

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Die Regulation der IL-6 Bildung im Herzen durch die CD73 - Adenosin - A2b Achse

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Anne Sophie Henseler
2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachter: PD. Dr. med. Florian Bönner

Zusammenfassung

Ischämische Herzerkrankungen gehören zu den weltweit führenden Todesursachen. Daher ist ein genaues Verständnis der Wundheilung nach abgelaufenem Myokardinfarkt notwendig, um neue kardioprotektive Therapien entwickeln zu können. Ein wesentliches Ereignis bei einer akuten Ischämie des Herzens ist der Anstieg des Zytokins IL-6 im Serum. Während IL-6 in der Akutphase kardioprotektiv wirkt, kann eine chronische Erhöhung der IL-6 Serumspiegel zu einer kardialen Hypertrophie und Abnahme der Kontraktilität führen. Ziel dieser Arbeit war es, die Kinetik der globalen Freisetzung von Zytokinen, insbesondere von IL-6, aus dem infarzierten Herzen der Maus zu bestimmen und die Mechanismen näher zu analysieren, die der IL-6 Freisetzung zugrunde liegen. Dazu zählte die Rolle von Adenosin, das von der CD73 Ectonukleotidase auf T Zellen gebildet wird, sowie die Signaltransduktion über den Adenosin A_{2B}-Rezeptor (A_{2B}R).

Um die globale Freisetzung von Zytokinen aus dem Herzen zu erfassen, wurde eine Methode entwickelt, 23 Zytokine im koronaren Effluat isoliert perfundierter Herzen reproduzierbar in Kontroll- und Infarkt-Tieren zu erfassen. An Tag 3 nach Infarkt kam es zu einer vermehrten Freisetzung insbesondere von IL-6, IL-9, MCP-1 und MIP-1 α . Gleiche Versuche an transgenen Tieren (CD4/CD73^{-/-}), die kein Adenosin auf T-Zellen bilden können, zeigten eine signifikante Verminderung der IL-6 Freisetzung. In ähnlicher Weise führte der Verlust der CD73 zu einer verminderten Freisetzung von Adenosin und dessen Abbauprodukte Inosin und Hypoxanthin aus dem Herzen. Ein Verlust der CD73 hatte keinen Einfluss auf die Plasmaspiegel der analysierten Zytokine. Da Monozyten/Makrophagen drei Tage nach Infarkt die größte Immunzellpopulation darstellen und auch die höchste Expression des A_{2B}-Rezeptors aufwiesen, wurde die Signaltransduktion an murinen Makrophagen und humanen Monozyten *in vitro* näher analysiert. Die pharmakologische Stimulation des A_{2B}R führte auf Expressions- und Proteinebene über den G_q-Signalweg zu einer vermehrten Bildung von IL-6 (mRNA und Protein) und IL-1 β (mRNA, IL-1 β Proteinsekretion wurde hier nicht untersucht).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das durch T-Zellen generierte Adenosin die kardiale IL-6 Produktion kontrolliert und dass dieser Effekt über A_{2B}R und den G_q-Signalweg vermittelt wird. Dies bekräftigt das Model einer CD73 → Adenosin → A_{2B}R → IL-6 Achse.

Summary

Ischemic heart disease is one of the leading causes of death worldwide. Therefore, a thorough understanding of the healing process after myocardial infarction (MI) is necessary to develop new cardioprotective therapies. An important event during acute cardiac ischemia is the increase of IL-6 in serum. In the acute phase, IL-6 is known to be cardioprotective while chronic elevation can lead to cardiac hypertrophy and a decrease in contractility. The aim of the present work was to study the kinetics of global cytokine release, especially IL-6, from the infarcted murine heart and to analyze the underlying mechanisms which lead to the release of IL-6. Particular attention was on the role of adenosine, which is derived from the ectonucleotidase CD73 on T cells, as well as the signaling pathway via the adenosine A_{2B}-receptor (A_{2B}R).

To determine global cardiac cytokine release, a new method was elaborated to reliably measure 23 cytokines in the coronary effluent perfusate from isolated mouse hearts previously subjected to MI as compared to control mice. On day 3 after MI, the release of IL-6, IL-9, MCP-1 and MIP-1 α was significantly increased. Similar experiments performed in T-cell specific CD73 knock-out mice revealed a significant decrease in IL-6 compared to wildtype controls. Loss of CD73 on T-cells also led to a reduced release of adenosine and its degradation products inosine and hypoxanthine. However, loss of CD73 did not impact on cytokine plasma levels. Since monocytes/macrophages represent the largest group of immune cells on day 3 after MI and were found to highly express the A_{2B}- receptor, signal transduction of murine macrophages and human monocytes was studied more closely *in vitro*. Pharmacological interrogation of A_{2B}R signaling revealed that the Gq-pathway mediates the increased production of IL-6 (mRNA and protein) and IL-1 β (mRNA, protein not analyzed).

In conclusion, these results demonstrate that T-cell derived adenosine controls cardiac IL-6 production via the A_{2B}- receptor and G_q- signaling. Findings are in support of a CD73 $\rightarrow$ adenosine $\rightarrow$ A_{2B}R $\rightarrow$ IL-6- axis.

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
A₁R	Adenosinrezeptor 1
A_{2A}R	Adenosinrezeptor 2A
A_{2B}R	Adenosinrezeptor 2B
A2BR^{-/-}	A2BR-Verlustmutante
A₃R	Adenosinrezeptor 3
ADP	Adenosindiphosphat
Ahr	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin (Fluorophor)
Arid5a	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 5A</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C/EBPβ	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4/CD73^{-/-}	CD4/CD73-Verlustmutante
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CXCL1	<i>C-X-C motif ligand 1</i>
CXCR2	<i>C-X-C motif chemokine receptor 2</i>
Cy	Cyanin-Farbstoff
DAMP	<i>Danger associated molecular pattern</i>
ddH₂O	<i>double distilled water</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia-inducible-factor 1</i>
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN	Interferon

IL-	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
JAK	Januskinase
KC	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
kDA	Kilodalton
KO	<i>Knock-out</i>
LAD	<i>Left anterior descending coronary artery</i>
LDL	<i>low density-Lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6g	Lymphozytenantigen 6g
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NSTEMI	<i>Non-ST-elevation myocardial infarction,</i> Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	<i>percutaneous coronary intervention,</i> perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
pM	Pikomolar
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>

qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
Sp1	<i>Transcription factor Sp1</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction,</i> ST-Streckenhebungsinfarkt
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th-Zellen	T-Helferzellen
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
v.c.	<i>vehicle control</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLE-DMEM	<i>Very-Low Endotoxin Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ischämische Herzerkrankungen	1
1.2	Pathologie des Myokardinfarkts.....	2
1.2.1	Entzündungsphase	3
1.2.2	Proliferationsphase	7
1.2.3	Reifungsphase.....	8
1.3	Zytokine	8
1.3.1	Rolle von IL-1.....	9
1.3.2	Zentrale Rolle von IL-6 im Myokardinfarkt	10
1.4	Purinerges System und Metabolismus	13
1.4.1	ATP- Gefahrensignal der Zelle	14
1.4.2	Extrazelluläre Degradation der Nukleotide durch Ektonukleotidasen...14	
1.4.3	Adenosin – Bildung und Signaltransduktion	16
1.5	Ziele der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	2
2.1	Geräte	2
2.2	Verbrauchsmaterialien	3
2.3	Chemikalien	4
2.4	Antikörper.....	5
2.5	<i>TaqMan</i> -Assays	5
2.6	Kommerzielle Kits	6
2.7	Puffer und Medien.....	7
2.8	Software.....	8
2.9	Ethikvotum	8
2.10	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	8
2.11	Induktion der Myokardinfarkte (Ischämie-Reperfusion)	8

2.12	Blutentnahme und Gewinnung des Plasmas	9
2.13	Gewinnung von koronaren Effluaten.....	9
2.14	Aufkonzentrierung der Effluat-Proben.....	10
2.15	Zytokinmessung mittels Bio-Plex-System.....	10
2.16	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	11
2.17	Zellbiologische Methoden	11
2.17.1	Isolation peritonealer Makrophagen	11
2.17.2	Zellzahlbestimmung.....	12
2.17.3	Magnetische Zellsortierung (MACS).....	12
2.17.4	Blutentnahme.....	13
2.17.5	Dichtegradientenzentrifugation	13
2.17.6	Durchflusszytometrische Zellsortierung- <i>Cell Sort</i>	14
2.18	Zellkultur	15
2.18.1	Monozyten und Makrophagen	15
2.18.2	T-Zellen.....	16
2.18.3	B-Zellen	16
2.19	Molekularbiologische Methoden	16
2.19.1	RNA-Isolation.....	16
2.19.2	Reverse Transkription.....	17
2.19.3	Quantitative <i>Real-Time PCR</i>	17
2.19.4	Methode der relativen Quantifizierung.....	18
2.20	UPLC- Ultra Performance Liquid Chromatography.....	18
2.21	Statistik	19
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Entwicklung eines Langendorff- basierten Modells zur Messung von Zytokinen in koronaren Effluaten	21
3.1.1	Initial- und Gleichgewichtsphase	21
3.1.2	Ist die Verwendung eines Proteinase-Inhibitors sinnvoll?	23

3.2	Bedeutung des CD73- Adenosins für die Zytokinsekretion	24
3.2.1	Zytokingehalt in koronaren Effluaten	24
3.2.2	Zytokinkonzentrationen im venösen Blut drei Tage nach Myokardinfarkt 28	
3.3	Freisetzung von Purinverbindungen in das koronare Effluat	29
3.4	Einfluss des A _{2B} -Rezeptors auf die IL-6 und IL-1 β -Produktion in murinen, peritonealen Makrophagen	30
3.5	Einfluss des A _{2B} R auf post-transkriptionelle Regulationsfaktoren von IL-6 .	34
3.6	Die A _{2B} R- IL-6- Achse an humanen Immunzellen.....	36
3.6.1	Einfluss der A _{2B} -Rezeptor-Stimulation auf die IL-6 und IL-1 β Expression humaner Monozyten	37
3.6.2	Einfluss der A _{2B} R-Stimulation auf die Expression post-transkriptioneller Regulationsfaktoren von IL-6.....	39
4	Diskussion	41
4.1	Zytokinmessungen im koronaren Effluat mit einer Langendorff-basierten Methode	42
4.2	Die Deletion von CD73 auf T-Zellen führt zu einer geringeren Ausschüttung von Zytokinen in das koronare Effluat.....	43
4.3	In CD4/CD73 ^{-/-} -Mäusen ist die Freisetzung von Purinverbindungen nach I/R reduziert	45
4.4	Die Stimulation des A _{2B} R führt G _q - abhängig zu einer vermehrten IL-6 Produktion in murinen, peritonealen Makrophagen und humanen Monozyten.....	46
4.5	Die Aktivierung des A _{2B} -Rezeptors führt zu einer Hemmung der Regnase-1 47	
4.6	Ausblick.....	48
5	Literaturverzeichnis.....	50
6	Abbildungsverzeichnis	60
7	Tabellenverzeichnis	62
8	Anhang	63

1 Einleitung

1.1 Ischämische Herzerkrankungen

Weltweit stellen ischämische Herzerkrankungen die häufigste Todesursache dar [1]. In Europa kam es in den letzten Jahren zu einer Reduktion der Mortalität [2], welche auf die vermehrte Verwendung von Reperfusionstherapien, perkutaner koronarer Interventionen (PCI), moderner antithrombotischer Therapien sowie Sekundärprävention [3-5] zurückzuführen ist. Weiterhin sterben jedoch ca. 20% der Bevölkerung in Europa an Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems [3].

Das Herz versorgt mit einer Pumpleistung von ca. 7000l pro Tag den menschlichen Organismus mit Blut [6]. Um diese Leistung zu gewährleisten, ist die ausreichende Versorgung des Herzmuskels (Myokard) mit Sauerstoff dringend erforderlich. Diese wird durch die Herzkranzgefäße (Koronarien) sichergestellt. Man unterscheidet die *Arteria coronaria dextra und sinistra*, welche aus dem *Pars ascendens* der Aorta entspringen. Sie dringen von außen in das Myokard ein und versorgen durch zahlreiche Abgänge und Anastomosen das Endo- und Myokard mit Sauerstoff [7].

Ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot führt zu einer Koronarinsuffizienz. Bei einem Verschluss einer Koronararterie kommt es zu einer Ischämie, welche sich klinisch in einem „Akuten Koronarsyndrom“ manifestiert. Das Akute Koronarsyndrom beinhaltet die instabile Angina pectoris sowie den Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) und den ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) [8]. Der akute Myokardinfarkt ist definiert als akute Myokardschädigung aufgrund einer Ischämie. Neben klinischen Befunden wie Thoraxschmerzen oder pathologischen EKG-Veränderungen sind erhöhte Troponinkonzentrationen im Blut nachweisbar, welche im akuten Stadium dynamischen Schwankungen unterliegen. Auf Basis der zugrunde liegenden Pathologien erfolgt eine Einteilung in fünf Gruppen: Der Myokardinfarkt Typ 1 stellt die häufigste Form dar und basiert auf der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, was zu einer Thrombusbildung mit nachfolgender Okklusion der Koronararterie führt. Im Rahmen eines Myokardinfarktes Typ 2 kommt es aufgrund eines Missverhältnisses zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot zu einer Ischämie. Kommt es zu einem plötzlichen Herztod nach Vorliegen ischämietypischer

EKG-Veränderungen, bevor eine Troponin-Bestimmung erfolgen konnte, spricht man von einem Myokardinfarkt Typ 3. Myokardinfarkte der Typen 4 und 5 treten im Rahmen von Koronarinterventionen auf, wie bspw. Bypass-Operationen oder *PCI* [9].

Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, etc. begünstigen eine endotheliale Dysfunktion in den Koronargefäßen und führen sekundär zu Ablagerungen von LDL, Immunzellen, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix in der Gefäßwand mit Einengung des Gefäßlumens. Klinisch kann diese Stenose als Angina pectoris imponieren [10]. Die so entstandenen Plaques sind u.a. aufgrund von Entzündungsprozessen äußerst instabil und können rupturieren, was zu einer plötzlichen Exposition des atheromatösen Kerns mit dem Blutstrom führt. Es entstehen Thromben, welche die Koronargefäße inkomplett oder komplett verschließen und so zu dem klinischen Bild eines Akuten Koronarsyndroms führen [11].

1.2 Pathologie des Myokardinfarkts

Durch den Verschluss eines Herzkranzgefäßes kommt es in dessen Versorgungsgebiet zu einer Unterversorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff. Die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien kommt zum Erliegen, sodass kein ATP mehr bereitgestellt werden kann. Dies führt zu einer Inaktivierung der Na^+/K^+ -ATPase, so dass es in Folge eines vermehrten Einstroms von Na^+ und Wasser zu einer Zellschwellung kommt. Bereits nach 60 sec Ischämie ist eine deutliche Reduktion der Kontraktilität nachweisbar [12]. Da die aerobe Energiegewinnung nicht mehr möglich ist, wird kompensatorisch die anaerobe Glykolyse hochreguliert, welche jedoch vergleichsweise ineffektiv ist [13]. Eine gesteigerte anaerobe Glykolyse führt zu einer intrazellulären Akkumulation von Laktat und Reduktion des pH-Wertes. Über den Na^+/H^+ -Austauscher gelangen Natrium-Ionen in die Zelle, was zu einem Konzentrationsgefälle von intra- nach extrazellulär führt. In Folge wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch aktiviert. Die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt an und bewirkt die Aktivierung von Proteasen, welche u.a. eine Degradation der Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums bewirken [14-17].

Eine frühzeitige Reperfusion des ischämischen Myokardes durch Thrombolyse oder perkutane koronare Intervention kann zu einer Reduktion des Infarktareals führen [18]. Es muss jedoch das Phänomen des Reperfusions-Schadens (*reperfusion injury*) beachtet werden. Wird das Infarktareal nämlich wieder mit Blut und Sauerstoff versorgt, kommt es zu einer schnellen Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes, sodass ein Konzentrationsgradient über der Zellmembran entsteht und die oben genannten Elektrolytverschiebungen verstärkt. Des Weiteren kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommen, welche die Kardiomyozyten direkt schädigen [19]. Zusammengenommen führen alle oben genannten Prozesse zu einer Nekrose von Myokardgewebe [20].

Die Wundheilung nach einem abgelaufenen Myokardinfarkt lässt sich in die Entzündungs-, Proliferations- und die Reifungsphasen einteilen [21]. Nachfolgend sollen diese Phasen näher betrachtet werden.

1.2.1 Entzündungsphase

Unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis werden sogenannte *danger signals* frei, welche *heat shock* Proteine, Hyaluron- und Fibronectinfragmente umfassen. Diese aktivieren *Toll-like* Rezeptoren und lösen eine Entzündungsreaktion aus [22]. Hierbei scheint besonders der *Toll-like* Rezeptor 4 eine bedeutende Rolle zu spielen, der nach Myokardinfarkt stark hochreguliert wird. Ursächlich hierfür ist der Anstieg der IL-1 β Konzentration, wodurch der TLR-4 induziert wird [23]. Weiterhin kommt es in Folge einer Schädigung des Herzmuskels zu einer Aktivierung des Komplementsystems [24]. Ein weiterer wichtiger Mediator der Entzündung sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Hierbei handelt es sich um hochreaktive Metabolite, welche mit Lipiden, Proteinen und DNA reagieren und direkt inhibitorisch auf das Myokard wirken [25]. Alle Faktoren führen zusammen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-11 oder TNF- α bewirkt und über die Regulation der Matrix-Metalloproteasen den Aufbau der extrazellulären Matrix beeinflusst [26, 27].

Neben der humoralen Immunantwort spielen in der initialen Entzündungsphase Immunzellen eine wichtige Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass eine

systemische Leukozytose zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei ischämischen Ereignissen führt [28]. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese vermehrt in das Myokard einwandern, um dort pro-inflammatorisch zu wirken.

Die zeitlich ersten Immunzellen, die in das Infarktgebiet infiltrieren, sind neutrophile Granulozyten. Sie werden über Adhäsionsmoleküle rekrutiert, die sogenannten Selektine und Integrine, welche eine Interaktion mit dem Endothel vermitteln. Durch diesen ersten Kontakt kommt es zu einer Konformationsänderung der Adhäsionsmoleküle, wodurch deren Affinität erhöht und die Bindung sowie die Extravasation der Leukozyten ermöglicht wird [29]. Neutrophile Granulozyten setzen proteolytische Enzyme frei, um nekrotische Zellen abzubauen. Des Weiteren sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- α und verstärken so die Entzündung [30]. Neutrophile fördern auch die Polarisation der Makrophagen zu einem reparativen Phänotyp, sodass sie auch in die Beendigung der Entzündung involviert sind. Die Anzahl der Neutrophilen nimmt an Tag drei nach Infarkt bereits deutlich ab und ab Tag sieben sind sie in der Regel aus dem Infarktgebiet verschwunden [31].

Auch Monozyten wandern früh in das Infarktgebiet ein, sodass bereits nach 30 min die ersten Zellen nachweisbar sind [32]. Hier differenzieren sie zu Makrophagen, die in pro-inflammatorische M1 und reparative M2 Makrophagen eingeteilt werden können [33]. Auf Basis verschiedener Eigenschaften und Oberflächenmarker kann man sowohl in der Maus als auch beim Menschen verschiedene Monozyten-Gruppen klassifizieren: in der Maus unterscheidet man pro-inflammatorische Ly-6C^{high} und anti-inflammatorische Ly-6C^{low}-Monozyten. Die murinen Ly-6C^{high} Monozyten werden in der Literatur als Äquivalent zu den humanen klassischen Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) angesehen. Des Weiteren gibt es im humanen System noch nicht-klassische (CD14⁺CD16⁺⁺) sowie intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) Monozyten. [34]

Im murinen Infarktmodell zeigt sich eine biphasische Monozytenantwort: in den ersten drei Tagen (Phase 1) nach Ischämie überwiegen die pro-inflammatorischen Ly-6C^{high} Monozyten, welche durch MCP-1 und dessen Bindung an CCR2 angelockt werden. Sie beseitigen durch proteolytische und phagozytotische Aktivität Zelldebris und fördern die Entzündungsreaktion durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine [34, 35]. Beeinflusst wird die Akkumulation dieser Monozyten durch gewebständige

Makrophagen. Während CCR2⁺ Makrophagen eine Infiltration begünstigen, wird diese durch CCR2⁻ Makrophagen verhindert [36]. In Phase zwei (Tag 4-7) überwiegen die anti-inflammatorischen Ly-6C^{low}-Monozyten, welche in der proliferativen Phase (siehe Abschnitt 1.2.2) eine bedeutende Rolle spielen. Die Produktion von IL-6, TNF- α und der MMP9 ist reduziert, während das anti-inflammatorische IL-10 vermehrt gebildet wird [37]. Außerdem sezernieren sie TGF- α und TGF- β und fördern dadurch die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Auch die Angiogenese wird durch Ly-6C^{low} Monozyten über VEGF gefördert [35]. Zusammengenommen lässt sich feststellen, dass Monozyten zentrale Protagonisten im Heilungsprozess nach einer Myokardischämie sind, die sowohl pro-inflammatorische als auch reparative Eigenschaften aufweisen.

Neben dem angeborenen Immunsystem spielen auch Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen) eine Rolle im Heilungsprozess nach Myokardinfarkt, welche jedoch erst in den letzten Jahren Gegenstand der Forschung wurden. Nach einem permanenten Verschluss eines Koronargefäßes steigt die Anzahl der T-Zellen im Herzen um das 10-fache an. Das Maximum wird dabei an Tag 7 nach Infarkt erreicht [38, 39]. Dieser Anstieg ist vermutlich durch eine Migration der Zellen aus dem Blut in das Herz erklärbar [39]. So wurde zum Beispiel im Blut von STEMI-Patienten 30 min nach Reperfusion eine Reduktion des Anteils an naiven CD4⁺CCR7⁺ T-Zellen beobachtet, während CD4⁺CCR7⁺ *Central Memory* Zellen in diesem Zeitraum anstiegen. Eine Migration dieser Zellen in das infarzierte Myokardium ist eine mögliche Erklärung, da hier ein Anstieg der CCR7- Liganden CCL-19 und CCL-21 beobachtet wurde [40].

T-Zellen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: CD4⁺ und CD8⁺-Zellen. CD8⁺ T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Ihr T-Zell-Rezeptor (TCR) interagiert mit MHC I Molekülen anderer Zellen. MHC I Moleküle präsentieren zelleigene Peptide. Ist eine Zelle virusinfiziert, werden virale Peptide präsentiert, die die CD8⁺ T-Zelle als fremd erkennt und die Zelle lysiert. Dabei spielen Mechanismen wie die Freisetzung von Perforin und Granzym aus intrazellulären Vesikeln oder die Interaktion des Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor eine wichtige Rolle. Des Weiteren produzieren CD8⁺-Zellen TNF- α und IFN- γ , was zu einem pro-inflammatorischen Zytokinmilieu führt und die Differenzierung der CD4⁺-Zellen beeinflusst [41]. CD4⁺-T-Zellen werden auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet und in verschiedene

Subgruppen eingeteilt: Th1-, Th2-, Th17- und regulatorische (Treg-) Zellen. Die Differenzierung wird maßgeblich durch Zytokine beeinflusst: IFN- γ und IL-12p70 fördern die Entwicklung von Th1-Zellen, welche selbst wiederum IFN- γ produzieren. Th1-Zellen sind in der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene involviert und aktivieren Makrophagen und CD8⁺-Zellen. Sie spielen jedoch auch eine Rolle in autoimmunen oder entzündlichen Prozessen wie bspw. Atherosklerose eine Rolle [41-43]. IL-4 und IL-13 fördern die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen. Ihre Funktion besteht in der Regulation der humoralen B-Zellantwort auf extrazelluläre Pathogene und sie sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 [43].

Nach einem Myokardinfarkt verschiebt sich das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen in Richtung Th1 [38]. Diese Verschiebung ist assoziiert mit einer erhöhten Apoptose von Kardiomyozyten und einer erniedrigten Myofibroblastendifferenzierung, was zu einem erhöhten Risiko einer Ventrikelruptur führt [44]. Auch die Th17-Zellen sind mit einem schlechteren *Outcome* nach Infarkt assoziiert. Sie entwickeln sich aus naiven T-Zellen

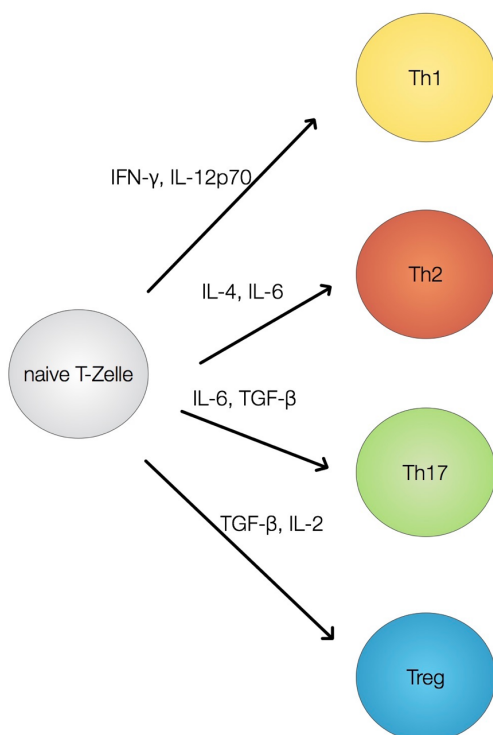


Abb. 1: Differenzierung CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von Zytokinen. [41, 45].

unter Einfluss von IL-6 und TGF- β und schütten IL-17 aus [43]. IL-17 erhöht die kardiale Fibrose, unterhält die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen in das Infarktgebiet sowie die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen [46].

Einen Gegenpol zu den Th1, Th2, und Th17 Populationen bilden die regulatorischen T-Zellen. Sie wirken anti-inflammatorisch, erhalten die Selbsttoleranz und wirken so der Entstehung von Autoimmunerkrankungen entgegen [47, 48]. Nach einem Herzinfarkt wandern sie in Abhängigkeit von CCR5 zügig in das Myokard ein [49]. Dort induzieren sie zahlreiche Veränderungen, die zu einer höheren Überlebensrate und einer besseren Wundheilung führen: sie fördern die Differenzierung profibrotischer Monozyten, erhöhen die Kollagen I und III Konzentrationen im Herzen und interagieren mit Fibroblasten. Außerdem limitieren sie die Apoptose von Kardiomyozyten und können durch Sekretion von IL-10 und IL-33 sogar deren Proliferation stimulieren [50-53]. Die kardioprotektiven Effekte der regulatorischen T-Zellen scheinen durch die Ectonukleotidase CD39 vermittelt zu sein [54].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine kontrollierte Entzündungsreaktion nach Infarkt notwendig ist, um nekrotisches Material abzubauen, da sonst in großem Maße Granulationsgewebe entstehen würde, welches die Narbe destabilisiert. Dadurch kann es zu einer Ruptur des Ventrikels führen kommen. Auf der anderen Seite ist eine überschießende Entzündung ebenfalls schädlich, da sie die Narbe ausdünnst und zu einer schlechteren Wundheilung führt [55].

1.2.2 Proliferationsphase

Auf die Entzündungsphase folgt die proliferative Phase. Sie ist charakterisiert durch die Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen, die Aktivierung von Fibroblasten, Kollagenbildung sowie Angiogenese. In dieser Phase dominieren Ly-6C^{low}-Monozyten, M2 Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten [21].

Eine wichtige Rolle spielen hier die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β . Sie werden von Tregs und Makrophagen sezerniert und hemmen die Entzündungsreaktion u.a. durch Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine [12, 55]. TGF- β ist von großer Bedeutung für die Ausbildung einer festen Narbe: es fördert die Bildung von Kollagenen, Fibronectin, Tenascin-C und Proteoglykanen und hemmt die Degradation der extrazellulären Matrix durch vermehrte Synthese von Proteinase-Inhibitoren, z.B. TIMP-1 [56, 57]. Außerdem beeinflusst TGF- β maßgeblich die Entwicklung von Myofibroblasten [21]. Diese Zellen verfügen über einen kontraktilen

Apparat und sind charakterisiert durch die Expression von *α -Smooth Muscle Actin* (SMA), sodass sie die Funktion glatter Muskelzellen übernehmen [58, 59]. Sie sind hauptsächlich in der Randzone des Infarktes lokalisiert [60].

Ein weiterer wichtiger Prozess in der Heilungsphase nach Myokardinfarkt ist die Angiogenese, die Ausbildung neuer Gefäße. Innerhalb kurzer Zeit nach Ischämie kommt es in Monozyten zur Hochregulation von HIF-1 α , einem Transkriptionsfaktor, der sehr sensibel auf Hypoxie reagiert und die Expression des Wachstumsfaktors VEGF induziert [35, 61]. Auch der *Fibroblast Growth Factor* (FGF), der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) und Angiopoetine fördern die Bildung von neuen Gefäßen im Infarktgebiet [62], um die metabolisch hoch aktiven Zellen im Bereich der Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können.

1.2.3 Reifungsphase

Im letzten Stadium der Wundheilung, der sogenannten Reifungsphase, kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl, da besonders die Myofibroblasten in Apoptose gehen [63]. Um die Infarktnarbe zu stabilisieren und eine Ruptur zu vermeiden, kommt es zu einer verstärkten Quervernetzung des Kollagens, welche durch die Lysyloxidase katalysiert wird [64]. Es muss jedoch beachtet werden, dass eine solche Fibrosierung mit einer höheren Steifigkeit des Herzens einhergeht, was auf Dauer zu einer eingeschränkten Pumpfunktion und Herzinsuffizienz führen kann [65].

1.3 Zytokine

Nach einem Myokardinfarkt kommt es neben der Aktivierung von Immunzellen auch zur Ausschüttung von Zytokinen. Hierbei handelt es sich um Proteine, die über Rezeptoren verschiedene Effekte in ihren Zielzellen auslösen können und von verschiedenen Immunzellen sezerniert werden [12, 41]. Da diese Arbeit sich auf IL-6 und IL-1 β fokussiert, sollen diese nachfolgend näher besprochen werden.

1.3.1 Rolle von IL-1

Zur Familie von Interleukin 1 gehören IL-1 α , IL-1 β sowie der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA) [66]. Wie bereits oben beschrieben, kommt es nach einer Ischämie zur Freisetzung sogenannter *DAMPs*, zu denen auch IL-1 α gehört. Dieses bindet an seinen zugehörigen *Pattern recognition receptor* (PRR), den IL-1 Rezeptor. MAP-Kinasen-vermittelt kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, was in Folge zur Expression von u.a. IL-1 β und IL-6 führt [67]. IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen sowie von Fibroblasten und epithelialen Zellen sezerniert. Die Produktion erfolgt neben der Aktivierung von NF- κ B auch durch die Bildung des Inflammasoms [68].

Nach einem Herzinfarkt steigt die IL-1 β mRNA Expression bereits innerhalb der ersten halben Stunde signifikant an [69]. Es fördert die Rekrutierung von Leukozyten in das Infarktgebiet und induziert die Expression anderer pro-inflammatorischer Zytokine. So führt eine Stimulation von vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit IL-1 zu einer vermehrten IL-6 Bildung [70, 71]. Des Weiteren schwächt IL-1 β die TGF- β -vermittelte kontraktile Aktivität von Fibroblasten ab, hemmt die α -SMA Expression und fördert die Produktion von MMPs [72, 73]. Neben der immunmodulatorischen Wirkung nimmt IL-1 β auch Einfluss auf die elektromechanische Kopplung, indem es z.B. die Expression des Ryanodinrezeptors (RYR) und der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA) negativ beeinflusst [74].

Die Nutzung des rekombinanten IL-1 β -Rezeptorantagonisten Anakinra führte bei STEMI-Patienten zu einer geringeren Dilatation des linken Ventrikels und einer besseren Herzfunktion [75]. Im Gegensatz dazu führte die Blockade von IL-1 β im murinen Infarktmodell zu einer verminderten Kollagenablagerung und einer damit einhergehenden erhöhten Rate an Ventrikelrupturen, sodass IL-1 β sowohl positiv als auch negativ Einfluss auf die Wundheilung nimmt [76]. Wegweisend in diesem Zusammenhang war die CANTOS-Studie (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*). Diese zeigte, dass die Gabe von Canakinumab, einem monoklonalen Antikörper gegen IL-1 β , bei Patienten, welche bereits einen Myokardinfarkt erlitten haben, die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Myokardinfarktes signifikant senkt [77].

1.3.2 Zentrale Rolle von IL-6 im Myokardinfarkt

Bei Interleukin-6 handelt es sich um ein Zytokin, welches bei nahezu allen inflammatorischen Geschehen im Organismus erhöht ist. IL-6 wird bereits als diagnostischer Marker bei Sepsis verwendet und sein Rezeptor ist Zielstruktur einer Antikörpertherapie bei Autoimmunerkrankungen (z.B. juvenile idiopathische Arthritis) [78, 79]. Des Weiteren scheint IL-6 als Teil eines „Zytokinsturms“ eine große Bedeutung bei schweren Verläufen der COVID-19 Erkrankung zu haben, sodass auch in diesem Kontext der Einsatz einer Antikörpertherapie diskutiert wird und in ersten Fallberichten zu positiven Resultaten führte [80, 81].

Interleukin-6 gehört einer größeren Gruppe von Zytokinen, die auch IL-11, den *leucemia inhibitory factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), *ciliary inhibitory factor* (CNTF), Cardiotropin-1 (CT-1), *cardiotrophin-like related cytokine*, stimulating neurotrophin-1/B-cell stimulating factor 3 (NNT-1), Neuropoetin (NPN), IL-27 und IL-31 umfasst. Neben einem ähnlichen strukturellen Aufbau nutzen alle Zytokine dieser Gruppe einen ähnlichen Signalweg, da sie neben einer spezifischen α -Untereinheit das Glycoprotein gp130 als Rezeptor nutzen [82].

Nach Bindung von IL-6 an seine α -Untereinheit, den sogenannten IL-6-Rezeptor, kommt es zu einer Assoziation dieses Komplexes mit zwei Molekülen gp130. Intrazellulär erfolgt die Signalweiterleitung mittels JAK/STAT, ERK sowie PI3K [83]. Die normalerweise membranständige α -Untereinheit kann durch die Protease ADAM 17 gespalten werden, sodass sie in den Extrazellularraum freigesetzt wird und als löslicher IL-6 Rezeptor vorliegt [84]. In Abhängigkeit davon, ob IL-6 an die membranständige oder lösliche Form des IL-6 Rezeptors bindet, unterscheidet man zwischen dem „*classic signaling*“ und dem „*trans signaling*“ [85]. Diese Unterscheidung ist von großer Bedeutung, da gezeigt werden konnte, dass die pro- inflammatorischen Effekte von IL-6 primär über das „*trans-signaling*“ vermittelt werden [86].

IL-6 beeinflusst außerdem die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen: in dem es das Th1/Th2-Gleichgewicht in Richtung von Th1 verschiebt, fördert es die Entwicklung von Th17-Zellen auf Kosten von Tregs, sodass die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen gehemmt wird [87-89]. Die Stimulation von Hepatozyten durch IL-6 führt zu der Synthese der sogenannten „Akute-Phase-Proteine“ zu denen u.a. das CRP

(C-reaktives Protein), Ferritin, Serumamyloid A, Fibrinogen, α_1 -Antitrypsin und Haptoglobin gehören. Gleichzeitig wird die Synthese von Fibronektin, Transferrin und Albumin reduziert [90]. Außerdem geht die „Akute Phase“ mit einer erhöhten Blutviskosität und einer erhöhten Thrombozytenzahl und -aktivität einher. Die Plasmakonzentration von IL-6 korreliert mit endothelialer Dysfunktion, Steifheit der Arterien und dem Ausmaß subklinischer Atherosklerose [91]. IL-6 wird von den Schaumzellen und glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques exprimiert und leistet einen Beitrag zu der Entstehung und Destabilisierung solcher Plaques [92]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die von IL-6 hervorgerufene erhöhte Thrombogenität und Destabilisierung atherosklerotischer Plaques das Auftreten von ischämischen Ereignissen begünstigt wird.

Im Rahmen eines „Akuten Koronarsyndroms“ erreicht IL-6 nach ca. 5h seine maximale Plasmakonzentration [73]. Diese Erhöhung der IL-6 Plasmakonzentration bleibt bis zu 12 Wochen bestehen [93]. Verschiedene Studien zeigten, dass eine Erhöhung von IL-6 in der Akutphase kardioprotektiv wirkt, in der chronischen Phase jedoch eine Hypertrophie und schlechtere Kontraktilität verursachen kann, sodass eine hohe IL-6 Konzentration mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert ist [94-96].

Wie oben bereits erwähnt, induziert IL-1 die Bildung von IL-6, welches wiederum die Produktion von CRP stimuliert, dessen Erhöhung im Rahmen eines ischämischen Ereignisses mit einer höheren Mortalität assoziiert ist [97]. Studien, welche das Prinzip der Mendelschen Randomisierung ausnutzten, zeigten, dass ein genetischer Polymorphismus im IL-6-Signalweg zu einer lebenslang niedrigeren CRP-Plasmakonzentration und einem niedrigeren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse führt [98, 99]. Dies legt die Vermutung nahe, dass IL-6 über das CRP Einfluss auf die Entstehung von Ischämien nimmt. Diese Vermutung wurde durch Analysen im Rahmen der CANTOS-Studie bestätigt, da hier eine Modulation des IL-6-Signalwegs durch die Hemmung von IL-1 β durch Canakinumab zu einer geringeren Rate an kardiovaskulären Ereignissen und einer niedrigeren Mortalität führte [100].

Da eine Hemmung des IL-6-Signalweges eine therapeutisch sinnvolle Option nach Myokardinfarkten darstellt, wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien durchgeführt, die den Effekt eines IL-6 Rezeptor-Antikörpers untersuchten. So führte eine intraperitoneale Gabe des Antikörpers MR 16-1 in einem murinen Infarktmodell zu einer supprimierten Inflammation sowie einer verminderten Dilatation und

konsekutiv verbesserten Funktion des linken Ventrikels. Auch die Überlebensrate war erhöht [101]. Die einmalige Gabe von Tocilizumab (monoklonaler, antihumaner IL-6 Rezeptor-Antikörper) führte bei NSTEMI-Patienten nach PCI (perkutane koronarer Intervention) zu einer signifikanten Reduktion der AUC (*area under the curve*) des CRPs und des Troponin T, sodass durch Tocilizumab die Entzündung und möglicherweise der myokardiale Schaden durch die *PCI* reduziert wurde [102]. Eine weitere Studie untersuchte, ob die einmalige Gabe von Tocilizumab einen Einfluss auf die Komplikationsrate 30 Tage nach STEMI/NSTEMI hat. Zu den untersuchten Komplikationen zählten ein erneuter Infarkt, neu-aufgetretene Arrhythmien, Klappen- bzw. Septumrupturen, Dissektionen, Tamponaden, das Auftreten einer Perikarditis und die Mortalitätsrate. Es zeigte sich kein jedoch signifikanter Unterschied zwischen der Tocilizumab- und Placebo-Gruppe [103]. Derzeit wird im Rahmen der „ASSAIL-MI“-Studie (*ASSessing the Effect of Anti-IL-6 Treatment in Myocardial Infarction*) untersucht, ob die einmalige Gabe von Tocilizumab den Myokardschaden bei Patienten mit akutem ST-Streckenhebungsinfarkt reduziert [104].

Aufgrund der großen Bedeutung von IL-6 bei entzündlichen Prozessen ist ein Verständnis der Regulation der Expression auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene wichtig. NF- κ B und das *CCAT enhancer binding protein β* (C/EBP β) regulieren die Transkription von IL-6 [105, 106]. Die Regulation auf post-transkriptioneller Ebene erfolgt durch sogenannte RNA-Bindeproteine, welche die mRNA durch Bindung an die AU-reichen Elemente (ARE) in der 3'-untranslatierten Region (UTR) kontrollieren [107]. Arid5a (*AT-rich interactive domain-containing protein 5A*) fördert die Produktion von IL-6, da es die mRNA stabilisiert. Die Bildung von Arid5a kann sowohl durch LPS, als auch durch IL-1 β und IL-6 in Makrophagen induziert werden, sodass ein positiver Feedback-Mechanismus in Bezug auf die IL-6 Sekretion besteht [108]. Das Gegenstück zu Arid5a bildet die Regnase-1 (Gen: ZC3H12A). Dieses Enzym gehört zu der Familie der Zinkfingerproteine und kann durch MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) induziert werden, sodass es auch als MCP-1 (*MCP induced protein*) bezeichnet wird. Es kann in Kardiomyozyten Apoptose auslösen und beeinflusst negativ die Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und MCP-1 [109, 110]. Eine Aktivierung von TLRs (*Toll-like-receptor*) und des IL-1R (Interleukin-1 Rezeptor) führt zu einer Phosphorylierung und Degradation der Regnase-1 und somit zu einer vermehrten Ausschüttung pro-

inflammatorischer Zytokine [111]. Die Wirkung der Regnase-1 wird durch Bindung an die 3'UTR (untranslatierte Region) der mRNA vermittelt. Die Bindungsstellen von Arid5a und der Regnase-1 an der IL-6 mRNA überlappen sich teilweise. Dies verdeutlicht die Bedeutung eines Gleichgewichts dieser Faktoren für die Regulation der IL-6 Bildung [108]. Im Gegensatz dazu führt eine Expression des Ahr (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) zu einer Reduktion der LPS-abhängigen IL-6 Bildung in Makrophagen. Eine Möglichkeit ist die Bildung eines Komplexes des Ahr mit den Transkriptionsfaktoren Stat1 und NF- κ B. Des Weiteren beeinflusst der Ahr die Histamin-abhängige IL-6 Produktion. Er bildet einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Sp1, sodass der Promotor des Gens der Histamindecarboxylase weniger phosphoryliert und transkribiert wird. Dies führt zu einer geringeren Menge an verfügbarem Histamin, einer abnehmenden Stimulation des H1-Rezeptors und einer geringeren IL-6 Produktion [112]. Abb. 2 gibt einen schematischen Überblick über die Regulation der LPS-induzierten IL-6 Expression.

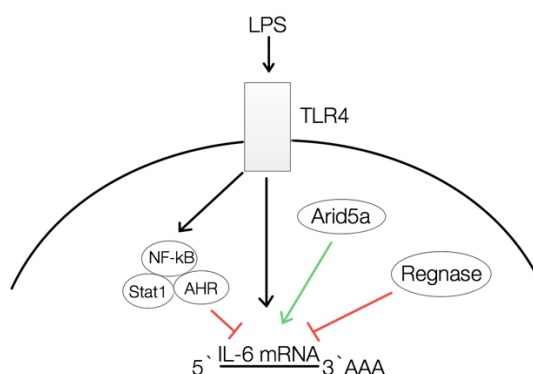


Abb. 2: Regulation der IL-6mRNA. [108, 112, 113]

1.4 Purinerges System und Metabolismus

Nukleotide sind Grundbausteine der Nukleinsäuren, spielen aber auch eine wichtige Rolle beim Zellstoffwechsel [114]. Nukleotide bestehen aus einer stickstoffhaltigen Base, einem Purin- oder Pyrimidinderivat, einer Pentose sowie einem oder mehreren Phosphatresten. Intrazellulär bilden sie Bausteine der Nukleinsäuren und spielen eine Rolle in verschiedenen Stoffwechselprozessen. Extrazellulär wirken sie über spezifische Rezeptoren (siehe unten) als Signalmoleküle [115-117]. Nachfolgend soll

die Bedeutung der Purine bei Entzündungsprozessen und deren Metabolismus näher erläutert werden.

1.4.1 ATP- Gefahrensignal der Zelle

Intrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) ist ein wichtiger Energielieferant für verschiedene Zellfunktionen [117]. Extrazelluläres ATP stellt dagegen ein wichtiges körpereigenes Gefahrensignal dar [118]. Nach einer Ischämie setzen Kardiomyozyten, Fibroblasten sowie aktivierte Immunzellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen ATP frei, sodass die extrazelluläre Konzentration dieses Nukleotides stark ansteigt [119]. Insbesondere setzen nekrotische Zellen massiv ATP frei [120]. Aber auch aus intakten Zellen wird ATP über Connexin- und Pannexin-Kanäle aktiv freigesetzt [121, 122]. Im Extrazellularraum vermittelt ATP seine pro-inflammatorischen Wirkungen über die sogenannten P2-Rezeptoren welche in zwei Gruppen unterteilt werden: die P2X- und die P2Y-Rezeptoren [123].

P2X-Rezeptoren sind Liganden-aktivierte-Ionenkanäle. Bindet ATP an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass Na⁺- und Ca²⁺-Ionen ein- und K⁺-Ionen ausströmen können. Im Menschen sind sieben Subtypen dieses Rezeptors bekannt [124]. Bei den P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Eine Stimulation dieses Rezeptors führt zu einer Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in seine α -Untereinheit sowie den $\beta\gamma$ -Komplex, wobei die α -Untereinheit in den acht identifizierten Rezeptoren unterschiedlich aufgebaut ist [125]. Eine Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors führt beispielsweise zu einer verstärkten Rekrutierung von Phagozyten in den Bereich einer Entzündung, damit geschädigte und apoptotische Zellen schneller beseitigt werden können [126].

1.4.2 Extrazelluläre Degradation der Nukleotide durch Ektonukleotidasen

Die extrazelluläre Konzentration von ATP - und damit die Stärke der Aktivierung von P2-Rezeptoren ist abhängig von der Verfügbarkeit von ATP. Diese wird entscheidend durch die Aktivität von Ektonukleotidasen reguliert, die extrazelluläre Nukleotide kaskadenförmig zu Adenosin abbauen [127, 128].

Eine wichtige Rolle in dieser Gruppe spielen die Nukleosid-Triphosphat-Diphosphorylasen (NTPDasen), welche Nukleosidtri- und Nukleosiddiphosphate zu Nukleosidmonophosphaten abbauen. Es sind acht verschieden NTPDasen bekannt, wobei die NTPDasen 1-3 und 8 auf der Zelloberfläche lokalisiert sind [128, 129]. Eine Schlüsselrolle in der Ektoenzym-Kaskade nimmt die 5'-Nucleotidase (CD73) ein, die den Abbau von AMP zu extrazellulärem Adenosin katalysiert. Über Glykosylphosphatidylinositol ist die CD73 in der Zellmembran verankert [130, 131].

Die Akkumulation von Adenosin im Extrazellularraum hat verschiedene biologische Wirkungen und führt u.a. zur Entwicklung eines anti-inflammatorischen Milieus [132]. Adenosin ist ein wichtiger Regulator der Immunreaktionen und moduliert z.B. die Adhäsion und Migration von Immunzellen sowie die Aktivierung der T-Zellen. Des Weiteren beeinflusst Adenosin die Bildung von Thromben [133, 134] und ist seit langem als Vasodilatator bekannt.

In einem murinen Infarktmodell konnte gezeigt werden, dass die CD73-Expression auf einwandernden Granulozyten und T-Zellen bereits nach 3 Tagen deutlich hochreguliert ist. Fehlt dieses Enzym auf den T-Zellen, so werden vermehrt pro-inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine wie bspw. IL-17 gebildet. Es kommt zu einer verstärkten Fibrose des Myokards und daraus resultierend zu einer deutlich eingeschränkten Herzfunktion [135, 136].

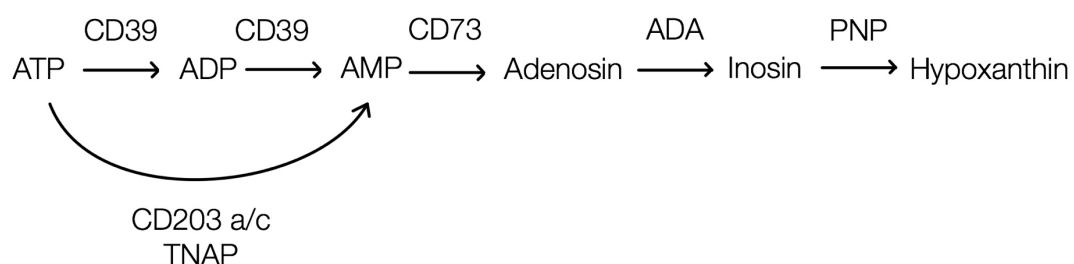


Abb. 3: Extrazellulärer Purinmetabolismus. CD39: Ektonukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1, TNAP: *Tissue non-specific alkaline phosphatase*, CD 203: Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase, CD38: zyklische ADP-Ribose-Hydrolase, CD157: *ADP-ribosyl cyclase 2*, CD73: Ekto-5'-Nuklotidase, ADA: Adenosin- Desaminase, PNP: Purin-Nukleosid-Phosphorylase [137]

1.4.3 Adenosin – Bildung und Signaltransduktion

Normalerweise beträgt die extrazelluläre Adenosinkonzentration 30-200 nM. Sie wird durch verschiedene Mechanismen reguliert: ein wichtiger Regulationsfaktor sind die Nukleosidtransporter, welche Adenosin über die Zellmembran transportieren [138]. Man unterscheidet zwei Gruppen solcher Transporter: äquibrative (ENTs) und konzentrative (CNTs) Nukleosidtransporter. Die äquibrativen Transporter transportieren Adenosin bidirektional entlang eines Konzentrationsgradienten über die Zellmembran, während die CNTs Nukleoside entgegen ihres Gradienten in die Zelle transportieren. Die Energie hierfür wird durch den Co-Transport von Na^+ -Ionen bereitgestellt.

Intrazellulär wird Adenosin entweder durch die Adenosin-Kinase zu AMP phosphoryliert oder durch die Adenosin-Desaminase weiter zu Inosin abgebaut [139]. Durch diese Prozesse werden die intra- und extrazellulären Adenosinkonzentrationen unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht gehalten. Eine Hypoxie oder inflammatorische Prozesse führen zu einem rapiden Anstieg der extrazellulären Adenosin Konzentration. Dies erfolgt über die beiden beschriebenen Mechanismen: 1) durch die extrazelluläre Degradation von ATP und ADP (siehe Abschnitt 1.4.2) und 2) durch die intrazelluläre Bildung von Adenosin und Freisetzung über Nukleosid-Transporter [140].

Seine Wirkungen auf das Herz und das Immunsystem vermittelt extrazelluläres Adenosin über vier Adenosin Rezeptoren: A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 [141]. Sie werden auch P1 Rezeptoren genannt und gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [142]. Die A_1 - und A_3 -Rezeptoren sind mit $G_{i/o}$ -Proteinen assoziiert. Eine Stimulation führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und einer konsekutiv verminderten Bildung von zyklischem AMP (cAMP). Der A_{2A} -Rezeptor aktiviert das G_s -Protein, welches die Adenylatcyclase stimuliert und so die Produktion von cAMP fördert [142]. Bindet Adenosin an den niederaffinen A_{2B} -Rezeptor, so läuft die Signaltransduktion sowohl über G_s als auch über G_q wobei dies zu einem Anstieg von Diacylglycerol- (DAG) und Inositoltriphosphatkonzentration (IP_3) führt. DAG stimuliert die Proteinkinase C, während IP_3 einen Ca^{2+} -Efflux aus intrazellulären Speichern fördert, was ebenfalls als *Second Messenger* (=Signalmolekül) aktiv ist (Abb. 4) [143].

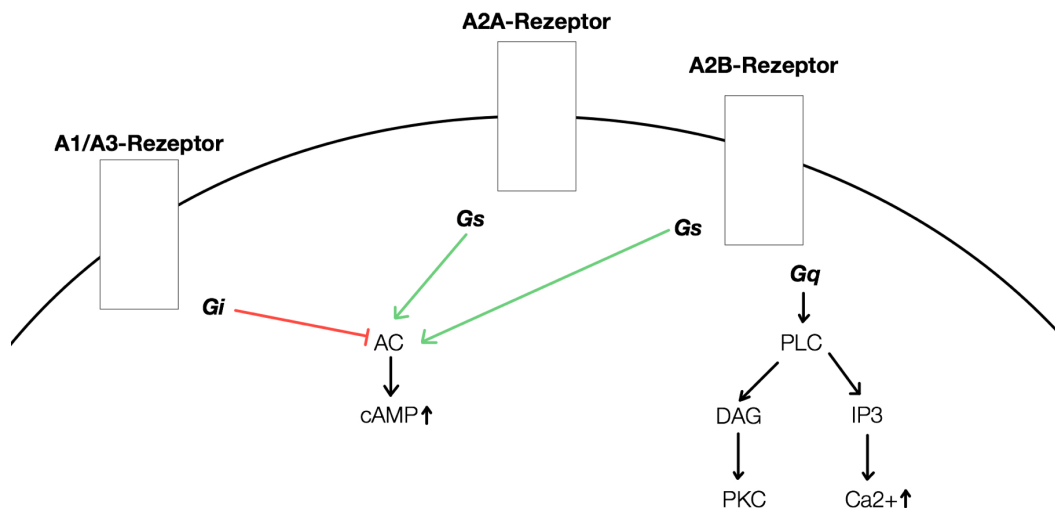


Abb. 4: Signaltransduktion der Adenosin-Rezeptoren. AC: Adenylatcyclase, cAMP: cycklisches AMP, PLC: Phospholipase C, DAG: Diacylglycerol, IP3: Inositoltriphosphat, PKC: Proteinkinase [142, 143]

Der A₁-Rezeptor:

Eine Aktivierung des A₁-Rezeptors wirkt im Herzen v.a. auf das Erregungsleitungssystem und vermittelt eine negative Chrono-, Dromo- und Inotropie [144]. Aus dieser Wirkung erklärt sich auch der klinische Einsatz des Adenosins als Antiarrhythmikum: es ist Mittel der Wahl bei supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, im Besonderen bei AV-Knoten-Reentry- und AV-Reentry-Tachykardien [145]. Des Weiteren wirkt Adenosin über den A₁-Rezeptor auf das Immunsystem: es stimuliert die Chemotaxis von Granulozyten, die Bildung freier Sauerstoffradikale und hebt in aktivierten Monozyten die hemmende Wirkung des A_{2A}-Rezeptors auf die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine auf [146, 147].

Der A_{2A}-Rezeptor:

Eine Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors führt am Herzen zu einer Vasodilatation der Koronarien [148]. Neben seiner Wirkung auf das kardiovaskuläre System vermittelt dieser Rezeptor starke immunsuppressive und somit entzündungshemmende Effekte. So führt eine Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors auf humanen Monozyten/Makrophagen zu einer vermehrten Bildung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 [149]. Mehrere

Studien zeigten, dass eine Behandlung mit einem A_{2A}-Agonisten zu einer Reduktion der Infarktgröße führt [150, 151].

Der A_{2B}- Rezeptor:

Physiologische, extrazelluläre Adenosinkonzentrationen liegen im nanomolaren Bereich. In diesem Zustand werden der A₁-, A_{2A}- und der A₃-Rezeptor aktiviert. Für die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors sind höhere Konzentrationen notwendig, wie sie etwa im Rahmen von Entzündungen, Ischämie/Reperfusion oder Hypoxie entstehen, sodass dieser Rezeptor vermutlich erst bei pathologischen Ereignissen von Bedeutung ist [152, 153]. Die Stimulation des A_{2B}-Rezeptors mittels spezifischer Agonisten führte in mehreren Studien zu einer deutlichen Verminderung der Infarktgröße [154, 155]. Adenosin erhöht über Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors die ischämische Toleranz des Herzens, in dem es das circadiane Protein Per2 stabilisiert. Dieses steigert die glykolytische Kapazität des Myokards [156]. Des Weiteren dämpft der A_{2B}-Rezeptor die Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt, in dem er die Differenzierung von anti-inflammatorischen Makrophagen fördert [157, 158].

Betrachtet man jedoch Langzeit-Effekte der A_{2B}-Signaltransduktion, so ist die Studienlage nicht einheitlich. Während zwei Studien eine Verbesserung der hämodynamischen Funktion unter Behandlung mit einem A_{2B}-Rezeptorantagonisten zeigten, führte bei Wakeno et al. eine Therapie mit einem Rezeptoragonisten zu einer Verbesserung der Herzfunktion [159-161]. Auch der Zeitpunkt der Therapie scheint von großer Bedeutung zu sein [159].

Der A₃-Rezeptor:

Im Gegensatz zu den anderen Adenosin-Rezeptoren weist der A₃-Rezeptor im Myokardgewebe nur eine geringe Expression auf. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Behandlung mit A₃-Rezeptoragonisten kardioprotektive Effekte vermittelt [162, 163]. Eine Stimulation des A₃-Rezeptors auf Mastzellen führt zu deren Aktivierung und Ausschüttung von Histamin [164]. Auf der anderen Seite wird durch den A₃-Rezeptor die LPS-abhängige Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins

TNF- α verhindert, sodass der A₃-Rezeptor sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen vermittelt [165].

1.5 Ziele der Arbeit

IL-6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches im infarzierten Herzen sezerniert wird und dort unterschiedliche Effekte vermittelt: in der akuten Phase wirkt es kardioprotektiv, eine chronische Erhöhung von IL-6 ist jedoch mit einem schlechteren *Outcome* (Mortalität, Herzfunktion) assoziiert. Darüberhinaus weiß man, dass die auf T-Zellen vorhandene Ektonukleotidase CD73 die Bildung des anti-inflammatorischen Adenosins katalysiert, welches eine bedeutende Rolle im Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt spielt. Auch gibt es erste Hinweise, dass es eine Adenosin-A_{2B}R - IL6-Achse gibt. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Bedeutung des durch CD73 auf T-Zellen gebildeten Adenosins für die globale Zytokin- Sekretion des infarzierten Herzens

- Entwicklung eines Langendorff-basierten Modells zur Messung von Zytokinen in koronaren Effluaten in der Maus.
- Welchen Einfluss hat ein T-zellspezifischer Verlust der CD73 auf die Zytokin Freisetzung am normoxischen und ischämischen Herzen?
- Ist die Ischämie-bedingte Freisetzung von Zytokinen aus dem Herzen auch systemisch nachweisbar?
- Welchen Einfluss hat ein T-zellspezifischer Verlust von CD73 auf die Freisetzung von Purinverbindungen des isoliert schlagenden Herzens?

2. Einfluss des A_{2B}R auf die IL-6 und IL-1 β Produktion muriner Makrophagen

- Fördert eine Stimulation des A_{2B}-Rezeptors die IL-6 Produktion?
- Über welchen Signalweg wird dieser Effekt vermittelt?
- Beeinflusst der A_{2B}R post-transkriptionelle Regulationsfaktoren von IL6?

3. Die A_{2B}R- IL-6- Achse an humanen Immunzellen?

- Welche *PBMCs* exprimieren den A_{2B}R?

- Steigert eine Stimulation des $A_{2B}R$ die Bildung von IL-1 β und IL-6 und über welche Signalkaskade wird dies vermittelt?
- Beeinflusst der $A_{2B}R$ posttranskriptionelle Regulationsfaktoren und darüber die IL-6 Bildung?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Geräte und Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
Analysenwaage	<i>Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214</i>
Autoklav	<i>F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland), 5169</i>
Bio-Plex 200 Multiplex-System	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Bio-Plex 200</i>
Bio-Plex Waschstation	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Proll Waschstation</i>
Eppendorf Mastercycler 5345 EP	<i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland)</i>
Inkubator	<i>Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Heracell 150 i</i>
Langendorffapparatur	<i>Werkstatt der Physiologie, Universität Düsseldorf</i>
Magnetrührer	<i>MP Biomedicals (Santa Ana, USA), FastPrep-24</i>
Nano-Drop	<i>Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), NanoDrop 2000</i>
Pinzetten	<i>Roth (Karlsruhe, Deutschland)</i>
Pipetten	<i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Research Plattenschüttler IKA</i>
Plattenschüttler	<i>IKA Werke (Staufen, Deutschland), MTS 2/4</i>
Real-time PCR Gerät	<i>Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland), StepOnePlus™ und ViiA 7</i>
Stauschlauch	<i>Prämeta (Troisdorf, Deutschland)</i>

Sterilbank Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2	<i>Labogene (Lyngø, Dänemark)</i>
Ultra-performance liquid chromatograph, ACQUITY UPLC CLASS H	<i>Waters GmbH (Eschborn, Deutschland)</i>
Zellsortierer	<i>Beckman Coulter (Brea, USA), MoFlo XDP</i>
Zentrifugen	<i>Beckman Coulter (Brea, USA), Allegra X-30R</i> <i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland), 5415R</i> <i>Thermo Scientific (Rockford, USA), Heraeus Megafuge 16R (Hanau, Deutschland)</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-Well Platten, U- und Flachboden	<i>greiner bio-one (Frickenhäusen, Deutschland), Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)</i>
Amicon® Ultra 3K Centrifugal Filter Devices	<i>Merck Millipore (Burlington, USA)</i>
Butterfly	<i>Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)</i>
Butterflyaufsatz	<i>Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)</i>
FACS- Röhrchen	<i>Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)</i>
Heparin-Röhrchen	<i>Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)</i>
Isofluran	<i>Piramal (Mumbai, Indien)</i>

Klebefolie (PCR)	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), microseal "B"</i>
MS Columns	<i>Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)</i>
Reaktionsgefäße (2 ml, 1.5 ml, 0.5 ml, 0.2 ml)	<i>Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)</i>
Spritze	<i>Becton Dickinson (Heidelberg, Germany), BD Micro Fine 0,5 ml</i>
Sterican Einmalkanülen, 21G	<i>B.Braun (Melsungen, Deutschland)</i>
UPLC Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss 300µl	<i>Waters GmbH (Eschborn, Deutschland)</i>
Zentrifugen-Röhrchen (50ml; 15ml)	<i>Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)</i>

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalie	Hersteller
Calciumdichlorid	<i>Merck (Darmstadt, Deutschland)</i>
Glucose	<i>Merck (Darmstadt, Deutschland)</i>
Histopaque 1077 und 1119	<i>Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)</i>
Kaliumchlorid	<i>Roth (Karlsruhe, Deutschland)</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt, Deutschland)</i>
Magnesiumsulfatheptahydrat	<i>Merck (Darmstadt, Deutschland)</i>
Natriumchlorid	<i>Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)</i>
Natriumhydrogencarbonat	<i>Roth (Karlsruhe, Deutschland)</i>
Sodiumpyruvat	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Roth (Karlsruhe, Deutschland)</i>
EDTA (0,5M; pH 8,0)	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
Dimethylsulfoxide	<i>Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)</i>
Trypan Blue Stain (0,4%)	<i>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</i>
Thioglycollate medium	<i>Fluka analytical (Seelze, Deutschland)</i>

cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free, Roche (Basel, Schweiz)

EASYPack, Protease Inhibitor Cocktail

Tablets

FcR Blocking Reagent human

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

BAY60-6583

Tocris (Bristol, Großbritannien)

FR-900359(UBO-QIC)

*Prof. Evi Kostenis,
Institut für Pharmazeutische Biologie,
Universität Bonn*

2.4 Antikörper

Tabelle 4: verwendete Antikörper und Bezugsquellen

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Ursprung	Firma
CD45	PerCP/Cy5.5	QA17A19	mouse	BioLegend
CD3	APC-Fire 750	SK7	mouse	BioLegend
CD19	FITC	HIB19	mouse	BioLegend
CD11b	APC	ICRF44	mouse	BioLegend
CD11b	PE/Cy7	ICRF44	mouse	BDBiosciences
CD14	PE/Cy7	63D3	mouse	BioLegend
CD15	PE/Dazzle	W6D3	mouse	BioLegend
CD19	PerCP/Cy5.5	SJ25C1	mouse	BioLegend

2.5 TaqMan-Assays

Tabelle 5: verwendete Taq-Man-Assays

Assay-ID	Genprodukt	Gensymbol
Hs00174131_m1	Interleukin-6	Il-6
Hs00386497_m1	Adenosinrezeptor 2B	A2BR
Hs00413100_g1	AT-rich interactive domain-containing protein 5A	ARID5A
Hs00907320_m1	Aryl Hydrocarbon Rezeptor	AHR
Hs00962356_m1	Endoribonuclease Zc3h12a	ZC3H12A

Hs0113381_g1	Histidin-Decarboxylase	HDC
Hs01555410_m1	Interleukin-1 β	IL-1 β
Hs04194366_g1	<i>ribosomal protein L13A</i>	RPL13A
Mm00434228_m1	Interleukin-1 β	IL-1 β
Mm00446190_m1	Interleukin-6	IL-6
Mm00456104_m1	Histidin-Decarboxylase	Hdc
Mm00462535_g1	Endoribonuclease Zc3h12a	Zc3h12a
Mm00524454_m1	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 5A</i>	Arid5A
Mm00478932_m1	Aryl Hydrocarbon Rezeptor	Ahr
Mm00850060_s1	<i>ribosomal protein S9</i>	RPS9

2.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 6: verwendete kommerzielle Kits und Bezugsquellen

Kit	Hersteller
Bio-Plex Pro™ Human Chemokine IL-6 Set	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine IL-6 Set	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Bio-Plex Pro™ Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Bio-Plex® Calibration Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Bio-Plex® Validation Kit 4.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	applied biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Macrophage Isolation Kit (Peritoneum), mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	applied biosystems by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.7 Puffer und Medien

Tabelle 7: verwendete Puffer und Medien

Puffer/Medien	Chemikalien
1x PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2.0 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.2
3% Brewer Thioglycollate Medium	30g Thioglycollat/l ddH ₂ O
FCS	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
IMDM (Iscove's modified Dulbecco's Medium)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Krebs-Henseleit-Puffer	NaCl 6,78g/l KCl 0,345g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,27g/l NaHCO ₃ 2,09g/l CaCl ₂ 0,37g/l KH ₂ PO ₄ 0,165g/l Glucose 1,495g/l Sodiumpyruvat 20ml Lösung/l
MACS-Puffer	0.5% BSA 5 mM EDTA in PBS, pH 7.4
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Puffer A UPLC (2l, pH 6)	200mM KH ₂ PO ₄ 200mM KCl
Puffer B UPLC (1l, pH 6)	200mM KH ₂ PO ₄ 200mM KCl 7,5% Acetonitril
VLE-DMEM (Very Low Endotoxin-DMEM)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)

2.8 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Programme Microsoft Excel 2010, Microsoft Word 2010 und Microsoft PowerPoint 2010 verwendet. Alle weiteren Programme werden im direkten Zusammenhang mit der verwendeten Methode (siehe Kapitel 3) erwähnt.

2.9 Ethikvotum

Alle Experimente mit humanem Blut wurden im Rahmen des Ethikvotums “2020-849-andere Forschung erstvotierend“ durchgeführt. Es wurden die Immunzellen von sechs Probanden (drei weibliche und drei männliche) im Alter von 19-34 Jahren untersucht (Mittelwert: 25,6 Jahre, Median: 24,5 Jahre). Die Probanden wurden vor Beginn umfassend aufgeklärt.

2.10 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Sie erhielten Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Alle Experimente wurden im Rahmen des Tierversuchsantrages (Aktenzeichen 81-02.04.2019.A064, Organentnahme: O19/99) an 8-12 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Für die Langendorff-Versuche wurden männliche Tiere verwendet, für die Isolation peritonealer Makrophagen weibliche Tiere. Es wurden zwei verschiedene Mutanten verwendet: T-zellspezifische CD73^{-/-}-Mäuse und A2BR^{-/-}-Tiere. Die C57Bl/6-wildtypischen Mäuse entstammten den jeweils gleichen Zuchtlinien.

2.11 Induktion der Myokardinfarkte (Ischämie-Reperfusion)

Die Myokardinfarkte wurden im Institut für Molekulare Kardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durch Herrn Dr. med. Zhaoping Ding wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert (2% Isofluran in

medizinischer Umgebungsluft) und anschließend intubiert. Während der Operation erfolgte die Narkose mittels 1,5%-Isofluran bei einer Atemfrequenz von ca. 200-250/min. Eine intraoperative Hypothermie wurde durch Fixation der Mäuse auf einer Wärmeplatte vermieden. Um die erfolgreiche Induktion eines ST-Hebungsinfarktes (STEMI) zu überprüfen, wurden Elektroden zur intraoperativen Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG) angebracht. Nach Durchführung einer lateralen Thorakotomie und Aufsuchung der LAD wurde diese mit einem 8-0 Polypropylenfaden umstochen und die LAD durch das Zuziehen eines Knotens um einen Kunststoffstift okkludiert. Nach 50-minütiger Ischämie wurden der Knoten gelöst (=Reperfusion). Abschließend erfolgte mittels Einzelknopfnähten der Verschluss des Operationsgebietes sowie eine Desinfektion der Wunde.

Bei sogenannte *Sham*-Operationen wurde die Operation wie oben genannt durchgeführt, es erfolgte jedoch keine Ligation der LAD, sodass kein Myokardinfarkt induziert wurde.

2.12 Blutentnahme und Gewinnung des Plasmas

Das durch retrobulbäre Punktion entnommene Heparin-Blut wurde 10 min bei 300 x g zentrifugiert, um den zellulären Anteil vom Blutplasma zu trennen. Das Plasma wurde anschließend bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.13 Gewinnung von koronaren Effluaten

Um die Freisetzung von Zytokinen *ex vivo* am infarzierten Herzen messen zu können, wurde eine retrograde Perfusion des isolierten Herzens (nach Langendorff) genutzt. Zunächst wurde den Mäusen i.p. Heparin appliziert, um der Entstehung von Thromben in den Koronargefäßen vorzubeugen. Anschließend wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet, Herz und Lunge wurden entnommen und in kaltes PBS überführt. Nach der Präparation des Herzens, wobei Lunge, Thymus sowie perikardiales Fett entfernt wurden, wurde dieses über die Aorta kanüliert. Mittels einer Apparatur wurde das isolierte Herz retrograd mit oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer für 2 min bei 1 m H₂O (entspricht 80 mmHg) und 37 °C perfundiert, um die Koronarien von Blut freizuspülen und eine Stabilisierung der Herzfrequenz zu ermöglichen. Danach wurde das Effluat für insgesamt 30 min aufgesammelt, wobei für jeweils 15 min ein 50 ml

Falcon verwendet wurde. Um den Abbau der Zytokine zu verhindern, wurde ein Proteinase-Inhibitor in der vom Hersteller angegebenen Konzentration hinzugegeben (cOmplete Protease-Inhibitor Tablets, Roche). Zusätzlich wurde das Effluat durch Eis gekühlt. Um später den Purinstoffwechsel mittels UPLC analysieren zu können, wurden alle drei Minuten gesondert ca. 500 µl Effluat in Eppendorf-*Tubes* gesammelt. Die Effluatproben für die Zytokinanalysen wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Am Ende des Versuches wurden die Herzgewichte mittels Feinwaage bestimmt.

2.14 Aufkonzentrierung der Effluat-Proben

Um Zytokine mittels Bio-Plex Technologie messen zu können, war es notwendig, die großvolumigen Effluat-Proben (ca. 50 ml) auf ein Volumen von ca. 200 µl aufzukonzentrieren. Hierfür wurden *Amicon® Ultra 3K Centrifugal Filter Devices* verwendet. Hierbei handelt es sich um Reaktionsgefäße mit einem integrierten Filter, welcher für Proteine mit einem Molekulargewicht von 3 kDa durchlässig ist. Da alle in dieser Arbeit analysierten Zytokine ein höheres Molekulargewicht aufweisen, wurden diese im Überstand zurückgehalten (siehe Anhang). Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.15 Zytokinmessung mittels Bio-Plex-System

Das Prinzip des Bio-Plex® Systems beruht auf einem Sandwich- ELISA. Von diesem unterscheidet es sich in dem Punkt, dass pro Probe mehrere Proteine gleichzeitig quantifiziert und detektiert werden können. Monoklonale Primärantikörper sind an sogenannte fluoreszierende *beads* gebunden, kleine magnetische Kügelchen, welche je nach Zytokin eine unterschiedliche Farbkodierung aufweisen. Binden nun an diese immobilisierten Antikörper Zytokine, können diese durch biotinylierte Sekundärantikörper über eine Streptavidin-Bindung Phycoerythrin markiert und durchflusszytometrisch (Bio-Plex® 200 Multiplex-System) detektiert werden. Anhand der Farbkodierung wird das Zytokin identifiziert und mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Assays verwendet: für die Plasma- und Effluatproben der infarzierten Mäuse (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2) wurde das Bio-

Plex™ Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay genutzt, welches L-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α identifiziert. In den Zellkulturüberständen der murinen Makrophagen und humanen Monozyten (siehe Abschnitte 3.4 und 3.6.1) wurde lediglich Interleukin-6 bestimmt.

Die Plasmaproben wurden vor der Messung in einem Verhältnis von 1:4 mit dem *Bio-Plex® Sample Diluent* verdünnt, die Zellkulturüberstände und Effluat wurden unverdünnt eingesetzt. Standardreihen und Verdünnungen der *beads*, Primär- und Sekundärantikörper wurden nach Protokoll des Herstellers verdünnt. Gemessen wurden die Proben mit dem Bio-Plex 200 Multiplex-System (high RPI target), die Analyse erfolgte mit Hilfe der Bio-Plex Manager Software anhand der Standardkurven.

2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Effluat-Proben erfolgte mit Hilfe eines BCA-Assays. Es wurde das *Standard Test Tube Protocol* des Pierce™ BCA Protein Assay Kits nach Anleitung durchgeführt. Die Standardreihe wurde modifiziert, indem die BSA-Konzentrationen mit dem Verdünnungsmittel 1:10 verdünnt wurden, sodass sich ein Detektionsbereich von 2,5-200 $\mu\text{g/ml}$ ergab.

Mithilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts (FLUOstar Optima, BMG labtech, Ortenberg, Deutschland) wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen und anhand des BSA-Standards die Proteinmenge bestimmt.

2.17 Zellbiologische Methoden

2.17.1 Isolation peritonealer Makrophagen

Zur Gewinnung einer hohen Zahl muriner Makrophagen wurde den Tieren (Wildtypen und A2BR^{-/-}) Thioglycolat-Medium intraperitoneal verabreicht. Dies führt zu einer verstärkten Migration von Makrophagen in das Peritoneum.

Die Isolation der Makrophagen erfolgte drei Tage nach Injektion. Nach Tötung des Tieres wurde das Abdomen mit 70% Ethanol gründlich desinfiziert. Es erfolgte eine mediane Inzision mit einer Schere und anschließend stumpfer Präparation, um Haut und Muskulatur vom Peritoneum abzulösen. Anschließend wurden 5 ml PBS mit einer

Spritze und 21 G Injektionskanüle in den Recessus splenorenalis injiziert, um eine Perforation intraabdomineller Organe zu vermeiden. Nachdem der Bauch des Tieres massiert wurde, um eine Verteilung des Puffers und eine Ablösung der Makrophagen zu gewährleisten, wurde das PBS mit der Spritze wieder aufgenommen und in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt.

2.17.2 Zellzahlbestimmung

Vor der magnetischen Zellsortierung (siehe Abschnitt 2.17.3) war es notwendig, die Gesamtzellzahl zu bestimmen. Diese erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Liegt das Deckglas korrekt auf, sind sogenannte Newtonsche Ringe sichtbar. Um die Kammer zu beladen, wurden 10 µl einer definierten Verdünnung von Zellsuspension und Trypanblau seitlich des Deckglases pipettiert. Durch Kapillarkräfte wurde diese Flüssigkeit in die Kammer gezogen. Anschließend wurden die Zellen in vier großen Quadraten gezählt und ein Mittelwert ermittelt. Dieser Mittelwert wurde zunächst mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Da ein Quadrat ein Volumen von 0,1 µl besitzt, ergab sich eine Multiplikation mit 10^4 , um die Zellzahl pro ml zu berechnen.

2.17.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *magnetic activated cell sorting* genutzt, um die peritonealen Makrophagen (siehe Abschnitt 2.17.1) aufzureinigen und anschließend Stimulationen und Genexpressionsanalysen durchführen zu können (siehe 4.4). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass bestimmte Zellpopulationen von einem Antikörper markiert werden, welcher an einen magnetischen *bead* gekoppelt ist. Anschließend werden mittels einer Säule mit ferromagnetischer Matrix die markierten von unmarkierten Zellen getrennt. In diesem Fall wurde das Verfahren der negativen Anreicherung gewählt, sodass die peritonealen Makrophagen als unmarkierte Zellen aufgefangen wurden.

Die Aufreinigung wurde gemäß Herstellerprotokollen für die *MS-Columns* (Miltenyi Biotech) durchgeführt.

Die Reinheit der erworbenen Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.17.4 Blutentnahme

Für die Gewinnung humaner Immunzellen wurden gesunden Spendern im Alter von 19 bis 34 Jahren ca. 30 ml venöses Blut abgenommen. Dieses wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen aufgefangen. Die Blutabnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen aus der *Vena mediana cubiti*.

2.17.5 Dichtegradientenzentrifugation

Um aus humanem Vollblut *PBMCs* zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dieser Schritt war notwendig, um im anschließenden *Cell Sort* eine höhere Reinheit der aufgetrennten Immunzellpopulationen (Monozyten, Lymphozyten) gewährleisten zu können. Hierfür wurde zunächst ca. 30 ml heparinisiertes Blut mit 30 ml PBS gemischt. Anschließend wurde der Gradient folgendermaßen pipettiert, von unten nach oben: 10 ml Histopaque 1119, darüber 10 ml Histopaque 1077 und schließlich 15 ml des Blut- PBS-Gemisches. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 1000 x g (niedrigste Beschleunigung, ohne Bremse, RT) wurde der *PBMC*-Ring mit einer Pasteurpipette abgenommen. Am Boden des Zentrifugationsröhrchens befanden sich die Erythrozyten, darüber das Histopaque 1119, ein Granulozytenring, Histopaque 1077, die *PBMCs* und Plasma. Der *PBMC*-Ring wurde in ein neues Röhrchen überführt, welches mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert wurde.

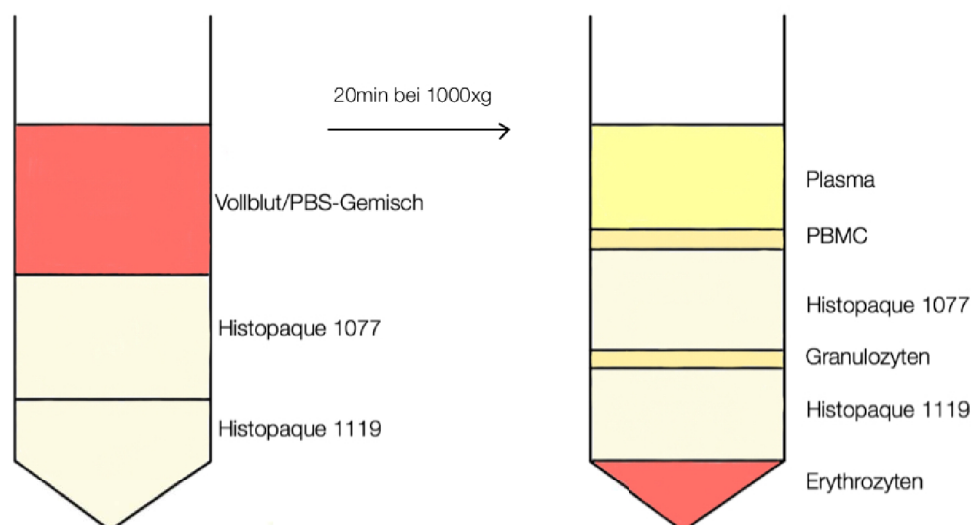


Abb. 5: Aufbau des Gradienten vor und nach der Zentrifugation (20min, 1000xg, RT, ohne Bremse und bei geringster Beschleunigung).

2.17.6 Durchflusszytometrische Zellsortierung- *Cell Sort*

Nach der Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abschnitt 2.17.5) erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung eine Auftrennung der *PBMC* in B-Zellen, T-Zellen und Monozyten. Das Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung oder *FACS* (*fluorescence activated cell sorting*) beruht auf der Markierung von Zellen mithilfe von Antikörpern, welche an Fluorochrome gebunden sind. Die gefärbten Zellen fließen einzeln durch eine Kapillare, in der die Fluorochrome mit einem Laserstrahl angeregt werden. Sensoren erfassen die Streuung des Lichtes, wobei das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*) Aussagen über die Größe und das seitliche Streulicht (*sideward scatter*) eine Aussage über die Granularität der gemessenen Zelle liefern. In Kombination mit der Fluoreszenzanalyse können die Zellen anhand ihrer Morphologie und Antigenexpression differenziert werden.

Zunächst wurde das Zellpellet in 500 µl humanem FcR-Block aufgenommen und für 10 min bei 4°C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 10 min bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern, die gegen die folgenden Antigene gerichtet sind, angefärbt:

Tabelle 8: Antikörper-Färbung humaner PBMCs

Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung
CD45	PerCP-Cy5.5	1:200
CD3	APC-Fire 750	1:200
CD19	FITC	1:200
CD19	PerCP-CY5.5	1:20
CD11b	APC	1:200
CD14	PECy7	1:200
CD15	PE-Dazzle 594	1:200

T-Zellen, B-Zellen und Monozyten zeigen folgende Eigenschaften hinsichtlich ihrer Antigeneigenschaften:

Monozyten: CD45⁺, CD11b⁺, CD14⁺, CD15⁻

T-Zellen: CD45⁺, CD11b⁻, CD3⁺, CD19⁻

B-Zellen: CD45⁺, CD11b⁻, CD3⁻, CD19⁺

Aufgefangen wurden die Zellen in 300 µl *IMDM complete* Medium.

2.18 Zellkultur

Sowohl murine, peritoneale Makrophagen als auch humane Monozyten, T- und B-Zellen wurden *in vitro* stimuliert und für zwei bzw. 24 h inkubiert, um die Effekte des A_{2B}R-Agonisten BAY60-6583 und des Gq-Inhibitors FR-900359(UBO-GIC) auf die IL-6 Sekretion zu untersuchen. Es wurde eine 96-Well-Rundbodenplatte verwendet und pro Well 200.000 Zellen in 100 µl Gesamtvolumen ausgesät.

Die Immunzellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nährmedien wurden bei 4°C gelagert. Alle Arbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Nach Ende der 2 h bzw. 24 h Inkubationszeit wurden aus jedem Well 70 µl Zellkulturüberstand für die Analyse der IL-6 Konzentration (siehe Abschnitt 2.15) abgenommen. Die übrigen 30 µl wurden in 1,5 ml Reagenzgefäße pipettiert. Anschließend wurden die Wells zweimal mit 100µl sterilem MACS-Puffer gewaschen, um die Immunzellen von der Wand abzulösen. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 300 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 350 µl RLT-Puffer Plus 1% β-Mercaptoethanol lysiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.18.1 Monozyten und Makrophagen

Die sortierten humanen Monozyten bzw. murinen Makrophagen wurden in VLE-DMEM 1% M-CSF aufgenommen und je 200.000 Zellen entweder mit 1µM des G_q-Inhibitor FR900359 behandelt oder nur mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO (Vehikel Kontrolle). Nach einer Vorinkubation von 1h wurden manche Gruppen zusätzlich mit 2.5µM des A_{2B}R-Agonisten BAY60-6583 bzw. mit einer entsprechenden Menge DMSO behandelt. Den humanen Monozyten wurden zusätzlich 100 ng/ml LPS hinzugefügt, den murinen 50 ng/ml.

Zusammengefasst wurden folgende Stimulationen durchgeführt:

1. 2,5µM BAY60-6583 + 50/100ng LPS
2. v.c. (*vehicle control*) + 50/100ng LPS
3. 1µM FR900359 + 2,5µM BAY 60-6583 + 50/100ng LPS
4. 1µM FR900359 + v.c. + 50/100ng LPS

2.18.2 T-Zellen

Auch die sortierten T-Zellen wurden mit BAY60-6583 und FR900359 kultiviert. T-Zellen wurden mit an *Dynabeads* gekoppelten Antikörpern gegen CD3 und CD28 inkubiert, was zu einer Aktivierung der T-Zellen führt. Die *Dynabeads* wurden in einem Verhältnis von Zelle zu *Bead* von 1:1 eingesetzt, sodass jede Zelle durch einen mit Antikörper beladenen *Bead* stimuliert werden konnte. Als Medium wurde IMDM *complete* verwendet.

2.18.3 B-Zellen

Die Kultivierung der B-Zellen erfolgte in Gegenwart von 10 µg/ml αIgM und 1µM CPG in VLE-DMEM *complete*. Es wurden analog zu Abschnitt 2.18.1 2,5µM BAY60-6583 und 1µM FR900359 eingesetzt.

2.19 Molekularbiologische Methoden

2.19.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden die Zellen in RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol lysiert und bei -80 °C gelagert. Diese Lysate wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation über Trennsäulen nach Herstellerprotokoll. Es wurde das *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) verwendet. Quantifiziert wurde die RNA-Menge mithilfe des Nanodrop 2000 Spektrometers.

2.19.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde direkt nach Isolation mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*applied biosystems by Thermo Fisher Scientific*) nach Herstellerangaben in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei werden sogenannte *random primer* verwendet, einzelsträngige, zufällige Hexanukleotide, die sich an die RNA anlagern. Eine reverse Transkriptase synthetisiert nun die complementäre DNA.

Nach reverser Transkription und Kühlung auf 4°C wurde die vervielfältigte cDNA bei -20 °C gelagert.

2.19.3 Quantitative *Real-Time PCR*

Die Genexpressionsanalysen wurden mit *TaqMan Assays* (*Thermo Fisher*) durchgeführt. Neben Gen-spezifischen *Primern* beinhalten die *Assays* eine Sonde bestehend aus Oligonukleotiden. An deren 5' Ende ist ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff gebunden, am 3' Ende ein *Quencher*-Fluoreszenzfarbstoff. Befinden sich diese Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander, wird die Fluoreszenz des *Reporters* unterdrückt. Ist das Zielgen exprimiert, bindet die Sonde in räumlicher Nähe zum *Primer*. Da die *Taq-Man* Polymerase auch eine 5' Nukleaseaktivität besitzt, ist sie in der Lage, die Sonde abzubauen. Dies führt dazu, dass *Reporter* und *Quencher* voneinander getrennt werden, sodass die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes zunimmt. Da in jedem Zyklus mehr *Reporter*-Fluoreszenz freigesetzt wird, nimmt diese proportional zur Höhe der Genexpression zu.

Das Reaktionsvolumen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 9: Reaktionsvolumen *Real-Time-PCR*

cDNA	1,0ul
Master Mix	5,0µl
<i>TaqMan Assay</i>	0,5µl
RNAse free water	3,5µl
Gesamtvolumen	10µl

Alle qRT-PCR Reaktionen wurden mit dem *StepOnePlus™ Real-time PCR-System* in 96-Well-Platten durchgeführt. Zunächst wurden die Proben durch das Gerät für 10 min auf 95°C erhitzt, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Nach weiteren 15 sec bei 95°C zur Denaturierung der DNA erfolgte die Hybridisierung der Primer bei 60°C für 1 min. Diese letzten drei Schritte wurden 39-mal wiederholt. Es wurden pro Probe zwei technische Replikate pipettiert.

Für die Auswertung (siehe Abschnitt 2.19.4) wurde die *StepOnePlus™-Software v2.3* genutzt.

2.19.4 Methode der relativen Quantifizierung

Zur Analyse der PCR-Messungen wurde die Methode der relativen Quantifizierung, auch ΔC_t -Methode genannt, verwendet. Hierbei wird die Genexpression des Ziel-Gens auf ein sogenanntes *housekeeping* Gen normalisiert. Dieses Gen sollte in den untersuchten Zellen gleichermaßen exprimiert und nicht reguliert werden. Für die murinen Versuchen wurde Rps9 (40S *ribosomal protein 9*), für die humanen RPL13A (*ribosomal protein L13A*) als Referenzgen verwendet.

Nach Ende der Reaktionszyklen wird zunächst der C_t -Wert (cycle threshold) bestimmt. Hier wird ein Schwellwert definiert, an dem möglichst alle Proben in ihrem linearen Amplifikationsbereich liegen.

Anschließend wird die Differenz des C_t Wertes zwischen Referenz- und Zielgen gebildet, welche als ΔC_t -Wert bezeichnet wird.

Da sich im Idealfall pro Zyklus der DNA-Gehalt verdoppelt, entspricht ein um eine Einheit größerer C_t -Wert der doppelten Menge DNA. Dies wird in der Auswertung berücksichtigt, in dem die relative Expression des Zielgens zum Referenzgen als $2^{-\Delta C_t}$ – Wert angegeben wird.

2.20 UPLC- Ultra Performance Liquid Chromatography

Die Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wird zur Trennung und Quantifizierung von Purin-Verbindungen eingesetzt.

Das Prinzip der UPLC basiert auf der Verwendung einer mobilen und einer stationären Phase. Die zu untersuchenden Proben fließen mit einem Eluent (entspricht der mobilen Phase) durch eine Trennsäule (stationäre Phase). Bestandteile, die eine hohe

Affinität zur stationären Phase aufweisen, bewegen sich deutlich langsamer als solche, die eine geringere Interaktion zeigen. Je höher also die Interaktion einzelner Moleküle mit der stationären Phase, desto länger die Verweildauer und desto später die Detektion am Ende der Trennsäule.

Die UPLC stellt eine Modifikation der HPLC (*High- Pressure Liquid Chromatography*) dar. Sie ist in der Lage, kleine Partikel (weniger als 2µm) unter Ausnutzung sehr hoher Drücke (bis zu 10MPa) aufzutrennen.

Die Analysen der 30 µl großen Proben wurden mithilfe des *Water's Acquity Ultra Performance Liquid Chromatographic H class System* durchgeführt.

Die stationäre Phase bildete die Cortecs C18 UPLC Säule (3.0x150 mm, 1.6 µm). Um die Nukleotide voneinander zu trennen, wurde mit Puffer A (200 mM KH₂PO₄, 200 mM KCl, pH 6) und Puffer B (200 mM KH₂PO₄, 200 mM KCl, 7.5 % Acetonitril, pH 6) folgender linearer Gradient gebildet: initial 100 % A; 0.03 min 96 % A, 4 % B; 4.53 min 91% A, 9% B; 22.63 min 5 % A, 95 % B; 26.10 min 5 % A, 95 % B; 26.50 min 100 %. Es wurde eine *low flow*- Einstellung (0.340 ml/min) gewählt.

Detektiert wurden die Analyten durch den Water's Multi λ Fluoreszenz Detektor 2475 (λ_{EM}=300nm, λ_{Ex}: 415nm). UV- Daten wurden bei einer Wellenlänge von 254nm akquiriert.

Nach Abschluss der Analyse wurde die Säule durch Verwendung des Puffer A (100%) mit einer Flussrate von 0,34ml/min gewaschen und neu equilibriert. Die Reinigung erfolgte mit Puffer C (0,2% Methanol) für 240 min nach jeder Versuchsreihe.

2.21 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden in dieser Arbeit die Programme Microsoft Excel (2010) und GraphPad Prism 8 (Graph Pad Software, La Jolla) verwendet. Es wurden folgende Tests verwendet: für die Testung der Normalverteilung der Shapiro-Wilk-Test, für den Vergleich zwischen zwei Gruppen, deren Daten normalverteilt waren und die sich in einer Variablen unterschieden, der *Student's t-Test*. Wurden mehr als zwei unabhängige Gruppen verglichen, die sich in einer Variablen unterschieden, wurde eine *One-way ANOVA* berechnet (Voraussetzung: Normalverteilung der Daten). Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Wurden mehrere Gruppen verglichen, die sich in zwei Variablen

unterschieden, wurde bei einer Normalverteilung der Daten eine *Two-way ANOVA* berechnet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3 Ergebnisse

Aus der Literatur ist bekannt, dass das durch die Ectonukleotidase CD73 gebildete Adenosin wichtig für den Heilungsprozess nach einem Herzinfarkt ist [136]. Darüber hinaus weiß man, dass Adenosin die Bildung von IL-6 induziert [137, 166, 167]. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob das nach Herzinfarkt durch CD73 auf T-Zellen gebildete Adenosin quantitativ ausreichend ist, um die IL-6 Sekretion des Herzens zu beeinflussen.

3.1 Entwicklung eines Langendorff- basierten Modells zur Messung von Zytokinen in koronaren Effluaten

Im Herzen werden Zytokine von verschiedenen Zelltypen sezerniert und gelangen in die koronare Zirkulation [168]. In dieser Arbeit wurde die globale kardiale Produktion und Sekretion von Zytokinen über die Freisetzung in das koronare Effluat von isoliert perfundierten Herzen der Maus bestimmt. Hierfür war es notwendig, ein Protokoll zu entwickeln, mit dem es möglich ist, die in das koronare Effluat freigesetzten Zytokine empfindlich und reproduzierbar zu messen.

3.1.1 Initial- und Gleichgewichtsphase

Das aus dem geöffneten Thorax entnommene Herz wurde mit eiskaltem PBS gespült, über die Aorta kanüliert und mit erwärmtem (37 °C), oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer nach dem Verfahren von Langendorff druckkonstant (1 mH₂O) perfundiert [169]. Nach einer Äquilibrationsphase von 20 Minuten (entspricht der Initialphase) erreicht das Herz einen *steady state* (entspricht dem Beginn der Gleichgewichtsphase) hinsichtlich Koronarfluss und Herzfrequenz.

Um nur die während der Äquilibrationsphase freigesetzten Zytokine zu erfassen, wurden die Herzen zunächst für zwei Minuten blutfrei perfundiert, um dann das koronare Effluat über einen Zeitraum von 30 min zu sammeln. In der *steady state*-Gruppe erfolgte das Sammeln des koronaren Effluates erst nach 20min und dann

wieder über einen Zeitraum von 30 min. Es wurden Herzen aus wildtypischen Tieren (WT) verwendet.

Das Volumen der aufgefangenen Effluat-Proben betrug zwischen 42,5 ml und 57,5 ml (Mittelwert: 54 ml). Um in späteren Versuchen die Zytokine sicher messen zu können, erfolgte nachfolgend die Einengung der Proben. Hierzu wurden diese über einen 3K Filter zentrifugiert, bis ein Gesamtvolumen von ca. 200µl erreicht wurde.

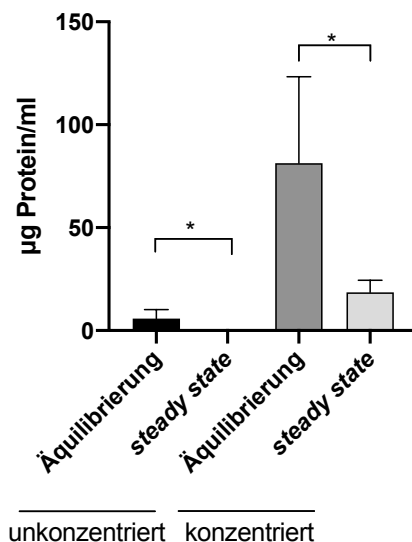


Abb. 6: Proteinkonzentration in koronaren Effluaten isolierter, Herzen aus WT-Mäusen. In beiden Gruppen wurden über einen Zeitraum von 30 min koronare Effluate gesammelt. Im Anschluss wurden 500 µl des Gesamtvolumens abgenommen und mittels BCA-Assays wurde der Proteingehalt bestimmt. Der Rest der Proben wurde für 2 Stunden und 50 min über einen 3K Filter zentrifugiert, sodass eine Einengung auf ein Gesamtvolumen von ca. 200 µl erfolgte. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test wurde ein *Student's t-Test* berechnet. Proteinmenge in µg/ml. n=6 (*p < 0,05)

Abb. 6 zeigt, dass in den Proben der Äquilierungsphase deutlich höhere Proteinkonzentrationen messbar waren als in denen der „steady state“-Phase und dass eine Konzentrierung der Proben erfolgreich war. Dieser Unterschied war sowohl für die unkonzentrierten (Äquilierung: 5,8 µg/ml ± 4,3 µg/ml; steady state: 7ng/ml ± 4ng/ml, p=0,0356) als auch für die aufkonzentrierten (Äquilierung: 81,16µg/ml ± 42,05µg/ml; steady state: 18,5µg/ml ± 5,9 µg/ml; p=0,02) Proben statistisch signifikant. Da die Proteinkonzentration unter steady state Bedingungen nur in den konzentrierten Proben im Messbereich des Assays lagen, wurden in allen nachfolgenden Versuchen die gewonnenen Effluat-Proben aufkonzentriert.

3.1.2 Ist die Verwendung eines Proteinase-Inhibitors sinnvoll?

Bei Zytokinen handelt es sich um Proteine, die bei Raumtemperatur instabil sind. Des Weiteren setzen Herzen Proteasen frei, welche Zytokine abbauen. Aus diesem Grund wurde nachfolgend die Wirkung eines Proteinase-Inhibitors auf die Freisetzung verschiedener Zytokine untersucht [170].

Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet: in der ersten Gruppe wurden isolierte Herzen von WT-Mäusen durch intrakoronare Gabe eines Proteinase-Inhibitors behandelt, die andere diente als Kontrollgruppe. Im Vergleich zu Abschnitt 3.1.1 wurde eine Modifikation des Versuchsablaufes vorgenommen: zunächst erfolgte eine retrograde, druckkonstante (1 mH₂O) Perfusion, um Herz und Koronarien von Blut freizuspülen. Nach zwei Minuten wurde auf einen flusskonstanten Modus (Flussrate: 1,5 ml/min) umgestellt. In der Versuchsgruppe enthielt der Puffer einen EDTA-freien Proteinase-Inhibitor in der vom Hersteller angegebenen Konzentration (*cOmplete Tablets*, EDTA frei, Roche).

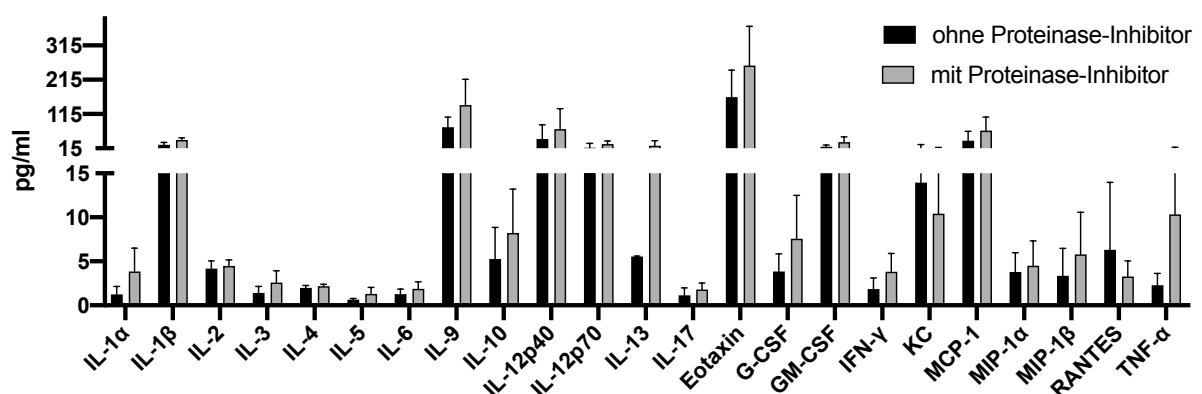


Abb. 7: Einfluss des Proteinase-Inhibitors auf die Konzentrationen von Zytokinen in koronaren Effluaten von normoxisch perfundierten Kontrollherzen. Die Volumina der Effluat-Proben wurden mittels Zentrifugation über einen 3K-Filter eingeeengt, anschließend erfolgte die Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Bio-Plex. In der Behandlungsgruppe wurde dem Puffer Proteinase-Inhibitor zugesetzt. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde der *Student's t-Test* berechnet. Zytokinmenge in pg/ml. n=3

Wie in Abb. 7 zu sehen ist, setzten isolierte, nicht- infarzierten Herzen insbesondere IL-1β, IL-9, IL-12, Eotaxin und MCP-1 frei. Der Einsatz eines Proteinase-Inhibitors führt zu einer geringen Erhöhung der meisten der gemessenen Zytokine, erreicht jedoch in keinem Fall das Signifikanzniveau.

Nachteilig bei diesem Versuch war außerdem, dass die Zugabe des Proteinase-Inhibitors zu Herzrhythmusstörungen oder zu einem Herzstillstand führte. Aus diesem Grund wurde in allen nachfolgenden Versuchen der Proteinase-Inhibitor in den Sammelgefäßen vorgelegt, um einer Proteindegradation während des Sammelprozesses und der Zentrifugation entgegenzuwirken.

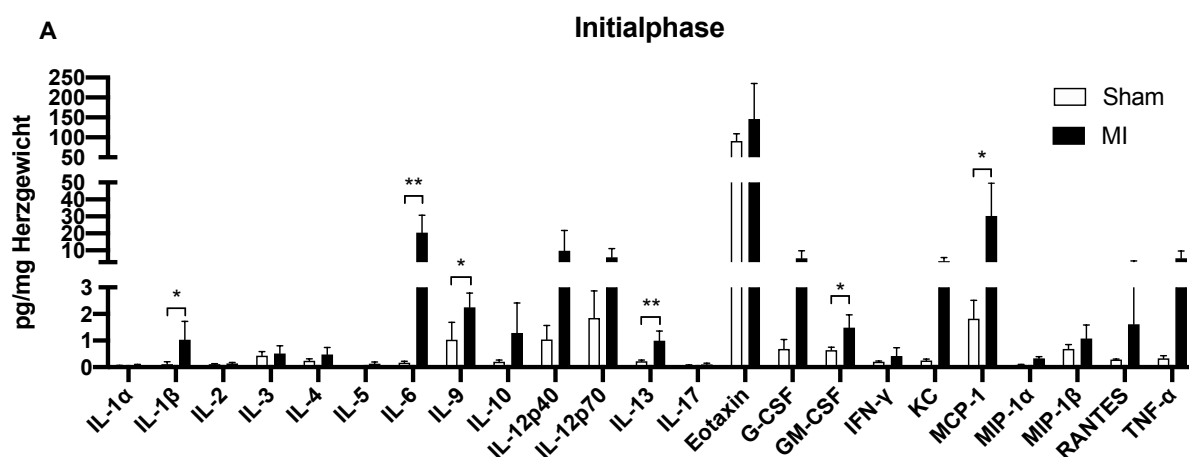
3.2 Bedeutung des CD73- Adenosins für die Zytokinsekretion

3.2.1 Zytokingehalt in koronaren Effluaten

Ein Myokardinfarkt löst eine lokale Entzündungskaskade aus und führt bereits nach kurzer Zeit zur Infiltration von Immunzellen in das infarzierte Myokard [35]. Da in diesem Kontext sowohl Adenosin als auch IL-6 eine wichtige Rolle spielen, sollte nachfolgend die Regulation von IL-6 im Herzen durch von CD73 gebildetem Adenosin untersucht werden und zwar bei Infarkttieren im Vergleich zu *Sham*-operierten Kontrollen.

Zunächst wurden die Konzentration verschiedener Zytokine im koronaren Effluat isolierter Herzen verglichen.

Die Infarkte wurden durch eine 50-minütige Okklusion der *LAD* mit anschließender Reperfusion induziert. An Tag drei nach Myokardinfarkt wurden die Herzen *ex vivo* über eine Langendorff-Apparatur mit Krebs-Henseleit-Puffer druckkonstant für 30 min perfundiert. In dieser Zeit wurden die koronaren Effluat gesammelt, wobei eine Einteilung in eine Initialphase (Minute 1-15) und eine Gleichgewichtsphase (Minute 16-30) erfolgte. Alle gemessenen Zytokinkonzentrationen wurden auf das Herzgewicht normalisiert.



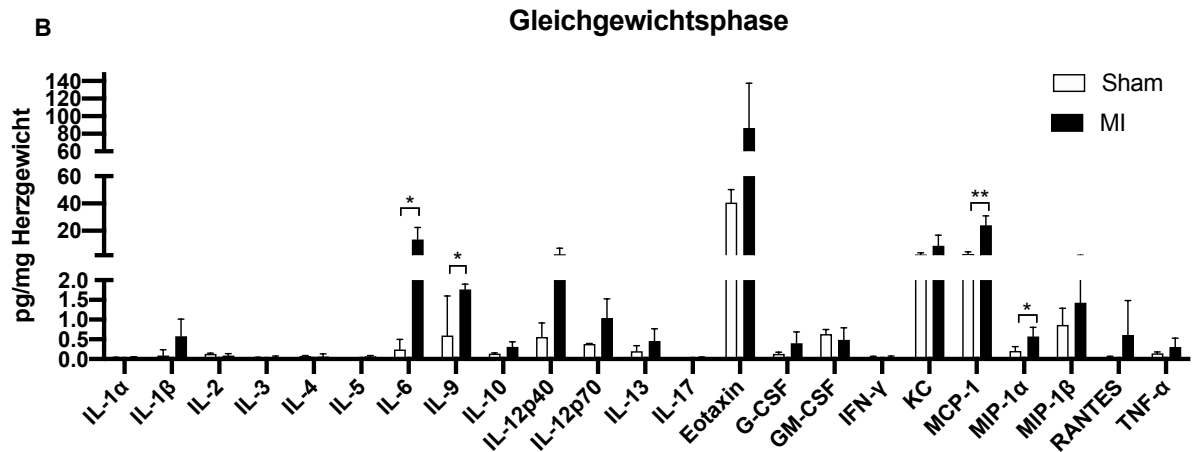


Abb. 8: Zytokinspiegel in koronaren Effluaten in Sham- und Infarkttieren drei Tage postoperativ. Die Herzen wurden über die Langendorff-Apparatur druckkonstant perfundiert, nach zweiminütiger Spülung der Koronarien wurde das Effluat aufgesammelt. Abb. **A** stellt die Zytokinkonzentrationen in der Initialphase dar, Abb. **B** in der Gleichgewichtsphase. Die Messung der Zytokine erfolgte mittels Bio-Plex. Nach Prüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurden signifikante Unterschiede mittels *Student's t-Test* berechnet. Zytokinmenge in pg/mg Herzgewicht. Sham: n=3; WT: n=6 (*p < 0,05; **p < 0,01)

Wie in Abb. 8 zusammengefasst, zeigte sich, dass in beiden Phasen die Zytokinkonzentrationen in den koronaren Effluaten der Infarkttiere höher waren als in denen der Sham-operierten Kontrollen. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede in der Initialphase (Minute 1-15) für IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-13, GM-CSF, MCP-1 und MIP-1 α und in der Gleichgewichtsphase (Minute 16-30) für IL-6, IL-9, MCP-1 und MIP-1 α . Des Weiteren fiel auf, dass an Tag drei nach Infarkt Eotaxin das Zytokin mit der höchsten Freisetzungsrates ist (Initialphase: 146,1 pg/mg Herzgewicht $\pm$ 88,8 pg/mg Herzgewicht, Gleichgewichtsphase: 86,6 pg/mg Herzgewicht $\pm$ 50,9 pg/mg Herzgewicht).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob Adenosin, das von CD73 auf T-Zellen gebildet wird, die beobachtete Steigerung der Zytokinkonzentrationen, besonders von IL-6, beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden WT und CD4/CD73-Verlustmutanten genutzt.

In den Abb. 9 und 10 sind diejenigen Zytokine dargestellt, welche statistisch signifikante Unterschiede aufwiesen. Der vollständige Datensatz findet sich im Anhang (Suppl. 1 und 2).

Initialphase (1-15min)

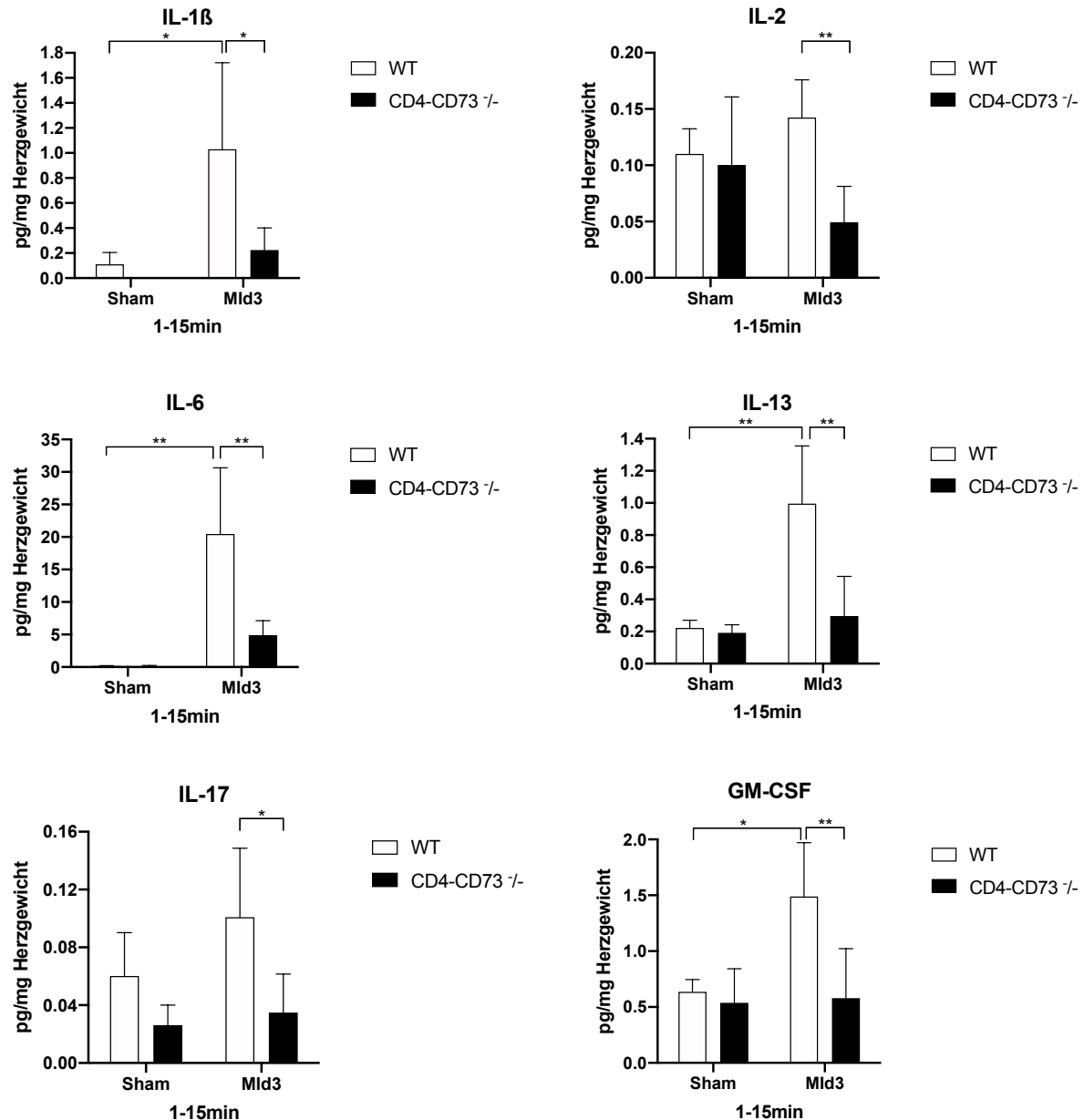


Abb. 9: Zytokinkonzentrationen in koronaren Effluaten von Wildtyp und CD4/CD73^{-/-}-Tieren an Tag 3 nach Infarkt. Die Herzen wurden druckkonstant (Langendorff) perfundiert. Nach zweiminütiger Perfusion zum Ausspülen des Blutes aus den Koronarien wurde für 15 min Effluat in Anwesenheit eines Proteinase-Inhibitors gesammelt. Die Messung erfolgte mittels Bio-Plex. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *Two-way-ANOVA* berechnet. Zytokinmenge in pg/mg Herzgewicht. Sham WT: n=3, Sham KO: n=4; MI WT und KO: n=6. (*p < 0,05; **p < 0,01)

Abb. 9 zeigt, dass nach Infarkt deutliche Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen bestanden: Die höchste Freisetzung fand sich bei IL-6 (Mittelwert: 20,46 pg/mg Herzgewicht). Des Weiteren geht aus den Daten hervor, dass in der Initialphase (Abbildung 10) die Konzentrationen von IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-13, IL-17 und GM-CSF in den Effluaten von CD4/CD73- Verlustmutanten statistisch

signifikant niedriger waren als in denen der Kontrollen. So war beispielsweise der IL-6 Spiegel im Wildtyp ca. 5-fach höher als in den CD4/CD73-Verlustmutanten ($p=0,022$). In der Gleichgewichtsphase (Abb. 10) blieb der Unterschied zwischen CD4/CD73^{-/-}-Tieren und WT für IL-6 weiter signifikant, auch wenn die absolute Menge in beiden Gruppen geringfügig abnahm. Weiterhin erreichten im Gegensatz zur Initialphase nun IL-9, MCP-1 und MIP-1 β das Signifikanzniveau.

Gleichgewichtsphase (16-30min)

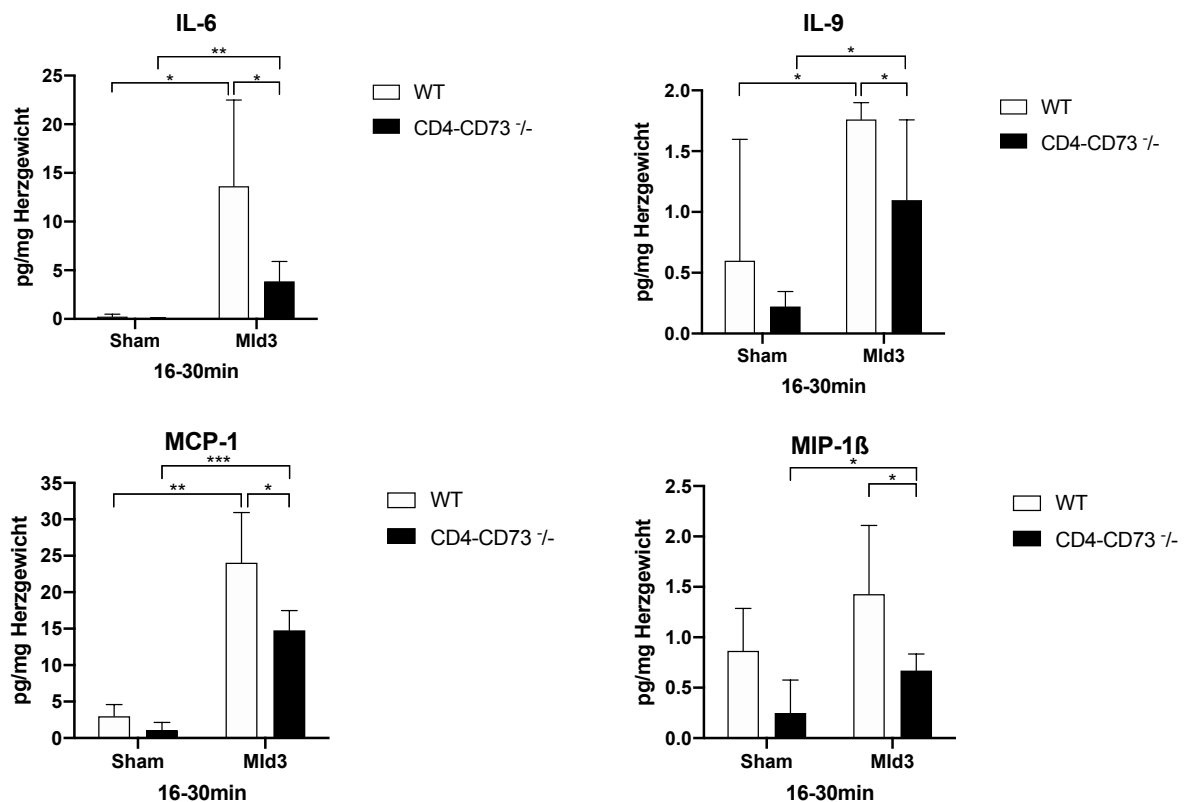


Abb. 10: Zytokinspiegel in koronaren Effluaten in der Gleichgewichtsphase. Es wurden die gleichen Herzen wie in Abb. 9 genutzt. Die Messung erfolgte mittels Bio-Plex. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *Two-way-ANOVA* berechnet. Zytokinmenge in pg/mg Herzgewicht. Sham WT: n=3, Sham KO: n=4; MI WT und KO: n=6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

3.2.2 Zytokinkonzentrationen im venösen Blut drei Tage nach Myokardinfarkt

Um zu untersuchen, ob sich die in koronaren Effluaten gefundenen Unterschiede auch systemisch nachweisen lassen, wurden die Plasmaspiegel verschiedener Zytokine an Tag drei nach Infarkt bestimmt.

Abb. 11 zeigt, dass die Zytokinkonzentrationen von IL-9, IL-12p(40) sowie Eotaxin in infarzierten Tieren nach drei Tagen signifikant höher waren als in den Kontrollen. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt bei Eotaxin, hier war der Plasmaspiegel um das 8-fache erhöht ($p=0,0001$). Auch Interleukin-6 war in Infarkttieren erhöht, der

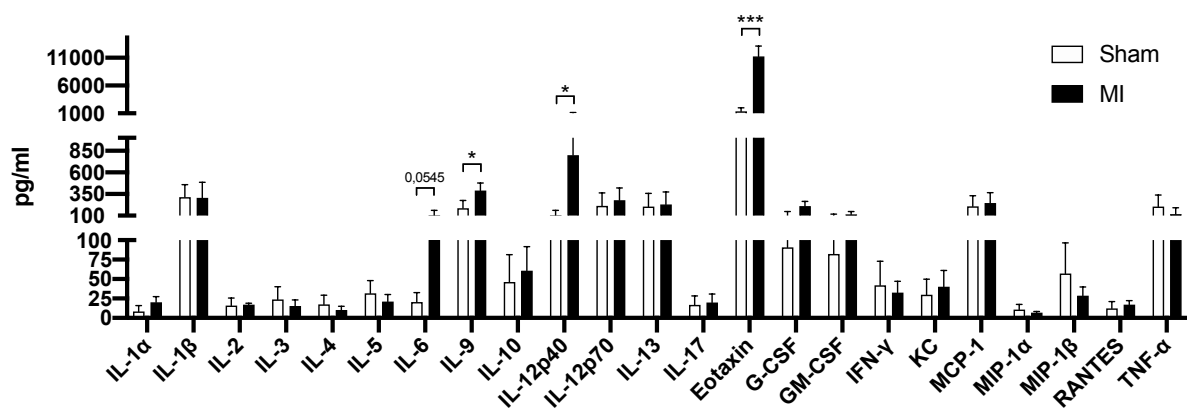


Abb. 11: Zytokinplasmaspiegel drei Tage postoperativ. Analyse der Plasmakonzentrationen von 23 Zytokinen von infarzierten Tieren sowie Sham-Kontrollen drei Tagen post MI. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde ein *Student's t-Test* berechnet. Zytokinspiegel in pg/ml. Sham n= 3; Infarkttiere n= 5. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Sham: 20,54 pg/ml $\pm$ 11,9 pg/ml; 3d post MI: 102,8 pg/ml $\pm$ 57,3 pg/ml; $p=0,0545$). Eotaxin wies in beiden Gruppen den höchsten Zytokinspiegel auf (Sham: 1343pg/ml $\pm$ 647,8 pg/ml; 3d post MI: 11247 pg/ml $\pm$ 1862 pg/ml).

Anschließend wurden die Zytokinplasmaspiegel zwischen infarzierten, WT- und CD4/CD73^{-/-} Mäusen drei Tage nach Infarkt verglichen.

Aus Abb. 12 wird ersichtlich, dass an Tag drei nach Infarkt die Zytokinspiegel im Plasma von Wildtypen und CD4/CD73- Verlustmutanten keine signifikanten Unterschiede aufweisen.

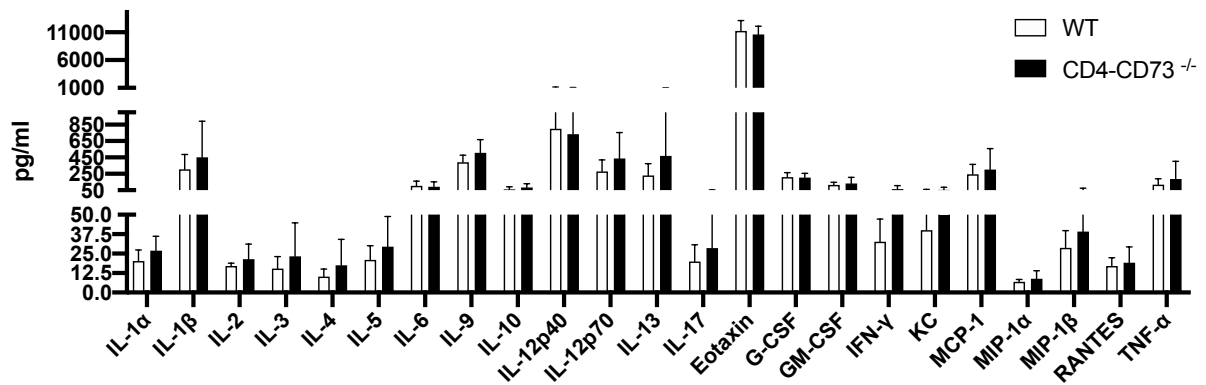


Abb. 12: Zytokinplasmaspiegel wildtypischer und CD4/CD73-Verlustmutanten drei Tage postoperativ. Analyse der Plasmakonzentrationen von 23 Zytokinen von infarzierten WT- sowie CD4/CD73^{-/-}-Tieren drei Tagen post MI. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde ein *Student's t-Test* berechnet. Zytokinspiegel in pg/ml. n=5

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, dass an Tag drei nach Myokardinfarkt die Zytokinspiegel sowohl in den koronaren Effluaten als auch im Plasma höher sind als in *Sham*-operierten Kontrolltieren. Ein wichtiger neuer Befund war, dass das von T-Zellen durch die CD73 gebildete Adenosin wesentlich das Zytokinmilieu des Herzens, insbesondere IL-6, moduliert.

3.3 Freisetzung von Purinverbindungen in das koronare Effluat

Neben der Analyse der Zytokine in den koronaren Effluaten wurde auch die Freisetzung verschiedener Purinverbindungen untersucht. Vorausgegangene Arbeiten unseres Institutes zeigten, dass nach einem ischämischen Ereignis die extrazelluläre Adenosinkonzentration erhöht ist und dass hierfür mutmaßlich die Hochregulation der Ektonukleotidase CD73 verantwortlich ist [135, 171].

Da für die Versuche in dieser Arbeit T-zellspezifische CD73-Verlustmutanten verwendet wurden, sollte die Bedeutung von CD73 auf T-Zellen für die globale Adenosinkonzentration drei Tage nach Infarkt im isoliert schlagenden Herzen analysiert werden.

Experimentell wurde so vorgegangen, dass während der Perfusion isolierter Herzen (Langendorff) alle 3 min ca. 500 µl Effluat gesammelt wurden, welches dann mithilfe von UPLC-Analysen auf die Freisetzung purinerger Metabolite analysiert wurde.

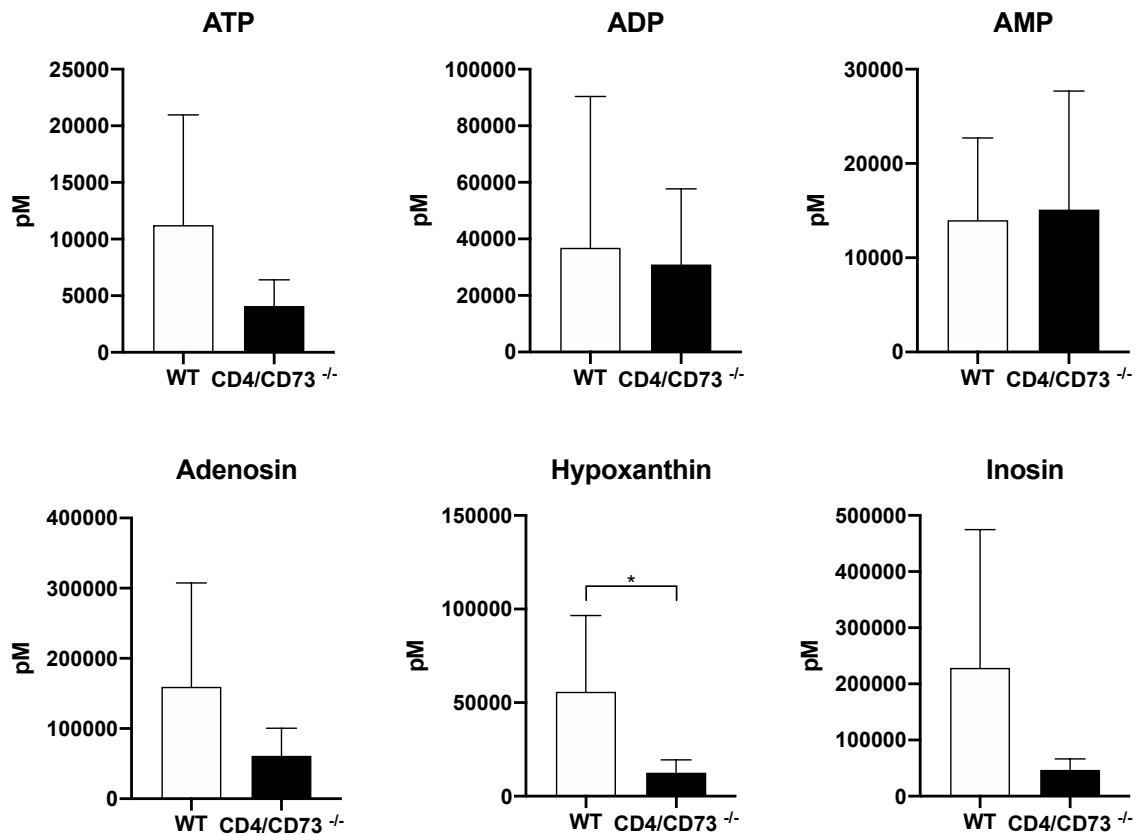


Abb. 13: Freisetzung von Purinverbindungen in das koronare Effluat von WT- und CD4/CD73^{-/-}-Tieren im isoliert perfundierten Herzen drei Tage nach I/R. Während der druckkonstanten Perfusion wurden alle 3 min ca. 500 µl Effluat gesammelt. Der Purinstoffwechsel wurde mittels UPLC analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung an einer Standardkurve sowie die Bildung eines Mittelwertes aus den Daten der verschiedenen Zeitpunkte für jedes Tier. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Student's t-Test*. Purinmenge in pM. n=6 (*p < 0,05)

Aus Abb. 13 wird ersichtlich, dass die Freisetzung von ATP, Adenosin, Inosin und Hypoxanthin in CD4/CD73^{-/-}-Mäusen vermindert ist, es wird jedoch nur bei Hypoxanthin das Signifikanzniveau erreicht (p=0,0476).

3.4 Einfluss des A_{2B}-Rezeptors auf die IL-6 und IL-1β-Produktion in murinen, peritonealen Makrophagen

Als nächstes wurde die Frage untersucht, welche Zellen des Herzens vorwiegend für die IL-6 Produktion verantwortlich sind. Makrophagen sind zentrale Protagonisten im Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt. Sie wandern als Monozyten innerhalb eines Tages in das Infarktgebiet ein und stellen in der ersten Woche nach Ischämie die größte Gruppe der Immunzellen des Herzens dar [35]. Außerdem gehören sie zu

den IL-6 produzierenden Zellen. Darüber hinaus führt eine Stimulation des A_{2B}-Rezeptors in Fibroblasten, dendritischen Zellen sowie EPDCs (*Epicardium-derived cells*) zu einer gesteigerten IL-6-Produktion [52, 137, 167, 172].

Nachfolgend wurde daher untersucht, ob eine Stimulation des A_{2B}-Rezeptors auch in Monozyten/Makrophagen zu einer gesteigerten Expression von IL-6 und IL-1 β führt.

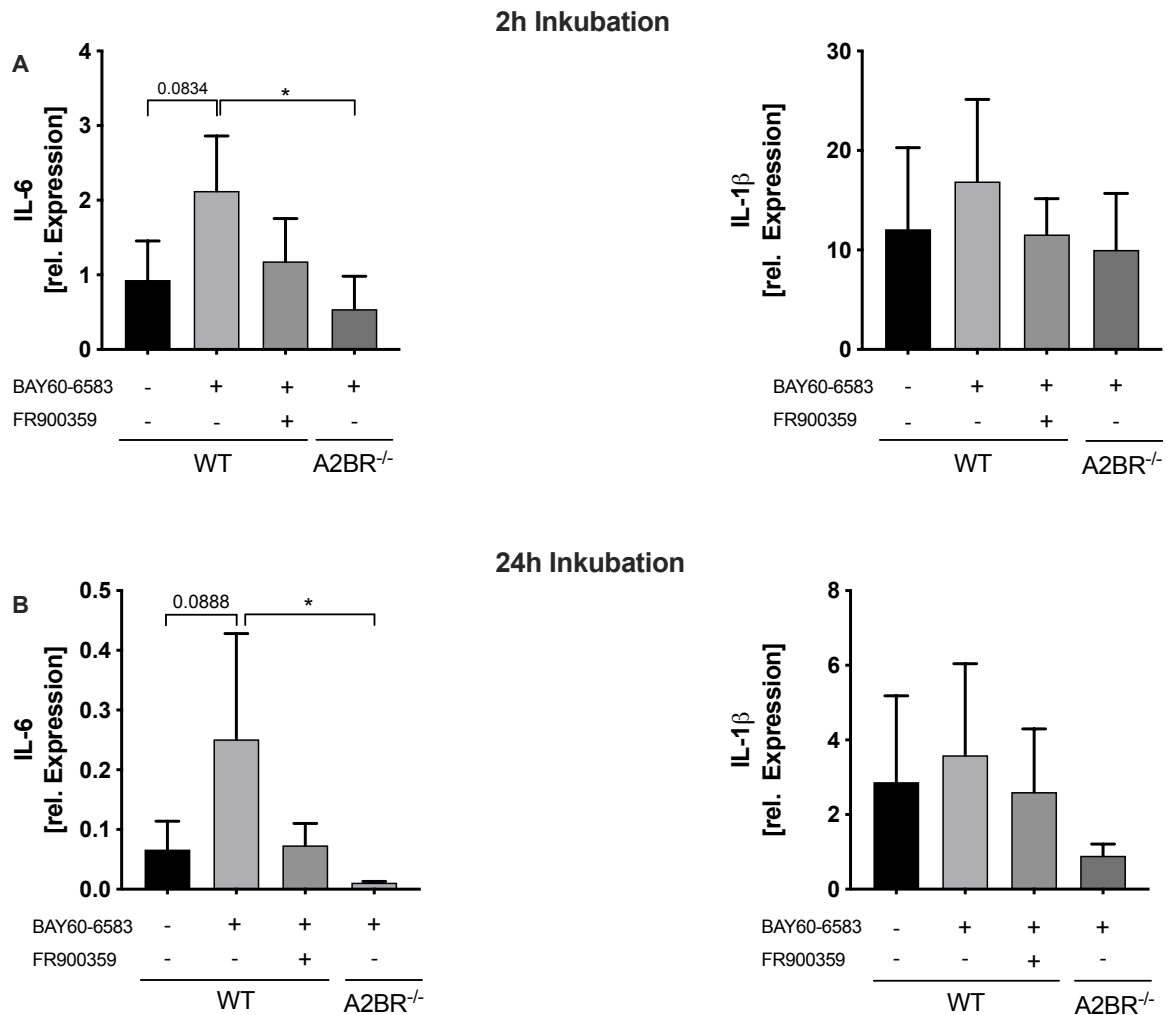


Abb. 14: IL-6 und IL-1 β - Expression in isolierten murinen, peritonealen Makrophagen. Thioglycolat-induzierte, murine Makrophagen wurden für zwei (A) bzw. 24 (B) Stunden mit 50 ng LPS/ml in Anwesenheit von 2,5 μ M des A_{2B}-Rezeptoragonisten BAY60-6583 und/oder dem Gq-Inhibitor FR900359 (1 μ M) stimuliert. Es wurden Makrophagen aus Wildtyp- und A2BR-Knockout-Tieren verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression bestimmt. Als Referenzgen diente der *Housekeeper* RPS9. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Nach Testung des Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way ANOVA* berechnet. n=4, WT= Wildtyp, A2BR^{-/-}: A2BR-Verlustmutante. (*p < 0,05)

Die peritonealen Makrophagen wurden zunächst mit 50 ng LPS für eine Stunde stimuliert. Anschließend erfolgte die spezifische Stimulation des A_{2B}-Rezeptors mit

BAY 60-6583, mit BAY 60-6583 zusammen mit dem G_q -Inhibitor FR900359, sowie eine BAY 60-6583 Stimulation in $A_{2B}R$ -defizienten Makrophagen.

Wie in Abb. 14 **A** zu sehen, führte eine Stimulation mit einem $A_{2B}R$ -Agonisten nach 2 Stunden zu einem Anstieg der IL-6 Expression, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreicht. Des Weiteren fiel auf, dass dieser Effekt durch Inhibition des G_q -Weges mit FR900359 gehemmt werden konnte, was jedoch auch nicht signifikant war.

Interessanterweise führte eine Stimulation von Makrophagen, denen der A_{2B} -Rezeptor fehlt ($A_{2B}R^{-/-}$) im Gegensatz zu den wildtypischen Kontrollen nicht zu einem Anstieg der IL-6 Expression ($p=0,0328$).

Nach 24h Kultivierung (Abb. 14 **B**) zeigte sich ein ähnliches Bild: eine Stimulation des A_{2B} -Rezeptors führte zu einer vermehrten IL-6 Expression, welche durch eine Inhibition des G_q -Signalweges reduziert wurde. $A_{2B}R^{-/-}$ -Makrophagen reagierten auf eine Stimulation mit BAY 60-6583 nicht mit einer erhöhten IL-6 Expression. Auffällig ist jedoch, dass nach 24h Inkubation die basale IL-6 Expression, bei gleicher Zellzahl und mRNA-Menge, niedriger war als nach 2h (2h Vehikelkontrolle: 0,93 rel. Expression $\pm$ 0,52 rel. Expression, 24h Vehikelkontrolle: 0,067 rel. Expression $\pm$ 0,047 rel. Expression). Jeweils ähnliche Tendenzen zeigten sich für die IL-1 β Expression nach 2 h bzw. 24 h Inkubation, es wurde jedoch in keinem Fall das Signifikanzniveau erreicht.

Anschließend wurde die IL-6 Menge im Zellkulturüberstand mittels Bio-Plex gemessen, um die Auswirkungen einer pharmakologischen Stimulation auf Proteinebene zu untersuchen.

Abb. 15 **A** zeigt, dass nach Stimulation (2h) von peritonealen Makrophagen mit dem A_{2B} -Agonisten BAY60-6583 sich die IL-6 Sekretion verglichen mit der Vehikel-Kontrolle ungefähr verdoppelt (Vehikel-Kontrolle: 2341 pg/ml $\pm$ 641,6pg/ml; BAY: 4710 pg/ml $\pm$ 1538pg/ml). Eine Behandlung mit dem G_q -Inhibitor FR900359 führte zwar zu einer verminderten IL-6 Produktion, erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung von Makrophagen gesehen, denen der A_{2B} -Rezeptor fehlte.

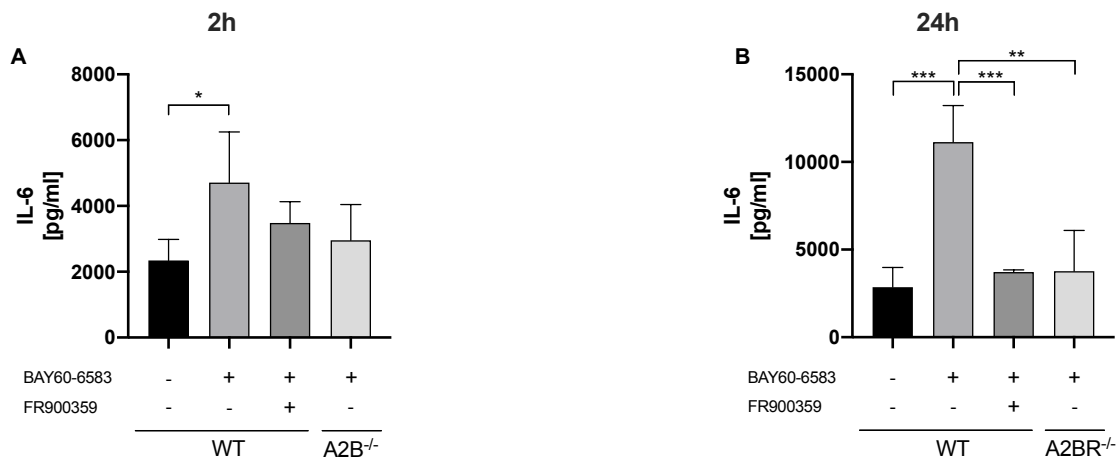


Abb. 15: IL-6 Proteingehalt in Zellkulturüberständen muriner Makrophagen. Thioglycolat-induzierte, murine Makrophagen wurden für zwei (A) bzw. 24 (B) Stunden mit 50 ng LPS/ml in Anwesenheit von 2,5 μ M des A_{2B}-Rezeptoragonisten BAY60-6583 und/oder dem G_q-Inhibitor FR900359 (1 μ M) stimuliert. Es wurden Makrophagen aus Wildtyp- und A2BR-Knockout-Tieren verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression bestimmt. Als Referenzgen diente der *Housekeeper* RPS9. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Nach Testung des Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way ANOVA* berechnet. n=4, WT= Wildtyp, A2BR^{-/-}: A2BR-Verlustmutante (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)

Ein deutlicheres Bild ergab sich nach 24h Inkubation (Abb. 15 B). Hier zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen: eine Inkubation mit BAY 60-6583 führt zu einer Steigerung der IL-6 Produktion um das 3,8 fache. Eine zusätzliche Hemmung des G_q-Signalweges reduzierte diese Produktion auf ein Drittel (p=0,0004).

Darüber hinaus war die IL-6 Produktion der A2BR^{-/-}-Makrophagen signifikant geringer als in identisch behandelten, wildtypischen Kontrollen (WT+A_{2B}R-Agonist: 1131 pg/ml $\pm$ 2085 pg/ml; A2BR^{-/-}+ A_{2B}R-Agonist: 3773 pg/ml $\pm$ 2318 pg/ml; p=0,003).

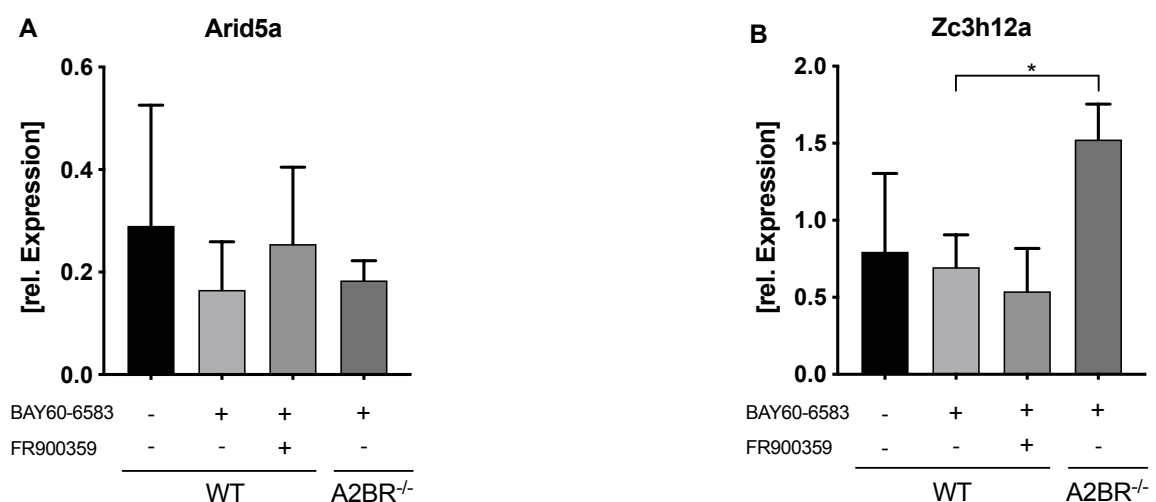
Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die über den A_{2B}-Rezeptor vermittelte IL-6 Produktion in Makrophagen über eine Aktivierung des G_q-Signalweges vermittelt wird.

3.5 Einfluss des A_{2B}R auf post-transkriptionelle Regulationsfaktoren von IL-6

Nachdem in Abschnitt 3.4 gezeigt wurde, dass der A_{2B}-Rezeptor über den G_q-Signalweg die IL-6 Produktion stimuliert, wurde in weiteren Experimenten der Einfluss einer A_{2B}-Stimulation auf die post-transkriptionellen Regulationsfaktoren von IL-6 untersucht. Im Einzelnen waren dies: Arid5a (*AT-rich interactive domain-containing protein 5A*), Regnase-1 (Gen: Zc3h12a), Ahr (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) sowie Hdc (Histidin-Decarboxylase). Arid5a stabilisiert die IL-6 mRNA und kann somit die IL-6 Produktion steigern. Die Regnase-1 bindet ebenfalls an die 3'UTR (untranslatierte Region) der IL-6 mRNA. Dies führt zu einer Destabilisierung und konsekutiv zu einer geringeren IL-6 Bildung [108]. Ahr beeinflusst den Histaminstoffwechsel durch Hemmung der Hdc, was zu einer niedrigeren IL-6 Produktion in Makrophagen führt [112, 113].

Da die Arid5a-Expression zwei Stunden nach LPS Stimulation das Maximum erreicht [108], wurden alle Faktoren zu diesem Zeitpunkt analysiert.

Abb. 16 zeigt, dass eine Stimulation des A_{2B}-Rezeptors keinen Einfluss auf die Expression der Gene Arid5a, Ahr und HDC hat. Lediglich das Gen Zc3h12a, welches Regnase-1 kodiert (Abbildung 16 **B**), steht möglicherweise unter dem Einfluss des A_{2B}-Rezeptors, da dessen Expression in A2BR^{-/-}-Makrophagen doppelt so hoch war wie in identisch behandelten Wildtyp-Kontrollen (p=0,01).



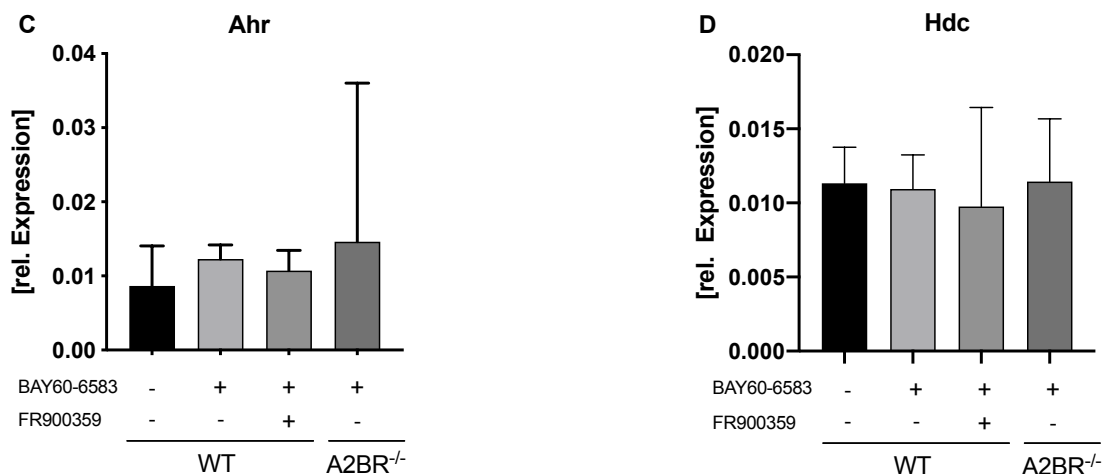


Abb. 16: Expression von Arid5a, Zc3h12a, Ahr und Hdc nach zweistündiger Inkubation. Thioglycolat-induzierte, murine Makrophagen wurden für zwei Stunden mit 50 ng LPS/ml in Anwesenheit von 2,5µM des A_{2B}-Rezeptoragonisten BAY60-6583 und/oder dem Gq-Inhibitor FR900359 (1µM) stimuliert. Es wurden Makrophagen aus Wildtyp- und A2BR-Knockout-Tieren verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression bestimmt. Als Referenzgen diente der *Housekeeper* RPS9. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Nach Testung des Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way ANOVA* berechnet. $n=4$, WT= Wildtyp, A2BR^{-/-}: A2BR-Verlustmutante, Arid5a: *AT-rich interactive domain-containing protein 5a*, Zc3h12a: Regnase-1, Ahr: Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, Hdc: Histidin-Decarboxylase (* $p < 0,05$)

Auch nach 24 Stunden (Abb. 17) zeigte sich, dass die Expression von Zc3h12a möglicherweise durch den A_{2B}-Rezeptor kontrolliert wird. Die Stimulation mit einem A_{2B}R-Agonisten führte zu einer Verminderung der Zc3h12a-Expression, wurde

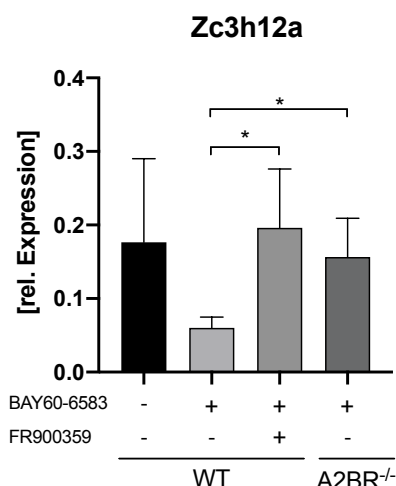


Abb. 17: Expression von Zc3h12a nach 24-stündiger Inkubation. Thioglycolat-induzierte, murine Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 50 ng LPS/ml in Anwesenheit von 2,5µM des A_{2B}-Rezeptoragonisten BAY60-6583 und/oder dem Gq-Inhibitor FR900359 (1µM) stimuliert. Es wurden Makrophagen aus Wildtyp- und A2BR-Knockout-Tieren verwendet. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression bestimmt. Als Referenzgen diente der *Housekeeper* RPS9. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Nach Testung des Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way ANOVA* berechnet. $n=4$, WT= Wildtyp, A2BR^{-/-}: A2BR-Verlustmutante, Zc3h12a: Regnase-1 (* $p < 0,05$)

zusätzlich der G_q -Signalweg gehemmt, kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Expression ($p=0,0427$). Des Weiteren war auch hier die Expression von Zc3h12a in A2BR^{-/-}-Makrophagen signifikant höher als in den Kontrollen ($p=0,0286$).

3.6 Die A_{2B}R- IL-6- Achse an humanen Immunzellen

Die bisherigen mechanistischen Studien zur Signaltransduktion von A_{2B}R wurden an Immunzellen der Maus durchgeführt. Ob sich ähnliche Mechanismen an humanen Immunzellen nachweisen lassen, wurde im Folgenden untersucht.

Zu diesem Zweck wurden aus dem peripheren Blut gesunder Spender unter Verwendung einer Dichtegradientenzentrifugation und durchflusszytometrischer Zellsortierung Monozyten sowie T- und B-Zellen isoliert. Diese Zellen wurden für 24h wie folgt stimuliert: Monozyten mit LPS, T-Zellen mit CD3/CD28 und B-Zellen mit CpG (CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin Oligonukleotide, welche über Stimulation des TLR9 B-Zellen aktivieren können [173]).

Die mittels quantitativer Real-Time-PCR erhobenen Daten für die Expression des A_{2B}-Rezeptors sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

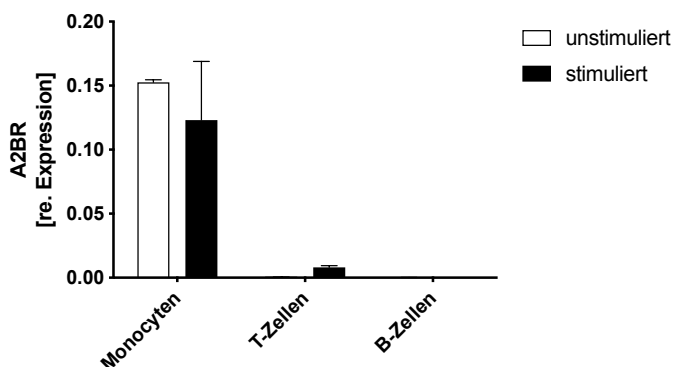


Abb. 18: Expression des A_{2B}-Rezeptors in humanen Immunzellen. Aus humanem Vollblut gesunder Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und FACS Monozyten, T- und B-Zellen isoliert. Anschließend wurden je 200.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Monozyten wurden für 24 h mit 100ng LPS inkubiert, die T-Zellen mit α CD3/CD28 beladenen *Dynabeads* und die B-Zellen mit 10 μ g/ml α IgM und 1 μ M CPG. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression bestimmt. Als Referenzgen diente der *Housekeeper* RPL13A. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. A2BR=A_{2B}-Rezeptor n=2

Wie man sieht, weisen die Monozyten sowohl stimuliert als auch unstimuliert die höchste A_{2B}-Rezeptor-Expression auf. Aus diesem Grund werden nachfolgend nur die Ergebnisse dargestellt, die mit Monozyten generiert wurden.

Einfluss der A_{2B}-Rezeptor-Stimulation auf die IL-6 und IL-1 β Expression humaner Monozyten

Wie man in Abb. 19 A sieht, führte eine zweistündige Stimulation humaner Monozyten mit BAY 60-6583 zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 und IL-1 β mRNA Expression (IL-1 β : $p=0,0231$; IL-6: $p=0,0312$), welche durch Einsatz des Gq-Inhibitors FR900359 in nicht signifikanten Maße herunterreguliert wurde.

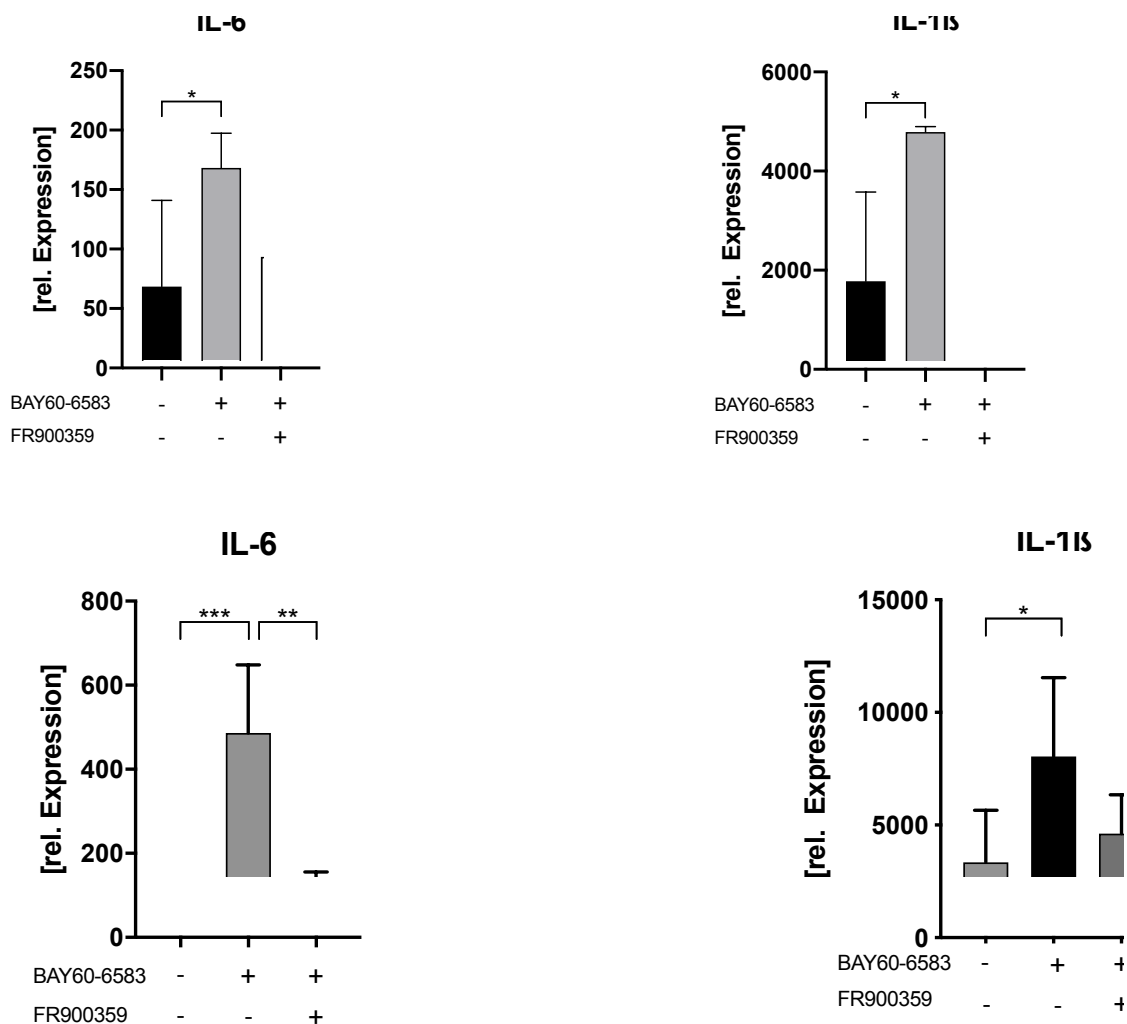


Abb. 19: Expression von IL-1 β und IL-6 in humanen Monozyten. Humane Monozyten wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für zwei (A) bzw. 24h (B) mit 100 ng LPS, 2,5 μ M des A_{2B}R-Agonisten und/oder 1 μ M des Gq-Inhibitors inkubiert. Es erfolgte eine Normalisierung der Genexpression am *Housekeeper* RPL13A. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way-ANOVA* berechnet. $n=3-6$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Wesentlich deutlichere Unterschiede zeigten sich nach 24h Inkubation: eine Stimulation der Monozyten mit dem A_{2B}R-Agonisten führte zu einem deutlichen Anstieg der IL-6 (IL-6: $p=0,0002$) und einer signifikanten Hemmung durch den G_q-Inhibitor ($p=0,0079$). Ähnliche Veränderungen fanden sich auch bei IL-1 β ; sie waren jedoch mit einer stärkeren Varianz behaftet.

Mit humanen B- und T-Zellen wurden analoge Versuche durchgeführt, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Abbildungen sind im Anhang (Suppl. 3) zu finden.

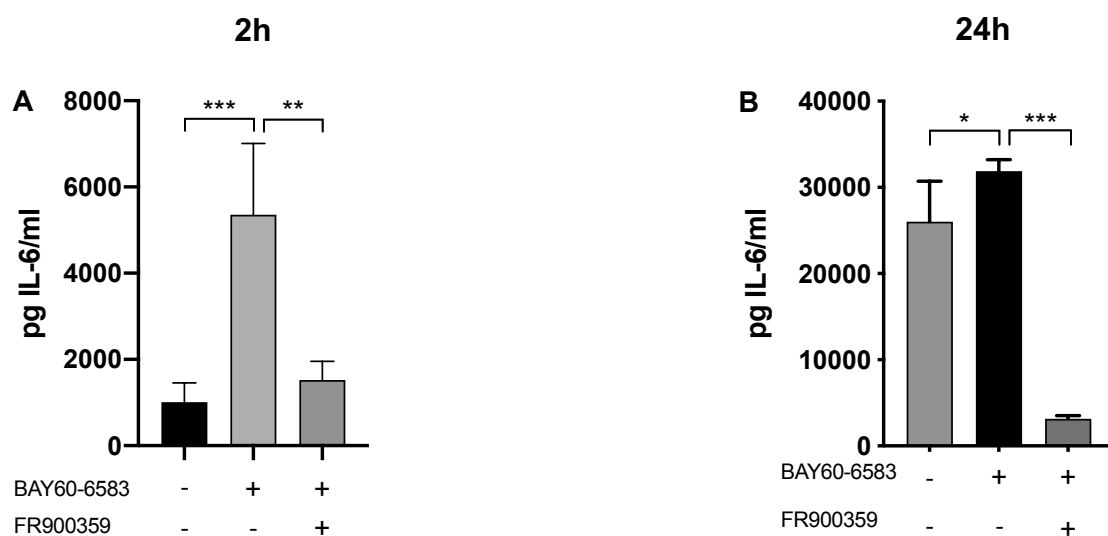


Abb. 20: IL-6 Spiegel in Zellkulturüberständen humaner Monozyten. Humane Monozyten gesunder Spender wurden für zwei (**A**) und 24 Stunden (**B**) mit 100ng LPS, 2,5 μ M BAY 60-6583 und/oder 1 μ M FR900359 inkubiert. Anschließend wurde in den Zellkulturüberständen mittels Bio-Plex der Interleukin-6 Gehalt bestimmt. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test wurde eine *One-way-ANOVA* berechnet. $n=4$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Wie in Abb. 20 dargestellt, ließen sich die auf Genebene beschriebenen Effekte für IL-6 auch auf Proteinebene nachweisen. Die BAY 60-6583-induzierte Steigerung der IL-6 Sekretion wurde sowohl nach zwei (**A**) als auch nach 24 Stunden (**B**) durch den G_q-Inhibitor FR900359 nahezu vollständig gehemmt (2h: $p= 0,0013$; 24h: $p<0,0001$).

3.6.2 Einfluss der A_{2B}R-Stimulation auf die Expression post-transkriptioneller Regulationsfaktoren von IL-6

Nachdem in Abschnitt 3.6.1 gezeigt wurde, dass der A_{2B}-Rezeptor auch in humanen Monozyten IL-6 stimuliert, stellte sich die Frage, ob auch in diesem System die post-transkriptionellen Regulationsfaktoren ZC3H12A, ARID5a, HDC sowie AHR eine Rolle spielen. Wie in früheren Versuchen (Abschnitt 3.5) erfolgte die Messung der Genexpression nach zweistündiger Inkubation.

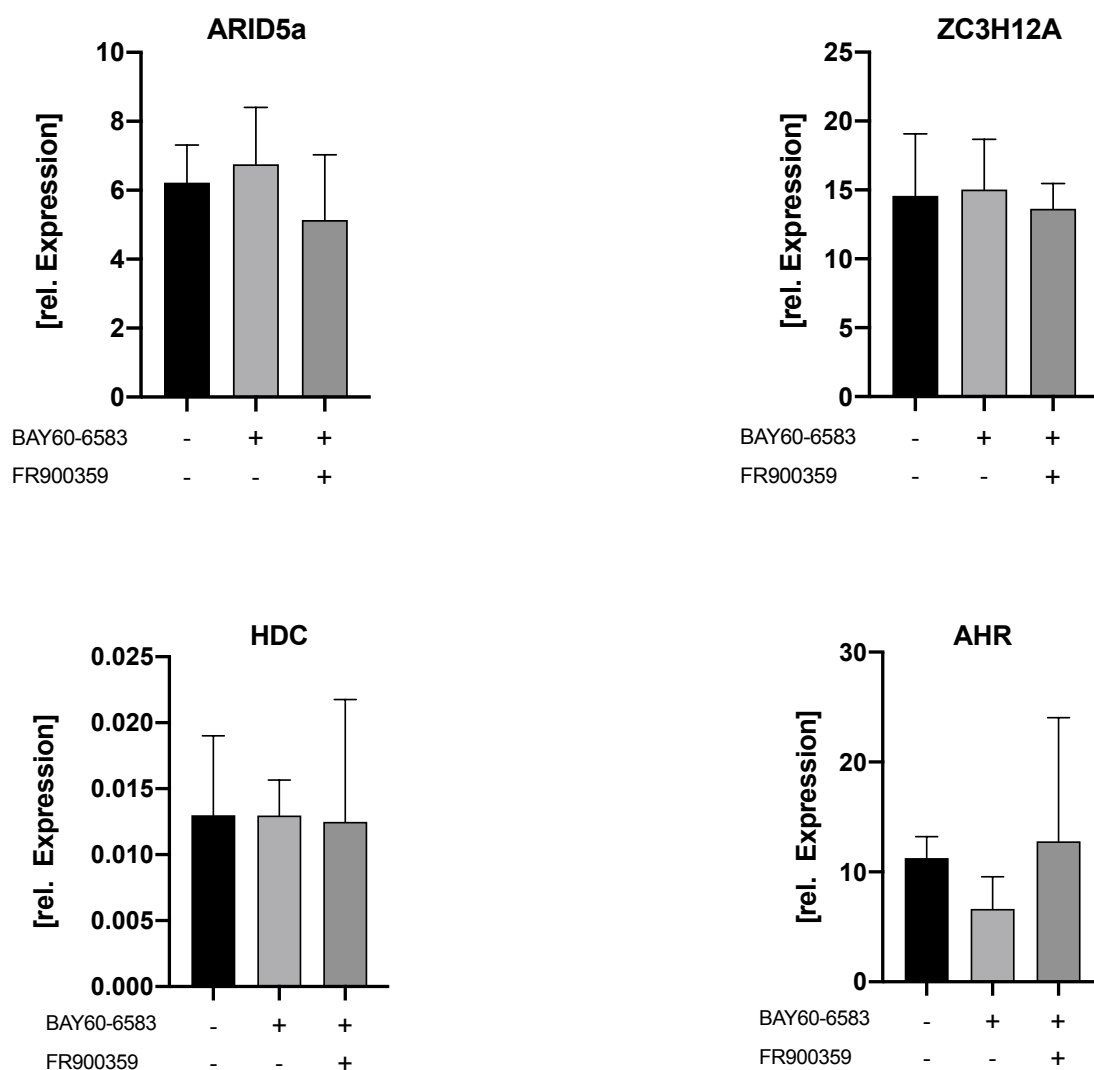


Abb. 21: Expression IL-6 regulierender Gene in humanen Monozyten. Humane Monozyten wurden aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert. Anschließend erfolgte eine zweistündige Stimulation mit 100ng LPS sowie 2,5µM BAY 60-6583 und/oder 1 µM FR900359. Nach RNA-Isolation und cDNA Synthese wurde die Expression der angezeigten Gene mittels quantitativer *Real-Time-PCR* bestimmt. Als Referenzgen wurde das *Housekeeping Gene* RPL13A verwendet. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Tests wurde eine *One-way-ANOVA* berechnet. n=4

In Abb. 21 wird sichtbar, dass eine kurzzeitige Stimulation (2h) des A_{2B}-Rezeptors keinen Effekt auf IL-6 regulierende Faktoren hat, was den Ergebnissen in murinen Makrophagen (siehe Abschnitt 3.5) entspricht.

Interessanterweise zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 24h (Abb. 22), dass BAY 60-6583 zu einer Hemmung der ZC3H12A-Expression führte ($p=0,02$), was durch Hemmung des G_q-Signalweges reversibel war, das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte.

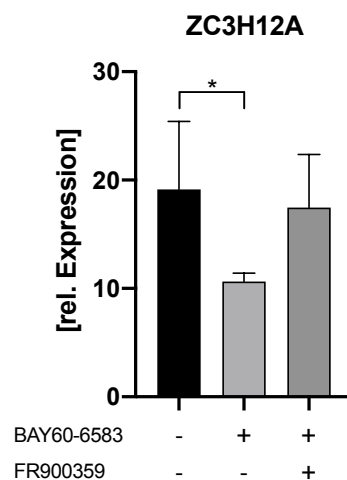


Abb. 22: ZC3H12A-Expression in humanen Monozyten. Humane Monozyten wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 24 h mit 100 ng LPS, 2,5 μ M BAY 60-6583 und/oder 1 μ M FR900359 inkubiert. Nach Isolation der RNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Nach Testung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet. $n=4$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, eine Langendorff-basierte Methode zu entwickeln, welche es erlaubt, über einen längeren Zeitraum Zytokine in koronaren Effluaten empfindlich und zuverlässig zu messen. Damit ist es möglich, die globale Zytokin-Bildung unter Kontrollbedingungen und nach Infarkt zu erfassen. Unter Verwendung eines transgenen Mausmodells (CD4/CD73^{-/-}) konnte gezeigt werden, dass das von der CD73 auf T-Zellen gebildete Adenosin quantitativ ausreichend ist, die IL-6 Produktion des Herzens zu modulieren. Diese Schlussfolgerung wird durch Messung der Freisetzungsrates von Purinverbindungen in das koronare Effluat unterstützt. Infarzierte Herzen von CD4/CD73^{-/-}-Mäusen setzten nämlich geringere Mengen an Adenosin und dessen Abbauprodukten Inosin und Hypoxanthin frei als wildtypische Kontrollen.

Ein weiterer wichtiger Befund war, dass eine pharmakologische Stimulation des A_{2B}-Rezeptors auf murinen, peritonealen Makrophagen sowie auf humanen Monozyten zu einer gesteigerten IL-6 Bildung führte. Diese Induktion konnte jeweils durch den hochspezifischen G_q-Inhibitor FR900359 antagonisiert werden und zeigt somit, dass das G_q-*Signaling* die A_{2B}-Rezeptor - induzierte Bildung von IL-6 vermittelt.

Schließlich ergaben sich in dieser Arbeit erste Hinweise darauf, dass die Aktivierung des A_{2B}R- G_q- Signalweges eine Verminderung der Expression von ZC3H12A, dem Gen das für das Enzyms Regnase-1 kodiert, bewirkte. Da Regnase-1 die IL-6 mRNA abbaut, könnte dies einen Mechanismus darstellen, wodurch die beobachtete Steigerung der IL-6 Produktion durch A_{2B}R-Stimulation zustande gekommen ist.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse das Vorhandensein einer CD73 - Adenosin - A_{2B}R - IL-6 Achse nahe, welche in Abb. 23 graphisch dargestellt ist.

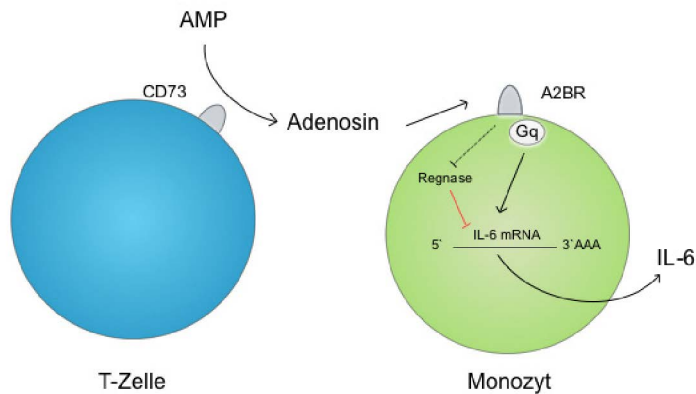


Abb. 23: Die CD73- A₂BR- IL-6- Achse.

4.1 Zytokinmessungen im koronaren Effluat mit einer Langendorff-basierten Methode

Um genaue Aussagen über die Zytokinausschüttung in infarzierten Herzen treffen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Langendorff-basierte Methode entwickelt, welche es erlaubt, Zytokine über einen längeren Zeitraum messen zu können (Protokoll siehe Abschnitt 2.13). Dieses Protokoll berücksichtigt mehrere Faktoren, welche zu einer Verzerrung der erhobenen Daten hätten führen können:

Zunächst wurde die Messung in zwei Abschnitte unterteilt, die Initial- (Minute 1-15) und die Gleichgewichtsphase (Minute 16-30), um einer Entnahme- bedingten Hypoxie und konsekutiv verstärkten Zytokinausschüttung Rechnung zu tragen. Es ist daher davon auszugehen, dass die in der Gleichgewichtsphase erhobenen Daten ein getreues Abbild der Zytokinfreisetzung infarzierter Herzen darstellen.

Des Weiteren wurde einem Abbau der Zytokine während des Sammelprozesses und der weiteren Analyse durch Verwendung eines Proteinase-Inhibitors entgegengewirkt. Um auch geringe Zytokinmengen sicher mittels Bio-Plex Technologie messen zu können, erfolgte einer Aufkonzentrierung der großvolumigen Proben. Schließlich wurden die Zytokinmengen auf das jeweilige Herzgewicht normalisiert, da davon auszugehen ist, dass größere Herzen mehr Immunzellen beinhalten und größere Zytokinmengen ausschütten.

Nicht berücksichtigt wurde ein Einfluss funktioneller Parameter, wie beispielsweise die Flussgeschwindigkeit, die Herzfrequenz oder Ejektionsfraktion. Diese könnten Variablen darstellen, welche die Zytokinausschüttung in das koronare Effluat mit beeinflussen.

In der Literatur finden sich nur wenige Protokolle zur Messung von Zytokinen in koronaren Effluaten. Diese unterscheiden sich in mehreren Punkten von dem hier verwendeten Protokoll. Sowohl Gilles et al. als auch Gurevitch et al. induzierten die kardialen Ischämien an der Langendorff-Apparatur [174, 175]. Dies hat zur Folge, dass im Wesentlichen die Zytokinausschüttung aus den Kardiomyozyten und vielleicht auch von residenten Immunzellen erfasst wird. Des Weiteren wurde im Gegensatz zu einer Herzinfarkt-bedingten, partiellen Ischämie eine globale Ischämie ausgelöst. Dies wird in unserem Protokoll durch Ligatur der *LAD* vermieden. Schließlich kommt es nach Induktion einer Ischämie *in vivo* über die Zeit zu einer Einwanderung von Immunzellen in das Herz, die das Infarktgeschehen wesentlich beeinflussen. Diese Komponente wird bei einer Ischämie am Langendorff-Herz nicht berücksichtigt. Erwähnt sei noch, dass in den genannten Publikationen lediglich TNF-alpha bestimmt wurde und nicht ein breiteres Spektrum an Zytokinen.

Übereinstimmend mit unseren Daten beobachteten auch Gilles und Gurevitch die größten Zytokinmengen unmittelbar nach Ischämie, sodass unsere Einteilung in zwei Phasen sinnvoll erscheint. Durch die Aufkonzentrierung der Proben und dem Sammeln über einem längeren Zeitraum entgeht die von uns durchgeführte Studie dem Problem von Gurevitch et al., die lediglich in der ersten Minute nach Ischämie Zytokine mittels ELISA detektieren.

Die von uns ausgearbeitete Methode ermöglicht somit die Messung der globalen Freisetzung von Zytokinen aus dem Herzen im koronaren Effluat. Darüber hinaus können Aussagen darüber getroffen werden, welche Zytokine vorzugsweise nach einem Herzinfarkt freigesetzt werden und mit welcher Kinetik diese Freisetzung erfolgt.

4.2 Die Deletion von CD73 auf T-Zellen führt zu einer geringeren Ausschüttung von Zytokinen in das koronare Effluat

Die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) ist von herausragender Bedeutung für die Regulation der Immunreaktion, da sie den Wechsel von einer ATP-bedingten pro-inflammatorischen zu einer Adenosin-bedingten anti-inflammatorischen Gewebsumgebung fördert [132]. Vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass insbesondere die T-zellspezifische CD73 eine wichtige Rolle in der Immunmodulation nach Herzinfarkt spielt [136].

In der vorliegenden Arbeit fand sich, dass ein Verlust von Adenosin, das von T-Zellen gebildet wird, in der Initialphase nach einem Infarkt zu einer signifikanten Verminderung der Freisetzung von IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-13, IL-17 sowie GM-CSF führt (Abb. 9). In der Gleichgewichtsphase war die Reduktion von IL-6, IL-9, MCP-1 sowie MIP-1 β noch signifikant (Abbildung 10). Diese Befunde sind insofern überraschend, als dass der allgemeinen Vorstellung entsprechend ein Verlust von CD73 zu einer Aggravation der Entzündung hätte führen sollen. Entsprechend wurde in zwei Studien gezeigt, dass T-Zellen, welche aus CD4/CD73^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, mehr Zytokine produzierten als die Kontrollen [136, 176]. In der Untersuchung von Borg et al. [136] wurde jedoch im Zellkulturüberstand der aus CD4/CD73- Verlustmutanten isolierten T-Zellen eine geringere IL-6 Menge gemessen, das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. Dies ist in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten, welche eine signifikant geringere IL-6 Ausschüttung in CD4/CD73^{-/-}-Mäusen zeigten (Abb. 9 und 10).

Die im koronaren Effluat gemessenen Veränderungen spiegelten sich jedoch nicht in den Plasmakonzentrationen wieder (Abbildung 12), sodass es sich wahrscheinlich um ein gewebespezifisches Phänomen zu handeln scheint. Blume et al. [177] wiesen im Serum von CD73^{-/-}-Tieren höhere Zytokinspiegel nach, im Nierengewebe waren diese Konzentrationen jedoch teilweise niedriger im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen. Für IL-6 fand sich in dieser Studie jedoch kein signifikanter Unterschied. Eine weitere Studie untersuchte die immunologischen Effekte eines globalen Verlustes der Ekto-5'-Nukleotidase [178] und fand, dass sich die in der Milz vorhandenen Immunzellpopulationen von CD73-Verlustmutanten zahlenmäßig teilweise signifikant von denen der Wildtypen unterschieden: so wurden in CD73^{-/-}-Tieren weniger NK-Zellen, Dendritische Zellen und Lymphozyten gemessen. Des Weiteren wurde im Serum der Verlustmutanten eine signifikant niedrigere IL-6 Konzentration gemessen, die Konzentrationen der übrigen gemessenen Zytokine unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. In Übereinstimmung mit unseren Daten zeigt diese Studie, dass CD73 die IL-6 Produktion beeinflusst und darüber Einfluss auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation nimmt.

IL-6 induziert die Bildung von Th17- und Th2-Zellen [41, 45]. Th17-Zellen stimulieren die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen und fördern die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [179]. In der vorliegenden Arbeit war die IL-6 Ausschüttung in den T-zellspezifischen CD73-Verlustmutanten signifikant geringer. Dies könnte zu einer verminderten Produktion von TH17- und Th2- Zellen führen und dadurch zu einer

verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Diese Schlussfolgerung wird dadurch unterstützt, dass in der Initialphase in den Effluaten der CD4/CD73^{-/-}-Tiere im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen signifikant weniger IL-17 und IL-2 (sezerniert von Th17- bzw. Th2-Zellen) gemessen wurde (Abb. 9).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Verlust der T-zellspezifischen CD73 nicht nur zu einer geringeren IL-6 Ausschüttung führt, sondern auch über eine Veränderung der Immunzellzusammensetzung im Herzen die Ausschüttung anderer Zytokine maßgeblich beeinflusst.

4.3 In CD4/CD73^{-/-}-Mäusen ist die Freisetzung von Purinverbindungen nach I/R reduziert

Nach einem ischämischen Ereignis wird ATP vermehrt aus den aktivierten bzw. geschädigten Zellen freigesetzt. ATP gilt als „Gefahrensignal“ der Zelle und vermittelt über P2-Rezeptoren im Wesentlichen eine pro-inflammatorische Wirkung [118]. Im Gegenzug kommt es nach einer Ischämie/Reperfusion zu einer Hochregulation von CD73 insbesondere auf Granulozyten und T-Zellen [135, 171]. Dies impliziert, dass das pro-inflammatorische ATP in das anti-inflammatorische Adenosin umgewandelt wird, was damit den Heilungsprozess einleitet. Die biologische Halbwertszeit von Adenosin ist nur kurz, da es zügig in die Abbauprodukte Inosin und Hypoxanthin umgewandelt wird [137].

In Übereinstimmung mit diesem allgemeinen Stoffwechselschema fand sich in der vorliegenden Arbeit nach einem Myokardinfarkt eine verminderte Freisetzung von Adenosin, Inosin und Hypoxanthin in das koronare Effluat, wenn CD73 auf T-Zellen in einem genetischen Mausmodell fehlte (Abb. 13). Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden von Bönner et al., die zeigten, dass die auf Leukozyten vorhandene CD73 eine wesentlich Determinante für die kardiale Adenosinbildung und den Heilungsprozess darstellt [171].

Interessanterweise fand sich aber auch, dass die ATP-Freisetzungsrates in das koronare Effluat von CD4/CD73^{-/-}-Mäusen reduziert war, auch wenn das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Verminderte ATP Spiegel könnten vielleicht erklären, warum in den CD73-Verlustmutanten geringere IL-1 β Mengen gemessen

wurden (Abb. 9 und 10), da ATP bekanntlich die Ausschüttung von IL-1 β über die Aktivierung des P2X7-Rezeptors induziert [180]. Es bleibt jedoch offen, über welchen Mechanismus die ATP-Freisetzung in den CD4/CD73^{-/-}-Tieren gehemmt wurde.

4.4 Die Stimulation des A_{2B}R führt G_q- abhängig zu einer vermehrten IL-6 Produktion in murinen, peritonealen Makrophagen und humanen Monozyten

Der A_{2B}-Rezeptor (A_{2B}R) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Bindet Adenosin an A_{2B}R, können sowohl das G_s- als auch das G_q- Protein aktiviert werden [143]. Das G_s-Protein steigert die Aktivität der Adenylatcyclase und fördert dadurch die Bildung von cAMP, welches die Proteinkinase A aktiviert. Eine Stimulation des G_q-Signalweges bewirkt eine Calciummobilisierung und eine Aktivierung der Proteinkinase C. Welcher Signalweg vorzugsweise bestritten wird, wird in der Literatur uneinheitlich beantwortet und könnte mit dem Zelltyp zusammenhängen. Es gibt nämlich sowohl Hinweise, dass die Hemmung des G_q-Signalweges die A_{2B}R-vermittelte IL-6 Bildung aufhebt [181, 182]; es gibt jedoch auch Studien, welche eine G_s-vermittelte IL-6 Produktion nachweisen konnten [183, 184].

Für murine, peritoneale Makrophagen und humane Monozyten zeigte sich in der jetzigen Studie ein identisches Bild: sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene führte eine pharmakologische Stimulation des A_{2B}R zu einer gesteigerten IL-6 Produktion, welche durch einen hochspezifischen G_q-Inhibitor (FR900359) gehemmt werden konnte. Dass es sich hier tatsächlich um einen A_{2B}R-vermittelten Effekt handelt, belegen Versuche mit peritonealen Makrophagen, die aus A_{2B}R Verlustmutanten gewonnen wurden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Stimulation des A_{2B}R Einfluss auf die IL-1 β mRNA Expression nimmt. An murinen, peritonealen Makrophagen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch kam es an humanen Monozyten A_{2B}R-abhängig zu einer signifikanten Steigerung der IL-1 β Expression (Abb. 19).

Übereinstimmend mit den jetzigen Ergebnissen zeigten auch andere Autoren, dass Makrophagen, welche aus A_{2B}R^{-/-}- Mäusen isoliert wurden, signifikant weniger IL-6

produzieren als wildtypische Kontrollen [166, 185]. Ryzhov et al. zeigten außerdem - in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Befunden - dass eine Stimulation von murinen, peritonealen Makrophagen mit dem nicht- selektiven $A_{2B}R$ -Agonisten NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosin) zu einer gesteigerten IL-6 Bildung führt [185]. Außerdem konnte in murinen Alveolarmakrophagen [186], pulmonalen und kardialen Fibroblasten [167, 187] sowie in dendritischen Zellen [172] eine $A_{2B}R$ -abhängige IL-6 Produktion beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten erstmals auf humanen Monozyten das Vorhandensein einer $A_{2B}R$ - G_q - IL-6 - Achse. Unter welchen Bedingungen diese Achse zum Tragen kommt ist bislang unklar. Es ist jedoch vorstellbar, dass in hypoxischem, humanen Gewebe die lokale Adenosin Konzentration hoch genug ist, um den niederaffinen $A_{2B}R$ zu aktivieren und darüber die IL-6 Bildung zu stimulieren. Auch ist denkbar, das pro-inflammatorische IL-6 nicht nur durch monoklonale Antikörper zu neutralisieren, sondern auch die IL-6 Bildung über Hemmstoffe von G_q bzw. des $A_{2B}R$ zu antagonisieren. Hier könnte ein neues therapeutisches Potential liegen.

4.5 Die Aktivierung des A_{2B} -Rezeptors führt zu einer Hemmung der Regnase-1

Bei dem Enzym Regnase-1 (Gen: ZC3H12A) handelt es sich um einen post-transkriptionellen Regulationsfaktor von IL-6. Durch Bindung an die IL-6 mRNA wird diese destabilisiert, wodurch die Translation beeinträchtigt wird und konsekutiv weniger IL-6 gebildet wird [110].

Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit, dass eine genetische Deletion des $A_{2B}R$ in murinen, peritonealen Makrophagen zu einer signifikant höheren Expression von Zc3h12a führt (Abb. 16 und 17). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass die IL-6 Expression in $A_{2B}R$ - Verlustmutanten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt ist. Allerdings führte eine $A_{2B}R$ Stimulation an Makrophagen von WT-Mäusen nach zweistündiger Stimulation zu keiner signifikanten Verminderung von Zc3h12a (Abbildung 16). Nach 24-stündiger Stimulation (Abb. 17) war ebenfalls keine signifikante Verminderung der Expression nachweisbar ($p=0,07$), es zeigte sich jedoch, dass eine Inkubation mit BAY60-6583 und dem G_q -Signalweg-Inhibitor zu

einem signifikanten Anstieg der Zc3h12a-Expression führte. Weiterhin konnte auch hier beobachtet werden, dass in Makrophagen aus A2BR^{-/-}-Tieren die Expression signifikant niedriger war als bei den WT-Kontrollen.

Auch bei humanen Monozyten kam es nach zwei Stunden nicht zu einer signifikanten Reduktion der ZC3H12A-Expression, nach 24 Stunden jedoch schon (Abb. 22). Diese Ergebnisse legen in Zusammenschau mit den im letzten Absatz diskutierten Ergebnissen die Vermutung nahe, dass eine Stimulation des A_{2B}R zu einer Aktivierung des G_q- Signalweges führt, welcher dann eine Hemmung der Regnase-1 bewirkt und dadurch die Produktion von IL-6 steigert.

Dieser mögliche Zusammenhang zwischen purinergem Stoffwechsel und Regnase-1 wird auch durch Daten der Literatur unterstützt. So berichten Nagahama et al., dass in Regnase-1^{-/-}- Tieren nach Induktion einer Colitis erhöhte ATP- und erniedrigte Adenosin-Werte messbar waren [188]. Interessanterweise kam es unter diesen Bedingungen auch zu einer Herunterregulation der CD73 und CD39. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass CD73 die Bildung der Regnase-1 negativ beeinflusst und dadurch die Produktion von IL-6 fördert. Dies könnte eine weitere Erklärung dafür sein, dass in den koronaren Effluaten der CD4/CD73-Verlustmutanten signifikant niedrigere IL-6 Werte gemessen wurden.

4.6 Ausblick

In den letzten Jahren konnte durch Einführung von Reperfusionstherapien durch perkutane Koronarintervention (PCI) die Letalität von Infarktpatienten deutlich reduziert werden. Diese Intervention hat eine Rekanalisierung der Koronararterien zum Ziel, um eine Versorgung des Myokards mit Sauerstoff sicherzustellen. Ein großes Problem stellt jedoch der sogenannte Reperfusionsschaden dar, der durch Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes zustande kommt. Dies führt dazu, dass insgesamt 50% des Myokardschadens nach abgelaufenem Myokardinfarkt und anschließender Rekanalisation durch die Reperfusion entsteht [189].

Insgesamt erscheint es sinnvoll, nicht nur eine Reperfusion des ischämischen Gebietes anzustreben, sondern auch direkt den Entzündungs- und Heilungsprozess zu beeinflussen. Hierbei darf es aber nicht das Ziel sein, die Entzündung global zu

hemmen. Es müssen vielmehr Schlüsselmoleküle identifiziert werden, welche den Heilungsprozess kritisch beeinflussen, um diese im Sinne einer „*targeted therapy*“ zu beeinflussen. Diese Therapiestrategie wird in der Onkologie bereits erfolgreich angewendet [190].

Adenosin und von ihm abgeleiteten biologischen Größen könnten ein solches therapeutisches Ziel darstellen. Es ist gut belegt, dass Adenosin für die Kardioprotektion von großer Bedeutung ist und im Rahmen eines experimentellen Myokardinfarktes die Infarktgröße reduzieren und das Überleben verbessern kann [119, 191]. In klinische Studien an Menschen fand sich allerdings kein eindeutiger Vorteil einer Adenosin-Therapie nach einem Myokardinfarkt [192-194]. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass die intravenöse Applikation von Adenosin schwere Nebenwirkungen wie Blutdruckabfall und Rhythmusstörungen zur Folge haben kann, was die therapeutische Konzentration bei systemischer Gabe deutlich einschränkt [145].

Es ist daher konzeptionell aussichtsreicher, die lokale Adenosinbildung zu beeinflussen, insbesondere die Adenosin-abhängige Bildung von IL6, die wahrscheinlich über die CD73 - Adenosin - A_{2B}R - G_q - Regnase-1 - IL-6 Achse wesentlich reguliert wird. Diese Achse stellt eine interessante Zielstruktur für eine zukünftige pharmakologische Intervention dar, insbesondere da IL-6 in der späteren Heilungsphase mit einer schlechteren Herzfunktion und erhöhten Mortalität assoziiert ist [94-96]. Die Regnase-1 kontrolliert die Translation von IL-6 und eine Studie zeigte bereits, dass ein Kardiomyozyten-spezifischer Regnase-1-Verlust IL-6- vermittelt eine ausgeprägte Entzündung und dilatative Kardiomyopathie zur Folge hat [195]. Vorstellbar ist, dass A_{2B}R-Antagonisten, G_q-Inhibitoren oder monoklonale Antikörper, die gegen IL-6 gerichtet sind, das pro-inflammatorische IL-6 reduzieren könnten und damit das Potential haben, die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach einem Infarkt günstig zu beeinflussen.

5 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, *Top 10 causes of death*, in *Global Health Observatory data*. 2018.
2. Hartley, A., et al., *Trends in Mortality From Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Europe: 1980 to 2009*. *Circulation*, 2016. **133**(20): p. 1916-26.
3. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(42): p. 3232-3245.
4. Puymirat, E., et al., *Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction*. *JAMA*, 2012. **308**(10): p. 998-1006.
5. Gale, C.P., et al., *Trends in hospital treatments, including revascularisation, following acute myocardial infarction, 2003-2010: a multilevel and relative survival analysis for the National Institute for Cardiovascular Outcomes Research (NICOR)*. *Heart*, 2014. **100**(7): p. 582-9.
6. Rainer Klinke, H.C.P., Armin Kurtz, Stefan Silbernagl, *Physiologie*. Vol. 6. Auflage. 2010: Georg Thieme Verlag.
7. al., G.A.e., *Duale Reihe Anatomie*. Vol. 2. Auflage. 2010: Georg Thieme Verlag.
8. al., G.H.e., *Innere Medizin*. 2019: Gerd Herold.
9. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. *Circulation*, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
10. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. *Circ Res*, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
11. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, 1995. **92**(3): p. 657-71.
12. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(2): p. 88-111.
13. Kubler, W. and P.G. Spieckermann, *Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 1970. **1**(4): p. 351-77.
14. Smith, G.L., et al., *Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart*. *J Physiol*, 1993. **472**: p. 11-22.
15. Garcia-Dorado, D., et al., *Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(2): p. 168-80.
16. Anderson, S.E., et al., *Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(6 Pt 1): p. C940-8.
17. Singh, R.B., et al., *The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(1): p. 101-10.
18. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. *Circulation*, 1977. **56**(5): p. 786-94.
19. Raedschelders, K., D.M. Ansley, and D.D. Chen, *The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(2): p. 230-55.
20. Whelan, R.S., V. Kaplinskiy, and R.N. Kitsis, *Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance*. *Annu Rev Physiol*, 2010. **72**: p. 19-44.

21. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2357-62.
22. Beg, A.A., *Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 509-12.
23. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 271-80.
24. Rossen, R.D., et al., *Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo*. Circ Res, 1988. **62**(3): p. 572-84.
25. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 609-34.
26. Lenardo, M.J. and D. Baltimore, *NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control*. Cell, 1989. **58**(2): p. 227-9.
27. Bond, M., A.H. Baker, and A.C. Newby, *Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **264**(2): p. 561-7.
28. Collier, B.S., *Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(4): p. 658-70.
29. Jones, S.P., et al., *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(5): p. H2196-201.
30. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
31. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.
32. Jung, K., et al., *Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts*. Circ Res, 2013. **112**(6): p. 891-9.
33. Troidle, L., et al., *Enhanced solute removal with intermittent, in-center, 8-hour nocturnal hemodialysis*. Hemodial Int, 2009. **13**(4): p. 487-91.
34. Leuschner, F. and M. Nahrendorf, *Novel functions of macrophages in the heart: insights into electrical conduction, stress, and diastolic dysfunction*. Eur Heart J, 2019.
35. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 3037-3047.
36. Bajpai, G., et al., *Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury*. Circ Res, 2019. **124**(2): p. 263-278.
37. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1611-22.
38. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 24-35.
39. Boag, S.E., et al., *T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia/reperfusion injury in patients*. J Clin Invest, 2015. **125**(8): p. 3063-76.
40. Hoffmann, J., et al., *High-throughput 13-parameter immunophenotyping identifies shifts in the circulating T-cell compartment following reperfusion in patients with acute myocardial infarction*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47155.

41. Kenneth Murphy, C.W.e.a., *Janeway Immunologie*. 9 ed. 2018.
42. Ait-Oufella, H., et al., *Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2014. **114**(10): p. 1640-60.
43. Santos-Zas, I., et al., *Adaptive Immune Responses Contribute to Post-ischemic Cardiac Remodeling*. *Front Cardiovasc Med*, 2018. **5**: p. 198.
44. Yan, X., et al., *Dectin-2 Deficiency Modulates Th1 Differentiation and Improves Wound Healing After Myocardial Infarction*. *Circ Res*, 2017. **120**(7): p. 1116-1129.
45. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 646-55.
46. Feng, W., et al., *IL-17 induces myocardial fibrosis and enhances RANKL/OPG and MMP/TIMP signaling in isoproterenol-induced heart failure*. *Exp Mol Pathol*, 2009. **87**(3): p. 212-8.
47. Sharabi, A., et al., *Regulatory T cells in the treatment of disease*. *Nat Rev Drug Discov*, 2018. **17**(11): p. 823-844.
48. Meng, X., et al., *Regulatory T cells in cardiovascular diseases*. *Nat Rev Cardiol*, 2016. **13**(3): p. 167-79.
49. Dobaczewski, M., et al., *CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(5): p. 2177-87.
50. Saxena, A., et al., *Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **307**(8): p. H1233-42.
51. Weirather, J., et al., *Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 55-67.
52. Tang, T.T., et al., *Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(1): p. 232.
53. Zacchigna, S., et al., *Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2432.
54. Xia, N., et al., *Activated regulatory T-cells attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury through a CD39-dependent mechanism*. *Clin Sci (Lond)*, 2015. **128**(10): p. 679-93.
55. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(12): p. 733-744.
56. Bassols, A. and J. Massague, *Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(6): p. 3039-45.
57. Edwards, D.R., et al., *Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor*. *EMBO J*, 1987. **6**(7): p. 1899-904.
58. Desmouliere, A., et al., *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*, 1993. **122**(1): p. 103-11.
59. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 349-63.
60. Virag, J.I. and C.E. Murry, *Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2433-40.
61. Lee, S.H., et al., *Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(9): p. 626-33.

62. van der Laan, A.M., J.J. Piek, and N. van Royen, *Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(8): p. 515-23.
63. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
64. Lerman, R.H., et al., *Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit*. Circ Res, 1983. **53**(3): p. 378-88.
65. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 563-81.
66. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
67. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
68. Netea, M.G., et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2324-35.
69. Herskowitz, A., et al., *Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium*. Am J Pathol, 1995. **146**(2): p. 419-28.
70. Loppnow, H. and P. Libby, *Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1*. Cell Immunol, 1989. **122**(2): p. 493-503.
71. Loppnow, H. and P. Libby, *Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 731-8.
72. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
73. Guillen, I., et al., *Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 2): p. R229-35.
74. Thaik, C.M., et al., *Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 1093-9.
75. Abbate, A., et al., *Interleukin-1 blockade with anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot study)*. Am J Cardiol, 2010. **105**(10): p. 1371-1377 e1.
76. Hwang, M.W., et al., *Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1546-53.
77. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
78. Pallas Beneyto, L.A., et al., *[Prognostic value of interleukin 6 for death of patients with sepsis]*. Med Clin (Barc), 2016. **147**(7): p. 281-6.
79. Turnier, J.L. and H.I. Brunner, *Tocilizumab for treating juvenile idiopathic arthritis*. Expert Opin Biol Ther, 2016. **16**(4): p. 559-66.
80. Mehta, P., et al., *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*. Lancet, 2020. **395**(10229): p. 1033-1034.
81. Mazzitelli, M., et al., *Use of subcutaneous tocilizumab in patients with COVID-19 pneumonia*. J Med Virol, 2020.

82. Fujio, Y., et al., *Glycoprotein 130 cytokine signal as a therapeutic target against cardiovascular diseases*. J Pharmacol Sci, 2011. **117**(4): p. 213-22.
83. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
84. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1237-47.
85. Libby, P. and V.Z. Rocha, *All roads lead to IL-6: A central hub of cardiometabolic signaling*. Int J Cardiol, 2018. **259**: p. 213-215.
86. Barkhausen, T., et al., *Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model*. Crit Care Med, 2011. **39**(6): p. 1407-13.
87. Rincon, M., et al., *Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 461-9.
88. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
89. Ichiyama, K., et al., *Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17003-8.
90. Castell, J.V., et al., *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes*. FEBS Lett, 1989. **242**(2): p. 237-9.
91. Ridker, P.M., *From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection*. Circ Res, 2016. **118**(1): p. 145-56.
92. Yudkin, J.S., et al., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* Atherosclerosis, 2000. **148**(2): p. 209-14.
93. Gabriel, A.S., et al., *IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure*. Eur J Intern Med, 2004. **15**(8): p. 523-528.
94. Terrell, A.M., et al., *Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart*. Shock, 2006. **26**(3): p. 226-34.
95. Wollert, K.C., et al., *Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9535-45.
96. Wollert, K.C. and H. Drexler, *The role of interleukin-6 in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(2): p. 95-103.
97. Zamani, P., et al., *Inflammatory biomarkers, death, and recurrent nonfatal coronary events after an acute coronary syndrome in the MIRACL study*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(1): p. e003103.
98. Collaboration, I.R.G.C.E.R.F., et al., *Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1205-13.
99. Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis, C., et al., *The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1214-24.
100. Ridker, P.M., et al., *Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. Eur Heart J, 2018. **39**(38): p. 3499-3507.

101. Kobara, M., et al., *Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 424-30.
102. Kleveland, O., et al., *Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial*. Eur Heart J, 2016. **37**(30): p. 2406-13.
103. Carroll, M.B., C. Haller, and C. Smith, *Short-term application of tocilizumab during myocardial infarction (STAT-MI)*. Rheumatol Int, 2018. **38**(1): p. 59-66.
104. Anstensrud, A.K., et al., *Rationale for the ASSAIL-MI-trial: a randomised controlled trial designed to assess the effect of tocilizumab on myocardial salvage in patients with acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI)*. Open Heart, 2019. **6**(2): p. e001108.
105. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
106. Matsusaka, T., et al., *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10193-7.
107. Gingerich, T.J., J.J. Feige, and J. LaMarre, *AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**(1): p. 49-63.
108. Masuda, K., et al., *Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(23): p. 9409-14.
109. Zhou, L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction*. Circ Res, 2006. **98**(9): p. 1177-85.
110. Liang, J., et al., *A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6337-46.
111. Iwasaki, H., et al., *The IkappaB kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1167-75.
112. Masuda, K., et al., *Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages*. Int Immunol, 2011. **23**(10): p. 637-45.
113. Matsushita, K., et al., *Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1185-90.
114. Berg JM, T.J., & Stryer L, *Biochemie*. 5. Auflage ed. 2003, Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag
115. Burnstock, G., *Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future*. Bioessays, 2012. **34**(3): p. 218-25.
116. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(3): p. 201-12.
117. Heinrich C., M.M., Graeve L., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin.
118. Trautmann, A., *Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal"*. Sci Signal, 2009. **2**(56): p. pe6.
119. Burnstock, G. and A. Pelleg, *Cardiac purinergic signalling in health and disease*. Purinergic Signal, 2015. **11**(1): p. 1-46.

120. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
121. Schenk, U., et al., *Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels*. Sci Signal, 2008. **1**(39): p. ra6.
122. Eltzschig, H.K., et al., *ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1100-8.
123. Burnstock, G., *Introduction: P2 receptors*. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(8): p. 793-803.
124. Hattori, M. and E. Gouaux, *Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 207-12.
125. Erb, L. and G.A. Weisman, *Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways*. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal, 2012. **1**(6): p. 789-803.
126. Elliott, M.R., et al., *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 282-6.
127. Kukulski, F., S.A. Levesque, and J. Sevigny, *Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling*. Adv Pharmacol, 2011. **61**: p. 263-99.
128. Kukulski, F., et al., *Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8*. Purinergic Signal, 2005. **1**(2): p. 193-204.
129. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Sträter, *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 437-502.
130. Sträter, N., *Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships*. Purinergic Signal, 2006. **2**(2): p. 343-50.
131. Zimmermann, H., *5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects*. Biochem J, 1992. **285** (Pt 2): p. 345-65.
132. Antonioli, L., et al., *CD39 and CD73 in immunity and inflammation*. Trends Mol Med, 2013. **19**(6): p. 355-67.
133. Eltzschig, H.K., et al., *Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3986-92.
134. Koszalka, P., et al., *Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 814-21.
135. Bonner, F., et al., *Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34730.
136. Borg, N., et al., *CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming*. Circulation, 2017. **136**(3): p. 297-313.
137. Hesse, J., et al., *CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction*. FASEB J, 2017. **31**(7): p. 3040-3053.
138. Cabrita, M.A., et al., *Molecular biology and regulation of nucleoside and nucleobase transporter proteins in eukaryotes and prokaryotes*. Biochem Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 623-38.
139. Noji, T., A. Karasawa, and H. Kusaka, *Adenosine uptake inhibitors*. Eur J Pharmacol, 2004. **495**(1): p. 1-16.
140. Antonioli, L., et al., *Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(4): p. 566-74.

141. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 1-34.
142. Klinger, M., M. Freissmuth, and C. Nanoff, *Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins*. Cell Signal, 2002. **14**(2): p. 99-108.
143. Feoktistov, I. and I. Biaggioni, *Adenosine A2B receptors*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(4): p. 381-402.
144. Ely, S.W. and R.M. Berne, *Protective effects of adenosine in myocardial ischemia*. Circulation, 1992. **85**(3): p. 893-904.
145. Karow T., L.-R.R., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2019*. Vol. 27. Auflage. 2018, Köln, Deutschland: Karow T. .
146. Cronstein, B.N., et al., *Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2201-6.
147. Takahashi, H.K., et al., *Effects of adenosine on adhesion molecule expression and cytokine production in human PBMC depend on the receptor subtype activated*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(6): p. 816-22.
148. Belardinelli, L., et al., *The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(3): p. 1066-73.
149. Csoka, B., et al., *A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2685-95.
150. Glover, D.K., et al., *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, 2005. **288**(4): p. H1851-8.
151. Lasley, R.D., M.S. Jahania, and R.M. Mentzer, Jr., *Beneficial effects of adenosine A(2a) agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(4): p. H1660-6.
152. Fredholm, B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1315-23.
153. Fredholm, B.B., et al., *Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells*. Biochem Pharmacol, 2001. **61**(4): p. 443-8.
154. Eckle, T., et al., *Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1581-90.
155. Maas, J.E., et al., *Evidence that the acute phase of ischemic preconditioning does not require signaling by the A2B adenosine receptor*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(5): p. 886-93.
156. Eckle, T., et al., *Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 774-82.
157. Seo, S.W., et al., *Differential Tissue-Specific Function of Adora2b in Cardioprotection*. J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1732-43.
158. Koeppen, M., et al., *Adora2b signaling on bone marrow derived cells dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Anesthesiology, 2012. **116**(6): p. 1245-57.
159. Toldo, S., et al., *GS-6201, a selective blocker of the A2B adenosine receptor, attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in the mouse*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **343**(3): p. 587-95.

160. Zhang, H., et al., *Blockade of A2B adenosine receptor reduces left ventricular dysfunction and ventricular arrhythmias 1 week after myocardial infarction in the rat model*. Heart Rhythm, 2014. **11**(1): p. 101-9.
161. Wakeno, M., et al., *Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats*. Circulation, 2006. **114**(18): p. 1923-32.
162. Liang, B.T. and K.A. Jacobson, *A physiological role of the adenosine A3 receptor: sustained cardioprotection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6995-9.
163. Chanyshv, B., et al., *Anti-ischemic effects of multivalent dendrimeric A(3) adenosine receptor agonists in cultured cardiomyocytes and in the isolated rat heart*. Pharmacol Res, 2012. **65**(3): p. 338-46.
164. Zhong, H., et al., *Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 338-45.
165. Sajjadi, F.G., et al., *Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3435-42.
166. Alter, C., et al., *A2bR-dependent signaling alters immune cell composition and enhances IL-6 formation in the ischemic heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019. **317**(1): p. H190-H200.
167. Feng, W., et al., *Stimulation of adenosine A(2B) receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC-delta-P38 signalling pathway*. Br J Pharmacol, 2010. **159**(8): p. 1598-607.
168. Neumann, F.-J., et al., *Cardiac Release of Cytokines and Inflammatory Responses in Acute Myocardial Infarction*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 748-755.
169. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. 1895.
170. Aziz, N., et al., *Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions*. Cytokine, 2016. **84**: p. 17-24.
171. Bonner, F., et al., *Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling*. Circ Res, 2013. **113**(3): p. 301-12.
172. Wilson, J.M., et al., *The A2B adenosine receptor promotes Th17 differentiation via stimulation of dendritic cell IL-6*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6746-52.
173. Huggins, J., et al., *CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27-naïve human B cells*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1611-9.
174. Gilles, S., et al., *Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 608-16.
175. Gurevitch, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion*. J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(1): p. 247-52.
176. Quast, C., et al., *Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure*. Circ Heart Fail, 2017. **10**(4).
177. Blume, C., et al., *Autoimmunity in CD73/Ecto-5'-nucleotidase deficient mice induces renal injury*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37100.
178. Adam, T., et al., *In Vivo Immunological Effects of CD73 Deficiency*. Cell Physiol Biochem, 2019. **52**(5): p. 1192-1202.
179. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(6): p. 652-7.
180. Dubyak, G.R., *P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells*. Cell Microbiol, 2012. **14**(11): p. 1697-706.

181. Rees, D.A., et al., *Adenosine-induced IL-6 expression in pituitary folliculostellate cells is mediated via A2b adenosine receptors coupled to PKC and p38 MAPK*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(4): p. 764-72.
182. Merighi, S., et al., *A2B adenosine receptors stimulate IL-6 production in primary murine microglia through p38 MAPK kinase pathway*. Pharmacol Res, 2017. **117**: p. 9-19.
183. Carapau, D., et al., *Transcriptome profile of dendritic cells during malaria: cAMP regulation of IL-6*. Cell Microbiol, 2007. **9**(7): p. 1738-52.
184. Kiriya, Y., et al., *Protein kinase A-dependent IL-6 production induced by calcitonin in human glioblastoma A172 cells*. J Neuroimmunol, 1997. **76**(1-2): p. 139-44.
185. Ryzhov, S., et al., *Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(2): p. 694-700.
186. Pedroza, M., et al., *Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22667.
187. Zhong, H., et al., *Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(1): p. 2-8.
188. Nagahama, Y., et al., *Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(43): p. 11036-11041.
189. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
190. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(1): p. 3-20.
191. Gile, J. and T. Eckle, *ADORA2b Signaling in Cardioprotection*. J Nat Sci, 2016. **2**(10).
192. McIntosh, V.J. and R.D. Lasley, *Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant?* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2012. **17**(1): p. 21-33.
193. Ross, A.M., et al., *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(11): p. 1775-80.
194. Kloner, R.A., et al., *Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial*. Eur Heart J, 2006. **27**(20): p. 2400-5.
195. Omiya, S., et al., *Cytokine mRNA Degradation in Cardiomyocytes Restrains Sterile Inflammation in Pressure Overloaded Hearts*. Circulation, 2020.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierung CD4⁺-Zellen in Abhängigkeit von Zytokinen.	6
Abb. 2: Regulation der IL-6mRNA.	113
Abb. 3: Extrazellulärer Purinmetabolismus	15
Abb. 4: Signaltransduktion der Adenosin-Rezeptoren.	17
Abb. 5: Aufbau des Gradienten vor und nach der Zentrifugation	132
Abb. 6: Proteinkonzentration in koronaren Effluaten isolierter, Herzen aus WT-Mäusen.	41
Abb. 7: Einfluss des Proteinase-Inhibitors auf die Konzentrationen von Zytokinen in koronaren Effluaten von normoxisch perfundierten Kontrollherzen	42
Abb. 8: Zytokinspiegel in koronaren Effluaten in Sham- und Infarkttieren drei Tage postoperativ.	44
Abb. 9: Zytokinkonzentrationen in koronaren Effluaten von Wildtyp und CD4/CD73^{-/-}-Tieren an Tag 3 nach Infarkt.	45
Abb. 10: Zytokinspiegel in koronaren Effluaten in der Gleichgewichtsphase.	46
Abb. 11: Zytokinplasmaspiegel drei Tage postoperativ.	47
Abb. 12: Zytokinplasmaspiegel wildtypischer und CD4/CD73-Verlustmutanten drei Tage postoperativ	48
Abb. 13: Freisetzung von Purinverbindungen in das koronare Effluat von WT- und CD4/CD73^{-/-} - Tieren im isoliert perfundierten Herzen drei Tage nach I/R.	49
Abb. 14: IL-6 und IL-1β Expression in isolierten murinen, peritonealen Makrophagen.	50
Abb. 15: IL-6 Proteingehalt in Zellkulturüberständen muriner Makrophagen.	52
Abb. 16: Expression von Arid5a, Zc3h12a, Ahr und Hdc nach zweistündiger Inkubation.	53
Abb. 17: Expression von Zc3h12a nach 24-stündiger Inkubation	54
Abb. 18: Expression des A_{2B}-Rezeptors in humanen Immunzellen.	55
Abb. 19: Expression von IL-1β und IL-6 in humanen Monozyten.	56
Abb. 20: IL-6 Spiegel in Zellkulturüberständen humaner Monozyten.	57
Abb. 21: Expression IL-6 regulierender Gene in humanen Monozyten.	58
Abb. 22: ZC3H12A-Expression in humanen Monozyten.	59

Abb. 23: Die CD73- A₂B_R- IL-6- Achse.	61
---	-----------

7 Tabellenverzeichnis

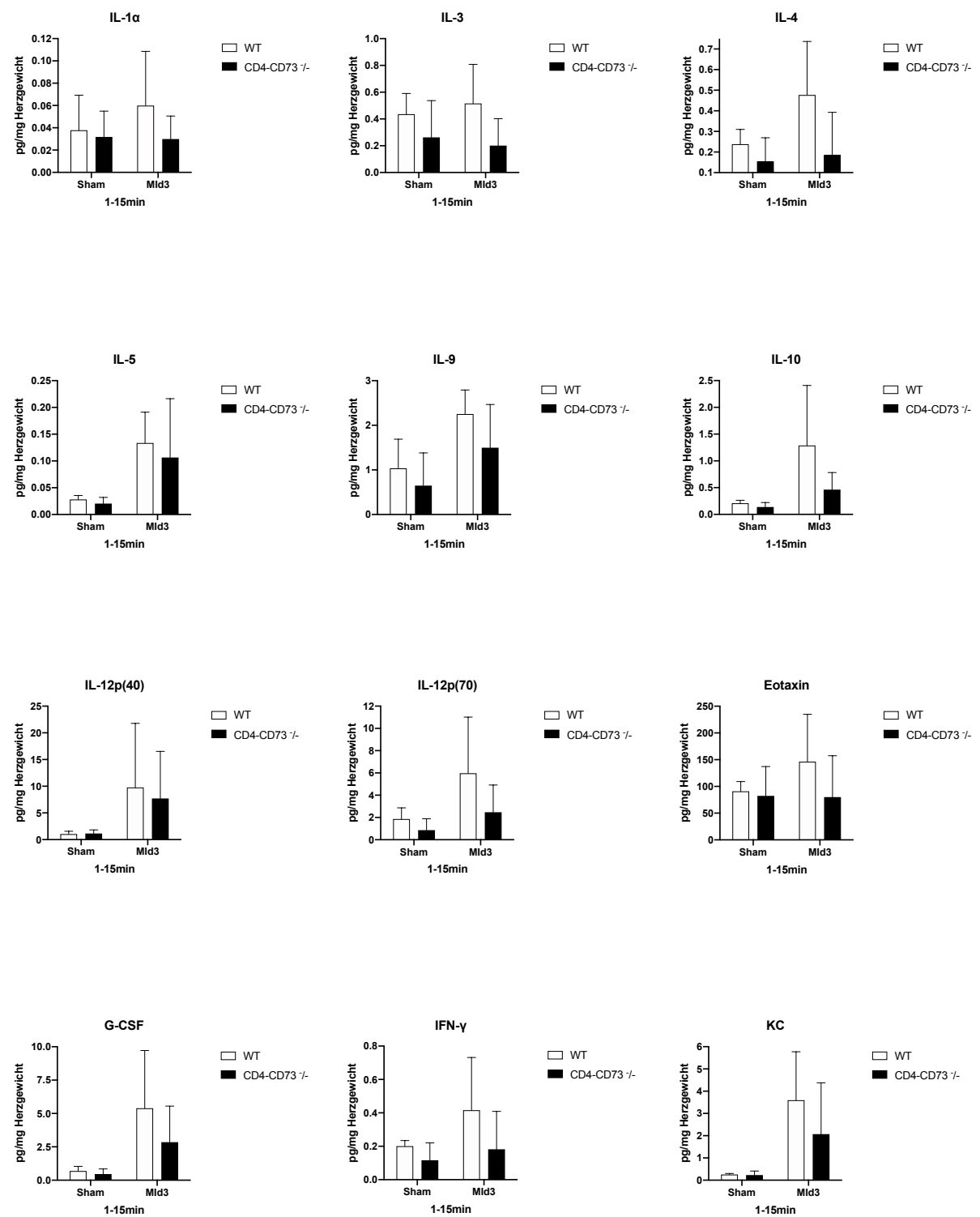
Tabelle 1: verwendete Geräte und Typenbezeichnung	21
Tabelle 2: verwendete Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen	22
Tabelle 3: verwendete Chemikalien und Bezugsquellen	24
Tabelle 4: verwendete Antikörper und Bezugsquellen	24
Tabelle 5: verwendete Taq-Man-Assays	24
Tabelle 6: verwendete kommerzielle Kits und Bezugsquellen	25
Tabelle 7: verwendete Puffer und Medien	26
Tabelle 8: Antikörper-Färbung humaner PBMCs	33
Tabelle 9: Reaktionsvolumen Real-Time-PCR	36

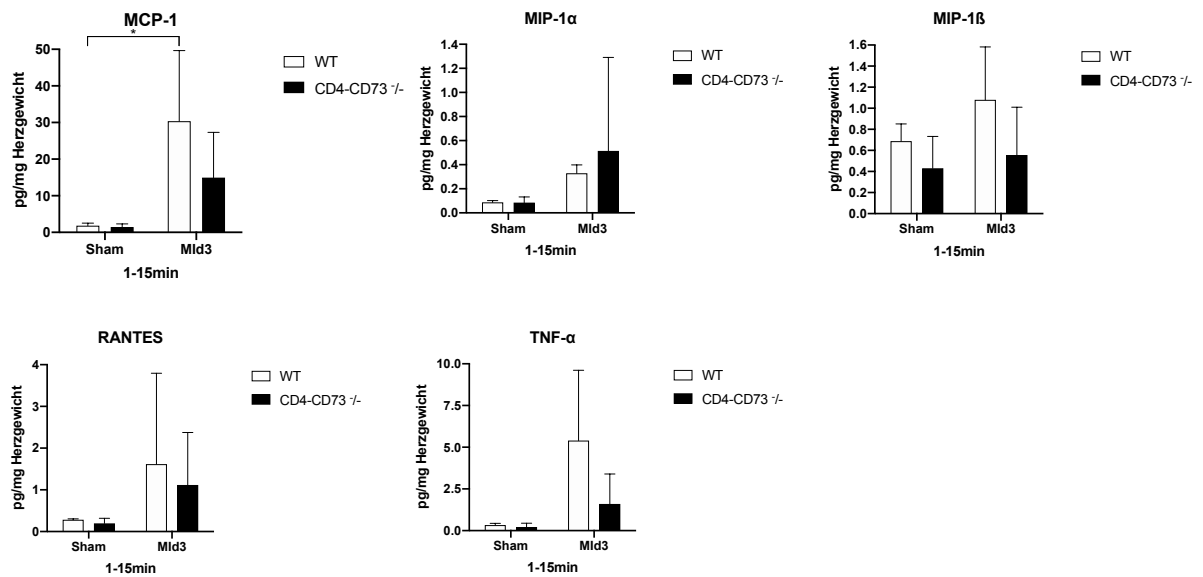
8 Anhang

Tabelle 10: Molekulargewichte der gemessenen Zytokine

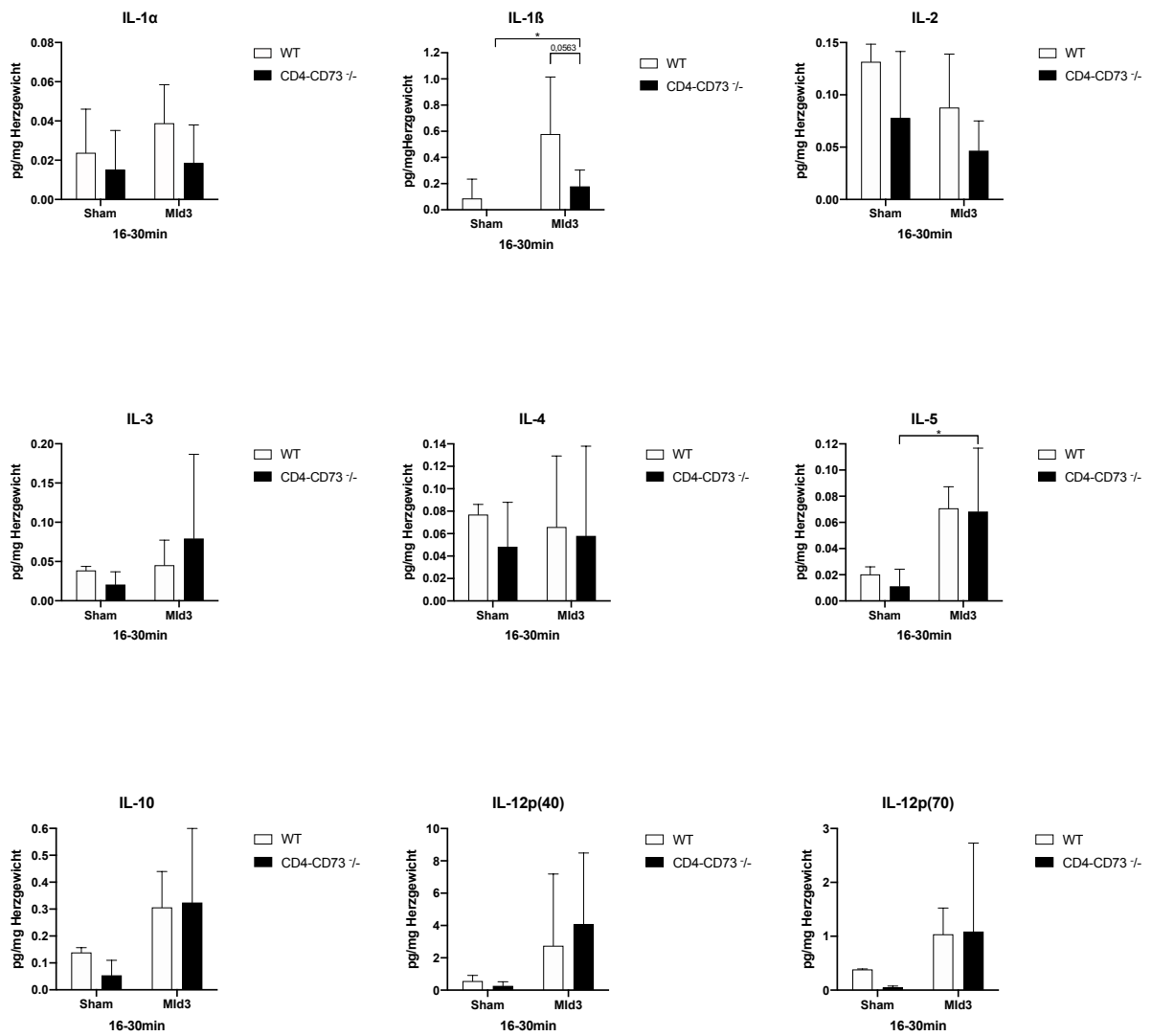
IL-1 α	31,0247kD
IL-1 β	30,9318 kD
IL-2	19,4008 kD
IL-3	18,541199 kD
IL-4	15,8342 kD
IL-5	15,4104 kD
IL-6	24,385 kD
IL-9	16,0751 kD
IL-10	20,641901 kD
IL-12p40	38 kD
IL-12p70	57,5 kD
IL-13	14,108 kD
IL-17	30,2 kD
Eotaxin	10,893701 kD
G-CSG	22,4223 kD
GM-CSF	15-19 kD
IFN γ	17,9078 kD
KC	10,254701 kD
MCP-1 (MCAF)	16,3266 kD
MIP-1 α	7,9 kD
MIP-1 β	7,8 kD
RANTES	8 kD
TNF- α	25,896301 kD

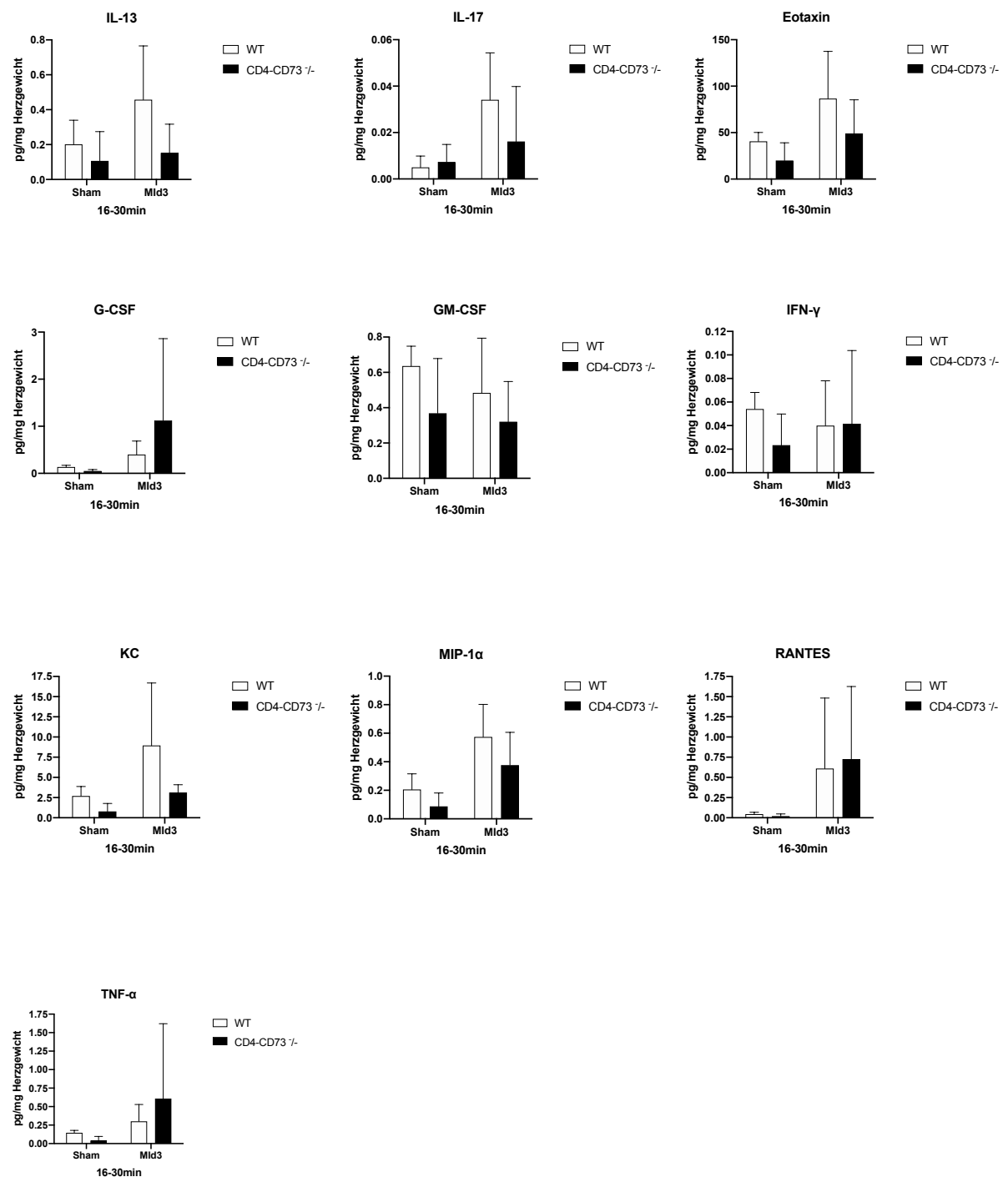
Suppl. 1: koronare Effluat in der Initialphase (1-15min)



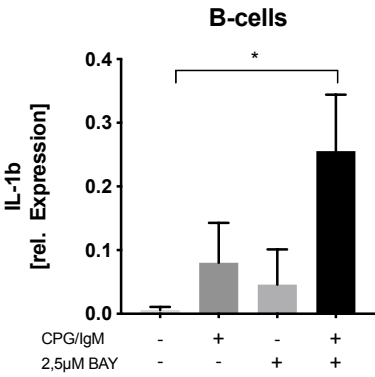


Suppl. 2: koronare Effluat in der Gleichgewichtsphase (16-30min)

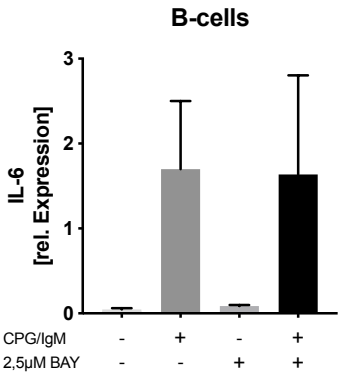




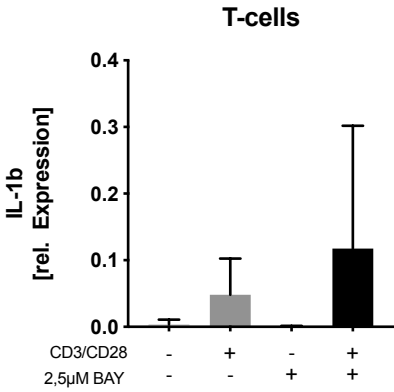
Suppl. 3: IL-6 und IL-1 β Expression in humanen B- und T-Zellen



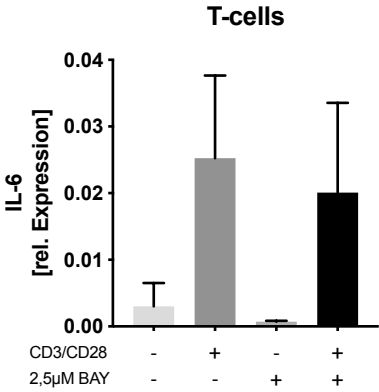
n=2-4



n=4



n=4



n=4

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Schrader für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Außerdem vielen Dank für die stets sehr gute Betreuung sowie die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit auf einem Kongress vorstellen zu können.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Scheller für die Übernahme der Co-Betreuung als auch für die fachlichen Anregungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christina Alter für die Übernahme meiner Betreuung. Danke für die große Geduld und Unterstützung sowie für die hilfreichen Ratschläge, wenn etwas mal nicht funktioniert hat.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Molekulare Kardiologie, die mir immer große Hilfsbereitschaft entgegengebracht und stets Blut gespendet haben. Vielen Dank für die schöne Zeit. Insbesondere möchte ich mich noch bei Herrn Dr. Ding für die zahlreichen Infarkt-Tiere und bei Herrn Bodo Steckel für die UPLC-Analysen bedanken.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Katharina Raba aus der Core Flow Cytometry Facility des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Hilfe bei der Zellsortierung danken.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden für die tolle Zeit während des Studiums und die moralische Unterstützung. Vielen Dank an Wiebke und Vero für das Korrekturlesen.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie. Danke für den starken Rückhalt, die liebevolle Unterstützung und dass ihr immer für mich da seid.