-Hydrolyse im Vergleich zu der CD73 wesentlich höher (441 μ M) [185]. Da auch in verschiedenen Organen (Lunge, Leber, Herz) von CD73-defizienten Mäusen deutlich weniger extrazelluläres Adenosin bzw. weniger AMPase-Aktivität gemessen wurde, wird die Bildung von Adenosin aus AMP offenbar im Wesentlichen von der CD73 vermittelt [186,187].

Wie im nächsten Abschnitt beschrieben, kann extrazelluläres Adenosin durch Bindung an P1-Rezeptoren entzündungshemmende Effekte einleiten. Folglich fungiert die CD73 als wichtiger Regulator in einer Vielzahl von inflammatorischen Prozessen [188]. So zeigten CD73^{-/-}-Mäuse in verschiedenen Krankheitsmodellen, wie beispielsweise bei Lungenschädigung [186,189], arterieller Gefäßverletzung [190] oder I/R im Darm [191] eine stärkere Infiltration von Immunzellen und einen ausgeprägteren Gewebeschaden. Gesunde CD73defiziente Mäuse waren dagegen phänotypisch unauffällig, so dass die CD73-vermittelte Adenosinbildung offenbar insbesondere unter pathologischen Bedingungen von Bedeutung ist [153,187].

1.3.5 Adenosinrezeptoren und ihre Funktionen

Extrazelluläres Adenosin kann an spezifische Adenosinrezeptoren (P1-Rezeptoren) auf der Zelloberfläche binden und somit verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden einleiten. Dadurch spielen Adenosinrezeptoren in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle [192]. Bei den Adenosinrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die in vier Subtypen unterschieden werden: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ [193,194]. Der Effektor aller Adenosinrezeptoren ist die Adenylatzyklase (AZ), die abhängig vom Rezeptorsubtyp inhibiert oder stimuliert wird: A₁- und A₃-Rezeptoren sind mit G_{i/o}-Proteinen assoziiert, was bei der Rezeptorentation zur Folge hat [192,195,196]. Dagegen koppeln A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren an G_s-Proteine, stimulieren dadurch die AZ und folglich die intrazelluläre Bildung des Signalmoleküls cAMP. Darüber hinaus wurden für alle vier Subtypen weitere Signalwege beschrieben, die zusammenfassend in Abbildung 5 dargestellt sind.



Abbildung 5: Signaltransduktion über Adenosinrezeptoren. Die Stimulation von A₁- und A₃-Rezeptoren inhibiert die Adenylatzyklase über die Aktivierung von G_i-Proteinen und führt zusätzlich zur Aktivitätssteigerung der Phospholipase C (PLC) über die G_{βγ}-Einheit. Dagegen sind A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren an G_s-Proteine gekoppelt und steigern nach Stimulation die Adenylatzyklase-Aktivität. Zusätzlich können A_{2B}- und A₃-Rezeptoren die PLC über G_q-Proteine aktivieren. Alle vier Adenosinrezeptoren sind zur Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) fähig, wodurch sie an Prozessen wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung oder der Apoptose beteiligt sind. CREB = *cAMP response element binding protein*; DAG = Diazylglycerin; IP₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat; PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PK = Proteinkinase; PLD = Phospholipase D; NF-*k*B = *nuclear factor-kB*. Modifiziert nach [197,198].

1.3.5.1 A_1 -Rezeptor (A_1R)

Die Aktivierung des A₁-Rezeptors verursacht eine Reihe von Effekten im kardiovaskulären System, wie z.B. die Verringerung der Herzfrequenz [198,199]. Im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen vermittelt er in vielen Gewebe- und Zelltypen pro-inflammatorische Effekte [200]. Auf humanen Granulozyten induziert die A₁-Rezeptor-Aktivierung beispielsweise die Chemotaxis, die Adhäsion an Endothelzellen, die Fc γ -vermittelte Phagozytose und die Bildung von Sauerstoffradikalen [201-203]. In stimulierten humanen Monozyten hebt die A₁R-Aktivierung zudem die hemmende Wirkung des A_{2A}-Rezeptors bei der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen auf [204]. Es wurden jedoch auch einige anti-inflammatorische Funktionen für den A₁-Rezeptor beschrieben [200]. In I/R-Modellen in der Lunge und der Niere zeigte ein A₁R-spezifischer Agonist beispielsweise eine protektive Wirkung und verringerte die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Myeloperoxidase, ein Indikator für die Aktivierung und Infiltration von Granulozyten [205,206].

1.3.5.2 A_{2A} -Rezeptor ($A_{2A}R$)

Der A2A-Rezeptor kann nach Aktivierung durch Adenosin eine Erweiterung von Blutgefäßen (Vasodilatation) bewirken und spielt somit ähnlich wie der A₁R eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System [207,208]. Zusätzlich ist der A2AR wesentlich an der Modulation von Entzündungsreaktionen beteiligt, da er auf den meisten Immunzellen exprimiert wird und dort vor allem entzündungshemmende Effekte einleitet [209]. Der A_{2A}R ist somit in seiner Wirkung oftmals dem A₁R direkt entgegengesetzt (siehe oben). So hat die Aktivierung des A2A-Rezeptors auf Granulozyten beispielsweise einen supprimierenden Effekt auf die Phagozytose, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Adhäsion an das Endothel [201-203,210]. In Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen hemmt der $A_{2A}R$ zudem die Expression von pro-inflammatorischen Th1-Zytokinen, wie IL-12, IFN- γ und TNF-a [211-216]. Im Gegensatz dazu wird die Bildung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Monozyten und Makrophagen über die Stimulation des A_{2A}R befördert [217,218]. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es nicht überraschend, dass A_{2A}R-Agonisten in einer Vielzahl von Krankheitsmodellen eine entzündungshemmende und gewebeprotektive Wirkung erzielen [200]. Beim Herzinfarktmodell führte die Behandlung mit A2AR-Agonisten beispielsweise in verschiedenen Spezies zur Reduktion der Infarktgröße [200,219-221].

1.3.5.3 A_{2B} -Rezeptor ($A_{2B}R$)

Im Vergleich zu den anderen Adenosinrezeptoren wird der $A_{2B}R$ erst bei mikromolaren Adenosinkonzentrationen aktiviert (EC50 = 24 µM) und ist damit deutlich unempfindlicher als die anderen drei Adenosinrezeptoren (EC50 = 0.3-0.7 µM) [222]. Da die physiologische Adenosinkonzentration im nanomolaren Bereich liegt, wird allgemein angenommen, dass A_{2B} -Rezeptoren erst unter pathologischen Bedingungen von Bedeutung sind [223]. Der A_{2B} -Rezeptor koppelt entweder an G_s - oder an G_q -Proteine, so dass nach Rezeptorstimulation unterschiedliche Signalwege eingeleitet werden können (siehe Abbildung 5). Verschiedene Studien zeigten, dass dabei offenbar sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Effekte vermittelt werden [200,224]. Auf Granulozyten und Makrophagen kann durch A_{2B} -Rezeptoraktivierung beispielsweise die Sekretion von TNF- α gehemmt werden [225,226]. In Makrophagen steigert die Stimulation des A_{2B} -Rezeptors zusätzlich die Bildung des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 [227] und befördert die Aktivierung von alternativ aktivierte (M2) Makrophagen [228]. Es wird vermutet, dass diese anti-inflammatorischen Effekte auf den G_s -vermittelten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration

20

zurückzuführen sind, ähnlich wie es beim A_{2A} -Rezeptor der Fall ist [200]. Daneben kann die $A_{2B}R$ -Aktivierung auch zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus einer Vielzahl von Zellen führen, was offenbar sowohl über G_s - und G_q -Signalwege verläuft [200,229,230].

1.3.5.4 A₃-Rezeptor (A₃R)

Als letztes Mitglied der Adenosinrezeptor-Familie wurde der A₃R entdeckt [231]. Während die anderen drei P1-Rezeptoren eine relativ hohe Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Säugetierfamilien aufweisen (86-93%), zeigt der A₃R starke Speziesunterschiede (z.B. 74% zwischen Mensch und Ratte) [193]. Daher weisen die A₃R aus verschiedenen Säugerarten oft große Unterschiede in der Affinität zu Liganden auf [198]. Die Signaltransduktion kann dabei über G_i- oder G_q-Proteine verlaufen, wobei mittlerweile auch noch andere intrazelluläre Signalwege identifiziert worden sind [232]. In Bezug auf das Immunsystem können die vermittelten Effekte sowohl anti- als auch pro-inflammatorisch sein [200]. So werden Mastzellen beispielsweise durch die A₃R-Aktivierung zur Ausschüttung des Entzündungsmediators Histamin angeregt [233]. Auf humanen und murinen Makrophagen-Zelllinien hemmt der A₃R dagegen die LPS-stimulierte Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α [234,235].

1.3.6 Adenosinabbau und -aufnahme in die Zelle

Adenosin kann durch die Adenosin-Desaminase (ADA) weiter zu Inosin abgebaut und den Adenosinrezeptoren somit als Substrat entzogen werden [150]. Im Menschen sind zwei Isoformen bekannt: ADA1 (auch ADA) und ADA2 (auch CECR1) [236,237]. Beide Enzyme kommen im Zytosol vor, wobei ADA zusätzlich als Ektoenzym auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen gefunden wurde [238]. Die Aminosäuresequenz der ADA weist allerdings keine Transmembrandomänen auf [239]. Stattdessen weisen mehrere Untersuchungen daraufhin, dass die ADA über andere Membranproteine (z.B. CD26, A₁-Rezeptor) mit der Zellmembran assoziiert ist [240,241]. Das von der ADA gebildete Inosin kann durch die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) weiter zu Hypoxanthin abgebaut werden [150]. Die PNP kommt normalerweise hauptsächlich im Zytosol vor, wobei HPLC-Untersuchungen auch auf eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche hindeuten [242]. Bislang ist jedoch nur wenig über die Rolle der PNP als Ektoenzym bekannt.

Alternativ zur extrazellulären Degradation kann Adenosin auch über Nukleosidtransporter in die Zelle aufgenommen werden, wodurch P1-Rezeptor-vermittelte Wirkungen ähnlich wie beim Abbau beendet werden [243,244]. Abhängig vom Transportmechanismus können zwei Familien unterschieden werden: konzentrative (CNTs, Kationen-abhängig) und äquilibrative (ENTs; Kationen-unabhängig) Nukleosidtransporter. Die CNTs (auch SLC28) befördern Nukleoside gegen einen Konzentrationsgradienten unter Cotransport von Na²⁺-Ionen in die Zelle. Die treibende Kraft dieses Transports ist somit der physiologische Na⁺-Gradient über die Zellmembran. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den ENTs (auch SLC29) um bidirektionale Transporter, die eine erleichterte Diffusion der Nukleoside entlang eines bestehenden Konzentrationsgradienten ermöglichen [243,244]. Das menschliche Genom enthält drei verschiedene SLC28-Gene (a1-3), die entsprechend für die Proteine CNT1-3 kodieren, während für die SLC29-Familie vier Gene (a1-a4) und vier Proteine (ENT1-4) bekannt sind [244]. Der CNT2 ist spezifisch für Purine, zeigt eine breite Gewebeverteilung und wird beispielsweise auf Makrophagen exprimiert [245,246]. Die bislang am besten charakterisierten äquilibrativen Transporter sind ENT1 und ENT2, die ein weites Spektrum an Purin- und Pyrimidinnukleosiden sowie Nukleobasen (z.B. Hypoxanthin) transportieren [244,247]. Beide Transporter sind an der Modulation des extrazellulären Adenosinniveaus beteiligt, da in ENT1- und ENT2-defizienten Mäusen deutlich erhöhte Adenosin-Konzentrationen im Plasma und in der Lungenflüssigkeit gefunden wurden imVergleich zu WT-Tieren [248,249].

Innerhalb der Zelle kann das aufgenommene Adenosin durch die zytosolische ADA abgebaut werden oder aber durch die **Adenosin-Kinase** (ADK) zu AMP phosphoryliert werden [250]. Das gebildete AMP wird anschließend durch weitere Enzyme zu höher phosphorylierten Formen aufgebaut, die dann wieder für den Energiemetabolismus und als Bausteine für Nukleinsäuren zu Verfügung stehen. Diese Form der Wiederverwertung von Adenosin wird daher auch als *salvage pathway* bezeichnet [251,252]. Die Adenosin-Kinase verwendet ATP als Phosphatgruppendonor, wodurch bei der von ihr katalysierten Reaktion ADP und AMP als Produkte entstehen [250]. Da die ADK ihr Substrat Adenosin mit hoher Affinität (K_m-Wert $\sim 2 \ \mu$ M) bindet und schnell umsetzt, trägt sie wesentlich zu der niedrigen, intrazellulären Adenosinkonzentration unter physiologischen Bedingungen bei [253,254]. Das dadurch entstehende Konzentrationsgefälle zwischen extra- und intrazellulärem Kompartment führt zu einem Influx von Adenosin über die beschriebenen Nukleosidtransporter [253,255]. Die ADK spielt somit eine indirekte Rolle bei der Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration unter Bei der Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration und hat folglich auch einen Einfluss auf die Aktivierung von P1-Rezeptoren [256].

22

1.4 Zielsetzung

Die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) – ein zentrales Enzym bei der extrazellulären Bildung des immunmodulatorischen Signalmoleküls Adenosin – fungiert als wichtiger Regulator in einer Vielzahl von inflammatorischen Prozessen. Der Einfluss der CD73 auf die Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt wurde bisher nicht untersucht. Zum besseren Verständnis der myokardialen Heilungsprozesse sollte daher die Rolle der CD73 in einem Ischämie/ Reperfusionsmodell an der Maus vor dem Hintergrund folgender Fragestellungen charakterisiert werden:

1. Die Expression von CD73

- Welche Zellen im Herzen exprimieren CD73?
- Gibt es Unterschiede auf den Immunzellen im Herz und Blut?
- Verändert sich das Expressionsmuster nach Herzinfarkt?

2. Die Expression weiterer Moleküle des purinergen Signalsystems

- Das Substrat der CD73 AMP wird insbesondere von der CD39 gebildet.
 Auf welchen Zellen wird die CD39 im gesunden und infarzierten Herz exprimiert?
- Eine Vielzahl weiterer Proteine, wie Connexine, Pannexine, Ektoenzyme, Nukleosidtransporter und intrazelluläre Enzyme (ADA, ADK), beeinflussen die extrazellulären Konzentrationen von Nukleotiden und Nukleosiden. Wie werden diese Moleküle von den Immunzellen im Blut und Herz exprimiert?

3. Die funktionelle Bedeutung der CD73 bei der Heilung nach Herzinfarkt

- Wirkt sich der Verlust der CD73 auf die Herzfunktion nach I/R aus?
- Gibt es Unterschiede bei der Entzündungsreaktion zwischen CD73-defizienten und wildtypischen Mäusen?
- Welche CD73-exprimierenden Zellen im Herzen könnten einen Einfluss auf den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt haben?

2 Material

2.1 Geräte und Apparaturen

Tabelle 2: Ver	wendete Labo	orgeräte und	Apparaturen.
----------------	--------------	--------------	--------------

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214
Autoklav	F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland), 5169
Bio-Plex Multiplex-System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Bio-Plex 200
Bio-Plex Waschstation	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), ProII Waschstation
Durchflusszytometer	<i>BD Biosciences (San Jose, USA),</i> FACSCanto TM II
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Gewebehomogenisator	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Gewebeschneider	Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen, Deutschland)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Thermomixer compact
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Heracell 150 i
Kryostat	Leica Biosystems (Nussloch, Deutschland), CM 1850
Langendorffapparatur	Werkstatt der Physiologie, Universität Düsseldorf
	Datenaufzeichnung: ADInstruments (Spechbach,
	Deutschland), Powerlab/16SP
	Schlauchpumpe: Abimed (Langenfeld, Deutschland)
	Minipuls 3
	Thermostat: Thermo Haake (Karlsruhe, Deutschland) DC1
	Flussmesser: Transonic Systems (Ithaca, USA) T106
MACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), MiniMacs
Magnetrührer	MP Biomedicals (Santa Ana, USA), FastPrep-24
Mikroplatten-Lesegerät	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland), FLUOstar Optima
Mikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland), MX 61
	Digitalkamera: Olympus, F-View, UC30
	Polarisationsfilter: Olympus, U-Ant, U-Pot
Nano-Drop	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), NanoDrop 2000
MR-Microimagingsystem	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), Mini 0.5
MR-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 30mm-birdcage
MR-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 400 MHz Bruker
	AUANCE III Widebore
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Research
Plattenschüttler	IKA Werke (Staufen, Deutschland), MTS 2/4
Real-time PCR Gerät	<i>Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland),</i> StepOnePlus [™] und <i>ViiA</i> 7
System zur Messung der	SA Instruments (Stony Brook, USA), M1025 System
Vitalfunktionen	HLC(DC + 1) is $D = (n+1) + 1 + C + 1$
vakuum-Absaugsystem	HLC (PJOrzneim, Deutschland), AC 04
v ortexer	v vv K International (Darmstaat, Deutschland)
	Beckman Coulter (Brea, USA), MoFIO XDP
Zentritugen	Beckman Coulter (Brea, USA), Allegra X-30K
	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), 5415K
	<i>I nermo Scientific (Rockford, USA)</i> , Heraeus Megatuge 16R

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die nicht gesondert in Tabelle 3 aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Allgemeine Verbrauchsmaterialien sind ebenfalls in Tabelle 3 aufgelistet. Spezielle Materialen, Enzyme und Kits sind direkt im Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden im Abschnitt 3 erwähnt.

Verbrauchsmaterial	Hersteller mit Typenbezeichnung
96-well PCR Platten	Starlab GmbH (Ahrensburg, Deutschland)
Isofluran	Actavis GmbH (Langenfeld, Deutschland)
Klebefolie (PCR)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), microseal "B"
Skalpell	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan), No. 10
Spritze	Becton Dickinson (Heidelberg, Germany), BD Micro Fine 0,5 ml
Zellkulturschalen	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz), 100

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

2.3 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper (anti-Maus) für die FACS-Analysen und -Sortierung.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Firma
CD45	PE	30-F11	Ratte	Miltenyi Biotec
CD45	APC	30-F11	Ratte	BD Biosciences
CD11b	APC	M1/70.15	Ratte	Miltenyi Biotec
CD11b	PE	M1/70	Ratte	BD Biosciences
CD11b	FITC	HL3	Hamster	BD Pharmigen
CD3	APC	145-2C11	Hamster	Miltenyi Biotec
CD3	APC	145-2C11	Hamster	BioLegend
CD8a	APC-H7	53-6.7	Ratte	BD Biosciences
CD4	PerCP-Cy5.5	RM4-5	Ratte	eBioscience
CD25	PE-Cy7	PC61	Ratte	BD Biosciences
FoxP3	PE	FJK-16s	Ratte	eBioscience
CD49b	APC	DX5	Ratte	Miltenyi Biotec
NKp46	APC	29A1.4	Ratte	Miltenyi Biotec
CD45R(B220)	APC-eFluor780	RA3-6B2	Ratte	eBioscience
Ly-6G (Gr-1)	PerCP-Cy5-5	RB6-8C5	Ratte	eBioscience
F4/80	APC-eFluor780	BM8	Ratte	eBioscience
CD11c	PE-Cy7	N418	Hamster	eBioscience
Ly6c	APC-Cy7	AL-21	Ratte	BD Biosciences
Ly6c	FITC	AL-21	Ratte	BD Biosciences
MHCII	FITC	M5/114.15.2	Ratte	Miltenyi Biotec
TER-119	PE	TER119	Ratte	BD Biosciences
CD31	APC	390	Ratte	BioLegend
CD73	FITC	496406	Ratte	R&D Systems
CD39	PE-Cy7	24DMS1	Ratte	eBioscience
CD39	FITC	495826	Ratte	R&D Systems

2.4 TaqMan-Assays

Die quantitative real-time PCR wurde sowohl im *Microfluidic Card-* als auch im 96-well-Format mit *TaqMan Gene Expression Assays* von der Firma Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Assays bestehen aus Primerpaaren und einer fluoreszenzmarkierten Sonde, die am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) markiert sind.

Assay-ID	Genprodukt	Gensymbol
Hs99999901_s1	Eukaryotische 18S rRNA	18S
Mm00607939_s1	β-Actin	Actb
Mm00545720_m1	Adenosin-Desaminase	Ada
Mm00612772_m1	Adenosin-Kinase	Adk
Mm01308023_m1	Adenosinrezeptor A1	Adoral
Mm00802075_m1	Adenosinrezeptor A2a	Adora2a
Mm00839292_m1	Adenosinrezeptor A2b	Adora2b
Mm01296602_m1	Adenosinrezeptor A3	Adora3
Mm00475834_m1	Alkalische Phosphatase	Alpl
Mm00840153_m1	ADP-Ribosyltransferase	Art2b
Mm00477672_m1	ADP-Ribosylzyklase 2	Bst1 (Cd157)
Mm01220906_m1	ADP-Ribozylzyklase 1	Cd38
Mm00501097_m1	Ektonukleotid Pyrophosphatase/	Enpp1
	Phosphodiesterase 1	
Mm00520308_m1	Ektonukleotid Pyrophosphatase/	Enpp3
	Phosphodiesterase 3	
Mm00515447_m1	NTDPase-1	Entpd1 (Cd39)
Mm00439105_m1	Connexin-43	Gjal (Cx43)
Mm00433610_s1	Connexin-37	Gja4 (Cx37)
Mm00501910_m1	Ekto-5'-nukleotidase	Nt5e (Cd73)
Mm00435460_m1	P2X1-Rezeptor	P2rx1
Mm00501787_m1	P2X4-Rezeptor	P2rx4
Mm00473677_m1	P2X5-Rezeptor	P2rx5
Mm00440578_m1	P2X7-Rezeptor	P2rx7
Mm00435471_m1	P2Y1-Rezeptor	P2ry1
Mm02619978_s1	P2Y2-Rezeptor	P2ry2
Mm00445136_s1	P2Y4-Rezeptor	P2ry4
Mm02620937_s1	P2Y6-Rezeptor	P2ry6
Mm00450900_m1	Pannexin-1	Panx1
Mm04212034_m1	Konzentrativer	Slc28a2 (Cnt2)
	Nukleosid-Transporter 2	
Mm01270577_m1	Equilibrativer	Slc29a1 (Entl)
	Nukleosid-Transporter 1	
Mm00432817_m1	Equilibrativer	Slc29a2 (Ent2)
	Nukleosid-Transporter 2	
Mm00446971_m1	TATA-Box-bindendes Protein	Tbp

Tabelle 5: Verwendete TaqMan Gene Expression Assays für die Microfluidic Cards.
Assay-ID	Genprodukt	Gensymbol
MM00443260_g1	Tumornekrosefaktor	Tnf
Mm00440502_m1	NO-Synthase 2 (induzierbare NO-	Nos2 (iNos)
	Synthase)	
Mm00475988_m1	Arginase 1	Argl
Mm00446190_m1	Interleukin-6	Il-6
Mm01178820_m1	Transforming Growth Factor β 1	Tgfb1

Tabelle 6: Verwendete TaqMan Gene Expression Assays für die qRT-PCR im 96-well Format.

2.5 Software

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die Programme Microsoft Word 2003, Microsoft Excel 2003, Microsoft Powerpoint 2003, Adobe Photoshop CS4 und Adobe Illustrator CS4 verwendet. Alle weiteren Computerprogramme sind im direkten Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden unter 3. aufgeführt.

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuchtiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und erhielten Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum*. Alle Experimente wurden mit 9-13 Wochen alten Mäusen durchgeführt und entsprachen den Vorgaben der Tierschutzverordnung. Für fast alle Versuche wurden weibliche Mäuse verwendet. Eine Ausnahme bilden lediglich die in Abschnitt 3.6.3 beschriebenen Experimente zur Expressionsanalyse von Genen des purinergen Systems. Hierfür wurden männliche Tiere verwendet, da diese bei gleichem Alter ein höheres Körper- und somit auch Herzgewicht aufwiesen und daher mehr Zellen aus dem Herzgewebe isoliert werden konnten. Bei den Versuchen, die in den Abschnitten 4.1-4.5, 4.7.1-4.7.3 beschrieben sind, entstammten die wildtypischen C57Bl/6-Mäuse der gleichen Zuchtlinie wie die CD73^{-/-}-Tiere. Für alle weiteren Experimente wurden C57Bl/6-Mäuse von der Firma Janvier (Le Genest Saint Isle, Frankreich) bezogen.

3.1.1 Global und T-zellspezifische CD73^{-/-} Mäuse

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene CD73-Mutanten verwendet: konstitutive (global) CD73^{-/-}-Mäuse und T-zellspezifische CD73^{-/-}-Tiere (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}).

Globale CD73-Verlustmutanten

Die konstitutiv CD73-defizienten Mäuse wurden von Koszalka *et al.* im Jahr 2004 in unserer Arbeitsgruppe generiert [187]. Bei diesen Tieren wurde das Exon II des CD73-Gens mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinasesystems deletiert. Mit dem Cre/loxP-System kann ein DNA-Segment, das zwischen zwei gleichgerichteten *loxP* (locus of <u>x-over P1</u>)-Erkennungsstellen liegt, durch das Enzym Cre-Rekombinase ausgeschnitten und die beiden DNA-Enden wieder ligiert werden [257]. Die Entfernung dieses Genabschnitts führt zum Translationsabbruch nach dem ersten Exon, so dass ein Großteil der Aminosäuresequenz, wie beispielsweise das aktive Zentrum des Enzyms und der GPI-Anker, verloren geht. Im Rahmen der Herstellung globaler CD73^{-/-}-Tiere konnten Koszalka *et al.* zusätzlich Tiere erzeugen, in denen das Exon II von zwei *loxP*-Stellen flankiert ist. Sowohl globale CD73^{-/-} als auch CD73^{flox/flox} - Tiere wurden zunächst auf NMRI-Hintergrund generiert, später aber auf C57Bl/6 Hintergrund

zurückgekreuzt. Die CD73^{flox/flox}-Mäuse wurden verwendet, um T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse zu generieren.

T-zellspezifische CD73-Verlustmutanten

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem kann auch dafür verwendet werden, ein Gen spezifisch in einem einzigen Zell- oder Gewebetyp zu deletieren [258]. Dafür werden zwei transgene Mauslinien benötigt: Eine Linie exprimiert die Cre-Rekombinase nur in bestimmten Zellarten, da das *cre*-Gen unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promoters steht. Der zweite Mausstamm trägt den *loxP*-flankierten Genabschnitt. Durch Verpaarung dieser Tiere können Nachkommen generiert werden, die homozygot eine *loxP*-Flankierung tragen und das Gen für die Cre-Rekombinase enthalten. In diesen Mäusen wird der *loxP*-flankierte Genabschnitt in allen Zellen deletiert, die die Cre-Rekombinase exprimieren.

In dieser Arbeit wurden Tiere verwendet, in denen die CD73 spezifisch in T-Zellen deletiert ist. Das Zuchtschema zur Generierung der T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäuse ist in Abbildung 6 dargestellt. CD73^{flox/flox}-Tiere wurden mit transgenen Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD4-Promoters exprimieren. Die CD4-Cre^{+/-} wurden uns freundlicherweise von Dr. Jochen Hühn aus Braunschweig überlassen.



Abbildung 6: Zuchtschema zur Generierung T-zellspezifischer CD73^{-/-}-**Mäuse.** Zur Herstellung der Tzellspezifischen CD73^{-/-}-Tiere (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}) wurden Mäuse, bei denen die Cre-Rekominase unter der Kontrolle des CD4-Promoters exprimiert wird (CD4-Cre^{+/-}) mit Tieren verpaart, in denen das Exon II des *CD73*-Gens von 2 *loxP*-Stellen flankiert wird (CD73^{flox/flox}). Dabei entstehen Nachkommen, die das CD4-Cre-Transgen enthalten, aber heterozygot für die *loxP*-Sequenzen sind (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox/+}). Daher wurden noch zwei weitere Verpaarungsschritte mit den CD73^{flox/flox}-Mäusen durchgeführt, so dass das *loxp*-flankierte *CD73*-Gen schließlich homozyogot vorlag und die Cre-Rekominase gleichzeitig T-zellspezifisch exprimiert wird (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}).

Aus der F1-Generation wurden diejenigen Nachkommen weiter zur Zucht verwendet, die das CD4-Cre-Transgen enthalten und heterozygot für die *loxP*-Flankierung sind. Diese Tiere wurden abermals mit CD73^{flox/flox}-Tiere verpaart, so dass in der F2-Generation Mäuse entstehen, die homozygot eine *loxP*-Flankierung tragen und das Gen für die Cre-Rekombinase enthalten (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}). Durch eine nochmalige Verpaarung dieser Tiere mit CD73^{flox/flox}-Mäusen entstehen entweder T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}) oder Mäuse, die zwar homozygot den flankierten *CD73*-Genabschnitt enthalten, nicht aber die Cre-Rekombinase. Letztere Tiere exprimieren CD73 und wurden in dieser Arbeit als Kontrollen verwendet. Die Zucht der Tiere wurde von den Mitarbeitern der Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf durchgeführt.

3.2 Zellisolierung

Im Laufe der Doktorarbeit wurden zwei verschiedene Protokolle für die Isolierung von Zellen aus dem Herzen etabliert. Bei beiden Methoden wurde das Herz nach Organentnahme retrograd nach Langendorff mit einer Kollagenase-Lösung perfundiert und verdaut. Mit Hilfe des in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Protokolls 1 wurden Zellen aus dem Herzen isoliert und anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert und quantifiziert (siehe Abschnitt 3.3). Protokoll 2 (Abschnitt 3.2.2) stellt eine abgewandelte Version der ersten Isolierungsmethode dar und verwendet eine andere Kollagenase und ein anderes Puffersystem. Dadurch konnte die Dauer des Gewebeverdaus verkürzt werden und war somit schonender für die Zellen. Der Grund für die Entwicklung dieses Protokolls war, dass die RNA von isolierten und FACSsortierten APCs aus dem Herzen teilweise degradiert war und nicht immer für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) verwendet werden konnte. Protokoll 2 wurde daher zur Isolierung von APCs aus dem Herzen verwendet, um diese anschließend über FACS zu sortieren, RNA zu extrahieren und mittels qRT-PCR spezifische Gene für M1/M2-Makrophagen zu analysieren (siehe Abschnitt 3.6).

3.2.1 Isolierung von Zellen aus dem Mäuseherz (Protokoll 1)

Zur effektiven Isolierung aller im Herzen vorkommenden Zellen wurden publizierte Protokolle zur Extraktion von intakten Kardiomyozyten modifiziert [259,260]. Das Herz wurde direkt nach Entnahme in kalten Waschpuffer überführt. Lunge, Fettgewebe und Thymus wurden entfernt und das Herz über die Aorta kanüliert. Das isolierte Herz wurde über

eine Langendorff-Apparatur retrograd mit oxygeniertem Waschpuffer bei einem Perfusionsdruck von 80 mmHg und 37 °C für 5 min perfundiert, um es von Blut frei zuspülen. Für den Verdau des Gewebes wurde das Herz mit 5 ml Kollagenase-Lösung (1050 U/ml, BioChrome AG, Berlin, Deutschland) rezirkulierend für 35 min bei 37 °C perfundiert. Nach Entfernung der Vorhöfe und Aorta wurde das Herzgewicht bestimmt und das verdaute Herzgewebe mittels Gewebeschneider (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland) zerkleinert. Das Gewebe wurde in kaltem 2%igen BSA-Puffer suspendiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Die Zellsuspension wurde über ein 100 μm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) gefiltert und bei 55 g und 4 °C für 1 min zentrifugiert um Kardiomyozyten von den restlichen Zellen des Herzen zu trennen. Der Überstand mit den nicht-Kardiomyozyten wurde anschließend über einen 40 μm Filter gegeben (BD Biosciences, San Jose, USA), bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert.

Waschpuffer: 4 mM NaHCO₃

10 mM HEPES
30 mM 2,3-Butandion-Monoxim
11 mM Glukose
0.3 mM EGTA
6.6 mM NaCl
0.22 mM KCl
0.1 mM MgCl₂ · H₂O
mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, pH 7.4

Kollagenase-Lösung: 1050 U/ml Kollagenase 2 in Waschpuffer

BSA-Puffer: 2% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) MACS-Puffer in Waschpuffer

MACS-Puffer: 0.5% BSA 5 mM EDTA in PBS, pH 7.4

3.2.2 Isolierung von Zellen aus dem Herzen (Protokoll 2)

Das Mäuseherz wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben entnommen, gespült und verdaut. Anstelle des Waschpuffers wurde *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) und statt der oben genannten Kollagenase wurde die Kollagenase NB 8 *Broad Range* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für den Verdau des Gewebes wurde das Herz für nur 10 min bei 37 °C rezirkulierend perfundiert, wobei die Kollagenase-Lösung während des gesamten Zeitraums mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast wurde. Nach Entfernung der Vorhöfe und Aorta wurde das verdaute Herzgewebe auf Eis in 2%igem BSA-Puffer mit einem Skalpell zerkleinert. Die anschließenden Dissoziations- und Zentrifugationsschritte wurden wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

HBSS-Puffer: 1.26 mM CaCl_2 $0.49 \text{ mM MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ $0.41 \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 5.33 mM KCl $0.44 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 4.17 mM NaHCO_3 137.93 mM NaCl $0.338 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 5.56 mM Dextrosemit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, pH 7.4

Kollagenase-Lösung: 1.32 PZ U/ ml Kollagenase NB 8 *Broad Range* in HBSS-Puffer

3.2.3 Isolierung von Zellen aus dem Blut

Das durch retroorbitale Punktion entnommenes Heparin-Blut wurde zur Lyse von Erythrozyten für 10 min auf Eis mit ACK Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert.

ACK Lysepuffer: 0.15 M NH₄Cl 1 mM KHCO₃ 0.1 mM EDTA pH 7.4

3.3 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) beruht auf der Markierung von Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und der anschließenden optischen Analyse des von den Zellen ausgesendeten Streu- und Fluoreszenzlichts. Dazu werden die Zellen in Einzelzellsuspension durch einen monochromatischen Laserstrahl

geleitet und die dabei entstehende Lichtstreuung und Fluoreszenzemission detektiert. Die Streuung des Lichts hängt dabei von der Größe und Granularität der Zellen ab, während sich die Emission des Fluoreszenzlichts proportional zur Menge der gebundenen Antikörper verhält. Mithilfe der Durchflusszytometrie können somit einzelne Zellen anhand ihrer Morphologie und Antigenexpression unterschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Verfahren verwendet, um Zellen aus dem Blut und Herzen zu identifizieren, zu charakterisieren und die Oberflächenexpression von CD73 und CD39 zu quantifizieren.

3.3.1 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Die aus dem Herzen und Blut isolierten Zellen wurden in MACS-Puffer aufgenommen (Herzzellen: 2.5 ml, Blutzellen: 1 ml). Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen mit 40 µl Fc-Block (Miltenvi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) pro ml Zellsuspension für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils 100 µl der Herzzellsuspension (ca. 1-2.5·10⁵ Zellen) in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 100 µl einer verdünnten Antikörperlösung für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Bei den Blutzellen wurden ca. 1·10⁵ Zellen in einem Volumen von 50 µl eingesetzt und mit 50 µl der Antikörpersuspension bei den oben genannten Inkubationsbedingungen gefärbt. Die Fluorochrom-konjugierten Antikörper wurden dabei in einer Verdünnung von 1:200 oder 1:100 verwendet. Anschließend wurde 1 ml MACS-Puffer zu der Zellsuspension pipettiert und die Zellen nach Zentrifugation (300 g, 4 °C, 10 min) in 100-200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Um tote Zellen zu markieren, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) unmittelbar vor der Messung zu der Zellsuspension gegeben (0.1 µg/ml). DAPI diffundiert bei toten Zellen aufgrund der beschädigten Zellmembran in die Zelle und interkaliert in die DNA-Doppelhelix.

3.3.2 Intrazelluläre Färbung von Foxp3

Der intrazelluläre Nachweis von Foxp3 wurde mit dem *Foxp3 staining buffer kit* (eBioscience, San Diego, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung fixiert und permeabilisiert. Für die Färbung wurden die Zellen mit 4 μ l des Foxp3-Antikörpers (eBioscience, San Diego, USA) in 100 μ l Permeabilisierungspuffer im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.3 Analyse und Auswertung durchflusszytometrischer Daten

Die Analyse der Zellen erfolgte am FACSCantoTM II Durchflusszytometer und die Daten wurden mit der FACSDivaTM Software (BD Bioscience) ausgewertet. Um bei den verwendeten Multiparameter-Analysen positive von negativen Signalen abgrenzen zu können, wurden FMO (*Fluorescence minus one*)-Kontrollen durchgeführt. Anhand dieser Kontrollen wurden die Analysefenster (*gates*) zur Eingrenzung der positiven Populationen festgelegt. Die minimale Anzahl an Zellen um eine Population zu definieren lag bei 150 Ereignissen (*events*). Zur Identifizierung und Charakterisierung unterschiedlicher Zellpopulationen wurden verschiedene zelltypspezifische Marker für die durchflusszytometrische Messung eingesetzt. In Tabelle 7 sind die Antikörper dargestellt, die für die Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen benutzt wurden.

Zellpopulation	verwendete Antikörper zur Charakterisierung der	
	Zellpopulation	
Leukozyten		
zytotoxische T-Zellen	$CD45^+CD3^+CD8^+$	
T-Helferzellen	$CD45^+CD3^+CD4^+$	
regulatorische T-Zellen	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	
B-Zellen	$CD45^{+}CD45R(B220)^{+}$	
NK-Zellen	$CD45^+CD49b(DX5)^+NKp46^+$	
Granulozyten	$CD45^+CD11b^+Ly6g^+$	
Monozyten	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Ly6g ⁻ CD11c ⁻ Ly6c ^{low/high}	
myeloische antigenpräsentierende	CD45 ⁺ CD11b ⁺ Lv6g ⁻ CD11c ⁺ F4/80 ^{+/-} MHCII ^{+/-}	
Zellen (APCs)		
weitere Zelltypen		
Endothelzellen	CD45 ⁻ CD31 ⁺	
Erythrozyten	CD45 ⁻ Ter119 ⁺	
Blutplättchen	CD45 ⁻ CD41 ⁺	

Tabelle 7: Verwendete Zellmarker zur Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen

Die in dieser Arbeit gezeigten Histogramme oder *Dot Plots* wurden mit den Programmen Kaluza (Beckman Coulter, Brea, USA) oder FCS Express 4 Plus (De Novo Software, Los Angeles, USA) erstellt.

3.3.4 Quantifizierung der Antigendichte auf der Zelloberfläche

Um die Oberflächenexpression von CD73 und CD39 auf Immunzellen quantitativ zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse mit dem QuantumTM Simply Cellular[®] kit (Bangs Laboratories, Fishers, USA) durchgeführt. Das Kit enthält 5 verschiedene Latex-Mikropartikel (beads), die mit unterschiedlichen, genau definierten Mengen an Bindungsantikörpern beschichtet sind. Diese Partikel-gekoppelten Antikörper binden den Fc-Teil der monoklonalen FACS-Antikörper, so dass jede bead-Population eine andere Anzahl an Antikörperbindestellen aufweist. Die beads wurden entsprechend den Herstellerangaben mit den gleichen CD73- oder CD39-Antikörpern gefärbt, die auch für die Färbung der Immunzellen verwendet wurden. Per Durchflusszytometrie wurde der Median der Fluoreszenzintensität jeder bead-Population bestimmt und mit der bekannten Antikörper-Bindungskapazität (ABC, antibody binding capacity) korreliert. Mithilfe der so generierten Standardkurve konnte die Fluoreszenzintensität der CD73- oder CD39- positiven Leukozytenpopulationen in die Anzahl an Antikörperbindestellen (antibody binding capacities, ABC) je Zelle umgerechnet werden. Die ABC der Zelle ist demnach ein Maß für die Oberflächenexpression der beiden Ektoenzyme. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der reinen Messung der mittleren Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation besteht darin, dass die ermittelten ABC definierte Werte sind, die einerseits unabhängig von Zytometereinstellungen sind und andererseits nicht von der Leuchtkraft verschiedener Fluorochrome abhängen. Dies ermöglicht es die Oberflächenexpression von CD73 und CD39 direkt zu vergleichen.

3.4 Untersuchung des Einflusses der Kollagenase-Behandlung auf die Ektoenzym-Expression

Um zu untersuchen, ob der enzymatische Verdau des Herzens einen Einfluss auf die Expression von CD39 und CD73 hat, wurden Leukozyten aus dem Blut mit der Kollagenase-Lösung (siehe Abschnitt 3.2.1) behandelt. Dazu wurden 600 μ l Blut entnommen und lysiert. Die Leukozyten wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Jeweils 250 μ l dieser Suspension wurden für 30 min bei folgenden Bedingungen inkubiert:

- 1) in 5 ml MACS-Puffer auf Eis
- 2) in 5 ml Waschpuffer bei 37 °C
- 3) in 5 ml Kollagenaselösung (1050 U/ml in Waschpuffer) bei 37 °C

Anschließend wurde die Expression von CD39 und CD73 auf den verschiedenen Leukozytenpopulationen durchflusszytometrisch untersucht.

3.5 Zellsortierung

Zur Isolation von definierten Zellpopulationen aus Blut- oder Herzzellsuspensionen wurde zum einen die Dichtegradientenzentrifugation in Kombination mit der magnetischen Zellseparation (MACS: *magnetic cell separation*) und zum anderen die durchflusszytometrische Zellsortierung (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) verwendet.

3.5.1 Dichtegradientenzentrifugation

Bevor einzelne Zellpopulationen aus der Herzzellsuspension mittels magnetischer Zellsortierung isoliert werden konnten, wurde zunächst eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dieser Schritt war notwendig um übriggebliebene Kardiomyozyten und Zelldebris abzutrennen, so dass die MACS-Säule bei der anschließenden Zellseparation nicht verstopfte. Hierfür wurden die Zellen nach der Isolation aus dem Herzen (siehe Abschnitt 3.2.1) in 4 ml kaltem PBS resuspendiert und vorsichtig über 6 ml kaltes Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, USA) geschichtet. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 600 g und 4 °C. Entsprechend ihrer Dichte reichern sich die verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Schichten des Gradientensystems an. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens sammeln sich Kardiomyozyten, abgestorbene Zellen und Granulozyten. Die restlichen Leukozyten befinden sich in der Grenzschicht zwischen Histopaque und PBS. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und mit 5 ml PBS bei 420 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und konnten für die magnetische Zellseparation verwendet werden.

PBS: 137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O 2.0 mM KH₂PO₄ pH 7.2

3.5.2 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Bei dieser Trennmethode werden Zellen über spezifische, magnetgekoppelte Antikörper markiert und in einem magnetischen Feld von den unmarkierten Zellen getrennt. Dazu werden die Zellen nach der Inkubation mit den Antikörper-Konjugaten über eine Trennsäule gegeben, die in einem starken Magnetfeld platziert wurde. Die Säulenmatrix besteht aus ferromagnetischen Kügelchen, so dass die markierten Zellen zurückgehalten werden, während unmarkierte Zellen die Trennsäule durchlaufen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen eluiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Trennmethode verwendet um antigenpräsentierende Zellen (APCs) aus dem Herzen aufzureinigen, so dass anschließend Genexpressionsanalysen mit den *TaqMan Microfluidic Cards* durchgeführt werden konnten (Abschnitt 3.6.3).

Zur Isolierung der APCs wurden 400 µl der kardialen Leukozytensuspension nach der Dichtegradientenzentrifugation für 15 min mit 100 µl CD11c-MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) bei 4-8 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 2 ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die Trennsäule (MS *column*, Miltenyi Biotec) im Magnetfeld (MiniMACS Separator, Miltenyi Biotec) gegeben. Die Säule wurde zuvor mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Um verbleibende, nicht markierte Zellen von der Säule zu entfernen, wurde diese viermal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Trennsäule aus dem MACS-Separator entfernt und die markierten CD11c⁺-Zellen mit 1.5 ml MACS-Puffer eluiert. Ein Aliquot dieser Elutionsfraktion wurde mit Antikörper gegen CD45, CD11b und CD11c gefärbt und die Reinheit im Durchflusszytometer überprüft. Die verbleibende Zellsuspension wurde bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die Zellen bis zur anschließenden quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Durchflusszytometrische Zellsortierung (FACS)

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung (FACS) entspricht grundsätzlich dem der oben beschriebenen durchflusszytometrischen Zellanalyse (siehe Abschnitt 3.3). Auch bei der Zellsortierung werden Zellen mit fluoreszenten Antikörpern markiert und in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geleitet. Im Unterschied zu der durchflusszytometrischen Zellanalyse werden die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften verschiedenen Zellen jedoch nicht nur detektiert, sondern auch genutzt um die unterschiedlichen Populationen zu trennen. Die gewünschten Zellpopulationen werden dazu mit einer entsprechenden Software über Analysefenster (*gates*) für die Sortierung ausgewählt. Die Abtrennung einzelner Zellen ist möglich, da der Flüssigkeitsstrahl mit der Zellsuspension schließlich in einzelne Tröpfchen aufbricht, so dass sich in jedem Tröpfchen eine Zelle befindet. Wenn Tröpfchen die zu isolierenden Zellen enthalten, werden diese mit einer elektrischen Ladung versehen und beim Durchqueren eines elektrischen Feldes in Auffangröhrchen abgelenkt. Diese Trennmethode wurde genutzt um T-Zellen, Granulozyten und Monozyten aus der Herz- oder Blutzellsuspension (siehe Abschnitte 3.2.1, 3.2.3) aufzureinigen. Diese Zellen wurden dann verwendet, um Genexpressionsanalysen mit *TaqMan Microfluidic Cards* durchzuführen (siehe Abschnitt 3.6.3). Zusätzlich wurden APCs die nach Protokoll 2 aus dem Herzen extrahiert wurden (Abschnitt 3.2.2) durch FACS-Sortierung isoliert, um anschließend die Expression von M1/M2-Genen mittels qRT-PCR zu untersuchen.

Für die Sortierung von T-Zellen, Granulozyten und Monozyten mussten, auf Grund der geringen Zellzahl, jeweils die Zellsuspensionen von zwei Herzen oder zwei Blutproben vereinigt werden. Nach der Isolation aus dem Herzen wurden die Zellen mit jeweils 5 µl der Antikörper gegen CD45, CD11c, Ly6g und CD3 in 1 ml MACS-Puffer gefärbt. Die Zellen aus dem Blut wurden im gleichen Volumen mit 3 µl der Antikörper gegen CD45, CD11b, Ly6g und CD3 inkubiert. Die Färbung erfolgte für 20 min bei 4-8 °C im Dunkeln. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert, mit DAPI gefärbt und wie folgt sortiert:

APCs	$(CD45^+ CD11c^+ Ly6g^-)$
Granulozyten	(CD45 ⁺ CD11c ⁻ Ly6g ⁺ , hoher <i>side scatter</i> [SSC])
T-Zellen	(CD45 ⁺ CD11c ⁻ Ly6g ⁻ CD3 ⁺ , niedriger SSC)
Monozyten	(CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD11b ⁺ , niedriger SSC)
Granulozyten	(CD45 ⁺ Ly6g ⁺ , hoher SSC)
T-Zellen	(CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD11b ⁻ , niedriger SSC)
	APCs Granulozyten T-Zellen Monozyten Granulozyten T-Zellen

Tote Zellen (DAPI⁺) und Dubletten wurden ausgeschlossen. Um die RNA-Degradation möglichst gering zu halten, wurden die Zellen direkt in 300 μ l RLT-Puffer (RNeasy Micro Kit; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) sortiert. Nach 1·10⁵ Zellen wurde das Auffangröhrchen gewechselt. Alle Zellen wurden direkt nach der Sortierung in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei -20 °C gelagert wurden. Die durchflusszytometrische Zellsortierung erfolgte am MoFlo XDP Sortierer (Beckman Coulter, Brea, USA) und wurde

im zentralen Durchflusszytometrie-Labor der Uniklinik Düsseldorf (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika) durchgeführt.

3.6 Genexpressionsanalysen

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) können spezifische mRNA-Transkripte in einer Probe nachgewiesen und quantifiziert werden. Diese Methode ermöglicht somit die Analyse der Genexpression und -regulation in Zellen. Zur Durchführung der qRT-PCR muss die aus dem Gewebe isolierte mRNA zunächst mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Wie in der klassischen PCR können nun spezifische DNA-Fragmente ausgehend von der cDNA amplifiziert werden [261]. Bei der qRT-PCR kann die zyklisch ablaufende Amplifikation mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden (*TaqMan*) oder interkalierender Farbstoffe (*SYBR-Green*) visualisiert werden.

SYBR-Green lagert sich unspezifisch in DNA-Doppelstränge ein, so dass auch eventuelle Kontaminationen detektiert werden. Über eine Schmelzkurvenanalyse am Ende des PCR-Laufs können die Amplifikationsprodukte anhand ihrer charakteristischen Schmelztemperatur identifiziert und mögliche Nebenprodukte über abweichende Schmelztemperaturen detektiert werden. Auf Grund der höheren Spezifität wurden in dieser Arbeit hauptsächlich sequenzspezifische TaqMan-Sonden verwendet. Diese hybridisieren zwischen den beiden PCR-Primern an einem Abschnitt der zu analysierenden DNA. Die Sonden enthalten einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende. Wird nun Licht durch einen Laser eingestrahlt, kommt es zur Anregung des Reporterfarbstoffs, wobei die Energie jedoch auf Grund der räumliche Nähe zum Quencher strahlungsfrei auf diesen übertragen wird. Das dabei zum Tragen kommende Prinzip wird als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet und bewirkt, dass die intakte TaqMan-Sonde kaum Fluoreszenz emittiert. Synthetisiert die DNA-Polymerase jedoch während der PCR-Reaktion ausgehend vom 3'-Ende des Primers einen neuen DNA-Strang, wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Reporter und Quencher befinden sich nun nicht mehr in ausreichender räumlicher Nähe und der Reporterfarbstoff kann Fluoreszenz emittieren. Sowohl bei der SYBR-Green- als auch bei der TaqMan-Methode nimmt das Fluoreszenzsignal somit proportional zur Vervielfältigung der DNA zu, so dass auf diese Weise die Amplifikation der PCR-Reaktion dargestellt werden kann. Am Anfang der PCR-

Reaktion ist nur wenig DNA vorhanden, so dass die Fluoreszenz nicht das Hintergrundsignal übersteigt. Durch den exponentiellen Anstieg des gebildeten PCR-Produkts wird das Fluoreszenzsignal messbar. Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal über die gesetzte Grundlinie ansteigt, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet. Dieser Wert wird für die Auswertung der qRT-PCR verwendet. Je mehr DNA am Anfang der PCR-Reaktion vorhanden ist, desto niedriger ist der Ct-Wert.

3.6.1 RNA-Isolierung

Die RNA aus MACS- oder FACS-sortierten Zellen wurden mit Hilfe des *RNeasy Micro Kits* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert. Bei einer Zellzahl unter 10⁵ wurden 75 µl RLT-Puffer zu den Zellen pipettiert, bei höheren Zellzahlen wurde 350 µl verwendet. Die Lysate wurden zur Homogenisierung mehrfach durch eine Kanüle (21G) gezogen und die RNA über Trennsäulen, wie vom Hersteller beschrieben, isoliert. Die RNA wurde mittels NanoDrop 2000 Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) quantifiziert und direkt für die pre-Amplifikation oder reverse Transkription eingesetzt.

3.6.2 Reverse Transkription und pre-Amplifikation

Aufgrund der geringen Anzahl der isolierten Zellen aus dem Gewebe oder Blut, war die Menge an extrahierter RNA sehr niedrig (~ 1-5 ng/µl). Um ausreichend cDNA für die anschließende qRT-PCR zu erhalten, wurde das *QuantiTect Whole Transcriptome Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Mit diesem Kit kann das gesamte Transkriptom in einem dreistufigen Prozess amplifiziert werden. Zunächst wird die RNA in cDNA revers transkribiert. Dabei werden zufällige Hexamerprimer (*random primer*) und Oligo-(dT)-Primer verwendet, wodurch die komplette RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Im zweiten und dritten Schritt wird die synthetisierte cDNA ligiert und amplifiziert. Zu Beginn wurden 5 µl der isolierten RNA eingesetzt und die reverse Transkription, Ligation und Amplifikation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die vervielfältige cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung in der qRT-PCR bei -20°C gelagert.

3.6.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Expressionsanalysen der Gene des purinergen Systems (siehe Ergebnisse 4.6) wurden mit 384-well *TaqMan Array Microfluidic Cards* (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt, während typische M1/M2-Gene (siehe Ergebnisse 4.7.2) mittels *TaqMan Gene Expression Assays* (Life Technologies) im 96-well-Format gemessen wurden.

Messung mit TaqMan Microfluidic Cards im 384-well Format

Die *Microfluidic Cards* bestehen aus 384 Reaktionskammern, die jeweils ein Volumen von 1 µl fassen können. In diesen Kammern befinden sich lyophilisierte Sonden und Primerpaare für 28 ausgewählte Gene des purinergen Systems. Die verwendeten Genexpressions-Assays inklusive endogener Kontrollen sind in Abschnitt 2.4 aufgelistet. Pro Karte konnten 4 Proben mit jeweils drei technischen Replikaten gemessen werden. Für die Analyse wurde die preamplifizierte cDNA 1:100 mit ddH₂O verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 µl mit 100 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) vermischt. Pro Probe wurden zwei Befüllungskammern der *Microfluidic Card* mit jeweils 100 µl des PCR-Reaktionsgemisches befüllt. Die Karte wurde zweimal für jeweils eine Minute bei 331 g zentrifugiert, so dass sich die PCR-Proben gleichmäßig über das Kapillarsystem auf die Kammern verteilten. Anschließend wurden die Kammern mit dem *TaqMan Array Microfluidic Card Sealer* (Life Technologies) verschlossen und die 384 PCR-Reaktionen auf der Karte gleichzeitig mit dem *ViiA 7 Real-time PCR System* (Life Technologies) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der ExpressionSuite Software v1.0.2 (Life Technologies).

Messung mit TaqMan Gene Expression Assays im 96-well Format

Die pre-amplifizierte cDNA wurde 1:100 mit ddH₂O verdünnt. Die verwendeten TaqMan-Assays (Life Technologies) sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die PCR-Reaktionen mit den *TaqMan Gene Expression Assays* (Life Technologies) wurden wie folgt auf Eis angesetzt:

2x Fast qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgien)	5.0 µl
20x TaqMan Gene Expression Assay	0.5 µl
ddH ₂ O	2.5 µl
cDNA	2.0 µl
	10.0 µl

Die qRT-PCR-Reaktionen wurden mit dem StepOnePlus[™] Real-time PCR-System (Life Technologies) in 96-well Platten gemessen. Dafür wurden die Reaktionsansätze zunächst zur Aktivierung der Meteor Taq-Polymerase für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 s und die Primerhybridisierung bei 60 °C für

1 min. Die letzten beiden Schritte wurden 40-mal wiederholt. Pro Probe wurden drei technische Replikate gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der StepOnePlus[™]-Software V2.2.2 (Life Technologies).

Auswertung

Um die Genexpression in verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen wurde die Methode der relativen Quantifizierung (\triangle Ct-Methode) angewendet [262]. Dabei wird die Expression der Zielgene auf eine endogene Kontrolle, d.h. ein Gen das in jeder Zelle gleichermaßen exprimiert und nicht reguliert wird, normalisiert. Bei den *Microfluidic Cards* wurde *β-actin* als endogene Kontrolle verwendet, bei den *TaqMan Gene Expression Assays* diente *Rplp0* (60S saures ribosomales Protein P0) als Referenzgen. Zur Quantifizierung wurde zunächst von jeder Probe der Ct-Wert für die Zielgene und das Referenzgen bestimmt. Dabei wurde jeweils der Mittelwert aus den drei Ct-Werten der technischen Replikate ermittelt. Im zweiten Schritt wurde die Differenz zwischen Referenz- und Zielgen gebildet (\triangle Ct-Wert):

$$\triangle Ct = Ct_{Referenzgen} - Ct_{Zielgen}$$

Im Falle einer optimalen Effizienz der qRT-PCR-Reaktion (100%) verdoppelt sich der DNA-Gehalt bei jedem Reaktionszyklus. Somit entspricht ein Ct-Wert, der um eine Einheit kleiner ist als ein zweiter Ct-Wert der doppelten Menge an DNA. Um diesen exponentiellen Anstieg bei der PCR-Reaktion zu berücksichtigen, wird die relative Expression eines Zielgens zur endogenen Kontrolle demnach als $2^{\triangle Ct}$ -Wert angegeben.

3.6.4 Quantifizierung der mRNA-Expression von CD45

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die qRT-PCR auch dafür verwendet, um die Ausbeute der Immunzellen nach der Extraktion aus dem Herzgewebe abzuschätzen. Dazu wurde die mRNA-Menge von CD45 in den einzelnen Fraktionen des Extraktionsprozesses bestimmt. Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten wurden wie unter 3.2 beschrieben aus dem Herz isoliert und mittels Gewebehomogenisator aufgeschlossen (FastPrep-24, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des Nukleinsäureaufreinigungsroboters *Qiacube* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Standardprotokollen des Herstellers. Die reverse Transkription und die anschließende qRT-PCR wurden mit dem *SuperScript III Platinum SYBR Green Two-Step qRT-PCR Kit* (Life Technologies, Carlsbad, USA) und den unten aufgeführten Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen, wurde am Ende des qRT-PCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve. Zur Erstellung dieser Standardkurve wurden $5\cdot10^6$ Leukozyten aus peripherem Blut verwendet. Die Quantifizierung der mRNA-Expression von CD45 wurde von Dr. med. Florian Bönner durchgeführt.

CD45 Primer forward 5'-ATTTGGGGGATTCCAGAAACG-3' reverse 5'-TCCATGGGGTTTAGATGCAG-3'

3.7 Zytokinmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zytokinspiegel in Herzlysaten und im Blutplasma mittels Bio-Plex-System und *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) gemessen. Für die Untersuchungen der Herzlysate wurden zunächst alle zytosolischen Proteine aus dem gesamten Gewebe isoliert. Nach der Messung des Gesamtproteingehaltes wurde eine geeignete Verdünnung eingestellt, so dass die Zytokine mit den oben genannten Methoden gemessen werden konnten. Das Blutplasma konnte direkt für die Zytokinanalysen eingesetzt werden.

3.7.1 Gewinnung von Blutplasma und Präparation der Herzen

Nach retroorbitaler Blutentnahme wurde das Plasma mittels Zentrifugation bei 500 g für 10 min bei 4 °C von den Blutzellen getrennt und bei -80 °C bis zur Messung der Zytokine gelagert. Unmittelbar nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde das Herz entnommen, über die Aorta kanüliert und für 1 min über eine Langendorff-Apparatur retrograd mit kaltem, oxygenierten Waschpuffer bei einem Perfusionsdruck von 80 mmHg von Blut freigespült. Lunge, Fettgewebe, Thymus, Aorta und die Vorhöfe wurden entfernt und das ventrikuläre Gewebe gewogen.

3.7.2 Isolierung von zytoplasmatischen Proteinen aus dem Herzgewebe

Die Proteinisolierung erfolgte mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extractions kits (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Das in dem Kit enthaltene Reagenz CER I wurde vor Verwendung frisch mit einem Protease-Inhibitor (HaltTM Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free, Thermo Fisher Scientific) in einer Verdünnung von 1:100 versetzt. Während der gesamten Isolierung der Proteine wurde auf Eis gearbeitet und alle verwendeten Materialen und Reagenzien wurden vorgekühlt. Das Herz wurde direkt nach der Präparation (Abschnitt 3.7.1) mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe in einem Glas-Homogenisierer unter Zugabe des Reagenz CER I zerstoßen. Das Gemisch wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, kurz gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reagenz CER II zugegeben. Die verwendeten Volumina der beiden Reagenzien richteten sich dabei nach der Menge des Herzgewebes. Für 100 mg Gewebe wurden 500 µl CER I und 27.5 µl CER II eingesetzt. Nach der Zugabe von CER II wurde das Reaktionsgemisch wie vom Hersteller angegeben mit einem Vortex-Schüttler (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemischt, für 1 min auf Eis inkubiert und erneut gemischt. Nach dem Zentrifugieren bei 16.000 g für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und bis zur Messung des Gesamtproteingehaltes oder der Zytokine bei -80 °C gelagert.

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Assay)

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinen [263]. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Peptidbindungen sowie Cystein-, Tyrosin- und Tryptophanresten. Cu⁺-Ionen bilden mit je zwei BCA-Molekülen einen Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm liegt. Die Proteinkonzentration kann über eine Eichgerade mit BSA (*bovine serum albumin*, Serumalbumin vom Rind) aus der gemessenen Absorption bestimmt werden.

Die Gesamtproteinkonzentration in den Herzlysaten wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay-Kits (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) gemessen. Für den BCA-Assay wurde das BCA Reagenz A (Bicinchoninsäure-Lösung) und Reagenz B (Kupfersulfat-Lösung) in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Von dieser Lösung wurden 200 µl pro well in eine 96-well Platte pipettiert und mit jeweils 10 µl der Herzlysate vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C erfolgte die Messung der Extinktion bei 570 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät (FLUOstar Optima, BMG labtech, Ortenberg, Deutschland). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Konzentrationsreihe (25-1000 µg/ml) mit BSA als Standard verwendet.

3.7.4 Zytokinmessung mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik ist ein antikörperbasiertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten "Sandwich"-ELISA sind monoklonale Primärantikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert, die spezifisch an die gesuchten Zytokine in der Probe binden. Die Detektion erfolgt über einen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper, der an ein weiteres Epitop des zu messenden Zytokins bindet und in Gegenwart eines Chromogens eine Farbreaktion induziert. In dem verwendeten Kit wird die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) verwendet, die das farblose Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) unter Umsetzung von H₂O₂ zum blaugefärbten Radikalkation oxidiert. Nach Zugabe einer säurehaltigen Stopplösung wird die enzymatische Reaktion beendet und eine gelbe Diimin-Form gebildet, die bei 450 nm detektiert werden kann. Anhand einer Standardkurve kann die gesuchte Zytokinkonzentration berechnen werden.

Das ELISA-Verfahren wurde verwendet, um die Konzentration von TGF- β in den Herzproben zu messen. Die Lysate wurden 1:30 verdünnt und die TGF- β -Konzentration mit dem *Mouse TGF-beta 1 DuoSet* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Bestimmung der Extinktion erfolge bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (FLUOstar Optima, BMG labtech, Ortenberg, Deutschland).

3.7.5 Zytokinmessung mittels Bio-Plex-System

Mit Hilfe des Bio-Plex[™]-Suspension-Array-Systems können mehrere Proteine gleichzeitig in einer Probe gemessen und quantifiziert werden. Das Prinzip dieser Methode ist vergleichbar mit dem oben beschriebenen Sandwich-ELISA. Die monoklonalen Primärantikörper sind jedoch nicht auf Mikotiterplatten, sondern an fluoreszierende Magnetkügelchen (*beads*) kovalent gebunden. Diese *beads* tragen je nach Zytokin, welches sie detektieren, eine eigene, spezifische Farbkodierung. Binden Zytokine an die immobilisierten Antikörper, können sie mit einem biotinylierten Sekundärantikörper detektiert und durch ein fluoreszierendes Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat sichtbar gemacht werden. Die Messung erfolgt an einem speziellen Durchflusszytometer, dem Bio-Plex 200 Multiplex-System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), welches gleichzeitig die Farbe der Kügelchen und die Phycoerythrin (PE)-Fluoreszenz misst. Die Farbkodierung der *beads* ermöglicht die Identifikation des gemessenen Zytokins und anhand der PE-Fluoreszenzintensität kann die jeweilige Zytokinmenge mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt werden.

Mit Hilfe des Bio-Plex Pro Mouse cytokine Th17 panels (Bio-Rad) wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ und TNF- α gemessen. Vor der Messung wurden die Herzlysate auf eine Konzentration von 500 µg Gesamtprotein/ml eingestellt. Die Blutproben wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit dem Bio-Plex® sample diluent (Bio-rad) verdünnt. Standard, beads, Detektionsantikörper und Streptavidin-PE wurde wie vom Hersteller angegeben verdünnt. Jeweils 50 µl der bead-Lösung wurden pro well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Flachboden, Bio-Plex) pipettiert und gewaschen. Dieser und alle weiteren Waschschritte wurden mit der Bio-Plex ProTM II Waschstation (Bio-rad) durchgeführt. Dabei wird die Mikrotiterplatte auf eine magnetische Trägerplatte gestellt, wodurch die magnetischen beads auf dem Boden der 96-well-Platte fixiert werden. Auf diese Weise kann der Puffer abgesogen oder hinzugefügt werden, während die magnetischen Kügelchen in der Mikrotiterplatte verbleiben. Zu den beads wurden jeweils 50 µl der Standardverdünnungsreihe oder der Herz- und Blutproben hinzugefügt. Es wurden jeweils Duplikate angesetzt. Die Mikrotiterplatte wurde kurz kräftig geschüttelt (30 s, 1100 rpm). Nach eine 30-minütigen Inkubation (RT, bei 750 rpm) und drei Waschschritten wurden jeweils 25 µl der Detektionsantikörper-Lösung in die Wells gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde erneut für 30 s bei 1100 rpm geschüttelt und anschließend für 30 min bei RT und 750 rpm inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde jeweils 50 µl Streptavidin-PE in die Wells pipettiert. Die Platte wurde weitere 10 min inkubiert (RT, bei 750 rpm) und ein letztes Mal gewaschen. Zu jedem Well wurden 100 µl Assay-Puffer hinzugefügt und die Platte kurz geschüttelt (30 s, RT, 1100 rpm). Die Messung erfolgte am Bio-Plex 200 Multiplex-System (Bio-Rad) im sensitiven Modus (high RP1 target).

3.8 Induktion des Herzinfarkts (Ischämie/Reperfusions-Modell)

Die Induktion der Herzinfarkte erfolgte in allen Experimenten durch eine 50-minütige Ligation der linken Koronararterie (*left anterior descending coronary artery*, LAD). Vor der Infarzierung wurden die Mäuse kurz mit Isofluran sediert, intubiert und mit 1.5% igem Isofluran bei einer Atemfrequenz von 150 Atemzügen/min künstlich beatmet und narkotisiert.

Die Maus wurde auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert und mit Elektroden versehen um während der gesamten Operationsdauer ein Elektrokardiogramm (EKG) abzuleiten. Nach Öffnung des Brustkorbs wurde die LAD mit einem 8-0 Polypropylenfaden umschlungen und die Enden durch einen kurzen Polyethylenschlauch (PE-10 Tubus) gefädelt. Durch das Anbringen von kleinen Gewichten an die Fadenenden wurde ein leichter Zug auf den Faden ausgelöst, so dass die LAD verschlossen wurde. Die durch die Okklusion ausgelöste Ischämie wurde im EKG durch eine ST-Streckenhebung kontrolliert. Nach 50 min wurden die Gewichte entfernt, der Faden somit gelockert und das Gefäß wieder geöffnet. Die erfolgreiche Reperfusion war durch eine leichte Rotfärbung des vorher weißen Herzgewebes und durch eine Normalisierung der ST-Strecke erkennbar. Am Ende der Operation wurde die Wunde vernäht und desinfiziert. Die Induktion der Herzinfarkte wurden von Dr. med. Florian Bönner und Dr. med. Zhaoping Ding durchgeführt.

3.9 ¹H-Magnetresonanztomographie (MRT)

Die ¹H-Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren, das zur Darstellung von Organen und Geweben in vivo genutzt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Informationen über die Morphologie und Funktion des Mäuseherzens unter basalen Bedingungen und nach Herzinfarkt zu gewinnen. Die ¹H-MRT nutzt die Tatsache, dass sich Wasserstoffkerne (¹H) aufgrund ihres magnetischen Dipolmoments in einem äußeren Magnetfeld ausrichten und dabei zwei energetisch unterschiedliche Zustände einnehmen können. In der energiearmen Orientierung ist das magnetische Moment des Protons parallel zum äußeren Feld ausgerichtet, während die zum Magnetfeld antiparallele Orientierung energetisch ungünstiger ist. Die magnetischen Momente sind hierbei nicht geradlinig ausgerichtet, sondern bewegen sich in Rotationsbewegungen um die Hauptfeldachse (Präzession). Proben wie Gewebe und Organe enthalten natürlich viele Protonen, so dass bei der MRT immer mehrere Kerndipolmomente gleichzeitig betrachtet werden. Aus energetischen Gründen befinden sich dabei mehr Kerne in der parallelen Orientierung, woraus eine Nettomagnetisierung entlang der Achse des äußeren Magnetfelds resultiert. Die eigentliche Messung beginnt, wenn ein kurzer Radiofrequenzimpuls eingestrahlt wird, somit Energie zugeführt wird und es zur Anregung der Kerne kommt. Dieser Radioimpuls wird senkrecht zum externen Magnetfeld angelegt, so dass der Vektor der Nettomagnetisierung aus der Richtung des Hauptfeldes gekippt wird. Das Maß der Auslenkung richtet sich nach der Stärke und Dauer des Anregungspulses und hat letztendlich einen Einfluss auf die Intensität des gemessenen MR-Signals. Werden die Radiowellen wieder abgeschaltet, kehren die angeregten Kerne und somit auch der Magenetisierungsvektor durch Rotationsbewegungen in den Ausgangszustand zurück. Dabei wird in einer Empfängerspule eine Spannung induziert, die messbar ist und das MR-Signal liefert. Die Spannung nimmt mit zunehmender Relaxation ab und das schwächer werdende Signal wird daher als freier Induktionszerfall (FID, *free induction decay*) bezeichnet. Um aus den MR-Signalen ein Bild zu erhalten, werden zusätzlich zum Hauptmagnetfeld Gradientenfelder in x-, y- und z-Richtung angelegt, wodurch eine räumliche Zuordnung der Messsignale möglich ist. Die ortskodierten Signale können am Computer mit Hilfe der Fourier-Transformation in ein zweidimensionales Bild umgerechnet werden. Unterschiedliche Intensitäten und Kontraste entstehen dabei durch verschiedene Protonendichten und Relaxationszeiten in verschiedenen Geweben.

3.9.1 MRT-Messung

Die Untersuchungen der Mäuseherzen wurden an einem 400 MHz Bruker AVANCE III Widebore NMR-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) mit einer Feldstärke von 9.4 Tesla durchgeführt. Um ortsaufgelöste Messungen durchzuführen, wurde dabei das Microimagingsystem Mini 0.5 in Kombination mit einer 30mm-*birdcage*-Resonatorspule (Bruker) verwendet.

Die Mäuse wurden initial über eine Atemmaske mit 2.5% Isofluran in einem Sauerstoff/Stickstoff-Gemisch narkotisiert. Nach ca. 2-3 Minuten wurde die Isoflurankonzentration auf 1.5% reduziert und während der gesamten Messung aufrechterhalten. Die betäubte Maus wurde in der Halterungsvorrichtung des Probenkopfes platziert und die Vorderpfoten sowie der linke Hinterlauf mit Hilfe von Klebestreifen (Leukoplast, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) an EKG-Elektroden befestigt. Zusätzlich wurde ein Drucksensor zur Kontrolle der Atmung auf den Rücken der Tiere angebracht. Anschließend wurde die Maus mit dem Halterungssystem in den Probenkopf geschoben und der gesamte Aufbau vertikal in den Magneten eingebracht und fixiert. Um die Körpertemperatur der Maus während der gesamten Messung beizubehalten wurde die Temperatur im Spektrometer auf 36 °C eingestellt. Im Magneten wurde die Atmung und die EKG-Signale mit Hilfe des M1025 Systems (SA Instruments, Stony Brook, USA) überwacht. Das Gerät wurde zusätzlich verwendet um die Datenaufnahme auf den QRS-Komplex sowie auf die Ausatmungsphase zu triggern, um kardiale und respiratorische Bewegungsartefakte zu unterdrücken. Nach Aufnahme einer Übersichtsaufnahme und eines orthogonalen Scans zur Lokalisierung des Herzens wurden 6-8 Kurzachsenschnitte von 1 mm Schichtdicke aufgenommen, so dass das gesamte Herz abgebildet wurde. Dazu wurde eine respirationsgetriggerte cine-FLASH (*Fast Low Angle Shot*)-Sequenz (*Field Of View* (FOV) von 3x3 cm², Matrix 128x128 nach Zerofilling 256x256) verwendet. Pro Schicht wurden 15 Bilder für einen Herzzyklus aufgenommen, so dass Diastole und Systole eindeutig bestimmt werden konnten. Es wurde zusätzlich ein Langsachsenschnitt durch den Apex gelegt, mit dem die genaue Positionierung der Kurzachsenschnitte vorgenommen werden konnte.

3.9.2 Bestimmung morphologischer und funktioneller Parameter

Die Auswertung der akquirierten Bilder erfolgte mit der Software Paravision (Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Die Konturen des Endokards wurden in der Enddiastole und Endsystole mit dem ROI (<u>Region Of Interest</u>)- Werkzeug in allen Kurzachsenschnitten markiert, um daraus die endokardialen Flächen des linken Ventrikels (LV) planimetrisch zu bestimmen. Durch Multiplikation dieser Flächen mit der Schichtdicke (1 mm) können die Volumina der einzelnen Kurzachsenschnitte berechnet werden. Die Summation über alle Schichten ergibt das enddiastolische (EDV) und endsystolische (ESV) Volumen. Daraus können folgende Parameter abgeleitet werden:

• Schlagvolumen (SV): Menge an Blut, die pro Herzschlag aus dem Herzen in die Peripherie gepumpt wird

$$SV(\mu l) = EDV - ESV$$

 Ejektionsfraktion (EF): prozentualer Anteil des bei der Kontraktion ausgeworfenen Blutes (SV) im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen der Herzkammer (EDV)

$$EF(\%) = SV/EDV$$

 Herzzeitvolumen (HZV): Menge an Blut, die pro Minute aus dem Herzen in die Peripherie gepumpt wird

$$HZV (ml min^{-1}) = SV \cdot Herzfrequenz (HF)$$

Für die Berechnung der linksventrikulären Masse (LVM) muss das Gesamtvolumen des linken Ventrikels bestimmt werden. Dazu wurden die Konturen des Epikards in der Enddiastole markiert, die derart eingekreiste Außenfläche (A_a) mit der Schichtdicke multipliziert und die einzelnen Teilvolumina über alle Schichten addiert. Die Differenz zwischen Gesamt- ($V_{gesamt}(D)$) und Innenvolumen (EDV) des linken Ventrikels ergibt das Myokardvolumen, das unter Kenntnis der spezifischen Dichte des Myokards (1.05 g/ml) zur Bestimmung der LVM verwendet wird. Die Myokardmasse wurde außerdem in Relation zum Körpergewicht der Maus gesetzt (rel. LVM).

- linksventrikuläre Masse (LVM): $LVM(mg) = [V_{gesamt}(D) EDV] \cdot 1.05$
- LVM relativ zum Körpergewicht: rel. LVM (mg/g) = LVM/ Körpergewicht

Die linksventrikuläre Wanddicke wurde anhand eines mittventrikulären Kurzachsenschnittes in der Enddiastole ermittelt. Bei der Bestimmung wird davon ausgegangen, dass sich epi- und endokardiale Flächen des linken Ventrikels durch Kreise beschreiben lassen, deren Radiendifferenz ($r_a - r_i$) dann den durchschnittlichen Wanddurchmesser (d_{mitt}) wiedergeben (siehe Abbildung 7). Zur Ermittlung der Innenfläche (A_i) wurde die ROI auf die endokardiale Grenzlinie des linken Ventrikels gelegt, wobei die Papillarmuskeln mit zur endokardialen Fläche gezählt wurden.

• linksventrikuläre Wanddicke (d_{mitt}): d_{mitt} (mm) = $r_a - r_i = \sqrt{A_a/\pi} - \sqrt{A_i/\pi}$



Abbildung 7: Bestimmung der linksventrikulären Wanddicke d_{mitt} mit Hilfe des epikardialen und endokardialen Radius.

3.9.3 Wandbewegungsanalyse

Zusätzlich zu den oben genannten funktionellen und morphologischen Parametern können auch regionale Wandbewegungsstörungen mittels MRT untersucht werden. Eine Bewegungsanomalie in einem Bereich der Ventrikelwand ist Ausdruck für eine gestörte Muskelkontraktion und kann mit Hilfe der fraktionellen Verkürzung (fractional shortening, FS) beschrieben werden. Die FS ist die prozentuale Durchmesserverkürzung des linken Ventrikels und berechnet sich aus dem Verhältnis von enddiastolischem und endsystolischem Durchmesser. Anders als bei der Echokardiographie, bei der die FS ähnlich zur EF ein globales Maß für die Pumpleistung des Herzens darstellt, wird die FS bei dem hier verwendeten MRT-basierten Verfahren in verschiedenen Sektoren über den gesamten Querschnitt des linken Ventrikels bestimmt. Dazu wurden Kurzachsenschnitte in 200 Sektoren unterteilt und die Durchmesserverkürzung für jeden Abschnitt berechnet. Für die Auswertung wurde jeweils der Transversalschnitt unterhalb der mittventrikulären Schicht gewählt, da sich der Infarkt durch die Okklusion der LAD besonders im Bereich der Vorderwand und des Apex manifestiert. Endokardiale Grenzlinien wurden mit dem ROI-Werkzeug in der Enddiastole und Endsystole nachgezogen, wobei die Konturen der Papillarmuskeln ausgespart wurden. Die anschließende Wandbewegungsanalyse wurde mit einer eigenen Software (entwickelt von Dr. rer. nat. Christoph Jacoby) durchgeführt. Beginnend bei der Insertion des rechten in den linken Ventrikel wurde das Herz ausgehend von einem berechneten Schwerpunkt in 200 Sektoren unterteilt (Abbildung 8). Für jeden dieser Sektoren wurde die Durchmesserverkürzung bei der Kontraktion als prozentualer Wert berechnet. Insgesamt können die 200 Sektoren vier Bereichen zugeordnet werden: der Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie dem Septum (Abbildung 8).



Abbildung 8: Wandbewegungsanalyse des linken Ventrikels mittels MRT. (A) Links: Gesundes Herz in der Enddiastole. Rechts: Um Wandbewegungsstörungen zu lokalisieren und quantifizieren, wird der linke Ventrikel in 200 Sektoren unterteilt. Die 200 Sektoren können den Bereichen Vorderwand (rot), Seitenwand (gelb), Hinterwand (blau) und Septum (grün) zugeordnet werden. (B) Für jeden Sektor wird die prozentuale Durchmesserverkürzung (= fraktionelle Verkürzung, FS) während der Kontraktion bestimmt. Die FS berechnet sich aus dem Verhältnis von enddiastolischem und endsystolischem Durchmesser. Links ist ein gesundes Mäuseherz gezeigt, rechts ein Herz 2 Wochen nach I/R.

3.10 Histologie

Nach der Entnahme wurde das Herz kurz in PBS gewaschen, in *KP-Cryo Compound* (Klinipath, Duiven, Niederlande) eingebettet und in -40 °C kaltem Isopentan eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 8 µm vom Apex bis zur Herzbasis angefertigt, auf einen Glasobjektträger aufgebracht und bei -20 °C gelagert.

3.10.1 Siriusrot-Färbung

Mit Hilfe des Farbstoffes Siriusrot können Kollagenfasern rot angefärbt werden [264]. Das Molekül enthält mehrere Sulfonsäuregruppen, die an die basischen Seitenketten der im Kollagen vorkommenden Aminosäuren binden können. Dabei lagert sich das langkettige Siriusrot-Molekül parallel an die Kollagenfaser an und färbt diese rot.

Vor der Färbung wurden die Schnitte für etwa 1 h bei RT aufgetaut. Anschließend wurde das Gewebe mit Pikrinsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 3 min fixiert, in einen Färbekasten nach Hellendahl überführt und kurz mit Leitungswasser gewaschen. Die Färbung erfolgte für 40 s in der unten angegebenen Siriusrot-Färbelösung. Nach einem kurzen Waschschritt in ddH₂O wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Objektträger in dem Färbekasten nacheinander in 70%, 80%, 90% sowie 96% Ethanol für 1 min getaucht, und abschließend für 5 min in 100% Ethanol gestellt. Nach 10 min Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit einem Deckgläschen (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) und Eindeckmedium (Roti-Histokitt II, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Siriusrot-Färbelösung: 0.1 g Siriusrot 100 ml gesättigte Pikrinsäure

3.10.2 Bestimmung von Kollagen I und III mittels Polarisationsmikroskopie

Zur Bestimmung der beiden Kollagentypen I und III wurde die Siriusrot-Färbung in Kombination mit der Polarisationsmikroskopie angewendet [264]. Hierzu wird unter dem Objekttisch ein Polarisationsfilter angebracht, der den von unten kommenden Lichtstrahl linear polarisiert, so dass nur eine Schwingungsebene des Lichtes durchgelassen wird. Oberhalb des Objekttisches wird ein zweiter Polarisationsfilter, der Analysator, eingebaut. Ist dieser im 90° Winkel zu dem Polarisator angeordnet, wird das polarisierte Licht nicht durchgelassen und das Blickfeld des Mikroskops erscheint schwarz. Wenn ein Gewebeschnitt auf dem Objekttisch zwischen den beiden Polarisationsfiltern platziert wird, kann die Schwingungsebene des polarisierten Lichts an doppelbrechenden (anisotropen) Substanzen gedreht werden, so dass das polarisierte Licht den zweiten Filter passieren kann. Doppelbrechende Strukturen, wie beispielsweise Kollagenfasern werden somit sichtbar, während isotrope Bereiche schwarz bleiben. Durch die Anlagerung des Farbstoffs Siriusrot wird die natürliche, schwache Anisotropie des Kollagens verstärkt und die Fasern erscheinen je nach Durchmesser in unterschiedlichen Farben. Kollagen I ist in dicken Faserbündeln organisiert, die im Polarisationsmikroskop orange-rot erscheinen. Dünnere, locker angeordnete Kollagenfasern vom Typ III zeigen dagegen eine grüne Färbung [265].

Die Bildaufnahme der Gewebeschnitte erfolgte über eine am Mikroskop (Olympus BX 61 Mikroskop; Hamburg, Deutschland) befestigte Digitalkamera (UC30, Olympus). Polarisator (U-POT, Olympus) und Analysator (U-Ant, Olympus) wurden so zueinander gedreht, dass der Lichtdurchlass minimal wurde und das Präparat mit Ausnahme der Kollagenfasern schwarz erschien. Pro Herz wurde ein repräsentativer mittventrikulärer Schnitt analysiert und jeweils ein natives und ein Polarisationsbild im Bereich der Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie des Septums in 10-facher Vergrößerung angefertigt. In jedem der vier Bereiche wurden die Anteile von Kollagen I und III mit Hilfe der Software Image J Version 1.44 (NIH) bestimmt und anschließend pro Herzpräparat gemittelt. Die Narbenregion wurde zunächst anhand des nativen Bildes mit dem Selection Brush-Werkzeug markiert und die ausgewählte ROI auf die Polarisationsaufnahme übertragen. Das digitalisierte Bild wurde mit der Funktion colour deconvolution (Azan-Mallory) in die Grundbestanteile blau, rot und gelb zerlegt. Das dabei generierte blaue Bild wurde für die Bestimmung von Kollagen I und das rote für die Quantifizierung von Kollagen III genutzt. Nach Invertion der Farben wurde ein Intensitätsbereich für die Bestimmung der Kollagenanteile festgelegt (blau: 160-180; rot: 60-125). In der anschließenden Analyse (Analyse Particles-Werkzeug) wurden Signale innerhalb dieses Bereiches als positiv gewertet und somit der Anteil der beiden Kollagentypen an dem jeweiligen Bildausschnitt berechnet.

3.11 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit den Programmen SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Chicago, USA) oder Microsoft Excel 2003. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichungen (SD) angegeben. Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen wurde entweder ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Waren die untersuchten Daten normalverteilt und Varianzhomogenität gegeben wurde der T-Test durchgeführt. In einigen Fällen wurde die Voraussetzung der Normalverteilung nicht erfüllt und daher der Mann-Whitney-U-Test angewendet. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der CD73 in der Entzündungsreaktion nach Ischämie/Reperfusion im Mäuseherzen zu untersuchen und somit zu dem Verständnis der Heilungsprozesse nach Myokardinfarkt beizutragen. Um die Bedeutung der CD73 unter pathologischen Bedingungen zu bewerten, war es zunächst notwendig, die Expression der CD73 auf den Zellen des gesunden Herzen zu untersuchen. Dies erforderte die Entwicklung einer Methode, mit der residente Immunzellen aus dem Herzen effektiv isoliert werden konnten (Kapitel 4.1). Durch Anwendung der entwickelten Protokolle wurde die Expression der CD73 unter basalen Bedingungen und nach Infarkt in Herz und Blut untersucht (Kapitel 4.2-4.5). Um zusätzlich einen Überblick über das gesamte purinerge Signalsystem zu bekommen, wurde die Expression ausgewählter Gene auf mRNA-Ebene analysiert (Kapitel 4.6). Die funktionelle Rolle der CD73 bei den Heilungsprozessen nach Herzinfarkt sollte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen CD73-Mutanten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Herzfunktion, die Immunreaktion und die Narbenbeschaffenheit nach Infarkt in konstitutiven und T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen bestimmt und mit wildtypischen Mäusen verglichen (Kapitel 4.7).

4.1 Residente Immunzellen im Herzen der Maus

Während die Infiltration von Immunzellen in das Herzgewebe nach Myokardinfarkt gut charakterisiert ist [16,63,266], ist die Verteilung von Immunzellen im Herzen unter basalen Bedingungen bislang nur unvollständig untersucht. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht residente Immunzellen aus dem Herz effektiv zu isolieren, um diese anschließend mittels Durchflusszytometrie zu charakterisieren und quantifizieren.

Als Grundlage für die Gewinnung der Immunzellen dienten Protokolle, die zur Isolierung von intakten Kardiomyozyten etabliert worden sind [259,260]. Nach Organentnahme wurde das isolierte Herz nach Langendorff mit einer Kollagenase-Lösung retrograd perfundiert und verdaut. Nach Entfernung der Vorhöfe und der Aorta wurde das Herzgewebe zerkleinert, in kaltem Puffer dissoziiert und gefiltert. Die entstandene Einzelzellsuspension konnte durch Zentrifugation in eine Fraktion mit intakten, langgestreckten (*rod shaped*) Kardiomyozyten und eine Fraktion mit allen übrigen Zellen des Herzens, den nicht-Kardiomyozyten, getrennt

werden (Abbildung 9A+B). Eine detaillierte Beschreibung der Zellisolation aus dem Herzen ist im Abschnitt 3.2 dieser Arbeit zu finden. Entscheidend bei dieser Methode ist, dass die Kardiomyozyten intakt blieben und so Hintergrundfluoreszenz durch Zelldebris in der nicht-Kardiomyozyten-Fraktion verringert wurde. Dies ermöglicht dann die Durchführung einer sensitiven FACS-Analyse aller kardialen Zellpopulationen. Wie in Abbildung 9C zu sehen ist, können drei große Zellpopulationen im Herzen der Maus detektiert werden: Endothelzellen (CD31⁺), Leukozyten (CD45⁺) und CD31⁻CD45⁻ Zellen, die vermutlich im Wesentlichen Fibroblasten und glatte Muskelzellen umfassen. Insgesamt enthält das gesunde Mäuseherzen unter basalen Bedingungen $20.0\pm9.1\cdot10^3$ Endothelzellen/mg Herzgewebe und überraschenderweise $2.3\pm0.9\cdot10^3$ Leukozyten/mg Herzgewebe (n = 5). Um auszuschließen, dass es sich bei den detektierten Leukozyten um eine Kontamination von Immunzellen aus dem Blut handelte, wurde die Anzahl der Erythrozyten (TER-119⁺ Zellen) in der Einzellsuspension bestimmt. Im peripheren Blut ist das physiologische Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten normalerweise 1000:1. In der nicht-Kardiomyozyten-Fraktion ist das Verhältnis von Erythrozyten zu Immunzellen jedoch lediglich 2:1 (Abbildung 9D), so dass nur 0.19±0.11% der im Herzen detektierten Leukozyten aus dem Blut stammen können (n = 5).

Um eine Aussage über die Effizienz der Leukozytenisolation aus dem Herzgewebe zu treffen, musste zunächst untersucht werden, wie viel der Gesamt-Immunzellzahl aus dem Herzen mit der oben beschriebenen Methode aus dem Gewebe extrahiert werden konnten. Um die Ausbeute der Immunzellen nach der Extraktion aus dem Gewebe abzuschätzen, wurde daher die mRNA des Leukozytenmarkers CD45 in den einzelnen Fraktionen des Extraktionsprozesses mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Insgesamt können 77±4 % der gesamten kardialen mRNA von CD45 in der nicht-Kardiomyozyten-Fraktion wiedergefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass etwa ³/₄ aller Immunzellen des Herzens mit der oben beschriebenen Methode aus dem Herzen gewonnen werden können.

Um die residenten Immunzellen im Herzen weiter zu charakterisieren, wurde eine FACS-Analyse mit verschiedenen zelltypspezifischen Markern durchgeführt. In Abbildung 10A ist die verwendete Strategie zur Charakterisierung der verschiedenen kardialen Immunzellpopulationen dargestellt.

56



Abbildung 9: Die verschiedenen Zellfraktionen des Mäuseherzens unter basalen Bedingungen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen intakter Kardiomyozyten (A) und nicht-Kardiomyozyten (B) nach Isolation aus dem Herzen. Blau = Zellkerne, Rot = $CD45^+$ -Zellen. C: Repräsentative FACS-Analyse der nicht-Kardiomyozyten-Fraktion. Schwarz = $CD45^+$ Zellen , hellgrau = Endothelzellen ($CD31^+$), dunkelgrau = $CD31^-CD45^-$ Zellen. D: Repräsentative Analyse der Anzahl von Erythrozyten (TER-119⁺) und Leukozyten ($CD45^+$) in der nicht-Kardiomyozyten-Fraktion. Im peripheren Blut wird ein Verhältnis von Erythrozyten zu Leukozyten von 1000:1 angenommen. Da in der nicht-Kardiomyozyten Fraktion ein Verhältnis von 2:1 gemessen wurde, errechnet sich eine Kontamination von ~0.2% mit Leukozyten aus dem Blut (n =5).

Zunächst wurden alle Leukozyten im Herzen über die Expression von CD45 identifiziert. Tote Zellen wurden mittels DAPI angefärbt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Wie im Abschnitt 3.3 beschrieben, wurden verschiedene Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, um die lebenden CD45⁺ Zellen in verschiedene Subpopulationen zu unterteilen. Lymphozyten, die sich generell durch einen niedrigen *side scatter* (SSC) auszeichnen, wurden mithilfe des Markers CD45R(B220) in B-Zellen und mit CD3 in T-Zellen unterteilt. T-Zellen konnten weiter in zytotoxische T-Zellen (CD3⁺CD8⁺), T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺) und regulatorische T-Zellen (CD3⁺CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺) differenziert werden. Myeloische Zellen wurden als CD11b⁺ Zellen charakterisiert und weiter unterschieden in CD11c⁺ Zellen (APCs, antigenpräsentierende Zellen), CD11c⁻ Zellen (Monozyten) und Ly6g⁺ Zellen (Granulozyten). Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden mit Antikörpern gegen CD49b(DX5) und NKp46 angefärbt.



Abbildung 10: Leukozytenpopulationen im Herzgewebe der Maus unter basalen Bedingungen. A: Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung der kardialen Immunzellpopulationen per Multiparameter-Durchflusszytometrie (*gating* Strategie). Leukozyten wurden aufgrund der Expression von CD45 identifiziert. Tote Zellen wurden mittels DAPI angefärbt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Mit Hilfe zellspezifischer, Fluorochrom-markierter Antikörper konnten lebende CD45⁺ Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Lymphozyten, charakterisiert durch einen niedrigen *side scatter* (SSC), wurden mithilfe des Markers CD45R(B220) in B-Zellen und mit CD3 in T-Zellen unterteilt. Myeloische Zellen wurden als CD11b⁺ Zellen charakterisiert und weiter unterschieden in CD11c⁺ Zellen (APC, antigenpäsentierende Zellen) und Ly6g⁺ Zellen (Granulozyten). **B:** Quantitative Darstellung der Leukozytenpopulationen im gesunden Herzen der Maus. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=5 Tiere.

Wie in Abbildung 10B gezeigt, besteht die größte Leukozytenpopulation im basalen Herzen aus myeloischen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells* = APCs; 73.2 \pm 2.2 % der gesamten Immunzellen; n = 5). Die kardialen APCs exprimieren die Oberflächenmarker CD11b sowie CD11c und weisen eine hohe Autofluoreszenz auf. Insgesamt sind 71.0 \pm 9.1 % dieser Zellen positiv für den Marker F4/80, und 76.2 \pm 2.1 % der Zellen exprimieren zusätzlich das Antigen MHCII. Auch T- und B-Zellen sowie Monozyten können unter basalen Bedingungen detektiert werden, wobei sich deren Anzahl jeweils in etwa der gleichen Größenordnung befindet (T-Zellen: 86 \pm 30, B-Zellen: 138 \pm 75, Monozyten: 89 \pm 40 Zellen/mg Herzgewebe, siehe Abbildung 10B). Monozyten können grundsätzlich in zwei weitere Populationen unterteilt werden: inflammatorische Ly6c^{high} Monozyten und reparative Ly6c^{low} Monozyten [267,268]. Unter basalen Bedingungen ist die Anzahl an inflammatorischen Monozyten gering, wohingegen 75.3±16.7 % (n=5) zu den reparativen Ly6c^{low} Monozyten zählen. Die Anzahl der klassischen Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen (18±7 Zellen/mg Herzgewebe) und Granulozyten (22±8 Zellen/mg Herzgewebe) sind unter basalen Bedingungen im Herzen ebenfalls sehr niedrig (Abbildung 10B).

4.2 Expression von CD73 und CD39 auf residenten kardialen Immunzellen

Mit der in 4.1 beschriebenen Methode zur Isolation von residenten Immunzellen aus dem Herzen war es nun möglich, die Expression von CD73 und CD39 auf der Oberfläche residenter, kardialer Leukozyten mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Ziel dieser Expressionsuntersuchungen war es, den Beitrag der verschiedenen Leukozytenpopulationen an der extrazellulär stattfindenden ATP-Degradation im Herzen unter basalen Bedingungen zu beurteilen. Eine Grundvoraussetzung für die Analyse von Oberflächenproteinen auf isolierten Zellen ist generell, dass sich die Expression durch den Extraktionsprozess aus dem Gewebe nicht verändert. Insbesondere die zum Gewebsverdau verwendeten proteolytischen Enzyme können Epitope auf der Zelle modifizieren oder aber die Abspaltung (shedding) von membrangebundenen Oberflächenmolekülen induzieren und folglich die Detektion durch FACS-Antikörper verhindern [269-271]. Da sowohl CD73 als auch CD39 in Folge verschiedener Stimuli von der Zellmembran abgespalten werden können [272-274], wurde zunächst untersucht, ob die zum Verdau verwendete Enzymlösung aus Kollagenase, Caseinase, Clostripain und Trypsin einen Einfluss auf die Expression dieser Ektoenzyme hat. Dafür wurden Leukozyten aus dem Blut isoliert und mit der Kollagenase-Lösung bei ähnlichen Bedingungen wie für die Präparation des Herzens (30 min, 37 °C, 1050 U/ml) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Leukozyten für die gleiche Zeit auf Eis oder aber nur mit Waschpuffer bei 37 °C inkubiert. Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigt die anschließende FACS-Analyse bezüglich der Expression von CD73 und CD39 auf zytotoxischen T-Zellen oder T-Helferzellen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen. Auch auf myeloischen Zellen wie Monozyten und Granulozyten konnte keine Änderung der Ektoenzym-Expression beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

Demnach hat weder die Temperatur von 37 °C, der Waschpuffer, noch die Kollagenase oder die in Spuren enthaltenden, anderen proteolytischen Enzyme einen Einfluss auf die

Expression der Ektoenzyme. Dies ist eine zentrale Voraussetzung für die Expressionsbestimmung auf kardialen Leukozyten.



Abbildung 11: *Ex vivo* Behandlung von Blut-Leukozyten mit der zum Herzverdau verwendeten Kollagenase-Lösung. Isolierte Leukozyten aus dem Blut wurden für 30 min entweder auf Eis, bei 37 °C in Waschpuffer, oder bei 37 °C in der Kollagenase-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD73 (rot) und CD39 (blau) auf zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei sollte untersucht werden, ob die Enzymbehandlung einen Einfluss auf die Expression der Ektoenzyme hat. Graue Histogramme = *fluorescence minus one* Kontrolle (FMO).

Das gemessene Expressionsmuster der beiden Ektoenzyme unter basalen Bedingungen im Mäuseherzen ist in Abbildung 12 dargestellt. Bei der Analyse wurde zum einen der Anteil der CD73- oder CD39-exprimierenden Zellen in den verschiedenen Leukozytenpopulationen bestimmt (Abbildung 12A). Zum anderen wurde die Anzahl der CD73- oder CD39-Moleküle auf der Zelloberfläche, also die Expressionsdichte der beiden Ektoenzyme auf den jeweiligen CD73- oder CD39-positiven Immunzellpopulationen ermittelt (Abbildung 12B). Um mögliche Änderungen im Expressionsmuster beim Übergang vom Blut in das Gewebe zu bestimmen, wurde zusätzlich die Expression der beiden Ektoenzyme auf peripheren Blut-Leukozyten bestimmt (Abbildung 12C+D).

Wie in Abbildung 12A gezeigt, wird CD73 hauptsächlich von T-Zellen (>40 %) exprimiert, während die Expression auf B-Zellen gering ist. Auch kardiale myeloischen Zellen weisen eine sehr niedrige CD73-Expression auf, mit Ausnahme der Granulozyten, von denen 21.9±8.2% das Ektoenzym auf der Zelloberfläche exprimieren. Das Expressionsniveau der

Ekto-5'-Nukleotidase ist innerhalb der verschiedenen T-Zellpopulationen und der NK-Zellen mit 20-24 \cdot 10³ CD73-Molekülen pro Zelle vergleichbar (Abbildung 12B). Auf den CD73⁺ Granulozyten ist die Oberflächenexpression mit 9.8±2.4 \cdot 10³ Molekülen pro Zelle hingegen geringer. Im Gegensatz zu CD73 kann die Ektonukleotidase CD39 auf allen kardialen Immunzellpopulationen detektiert werden. Wie in Abbildung 12A gezeigt, ist das Expressionsmuster von CD39 auf den verschiedenen Leukozytenpopulationen fast entgegengesetzt zu dem von CD73: Auf T-Zellen ist die Expression vergleichsweise gering, auf myeloischen Zellen dagegen hoch. Beispielsweise wird CD39 von fast allen APCs (99.6±0.4 %) exprimiert, wohingegen CD73 auf diesen Zellen kaum exprimiert wird (0.1±0.2 %). Insgesamt ist die Expressionsdichte von CD39 generell höher als die von CD73, mit Ausnahme der regulatorischen T-Zellen (Abbildung 12B). Das mit Abstand höchste Expressionslevel von CD39 wurde auf APCs detektiert (741.8±84.7 \cdot 10³ Moleküle/Zelle).



Abbildung 12: Expression von CD73 und CD39 auf Leukozyten im Herzen und Blut unter basalen Bedingungen. A: Anteil der CD73- und CD39-positiven Zellen an der gesamten Leukozytenpopulation im Herzen. B: CD73 und CD39 Oberflächenexpression auf den verschiedenen Immunzellen im Herzen. C: Anteil der CD73- und CD39-positiven Zellen an der gesamten Leukozytenpopulation im Blut. D: CD73 und CD39 Oberflächenexpression auf den Immunzellen im Blut. Für die Bestimmung der Oberflächenexpression wurde die Anzahl der Antikörperbindestellen für CD73 oder CD39 auf der jeweiligen Zelloberfläche durchflusszytometrisch ermittelt (siehe Methoden 3.3.1). Die Bestimmung erfolgte dabei ausschließlich auf den CD73- oder CD39-positiven Zellen einer Population. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=5 Tiere. n.d. = nicht detektierbar.

Bei den detektierten, residenten Immunzellen im Herzen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Leukozyten, die ursprünglich aus dem Blut stammen und in das Herzgewebe eingewandert sind. Daher wurde zusätzlich die Expression der beiden Ektoenzyme auf peripheren Blut-Leukozyten bestimmt (Abbildung 12C+D). Das Expressionsmuster der beiden Ektoenzyme ist dem im Herzen generell ähnlich (Abbildung 12C). Auch im Blut wird CD73 hauptsächlich auf T-Zellen exprimiert: ~ 55-94% der verschiedenen T-Zellpopulationen exprimieren das Ektoenzym. Dagegen wird CD39 hauptsächlich von B-Zellen (80.1±1.6% CD39⁺) und myeloischen Zellen exprimiert (~ 59% CD39⁺ Granulozyten und NK-Zellen). Insgesamt ist der Anteil der CD73-exprimierenden T-Zellen und Granulozyten im Herzen niedriger als im peripheren Blut (vergleiche Abbildung 12A und C). Beispielsweise unterscheidet sich der Anteil der CD73⁺ zytotoxischen T-Zellen im Herzen (49.6±4.8%) signifikant von dem Anteil im Blut (85.7±3.3 %, p<0.001). Ähnliches galt auch für die Granulozyten (Herz: 21.9±8% CD73⁺; Blut: 35.1±6% CD73⁺; p=0.02). Interessanterweise ist nicht nur der Anteil von CD73-exprimierenden Zellen im Herzen niedriger, sondern auch das Expressionsniveau der CD73 auf kardialen zytotoxischen T-Zellen $(23.7\pm4.7\cdot10^3)$ CD73-Moleküle im Herzen gegenüber 36.8±4.2·10³ im Blut, p=0.006) und T-Helfer-Zellen $(22.2\pm3.9\cdot10^3$ Molekülen CD73 im Herzen gegenüber $28.1\pm3.3\cdot10^3$, p=0.026). Im Gegensatz zur CD73, ist der Anteil der CD39-exprimierenden Leukozyten im Herzgewebe tendenziell höher als im Blut (vergleiche Abbildung 12A und C). Eine Ausnahme bilden die B-Zellen mit weniger CD39⁺ Zellen im Herzgewebe verglichen mit dem peripheren Blut (49.5±7.1% im Herzen versus 80.0±1.6% CD39⁺ B-Zellen im Blut, p=0.008). Anders als das Expressionslevel der CD73, ist die Antigendichte von CD39 auf kardialen T-Zellen, Granulozyten und Monozyten höher als im Blut (vergleiche Abbildung 12B und D).

4.3 Immunzellinfiltration und Expression der Ektonukleotidasen im Herzen nach Myokardinfarkt

Um die Folgen eines Herzinfarktes auf die Expression der beiden Ektoenzyme auf kardialen Immunzellen zu untersuchen, wurde zunächst die Anzahl der infiltrierten Immunzellen im Herzgewebe analysiert. Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es in Folge eines Herzinfarktes innerhalb kürzester Zeit zu einem Untergang des Herzmuskelgewebes. Die ischämiebedingte Nekrose oder Apoptose der Kardiomyozyten lösen dabei verschiedene Entzündungskaskaden aus, die zu einer schnellen Infiltration von Leukozyten aus dem Blut in
das Herzgewebe führen [63]. Gleichzeitig werden hohe Konzentrationen an Nukleotiden aus nekrotischen oder apoptotischen Zellen freigesetzt [46,120]. Es sollte daher untersucht werden, welche Immunzellpopulationen in der akuten Phase nach Infarkt in das Gewebe einwandern und ob es Unterschiede im Expressionsmuster der Ektonukleotidasen im Vergleich zu basalen Bedingungen gibt. Die Induktion der Herzinfarkte erfolgte durch eine 50-minütige Ligation der linken Koronararterie (LAD : *Left Anterior Descending Coronary Artery*) (siehe 3.8).

Die Ergebnisse der anschließenden FACS-Analyse sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Auf der linken Seite sind repräsentative *Dot Plots* und Histogramme dargestellt (A-C), während auf der rechten Seite die quantitativen Veränderungen im Vergleich zum gesunden Mäuseherz präsentiert werden (D-F). Drei Tage nach I/R steigt die Anzahl der gesamten Immunzellen im Herzen von $2.3\pm0.9\cdot10^3$ auf $9.1\pm3.3\cdot10^3$ Leukozyten/mg Herzgewebe an (n=5). Wie erwartet ist diese Zunahme im Wesentlichen auf die Infiltration von Granulozyten (~100-facher Anstieg) und Monozyten (~15-facher Anstieg) zurückzuführen (Abbildung 13A+D). Insbesondere die Zahl der inflammatorischen CD11b⁺Ly6g^{high} Monozyten steigt stark an (83-fache Zunahme), wohin gegen die Infiltration von nicht-inflammatorischen CD11b⁺Ly6c^{low} Monozyten vergleichsweise gering ist (2.5-facher Anstieg). Neben diesen Zellen des angeborenen Immunsystems kommt es außerdem zu einer signifikanten Zunahme an zytotoxischen T-Zellen (p=0.005), T-Helfer Zellen (p=0.014), NK Zellen (p=0.017) und APCs (p=0.008) (Abbildung 13D).

Neben Veränderungen in der Anzahl und Zusammensetzung der Immunzellen können auch Unterschiede im Expressionsmuster der Ektonukleotidasen nach I/R detektiert werden. Wie in Abbildung 13E dargestellt, steigt die Anzahl der CD73-exprimierenden Zellen innerhalb der kardialen T-Zellpopulationen, NK-Zellen und Granulozyten auf das 1.3-1.8-fache im Infarktherz an. Auf B-Zellen, Monozyten und antigenpräsentierende Zellen hingegen kann keine CD73 Expression beobachtet werden, ähnlich wie es schon unter basalen Bedingungen gezeigt wurde (vergleiche Abbildung 12A).

Es wurde zusätzlich untersucht, ob es auch auf den jeweiligen CD73-positiven Zellen zu einer Änderung im CD73-Expressionsspiegel nach Infarkt kommt. Interessanterweise nimmt die Oberflächenexpression der CD73 nach Infarkt zu (Abbildung 13B+F). Insbesondere auf Granulozyten kommt es zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zum gesunden Herz (2.8-facher Anstieg, p=0.001, Abbildung 13B). Im Gegensatz zu CD73 bleibt der Anteil der



CD39⁺ Leukozyten weitgehend unverändert im Vergleich zu basalen Bedingungen (Abbildung 13E).

Abbildung 13: Änderungen der Anzahl an Leukozyten, der CD73 oder CD39-positiven Zellen und der CD73 und CD39 Expressionsspiegel drei Tage nach I/R im Vergleich zu basalen Bedingungen. Auf der linken Seite sind repräsentative FACS-Analysen von verdauten Herzen (A) sowie der Expression von CD73 (B) und CD39 (C) drei Tage nach I/R und im gesunden Herzen gezeigt. Rotes Histogramm = CD73-Expression, Blau = CD39-Expression, Grau = FMO Kontrolle. Auf der rechten Seite ist die Zunahme der Leukozytenpopulationen im Herzgewebe (D), die Veränderungen des Anteils CD73⁺ und CD39⁺ Zellen innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulationen (E) und die Änderungen des CD73- und CD39-Expressionsniveaus auf CD73⁺ oder CD39⁺ Leukozyten (F) nach I/R dargestellt. ZTZ = zytotoxische T-Zellen, THZ = T-Helferzellen, Treg = regulatorische T-Zellen, BZ = B-Zellen, NKZ = natürliche Killer Zellen, Gr = Granulozyten, Mo = Monozyten, APC = antigenpräsentierende Zellen. Die Analyse wurde 3 Tage nach I/R durchgeführt und mit den Werten für das gesunde Herz verglichen (gestrichelte Linie bei E und F). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=5 Tiere. n.d. = nicht detektierbar. *p<0.05 bezieht sich auf den Vergleich der Zellen/mg Herzgewebe nach I/R und unter basalen Bedingungen.

Eine Ausnahme bilden kardiale B-Zellen, die eine signifikante Zunahme an CD39exprimierenden Zellen zeigen (1.5-fach, p=0.001, Abbildung 13E). Auch auf den CD39positiven Zellen wurde die Oberflächenexpression bestimmt. Das Expressionsniveau der CD39 nimmt auf Monozyten und APCs nach I/R ab (0.4-fach bzw. 0.3-fach, p<0.01), auf Granulozyten hingegen tendenziell zu (2-fach, jedoch nicht signifikant, Abbildung 13C+F).

Um zu untersuchen, ob die Änderungen in der Expression der Ektoenzyme nach I/R spezifisch für Leukozyten im Herzen sind oder ähnliches auch im Blut zu beobachten ist, wurden Immunzellen aus dem Blut drei Tage nach I/R durchflusszytometrisch analysiert. Weder die Anteile an CD73⁺ oder CD39⁺, noch die Oberflächenexpression auf den einzelnen Leukozytensubpopulationen sind nach I/R verändert (Daten nicht dargestellt). Unter basalen Bedingungen ist die Expression der CD73 im Herzen niedriger als im Blut (siehe Abbildung 12A+C). Durch die oben beschriebene Hochregulation der CD73 ändert sich dieses Verhältnis. Der Anteil der CD73⁺ T-Helferzellen ist im Herzen signifikant höher als im Blut (Blut: 54.0±15.5%; Herz: 64.8±3.9%; p=0.006), ähnliches gilt für die NK-Zellen (Blut: 11.4±1.4%; Herz: 20.1±4.4%; p=0.009). Außerdem ist das Expressionsniveau auf Granulozyten signifikant erhöht (Blut: $10.8\pm1.4\cdot10^3$: Herz: 27.1±4.1·10³ Moleküle/Zelle: p=0.001). Wie schon unter basalen Bedingungen ist der Anteil der CD39⁺ Zellen auch nach Infarkt im Herzen weiterhin höher als im Blut, insbesondere bei T-Helferzellen (Blut: 8.2±3.6%; Herz: 33.2±11.0%; p=0.003) und Granulozyten (Blut: 55.0±5.0%; Herz: 82.4±11.2%; p=0.008). Da das Expressionsniveau der CD39 jedoch nach Infarkt auf fast allen Immunzellpopulationen abnimmt (siehe Abbildung 13F), ist der Expressionsgrad der CD39 auf den Immunzellen im Herzen und im Blut nach Infarkt annähernd gleich.

Um den Beitrag der verschiedenen Leukozytenpopulationen am ATP-Abbau im Herzen zu beurteilen, sind drei Aspekte wichtig: 1) die Gesamtzahl der einzelnen Leukozytensubtypen im Herzgewebe, 2) der Anteil der CD73 oder CD39-exprimierenden Zellen in einer Population und 3) die Stärke der Oberflächenexpression von CD73 und CD39 auf den einzelnen CD73⁺ oder CD39⁺ Zellen. Wie in Abbildung 14 dargestellt, kann aus diesen drei Werten die Gesamtmenge an CD73 und CD39, die durch die einzelnen Leukozytenpopulationen in das Herzgewebe eingebracht wird, berechnet werden. Es ist klar zu erkennen, dass die Menge der CD73-Moleküle pro mg Herzgewebe drei Tage nach I/R stark ansteigt, insbesondere auf Grund von eingewanderten Granulozyten (~ 400-fache Steigerung des CD73 Gehaltes/mg Herzgewebe). Dieser ausgeprägte Anstieg wird hauptsächlich durch die massive Infiltration dieser Zellpopulation (Abbildung 13D), aber auch durch die Hochregulation der

CD73-Oberfächenexpression (Abbildung 13F) auf diesem Zelltyp nach I/R hervorgerufen. Während der CD73-Gehalt auch durch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen gesteigert wird, zeigt Abbildung 14B, dass der Gehalt an CD39 Molekülen im Herzgewebe demgegenüber ausschließlich aufgrund von Granulozyten zunimmt.



Abbildung 14: Berechneter CD73 (A) und CD39 (B) Gehalt pro mg Herzgewebe unter basalen Bedingungen und nach I/R. Die Menge der Zelloberflächenmoleküle im Herzgewebe wurde durch die Multiplikation 1) der absoluten Zellzahl pro mg/Gewebe mit 2) der Anzahl der CD73- oder CD39-positiven Zellen und 3) der Anzahl der CD73-Moleküle auf den CD73⁺ oder CD39⁺ Zellen (=Expressionsniveau) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=5 Tiere. n.d. = nicht detektierbar, *p<0.05.

4.4 Expression von CD73 und CD39 auf nicht-Immunzellen im Herzen und Blut

Um mögliche Beiträge zur extrazellulären Nukleotid-Degradation von nicht-Immunzellen im Herzen und Blut zu berücksichtigen, sollte die Expression von CD73 und CD39 nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf allen anderen Zellen untersucht werden. Dazu zählen Kardiomyozyten, Endothelzellen und CD31⁻CD45⁻ Zellen im Herzen (vergleiche Abbildung 9) sowie Erythrozyten und Plättchen im Blut. In Tabelle 8 ist die Expression der Ektoenzyme unter basalen Bedingungen dargestellt. Weder auf Kardiomyozyten noch auf Erythrozyten können CD73 und CD39 detektiert werden. Während nur ein geringer Teil der koronaren Endothelzellen CD73 exprimieren, sind fast alle Endothelzellen positiv für CD39. Die Zellpopulation der kardialen CD31⁻CD45⁻ umfasst alle Zellen des Herzens mit Ausnahme von Kardiomyozyten und Endothelzellen, also beispielsweise glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Diese Zellen exprimieren kein CD73, hingegen exprimieren 65.1±12.9% dieser

Zellen CD39. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt sich auch bei den Blutplättchen, die zu 35.2±5.1% positiv für CD39 sind, CD73 aber nicht exprimieren.

Tabelle 8: Prozentuale Anzahl kardialer Zellen und zirkulierender Blutzellen, die unter basalenBedingungen eine Expression von CD73 und CD39 zeigen (n=4-5)

Zellpopulationen		CD73 (%)	CD39 (%)
kardiale Zellen	Kardiomyozyten*	0	0
	koronare Endothelzellen	1.9 ± 0.3	99.4 ± 0.3
	CD31 ⁻ CD45 ⁻ Zellen	0	65.1 ± 12.9
	Leukozyten	1.7 ± 0.49	87.1 ± 3.6
Blut	Erythrozyten	0	0
	Plättchen	0	$\textbf{35.2} \pm \textbf{5.1}$
	Leukozyten	$\textbf{28.4} \pm \textbf{9.2}$	$\textbf{37.8} \pm \textbf{9.4}$

* analysiert mittels Fluoreszenzmikroskopie

Wie die durchgeführten Expressionsanalysen zeigen, wird CD73 nur auf Endothelzellen und Leukozyten im Herzen exprimiert. Die Beschränkung der CD73 auf nur zwei kardiale Zellpopulationen wirft die Frage auf, welchen Anteil die beiden Populationen an der Gesamtexpression von CD73 im Herzgewebe haben. Wie in Abbildung 15 links gezeigt, bilden koronare Endothelzellen die Mehrheit der CD73-exprimierenden Zellen unter basalen Bedingungen (90±2.6%; n=5), obwohl nur ca. 2% der koronaren Endothelzellen CD73 exprimieren. Da jedoch die Gesamtanzahl der Endothelzellen die der residenten Leukozyten unter normalen Bedingungen um das ca. 10-fache übersteigt (siehe Abschnitt 4.1), machen residente Immunzellen nur einen kleinen Teil an den CD73⁺ Zellen aus.



Abbildung 15: Vergleich der CD73-exprimierenden Leukozyten und koronaren Endothelzellen im Herzen unter basalen Bedingungen und nach I/R. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=4 Tiere.

Das Bild ändert sich jedoch, wenn es nach I/R zu einer massiven Infiltration von Leukozyten in das Herzgewebe kommt (vergleiche Abbildung 13D). Während die Anzahl an CD73⁺ Endothelzellen nach Infarkt annähernd gleich bleibt, steigt die Anzahl an CD73⁺ Leukozyten im Herzen stark an (Abbildung 15). Somit machen kardiale Leukozyten den Großteil der CD73-exprimierenden Zellen drei Tage nach Infarkt im Herzen aus (66.8±14.7%, n=4).

Auch auf den Endothelzellen wurde die Stärke der Oberflächenexpression der Ektoenzyme untersucht. Während sich das Expressionsniveau der CD73 auf Endothelzellen nach I/R nicht von dem unter basalen Bedingungen unterscheidet (Daten nicht dargestellt), nimmt die Oberflächenexpression von CD39 auf Endothelzellen um 18% nach I/R ab $(44.4\pm3.6\cdot10^4$ versus $36.6\pm4.9\cdot10^4$, p=0.029).

4.5 Expression von CD73 und CD39 auf Immunzellen 14 Tage nach I/R

Die in den vorherigen Abschnitten beschriebene Expression der Ektoenzyme wurde drei Tage nach I/R gemessen, also zu einem Zeitpunkt innerhalb der akuten Phase der Entzündung. Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Anzahl an nekrotischen, apoptotischen und aktivierten Zellen im Herzgewebe, wodurch der Extrazellularraum mit großen Mengen an ATP überflutet wird. Die in Abschnitt 4.3 präsentierten Daten zeigen, dass sich die Expression der Ektoenzyme in diesem inflammatorischen Milieu offenbar verändert. Es stellt sich nun die Frage, wie sich die Expression von CD39 und CD73 mit fortschreitender Wundheilung und zunehmenden kardialen Umbauprozessen (nachfolgend als Remodeling bezeichnet) des Gewebes verhält, wenn also die akute Inflammation abgeklungen ist, tote Zellen durch Phagozytose beseitigt wurden und somit extrazelluläre ATP-Konzentrationen vermutlich sinken [275]. Die Expression der Ektoenzyme wurde daher auch 14 Tage nach I/R auf den Immunzellen im Herzen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

14 Tage nach I/R fällt die Anzahl der gesamten Immunzellen im Herzen mit $2.6\pm1.1\cdot10^3$ Leukozyten/mg Herzgewebe (n=4) annähernd auf das basale Niveau (basal: $2.3\pm0.9\cdot10^3$, 3 Tage nach I/R: $9.1\pm3.3\cdot10^3$ Leukozyten/mg Herzgewebe). Wie Abbildung 16A zeigt, sinkt auch die Anzahl der einzelnen Leukozytensubpopulationen im Herzgewebe wieder ab. Lediglich die Zahl der Monozyten bleibt im Vergleich zu basalen Bedingungen signifikant erhöht, jedoch ist ihre Anzahl deutlich niedriger als 3 Tage nach I/R (14 Tage: 251±118 im





Abbildung 16: Änderungen der Zellzahl der individuellen Leukozytenpopulationen (A), des Anteils der CD73 oder CD39-positiven Zellen (B) und des CD73- und CD39-Expressionsniveaus (C) 14 Tage nach I/R im Vergleich zu basalen Bedingungen. Zellzahlen und Oberflächenexpression wurden 14 Tage nach I/R durchflusszytometrisch bestimmt und mit den Werten für das gesunde Herz verglichen. ZTZ = zytotoxische T-Zellen, THZ = T-Helferzellen, Treg = regulatorische T-Zellen, BZ = B-Zellen, NKZ = natürliche Killer Zellen, Gr = Granulozyten, Mo = Monozyten, APC = antigenpräsentierende Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=4-5 Tiere. n.d. = nicht detektierbar. *p<0.05 bezieht sich auf den Vergleich der Zellen/mg Herzgewebe 14 Tage nach I/R und den Basalbedingungen.

Abbildung 16 zeigt auch den prozentualen Anteil der CD73- oder CD39-exprimierenden Zellen (Abbildung 16B) und das jeweilige Expressionsniveau in den einzelnen Leukozytenpopulationen (Abbildung 16C). Trotz Abnahme der Zellzahl bleibt der Anteil der CD73exprimierenden T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen im Herzgewebe nahezu unverändert erhöht (z.B. T-Helferzellen: 14 Tage: 65±10% im Vergleich zu basal: 36±11% (p<0,001) und 3 Tage: 65±4% CD73⁺ Zellen). Im Gegensatz dazu nimmt die Anzahl der CD73-positiven kardialen Granulozyten im Vergleich zu 3 Tagen nach I/R ab und erreicht wieder das Ausgangsniveau (Abbildung 16B). Auch der Expressionsgrad der CD73 auf der Oberfläche der verschiedenen Zellen fällt in dieser späten Phase der Wundheilung auf basale Werte zurück (Abbildung 16C). Einzig die CD73-Oberflächenexpression auf regulatorischen T-Zellen ist, ähnlich wie nach 3 Tagen, tendenziell erhöht, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (basal: 23.7±7.8·10³, 3 Tage: 33.6±7.8·10³, 14 Tage: 35.5±17.1·10³ Moleküle/Zelle). Der Anteil der CD39⁺ Zellen in den Leukozytensubpopulationen bleibt, wie schon 3 Tage nach I/R, auch in dieser späten Phase der Wundheilung im Vergleich zu Normalbedingungen unverändert. B-Zellen, die in der akuten Phase der Entzündung noch vermehrt CD39 exprimieren (siehe Abbildung 13E), fallen 14 Tage nach I/R wieder auf den basalen CD39-Expressionsgrad zurück. Dies betrifft jedoch nur die Anzahl der CD39-exprimierenden B-Zellen, ihr Expressionsspiegel ist jedoch ~ 1.6 -fach höher als unter Ausgangsbedingungen (p=0.029). Dagegen ist die Oberflächenexpression der CD39 auf APCs signifikant niedriger als unter Basalbedingungen, wobei sie jedoch im Vergleich zur akuten Phase nach I/R tendenziell ansteigt (14 Tage: $4.7\pm2.2\cdot10^5$ im Vergleich zu basal: $7.5\pm0.9\cdot10^5$ (p=0.034) und 3 Tage: $2.1 \pm 0.4 \cdot 10^5$ (p=0.055)).

Zusammenfassend zeigen die in diesem Kapitel dargestellten Expressionsanalysen, dass CD73 in der akuten Phase der Entzündung auf kardialen T-Zellen und Granulozyten im Vergleich zum gesunden Herzen hochreguliert wird. Auch in der späteren Heilungsphase bleibt die Expression auf T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen im Herzen erhöht, wohingegen die Expression auf Granulozyten wieder auf das Ausgangsniveau zurückfällt. CD39 wird dagegen innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulationen unterschiedlich reguliert. Während die Expression 3 Tage nach I/R auf B-Zellen und tendenziell auch auf Granulozyten zunimmt, sinkt sie auf Monozyten und APCs ab. 14 Tage nach I/R ist das Expressionsmuster der CD39 vergleichbar mit der Expression im gesunden Herzen. Lediglich der Grad der Oberflächenexpression ist auf B-Zellen signifikant erhöht, auf APCs dagegen weiterhin niedriger.

4.6 Quantitative Analyse verschiedener Gene des purinergen Systems

Neben der CD39 und CD73 beeinflussen eine Vielzahl weiterer Proteine die Konzentration von Nukleotiden und Nukleosiden im Extrazellularraum. Um einen umfassenden Überblick über den extrazellulären Purinstoffwechsel auf Immunzellen im Herzen zu bekommen, wurden daher insgesamt 28 Gene ausgewählt, die nach Daten der Literatur eine Rolle im purinergen Signalsystem spielen (siehe Einleitung 1.3). Die selektierten Gene, die von ihnen kodierten Proteine, ihre Funktion und Lokalisierung in der Zelle sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Ein zentraler Augenmerk galt der Expression der Adenosinrezeptoren, um zu untersuchen über welche Rezeptoren das von der CD73 nach I/R vermehrt gebildete Adenosin wirken könnte.

Um die Regulation dieser Gene nach Myokardinfarkt zu untersuchen, sollte die mRNA-Expression in APCs, Granulozyten und T-Zellen aus infarzierten Herzen mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) bestimmt werden. Als Kontrolle diente die Transkriptmenge in APCs aus gesunden Herzen sowie in Monozyten, Granulozyten und T-Zellen aus dem Blut von Kontroll- und infarzierten Mäusen. Hierfür wurde das Herzgewebe, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, verdaut und die Immunzellpopulationen per MACS- oder FACS-Sortierung isoliert.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen sind für kardiale APCs, Monozyten aus dem Blut sowie für Granulozyten aus Blut und Herz in Abbildung 17 dargestellt. Die Untersuchung der mRNA-Expression in kardialen T-Zellen erwies sich auf Grund der geringen Zellzahl im Herzen als schwierig. Die Analyse konnte zwar letztlich mit dem im Abschnitt Methoden 3.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt werden, aus Zeitgründen war jedoch nur die Messung von zwei Proben der kardialen T-Zellen möglich. Die wichtigsten Tendenzen, die sich aus dieser Untersuchung ergaben sind am Ende dieses Abschnittes zusammengefasst.

Der Vergleich von APCs aus gesunden und infarzierten Mäuseherzen zeigt aufgrund der hohen Streuung der Werte kaum signifikante Unterschiede. Auffallend ist jedoch, dass die Expression des P2X7-Rezeptors 3 Tage nach I/R signifikant abnimmt (basal: 0.019±0.011; I/R: 0.0054±0.004 *arbitrary units* (AU); p=0.046). In Übereinstimmung mit der durchfluss-zytometrischen Analyse der CD39-Proteinexpression (siehe 4.3), sinkt auch die Trans-kriptmenge nach I/R ab, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen (Abbildung 17A).

Abkürzung	kodiertes Protein	Funktion		Lokalisierung
Panx1	Pannexin-1	Transport	von ATP	Zellmembran
Cx37	Connexin-37	Transport	von ATP	n
Cx43	Connexin-43	Transport	von ATP und NAD $^{+}$	"
P2X1	P2X1-Rezeptor	Rezeptor	für ATP (Ionenkanal)	"
P2X4	P2X4-Rezeptor	Rezeptor	für ATP (Ionenkanal)	"
P2X5	P2X5-Rezeptor	Rezeptor	für ATP (Ionenkanal)	"
P2X7	P2X7-Rezeptor	Rezeptor	für ATP (Ionenkanal)	"
P2Y1	P2Y1-Rezeptor	Rezeptor	für ADP, ADP-Ribose	(GPCR) "
P2Y2	P2Y2-Rezeptor	Rezeptor	für ATP, UTP	(GPCR) "
P2Y4	P2Y4-Rezeptor	Rezeptor	für UTP, ATP, UDP	(GPCR) "
P2Y6	P2Y6-Rezeptor	Rezeptor	für UTP, UDP	(GPCR) "
CD39	NTDPase-1	Enzym	ATP → AMP	"
CD38	ADP-Ribosylzyklase 1	Enzym	NAD - ADP-Ribose	"
ART2b	ADP-Ribosyltransferase	Enzym	NAD - ADP-Ribose	"
CD157	ADP-Ribosylzyklase 2	Enzym	NAD - ADP-Ribose	
ENPP1	Ektonukleotid Pyrophosphatase/	Enzym	ATP → AMP (ADP)	"
	Phosphodiesterase 1		NAD -> AMP	
			ADP-Ribose - AMP	
ENPP3	Ektonukleotid Pyrophosphatase/	Enzym	ATP → AMP	
	Phosphodiesterase 3		NAD -> AMP	
CD73	Ekto-5'-Nukleotidase	Enzym	AMP -> Adenosin	"
ALPI	Alkalische Phosphatase	Enzym	u.a. AMP 🔶 Adenosin	
A1	A ₁ -Rezeptor	Rezeptor	für Adenosin (GPCR)	"
A2A	A _{2A} -Rezeptor	Rezeptor	für Adenosin (GPCR)	"
A2B	A _{2B} -Rezeptor	Rezeptor	für Adenosin (GPCR)	II.
A3	A ₃ -Rezeptor	Rezeptor	für Adenosin (GPCR)	"
	Adenosin Deseminase	Enzym		Zellmembran/
	Adenosin-Desaminase	LIIZYIII		Zytoplasma
ADK	Adenosin-Kinase	Enzym	ATP+Adenosin -> ADP+A	MP Zytoplasma
ENT1	Equilibrativer Nukleosidtransporter 1	Transport	von Nukleosiden	Zellmembran
ENT2	Equilibrativer Nukleosidtransporter 2	Transport	von Nukleosiden	ш
CNT2	Konzentrativer Nukleosidetransporter 2	Transport	von Nukleosiden	"

Tabelle 9: Ausgewählte Gene für die mRNA-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR. Angegeben ist die verwendete Abkürzung, die Bezeichnung des kodierten Proteins, die Funktion der Proteine im Purinstoffwechsel und die Lokalisierung innerhalb der Zelle.

Interessanterweise nimmt die Expression aller detektierbaren NAD⁺-abbauenden Enzyme (CD38, CD157 und ENPP1) tendenziell zu (Abbildung 17B). Wie in Abbildung 17C zu sehen ist, sind die Adenosinrezeptoren A₁, A_{2A} und A₃ sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach I/R nicht bzw. sehr gering exprimiert. Im Gegensatz dazu steigt die Expression des A_{2B}-Rezeptors 3 Tage nach I/R stark an, wobei aufgrund der hohen Standardabweichung nicht das Signifikanzniveau erreicht wird (basal: $3.7 \cdot 10^{-5} \pm 4.1 \cdot 10^{-5}$; I/R: $2.4 \cdot 10^{-3} \pm 3.9 \cdot 10^{-3}$ AU). Es fällt zudem ins Auge, dass die Expression der beiden Adenosintransporter ENT1 und CNT2 nach I/R tendenziell abnimmt (Abbildung 17C).







Abbildung 17: Quantitative Analyse der mRNA-Expression verschiedener Transporter, Rezeptoren und Enzyme des purinergen Signalsystems in kardialen APCs (A-C), Monozyten aus dem Blut (D-F) sowie Granulozyten aus Blut und Herz (G-I). Die verschiedenen Gene sind nach ihrer Beteiligung am ATP- (A, D, G), NAD⁺- (B, E, H) und Adenosin- (C, F, I)-Stoffwechsel dargestellt. Es ist zu beachten, dass Cx43, ENPP1 und

ENPP3 sowohl Teil des ATP-, als auch des NAD⁺-Metabolismus sind (siehe Tabelle 9). Die Transkriptmenge wurde mittels qRT-PCR bestimmt und ist relativ zum endogenen Referenzgen β -actin angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; APCs, Monozyten (basal), Granulozyten (Herz) jeweils n=4; Monozyten (I/R), Granulozyten (Blut, basal und I/R) jeweils n=3; *p<0,05.

Wie in Abschnitt 4.3 gezeigt, steigt die Zahl der APCs im Herzgewebe 3 Tage nach Infarkt auf das ca. 2.5-fache an. Es ist anzunehmen, dass diese Zunahme durch eine Einwanderung von Monozyten aus dem Blut und ihre anschließende Differenzierung zu APCs bedingt ist. Da somit zumindest ein Teil der kardialen APCs nach I/R aus den Monozyten-Vorläufern abstammt, sollte das Expressionsmuster der oben genannten Gene auch in Monozyten aus dem Blut gesunder und infarzierter Mäuse untersucht werden.

Die Ergebnisse zur Transkriptanalyse der Blut-Monozyten ist in Abbildung 17D-F zusammengefasst. Insgesamt ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Monozyten aus dem Blut gesunder und infarzierter Tiere. Einige Gene verhalten sich ähnlich wie in den APCs: So sinkt die Transkriptmenge des P2X7-Rezeptors und der CD39 nach I/R ab, während die der CD38 tendenziell zunimmt (Abbildung 17D+E). Anzumerken ist, dass einige Gene in Monozyten generell stärker exprimiert werden als in APCs. Dazu zählen Panx1, P2X1 sowie der Adenosinrezeptor A_{2A}. Andererseits ist die mRNA-Expression von Cx37, ENPP1 und ADK in den ausdifferenzierten APCs höher als in ihren Vorläufern aus dem Blut.

Im gesunden Mäuseherzen befinden sich nur wenige Granulozyten (siehe 4.1). Folglich sind die kardialen Granulozyten nach Myokardinfarkt hauptsächlich aus dem Blut eingewandert. Aus diesem Grund wurden die mRNA-Expressionsanalysen in Granulozyten aus dem Blut gesunder und infarzierter Mäuse mit den Zellen im Herzgewebe verglichen. Die in Abbildung 17G-I zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass z.B. die Connexine Cx37 und Cx43, die Nukleotid-Rezeptoren P2X4, P2X7 und P2Y6, sowie ENPP1, ENPP3, CD38 und ADK im Herzen stärker exprimiert zu sein scheinen als im Blut. Auch die mRNA von CD73 wird in Übereinstimmung mit den Proteinmessungen (siehe 4.3) im Herzen nach Infarkt stärker exprimiert. Interessanterweise nimmt auch die Expression des A_{2B}-Rezeptors im Herzen nach I/R gegenüber dem Blut stark zu. Auf Grund der hohen Standardabweichung ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Bei den Genen Panx1, CD39 und CD157 ist die mRNA-Expression nur in den Granulozyten aus dem Blut infarzierter Tiere erhöht, nicht jedoch im Herzen. Auffällig ist auch, dass die Transkriptmenge der beiden Nukleosidtransporter ENT1 und CNT2 nach Infarkt sowohl im Blut als auch im Herzen gegenüber den basalen Bedingungen tendenziell zunimmt.

Wie bereits erwähnt wurde die qRT-PCR-Analyse auch mit T-Zellen aus dem Blut (n=3) und Herz (n=2) durchgeführt. Aufgrund der geringen Probenanzahl soll hier nur auf eine Besonderheit hingewiesen werden, die insbesondere im Hinblick auf die oben beschriebenen Daten interessant ist. Sowohl im Blut (basal und nach I/R), als auch im Herzen (nach I/R) exprimieren die T-Zellen den A_{2A} -Rezeptor auf einem vergleichbaren Niveau (Blut basal: $1.9 \cdot 10^{-3} \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$; Blut I/R: $2.2 \cdot 10^{-3} \pm 1.9 \cdot 10^{-3}$; Herz I/R: $3.1 \cdot 10^{-3} \pm 4.3 \cdot 10^{-3}$ AU) nicht aber die A_1 - und A_3 -Rezeptoren. Auch der A_{2B} -Rezeptor wird von den Zellen im Blut nicht exprimiert. Bemerkenswerterweise steigt die mRNA-Expression dieses Rezeptors jedoch im Herzen nach Infarkt deutlich an (Herz I/R: $0.9 \cdot 10^{-3} \pm 1.1 \cdot 10^{-3}$ AU), ähnlich wie schon bei den APCs und Granulozyten.

Insgesamt zeigen die mRNA-Expressionsanalysen auf Grund der hohen Streuung und der bislang geringen n-Zahlen wenig signifikante Unterschiede. Ein auffallender Aspekt ist jedoch, dass der A_{2B}-Rezeptor von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen im Blut nicht bzw. kaum exprimiert wird, die Expression dafür aber bei allen untersuchten Zellen im Herzen nach Infarkt deutlich ansteigt.

4.7 Die funktionelle Rolle der CD73 im Heilungsprozess nach I/R

Die bislang dargestellten Daten zeigen eindeutig, dass die CD73 nach I/R auf Granulozyten und T-Zellen im Herzen hochreguliert wird. Da CD73 die hydrolytische Spaltung von extrazellulärem AMP zu Adenosin katalysiert, legt dies eine verstärkte lokale Bildung von Adenosin im Bereich der Entzündung nahe. Es ist bekannt, dass extrazelluläres Adenosin über die Aktivierung von verschiedenen Adenosinrezeptoren immunmodulatorische Effekte vermitteln kann [106]. Beispielsweise löst Adenosin insbesondere über A_{2A}-Rezeptoren anti-inflammatorische Zellantworten aus (siehe 1.3.5). Um nun auch die funktionelle Rolle der CD73 beim Herzinfarkt zu untersuchen, wurden im Folgenden die Herzfunktion und die Immunantwort von CD73-defizienten (CD73^{-/-}) und wildtypischen (WT) Mäusen nach I/R miteinander verglichen.

4.7.1 Die Herzfunktion von CD73^{-/-} Mäusen nach I/R

Der Herzinfarkt wurde wie bei den vorherigen Experimenten durch eine 50-minütige Ligation der LAD ausgelöst. Linksventrikuläre Parameter wurden vor der Induktion des Infarktes

(basal) sowie 1, 7, 14 und 28 Tage nach Herzinfarkt mittels ¹H-MR-Bildgebung bestimmt. Zusätzlich wurde die *Area at Risk* (AAR) einen Tag nach I/R mittels *late gadolinium enhanced* (LGE) MRT untersucht. Diese Versuche wurden zusammen mit Dr. med. Florian Bönner durchgeführt und ausgewertet.

Wie in Abbildung 18A gezeigt, ist die von der Ischämie betroffene Fläche im Myokard des linken Ventrikels in WT und CD73^{-/-} an Tag 1 nach Induktion des Herzinfarktes etwa gleich groß (WT: $36\pm7\%$; CD73^{-/-}: $32\pm6\%$; n=12). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung sinkt die globale Ejektionsfraktion (EF) in beiden Gruppen in gleichem Maße ab (basal WT: $71.3\pm2.6\%$, CD73^{-/-}: $69.4\pm2.5\%$; 1 Tag nach I/R WT: $48.8\pm5.2\%$, CD73^{-/-}: $52.8\pm5.0\%$; Abbildung 18B). Im weiteren Heilungsverlauf stabilisiert sich die EF im WT, während sie in den CD73-defizienten Mäusen jedoch kontinuierlich abnimmt. Wildtypische Mäuse wiesen 28 Tage nach I/R eine Ejektionsfraktion von $53.4\pm2.6\%$ auf, während CD73-defiziente Tiere durch eine signifikant erniedrigte EF von $38.4\pm7.2\%$ gekennzeichnet waren (p<0,01).



Abbildung 18: Im zeitlichen Verlauf nach I/R zeigen CD73^{-/-}-Mäuse eine eingeschränkte Herzfunktion im Vergleich zum WT. A: Prozentualer Anteil der *Area at Risk* (AAR) am Gesamtmyokard des linken Ventrikels ein Tag nach I/R. Diese Areale wurden mittels LGE MRT identifiziert. B: Globale Ejektionsfraktion von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen nach I/R. LVMM = linksventrikuläre Myokardmasse. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=12 CD73^{-/-} und n=12 WT-Mäusen, *p<0.05, ** p<0.01.

4.7.2 Quantitative und qualitative Analyse der Immunzellinfiltration in CD73^{-/-}-Mäusen nach Herzinfarkt

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3 zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur, dass es in der akuten Phase nach Infarkt zu einer massiven Infiltration von Immunzellen in das Herzgewebe kommt. Wie dann in 4.5 beschrieben, sinkt in WT-Mäusen die Anzahl der Leukozyten im Herzgewebe während des weiteren Heilungsverlaufs wieder ab. Die schlechtere Erholung der

CD73-defizienten Tiere nach I/R wirft daher die Frage auf, ob es möglicherweise Unterschiede zwischen wildtypischen und CD73-defizienten Mäusen in der Immunantwort nach Infarkt gibt. Dazu wurden die Immunzellen aus den Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen unter basalen Bedingungen sowie 3, 7 und 14 Tage nach I/R isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 19+20 und 22+23 zusammengefasst. Auf der jeweils linken Seite sind repräsentative *Dot Plots* und Histogramme gezeigt (A-C), während auf der rechten Seite die Menge der Immunzellen im Herzgewebe dargestellt ist (D-F).

Wie oben beschrieben, steigt die Anzahl der gesamten Immunzellen im Herzen von WT-Mäusen 3 Tage nach Infarkt stark an und fällt 14 Tage nach I/R auf das Ausgangsniveau zurück (Abbildung 19D). Auch bei CD73^{-/-} Tieren nimmt die Zahl der kardialen Leukozyten in der akuten Phase der Entzündung zu (3 Tage nach I/R; WT: $8.4\pm2.9\cdot10^3$; CD73^{-/-}: $7.2\pm1.8\cdot10^3$ Leukozyten/mg Herzgewebe). Im weiteren Verlauf bleibt das Niveau dieser Zellen im Herzgewebe jedoch konstant hoch, so dass 14 Tage nach I/R eine ca. 3-fache höhere Immunzellzahl in den CD73^{-/-}- als in WT-Tieren gefunden werden kann (WT: $2.9\pm1.2\cdot10^3$; CD73^{-/-}: $9.4\pm3.7\cdot10^3$ Zellen/mg Herzgewebe, p<0.05).

Im Folgenden wurde untersucht, welche Subpopulationen zu dieser hohen Zahl an Leukozyten im Herzen der CD73-Mutante beitragen. In der akuten Phase der Entzündung wandern hauptsächlich Granulozyten und Monozyten in das Herzgewebe von WT- und CD73^{-/-}- Mäusen ein (vergleiche auch Abschnitt 4.3). Abbildung 19E zeigt, dass die Anzahl der Granulozyten in wildtypischen Mäusen im weiteren Heilungsverlauf schnell abnimmt und 14 Tage nach I/R wieder auf basale Werte fällt, wohingegen die Menge dieser Zellen in CD73-defizienten Tieren signifikant erhöht ist (14 Tage nach I/R; WT: $0.4\pm0.2\cdot10^2$; CD73^{-/-}: $13.2\pm0.8\cdot10^2$ Zellen/mg Herzgewebe, p=0.023). Dagegen sinkt die Gesamtzahl an Monozyten sowohl in WT- als auch in CD73^{-/-}-Tieren nach anfänglich starker Infiltration in das Gewebe wieder ab (14 Tage nach I/R: WT: $2.5\pm1.2\cdot10^2$; CD73^{-/-}: $3.8\pm2.8\cdot10^2$ Zellenl/mg Herzgewebe). Wie in Abbildung 19C+F gezeigt, ist allerdings der prozentuale Anteil von inflammatorischen Ly6c^{high}-Monozyten in CD73^{-/-}: $51.5\pm26.0\%$; p<0.01).

Die Infiltration kardialer APCs erreicht bei WT-Mäusen 3 Tage nach Infarkt ihren Höhepunkt (Abbildung 20D). Sieben Tagen nach I/R nimmt die Zahl der APCs zwar ab, sie bleibt aber

gegenüber dem gesunden Herzen noch signifikant erhöht (WT basal: $1.7\pm0.7\cdot10^3$; 7 Tage: $2.9\pm0.5\cdot10^3$ Zellen/mg Herzgewebe; p=0.04).



Abbildung 19: Immunzellinfiltration nach I/R in das Herzgewebe von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen. Auf der linken Seite sind repräsentative FACS-Analysen der gesamten Leukozyten (A), der Granulozyten (B) und der inflammatorischen Ly6c^{high}-Monozyten (C) im Herzen 14 Tage nach I/R dargestellt. Schwarzes Histogramm = Ly6c-Expression, grau = FMO-Kontrolle. Auf der rechten Seite ist die Anzahl der gesamten Leukozyten (D) und der Granulozyten (E) pro mg Herzgewebe gezeigt. F: Prozentualer Anteil von inflammatorischen Ly6c^{high} Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=3-7, *p<0.05.



Abbildung 20: Infiltration und Phänotyp von APCs im Herzgewebe von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen nach I/R. Auf der linken Seite sind repräsentative FACS-Analysen der gesamten APCs (CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺) (A) sowie *Dot Plots* (B) und Histogramme (C) der Expression von F4/80 auf den APCs 14 Tage nach I/R gezeigt. Schwarzes Histogramm = F4/80 Expression, Grau = FMO-Kontrolle. Auf der rechten Seite ist die Anzahl der gesamten APCs (D), der prozentuale Anteil der F4/80⁺ APCs an den gesamten antigenpräsentierenden Zellen (E) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der F4/80⁺ APCs (F) dokumentiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=3-7, *p<0.05.

Erst 14 Tage nach Infarkt sinkt die Zellzahl der APCs wieder auf das basale Niveau. Im Gegensatz dazu steigt ihre Anzahl im Herzen der CD73-Mutanten auch nach der akuten Phase der Entzündung weiter an und ist 14 Tage nach I/R fast dreifach höher als im WT (WT: $1.9\pm0.9\cdot10^3$; CD73^{-/-}: $5.4\pm1.2\cdot10^3$ Zellen/mg Herzgewebe; p<0.01).

Wie oben beschrieben, weisen die Vorläuferzellen der APCs, die Monozyten, einen proinflammatorischen Phänotyp in CD73^{-/-}-Mäusen auf. Um zu untersuchen, ob ähnliches auch für die ausdifferenzierten APCs gilt, wurde die Expression des Oberflächenmarkers F4/80 analysiert. Das Glykoprotein F4/80 wird unter anderem auf Makrophagen exprimiert und nach Aktivierung herabreguliert [276]. Wie in Abbildung 20E demonstriert, nimmt der prozentuale Anteil der F4/80 exprimierenden APCs in CD73-transgenen-Mäusen nach I/R im Vergleich zu basalen Bedingungen ab (basal: 69.2±6.0%; 14 Tage nach I/R: 41.2±13.9%; p=0.016). Dadurch ergeben sich zu allen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt signifikant niedrigere Werte als im WT. Um die Expressionsstärke dieses Antigens auf den APCs zu untersuchen, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der F4/80 positiven Zellen bestimmt (Abbildung 20C). Wie Abbildung 20F zeigt, ist das Expressionsniveau von F4/80 in CD73^{-/-}-Mäusen tendenziell niedriger als im WT.

Die niedrige F4/80 Expression in CD73-defizienten Tieren deutet auf eine stärkere Aktivierung der APCs nach I/R hin. Um die unterschiedliche Differenzierung der APCs in WT- und CD73^{-/-}-Mäusen zu verifizieren, wurde die Expression von M1 und M2 Makrophagen-Markern in diesen Zellen untersucht. Als M1-Makrophagen werden klassische, pro-inflammatorische Makrophagen bezeichnet, die insbesondere entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- α und IL-6 sezernieren. M2-Makrophagen werden auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt und fördern die Geweberegeneration, beispielsweise durch die Sekretion von TGF- β (siehe 1.2.2). Sieben Tage nach I/R wurden Immunzellen aus Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen extrahiert und antigenpräsentierende Zellen über die Oberflächenmarker CD45, CD11b und CD11c mittels Zellsortierung (FACS) isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von M1- (TNF- α , IL-1 β , IL-6) und M2-Genen (Arginase-1, IL-10, TGF- β) per qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse dieser Genexpressions-analyse sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

Im Vergleich zu wildtypischen Mäusen werden in CD73^{-/-}-Tieren M1-Gene tendenziell stärker, M2-assoziierte Gene dagegen schwächer exprimiert. Dies deutet auf eine M1-Polarisierung der CD73^{-/-} Makrophagen hin, wenngleich bei keinem der untersuchten Gene das statistische Signifikanzniveau erreicht wird. Die generell niedrige Expression aller

82

Inflammation-assoziierten Gene und die vergleichsweise hohe Expression von M2-Genen in WT-Mäusen weist dementsprechend auf eine Polarisierung zu alternativ aktivierten (M2)-Makrophagen hin.



Abbildung 21: Makrophagenpolarisierung in Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen 7 Tage nach I/R. Kardiale APC (CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺) wurden per Zellsortierung (FACS) isoliert und die mRNA-Expression von typischen Genen für M1- (A) sowie M2-Makrophagen (B) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Transkriptmenge ist relativ zum endogenen Referenzgen *Rplp0* angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=4 WT- und n=5 CD73^{-/-}-Mäuse.

Neben den oben beschriebenen myeloischen Zellen wandern nach Infarkt auch verschiedene T-Zellsubtypen in das Herzgewebe ein (vergleiche auch 4.3). In Abbildung 22A-C sind repräsentative *Dot Plots* von der FACS-Analyse kardialer T-Zellen gezeigt. Abbildung 22D-F zeigt den zeitlichen Verlauf der Zahl an T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen sowie den prozentualen Anteil von regulatorischen T-Zellen an den T-Helferzellen in Herzen von WT- und CD73^{-/-}-Tieren. In WT-Mäusen steigt die Anzahl der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen im Herzgewebe bis 7 Tage nach I/R auf das etwa Dreifache an und fällt im späteren Heilungsverlauf wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Abbildung 22D+E). Dagegen nimmt die Zahl dieser beiden T-Zellpopulationen in CD73^{-/-} Mäusen auch 14 Tage nach I/R weiter zu und ist massiv höher als in wildtypischen Tieren (T-Helferzellen: WT: 36 ± 13 ; CD73^{-/-}: 394 ± 304 Zellen/mg Herzgewebe; p<0.01). Dagegen ist der prozentuale Anteil der regulatorischen T-Zellen (CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) an den gesamten T-Helferzellen (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) in CD73-defizienten Tieren tendenziell geringer als in WT-Mäusen (Abbildung 22F).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Zelltypen konnten bei B- und NK-Zellen keine Unterschiede zwischen WT- und CD73^{-/-}-Mäusen nach I/R im Herzgewebe gefunden

werden. In Abbildung 23 sind repräsentative FACS-Analysen und die entsprechenden Zellzahlen im Herzen der Tiere dargestellt.



Abbildung 22: Infiltration von T-Zellen in das Herzgewebe von WT- und CD73^{-/-}-Mäusen nach I/R. Auf der linken Seite sind repräsentative FACS-Analysen der T-Helferzellen (A), der zytotoxischen T-Zellen (B) und der regulatorischen T-Zellen (C) 14 Tage nach I/R im Herzen dargestellt. Auf der rechten Seite ist die quantitative Analyse der T-Helferzellen (D) und der zytotoxischen T-Zellen (E) pro mg Herzgewebe gezeigt. F: prozentualer Anteil von regulatorischen T-Zellen (Treg; $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) an den T-Helferzellen (CD45⁺CD3⁺CD4⁺). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=3-7, *p<0.05.



Abbildung 23: B- und NK-Zellen im Herzgewebe von WT- und CD73^{-/-}**-Mäusen nach I/R.** Auf der linken Seite sind repräsentative *Dot Plots* der B-Zellen (**A**) und NK-Zellen (**B**) 7 Tage nach I/R im Herzen dargestellt. Auf der rechten Seite ist die quantitative Analyse der B-Zellen (**C**) und NK-Zellen (**D**) pro mg Herzgewebe gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=3-7, *p<0.05.

Die Zahl der B-Zellen ändert sich nach I/R sowohl in WT- als auch in CD73^{-/-}-Mäusen kaum (Abbildung 23C). Im Gegensatz dazu weisen NK-Zellen eine ähnliche Einwanderungskinetik wie T-Zellen im WT auf. Abbildung 23D zeigt, dass dessen Zellzahl bei WT- und CD73^{-/-}-Tieren bis 7 Tage nach I/R auf das ca. 3.5-fache ansteigt und anschließend wieder auf basale Werte zurückfällt.

4.7.3 Zytokinspiegel im Herzen und Serum nach I/R

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, führt die Deletion der CD73 zu einer verlängerten Leukozyten-Persistenz im Herzgewebe nach Myokardinfarkt und einem proinflammatorischen Phänotyp der eingewanderten Monozyten und APCs. Daraus ergibt sich die Frage, wie sich diese quantitativen und qualitativen Veränderungen auf das Zytokinmilieu im Herzgewebe auswirken. Es wurde daher die Expression von pro-inflammatorischen (IL-6, IL-17, TNF-α, IFN-γ) und anti-inflammatorischen Zytokinen (TGF-β, IL-10) in Herzlysaten von WT- und CD73^{-/-}-Tieren nach I/R mittels Bio-Plex oder ELISA gemessen. Da funktionelle Einschränkungen und Unterschiede in der Immunzellinfiltration von CD73-Mutanten erst in der späten Heilungsphase auftreten, wurden die Zytokinmessungen 7 und 14 Tage nach I/R durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zytokine im Blutserum bestimmt, um zu untersuchen, ob systemische Unterschiede zwischen WT- und CD73-defizienten Tieren bestehen.

In Abbildung 24 sind die hierbei erhaltenen Daten für Herzlysate (A, B) sowie Blutseren (C, D) zusammengefasst. Sieben Tage nach I/R können alle gemessenen Zytokine mit Ausnahme von IFN- γ im Herzen nachgewiesen werden, wobei TNF- α die höchsten Gewebespiegel aufwies (Abbildung 24A). Aus den Daten geht desweiteren hervor, dass der Gehalt der proinflammatorischen Zytokine IL-17 und TNF- α in CD73^{-/-}-Mäusen signifikant höher, der des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β dagegen niedriger als im Wildtyp ist.



Abbildung 24: Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Herzen und Blut von WTund CD73^{-/-}-Mäusen nach Myokardinfarkt. Die Messung der Zytokine erfolgte im Herzlysat (A, B) oder im Blutserum (C, D) mittels Bio-Plex oder ELISA. Die Zytokinmenge wurde im Gewebe auf die Gesamtproteinmenge im Herzen bezogen. Im Blut sind die Zytokine pro ml Serum angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=4-6, *p<0.05.

14 Tage nach I/R ist die Menge an IL-6 nicht mehr messbar, wohingegen interessanterweise der Gehalt von IL-17 und TNF- α in beiden Gruppen ansteigt. Zu diesem späten Zeitpunkt der Heilungsphase weisen hingegen die Gewebespiegel des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 im Wildtyp ein höheres Niveau auf als in der CD73^{-/-}-Mutante (WT: 381±73,CD73^{-/-}: 276±59 pg/mg Gesamtprotein; p=0.035).

Demgegenüber konnten im Blut keine Unterschiede zwischen WT- und $CD73^{-/-}$ -Mäusen festgestellt werden (Abbildung 24C+D). Sieben Tage nach I/R ist das Zytokinprofil im Serum prinzipiell ähnlich zu dem im Herzen, so dass auch im Blut die TNF- α -Konzentration am höchsten ist. Im Gegensatz zum Herzen ist IFN- γ im Serum nachweisbar, wenn auch nur in niedriger Konzentration (Abbildung 24C). Zwischen Tag 7 und 14 nach I/R steigt die TNF- α -und die IFN- γ -Konzentration etwa auf das 3- bis 4-fache an. IL-6 nimmt dagegen ähnlich wie im Herzen ab.

Zusammenfassend demonstrieren die präsentierten Daten, dass CD73 offenbar eine wichtige Rolle in der Wundheilung nach Herzinfarkt einnimmt. Während sich nach Infarkt die Ejektionsfraktion in WT-Tieren nach initialer Abnahme mit fortschreitender Heilung stabilisieren kann, wird die Pumpleistung in CD73-defizienten Mäusen kontinuierlich schlechter. Die funktionelle Beeinträchtigung geht einher mit einer verlängerten Persistenz der Immunzellen im Gewebe, einem proinflammatorischen Phänotyp von kardialen Monozyten und Makrophagen sowie einer erhöhten Expression von entzündungsfördernden Zytokinen im Herzgewebe.

Die in 4.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Ektonukleotidase nur auf zwei Zellpopulationen im Herzen exprimiert wird: auf Leukozyten und Endothelzellen. Um zu untersuchen, welchem dieser beiden CD73-exprimierenden Zelltypen im Heilungsprozess nach Herzinfarkt die wichtigere Rolle zukommt, wurden in unserem Institut Knochenmarkchimäre generiert [277]. Das Knochenmark aus WT-Mäusen wurde dazu in CD73-defiziente Tiere transplantiert, so dass die entstandenen chimären Mäuse wildtypische, CD73⁺-Leukozyten bildeten, während die übrigen Zellen und somit auch die Endothelzellen kein CD73 exprimierten. Es stellte sich heraus, dass die chimären Mäuse 14 Tage nach I/R eine ähnlich hohe Ejektionsfraktion zeigen wie WT-Mäuse [277]. Der Phänotyp von CD73defizienten Mäusen konnte somit durch die Rekonstruktion der CD73-Expression auf Leukozyten vollständig aufgehoben werden. Dies belegt, dass die Expression der CD73 auf Leukozyten für die Heilungsprozesse nach Infarkt wichtig ist, während die CD73 auf Endothelzellen offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2 und 4.3 zeigen außerdem, dass eine nennenswerte CD73-Expression innerhalb der Leukozyten auf nur drei Subpopulationen beschränkt ist: auf T-Zellen, Granulozyten und NK-Zellen. Die Expression auf NK-Zellen ist dabei vergleichsweise gering und insbesondere nach Infarkt machen die T-Zellen und Granulozyten den Großteil der CD73-positiven Leukozyten im Gewebe aus (Abschnitt 4.3). Es stellt sich daher die Frage, ob die funktionellen Einschränkungen und die veränderte Immunantwort in CD73^{-/-}-Mäusen nach Herzinfarkt durch das Fehlen von CD73 auf T-Zellen oder auf Granulozyten ausgelöst werden. Es wäre außerdem denkbar, dass beide Zelltypen gleichermaßen zu dem beobachteten Phänotyp der CD73^{-/-}-Tiere beitragen. Um dem weiter nachzugehen, wurden T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}) generiert und auf ihre Funktion nach Herzinfarkt untersucht. Im Einzelnen wurden Pumpfunktion und Narbenbildung bei diesen Tieren untersucht und mit den Werten von CD4-Cre^{-/-}CD73^{flox/flox} Kontrollen und konstitutiven (globalen) CD73^{-/-}-Mäusen verglichen.

4.7.4 Der Heilungsprozess in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen

4.7.4.1 Charakterisierung der T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäuse

T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse wurden unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems gezüchtet. Dazu wurden CD4-Cre^{+/-}-Mäuse mit CD73^{flox/flox} Tieren verpaart, so dass CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox} Mäuse entstanden. Das Zuchtschema ist im Abschnitt 3.1.1 detailliert beschrieben. Im Folgenden werden die CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox} Tiere als T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse bezeichnet. In diesen Tieren wird unter der Kontrolle des CD4-Promoters das *loxP*-flankierte CD73-Gensegment deletiert, so dass T-Zellen keine funktionelle CD73 exprimieren. Der Genotyp der Mäuse wurde mittels PCR-Analyse von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien ermittelt. Um sicherzugehen, dass CD73 tatsächlich nur auf T-Zellen deletiert wurde, wurde die Expression der CD73 auch durchflusszytometrisch auf verschiedenen Zelltypen untersucht: Wie die Ergebnisse aus Abschnitt 4.2 zeigen, wird die Ektonukleotidase im Blut hauptsächlich auf den verschiedenen T-Zellpopulationen und auf Granulozyten exprimiert. Vorversuche zeigten zudem, dass Makrophagen aus dem Peritonealraum ebenfalls eine hohe CD73-Expression aufweisen. Aus diesem Grund wurde die CD73-Expression in Tzellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen auf T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und Granulozyten aus dem Blut sowie auf Makrophagen aus dem Peritoneum mittels FACS analysiert. Als Kontrollen dienten global CD73-defiziente Tiere sowie CD4-Cre^{-/-}CD73^{flox/flox} Mäuse. Letztere enthalten zwar die *loxP*-Stellen, exprimieren jedoch keine Cre-Rekombinase, so dass CD73 normal gebildet wird.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen sind in Abbildung 25 zusammengestellt. Es zeigte sich, dass die CD73 in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Tieren auf Granulozyten aus dem Blut und auf Peritonealmakrophagen im selben Maße exprimiert wird wie in CD73^{flox/flox}-Kontrollmäusen. Dagegen kann CD73 weder auf T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺) noch auf zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) aus dem Blut detektiert werden.



Abbildung 25: Expression der CD73 in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen und Kontrollen. Als Kontrollen dienten CD4-Cre^{-/-}CD73^{flox/flox} Tiere und konstitutive (globale) CD73-defiziente Mäuse. Die Expression wurde auf T-Helferzellen (CD3⁺CD4⁺), zytotoxischen T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) und Granulozyten aus dem Blut, sowie auf Makrophagen aus dem Peritonealraum durchflusszytometrisch untersucht. Graue Histogramme = *fluorescence minus one* Kontrolle (FMO).

Insgesamt bestätigt die FACS-Analyse somit die Spezifität der T-zellspezifischen CD73-Mutante. Interessanterweise sind auch CD4-negative T-Zellen (CD8⁺ zytotoxische T-Zellen) von der Deletion betroffen sind, obwohl die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD4-Promoters steht. Das kann damit erklärt werden, dass T-Zellen über ein Stadium im Thymus heranreifen, in dem sie sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren. Aus diesen doppeltpositiven Lymphozyten differenzieren sich dann die einfach positiven CD4⁺ T-Helferzellen oder CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Da diese Zellen aber alle das CD4⁺CD8⁺-Stadium im Thymus durchlaufen haben, ist die CD73 in beiden T-Zellpopulationen deletiert.

4.7.4.2 Die Herzfunktion von T-zellspezifischen CD73^{-/-} Mäusen nach I/R

Um nun die Rolle der CD73 auf T-Zellen bei der Heilung nach Herzinfarkt (50 min I/R) näher zu untersuchen, wurde zunächst die Herzfunktion der T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäuse nach I/R bestimmt. Da die Unterschiede in der Pumpleistung bei WT- und konstitutiven CD73^{-/-}-Mäusen erst sukzessiven im Verlauf der Heilung nach Infarkt auftraten, wurden linksventrikuläre Parameter vor der Induktion des Infarktes (basal) sowie 1, 2, 3 und 4 Wochen nach MI mittels ¹H-MR-Bildgebung erfasst. Zur Kontrolle wurden die gleichen Experimente mit CD4-Cre^{-/-}CD73^{flox/flox} (nachfolgend als Kontrollmäuse bezeichnet) und globalen CD73^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

Die Ergebnisse der MRT-Messungen sind in Abbildung 26–29 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Ejektionsfraktion eine Woche nach I/R im Vergleich zu den basalen Werten in allen drei Gruppen signifikant abnahm (Abbildung 26A). In T-zellspezifischen und Kontrollmäusen beträgt die Abnahme etwa 35%, in globalen CD73^{-/-}-Tieren sogar ~ 45%. Wie schon in Abschnitt 4.7.1 für wildtypische Mäuse beschrieben, steigt die EF in Kontrolltieren 2 Wochen nach I/R tendenziell wieder an und stabilisiert sich im weiteren Heilungsverlauf. Dagegen ist die Ejektionsfraktion in globalen CD73^{-/-}-Mäusen 2 Wochen nach I/R wie erwartet signifikant niedriger als in den Kontrollen (CD73^{-/-}: 44±7 %; Kontrolle: 54±8 %; p=0.009). Auch in der späteren Phase der Heilung bleiben die Werte des globalen CD73-Transgens tendenziell niedriger. Die T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäuse zeigen generell einen ähnlichen Verlauf wie global CD73-defiziente Tiere. Nach der initialen Abnahme eine Woche nach I/R erholen sich die Tiere nicht wieder und die Ejektionsfraktion bleibt konstant niedrig (3 Wochen nach I/R; T-zellspezifischer CD73^{-/-}: 43±7%, Kontrolle 52±8%, p=0.03).

Deutlicher werden die Unterschiede zwischen den beiden CD73^{-/-}-Gruppen und den Kontrollen bei Betrachtung der enddiastolischen (EDV) und endsystolischen Volumina (ESV; Abbildung 26B-D). In Abbildung 26C sind repräsentative, mittventrikuläre Kurzachsenschnitte in der Diastole und Systole 2 Wochen nach I/R gezeigt. Man kann klar erkennen, dass sowohl der enddiastolische als auch der endsystolische Durchmesser in T-zell-

spezifischen und globalen CD73^{-/-}-Mäusen größer ist als in den Kontrollen. Dieser visuelle Eindruck wird durch die quantitative MRT-Analyse bestätigt (Abbildung 26B+D). Sowohl globale, als auch T-zellspezifische CD73^{-/-}-Tiere weisen nach I/R signifikant höhere EDV und ESV auf als die Kontrollmäuse. Die Unterschiede zwischen den transgenen Gruppen und den Kontrollen bleiben dabei über den gesamten Beobachtungszeitraum etwa gleich groß. Aufgrund der hohen Streuung wird zwar nicht zu jedem Messpunkt das Signifikanzniveau erreicht, dennoch weist der gesamte Verlauf der EDV und ESV auf eine deutliche Dilatation der beiden Mutanten-Herzen nach I/R hin. Bemerkenswert ist, dass die Volumenzunahme in der Enddiastole und Endsystole bei beiden CD73^{-/-}-Gruppen während des gesamten Heilungsverlaufes etwa gleich groß ist.



Abbildung 26: Die Deletion der CD73 auf T-Zellen führt ähnlich wie globale CD73-Defizienz zu einer eingeschränkten Herzfunktion nach I/R. Es wurden T-zellspezifische CD73^{-/-}- (CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}) mit konstitutiven, globalen CD73^{-/-}-Tieren und Kontrollmäusen (CD4-Cre^{-/-}CD73^{flox/flox}) verglichen. Dargestellt sind die Ejektionsfraktion (**A**), das enddiastolische (**B**) sowie das endsystolische (**D**) Volumen. (**C**): Repräsentative mittventrikuläre Kurzachsenschnitte in der Systole und Diastole. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=11 Kontroll- und jeweils n=10 T-zellspezifische Sowie globale CD73^{-/-}-Mäuse. Für die Berechnung der Signifikanzen wurden jeweils T-zellspezifische CD73^{-/-}-(blau) und globale CD73^{-/-}-Mäuse (rot) mit Kontrolltieren verglichen; *p<0.05.

Weitere mittels MRT bestimmte funktionelle und morphologische Parameter sind in Abbildung 27 zusammengefasst. Insgesamt zeigten sich hierbei nur wenige Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Unter basalen Bedingungen weisen globale CD73^{-/-}-Mäuse ein etwas höheres Schlag- und Herzzeitvolumen auf als die Kontrollen. Nach Herzinfarkt verschwindet dieser Unterschied. Auch beim Herzzeitvolumen (HZV) zeigen sich keine großen Unterschiede (Abbildung 27B). Lediglich 3 Wochen nach I/R ist das HZV in T-zellspezifischen CD73^{-/-} Mäuse signifikant niedriger als in den Kontrollen (T-zellspezifischer CD73^{-/-}: 16.7±2.1; Kontrollen: 14.7±1.2 ml min⁻¹; p=0.015). Auch die linksventrikuläre (LV) Masse bezogen auf das Körpergewicht und die LV Wanddicke ist in transgenen Tieren und Kontrollen gleich (Abbildung 27C+D).



Abbildung 27: Funktionelle und morphologische Parameter von T-zellspezifischen CD73^{-/-}-, globalen CD73^{-/-}- und Kontrollmäusen. Gezeigt sind das Schlagvolumen (A), das Herzzeitvolumen (B), die linksventrikuläre Masse relativ zum Körpergewicht (C) und die mittlere linksventrikuläre Wanddicke (D) der Tiere. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=11 Kontroll- und jeweils n=10 T-zellspezifische sowie globale CD73^{-/-}-Mäuse; *p<0.05.

Die erniedrigte EF nach I/R in den beiden CD73^{-/-}-Gruppen deutet auf eine global verringerte Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels hin. Um die funktionellen Einschränkungen

besser zu lokalisieren, wurde die fraktionelle Verkürzung (*fractional shortening*, FS) über den gesamten Ventrikelquerschnitt bestimmt. Die FS ist die prozentuale Durchmesserverkürzung des linken Ventrikels, berechnet sich aus dem Verhältnis von enddiastolischem und endsystolischem Durchmesser und beschreibt somit die Wandbewegung bei der Kontraktion des Herzens. Für die Analyse der FS wurden Kurzachsenschnitte in 200 Sektoren unterteilt und die Durchmesserverkürzung für jeden Abschnitt berechnet. Die 200 Sektoren können insgesamt vier Bereichen zugeordnet werden: der Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie dem Septum (siehe 3.9.3). Dementsprechend kann untersucht werden, inwieweit die einzelnen Bereiche des Ventrikels zur Pumpleistung beitragen und ob sich hier deutlichere Unterschiede bezüglich der lokalen Kontraktilität in den drei Versuchsgruppen manifestieren.

In einem ersten Schritt wurde die fraktionelle Verkürzung der gesunden Herzen analysiert (Abbildung 28). Die Auswirkungen der I/R auf die lokale Kontraktion nach 1, 2, 3 und 4 Wochen sind in Abbildung 29 zusammengefasst. Auf der linken Seite sind jeweils die Mittelwerte der FS für jeden der 200 Sektoren dargestellt, während auf der rechten Seite die gemittelte Verkürzungsfraktion für jeden der vier Bereiche des linken Ventrikels angegeben ist. Unter basalen Bedingungen kann die stärkste Wandbewegung in allen Versuchsgruppen in den Sektoren der Seiten- und Hinterwand beobachtet werden, während die FS im Bereich des Septums am niedrigsten ist (Abbildung 28A+B).



Abbildung 28: Fraktionelle Verkürzung (FS) des linken Ventrikels in gesunden T-zellspezifischen und globalen CD73^{-/-}-Mäusen sowie Kontrolltieren. A: Der linke Ventrikel wurde in 200 Sektoren unterteilt und die fraktionelle Verkürzung für jeden Sektor berechnet. Die Standardabweichungen sind als graue Schattierung angedeutet. B: Darstellung der Verkürzungsfraktion für den gesamten Bereich der Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie des Septums. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=11 Kontroll- und je n=10 T-zellspezifische sowie globale CD73^{-/-}-Mäuse; *p<0.05.

In Übereinstimmung mit den oben dargestellten Daten der globalen Ejektionsfraktion (Abbildung 26A), lassen sich auch in der lokalen FS bei gesunden Mäusen keine

Unterschiede zwischen CD73^{-/-}-Gruppen und Kontrolltieren nachweisen. Lediglich in den septalen Sektoren ist die FS in den globalen CD73^{-/-}-Mäusen leicht erhöht (Abbildung 28A+B).

Eine Woche nach Induktion des Herzinfarktes sinkt die fraktionelle Verkürzung in allen Sektoren ab (Abbildung 29). Erwartungsgemäß sind dabei die Vorder- und Seitenwand am stärksten betroffen, da dies das Hauptversorgungsgebiet der LAD umfasst. In diesen Bereichen nimmt die FS um 88-95% (Vorderwand) bzw. 75-80% (Seitenwand) ab. Der Abfall der FS in der Hinterwand (59-67%) ist im Vergleich dazu etwas niedriger. Die geringste Beeinträchtigung zeigt das Septum (34-45%), dessen Beitrag zur EF jedoch auch schon unter basalen Bedingungen am niedrigsten war (vergleiche Abbildung 28). Zu diesem Zeitpunkt kann kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen beobachtet werden (Abbildung 29). Dies ändert sich 2 Wochen nach Infarkt. Während die FS im Bereich der Vorderwand bei den Kontrollmäusen auf etwa das Doppelte ansteigt, sinkt die Verkürzungsfraktion bei T-zellspezifischen und globalen CD73^{-/-}-Tieren sogar tendenziell ab (FS der Kontrolltiere: 9.5±6.9%; globaler CD73^{-/-}: 0.9±2.1%; T-zellspezifischer CD73^{-/-}: 1.9±3.23%; p<0,05). In den drei anderen Bereichen steigt die FS der Kontrolltiere ebenfalls tendenziell an, insbesondere im Abschnitt der Seitenwand (1 w post I/R: 11.8±4.6%; 2 w post I/R: 23.8±10.7%). Auch in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen kommt es zu einer Zunahme der Wandbewegung in diesem Bereich (1 w post I/R: 15.7±6.8%; 2 w post I/R: 20.2±11.9%). Wie in Abbildung 29 gezeigt bleibt die FS in den Sektoren der Seiten- und Hinterwand in den globalen CD73^{-/-}-Tieren dagegen niedrig. Verglichen mit den Kontrollen ist die Kontraktiliät der Seitenwand in diesen Tieren signifikant verringert (FS der Kontrolltiere: 23.8±10.7%; globaler CD73^{-/-}: 13.1±8.5%; p=0.021). Die Bewegung der Hinterwand und des Septums ändert sich gegenüber einer Woche nach I/R in beiden CD73^{-/-}-Gruppen nur wenig.

Drei Wochen nach I/R bleibt die FS im Bereich der Vorderwand in beiden transgenen Gruppen signifikant niedriger als in den Kontrollen (Kontrolle: 10.7 ± 7.1 ; globaler CD73^{-/-}: $4.5\pm2.4\%$; T-zellspezifischer CD73^{-/-}: 2.9 ± 3.8 ; p<0.05). In Kontroll- und T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Tieren kommt es zu diesem Zeitpunkt kaum noch zu Veränderungen. Im Gegensatz dazu nimmt die FS in globalen Mutanten in allen Bereichen zu und nähert sich somit den Werten der T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Tiere an (Abbildung 29). Vier Wochen nach Infarkt verändert sich die fraktionelle Verkürzung im Vergleich zu 3 Wochen nach I/R kaum mehr.



Die FS der beiden transgenen Gruppen bleibt im Bereich der Vorderwand auf einem konstant niedrigen Niveau und ist somit weiterhin signifikant geringer als in den Kontrollen.

Abbildung 29: Fraktionelle Verkürzung (FS) des linken Ventrikels nach I/R in T-zellspezifischen und globalen CD73^{-/-}-Mäusen sowie Kontrolltieren. A: Fraktionelle Verkürzung für die 200 Sektoren des linken Ventrikels. Standardabweichungen sind als graue Schattierung angedeutet. B: Darstellung der Verkürzungsfraktion für den gesamten Bereich der Vorder-, Seiten- und Hinterwand sowie des Septums. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n=11 Kontroll- und je n=10 T-zellspezifische sowie globale CD73^{-/-}-Mäuse; *p<0.05; **p<0.01.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass es infolge des Herzinfarkts in globalen und Tzellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen zu einer ähnlichen Einschränkung der Wandbewegung im Bereich der Vorderwand kommt. Die Bewegungsstörung in diesem Bereich manifestiert sich 2 Wochen nach I/R und verbessert sich im Gegensatz zu den Kontrollen im weiteren Heilungsverlauf nicht. Dies zeigt, dass insbesondere der Bereich, der am stärksten vom Perfusionsdefizit während der Ischämie betroffen ist, aufgrund des Fehlens der CD73 (global oder T-zellspezifisch) die gravierendsten Funktionseinschränkungen aufweist.

4.7.4.3 Qualitative Analyse des Narbengewebes nach I/R

Eine denkbare Ursache für die regionalen Wandbewegungsstörungen in den beiden CD73^{-/-}-Tieren könnte eine stärkere Narbenbildung oder strukturelle Unterschiede des fibrotischen Gewebes im Infarktbereich sein. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde zunächst die Narbenregion globaler CD73^{-/-}-Mäusen von Dr. med. Florian Bönner untersucht [277]. Tatsächlich zeigten diesen Tiere 4 Wochen nach Infarkt eine stärkere Wandausdünnung und ein größeres Infarktareal (Infarktexpansion) als wildtypische Tiere. Zudem war der Anteil an fibrotischem Gewebe in der Infarktregion und in nicht infarzierten Bereichen (Remote-Region) erhöht. Auch in der Qualität des Narbengewebes zeigten sich Unterschiede, da verschieden hohe Anteile der beiden Kollagentypen I und III in WT- und CD73-defizienten Mäusen gefunden wurden. Kollagen I ist in dicht gepackten Bündeln organisiert, während Kollagen III ein lockeres Netzwerk bildet (siehe 1.2.3). Das Vorkommen dieser beiden Kollagentypen beeinflusst somit die Stabilität und mechanische Belastbarkeit des nach I/R gebildeten Narbengewebes. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Qualität der Narbe in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Tieren analysiert werden. Dazu wurde das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III in der Narbenregion des linken Ventrikels untersucht. Wie im Abschnitt 3.10.2 beschrieben, wurden für die Typisierung der unterschiedlichen Kollagenfasern Sirius-Rot-gefärbte Gewebeschnitte mittels Polarisationsmikroskopie untersucht. Die Herzen wurden nach Abschluss der MR-Messungen, also 4 Wochen nach I/R entnommen.

Abbildung 30 zeigt repräsentative polarisationsmikroskopische Aufnahmen aus der Narbenregion, sowie die Ergebnisse der quantitativen Analyse. Im polarisierten Licht kann zwischen gelb-rot leuchtendem Kollagen I und grün erscheinendem Kollagen III unterschieden werden. Wie Abbildung 30A zeigt, dominiert in den Kontrollmäusen Kollagen I (rot), während in den beiden transgenen Gruppen auch Kollagenfasern III (grün) klar erkennbar sind. Für die quantitative Analyse wurde das Verhältnis Kollagen I zu III in vier verschiedenen Arealen des linken Ventrikels bestimmt. Wie in Abbildung 30B dargestellt, werden die visuellen Eindrücke durch die quantitative Untersuchung bestätigt. In Kontrollmäusen überwiegt Kollagen I über Kollagen Typ III. In globalen und T-zellspezifischen-CD73^{-/-} Tieren ist dagegen häufiger das lose gepackte Kollagen III zu finden. Das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III ist in beiden Genotypen signifikant niedriger als in den Kontrollen.



Abbildung 30: Kollagen Typ I und III in der Narbenregion des linken Ventrikels. A: Repräsentative polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Narbengewebes im linken Ventrikel; rot/gelb = Kollagen I; grün = Kollagen III. B: Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III im Narbenbereich. Insgesamt wurde das Verhältnis von Kollagen I zu III in vier verschiedenen Arealen des linken Ventrikels bestimmt und anschließend für jedes Tier gemittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=8; *p<0.05.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es auch in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Mäusen zu funktionellen Beeinträchtigungen und morphologischen Veränderungen nach I/R kommt, wobei das Ausmaß vergleichbar mit denen in globalen CD73^{-/-}-Tieren war. Dies unterstreicht die zentrale Rolle der CD73 auf T-Zellen für den Heilungsprozess nach Herzinfarkt.

5 Diskussion

Trotz großer Fortschritte bei der Diagnostik und Behandlung zählt der Herzinfarkt nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und anderen Industrienationen [5,7]. In Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze ist daher ein besseres Verständnis der Heilungsprozesse nach Myokardinfarkt von fundamentaler Bedeutung. Der Heilungsprozess nach Herzinfarkt ist ein komplexer Vorgang, der viele verschiedene Abschnitte umfasst: Die ischämieinduzierte Nekrose löst eine Reihe von Entzündungsreaktionen aus, diverse reparative Mechanismen werden eingeleitet, die extrazelluläre Matrix wird ab- und neu aufgebaut und schließlich wird eine stabile Infarktnarbe gebildet [16]. Dabei ist die rechtzeitige Eindämmung inflammatorischer Signale von entscheidender Bedeutung, da eine andauernde Entzündung den Herzmuskel weiter schädigt, die Bildung einer stabilen Narbe stört und somit die Pumpfunktion des Herzens weiter verschlechtert [98]. Ein wichtiger Regulationsmechanismus in einer Vielzahl entzündlicher Prozesse stellt das purinerge System dar [105]. Dabei kommt insbesondere der CD73 eine wichtige Rolle zu, da das von diesem Enzym gebildete extrazelluläre Adenosin ein wichtiger Immunmodulator ist [105]. In dieser Arbeit wurde die Rolle der CD73 in der Entzündungsreaktion nach Ischämie/Reperfusion im Mäuseherzen im Detail untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die CD73 auf eingewanderten T-Zellen und Granulozyten im Myokard hochreguliert wird und damit das Herz vor einer unkontrollierten Entzündung in der Heilungsphase nach Infarkt schützt. Es konnte außerdem demonstriert werden, dass insbesondere der CD73 auf T-Zellen eine entscheidende Bedeutung in der Wundheilung nach I/R zukommt.

5.1 Residente Immunzellen im gesunden Mäuseherzen

5.1.1 Isolation von Immunzellen aus dem Herzen

Ein wichtiger Aspekt aller Untersuchungen an Immunzellen im Gewebe ist die Charakterisierung und Phänotypisierung verschiedener Zellpopulationen mittels Methoden wie Durchflusszytometrie, qRT-PCR oder Zytokin-Assays. Derartige Untersuchungen erfordern das Herauslösen der Immunzellen aus einem Gewebeverband, ohne die Zellintegrität zu beeinträchtigen. In dieser Hinsicht stellt das Herz mit seiner stabilen, festen Konsistenz eine besondere Herausforderung dar.
Um die Bedeutung von CD73 in der Entzündungsreaktion nach kardialer I/R zu untersuchen, war es notwendig die Expression des Ektoenzyms auf den Zellen des gesunden Herzen zu analysieren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, mit der residente Immunzellen aus dem Herzen effektiv isoliert werden können. Ein derartiges Verfahren wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die Vereinzelung von Zellen aus weichen Organen (z.B. Milz, Thymus, Lymphknoten) kann durch das Zerreiben und Filtern über ein feinmaschiges Sieb erreicht werden. Beim Herzen ist diese einfache Technik aufgrund der festen Beschaffenheit des Gewebes jedoch nicht möglich. Stattdessen muss das Herz zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend zum Verdau der extrazellulären Matrix mit einer Enzymlösung behandelt werden. Entsprechende Methoden wurden für die Isolation von kardialen Endothelzellen [278,279] und Leukozyten [76,280,281] in der Literatur beschrieben. Der Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass der Verdau der entstandenen Gewebeklumpen oft nicht homogen und vollständig abläuft. Das ist insbesondere ungünstig wenn eine quantitative Analyse der kardialen Zellen durchgeführt werden soll oder für nachfolgende Untersuchungen wie die qRT-PCR hohe Zellausbeuten benötigt werden. Hinzu kommt, dass die in den Herzgefäßen vorhandenen Blutzellen häufig nicht abgetrennt werden und somit nicht zwischen intravasalen und residenten Immunzellen unterschieden werden kann.

Zur Isolation von Kardiomyozyten wird das Herz üblicherweise nach Langendorff mit einer Kollagenase-Lösung retrograd über die Aorta perfundiert, um einen gleichmäßigen Verdau zu erreichen [259,260,282]. Auf der Basis dieses Ansatzes wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit Protokolle zur Immunzellisolation aus dem Herzen entwickelt. Durch die verwendete Pufferzusammensetzung sowie die in 3.2 beschriebenen Extraktionsschritte blieb die Kardiomyozytenintegrität während des gesamten Isolationsprozesses weitestgehend erhalten, so dass das Signal der nachfolgenden FACS-Analyse nicht durch Zelldebris oder apoptotische Vesikel ("blebs") gestört wird. Auf diese Weise gelang es in dieser Arbeit zwei Hauptzellfraktionen effektiv aus dem Herzgewebe zu extrahieren und voneinander abzutrennen: vitale Kardiomyozyten und alle weiteren nicht-Kardiomyozyten. Letztere Fraktion umfasst Leukozyten (CD45⁺), Endothelzellen (CD31⁺) und CD45⁻CD31⁻ Zellen (Abbildung 9). Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren ca. 77% der gesamten kardialen Immunzellen aus dem Herzen gewonnen werden können. Neben der hohen Zellausbeute hatten die verwendeten Protokolle zwei weitere Vorteile. Zum einen wurde das Herz vor dem Verdau über die Koronargefäße von Blut freigespült, so dass die Kontamination

mit Blutzellen in der isolierten Einzelzellsuspension vernachlässigbar war (0.19±0.11%). Zum anderen blieben die Kardiomyozyten größtenteils intakt, so dass die Hintergrundfluoreszenz durch Zelldebris in der nicht-Kardiomyozyten Fraktion sehr gering war. Dies ermöglichte erstmals die Durchführung einer sensitiven FACS-Analyse aller kardialen Zellpopulationen, einschließlich mengenmäßig gering vorkommender Zellen wie residente Leukozyten in normalen Herzen.

Prinzipiell besteht bei der Zellisolierung durch Gewebeverdau die Gefahr, dass die verwendeten proteolytischen Enzyme Epitope auf der Zelle modifizieren oder aber die Abspaltung (*shedding*) von membrangebundenen Oberflächenmolekülen induzieren und folglich die Detektion durch FACS-Antikörper verhindern [269-271]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass dies zumindest für CD73 und CD39 nicht der Fall ist (Abbildung 11), und die verwendete Methode somit eine quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen erlaubt. Die entwickelten Protokolle sind von allgemeinem Interesse, da nun Veränderungen unterschiedlicher kardialer Zellpopulationen bei verschiedenen Herz-krankheiten quantitativ und phänotypisch untersucht werden können.

Unter Anwendung dieser Protokolle konnte gezeigt werden, dass bereits das gesunde Mäuseherz 2.27±0.91·10³ Immunzellen/mg Herzgewebe enthält. Dieses Ergebnis war überraschend, da das Herz im Gegensatz zu anderen Organen wie Lunge, Haut, Darm oder Leber im Normalfall nicht mit Antigen aus der Umwelt in Kontakt kommt. Aus diesem Grund wird generell davon ausgegangen, dass zumindest unter basalen Bedingungen keine oder nur sehr eingeschränkte Immunreaktionen im Herzen ablaufen [283]. Dennoch konnten hier im Rahmen einer durchflusszytometrischen Analyse verschiedene residente Leukozyten-populationen im gesunden Mäuseherzen nachgewiesen werden. Den mit Abstand größten Anteil an der Gesamtzahl kardialer Immunzellen im gesunden Mäuseherzen bilden myeloische antigenpräsentierende Zellen mit 73% (Abbildung 10). Die APCs exprimieren die Integrinuntereinheiten CD11b sowie CD11c und über 70% weisen zusätzlich die Ober-flächenproteine F4/80 und MHCII auf.

Die beiden Marker CD11c und F4/80 werden häufig zur Unterscheidung von dendritischen Zellen (CD11c⁺) und Makrophagen (F4/80⁺) verwendet. In den letzten Jahren stellte sich aber klarer heraus, dass beide Oberflächenmarker insbesondere für nicht-lymphatische Organe nicht immer zelltypspezifisch sind [284]. Beispielsweise exprimieren Alveolarmakrophagen in der Lunge im hohen Maße CD11c [285], während in der Niere zusätzlich zu F4/80-negativen auch F4/80-positive dendritische Zellen (DCs) gefunden wurden [286,287]. Zudem

wurde postuliert, dass die heterogene Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen eine Vielzahl verschiedener Subpopulationen umfasst und die Übergänge zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen oftmals fließend sind [284,288,289]. Eine eindeutige Zuordnung der residenten, kardialen CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80^{+/-} MHCII^{+/-} Zellen zu der Gruppe der Makrophagen oder der DCs ist somit allein anhand der Oberflächenmarker nicht möglich. Die Zellen wurden daher in dieser Arbeit ganz allgemein als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet.

Wie zu erwarten, konnten nur wenige Granulozyten, inflammatorischen Monozyten und NK-Zellen im gesunden Mäuseherzen gefunden werden (Abbildung 10). Im Vergleich dazu war die Zahl an T- und B-Zellen interessanterweise um etwa das 4-5-fache höher. Es wurde lange angenommen, dass Lymphozyten, die noch kein Antigenkontakt hatten (naive Lymphozyten), kontinuierlich zwischen Blut- und Lymphgefäßen zirkulieren, ohne in nicht-lymphatische Gewebe einzuwandern. Neuere Studien an gesunden Mäusen zeigen jedoch, dass auch nichtlymphatische Organe, wie das Gehirn, die Lunge oder die Nieren naive T- und B-Zellen enthalten [290,291]. Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die Zellen nicht lange in den Geweben verbleiben, sondern vielmehr ständig zwischen Blut- und Lymphgefäßen sowie den nicht-lymphatischen Geweben zirkulieren. Da die Wanderung zwischen Blut- und Lymphsystem jedoch bevorzugt abläuft, ist die Anzahl der naiven Lymphozyten in den peripheren Geweben allerdings gering. Es ist bislang nicht klar, ob es sich bei der Migration in die nicht-lymphatischen Organe um ein zufälliges, willkürliches Ereignis handelt oder ob die naiven Lymphozyten dort eine spezielle Funktion erfüllen. In diesem Zusammenhang postulierten Cose et al., dass naive Lymphozyten grundsätzlich in jedes nicht-lymphatische Organ einwandern können [290,291]. Es wäre daher vorstellbar, dass es sich bei den T- und B-Zellen im Herzen um naive Lymphozyten handelt, die kontinuierlich in das Myokardgewebe ein- und auswandern. Diese Theorie erscheint zumindest unter sterilen, nicht-inflammatorischen Bedingungen wahrscheinlicher als die Möglichkeit, dass es sich bei den kardialen Lymphozyten um aktivierte Effektor- oder Gedächtniszellen handelt, auch wenn dies bei dem bisherigen Wissensstand nicht ausgeschlossen werden kann.

5.1.2 Funktion der residenten Immunzellen

Obwohl residente APCs im Herzen schon seit den 80er Jahren beschrieben wurden [281,292], ist deren genaue Funktion unter basalen Bedingungen bislang noch weitgehend unklar. In

vielen anderen Organen spielen residente Makrophagen und DCs eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase sowie bei der Erkennung von Gewebeschäden und Pathogenen [293-295]. In der Niere bilden APCs beispielsweise ein komplexes, zusammenhängendes Netzwerk im gesamten Interstitium aus. Die dendritischen Fortsätze ragen dabei weit in den interstitiellen Raum, vermutlich um die Umgebung nach Antigenen abzusuchen [296]. Residente, renale APCs agieren somit als "Wächter" und können schnell auf eine Vielzahl von Stimuli, die infolge eines Gewebeschadens entstehen, reagieren [297]. In den ersten 24 h nach renaler I/R sind APCs die Hauptproduzenten von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6, MCP-1 sowie RANTES und fungieren daher vermutlich als Initiatoren der Entzündungsreaktion [286]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch residente APCs im Herzen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Gewebeschädigungen sowie der darauffolgenden Initiierung und Eingrenzung der Entzündungsreaktion spielen, auch wenn konkrete Nachweise bislang noch fehlen.

Zusätzlich zu den genannten Funktionen wäre es denkbar, dass residente APCs im Herzen eine typische Funktion von dendritischen Zellen besitzen, nämlich die Fähigkeit zur Aktivierung von naiven T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Unreife dendritische Zellen besitzen eine hohe phagozytotische Aktivität und sind klassischerweise dafür bekannt, dass sie bei einer Infektion eingedrungene Erreger im peripheren Gewebe aufnehmen können [298]. Die Erkennung der pathogenen Antigene führt zur Differenzierung und Reifung der DCs und initiiert ihre Migration in die Lymphknoten. Dort werden die verarbeiteten Antigene den T-Zellen präsentiert und diese somit aktiviert [298]. Dendritische Zellen können aber auch bei Gewebeschäden in Abwesenheit von mikrobiellen Strukturen als Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem fungieren [299]. Bei dieser "sterilen" Entzündungsreaktion werden die DCs durch endogen freigesetzte Bestandteile aus nekrotischen oder gestressten Zellen (damage-associated molecular patterns, DAMPs) aktiviert. Ähnlich wie nach der Pathogenerkennung kann daraufhin eine T-Zellantwort hervorgerufen werden [299]. Ob residente DCs tatsächlich zur Induktion einer adaptiven Immunantwort nach sterilen Entzündungen im Herzen beitragen, ist bisher noch nicht bekannt. Einen ersten Hinweis darauf liefern die Versuche von Hofmann et al., die mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Partikeln die Wanderung von phagozytierenden Zellen in die drainierenden Lymphknoten des Herzen verfolgen konnten [81]. Sie konnten damit zeigen, dass bereits 16 h nach Herzinfarkt Phagozyten aus dem Myokard in die mediastinalen Lymphknoten eingewandert sind [81]. Die Zellen wurden nicht weiter charakterisiert, aber aufgrund der kurzen Zeitspanne nach Infarkt ist es durchaus möglich, dass es sich hierbei um residente APCs aus dem Herzen gehandelt hat.

5.2 Das purinerge Signalsystem im gesundem Herzen

Die beschriebenen Protokolle zur Isolation kardialer Zellen ermöglichten die Untersuchung der Proteinexpression von CD73 und CD39 auf allen Zellen des Herzens. In der größten Leukozytenpopulation, den residenten APCs, wurde außerdem die mRNA-Expression von 28 Genen des purinergen Systems untersucht. Aufgrund der geringen Zellzahl waren diese Analysen bei anderen kardialen Immunzellen unter basalen Bedingungen leider nicht möglich. Stattdessen wurden die jeweiligen Leukozyten im Blut untersucht, da diese letztlich nach Infarkt in das Herzgewebe einwandern. In diesem Abschnitt wird zunächst die Expression im gesunden Herzen diskutiert, um anschließend die Veränderungen nach I/R in Abschnitt 5.3 zu besprechen.

5.2.1 Die Freisetzung von Nukleotiden aus der Zelle

Wie in der Einleitung beschrieben, sind extrazelluläres ATP und NAD⁺ zwei wichtige Signalmoleküle des purinergen Systems, da sie im Falle eine Zellschädigung als Warnzeichen für das Immunsystem dienen können. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die extrazellulären Konzentrationen der beiden Nukleotide jedoch sehr niedrig (siehe Abschnitt 1.3.1).

Grundsätzlich kann die Freisetzung von Nukleotiden aus intakten Zellen über Kanäle in der Zellmembran, wie Pannexine oder Connexine, vermittelt werden. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Pannexin 1 (Panx1) und die beiden Connexine 43 (Cx43) und 37 (Cx37) von einer Vielzahl an Immunzellen exprimiert werden und ATP freisetzen können [124,130,131,300,301]. Cx43 vermittelt zudem die Freisetzung von NAD⁺ [302]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Panx1, Cx43 und Cx37 auf residenten APCs nachgewiesen werden, jedoch war die mRNA-Expression im Vergleich zu anderen Genen gering (Abbildung 17A). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich auch für die untersuchten Blut-Leukozyten (Abbildung 17D+G). Es ist daher davon auszugehen, dass die Freisetzung von ATP und NAD⁺ über Pannexine und Connexine unter basalen Bedingungen nur gering ist, um den Verlust der wichtigen Metabolite des Energiehaushalt und Elektronentransfers zu verhindern. In Einklang

mit dieser Annahme wurde im gesunden Herzen eine interstitielle ATP-Konzentration im niedrigen nanomolaren Bereich beschrieben [303].

5.2.2 P2-Rezeptoren

Freigesetztes ATP kann über P2-Rezeptoren eine Aktivierung von Immunzellen auslösen und so pro-inflammatorische Signalkaskaden einleiten [110]. Residente APCs im Herzen und ihre Vorläuferzellen, die Monozyten aus dem Blut, wiesen prinzipiell ein ähnliches Expressionsmuster der P2X- und P2Y-Rezeptoren auf (Abbildung 17A+D). In beiden Zelltypen wurden P2Y6 und P2X7 von allen untersuchten Nukleotid-Rezeptoren am stärksten exprimiert. Interessanterweise war die Expression von P2X7 in kardialen APCs 2-fach und im Falle des P2Y6 sogar 5-fach höher als in den Blut-Monozyten. Offenbar werden diese beiden Rezeptoren also während ihrer Reifung zu gewebsständigen APCs im Herzen hochreguliert. Ähnliches konnte bereits an *in vitro* differenzierten Makrophagen gezeigt werden, die im Vergleich zu ihren Monozytenvorläufern aus dem Blut eine höhere Aktivität des P2X7 Rezeptoren daher möglicherweise an der Regulation von Makrophagen-spezifischen Funktionen beteiligt.

Der bevorzugte Ligand des P2Y6-Rezeptors ist nicht ATP, sondern Uridindiphosphat (UDP) [305]. UDP kann infolge von Zellschädigungen freigesetzt werden oder als Abbauprodukt von extrazellulärem Uridintriphosphat (UTP) entstehen [242]. Ähnlich wie beim ATP, liegt die extrazelluläre UTP-Konzentration unter basalen Bedingungen im niedrigen nanomolaren Bereich [306]. Infolge von mechanischem Stress kann UTP über nicht-lytische Prozesse aus Zellen freigesetzt [307] und im Extrazellularraum durch NTPDasen (z.B. CD39) zu UDP hydrolysiert werden [151]. Zhang et al. konnten zeigen, dass P2Y6 in hohem Maße von Peritonealmakrophagen, Knochenmarksmakrophagen (bone marrow macrophages, BMM) und RAW264.7 Makrophagen exprimiert wird und seine UDP-induzierte Aktivierung zur Freisetzung des Monozyten-Chemoattraktor-Proteins-1 (MCP-1/CCL2) führt [146]. Die primäre Funktion dieses Chemokins ist die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in Entzündungsgebiete [145]. Auch nach Myokardgewebe führt dieses Chemokin zu einer raschen Migration von Monozyten/Makrophagen in das Herzgewebe [75]. Da auch die in dieser Arbeit untersuchten kardialen APCs den P2Y6-Rezeptor ähnlich hoch exprimieren, wäre es denkbar, dass sie nach Aktivierung durch UDP ebenfalls MCP-1 freisetzen. Unter basalen Bedingungen ist allerdings davon auszugehen, dass die extrazelluläre UDP-

Konzentration für eine Stimulation des Rezeptors zu gering ist. Erlinge *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass wenige Minuten nach Herzinfarkt ein erhöhter UTP-Spiegel im Blut detektiert werden kann und somit vermutlich auch die Konzentrationen von UTP oder UDP im Extrazellularraum des Herzen zunimmt [308]. Es wäre daher denkbar, dass residente APCs nach MI aufgrund ihrer hohen P2Y6-Expression zur Produktion von chemotaktischen Proteinen angeregt werden und somit zur Induktion der Immunantwort beitragen. Diese Hypothese unterstreicht die in Abschnitt 5.1 vorgeschlagene Funktion der residenten APCs als "Wächter", die schnell auf Zellschädigungen im Herzen reagieren können. In analoger Weise wäre es vorstellbar, dass auch P2X7 zur Einleitung von Entzündungsprozessen nach Zellschädigungen im Herzen beiträgt, da seine Aktivierung zur Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β führt [309]. IL-1 β bewirkt die Infiltration von Neutrophilen und ist ein wichtiger Initiator der sterilen Inflammation [310].

Eine weitere interessante Eigenschaft des P2X7-Rezeptors ist seine Funktion als Scavenger-Rezeptor in Abwesenheit von ATP [311]. Gu *et al.* konnten zeigen, dass Makrophagen in Serum- und ATP-freiem Medium über einen P2X7-vermittelten Mechanismus zur Phagozytose toter Zellen angeregt werden [312]. Aufgrund der niedrigen ATP-Konzentration im gesunden Herzen ist es daher durchaus möglich, dass auch residente APCs über P2X7-Rezeptoren alternde, apoptotische Zellen aufnehmen können. Dies würde die Rolle der residenten APCs bei der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase im gesunden Herzen untermauern (siehe Abschnitt 5.1).

5.2.3 Abbau von extrazellulären Nukleotiden zu Adenosin

Extrazelluläres ATP und NAD⁺ können durch verschiedene Ektoenzyme abgebaut werden, wobei die Halbwertszeit der Nukleotide durch die Aktivität und Expression dieser Enzyme bestimmt wird.

Abbau von extrazellulärem ATP

ATP und ADP können insbesondere durch die Ektonukleotidase CD39 zu AMP hydrolysiert werden [153]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass residente APCs, koronare Endothelzellen (CD31⁺) und CD31⁻CD45⁻ Zellen (Fibroblasten, glatte Muskelzellen) im Herzen eine hohe Oberflächenprotein-Expression von CD39 aufweisen (Abbildung 12, Tabelle 8). Genexpressionsanalysen von kardialen Immunzellen zeigten außerdem, dass sich die hohe CD39-Expression von APCs auch auf der Ebene der mRNA widerspiegelt (Abbildung 17). Aufgrund der hohen Expression der Ektonukleotidase ist von einer schnellen Hydrolyse des extrazellulären ATPs im Herzen durch die obengenannten Zellen auszugehen, so dass die ATP-induzierte Aktivierung von P2-Rezeptoren unter basalen Bedingungen vermutlich nicht zum Tragen kommt. Auf diese Weise können Ektonukleotidasen prinzipiell pro-inflammatorische, ATP-vermittelte Immunreaktionen stoppen bzw. antagonisieren [152].

Neben CD39 können auch die beiden Ektonukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen ENPP1 und ENPP3 extrazelluläres ATP zu ADP oder AMP abbauen [153]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten, dass beide Enzyme im Gegensatz zur CD39 nur schwach von residenten APCs exprimiert werden (Abbildung 17B). Auf diesen Zellen scheint daher CD39 das vorherrschende ATP-degradierende Ektoenzym zu sein.

Abbau von extrazellulärem NAD⁺

Extrazelluläres NAD⁺ wird durch verschiedene Enzyme abgebaut. Zum einen kann NAD⁺ durch die ADP-Ribosyltransferase 2b (ART2b) hydrolysiert werden, wobei die ADP-Ribosegruppe nicht freigesetzt, sondern auf ein Zielprotein übertragen wird [313]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass der ART2b-vermittelte Abbauweg auf Granulozyten, Monozyten und APCs offenbar keine Rolle spielt, da dieses Enzym auf mRNA-Ebene nicht detektiert werden konnte (Abbildung 17B+E+H). Tatsächlich wurde ART2b (auch ART2.2 genannt) bislang nur auf T-Zellen nachgewiesen, während sich die Isoform ART2a (auch ART2.1 genannt) auch auf dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen fand [177].

Zusätzlich zu der ADP-Ribosyltransferase kann NAD⁺ durch CD157 (BST1) und CD38 zu ADP-Ribose abgebaut werden, welche dann durch ENPPs zu AMP hydrolysiert wird [313]. Darüber hinaus können ENPP1 und ENPP3 NAD⁺ direkt zu AMP umsetzen [153]. Die in dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Untersuchungen zeigten, dass kardiale APCs die Gene für CD157, CD38 und ENPP1 exprimieren (Abbildung 17B). Möglicherweise sind diese Enzyme daher am NAD⁺-Abbau im gesunden Herzen beteiligt und können eine NAD⁺induzierte, pro-inflammatorische Immunreaktionen antagonisieren. So wurde von Seman *et al.* nachgewiesen, dass bereits 1 μ M extrazelluläres NAD⁺ zur Apoptose von T-Zellen führt, wobei der Zelltod über die ART2-vermittelte ADP-Ribosylierung des P2X7-Rezeptors eingeleitet wird [178]. Bemerkenswerterweise liegt diese Konzentration nur wenig über der normalen Serumkonzentration von 0.1-0.3 μ M [111,112]. Das Enzym CD38 kann dieser toxischen Signalwirkung von NAD⁺ entgegenwirken, indem es durch den Abbau des Nukleotids ART2 das Substrat entzieht [314]. Da auch geringe Mengen an NAD⁺ eine zellschädigende Wirkung haben, könnte CD38 oder die anderen NAD⁺-abbauenden Enzyme auf residenten APCs zum eigenen Schutz und/oder dem der benachbarten Zellen im gesunden Herzen beitragen.

Abbau von extrazellulärem AMP und die gegensätzliche Expression von CD39/CD73

Die Abbauwege des extrazellulären ATP und NAD⁺ laufen auf der Stufe des AMP zusammen. AMP kann dann anschließend durch die CD73 oder die alkalische Phosphatase zu Adenosin hydrolysiert werden [150]. Versuche an CD73^{-/-}-Mäusen zeigten, dass die AMPase Aktivität in der Membranfraktion des Herzen fast vollständig durch die Deletion des CD73-Gens aufgehoben wird [187]. Zusätzlich konnte für CD73 eine homogene Expression auf dem Endothel myokardialer Arteriolen und Kapillaren nachgewiesen werden, während die alkalische Phosphatase lediglich auf einem geringen Teil der Kapillaren vorkommt [187]. Demnach erfolgt der Abbau des AMPs im Herzen hauptsächlich durch CD73.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass CD73 nur von 2% der koronaren Endothelzellen und einigen Immunzellen (siehe unten) exprimiert wird (Tabelle 8, Abbildung 12). Im Gegensatz dazu wurde die CD39 im hohen Maße auf allen kardialen Zellen mit Ausnahme von Kardiomyozyten exprimiert. Im gesunden Herzen scheint der Schwerpunkt daher auf der Degradation von pro-inflammatorischen ATP und ADP zu liegen. Vermutlich tragen die Ektonukleotidasen somit hauptsächlich durch die Regulierung der P2-Rezeptoraktivierung zur Homöostase unter physiologischen Bedingungen bei.

Auch innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulationen waren CD73 und CD39 unterschiedlich verteilt (Abbildung 12). Sowohl im Blut als auch im Herzen wird CD73 hauptsächlich von T-Zellen exprimiert und nur schwach von einigen myeloischen Zellen. Im Unterschied dazu zeigt CD39 ein genau gegensätzliches Expressionsmuster. Insbesondere residente APCs zeigten eine hohe CD39 Expression, während CD73 auf mRNA- und Proteinebene kaum messbar war. Wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, weisen APCs ebenfalls eine hohe P2X7 und P2Y6 Expression auf, so dass CD39 möglicherweise insbesondere auf diesen Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von P2-vermittelten pro-inflammatorischen Signalkaskaden spielt. In ähnlicher Weise schützt CD39 Peritonealmakrophagen vor einem P2X7-induzierten Zelltod [315].

Insgesamt zeigen die durchgeführten Expressionsanalysen, dass die initiale extrazelluläre ATP-Degradation im Herzgewebe durch APCs, Monozyten und CD31⁻CD45⁻ Zellen (Fibroblasten, glatte Muskelzellen) katalysiert wird. Die weitere Dephosphorylierung von AMP erfolgt dagegen durch T-Zellen und im geringen Maße von Granulozyten und NK-Zellen.

Ein auffälliger Aspekt bei der CD73-Expression auf Immunzellen war, dass der Prozentsatz von CD73⁺ T-Zellen im Herzen insgesamt niedriger war als im Blut (Abbildung 12). Mögliche Erklärungen sind, dass entweder bevorzugt CD73-negative T-Zellen in das Herzgewebe einwandern oder dass CD73 bei der Migration durch das Endothel herrunterreguliert wird. Die letzte Hypothese wird gestützt durch Versuche an einer Lymphozyten-Endothel-Kokultur, die zeigten, dass die CD73-Aktivität bei der Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen abnimmt [316]. Henttinen *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass die Endothelpermeabilität und Leukozytenmigration durch Adenosin gehemmt wird [316].

5.2.4 Adenosinrezeptoren, -abbau und -transport

Das von der CD73 generierte extrazelluläre Adenosin kann entweder an verschiedene Adenosinrezeptoren binden, durch Ektoenzyme weitermetabolisiert oder durch Nukleosidtransporter in die Zelle aufgenommen werden. Die Aktivierung der vier Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 kann viele verschiedene Zellfunktionen modulieren [106,137]. In Makrophagen hemmt Adenosin beispielsweise die Differenzierung und Aktivierung sowie die Produktion von Zytokinen [317]. Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, waren die vier Rezeptoren in residenten kardialen APCs auf mRNA-Ebene kaum messbar (Abbildung 17C). Im Gegensatz dazu exprimieren ihre Monozytenvorläufer aus dem Blut geringe Mengen der A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren (Abbildung 17F), ähnlich wie es in der Literatur für humane Blut-Monozyten beschrieben ist [318]. Da die Expression der Adenosinrezeptoren auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen prinzipiell vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängt [318,319], wäre es denkbar, dass die Adenosinrezeptoren auf Monozyten bei ihrer Reifung zu residenten APCs im Herzen herrunterreguliert werden.

Die für die P1-Rezeptoraktivierung zur Verfügung stehende extrazelluläre Adenosinkonzentration wird durch die Bildung (CD73, alkalische Phosphatase), den Abbau (AdenosinDesaminase) sowie den Transport von Adenosin in die Zelle (Nukleosidtransporter) bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Adenosin-Desaminase und der konzentrative Nukleosidtransporter CNT2 zwar auf residenten APCs nachgewiesen werden, allerdings war die Expression gering (Abbildung 17C). Im Gegensatz dazu fand sich eine verhältnismäßig hohe mRNA-Expression des bidirektionalen äquilibrativen Nukleosid-Transporters ENT1 in diesen kardialen Zellen. Es ist denkbar, dass residente APCs über diesen Transporter die lokale Adenosinkonzentration an der Zelloberfläche gering halten und somit die Aktivierung von Adenosinrezeptoren indirekt hemmen. Ein ähnlicher Regulationsmechanismus des extrazellulären Adenosins über den ENT1 wurde bereits bei glatten Muskelzellen postuliert [320]. Insgesamt deuten die geringe mRNA-Expression der Adenosinrezeptoren und die vergleichsweise hohe Expression von ENT1 daraufhin, dass Adenosinrezeptor-vermittelte Immunreaktionen auf residenten APCs im gesunden Herzen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen.

5.3 Das purinerge Signalsystem im Herzen nach I/R

Der ischämiebedingte Zelltod von Kardiomyozyten beim Herzinfarkt führt zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Myokardgewebe [16]. Begleitet wird dieser Prozess initial von der Freisetzung hoher Mengen an ATP oder NAD⁺ aus nekrotischen, apoptotischen oder aktivierten Zellen [120]. Im Extrazellularraum können die Nukleotide und ihre Abbauprodukte verschiedene Phasen des inflammatorischen Prozesses, wie z.B. die Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen, modulieren [120]. Wie in Abschnitt 5.2 schon erwähnt, wird die Konzentration und Verweildauer der Nukleotide im Extrazellularraum dabei durch eine Vielzahl von Ektoenzymen und Transportern bestimmt. Im Zusammenhang mit dem Herzinfarkt ist die Expression dieser unterschiedlichen Proteine des purinergen Signalsystems bislang nur unvollständig untersucht. Da laut Literatur insbesondere CD39 und CD73 eine wichtige Rolle bei der Regulation von ATP- und Adenosin-induzierten Signalen spielen [188], wurde in dieser Arbeit die Proteinexpression der beiden Ektonukleotidasen auf allen Zellen des Herzens nach I/R untersucht. Zusätzlich ermöglichten mRNA-Expressionsanalysen von verschiedenen ATP- und Adenosinrezeptoren, NAD⁺-abbauenden Enzymen sowie Nukleotid- und Nukleosidtransportern einen umfassenden Überblick über das purinerge Signalsystem in kardialen Immunzellen.

5.3.1 CD73 wird nach Infarkt insbesondere auf Granulozyten und T-Zellen hochreguliert

In Übereinstimmung mit der Literatur [63], fand sich 3 Tage nach Infarkt ein starker Anstieg von Granulozyten und Monozyten im Herzgewebe (Abbildung 13D). Zusätzlich wanderten zu diesem frühen Zeitpunkt der Entzündung auch bereits T-Zellen, NK-Zellen und APCs in das Herzen ein (Abbildung 13D). Bemerkenswerterweise nahm die CD73-Expression auf Granulozyten, T-Zellen und NK-Zellen im Herzen signifikant zu (Abbildung 13E+F). Ein Anstieg der CD73-Aktivität wurde bereits *in vitro* an T-Zellen infolge einer anti-CD3/anti-CD28 Stimulation in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen [216]. Neu ist jedoch der Befund, dass CD73 auch auf Immunzellen im Herzen nach Infarkt hochreguliert ist. Somit kommt diesem Effekt wahrscheinlich auch unter *in vivo* Bedingungen eine funktionelle Bedeutung zu.

Durch die Infiltration der Immunzellen in das Herz bei gleichzeitiger Hochregulation des Ektoenzyms steigt die Anzahl von CD73-exprimierenden Leukozyten im Herzgewebe nach I/R dramatisch an. Während im gesunden Herzen noch koronare Endothelzellen die Mehrheit der CD73-exprimierenden Zellen bilden (~90 %), machen kardiale Leukozyten drei Tage nach I/R etwa 2/3 der gesamten CD73⁺-Zellen aus (Abbildung 15). Da es insbesondere im Infarktareal zu einer Anhäufung von Immunzellen kommt, ist der Anteil an CD73⁺-Leukozyten in diesem Bereich wahrscheinlich sogar noch höher. Es ist daher zu vermuten, dass es insbesondere im Entzündungsherd zu einer gesteigerten AMP-Hydrolyse und Akkumulation von Adenosin kommt. Tatsächlich konnten jüngste Arbeiten aus unserem Institut zeigen, dass die extrazelluläre Adenosinkonzentration im Herzen 7 Tage nach Infarkt signifikant zunimmt [277]. Dieser Effekt blieb bei CD73^{-/-}-Mäusen aus, so dass die gesteigerte Adenosinbildung nach Herzinfarkt wesentlich durch CD73 katalysiert wird [277].

Da extrazelluläres Adenosin bekanntermaßen immunmodulatorisch wirkt [106], wäre es denkbar, dass CD73-generiertes Adenosin im Herzen einen regulatorischen Einfluss auf die Funktionen der eingewanderten Immunzellen hat. Romio *et al.* konnten bereits nachweisen, dass das von CD73 gebildete Adenosin die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus Effektor-T-Zellen hemmt [216]. Dieser Prozess wird in T-Zellen über den A_{2A}-Rezeptor vermittelt [216]. In Bezug auf den Herzinfarkt wäre es daher vorstellbar, dass die CD73-Hochregulation auf eingewanderten Granulozyten und T-Zellen zur Akkumulation von Adenosin am Entzündungsort führt, welches durch die Aktivierung von Adenosinrezeptoren vor einer überschießenden Immunantwort schützt (siehe auch Abschnitt 5.3.2). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Analysen in der akuten Phase der Entzündung, wurde die CD73-Expression auch 14 Tage nach Infarkt untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist die akute Inflammation bereits abgeklungen, tote Zellen und Debris wurden durch phagozytierende Immunzellen entfernt und eine stabile Narbe wird gebildet [275]. In Übereinstimmung mit der Literatur [275], ging die Anzahl der Immunzellen in den untersuchten Herzen 14 Tage nach I/R annähernd auf das basale Niveau zurück (Abbildung 16A). Der Anteil der CD73⁺-Zellen nahm innerhalb der Granulozytenpopulation wieder ab, wohingegen er bei den T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen nahezu unverändert hoch blieb (Abbildung 16B). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die CD73 auch im Remodelingprozess eine Rolle spielen könnte. In Einklang mit dieser Hypothese wurde für Adenosin nicht nur ein anti-inflammatorischer Effekt auf Immunzellen beschrieben, sondern auch ein inhibitorischer Einfluss auf die Aktivierung von Fibroblasten und die Bildung von Kollagen (siehe auch Abschnitt 5.4.2) [321].

5.3.2 Der A_{2B}-Rezeptor auf Leukozyten im Herzen nach I/R

Die gesteigerte CD73-Expression auf eingewanderten, kardialen T-Zellen und Granulozyten nach Infarkt warf die Frage auf, über welche Rezeptoren das vermehrt gebildete Adenosin auf die Immunzellen wirkt. Die durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen zeigten, dass A₁- und A₃-Rezeptoren auf den untersuchten Leukozyten nicht bzw. kaum vorhanden sind (Abbildung 17), so dass diese Rezeptorsubtypen daher vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der A_{2A}-Rezeptor wird im Herzen lediglich von T-Zellen exprimiert (Abschnitt 4.6). Wie bereits oben erwähnt, ist davon auszugehen, dass die A_{2A}-Rezeptoraktivierung auf T-Zellen durch das von der CD73 gebildete Adenosin zu einer verringerten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt [213,216]. Im Gegensatz dazu wird der A_{2A}-Rezeptor auf Granulozyten und APCs im Herzen kaum exprimiert (Abbildung 17C+I), so dass die Funktion dieser Zellen im Entzündungsgeschehen nach Infarkt vermutlich über andere Adenosinrezeptoren moduliert wird. Bemerkenswerterweise stieg die Expression des A_{2B}-Rezeptors auf APCs, Granulozyten und T-Zellen im Herzen nach Infarkt an (Abbildung 17C+I und Abschnitt 4.6).

Welche Rolle der A_{2B} -Rezeptor im Infarktgeschehen spielt, konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden. Die Funktion dieses Rezeptors bei der Modulation von Entzündungsprozessen und Geweberemodeling wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen pro-inflammatorische Effekte infolge einer A_{2B} -Rezeptoraktivierung

und andere zeigen genau das Gegenteil [224]. Dies wird z.B. bei Infarktstudien mit ischämischer Präkonditionierung (IP) deutlich [322,323]. Bei der IP werden kurze Zyklen aus Ischämie und Reperfusion vor dem Eintreten eines Myokardinfarkts induziert, wodurch die Schädigung des Herzgewebes verringert werden kann. Eckle et al. zeigten, dass A2B-Rezeptor-defiziente Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen größere Infarkte infolge von IP und 2 h nach I/R aufwiesen [322]. Diese Ergebnisse würden für eine protektive Rolle des A2B-Rezeptors sprechen. Dem steht eine Studie von Maas et al. entgegen, in der die Infarktgrößen von WT und A2BR-/- Mäusen infolge von IP und 24 h nach I/R gleich ausgeprägt war [323]. Die Autoren nehmen an, dass die gegensätzlichen Ergebnisse der beiden Unterschiede Studien durch im Versuchsprotokoll oder Untersuchungszeitpunkt hervorgerufen wurden [323]. A2B-Rezeptoren können daher abhängig vom Modell oder Zeitpunkt im Entzündungsverlauf verschiedene Effekte auslösen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte sowohl für einen A2BR-Agonisten [322] als auch für einen A2BR-Antagonisten [324] ein positiver Effekt auf den Heilungsprozess nach Herzinfarkt nachgewiesen werden. Der A2BR-Agonist BAY 60-6583 wurde z.B. vor Induktion des Infarktes verabreicht und führte zur Reduktion der Infarktgröße 2 h nach I/R [322]. Der A_{2B}R-Antagonist GS-6201 wurde dagegen direkt nach einer permanenten Ligatur der LAD über einen Zeitraum von 14 Tagen appliziert, wodurch weniger Immunzellen in das Gewebe einwanderten und die Ausbildung einer linksventrikulären Dysfunktion gehemmt wurde [324]. Folglich wirkt die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors nach derzeitigem Wissensstand unmittelbar nach Infarkt kardioprotektiv, während in der späteren Heilungsphase eine proinflammatorische A2BR-Wirkung dominiert. Welche Zelltypen zu den jeweiligen Effekten beitragen, ist dabei jedoch unklar. Die in dieser Arbeit beobachtete Hochregulation des A_{2B}-Rezeptors 3 Tage nach I/R auf Granulozyten, APCs und T-Zellen im Herzen könnte ein erster Hinweis sein, dass eine A2BR-vermittelte Regulation an kardialen Immunzellen in der Heilungsphase nach Infarkt eine wichtige Rolle spielen könnte.

Während der A_{2B}-Rezeptor auf Granulozyten und Makrophagen nach bisherigem Wissensstand insbesondere anti-inflammatorische Effekte vermittelt (siehe 1.3.5), ist über die Rolle des A_{2B}-Rezeptors auf T-Zellen bislang nur wenig bekannt. Mirabet *et al.* konnten zeigen, dass der A_{2B}-Rezeptor nach Aktivierung von humanen T-Zellen hochreguliert wird [325]. Entsprechend deutet die in dieser Arbeit gefundene Heraufregulation des A_{2B}-Rezeptors auf T-Zellen im Herzen nach I/R daher auf einen aktivierten Zustand der Zellen hin. Mirabet *et al.* wiesen außerdem nach, dass die Stimulation des A_{2B}-Rezeptors zu einer verminderten IL-2 Sekretion aus aktivierten T-Zellen führt [325]. IL-2 hat vielfältige Funktionen auf T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen [326]. Beispielsweise befördert IL-2 die Proliferation von regulatorischen T-Zellen und hemmt zusätzlich die Differenzierung von pro-inflammatorischen T_H17-Zellen, wodurch es vor einer unkontrollierten Immunantwort schützen kann [327]. Auf der anderen Seite weisen *in vitro* Versuche daraufhin, dass eine Stimulation des A_{2B}-Rezeptors die Differenzierung von naiven T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen befördert [328], was eine entzündungshemmende Wirkung zur Folge hätte. Welche Effekte im Herzen nach Infarkt zum Tragen kommen, ist daher noch offen.

5.3.3 Die Regulation von CD39 auf APCs und Endothelzellen

Drei Tage nach Infarkt nahm das Expressionsniveau der CD39 auf Monozyten und APCs im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen signifikant ab (Abbildung 13F). Im Falle der kardialen APCs blieb die Oberflächenexpression auch noch 14 Tage nach Infarkt auf einem erniedrigten Niveau (Abbildung 16C). Die Funktion dieser Herabregulation auf den myeloischen Zellen ist unklar. Zanin *et al.* zeigten, dass LPS-stimulierte Peritoneal-makrophagen ebenfalls eine verringerte Aktivität und Expression von CD39 aufweisen [329]. Diese Makrophagen waren außerdem durch einen M1-Phänotyp charakterisiert und anfälliger für einen ATP-induzierten Zelltod [329]. In Analogie zu diesen Experimenten könnte die Herabregulation der CD39 auf kardialen APCs nach Infarkt für eine Phänotypveränderung in Richtung aktivierte bzw. M1-Makrophagen sprechen.

Auch auf Endothelzellen sank die Oberflächenexpression von CD39 drei Tage nach Infarkt (Abschnitt 4.4). In ähnlicher Weise konnte auch nach I/R in der Niere eine Abnahme der CD39-Aktivität auf vaskulären Endothelzellen gezeigt werden [330]. Außerdem spielt die CD39 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Barrierefunktion des Endothels, da CD39^{-/-}-Mäuse insbesondere unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte vaskuläre Permeabilität aufweisen [331]. Eine Abnahme der CD39-Expression auf koronaren Endothelzellen nach Myokardinfarkt könnte daher den Einstrom von Immunzellen in den Infarktbereich fördern.

5.3.4 ATP-Transporter, -Rezeptoren und Nukleotid-abbauende Ektoenzyme nach I/R auf Granulozyten

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits diskutiert, wie die CD39, CD73 und die verschiedenen Adenosinrezeptoren das Entzündungsgeschehen nach Herzinfarkt beeinflussen. Wie in 5.2 bereits angedeutet, sind aber auch noch weitere purinerge Signalsysteme an der

Modulation der Immunzellfunktionen beteiligt [110]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Granulozyten bei ihrer Migration vom Blut in das Herzgewebe eine Reihe von phänotypischen Veränderungen durchlaufen und eine Hochregulation der Expression einiger Gene des purinergen Signalsystem erfolgt. So wird die Genexpression der beiden Connexine Cx37 und Cx43, des ATP-Rezeptors P2X7, der ATP- oder NAD⁺- abbauenden Enzyme ENPP1, ENPP3 und CD38 sowie der alkalischen Phosphatase erst nach Migration der Granulozyten ins Herz induziert (Abbildung 17G-I). Wie nachfolgend diskutiert, sind diese Veränderungen möglicherweise mit einer Reihe von chemotaktischen Prozessen verknüpft.

Chemotaxis ist ein komplexer Prozess, der die Orientierung entlang eines Lockstoffgradienten, die Polarisierung und die gerichtete Migration der Zellen zum Entzündungsherd umfasst [110]. Es ist bekannt, dass diese Prozesse unter anderem durch Nukleotide wie ATP und Adenosin beeinflusst werden [110,332]. So führt die Stimulierung von Granulozyten mit dem chemotaktischen Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) zur Freisetzung von ATP am vorderen Pol der Zelle (*leading edge*) [149]. In einem autokrinen Mechanismus werden infolgedessen P2Y2-Rezeptoren aktiviert, die wiederum die Orientierung der Zellen im Gradienten steuern [149]. Die Freisetzung von ATP erfolgt dabei über Pannexin-1 oder Connexin-43 [124,333]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese beiden Transporter von Granulozyten im Herzen exprimiert werden. Insbesondere Cx43 wird 3 Tage nach I/R auf mRNA-Ebene hochreguliert (Abbildung 17G). Diese Daten lassen vermuten, dass Granulozyten nach ihrer Migration ins Herzgewebe verstärkt ATP freisetzen und so die gerichtet Chemotaxis in das Infarktareal befördern.

Nach einer P2Y2-Rezeptor-vermittelten Ausrichtung im chemotaktischen Gradienten kommt es zur Polarisierung der Zellen. Dieser Prozess umfasst eine Reorganisation des Zytoskeletts und eine Umverteilung verschiedener Rezeptoren auf der Zelloberfläche [332]. Dabei reichern sich A₃-Rezeptoren [149], CD39 und möglicherweise weitere Ektonukleotidasen am vorderen Zellpol an [334], wodurch das auf dieser Seite freigesetzte ATP vermutlich schnell zu Adenosin abgebaut wird [334]. Bislang ist noch nicht klar, welche Ektoenzyme das von der CD39 gebildete AMP zu Adenosin hydrolysieren. Corriden *et al.* zeigten, dass die alkalischen Phosphatase auf mRNA-Ebene in humanen Neutrophilen exprimiert wird und schlugen daher vor, dass dieses Enzym zur Adenosinbildung während der Chemotaxis beiträgt [334]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine Hochregulation der CD73 (Protein) und der alkalische Phosphatase (mRNA) in kardialen Granulozyten nach I/R detektiert (Abbildung 13+17I). Es ist daher wahrscheinlich, dass beide Enzyme an der Modulation der Chemotaxis von Neutrophilen im Herzen beteiligt sind.

Das von den Granulozyten gebildete Adenosin kann die Chemotaxis über autokrine oder parakrine Mechanismen sowohl befördern als auch hemmen [335]. So inhibiert die Aktivierung des A_{2A} -Rezeptors die Infiltration der Granulozyten [336,337], während die Stimulation von A_3 -Rezeptoren die Chemotaxis von humanen Neutrophilen beschleunigt [149,335]. Die A_3 -Rezeptor-vermittelten Effekte scheinen allerdings speziesabhängig zu sein, da die Migration von murinen Neutrophilen – im Gegensatz zu humanen Zellen – durch einen A_3 R-spezifischen Agonisten inhibiert wird [338]. Rosenberger *et al.* postulierten, dass auch der A_{2B} -Rezeptor eine inhibitorische Wirkung auf die Chemotaxis von Neutrophilen ausübt [339]. Jedoch wird dieser Effekt vermutlich nicht durch Adenosin hervorgerufen, sondern durch direkte oder indirekte Interaktion des A_{2B} -Rezeptors mit dem chemotaktischen Botenstoff Netrin-1 [339]. In der vorliegenden Arbeit konnte der A_3 - und A_{2A} -Rezeptor nicht bzw. kaum auf Granulozyten im Blut und Herzen nachgewiesen werden (Abbildung 17I). Wenn die Adenosinrezeptoren an der Migrationsbewegung beteiligt sind, wird die Chemotaxis der Neutrophilen im Herzgewebe nach I/R daher wahrscheinlich eher über den A_{2B} -Rezeptor moduliert.

Auch das Ektoenzym CD38, welches die Hydrolyse von NAD⁺ zu ADP-Ribose und zyklischer ADP-Ribose katalysiert, kann die Migration von Leukozyten zum Entzündungsherd regulieren [340]. Die Chemotaxis von Granulozyten wird dabei insbesondere durch die von der CD38 gebildete ADP-Ribose befördert [341]. Folglich führt die in dieser Arbeit beobachtete Induktion der CD38-Expression nach I/R möglicherweise zu einer beschleunigten Migration der kardialen Granulozyten zum Entzündungsherd.

CD157 ist neben CD38 ein weiteres Ektoenzym, das NAD⁺ zu ADP-Ribose abbauen kann. Allerdings scheint CD157 auf Granulozyten vorrangig als Rezeptor zu fungieren und weniger als Ektoenzym, wobei der natürliche Ligand bislang noch unbekannt ist [173]. Ortolan *et al.* wiesen nach, dass CD157 entscheidend an der Migration von Neutrophilen durch endotheliale Zell-Zell-Kontakte (*junctions*) beteiligt ist [342]. Wurde CD157 z.B. mit einem Antikörper blockiert, konnten die Granulozyten zwar noch adhärieren, polarisieren und sich bewegen, die Transmigration in das Gewebe war jedoch gehemmt [342]. Interessanterweise zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Analysen, dass CD157 nach Herzinfarkt in Granulozyten aus dem Blut signifikant höher exprimiert wurde als in den kardialen Immunzellen (Abbildung 17H). Es ist daher denkbar, dass CD157 im Blut hochreguliert wird, um die Transmigration der Granulozyten in das entzündete Herzgewebe zu befördern.

Insgesamt geben die mRNA-Analysen erste Hinweise, dass die Chemotaxis von Neutrophilen im Herzen nach Infarkt durch verschiedene purinerge Signalsysteme moduliert wird. Die gesteigerte Expression von P2X7, ENPP1 und ENPP3 hat dagegen vermutlich andere Funktionen. So führt die Aktivierung des P2X7-Rezeptors auf Granulozyten zur gesteigerten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [343]. Im Infarktgeschehen sind hohe Mengen an ROS zellschädigend, geringe Konzentrationen wirken dagegen pro-angiogenetisch und pro-fibrotisch und fördern somit den Remodelingprozess [344]. Welche Rolle die P2X7-vermittelte ROS-Freisetzung im Heilungsprozess nach Infarkt spielt, ist bisher nicht bekannt. Ebenfalls unklar ist, welche Funktionen ENPP1 und ENPP3 auf Granulozyten haben. Da die beiden Ektoenzyme sowohl ATP als auch NAD⁺ hydrolysieren, wäre es allerdings denkbar, dass sie die Konzentrationen dieser Nukleotide an der Zelloberfläche verringern und somit pro-inflammatorische Signale begrenzen.

5.3.5 Regulation des P2X7-Rezeptors sowie NAD⁺-abbauender Enzyme nach I/R in kardialen APCs

Drei Tage nach I/R stellen die APCs neben den Granulozyten die größte Immunzellpopulation im Herzen dar (Abbildung 13). Vermutlich besteht diese Population aus einer Mischung von residenten APCs, die bereits im gesunden Herzen vorhanden waren, und eingewanderten Monozyten, die sich im Herzgewebe zu Makrophagen/DCs differenziert haben. Aus diesem Grund wurden die APCs aus ischämischen Herzen sowohl mit residenten APCs (Abbildung 17A-C), als auch mit Monozyten aus dem Blut von gesunden und infarzierten Mäusen (Abbildung 17D-F) auf mRNA-Ebene verglichen.

Wie bereits in Kapitel 5.2.2 diskutiert, sind residente APCs im Herzen durch eine hohe P2X7-Rezeptorexpression gekennzeichnet. Da der P2X7-Rezeptor aber erst durch hohe ATP-Konzentrationen (>100 μM) aktiviert wird [137], spielt die Nukleotid-induzierte Aktivierung unter basalen Bedingungen vermutlich keine Rolle. In der akuten Phase des Infarktgeschehens steigt die extrazelluläre ATP-Konzentration jedoch dramatisch an, so dass die Voraussetzungen für die P2X7-Rezeptoraktivierung gegeben sein dürften. Die Stimulierung des Rezeptors induziert die Aktivierung des NALP3-Inflammasoms sowie die darauffolgende Prozessierung und Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 [345]. Eine dauerhafte Aktivierung des P2X7-Rezeptors führt schließlich zur Bildung von großen Poren in der Zellmembran und somit zum Zelltod [346]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Abnahme der P2X7-Rezeptorexpression auf kardialen APCs nach I/R im Vergleich zu basalen Bedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 17A). Die beobachtete Herabregulation dieses ATP-Rezeptors könnte daher pro-inflammatorischen und proapoptotischen Prozessen entgegenwirken und somit einen protektiven Effekt auf die APCs im entzündeten Herzen haben. Im Blut war die P2X7-Expression in Monozyten nach I/R ebenfalls geringer als unter basalen Bedingungen (Abbildung 17D). Allerdings konnten Gudipaty *et al.* zeigen, dass physiologische Konzentrationen von extrazellulären Na⁺ und Cl⁻ eine ATP-induzierte Aktivierung des P2X7-Rezeptors in humanen Blut-Monozyten stark hemmen [347]. Dies könnte dafür sprechen, dass der P2X7-Rezeptor auch auf den Monozyten aus dem Mäuseblut inaktiv ist.

Das Ausmaß einer P2X7-Rezeptoraktivierung wird nicht nur über die Expression, sondern auch über ADP-Ribosylierung des Rezeptors reguliert. In Makrophagen hydrolysiert die ADP-Ribosyltransferase ART2.1 extrazelluläres NAD⁺ und überträgt die ADP-Ribosegruppe dabei auf einen Argininrest der P2X7-Ektodomäne [348]. Diese kovalente Modifikation führt zu einer erhöhten Sensitivität des P2X7-Rezeptors gegenüber ATP, so dass der Rezeptor bei niedrigeren ATP-Konzentrationen aktiviert und die Porenbildung in der Zellmembran induziert wird [348]. Andere NAD⁺-degradierende Enzyme, wie z.B. die Ektonukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (ENPP), CD157 oder CD38, können diesem proapoptotischen Mechanismus entgegenwirken, indem sie das Substrat der ADP-Ribosyltransferase abbauen [314]. Die in dieser Arbeit gemessene Expression der NAD⁺-abbauenden Enzyme CD157, ENPP1 und CD38 war auf kardialen APCs nach I/R tendenziell höher als unter basalen Bedingungen (Abbildung 17B). Es ist daher denkbar, dass extrazelluläres NAD⁺ nach I/R relativ schnell von APCs im Herzen abgebaut wird und somit pro-apoptotische und pro-inflammatorische Effekte verringert werden.

5.3.6 Zusammenfassende Darstellung des extrazellulären Purin-Stoffwechsels im Herzen nach I/R

In Abbildung 31 sind die wichtigsten Befunde dieser Arbeit über das purinerge Signalsystem im Blut und Herzen drei Tage nach I/R zusammengefasst. Zu diesem Zeitpunkt strömen massiv Immunzellen in das infarzierte Myokardgewebe ein, wobei Granulozyten den mengenmäßig größten Anteil bilden. Die Transmigration von Neutrophilen aus der Blutbahn

in das ischämische Herzgewebe könnte durch das Ektoenzym CD157 befördert werden, da es die Wanderung durch endotheliale Zell-Zell-Kontakte vermittelt [342]. Im Herzgewebe wandern Granulozyten über einen chemotaktischen Gradienten in Richtung Infarktbereich [344,349]. Dieser Prozess kann durch folgende Faktoren moduliert werden: Zum einen führt die gesteigerte Expression der Connexine 43 und 37 auf Granulozyten vermutlich zu einer verstärkten Freisetzung von ATP und NAD⁺. Extrazelluläres NAD⁺ wird dann durch das Ektoenzym CD38 zu ADP-Ribose abgebaut, welche zusammen mit ATP in autokriner Weise die Ausrichtung der Granulozyten im chemotaktischen Gradienten vermitteln und die Migration in Richtung des Entzündungsherds befördern. Auf der anderen Seite nimmt auch die Expression der Nukleotid-abbauenden Enzyme ENPP1, ENPP3 und CD39 nach Infarkt zu, wodurch ATP und ADP-Ribose im Extrazellularraum vermehrt zu AMP hydrolysiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Chemotaxis der Neutrophilen im Herzen sowohl durch die Freisetzung bzw. Bildung als auch durch den Abbau der extrazellulären Nukleotide reguliert wird. Das aus der NAD⁺- und ATP-Hydrolyse stammende AMP wird vermutlich schnell zu Adenosin abgebaut, da das Expressionsniveau der CD73 auf Granulozyten nach I/R stark ansteigt. Das gebildete Adenosin kann dann die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und TNF-α über eine autokrine A_{2B}-Rezeptoraktivierung hemmen [226,335].

Drei Tage nach I/R wandern neben Granulozyten auch signifikante Mengen an T-Zellen in das Herzgewebe ein. Schenk *et al.* konnten demonstrieren, dass aktivierte T-Zellen ATP freisetzen [350]. Das extrazelluläre ATP wird dann vermutlich zusammen mit Nukleotiden aus apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten kaskadenartig von den Ektonukleotidasen CD39 und CD73 abgebaut. Bemerkenswerterweise steigt die CD73-Expression auf T-Zellen nach Infarkt signifikant an, so dass von einer raschen AMP-Hydrolyse und vermehrter, lokaler Adenosinbildung auszugehen ist. Die darauf folgende autokrine Aktivierung von A_{2A}- oder A_{2B}-Rezeptoren kann sowohl entzündungshemmende als auch fördernde Effekte auslösen. Die Stimulation des A_{2A}-Rezeptors wirkt dabei antiinflammatorisch und geht mit einer verminderten Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IFN- γ und TNF- α , aus CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen einher [213,351]. Ob die beobachtete Hochregulation des A_{2B}-Rezeptors auf kardialen T-Zellen entzündungsfördernde Effekte vermittelt, ist bislang noch ungeklärt.

Zusätzlich zu Granulozyten und T-Zellen wandern 3 Tage nach I/R auch massiv Monozyten aus dem Blut in das Myokardgewebe ein und differenzieren sich zu reifen, myeloischen



APCs. Neben Granulozyten bilden APCs/Monozyten daher die größte Immunzellpopulation im Herzen.

Abbildung 31: Das extrazelluläre purinerge Signalsystem auf Immunzellen und Fibroblasten drei Tage nach I/R. In der initialen Phase nach I/R werden ATP und NAD⁺ vorrangig aus apoptotischen und nekrotischen Kardiomyozyten freigesetzt, während die extrazellulären Nukleotide im weiteren Verlauf wahrscheinlich zum großen Teil aus aktivierten Immunzellen stammen. Infolge des Infarktes verändert sich die Expression von verschiedenen Nukleotid-Transportern, Ektoenzymen sowie Nukleotid- und Adenosin-Rezeptoren (roter Pfeil: Hochregulation; blauer Pfeil: Herrunterregulation). So steigt u.a. die CD73-Oberflächenexpression auf kardialen

Granulozyten und T-Zellen nach I/R an. Da Kardiomyozyten, myeloische APCs und kardiale Fibroblasten die CD73 nicht exprimieren, wird Adenosin hauptsächlich von Granulozyten und T-Zellen gebildet. Das aus dem NAD⁺-Abbau stammende AMP (*AMP) kann ebenfalls von der CD73 zu Adenosin abgebaut werden. Vermutlich wirkt das gebildete Adenosin insbesondere über den A_{2B}-Rezeptor, da dieser in allen dargestellten Immunzellpopulationen nach I/R hochreguliert wird. Modifiziert nach [277].

Während in kardialen Granulozyten aber insbesondere Gene reguliert werden, die mit der Chemotaxis assoziiert sind, werden in APCs nach Infarkt purinerge Mechanismen zum Schutz der Zelle wirksam. So dürfte sowohl die Herabregulation des P2X7-Rezeptors als auch die Hochregulation von NAD⁺-abbauenden Ektoenzymen einer ATP- und NAD⁺vermittelten Apoptose entgegenwirken. Dieser Schutzmechanismus ist möglicherweise besonders wichtig, da die CD39-Oberflächenexpression nach Infarkt signifikant abnimmt und die ATP-Hydrolyse auf APCs somit vermutlich langsamer abläuft als unter basalen Bedingungen. Bemerkenswerterweise fehlt den APCs die CD73, so dass sie das gebildete extrazelluläre AMP selbst nicht weiter hydrolysieren können. Ähnliches gilt auch für Fibroblasten im Herzen. Es ist daher davon auszugehen, dass das von APCs und Fibroblasten gebildete AMP durch CD73 auf Granulozyten und T-Zellen zu Adenosin hydrolysiert wird.

Das entstandene Adenosin kann zum einen autokrin auf Granulozyten und T-Zellen wirken, und zum anderen die Funktionen von APCs und Fibroblasten in parakriner Weise modulieren. Bei den beiden letztgenannten Zellpopulationen wird dabei vermutlich der A_{2B}-Rezeptor aktiviert, wodurch in APCs die Differenzierung zu reparativen M2-Makrophagen stimuliert [228] und in kardialen Fibroblasten die Kollagen-Synthese gehemmt wird [352].

Kardiomyozyten – in Abbildung 31 nicht dargestellt – fehlen die beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73, so dass diese Zellen nicht zum Abbau von extrazellulärem ATP befähigt sind. Allerdings konnte in verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass Kardiomyozyten alle vier Adenosinrezeptoren exprimieren [353]. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, dass die Funktion von Kardiomyozyten auch durch das von Granulozyten und T-Zellen gebildete Adenosin moduliert werden kann.

Insgesamt spricht die oben beschriebene zelluläre Verteilung von CD39 und CD73 für eine metabolische Kompartimentierung zwischen myeloischen und lymphatischen Zellen, deren funktionelle Bedeutung im Einzelnen noch unklar ist. Anhand der schematischen Darstellung der unterschiedlichen Stoffwechselprozesse in Abbildung 31 wird deutlich, dass CD73 das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Bildung von extrazellulärem, antiinflammatorischen Adenosin im Herzen nach I/R ist. Der Ektonukleotidase CD73 kommt somit wahrscheinlich eine Schlüsselrolle im Heilungsprozess nach Herzinfarkt zu. Diese Schlussfolgerung wird durch funktionelle Studien unterstützt (siehe nachfolgende Kapitel).

5.4 Die Rolle der CD73 im Heilungsprozess nach Herzinfarkt

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln besprochen, führt die Hochregulation der CD73 auf kardialen Granulozyten und T-Zellen nach I/R vermutlich zu einer gesteigerten Bildung von anti-inflammatorischem Adenosin in den entzündeten Bereichen des Herzens. Diese Annahme konnte durch direkte Messungen belegt werden [277]. Bei der Hochregulation handelt es sich wahrscheinlich um einen körpereigenen Rückkopplungsmechanismus, der durch den Infarkt aktiviert wird und vor einer überschießenden Entzündungsreaktion und nachfolgender Gewebeschädigung schützt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die funktionelle Rolle der CD73 beim Heilungsprozess nach Herzinfarkt mit Hilfe von CD73-defizienten Mäusen untersucht.

Beim Vergleich der *Area at Risk* und der Abnahme der Ejektionsfraktion ein Tag nach I/R zeigten sich zunächst keine Unterschiede zwischen CD73^{-/-}- und wildtypischen Mäusen (Abbildung 18). Im weiteren Heilungsverlauf verschlechterte sich jedoch die EF der CD73^{-/-}- Mäuse signifikant im Vergleich zu den Kontrollen. Dementsprechend scheint die CD73 in der initialen Phase des Infarktes keine große Rolle zu spielen, während sie den späteren Heilungsverlauf positiv beeinflusst. Betrachtet man den temporären Verlauf des Infarkt-geschehens im Überblick, so kommt es in den ersten 24 Stunden nach Infarkt zu einem massiven Untergang von Kardiomyozyten auf Grund von ischämiebedingter Nekrose und Apoptose [354]. Die dabei freiwerdenden DAMPs, wie z.B. ATP, aktivieren das Immunsystem und stimulieren den Einstrom von verschiedenen Immunzellen, der etwa bis 7 Tage nach Infarkt anhält [120,355]. In Anbetracht dieser zeitlichen Abfolge, der Hochregulation von CD73 auf eingewanderten Immunzellen und der immunmodulatorischen Funktion von Adenosin, liegt der Schluss nahe, dass CD73 das Entzündungsgeschehens nach I/R moduliert und dadurch den Heilungsprozess befördert.

5.4.1 Die Modulation der Entzündungsreaktion nach I/R durch CD73

Durchflusszytometrische Analysen von wildtypischen Mäusen zeigten 3 Tage nach I/R eine Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten, APCs;

Abbildung 19+20), ähnlich wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [63]. Das adaptive Immunsystem setzt dagegen etwas verzögert ein, da die Migration von T-Zellen in das Myokardgewebe erst 7 Tage nach I/R ihren Höhepunkt erreicht (Abbildung 22). Nach zwei Wochen sinkt die Zellzahl aller Immunzellpopulationen wieder auf das basale Niveau, so dass die Entzündungsreaktion offenbar vollständig abgeklungen ist. In CD73-defizienten Mäusen verläuft das inflammatorische Geschehen in der initialen Phase zunächst ähnlich wie in WT-Tieren (Abbildung 19+20+22). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der in Abschnitt 5.4 postulierten Hypothese, nach der CD73 unmittelbar nach Infarkt eine eher untergeordnete Rolle spielt. Ab 7 Tage nach I/R beginnen sich Unterschiede zwischen WTund CD73^{-/-}-Mäusen abzuzeichnen, die 14 Tage nach Infarkt signifikant werden: Granulozyten und Monozyten persistieren auch nach der initialen Inflammationsphase im Herzgewebe der CD73-Mutante (Abbildung 19, Abschnitt 4.7.2) und die Anzahl an APCs und T-Zellen steigt sogar bis 14 Tage nach I/R weiter an (Abbildung 20+22). Dies deutet daraufhin, dass die Inflammation im infarzierten Herzen nach Deletion der CD73 nicht mehr eingedämmt und somit aufgelöst werden kann. Es ist bekannt, dass das Zusammenspiel von mehreren verschiedenen Zelltypen im Herzen entscheidend für eine zeitnahe Eingrenzung der Entzündungsreaktion nach Infarkt ist [98]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen die Entfernung von apoptotischen Granulozyten durch phagozytierende Zellen, die Differenzierung von kardialen Makrophagen und die Einwanderung von reparativen Monozyten sowie regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Auflösung der Inflammation [98]. Alle diese Prozesse sind in CD73^{-/-}-Tieren gestört bzw. verlaufen verzögert.

Im Zeitraum 3 bis 7 Tage nach Infarkt nimmt die Anzahl an Granulozyten im Herzgewebe normalerweise stark ab (Abbildung 19), da die meisten Granulozyten in die Apoptose gehen [98]. Die Phagozytose von apoptotischen Granulozyten durch Makrophagen führt zur Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen und Lipidmediatoren und ist somit ein wichtiger Mechanismus zur Auflösung der Entzündung [356]. In CD73-transgenen Tieren persistieren Granulozyten auch noch 2 Wochen nach Infarkt im Herzgewebe, was durch eine verlangsamte Apoptose oder durch einen kontinuierlichen Influx von Neutrophilen in das Herzgewebe bedingt sein könnte. Beide Prozesse können durch erhöhte Konzentrationen von TNF- α stimuliert werden [356-358], wie sie im Herzgewebe von CD73^{-/-}-Mäusen gefunden wurden (Abbildung 24A). TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet [359], kann nach Aktivierung aber auch aus Granulozyten selbst freigesetzt werden [226]. Adenosin hemmt die Sekretion von TNF- α sowohl aus Neutrophilen [226] als auch aus Makrophagen (siehe unten) und trägt somit vermutlich zur Beendigung der Granulozyten-dominierten Phase und zur rechtzeitigen Auflösung der Inflammation in wildtypischen Tieren bei.

Makrophagen spielen bei Entzündungsauflösung nach Infarkt eine wesentliche Rolle, da sie tote Zellen und Debris phagozytieren und anti-inflammatorische Zytokine sezernieren. Darüber hinaus sind sie an weiteren wichtigen Prozessen der Wundheilung, wie dem Umbau der extrazellulären Matrix, der Aktivierung von Fibroblasten und der Angiogenese beteiligt [77]. Die Funktion und der Phänotyp der Makrophagen ändern sich dabei im Verlauf der Entzündung. In der inflammatorischen Phase nach Herzinfarkt überwiegen M1-Makrophagen, während im weiteren Heilungsprozess M2-Makrophagen vorherrschen (siehe Einleitung 1.2.2). Auch wenn die Rolle der beiden Makrophagen-Subpopulationen bei der Heilung nach Herzinfarkt noch nicht abschließend geklärt ist, scheint der rechtzeitige Übergang von der M1- zur M2-dominierten Phase entscheidend für die Auflösung der Entzündung und den Remodelingprozess zu sein [77,98]. Csoka et al. konnten zeigen, dass extrazelluläres Adenosin die Aktivierung von M2-Makrophagen über die Stimulation von A2A- und A2B-Rezeptoren fördert [228]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass kardiale Makrophagen aus CD73^{-/-}-Mäusen 7 Tage nach I/R eine höhere mRNA-Expression von M1-Genen (TNF-α. IL-1β, IL-6) und eine etwas niedrigere Expression von M2-Genen (Arginase-1, IL-10, TGF-β) aufwiesen als wildtypische Tiere (Abbildung 21). Diese Polarisierung in Richtung M1-Makrophagen spiegelte sich auch in den durchflusszytometrischen Analysen wider, da der Anteil von F4/80 exprimierenden APCs in Herzen von CD73-defizienten Tieren nach Infarkt signifikant niedriger war als in WT-Mäusen (Abbildung 20). Dies deutet auf einen aktivierten, pro-inflammatorischen Makrophagenphänotyp hin [276].

Ähnlich wie die reifen APCs waren auch ihre Vorläuferzellen, die Monozyten, in CD73^{-/-}-Mäusen durch einen pro-inflammatorischen, Ly6c^{high}-exprimierenden Phänotyp in der späten Phase der Heilung gekennzeichnet (Abbildung 19). In Analogie zu dem M1/M2-Schema in Makrophagen wandern nach Infarkt normalerweise zunächst inflammatorische Ly6c^{high}-Monozyten in das Herzgewebe ein, die in der späten Heilungsphase von reparativen Ly6c^{low}-Monozyten abgelöst werden (siehe 1.2.2). Beide Phasen der Monozytenantwort sind für den Heilungsprozess nach Infarkt wichtig und Störungen in der zeitlichen Abfolge können zu einer erhöhten Nekrose, einer verminderten Kollagenbildung sowie einer verringerten Anzahl an glatten Muskelzellen und Endothelzellen führen [63]. Beispielsweise führt eine verlängerte Ly6c^{high}-Monozyten-Phase zu einer Beeinträchtigung der reparativen Funktionen von Ly6c^{low}-Monozyten, Myofibroblasten und Endothelzellen [360]. Die Persistenz von proinflammatorischen Monozyten hat somit sowohl im Mausmodell als auch im Menschen eine verschlechterte Herzfunktion und eine erhöhte linksventrikuläre Dilatation nach Infarkt zur Folge [360,361]. Es ist daher anzunehmen, dass die erhöhte Anzahl von Ly6c^{high}-Monozyten in den CD73^{-/-}-Mutanten zu der verringerten Pumpleistung nach Infarkt beiträgt. Es ist allerdings unklar, auf welche Weise das von der CD73-gebildete Adenosin zur erhöhten Rekrutierung von Ly6c^{high}-Monozyten führt.

In Übereinstimmung mit dem pro-inflammatorischen Phänotyp von Monozyten und APCs konnten im Herzgewebe von $CD73^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Menge von TNF- α und verringerte Konzentrationen der anti-inflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 detektiert werden (Abbildung 24A+B). Wie bereits oben erwähnt, befördert TNF- α die Entzündung im Herzen und führt daher zu einer verringerten Kontraktilität und einem schlechteren Remodeling nach Infarkt [362]. Sowohl in humanen als auch in murinen Studien konnte gezeigt werden, dass Adenosin die Freisetzung von TNF- α aus Monozyten und Makrophagen hemmt [363]. In Mäusen wird dieser supprimierende Effekt über den A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptor vermittelt [212,225]. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass kardiale APCs nach I/R hauptsächlich den A_{2B}-Rezeptor exprimieren (Abbildung 17C), könnte Adenosin somit über diesen Rezeptor die TNF- α Freisetzung verringern und die Heilung befördern.

Die Zytokine TNF-α, TGF-β und IL-10 können auch durch verschiedene T-Zellpopulationen freigesetzt werden, die somit vermutlich zu dem pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokinmilieu in den Herzen von CD73^{-/-}- bzw. WT-Tieren beitragen. In den letzten Jahren demonstrierten verschiedene Studien, dass T-Zellen und insbesondere regulatorische T-Zellen eine supprimierende Wirkung auf die Immunantwort nach Herzinfarkt haben [81,83,364]. Tang *et al.* zeigten, dass eine erhöhte Anzahl von Treg-Zellen im Herzen nach Infarkt zu einer verbesserten Herzfunktion, weniger interstitiellen Fibrose und einer verringerten Apoptose von Kardiomyozyten führt [83]. Zusätzlich wanderten weniger Immunzellen in das Herz ein, die Expression von TNF-α im Myokardgewebe nahm ab, die von IL-10 dagegen zu. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten Tang *et al.*, dass Treg-Zellen das Remodeling nach Infarkt durch Hemmung der Entzündungsreaktion und direkten Schutz von Kardiomyozyten befördern [83]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fand sich in Herzen von CD73^{-/-}-Tieren ein tendenziell geringeres Verhältnis von regulatorischen T-Zellen (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) im Vergleich zu der Gesamtzahl der CD4⁺-T-Zellen (Abbildung 22F). Dieses Ergebnis spiegelt sich in den bereits erwähnten niedrigeren Konzentrationen von IL-10 und TGF-β wieder, die normalerweise in hohen Mengen von Treg-Zellen sezerniert werden [365]. Es ist daher zu vermuten, dass die Anzahl der Treg-Zellen in CD73^{-/-}-Herzen nicht ausreicht, um die Entzündungsreaktion rechtzeitig einzudämmen. Dementsprechend strömen 2 Wochen nach Infarkt auch weiter zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen in das Herzgewebe ein (Abbildung 22D+E). Varda-Bloom *et al.* wiesen nach, dass zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) nach Infarkt aktiviert werden, gesunde Kardiomyozyten in vitro abtöten und daher vermutlich zur Schädigung des Myokardgewebes nach Infarkt beitragen [84]. Versuche mit CD4⁺-Zelldefizienten Tieren machten hingegen deutlich, dass T-Helferzellen die Wundheilung nach Herzinfarkt befördern [81]. Dazu ist auf den ersten Blick eine Studie von Yang et al. widersprüchlich, in welcher IFN-y produzierende T-Helferzellen den Einstrom von Immunzellen in das Herzgewebe vermitteln und ihre Deletion zu einer Abnahme der Infarktgröße 1 Tag nach I/R führt [221]. Diese Befunde sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Heilungsprozess nach Infarkt stark davon abhängt, ob die eingewanderten T-Zellen pro- oder anti-inflammatorische Zytokine sezernieren. Romio et al. konnten an in vitro stimulierten CD4⁺ T-Zellen zeigen, dass die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen durch die Aktivierung des A2A-Rezeptors gehemmt wird [216]. Dementsprechend sezernieren CD73defiziente T-Zellen höhere Mengen an IFN-γ, TNF-α und IL-2 [216]. Im Zusammenhang mit dem Herzinfarkt wäre es daher denkbar, dass das von der CD73 gebildete Adenosin die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus T-Zellen autokrin hemmt und so die Auflösung der Entzündungsreaktion befördert. Da dieser supprimierende Mechanismus in CD73^{-/-}-Mäusen entfällt, tragen die eingewanderten T-Zellen in diesen Tieren stattdessen zur Infiltration und Aktivierung von APCs, Monozyten und Granulozyten bei.

Die genannten Unterschiede im Zytokinmuster zwischen WT- und CD73^{-/-}-Tieren konnten nur im Herzen und nicht im Blut gefunden werden (Abbildung 24). Es liegt daher nahe, dass die oben beschriebenen, hemmenden Effekte von Adenosin lokal auf den Entzündungsort beschränkt sind und durch die gesteigerte CD73-Expression auf eingewanderten Granulozyten und T-Zellen induziert werden. Koronare Endothelzellen exprimieren zwar ebenfalls CD73 (Tabelle 8), allerdings zeigten weiterführende Versuche mit Knochenmarkchimären, dass die Ektonukleotidase auf diesen Zellen keinen Einfluss auf den Heilungsprozess nach Infarkt hat [277]. Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass CD73exprimierende Immunzellen die wesentliche Zellfraktion darstellt, welche die Wundheilung nach Herzinfarkt befördert.

5.4.2 CD73 auf T-Zellen ist ein wichtiger Modulator der Wundheilung nach Herzinfarkt

CD73 wird nach Myokardinfarkt im Wesentlichen von zwei Immunzellpopulationen im Herzen exprimiert: von Granulozyten und T-Zellen (vergleiche Abschnitt 4.3). Um zu untersuchen, welche der beiden Leukozytenpopulationen zu der eingeschränkten Wundheilung in CD73-defizienten Tieren beiträgt, wurden T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse (CD4-Cre^{+/-} CD73^{flox/flox}) generiert. In dieser Arbeit konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die Ektonukleotidase in diesen Tieren sowohl auf CD4⁺- als auch auf CD8⁺-T-Zellen deletiert ist, wohingegen Granulozyten ein normales CD73-Expressionsniveau aufweisen (Abbildung 25). Die vollständige CD73-Defizienz auf beiden T-Zellsubtypen ist darauf zurückzuführen, dass sowohl einfach positive CD4- als auch einfach positive CD8-T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus ein CD4⁺CD8⁺-doppelt positives Stadium durchlaufen [366].

Obwohl die CD73 in diesem Untersuchungsmodell nur auf T-Zellen fehlt, war die Herzfunktion von CD4-Cre^{+/-}CD73^{flox/flox}-Mäusen nach I/R bemerkenswerterweise in gleicher Weise eingeschränkt wie in globalen CD73^{-/-}-Tieren (Abbildung 26). Die Herzen beider transgener Gruppen waren bereits eine Woche nach I/R deutlich dilatiert (Abbildung 26 C-D) und zeigten zudem nach zwei Wochen eine verringerte Kontraktionsfähigkeit des Infarktbereichs (Abbildung 29), was zu der verringerten Pumpleistung im Vergleich zu den Kontrolltieren führt (Abbildung 26A).

Der Befund, dass T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse ähnliche funktionelle Einschränkungen nach I/R zeigen wie global-transgene Tiere macht deutlich, dass die CD73 auf T-Zellen als entscheidender Modulator des Heilungsprozesses nach Herzinfarkt fungiert. Die Ektonukleotidase auf Granulozyten scheint in diesem Zusammenhang nur einen geringen Einfluss zu haben, da in globalen CD73^{-/-}-Tieren die Kontraktilität lediglich vorübergehend 2 Wochen nach I/R etwas stärker eingeschränkt war als in den T-zellspezifischen KO-Mäusen (Abbildung 29).

Hier stellte sich zwangsläufig die Frage, wie es möglich ist, dass die Ektonukleotidase auf nur einer einzigen Zellpopulation, die zudem nur in geringer Anzahl im Herzen vorkommt, einen derartigen Einfluss auf die Wundheilung nach I/R hat. Prinzipiell sind zwei Mechanismen denkbar: Das von der CD73 auf T-Zellen gebildete Adenosin moduliert (i) parakrin den Phänotyp von diversen anderen kardialen Zellen oder (ii) autokrin den Phänotyp der T-Zellen

selbst, die daraufhin durch die Freisetzung von Zytokinen andere Zellen im Herzen regulieren.

Zu (i): Wie bereits in Kapitel 5.4.1 diskutiert, lässt sich das Fazit ziehen, dass Adenosin hauptsächlich einen immunsuppressiven Effekt auf die Leukozyten im Herzen hat und somit wesentlich an der Auflösung der Inflammation nach I/R beteiligt ist. Extrazelluläres Adenosin kann aber auch auf andere kardiale Zellen, wie z.B. Fibroblasten wirken und so die Narbenbildung im Infarktbereich beeinflussen. Fibroblasten wandern beim Abklingen der akuten Entzündungsreaktion in das Infarktareal ein und differenzieren sich zu Myofibroblasten [56]. Diese synthetisieren kontraktile Proteine wie α -SMA (α -smooth muscle actin) und sind Hauptproduzenten von Kollagen und weiteren Matrixproteinen [56]. Durch die Sekretion dieser Matrixkomponenten wird ein Narbengewebe aufgebaut, welches das nekrotische Myokardgewebe ersetzt, die Infarktregion stabilisiert und die Dilatation des Ventrikels minimiert [88]. Im Gegensatz dazu führt eine übermäßige Fibrose in den nicht-infarzierten Bereichen zu einer erhöhten Steifigkeit des Ventrikels und folglich zu einer eingeschränkten Herzfunktion [367]. Adenosin hemmt die Kollagen-Synthese von kardialen Fibroblasten über den A_{2B}-Rezeptor [352] und schützt somit vor der exzessiven Bildung extrazellulärer Matrix und der damit verbundenen linksventrikulären Dysfunktion nach Herzinfarkt [368].

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung ist der Befund, dass der Anteil an fibrotischem Gewebe in globalen CD73^{-/-}-Mäusen sowohl in der Infarktregion als auch in den nichtinfarzierten Bereichen des Herzens höher war als in WT-Tieren [277]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich sowohl globale als auch T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäusen hinsichtlich der Narbenqualität von wildtypischen Tieren unterscheiden: Vier Wochen nach Infarkt wiesen beide CD73^{-/-}-Gruppen einen höheren Anteil der dünneren Kollagenfasern III im Vergleich zum dichter-gepackten Kollagen I auf (Abbildung 30). Im gesunden Herzen besteht die extrazelluläre Matrix zu etwa 85 % aus Kollagen I und zu ~ 11 % aus Kollagen III [369]. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, wird nach Infarkt zunächst das locker-gepackte Kollagen III gebildet, während in der späteren Heilungsphase das zugfestere Kollagen I vorherrscht (siehe Abschnitt 1.2.3). Ein verringertes Verhältnis von Kollagen I zu III deutet daher auf eine unreife Infarktnarbe hin [370]. Vor diesem Hintergrund scheint die Narbenbildung nach I/R in beiden CD73^{-/-}-Gruppen gestört zu sein. Es ist daher zu vermuten, dass das von den T-Zellen gebildete Adenosin nicht nur vor einer übermäßigen Fibrose schützt, sondern auch die Ausbildung einer stabilen, zugfesten Infarktnarbe befördert. Die Narbenbildung kann neben Adenosin zusätzlich durch Zytokine reguliert werden [371]. Insbesondere das von M2-Makrophagen und Treg-Zellen gebildete TGF-β stimuliert die Differenzierung zu Myofibroblasten sowie die Bildung von extrazellulären Matrixproteinen [85]. Aber auch die von T-Zellen sezernierten Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 sowie das Th17-Zytokin IL-17 wirken pro-fibrotisch, da sie die Proliferation und Kollagensynthese von Fibroblasten stimulieren [371-374].

Zu (ii): Interessanterweise konnten Romio *et al.* an *in vitro* stimulierten CD4⁺ T-Zellen zeigen, dass die Sekretion von IL-4 und IL-13 durch die Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors um mehr als die Hälfte gesenkt wird [216]. Ebenso konnte die IL-17 Sekretion von humanen Zellen durch Behandlung mit dem Adenosin-Analogon 2-Chloroadenosin inhibiert werden [375]. Es ist daher denkbar, dass CD73-generiertes Adenosin die Freisetzung von IL-4, IL-13 und IL-17 aus kardialen T-Zellen über einen autokrinen Rückkopplungsmechanismus hemmt und so vor einer exzessiven Fibrose nach Infarkt schützt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde in Rahmen dieser Arbeit 7 Tage nach I/R erhöhte IL-17-Konzentrationen im Herzgewebe von globalen CD73^{-/-}-Mäusen gemessen (Abbildung 24), was aus Zeitgründen bislang noch nicht in T-zellspezifischen CD73^{-/-}-Tieren verifiziert wurde.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die CD73 auf T-Zellen ein wichtiger Modulator der Wundheilung nach Herzinfarkt darstellt. Vermutlich wirkt das von der Ektonukleotidase CD73 gebildete Adenosin direkt auf kardiale Immunzellen und Fibroblasten und hemmt so die Entzündungsreaktion und schützt darüber hinaus vor einer übermäßigen Fibrosierung. Zusätzlich könnte das von den T-Zellen generierte extrazelluläre Adenosin autokrin die Freisetzung von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen T-Zellzytokinen hemmen und die Wundheilung zusätzlich befördern.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Klinke R, Bauman R, Gay R, & Rothenburger A (2010) Physiologie, 6. Auflage, Thieme.
- [2] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, & White HD (2012) Third universal definition of myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.* **9**, 620-633.
- [3] Bui QT, Prempeh M, & Wilensky RL (2009) Atherosclerotic plaque development. *Int. J Biochem. Cell Biol.* **41**, 2109-2113.
- [4] Hansson GK, Robertson AK, & Soderberg-Naucler C (2006) Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 297-329.
- [5] World Health Organisation (WHO) (2013) Fact Sheet No 310: The top 10 causes of death.
- [6] Statistisches Bundesamt (2010) Gesundheit Krankheitskosten. Wiesbaden.
- [7] Statistisches Bundesamt (2011) Gesundheit Todesursachen in Deutschland 2010. pp. 1. Wiesbaden.
- [8] Boateng S & Sanborn T (2013) Acute myocardial infarction. Dis. Mon. 59, 83-96.
- [9] Welch TD, Yang EH, Reeder GS, & Gersh BJ (2012) Modern management of acute myocardial infarction. *Curr. Probl. Cardiol.* **37**, 237-310.
- [10] Lopez-Sendon J & Lopez de Sa E (2008) Acute Heart Failure in the Setting of Acute Coronary Syndromes. In Acute Heart Failure (Mebazaa,A., Gheorghiade,M., Zannad,F., & Parrillo,J., eds), pp. 168-182. Springer London.
- [11] Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JM, Warnica JW, Flaker GC, Braunwald E, & Pfeffer MA (2003) Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am. Coll. Cardiol.* 42, 1446-1453.
- [12] Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, & Vasan RS (2008) Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 118, 2057-2062.
- [13] Frantz S, Bauersachs J, & Ertl G (2009) Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **81**, 474-481.
- [14] Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, & Wollert KC (2012) Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol. Med. (Berl)* **90**, 361-369.
- [15] Blankesteijn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, & Smits JF (2001) Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand.* **173**, 75-82.
- [16] Frangogiannis NG (2008) The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res.* **58**, 88-111.
- [17] Katz A (2011) *Physiology of the Heart*, Wolters Kluwer Health.
- [18] Scheuer J (1967) Myocardial metabolism in cardiac hypoxia. Am. J Cardiol. 19, 385-392.
- [19] Jennings RB (1969) Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *Am. J Cardiol.* 24,753-765.

- [20] Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, Ravens KG, & Bing RJ (1968) Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circ. Res.* 23, 429-438.
- [21] Kubler W & Spieckermann PG (1970) Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol. Cell Cardiol.* **1**, 351-377.
- [22] Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, & Mayer SE (1981) Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ. Res.* 49, 892-900.
- [23] Mochizuki S & Neely JR (1979) Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. *J Mol. Cell Cardiol.* **11**, 221-236.
- [24] Rovetto MJ, Lamberton WF, & Neely JR (1975) Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ. Res.* **37**, 742-751.
- [25] Meier P, Schirmer SH, Lansky AJ, Timmis A, Pitt B, & Seiler C (2013) The collateral circulation of the heart. *BMC. Med.* **11**, 143.
- [26] van der Laan AM, Nahrendorf M, & Piek JJ (2012) Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart* **98**, 1384-1390.
- [27] Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, & Frangogiannis NG (2009) Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem. Cell Biol.* **131**, 471-481.
- [28] Jennings RB & Reimer KA (1981) Lethal myocardial ischemic injury. Am. J Pathol. 102, 241-255.
- [29] Inserte J, Barba I, Hernando V, Abellan A, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, & Garcia-Dorado D (2008) Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc. Res.* 77, 782-790.
- [30] Smith GL, Donoso P, Bauer CJ, & Eisner DA (1993) Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart. *J Physiol* **472**, 11-22.
- [31] Murphy E, Perlman M, London RE, & Steenbergen C (1991) Amiloride delays the ischemiainduced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68, 1250-1258.
- [32] Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, & Cala PM (1990) Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. Am. J Physiol 259, C940-C948.
- [33] Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, & Piper HM (2012) Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 94, 168-180.
- [34] Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, & Netticadan T (2004) The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 101-110.
- [35] Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, & Gellerich FN (2003) Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 911-916.

- [36] Tsuji T, Ohga Y, Yoshikawa Y, Sakata S, Abe T, Tabayashi N, Kobayashi S, Kohzuki H, Yoshida KI, Suga H, Kitamura S, Taniguchi S, & Takaki M (2001) Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca2+ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H1286-H1294.
- [37] Yoshida K, Yamasaki Y, & Kawashima S (1993) Calpain activity alters in rat myocardial subfractions after ischemia or reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1182**, 215-220.
- [38] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, & Korthuis RJ (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 298, 229-317.
- [39] Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, & Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786-794.
- [40] Hausenloy DJ & Yellon DM (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. J. Clin. Invest 123, 92-100.
- [41] Raedschelders K, Ansley DM, & Chen DD (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.* 133, 230-255.
- [42] Baines CP (2009) The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 181-188.
- [43] Whelan RS, Kaplinskiy V, & Kitsis RN (2010) Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol* **72**, 19-44.
- [44] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, & Vinten-Johansen J (2001) Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis.* 6, 279-290.
- [45] Chen GY & Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826-837.
- [46] Ravichandran KS (2011) Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity.* **35**, 445-455.
- [47] Christia P & Frangogiannis NG (2013) Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur. J Clin Invest* **43**, 986-995.
- [48] Mann DL (2011) The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ. Res.* **108**, 1133-1145.
- [49] Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, & de Kleijn DP (2012) The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* **94**, 276-283.
- [50] Baeuerle PA & Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 141-179.
- [51] Kilgore KS, Schmid E, Shanley TP, Flory CM, Maheswari V, Tramontini NL, Cohen H, Ward PA, Friedl HP, & Warren JS (1997) Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. *Am. J Pathol.* **150**, 2019-2031.
- [52] Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, & Rossen RD (1997) Complement C5a, TGF-beta

1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* **95**, 684-692.

- [53] Sen CK & Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J 10, 709-720.
- [54] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, & Ikeda U (2011) Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123, 594-604.
- [55] Takahashi M (2011) Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc. Med.* **21**, 37-41.
- [56] Chen W & Frangogiannis NG (2013) Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 945-953.
- [57] Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith CW, & Entman ML (1997) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* **95**, 693-700.
- [58] Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, & Entman ML (1998) Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 98, 699-710.
- [59] Ito BR, Engler RL, & del BU (1993) Role of cardiac mast cells in complement C5a-induced myocardial ischemia. *Am. J Physiol* **264**, H1346-H1354.
- [60] Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, & Gallo RL (2004) Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. J. Biol. Chem. 279, 17079-17084.
- [61] Palazzo AJ, Jones SP, Anderson DC, Granger DN, & Lefer DJ (1998) Coronary endothelial Pselectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. Am. J. Physiol 275, H1865-H1872.
- [62] Frangogiannis NG (2007) Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* **97**, 738-747.
- [63] Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, & Pittet MJ (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J. Exp. Med. 204, 3037-3047.
- [64] Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, & Carretero OA (2002) Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp. Physiol* **87**, 547-555.
- [65] Simpson PJ, Todd RF, III, Fantone JC, Mickelson JK, Griffin JD, & Lucchesi BR (1988) Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest* **81**, 624-629.
- [66] Li W, Goldstein DR, & Kreisel D (2013) Intravital 2-photon imaging, leukocyte trafficking, and the beating heart. *Trends Cardiovasc. Med.* 23, 287-293.

- [67] McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, & Kubes P (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366.
- [68] Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, & Entman ML (1991) Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 84, 400-411.
- [69] Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, & Entman M (2001) Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 103, 2181-2187.
- [70] Vinten-Johansen J (2004) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **61**, 481-497.
- [71] Hirase T & Node K (2012) Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol* **302**, H499-H505.
- [72] Jordan JE, Zhao ZQ, & Vinten-Johansen J (1999) The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **43**, 860-878.
- [73] Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, & Lindbom L (2008) Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* **112**, 1461-1471.
- [74] Nahrendorf M & Swirski FK (2013) Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ. Res.* **112**, 1624-1633.
- [75] Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, & Frangogiannis NG (2005) CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* 96, 881-889.
- [76] Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, & Elsasser A (2009) Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J. Cell Mol. Med.* 13, 3485-3496.
- [77] Lambert JM, Lopez EF, & Lindsey ML (2008) Macrophage roles following myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **130**, 147-158.
- [78] Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, & Entman ML (2000) IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J. Immunol.* **165**, 2798-2808.
- [79] Macpherson G & Austyn J (2013) *Exploring Immunology: Concepts and Evidence*, Wiley-Blackwell.
- [80] Serhan CN, Ward PA, & Gilroy DW (2010) *Fundamentals of inflammation*, Cambridge University Press.
- [81] Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, & Frantz S (2012) Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **125**, 1652-1663.

- [82] Liao YH & Cheng X (2006) Autoimmunity in myocardial infarction. Int. J. Cardiol. 112, 21-26.
- [83] Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, & Cheng X (2012) Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 107, 232.
- [84] Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, Battler A, Eldar M, & Hasin D (2000) Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol. Cell Cardiol.* 32, 2141-2149.
- [85] Dobaczewski M, Chen W, & Frangogiannis NG (2011) Transforming growth factor (TGF)beta signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell Cardiol.* **51**, 600-606.
- [86] Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, & Gabbiani G (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 103-111.
- [87] Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, & Chaponnier C (2001) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730-2741.
- [88] Daskalopoulos EP, Janssen BJ, & Blankesteijn WM (2012) Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc. Microanal.* **18**, 35-49.
- [89] Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, & Daemen MJ (1995) Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am. J Pathol.* **147**, 325-338.
- [90] Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. J Am. Coll. Cardiol. 13, 1637-1652.
- [91] Frangogiannis NG, Michael LH, & Entman ML (2000) Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc. Res.* **48**, 89-100.
- [92] van der Laan AM, Piek JJ, & van RN (2009) Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 515-523.
- [93] Zhao T, Zhao W, Chen Y, Ahokas RA, & Sun Y (2010) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. *Microvasc. Res.* 80, 188-194.
- [94] Zhao W, Lu L, Chen SS, & Sun Y (2004) Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 605-611.
- [95] Lerman RH, Apstein CS, Kagan HM, Osmers EL, Chichester CO, Vogel WM, Connelly CM, & Steffee WP (1983) Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ. Res.* 53, 378-388.
- [96] Holmes JW, Borg TK, & Covell JW (2005) Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **7**, 223-253.
- [97] Koshy SK, Reddy HK, & Shukla HH (2003) Collagen cross-linking: new dimension to cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* **57**, 594-598.
- [98] Frangogiannis NG (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* **110**, 159-173.
- [99] van den Borne SW, Cleutjens JP, Hanemaaijer R, Creemers EE, Smits JF, Daemen MJ, & Blankesteijn WM (2009) Increased matrix metalloproteinase-8 and -9 activity in patients with infarct rupture after myocardial infarction. *Cardiovasc. Pathol.* **18**, 37-43.
- [100] Huebener P, Abou-Khamis T, Zymek P, Bujak M, Ying X, Chatila K, Haudek S, Thakker G, & Frangogiannis NG (2008) CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. J. Immunol. 180, 2625-2633.
- [101] Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, & Nahrendorf M (2010) Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. J. Am. Coll. Cardiol. 55, 1629-1638.
- [102] Abbate A, Bonanno E, Mauriello A, Bussani R, Biondi-Zoccai GG, Liuzzo G, Leone AM, Silvestri F, Dobrina A, Baldi F, Pandolfi F, Biasucci LM, Baldi A, Spagnoli LG, & Crea F (2004) Widespread myocardial inflammation and infarct-related artery patency. *Circulation* 110, 46-50.
- [103] Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, Winkelmann K, Michael LH, Lawler J, & Entman ML (2005) Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* **111**, 2935-2942.
- [104] Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, & Liu PP (2004) Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* **110**, 3221-3228.
- [105] Eltzschig HK, Sitkovsky MV, & Robson SC (2013) Purinergic signaling during inflammation. N. Engl. J. Med. 368, 1260.
- [106] Hasko G & Cronstein B (2013) Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol.* **4**, 85.
- [107] Berg JM, Tymoczko JL, & Stryer L (2003) *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Deutschland.
- [108] Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, & Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**, 19-29.
- [109] Burnstock G (2012) Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* **34**, 218-225.
- [110] Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 201-212.
- [111] Kim UH, Kim MK, Kim JS, Han MK, Park BH, & Kim HR (1993) Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 147-152.
- [112] Terada M, Fujiki H, Marks PA, & Sugimura T (1979) Induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells by nicotinamide and related compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. S. A 76, 6411-6414.
- [113] Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, Lamming DW, Souza-Pinto NC, Bohr VA, Rosenzweig A, de CR, Sauve AA, & Sinclair DA (2007) Nutrient-sensitive mitochondrial NAD+ levels dictate cell survival. *Cell* 130, 1095-1107.

- [114] Karczewska J, Martyniec L, Dzierzko G, Stepinski J, & Angielski S (2007) The relationship between constitutive ATP release and its extracellular metabolism in isolated rat kidney glomeruli. *J Physiol Pharmacol.* **58**, 321-333.
- [115] Vitiello L, Gorini S, Rosano G, & la SA (2012) Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* **120**, 511-518.
- [116] Yin J, Xu K, Zhang J, Kumar A, & Yu FS (2007) Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *J Cell Sci.* **120**, 815-825.
- [117] Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, Zhao C, Nichols CG, & Ashcroft FM (2000) A novel method for measurement of submembrane ATP concentration. *J. Biol. Chem.* **275**, 30046-30049.
- [118] Miller DS & Horowitz SB (1986) Intracellular compartmentalization of adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 261, 13911-13915.
- [119] Allen DG, Morris PG, Orchard CH, & Pirolo JS (1985) A nuclear magnetic resonance study of metabolism in the ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis. *J Physiol* **361**, 185-204.
- [120] Eltzschig HK & Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391-1401.
- [121] Lazarowski ER, Boucher RC, & Harden TK (2000) Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J. Biol. Chem.* **275**, 31061-31068.
- [122] Lazarowski ER (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic. Signal.* **8**, 359-373.
- [123] Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, & Ravichandran KS (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863-867.
- [124] Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Kuper N, Karcher C, Weissmuller T, Boengler K, Schulz R, Robson SC, & Colgan SP (2006) ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* 99, 1100-1108.
- [125] Sabirov RZ & Okada Y (2009) The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J Physiol Sci.* **59**, 3-21.
- [126] Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, & Kojima S (2010) Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol. Chem.* 285, 17406-17416.
- [127] Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, & Sosinsky G (2007) Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 282, 31733-31743.
- [128] Sohl G & Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62, 228-232.
- [129] Wang N, De BM, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Vinken M, Rogiers V, Bukauskas FF, Bultynck G, & Leybaert L (2013) Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 35-50.

- [130] Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, Chanson M, Goodenough DA, & Kwak BR (2006) Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat. Med.* 12, 950-954.
- [131] Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, & Grassi F (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.* **1**, ra6.
- [132] Burnstock G (2004) Introduction: P2 receptors. Curr. Top. Med. Chem. 4, 793-803.
- [133] Jarvis MF & Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**, 208-215.
- [134] Hattori M & Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207-212.
- [135] Di VF, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, & Baricordi OR (2001) Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587-600.
- [136] Erb L, Liao Z, Seye CI, & Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* **452**, 552-562.
- [137] Bours MJ, Swennen EL, Di VF, Cronstein BN, & Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **112**, 358-404.
- [138] Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal SM, Melchiorri L, Baricordi OR, & Di VF (1997) Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol.* 159, 1451-1458.
- [139] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, & Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232.
- [140] Woehrle T, Yip L, Elkhal A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, Insel PA, & Junger WG (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* **116**, 3475-3484.
- [141] Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, & Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23, 1685-1693.
- [142] Lecut C, Frederix K, Johnson DM, Deroanne C, Thiry M, Faccinetto C, Maree R, Evans RJ, Volders PG, Bours V, & Oury C (2009) P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation. *J Immunol.* 183, 2801-2809.
- [143] Jacob F, Perez NC, Bachert C, & Van CK (2013) Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic. Signal.* 9, 285-306.
- [144] Fruscione F, Scarfi S, Ferraris C, Bruzzone S, Benvenuto F, Guida L, Uccelli A, Salis A, Usai C, Jacchetti E, Ilengo C, Scaglione S, Quarto R, Zocchi E, & De FA (2011) Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD+ release and P2Y11-mediated signaling. *Stem Cells Dev.* 20, 1183-1198.

- [145] Yadav A, Saini V, & Arora S (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1570-1579.
- [146] Zhang Z, Wang Z, Ren H, Yue M, Huang K, Gu H, Liu M, Du B, & Qian M (2011) P2Y(6) agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment. J. Immunol. 186, 5376-5387.
- [147] Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, & Coutinho-Silva R (2011) Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. *Immunobiology* 216, 1-11.
- [148] Matsuyama H, Amaya F, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, Shime N, Ishizaka A, & Hashimoto S (2008) Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study. *Respir. Res.* **9**, 79.
- [149] Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, & Junger WG (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314, 1792-1795.
- [150] Kukulski F, Levesque SA, & Sevigny J (2011) Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv. Pharmacol.* **61**, 263-299.
- [151] Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, & Sevigny J (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic. Signal.* 1, 193-204.
- [152] Robson SC, Sevigny J, & Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic. Signal.* 2, 409-430.
- [153] Zimmermann H, Zebisch M, & Strater N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic. Signal.* **8**, 437-502.
- [154] Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, & Zimmermann H (2000) Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem. J.* 351 Pt 3, 639-647.
- [155] Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, & Ford JE (1999) CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleoside diphosphates. J. Biol. Chem. 274, 20064-20067.
- [156] Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, Kosenburger K, Yang JW, Waldhoer M, Sitte HH, & Boehm S (2009) A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 325-334.
- [157] Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, & Robson SC (2007) CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic. Signal.* **3**, 171-180.
- [158] Friedman DJ, Kunzli BM, Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, Csizmadia E, Friess H, & Robson SC (2009) From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 16788-16793.
- [159] Sun X, Imai M, Nowak-Machen M, Guckelberger O, Enjyoji K, Wu Y, Khalpey Z, Berberat P, Munasinghe J, & Robson SC (2011) Liver damage and systemic inflammatory responses

are exacerbated by the genetic deletion of CD39 in total hepatic ischemia. *Purinergic. Signal.* 7, 427-434.

- [160] Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, & Stefan C (2000) Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 393-432.
- [161] Gijsbers R, Aoki J, Arai H, & Bollen M (2003) The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett.* **538**, 60-64.
- [162] Bachorik PS & Dietrich LS (1972) The purification and properties of detergent-solubilized rat liver nucleotide pyrophosphatase. *J Biol. Chem.* **247**, 5071-5078.
- [163] Evans WH, Hood DO, & Gurd JW (1973) Purification and properties of a mouse liver plasmamembrane glycoprotein hydrolysing nucleotide pyrophosphate and phosphodiester bonds. *Biochem. J* 135, 819-826.
- [164] Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, Serra S, & Malavasi F (2013) A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *OncoImmunology*. 2, e26246.
- [165] Stefan C, Jansen S, & Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic. Signal.* **2**, 361-370.
- [166] Grahnert A, Grahnert A, Klein C, Schilling E, Wehrhahn J, & Hauschildt S (2011) Review: NAD +: a modulator of immune functions. *Innate. Immun.* **17**, 212-233.
- [167] Hirata Y, Kimura N, Sato K, Ohsugi Y, Takasawa S, Okamoto H, Ishikawa J, Kaisho T, Ishihara K, & Hirano T (1994) ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* 356, 244-248.
- [168] Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walseth TF, & Lee HC (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262, 1056-1059.
- [169] Gustafsson AJ, Muraro L, Dahlberg C, Migaud M, Chevallier O, Khanh HN, Krishnan K, Li N, & Islam MS (2011) ADP ribose is an endogenous ligand for the purinergic P2Y1 receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* 333, 8-19.
- [170] De FA, Zocchi E, Guida L, Franco L, & Bruzzone S (2004) Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD+/cyclic ADP-ribose system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 176-191.
- [171] Hussain AM, Lee HC, & Chang CF (1998) Functional expression of secreted mouse BST-1 in yeast. Protein Expr. Purif. 12, 133-137.
- [172] Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Garbarino G, Dianzani U, Stockinger H, & Malavasi F (1998) Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. J. Immunol. 160, 395-402.
- [173] Malavasi F, Deaglio S, Ferrero E, Funaro A, Sancho J, Ausiello CM, Ortolan E, Vaisitti T, Zubiaur M, Fedele G, Aydin S, Tibaldi EV, Durelli I, Lusso R, Cozno F, & Horenstein AL (2006) CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity. *Mol. Med.* 12, 334-341.
- [174] Seman M, Adriouch S, Haag F, & Koch-Nolte F (2004) Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr. Med. Chem.* **11**, 857-872.

- [175] Glowacki G, Braren R, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter EH, Haag F, & Koch-Nolte F (2001) Structure, chromosomal localization, and expression of the gene for mouse ecto-mono(ADPribosyl)transferase ART5. *Gene* 275, 267-277.
- [176] Glowacki G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F, & Koch-Nolte F (2002) The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferases in humans and the mouse. *Protein Sci.* **11**, 1657-1670.
- [177] Hong S, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, & Dubyak GR (2009) Basal and inducible expression of the thiol-sensitive ART2.1 ecto-ADP-ribosyltransferase in myeloid and lymphoid leukocytes. *Purinergic. Signal.* 5, 369-383.
- [178] Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, & Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*. **19**, 571-582.
- [179] Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285 (Pt 2),** 345-365.
- [180] Strater N (2006) Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic. Signal.* **2**, 343-350.
- [181] Heuts DP, Weissenborn MJ, Olkhov RV, Shaw AM, Gummadova J, Levy C, & Scrutton NS (2012) Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem.* 13, 2384-2391.
- [182] Knofel T & Strater N (1999) X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 448-453.
- [183] Hunsucker SA, Mitchell BS, & Spychala J (2005) The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **107**, 1-30.
- [184] Garavaglia S, Bruzzone S, Cassani C, Canella L, Allegrone G, Sturla L, Mannino E, Millo E, De FA, & Rizzi M (2012) The high-resolution crystal structure of periplasmic Haemophilus influenzae NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. *Biochem. J.* 441, 131-141.
- [185] Schutz W, Schrader J, & Gerlach E (1981) Different sites of adenosine formation in the heart. *Am. J. Physiol* **240**, H963-H970.
- [186] Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, & Eltzschig HK (2007) Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. J. Immunol. 178, 8127-8137.
- [187] Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zernecke A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, & Schrader J (2004) Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ. Res.* 95, 814-821.
- [188] Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, & Hasko G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* **19**, 355-367.
- [189] Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, & Eltzschig HK (2009) Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J.* **23**, 473-482.

- [190] Zernecke A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzlaff JM, Luscher B, Schrader J, & Weber C (2006) CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 113, 2120-2127.
- [191] Hart ML, Henn M, Kohler D, Kloor D, Mittelbronn M, Gorzolla IC, Stahl GL, & Eltzschig HK (2008) Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemiareperfusion injury. *FASEB J.* 22, 2784-2797.
- [192] Chen JF, Eltzschig HK, & Fredholm BB (2013) Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 265-286.
- [193] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, & Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527-552.
- [194] Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, & Muller CE (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* **63**, 1-34.
- [195] Klinger M, Freissmuth M, & Nanoff C (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal.* 14, 99-108.
- [196] Linden J (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 775-787.
- [197] Hasko G, Linden J, Cronstein B, & Pacher P (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 759-770.
- [198] Jacobson KA & Gao ZG (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 247-264.
- [199] Yang JN, Tiselius C, Dare E, Johansson B, Valen G, & Fredholm BB (2007) Sex differences in mouse heart rate and body temperature and in their regulation by adenosine A1 receptors. *Acta Physiol (Oxf)* **190,** 63-75.
- [200] Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, & Wilson CN (2009) Adenosine receptors and inflammation. In Adenosine Receptors in Health and Disease pp. 215-269. Springer.
- [201] Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, & Williams M (1990) The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* **85**, 1150-1157.
- [202] Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, & Weissmann G (1992) Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol.* **148**, 2201-2206.
- [203] Salmon JE & Cronstein BN (1990) Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. J. Immunol. 145, 2235-2240.
- [204] Takahashi HK, Iwagaki H, Hamano R, Wake H, Kanke T, Liu K, Yoshino T, Tanaka N, & Nishibori M (2007) Effects of adenosine on adhesion molecule expression and cytokine production in human PBMC depend on the receptor subtype activated. *Br. J Pharmacol.* 150, 816-822.

- [205] Fernandez LG, Sharma AK, LaPar DJ, Kron IL, & Laubach VE (2013) Adenosine A1 receptor activation attenuates lung ischemia-reperfusion injury. J Thorac. Cardiovasc. Surg. 145, 1654-1659.
- [206] Lee HT, Gallos G, Nasr SH, & Emala CW (2004) A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am. Soc. Nephrol.* **15**, 102-111.
- [207] Belardinelli L, Shryock JC, Snowdy S, Zhang Y, Monopoli A, Lozza G, Ongini E, Olsson RA, & Dennis DM (1998) The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284, 1066-1073.
- [208] Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El YM, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, & Parmentier M (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**, 674-678.
- [209] Milne GR & Palmer TM (2011) Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. *ScientificWorldJournal*. **11**, 320-339.
- [210] Zhao ZQ, Sato H, Williams MW, Fernandez AZ, & Vinten-Johansen J (1996) Adenosine A2receptor activation inhibits neutrophil-mediated injury to coronary endothelium. Am. J Physiol 271, H1456-H1464.
- [211] Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, Marton A, & Szabo C (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 14, 2065-2074.
- [212] Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, & Auchampach JA (2006) Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 172-180.
- [213] Lappas CM, Rieger JM, & Linden J (2005) A2A adenosine receptor induction inhibits IFNgamma production in murine CD4+ T cells. *J. Immunol.* **174**, 1073-1080.
- [214] Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, Mrowietz U, Dichmann S, & Norgauer J (2001) Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J* 15, 1963-1970.
- [215] Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la SA, Girolomoni G, & Norgauer J (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 101, 3985-3990.
- [216] Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Huls S, Burghoff S, & Schrader J (2011) Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **301**, C530-C539.
- [217] Csoka B, Nemeth ZH, Virag L, Gergely P, Leibovich SJ, Pacher P, Sun CX, Blackburn MR, Vizi ES, Deitch EA, & Hasko G (2007) A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli. *Blood* 110, 2685-2695.
- [218] Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, & Elenkov IJ (2000) Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol.* 164, 436-442.
- [219] Glover DK, Riou LM, Ruiz M, Sullivan GW, Linden J, Rieger JM, Macdonald TL, Watson DD, & Beller GA (2005) Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-

146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H1851-H1858.

- [220] Lasley RD, Jahania MS, & Mentzer RM, Jr. (2001) Beneficial effects of adenosine A(2a) agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. Am. J Physiol Heart Circ. Physiol 280, H1660-H1666.
- [221] Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, & Linden J (2006) Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 114, 2056-2064.
- [222] Fredholm BB, Irenius E, Kull B, & Schulte G (2001) Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 443-448.
- [223] Fredholm BB (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death. Differ.* **14**, 1315-1323.
- [224] Feoktistov I & Biaggioni I (2011) Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv. Pharmacol.* **61**, 115-144.
- [225] Chen H, Yang D, Carroll SH, Eltzschig HK, & Ravid K (2009) Activation of the macrophage A2b adenosine receptor regulates tumor necrosis factor-alpha levels following vascular injury. *Exp. Hematol.* 37, 533-538.
- [226] Koeppen M, Harter PN, Bonney S, Bonney M, Reithel S, Zachskorn C, Mittelbronn M, & Eckle T (2012) Adora2b signaling on bone marrow derived cells dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 116, 1245-1257.
- [227] Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, & Hasko G (2005) Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* **175**, 8260-8270.
- [228] Csoka B, Selmeczy Z, Koscso B, Nemeth ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., Gause WC, Leibovich SJ, & Hasko G (2012) Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J.* **26**, 376-386.
- [229] Feoktistov I, Goldstein AE, & Biaggioni I (1999) Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptormediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol. Pharmacol.* 55, 726-734.
- [230] Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, Wong M, Gewirtz AT, Si-Tahar M, & Madara JL (2001) Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal lumenal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. J. Clin. Invest 107, 861-869.
- [231] Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, & Civelli O (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 7432-7436.
- [232] Cheong SL, Federico S, Venkatesan G, Mandel AL, Shao YM, Moro S, Spalluto G, & Pastorin G (2013) The A3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches. *Med. Res. Rev.* **33**, 235-335.
- [233] Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, Sanborn BM, Jacobson MA, Tilley SL, & Blackburn MR (2003) Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor. J. Immunol. 171, 338-345.

- [234] Martin L, Pingle SC, Hallam DM, Rybak LP, & Ramkumar V (2006) Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factorkappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. J. Pharmacol. Exp. Ther. 316, 71-78.
- [235] Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, & Firestein GS (1996) Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. J. Immunol. 156, 3435-3442.
- [236] Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, & Camaioni E (2001) Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.* 21, 105-128.
- [237] Zavialov AV & Engstrom A (2005) Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem. J.* **391**, 51-57.
- [238] Aran JM, Colomer D, Matutes E, Vives-Corrons JL, & Franco R (1991) Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001-1008.
- [239] Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, & Lluis C (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* **52**, 283-294.
- [240] Ciruela F, Saura C, Canela EI, Mallol J, Lluis C, & Franco R (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* **380**, 219-223.
- [241] Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, & Morimoto C (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**, 466-469.
- [242] Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 673-694.
- [243] Li RW, Yang C, Sit AS, Lin SY, Ho EY, & Leung GP (2012) Physiological and pharmacological roles of vascular nucleoside transporters. J. Cardiovasc. Pharmacol. 59, 10-15.
- [244] Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, & Baldwin SA (2013) The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* 34, 529-547.
- [245] Gray JH, Owen RP, & Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* **447**, 728-734.
- [246] Soler C, Garcia-Manteiga J, Valdes R, Xaus J, Comalada M, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Celada A, & Felipe A (2001) Macrophages require different nucleoside transport systems for proliferation and activation. *FASEB J.* 15, 1979-1988.
- [247] Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, & Young JD (2011) Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J. Biol. Chem.* **286**, 32552-32562.
- [248] Eckle T, Hughes K, Ehrentraut H, Brodsky KS, Rosenberger P, Choi DS, Ravid K, Weng T, Xia Y, Blackburn MR, & Eltzschig HK (2013) Crosstalk between the equilibrative nucleoside transporter ENT2 and alveolar Adora2b adenosine receptors dampens acute lung injury. *FASEB J.* 27, 3078-3089.

- [249] Rose JB, Naydenova Z, Bang A, Ramadan A, Klawitter J, Schram K, Sweeney G, Grenz A, Eltzschig H, Hammond J, Choi DS, & Coe IR (2011) Absence of equilibrative nucleoside transporter 1 in ENT1 knockout mice leads to altered nucleoside levels following hypoxic challenge. *Life Sci.* 89, 621-630.
- [250] Boison D (2013) Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol. Rev.* 65, 906-943.
- [251] Jacob M.I. & Berne R.M (1960) Metabolism of purine derivatives by the isolated cat heart. *Am. J. Physiol* **198**, 322-326.
- [252] Murray AW (1971) The biological significance of purine salvage. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 811-826.
- [253] Deussen A (2000) Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **362**, 351-363.
- [254] Phillips E & Newsholme EA (1979) Maximum activities, properties and distribution of 5' nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in rat and human brain. J. Neurochem. 33, 553-558.
- [255] Deussen A, Stappert M, Schafer S, & Kelm M (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* **99**, 2041-2047.
- [256] Greene RW (2011) Adenosine: front and center in linking nutrition and metabolism to neuronal activity. J. Clin. Invest 121, 2548-2550.
- [257] Sauer B & Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 5166-5170.
- [258] Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, & Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- [259] Fiset C, Clark RB, Larsen TS, & Giles WR (1997) A rapidly activating sustained K+ current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. J. Physiol 504 (Pt 3), 557-563.
- [260] Zhou YY, Wang SQ, Zhu WZ, Chruscinski A, Kobilka BK, Ziman B, Wang S, Lakatta EG, Cheng H, & Xiao RP (2000) Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 279, H429-H436.
- [261] Mullis KB & Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- [262] Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- [263] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, & Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- [264] Junqueira LC, Bignolas G, & Brentani RR (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11, 447-455.

- [265] Junqueira LC, Montes GS, & Sanchez EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry* **74**, 153-156.
- [266] Rock KL, Latz E, Ontiveros F, & Kono H (2010) The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 321-342.
- [267] Geissmann F, Jung S, & Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. **19**, 71-82.
- [268] Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van RN, Stehling M, Drevets DA, & Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. J. Immunol. 172, 4410-4417.
- [269] Abuzakouk M, Feighery C, & O'Farrelly C (1996) Collagenase and Dispase enzymes disrupt lymphocyte surface molecules. *J. Immunol. Methods* **194**, 211-216.
- [270] Grange C, Letourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Martin J, Liberman M, Latour M, Widmer H, Lattouf JB, Piccirillo CA, Cailhier JF, & Lapointe R (2011) Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. J. Immunol. Methods 372, 119-126.
- [271] Van DN, Baeten D, De VM, Demetter P, Elewaut D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, & De KF (2000) Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. J. Immunol. Methods 236, 27-35.
- [272] Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, & Jalkanen S (1997) Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J. Cell Biol.* **136**, 421-431.
- [273] Kalsi K, Lawson C, Dominguez M, Taylor P, Yacoub MH, & Smolenski RT (2002) Regulation of ecto-5'-nucleotidase by TNF-alpha in human endothelial cells. *Mol. Cell Biochem.* 232, 113-119.
- [274] Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, Noris P, Balduini CL, Gritti D, Ricevuti G, & Wiedermann CJ (2002) Reversal of thrombin-induced deactivation of CD39/ATPDase in endothelial cells by HMG-CoA reductase inhibition: effects on Rho-GTPase and adenosine nucleotide metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 894-900.
- [275] Frangogiannis NG (2006) The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 1907-1939.
- [276] Ezekowitz RA & Gordon S (1982) Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines. *J. Exp. Med.* **155**, 1623-1637.
- [277] Bönner F, Borg N, Jacoby C, Temme S, Ding Z, Flögel U, & Schrader J (2013) Ecto-5'nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. *Circ. Res.* 113, 301-312.
- [278] Marelli-Berg FM, Peek E, Lidington EA, Stauss HJ, & Lechler RI (2000) Isolation of endothelial cells from murine tissue. *J. Immunol. Methods* **244**, 205-215.
- [279] Rui T, Cepinskas G, Feng Q, Ho YS, & Kvietys PR (2001) Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **281**, H440-H447.

- [280] Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, Sugano Y, Takahashi T, Abe H, Mochizuki S, Sano M, Yoshikawa T, Okada Y, Koyasu S, Ogawa S, & Fukuda K (2012) Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* 125, 1234-1245.
- [281] Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, & Roake JA (1994) Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J. Immunol.* **152**, 2401-2410.
- [282] Louch WE, Sheehan KA, & Wolska BM (2011) Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J. Mol. Cell Cardiol.* **51**, 288-298.
- [283] Taqueti VR, Mitchell RN, & Lichtman AH (2006) Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Annu. Rev. Physiol* **68**, 67-95.
- [284] Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, & Randolph GJ (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 453-460.
- [285] Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, & Orme IM (2003) Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. J. Immunol. 171, 3128-3135.
- [286] Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, & Griffin MD (2007) Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 71, 619-628.
- [287] Kruger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, Engel D, Giese B, Muller-Newen G, Floege J, & Kurts C (2004) Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. J. Am. Soc. Nephrol. 15, 613-621.
- [288] Ferenbach D & Hughes J (2008) Macrophages and dendritic cells: what is the difference? *Kidney Int.* **74,** 5-7.
- [289] Hume DA (2008) Macrophages as APC and the dendritic cell myth. J. Immunol. 181, 5829-5835.
- [290] Cose S, Brammer C, Khanna KM, Masopust D, & Lefrancois L (2006) Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1423-1433.
- [291] Inman CF, Murray TZ, Bailey M, & Cose S (2012) Most B cells in non-lymphoid tissues are naive. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 235-242.
- [292] Hart DN & Fabre JW (1981) Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. J. Exp. Med. 154, 347-361.
- [293] Lech M, Grobmayr R, Weidenbusch M, & Anders HJ (2012) Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments. *Mediators. Inflamm.* 2012, 951390.
- [294] Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. Cell 140, 771-776.
- [295] Murray PJ & Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723-737.

- [296] Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML, & Nelson PJ (2006) CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int.* 70, 591-596.
- [297] Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, & Duffield J (2012) The renal mononuclear phagocytic system. J. Am. Soc. Nephrol. 23, 194-203.
- [298] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, & Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621-667.
- [299] Zelenay S & Reis E Sousa (2013) Adaptive immunity after cell death. *Trends Immunol*.
- [300] D'hondt C, Ponsaerts R, De SH, Vinken M, De VE, De BM, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, & Bultynck G (2011) Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal.* **23**, 305-316.
- [301] Pelegrin P & Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* **25**, 5071-5082.
- [302] Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, & De FA (2001) Connexin 43 hemi channels mediate Ca2+-regulated transmembrane NAD+ fluxes in intact cells. *FASEB J.* **15**, 10-12.
- [303] Skobel E & Kammermeier H (1997) Relation between enzyme release and irreversible cell injury of the heart under the influence of cytoskeleton modulating agents. *Biochim. Biophys. Acta* **1362**, 128-134.
- [304] Hickman SE, el KJ, Greenberg S, Schieren I, & Silverstein SC (1994) P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood* 84, 2452-2456.
- [305] Communi D, Parmentier M, & Boeynaems JM (1996) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222, 303-308.
- [306] Lazarowski ER & Boucher RC (2001) UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci.* 16, 1-5.
- [307] Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, & Harden TK (1997) Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 24348-24354.
- [308] Erlinge D, Harnek J, van HC, Olivecrona G, Jern S, & Lazarowski E (2005) Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *Int. J. Cardiol.* **100**, 427-433.
- [309] Dubyak GR (2012) P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol.* **14**, 1697-1706.
- [310] Kono H, Karmarkar D, Iwakura Y, & Rock KL (2010) Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J. Immunol.* **184**, 4470-4478.
- [311] Wiley JS & Gu BJ (2012) A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic. Signal.* 8, 579-586.
- [312] Gu BJ, Saunders BM, Petrou S, & Wiley JS (2011) P2X(7) is a scavenger receptor for apoptotic cells in the absence of its ligand, extracellular ATP. *J. Immunol.* **187**, 2365-2375.

- [313] Haag F, Adriouch S, Brass A, Jung C, Moller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, & Koch-Nolte F (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic. Signal.* 3, 71-81.
- [314] Krebs C, Adriouch S, Braasch F, Koestner W, Leiter EH, Seman M, Lund FE, Oppenheimer N, Haag F, & Koch-Nolte F (2005) CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADPribosylation of T cell surface proteins. *J. Immunol.* 174, 3298-3305.
- [315] Levesque SA, Kukulski F, Enjyoji K, Robson SC, & Sevigny J (2010) NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1473-1485.
- [316] Henttinen T, Jalkanen S, & Yegutkin GG (2003) Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. J. Biol. Chem. 278, 24888-24895.
- [317] Hasko G & Pacher P (2012) Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler*. *Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 865-869.
- [318] Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I, & Dikov MM (2008) Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **112**, 1822-1831.
- [319] Eppell BA, Newell AM, & Brown EJ (1989) Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. *J. Immunol.* **143**, 4141-4145.
- [320] Leung GP, Man RY, & Tse CM (2005) D-Glucose upregulates adenosine transport in cultured human aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H2756-H2762.
- [321] Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, & Haseler LJ (2011) Adenosine and its receptors in the heart: regulation, retaliation and adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1413-1428.
- [322] Eckle T, Krahn T, Grenz A, Kohler D, Mittelbronn M, Ledent C, Jacobson MA, Osswald H, Thompson LF, Unertl K, & Eltzschig HK (2007) Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 115, 1581-1590.
- [323] Maas JE, Wan TC, Figler RA, Gross GJ, & Auchampach JA (2010) Evidence that the acute phase of ischemic preconditioning does not require signaling by the A 2B adenosine receptor. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**, 886-893.
- [324] Toldo S, Zhong H, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Kannan H, Zeng D, Belardinelli L, Voelkel NF, & Abbate A (2012) GS-6201, a selective blocker of the A2B adenosine receptor, attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343**, 587-595.
- [325] Mirabet M, Herrera C, Cordero OJ, Mallol J, Lluis C, & Franco R (1999) Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. J. Cell Sci. 112 (Pt 4), 491-502.
- [326] Liao W, Lin JX, & Leonard WJ (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. **38**, 13-25.
- [327] Banchereau J, Pascual V, & O'Garra A (2012) From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **13**, 925-931.

- [328] Nakatsukasa H, Tsukimoto M, Harada H, & Kojima S (2011) Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 114-119.
- [329] Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LF, Filho AZ, Moreira JC, Morrone FB, Sevigny J, Schetinger MR, de Souza Wyse AT, & Battastini AM (2012) Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS. One.* **7**, e31205.
- [330] Robson SC, Kaczmarek E, Siegel JB, Candinas D, Koziak K, Millan M, Hancock WW, & Bach FH (1997) Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. J. Exp. Med. 185, 153-163.
- [331] Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, & Colgan SP (2003) Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* **198**, 783-796.
- [332] Junger WG (2008) Purinergic regulation of neutrophil chemotaxis. Cell Mol. Life Sci. 65, 2528-2540.
- [333] Chen Y, Yao Y, Sumi Y, Li A, To UK, Elkhal A, Inoue Y, Woehrle T, Zhang Q, Hauser C, & Junger WG (2010) Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. *Sci. Signal.* **3**, ra45.
- [334] Corriden R, Chen Y, Inoue Y, Beldi G, Robson SC, Insel PA, & Junger WG (2008) Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *J. Biol. Chem.* **283**, 28480-28486.
- [335] Barletta KE, Ley K, & Mehrad B (2012) Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 856-864.
- [336] Koizumi S, Odashima M, Otaka M, Jin M, Linden J, Watanabe S, & Ohnishi H (2009) Attenuation of gastric mucosal inflammation induced by indomethacin through activation of the A2A adenosine receptor in rats. J. Gastroenterol. 44, 419-425.
- [337] Wang H, Zhang W, Tang R, Zhu C, Bucher C, Blazar BR, Geng JG, Zhang C, Linden J, Wu C, & Huo Y (2010) Adenosine receptor A2A deficiency in leukocytes increases arterial neointima formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 915-922.
- [338] van der Hoeven D, Wan TC, & Auchampach JA (2008) Activation of the A(3) adenosine receptor suppresses superoxide production and chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils. *Mol. Pharmacol.* **74**, 685-696.
- [339] Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, Masekowsky E, Mager A, Morote-Garcia JC, Unertl K, & Eltzschig HK (2009) Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat. Immunol.* 10, 195-202.
- [340] Salmi M & Jalkanen S (2012) Ectoenzymes controlling leukocyte traffic. *Eur. J. Immunol.* **42**, 284-292.
- [341] Partida-Sanchez S, Gasser A, Fliegert R, Siebrands CC, Dammermann W, Shi G, Mousseau BJ, Sumoza-Toledo A, Bhagat H, Walseth TF, Guse AH, & Lund FE (2007) Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. J. Immunol. 179, 7827-7839.

- [342] Ortolan E, Tibaldi EV, Ferranti B, Lavagno L, Garbarino G, Notaro R, Luzzatto L, Malavasi F, & Funaro A (2006) CD157 plays a pivotal role in neutrophil transendothelial migration. Blood 108, 4214-4222.
- [343] Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha H, & Kim KT (2001) P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. *J. Immunol.* **166**, 6754-6763.
- [344] Ma Y, Yabluchanskiy A, & Lindsey ML (2013) Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis. Tissue Repair* 6, 11.
- [345] Di VF (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 465-472.
- [346] Di VF, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, & Baricordi OR (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death. Differ.* **5**, 191-199.
- [347] Gudipaty L, Humphreys BD, Buell G, & Dubyak GR (2001) Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. Am. J. Physiol Cell Physiol 280, C943-C953.
- [348] Hong S, Schwarz N, Brass A, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F, Schilling WP, & Dubyak GR (2009) Differential regulation of P2X7 receptor activation by extracellular nicotinamide adenine dinucleotide and ecto-ADP-ribosyltransferases in murine macrophages and T cells. J. Immunol. 183, 578-592.
- [349] Pittman K & Kubes P (2013) Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. J. Innate. Immun. 5, 315-323.
- [350] Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, & Grassi F (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci. Signal.* **1**, ra6.
- [351] Erdmann AA, Gao ZG, Jung U, Foley J, Borenstein T, Jacobson KA, & Fowler DH (2005) Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2-driven expansion in vivo. *Blood* **105**, 4707-4714.
- [352] Dubey RK, Gillespie DG, & Jackson EK (1998) Adenosine inhibits collagen and protein synthesis in cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Hypertension* **31**, 943-948.
- [353] McIntosh VJ & Lasley RD (2012) Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **17**, 21-33.
- [354] O'Neal W, Griffin WF, ent SD, & irag JAI (2012) Cellular Pathways of Death and Survival in Acute Myocardial Infarction. *J Clin Exp Cardilog* **S6:003**.
- [355] Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, & Sano M (2013) Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol. Cell Cardiol.* **62C**, 24-35.
- [356] Soehnlein O & Lindbom L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427-439.
- [357] Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, & Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80, 2012-2020.

- [358] Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, & McColl SR (1997) Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol.* **159**, 3595-3602.
- [359] Meldrum DR (1998) Tumor necrosis factor in the heart. Am. J Physiol 274, R577-R595.
- [360] Nahrendorf M, Pittet MJ, & Swirski FK (2010) Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* **121**, 2437-2445.
- [361] van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF, Nijveldt R, Lommerse I, Delewi R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Zwaginga JJ, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Rossum AC, Voermans C, van der Schoot CE, & Piek JJ (2012) A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *Am. Heart J* **163**, 57-65.
- [362] Kleinbongard P, Schulz R, & Heusch G (2011) TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail. Rev.* **16**, 49-69.
- [363] Hasko G, Pacher P, Deitch EA, & Vizi ES (2007) Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol. Ther.* **113**, 264-275.
- [364] Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, & Frangogiannis NG (2010) CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am. J Pathol.* **176**, 2177-2187.
- [365] Hussell T, Cavanagh M, Wissinger E, & Findlay EG (2010) 9 Lymphocytes. *Fundamentals. of Inflammation* 107.
- [366] Maltzman JS & Turka LA (2007) Conditional gene expression: a new tool for the transplantologist. *Am. J Transplant.* 7, 733-740.
- [367] Weber KT (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* **96**, 4065-4082.
- [368] Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N, & Kitakaze M (2006) Longterm stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* 114, 1923-1932.
- [369] Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, & Bashey RI (1988) Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ. Res.* **62**, 757-765.
- [370] Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, & Janicki JS (2006) The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur. J Cardiothorac. Surg.* **30**, 604-610.
- [371] Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J. Pathol. 214, 199-210.
- [372] Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, & Wynn TA (1999) An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. J Clin Invest 104, 777-785.
- [373] Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, & Phipps RP (1994) Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol.* **152**, 3606-3614.

- [374] Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K, Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K, & Sano M (2012) Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am. Heart Assoc.* **1**, e004408.
- [375] Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, & Mills KH (2009) CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* **183**, 7602-7610.

7 Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bedanken bei:

- Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Möglichkeit, an diesem interessanten und attraktiven Thema zu arbeiten, die Unterstützung und fachlichen Anregungen sowie die guten Arbeitsbedingungen in seinem Institut. Vielen Dank auch für die Gelegenheit, Teile dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen und dabei wertvolle Erfahrungen zu sammeln.
- Prof. Dr. Eckhard Lammert f
 ür die freundliche
 Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation,
- allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die große Hilfsbereitschaft, eure Unterstützung bei praktischen und fachlichen Problemen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein großer Dank gilt Dr. Florian Bönner für die schöne und produktive Zusammenarbeit in der ersten Zeit meiner Doktorarbeit. Gemeinsam mit ihm gelangen die Isolierung von kardialen Immunzellen sowie die Charakterisierung der Heilung nach Herzinfarkt in global CD73-defizienten Tieren. Dr. Florian Bönner und Dr. Zhaoping Ding danke ich zudem für die Durchführung der Herzinfarkt-Operationen. Ein Dank geht außerdem an Dr. Christoph Jacoby und Dr. Ulrich Flögel für ihre Bereitschaft mir die Welt des MRTs näherzubringen und mir bei den entsprechenden Analysen zu helfen. Dr. Daniela Friebe und Dr. Sebastian Temme danke ich für ihre Hilfe bei der qRT-PCR und bei immunologischen Fragestellungen. Eine große Hilfe bei den Experimenten waren außerdem Bodo Steckel, Jutta Ziemann und Sabine Bongardt.
- Katharina Raba der Core Flow Cytometry Facility am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Hilfe bei der Durchführung der Zellsortierung,
- allen Mitarbeitern des Instituts f
 ür Herz- und Kreislaufphysiologie inklusive der AG Kr
 üger f
 ür das nette und lustige Arbeitsklima,
- meinen Korrekturlesern Dr. Christoph Jacoby, Dr. Sebastian Temme, Dr. Daniela Friebe und meiner Schwester Sarah Borg für ihre Mühe und die vielen konstruktiven Kommentare. Ein besonderer Dank geht an Dr. Ulrich Flögel für das aufmerksame Lesen meiner Dissertation und die hilfreichen Anmerkungen.
- meiner Familie und Freunden f
 ür ihre gro
 ßartige und liebevolle Unterst
 ützung w
 ährend meines gesamten Studiums sowie der Promotion. Besonders danke ich Ahmad f
 ür seinen steten R
 ückhalt, seine Geduld und die notwendige Ablenkung von der Laborwelt.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Ort, Datum)

(Unterschrift, Nadine Désirée Borg)