

**Einfluss eines veränderten angeborenen Immunstatus auf
die Immunzellinfiltration und Heilung nach
Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patricia Kleimann

aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2024

aus dem Institut für Molekulare Kardiologie,
in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Kardiovaskuläre Bildgebung,
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme
2. Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2025

*„In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen nicht irre machen
läßt und die Probleme zu ehren weiß.“ - Johann Wolfgang von Goethe*

Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt (MI) und seine Folgeerkrankungen, wie z.B. die Herzinsuffizienz, zählen immer noch zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Dank einer verbesserten Akutversorgung, z.B. durch die perkutane Koronarintervention (PCI), wurde die frühe Mortalität des MI stark reduziert. Jedoch entwickelt eine nicht unerhebliche Anzahl Menschen nach einem MI über die Zeit ein Herzversagen, dessen Hintergründe bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnten. Es gibt allerdings Hinweise, dass ein immunologisches Ungleichgewicht im angeborenen Immunsystem mit einer verstärkten proinflammatorischen Reaktion daran beteiligt sein könnte. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass neben T- und B-Zellen auch Immunzellen der angeborenen Immunantwort wie z.B. Monozyten, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten ein Gedächtnis ausbilden können, welches auf epigenetischen sowie metabolischen Veränderungen basiert. Bei Restimulation zeigen diese Immunzellen eine langfristig verstärkte Reaktionen, was als *Trained innate immunity* (TII) bezeichnet wird. TII kann sowohl durch verschiedene exogene (z.B. Viren, Bakterien, Parasiten) als auch endogene (z.B. oxidiertes *Low-Density*-Lipoprotein, Hormone, Harnsäure) Faktoren ausgelöst werden. Um experimentell einen TII-Phänotyp zu induzieren, werden häufig β -Glucane eingesetzt, bei denen es sich um Polysaccharide handelt, die u.a. in den Zellwänden von Pilzen vorkommen. Die 1,3-Glucan-Einheiten binden dabei an bestimmte PRRs (*pattern recognition receptors*) wie z.B. Dectin-1 auf der Zelloberfläche von z.B. Makrophagen, was zur Aktivierung dieser Zellen führt. Der TII-Phänotyp kann die Immunantwort gegen pathogene Erreger unterstützen, aber andererseits auch die Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen fördern. Obwohl es aussagekräftige Hinweise/Belege dafür gibt, dass TII die Atherosklerose verstärken kann, ist bisher nicht untersucht worden, welchen Einfluss TII auf einen Myokardinfarkt nimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einfluss eines TII-Phänotyps auf die akute Entzündungsreaktion und den nachfolgenden Heilungsprozess nach einem experimentell induzierten MI in der Maus untersucht werden. Der TII-Phänotyp wurde durch zwei intraperitoneale (Tag -7 und -4) Injektionen Zymosan A (ZyA) induziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass die ZyA-Behandlung vor allem zu einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten und klassischer Monozyten im Blut, in der Milz und im Knochenmark führte. Daraufhin erfolgte die Induktion eines MI durch eine 50-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion. *Late Gadolinium Enhancement*-Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen sowie funktionelle ^1H -MRT-Messungen zeigten für ZyA-behandelte Mäuse bereits an Tag 1 nach MI eine erhöhte Infarktgröße mit niedriger Ejektionsfraktion. Über einen Zeitraum von vier Wochen verschlechterte sich die Herzfunktion der ZyA-behandelten Mäuse kontinuierlich, wie sich anhand der Ejektionsfraktion, aber auch aufgrund der endsystolischen und -diastolischen Werte zeigte. Zudem war an Tag 28 nach MI der Infarktbereich ZyA-behandelter Tiere deutlich dünner. Interessanterweise konnte nach der intravenösen Applikation von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs), welche vor allem von zirkulierenden Monozyten bzw. lokalen Makrophagen aufgenommen werden, an Tag 2 nach MI in den Herzen von ZyA-behandelten Mäusen ein signifikant verringertes ^{19}F -Signal festgestellt werden. Durchflusszytometrische Analysen der kardialen Immunzellen an Tag 2 zeigten jedoch weder eine erhöhte noch eine verringerte Anzahl proinflammatorischer Immunzellen im Herz der ZyA-behandelten Tiere, die dieses Ergebnis erklären könnten. Ähnliche Befunde konnten nach der PFC-Injektion in einem Modell der LPS-induzierten subkutanen Entzündung (Matrigel/LPS) detektiert werden. Auch hier

zeigte sich sowohl im Matrigel als auch im Knochenmark ZyA-behandelter Tiere ein verringertes ^{19}F -Signal, während die Anzahl neutrophiler Granulozyten sogar leicht erhöht war. Mithilfe von *in vivo* Untersuchungen konnte eine verschlechterte Endozytose von PFCs durch neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten sowohl im Blut als auch in der Milz und im Knochenmark identifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde darüber hinaus untersucht, ob die ZyA-Behandlung einen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Immunzellen und deren Aktivierungsmuster sowohl vor als auch nach einem zweiten Stimulus hat. Dafür wurden zum einen Immunzellen allgemein und zum anderen nur neutrophile Granulozyten nach alleiniger ZyA-Behandlung oder zusätzlicher Matrigel/LPS-Implantation aus dem Knochenmark isoliert. Neutrophile Granulozyten, klassische Monozyten und Makrophagen wurden daraufhin *ex vivo* mit fluoreszenzmarkierten *Escherichia coli*- und Dextran-Partikeln sowie PFCs bezüglich ihrer Endozytoseeigenschaften untersucht. Dabei zeigten Makrophagen ZyA-behandelter Mäuse eine signifikant verringerte Aufnahme von allen drei Partikelarten. Isolierte neutrophile Granulozyten wurden in Bezug auf die Oberflächenexpression ihrer Aktivierungsmarker (CD11b, CD62L, CD63) sowie ihrer Migrationseigenschaften und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) analysiert. In diesem Zusammenhang wurde nur eine signifikant verstärkte Migration neutrophiler Granulozyten nach ZyA-Behandlung, jedoch kein Unterschied in der ROS-Produktion und bei den Aktivierungsmarkern gefunden.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass durch die intraperitoneale Injektion von ZyA ein TII-Phänotyp induziert wird, der zu einem größeren Myokardinfarkt und infolgedessen zu einem kontinuierlichen kardialen Funktionsverlust führt. Letzteres deutet auf einen verschlechterten Heilungsprozess des Herzes hin, der auf eine verminderte Endozytose durch neutrophile Granulozyten und Monozyten zurückzuführen sein könnte. In Zukunft müssen jedoch noch die genauen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen geklärt werden. Dies könnte auch dabei helfen, weitere Risikofaktoren für die Entstehung eines Herzversagens zu erkennen, um darauf aufbauend mögliche neue therapeutische Ansätze zu identifizieren und somit einen progressiven Myokardschaden zu vermindern.

Summary

Myocardial infarction (MI) and its sequelae, such as heart failure, are still among the most common causes of death worldwide. As a result of improved intensive care, e.g. through percutaneous coronary intervention (PCI), the early mortality due to MI has been greatly reduced. However, a not inconsiderable number of people develop heart failure over time after MI, while the causes of which have not yet been fully clarified. Nevertheless, there are indications that an immunological imbalance in the innate immune system with an increased proinflammatory reaction is involved. In recent years, it has become clear that, in addition to T- and B-cells, immune cells of the innate immune response such as monocytes, macrophages or neutrophil granulocytes can also form a memory based on epigenetic and metabolic changes. Upon restimulation, these immune cells show a long-term enhanced response, which is referred to as trained innate immunity (TII). TII can be triggered by various exogenous (e.g. viruses, bacteria, parasites) as well as endogenous (e.g. oxidized low-density lipoprotein, hormones, uric acid) factors. To experimentally induce TII, β -glucans are often used, which are polysaccharides that occur for example in the cell walls of fungi. The 1,3-glycosidic linkages bind to certain PRRs (pattern recognition receptors) such as Dectin-1 on the cell surface of e.g. macrophages, thereby activating these cells. The induced TII-phenotype can support the immune response against pathogens, but on the other hand it can promote the development and progression of cardiovascular diseases. Although there is convincing evidence that TII can worsen atherosclerosis, the impact of TII on MI has not yet been investigated.

The aim of this study was to examine the influence of a TII-phenotype on the acute inflammatory response and the subsequent healing process after an experimentally generated MI in mice. The TII-phenotype was induced by two intraperitoneal (day -7 and -4) injections of zymosan A (ZyA). Flow cytometric analyses showed that ZyA-treatment mainly led to an increased number of neutrophil granulocytes and classical monocytes in the blood, spleen and bone marrow. This was followed by the induction of a MI by 50 min of ischemia with subsequent reperfusion. Late gadolinium enhancement (LGE) magnetic resonance imaging (MRI) and functional ^1H MRI showed an increased infarct size with decreased ejection fraction already on day 1 after MI in ZyA-treated mice. Over the course of four weeks, the cardiac function of ZyA-treated mice declined continuously, as shown by the ejection fraction, but also by the end-diastolic and -systolic volume. In addition, on day 28 after MI, the ischemic area of ZyA-treated animals was significantly thinner. Interestingly, after intravenous application of perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs), which are primarily taken up by circulating monocytes or local macrophages, a significantly reduced ^{19}F signal was detected in the hearts of ZyA-treated mice on day 2 after MI. However, flow cytometric analyses of cardiac immune cells on day 2 showed neither an increased nor a decreased number of proinflammatory immune cells in the heart of ZyA-treated animals, that could explain these results. Similar findings were detected after PFC injection in a model of LPS-induced subcutaneous inflammation (matrigel/LPS). Here as well, both the matrigel and the bone marrow of ZyA-treated animals showed a reduced ^{19}F signal, while the number of neutrophil granulocytes was even slightly increased. Using *in vivo* examinations, an impaired endocytosis of PFCs by neutrophil granulocytes and classical monocytes was identified in blood, spleen and bone marrow. Based on these results, it was investigated in more detail whether ZyA-treatment has an influence on the functional properties of the immune cells and their activation patterns both before and after a second stimulus. For this reason, immune cells in general and only neutrophil granulocytes were isolated

from the bone marrow after ZyA-treatment or additional matrigel/LPS-implantation. Neutrophil granulocytes, classical monocytes and macrophages were then examined *ex vivo* for their endocytosis properties using fluorescence-labelled *Escherichia coli* and dextran particles as well as PFCs. Macrophages from ZyA-treated mice showed a significantly reduced uptake of all three particle types. Isolated neutrophil granulocytes were analysed regarding the surface expression of their activation markers (CD11b, CD62L, CD63) as well as their migration properties and the production of reactive oxygen species (ROS). In this context, only a significantly increased migration of neutrophil granulocytes was found after ZyA-treatment, but no differences in ROS production and activation markers.

In summary, the present study shows that intraperitoneal injection of ZyA induces a TII-phenotype that leads to aggravated myocardial infarction and subsequently to a continuous cardiac dysfunction. This indicates a worsened healing process of the heart, which could be due to reduced endocytosis by neutrophil granulocytes and monocytes. In the future, the exact underlying pathophysiological mechanisms must be still clarified. This could also help to recognise further risk factors for the development of heart failure in order to identify possible new therapeutic approaches and thus reduce progressive myocardial damage.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A	Atto
AAA	abdominales Aortenaneurysma
Abb.	Abbildung
AF	Alexa Fluor
AKT	<i>serine/threonine-specific protein kinases</i>
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
bzw.	beziehungsweise
CARD9	<i>caspase recruitment domain family member 9</i>
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CR3	Komplementrezeptor 3
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DAMP	<i>damage-associated pattern</i>
Dectin-1	<i>dendritic cell-associated C-type lectin-1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	Fetales Kälberserum
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte stimulating factor</i>
hemITAM	<i>hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia inducible factor-1α</i>
IFN- γ	<i>interferon gamma</i>

IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LAD	<i>left anterior descending artery</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mNP	murines neutrophile Granulozyten spezifisches Peptid
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Probenanzahl
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
oxLDL	oxidiertes <i>Low-Density</i> -Lipoprotein
p	p-Wert/Signifikanzwert
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Perfluorcarbon-Nanoemulsion

PFCE	Perfluor-15-kronen-5-ether
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKM2	Pyruvatkinase M2
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVAT	perivaskuläres Fettgewebe
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis
Src	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
T	Tesla
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
T _H X-Zelle	Typ-X-T-Helferzelle
TII	<i>Trained innate immunity</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
UPLC	<i>Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.-%	Volumenprozent
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
x g	multipliziert mit Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
ZyA	Zymosan A

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Die drei Phasen der Heilung des Herzes nach einem Myokardinfarkt.
- Abb. 2:** Auslöser und Auswirkungen von *Trained innate immunity* (TII).
- Abb. 3:** Schematischer Überblick über die Wechselwirkungen zwischen TII und kardiovaskulären Erkrankungen.
- Abb. 4:** Versuchsablauf der Induktion eines *Trained innate immunity* (TII)-Phänotyps und anschließendem Myokardinfarkt (MI) bzw. LPS-induzierter subkutaner Entzündung (Matrigel/LPS).
- Abb. 5:** *Gating*-Strategien für Immunzellen aus dem Blut.
- Abb. 6:** Zwei *Gating*-Strategien für Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark.
- Abb. 7:** *Gating*-Strategie für Ly6G^{low}-Zellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark.
- Abb. 8:** ZyA-Behandlung beeinflusst Immunzellzahlen im Blut, in der Milz und im Knochenmark.
- Abb. 9:** Keine veränderte Anzahl von Stamm- und Vorläuferzellen nach ZyA-Behandlung an Tag 0.
- Abb. 10:** Erhöhte Infarktgröße, aber reduziertes ¹⁹F-Signal im Infarktbereich ZyA-behandelter Mäuse.
- Abb. 11:** ZyA-Behandlung beeinflusst Immunzellzahlen im Herz, im Blut, in der Milz und im Knochenmark.
- Abb. 12:** Reduziertes ¹⁹F-Signal im Matrigel und Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation.
- Abb. 13:** ZyA-Behandlung verändert die Immunzellzahlen nach Matrigel/LPS-Implantation.
- Abb. 14:** Zymosan A beeinflusst Hämatopoese nach MI und Matrigel/LPS-Implantation.
- Abb. 15:** ZyA-Behandlung führt zu verringerter PFC-Aufnahme *in vivo* an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation.
- Abb. 16:** ZyA-Behandlung führt zu reduziertem ¹⁹F-Signal im Knochenmark und in der Milz.
- Abb. 17:** Reduzierte PFC-Aufnahme nach ZyA-Behandlung.
- Abb. 18:** PFC-Aufnahme von Immunzellen nach *ex vivo* ZyA-Behandlung.
- Abb. 19:** Durchflusszytometrische Analyse der ^{AF488}ZyA-Aufnahme durch Immunzellen der Milz und des Knochenmarks.
- Abb. 20:** Oberflächenexpression von Dectin-1, TLR2, CD18 und CD36 in PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag 0.

- Abb. 21:** Untersuchung von Endozytose-Eigenschaften nach ZyA-Behandlung.
- Abb. 22:** Funktionelle Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark vor und nach Induktion eines zweiten Stimulus.
- Abb. 23:** Funktionelle Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten aus dem Matrigel an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation.
- Abb. 24:** Veränderte Ly6G-Expression nach ZyA-Behandlung.
- Abb. 25:** Verändertes Milzgewicht durch ZyA-Behandlung.
- Abb. 26:** Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Zymosan A auf die Herzfunktion und Heilung nach Myokardinfarkt (MI).
- Abb. 27:** T1- und T2-*Mapping* nach ZyA-Behandlung und Verlauf nach Induktion eines Myokardinfarkts (MI).
- Abb. 28:** Histologische Untersuchung und Gewicht des Herzes von PBS- bzw. ZyA-behandelten Mäusen.
- Abb. 29:** Einfluss von Zymosan A und einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung auf die T1- und T2-Zeiten des Knochenmarks.
- Abb. 30:** Analyse des Verlaufs einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung nach ZyA-Behandlung mittels T1- und T2-*Mapping*.
-
- Ergänzende Abb. 1:** *Gating*-Strategien für Immunzellen aus der Milz.
- Ergänzende Abb. 2:** *Gating*-Strategien für Immunzellen aus dem Knochenmark.
- Ergänzende Abb. 3:** *Gating*-Strategien für Immunzellen aus dem Herz.
- Ergänzende Abb. 4:** *Gating*-Strategie für Immunzellen aus dem Matrigel.
- Ergänzende Abb. 5:** Einfluss von ZyA auf die Hämatopoese im Knochenmark.
- Ergänzende Abb. 6:** *Gating*-Strategie für Ly6G^{low}-Zellen aus a) dem Herz und b) dem Matrigel.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1. Herzphysiologie und Entstehung eines Myokardinfarkts	1
1.1.1. Kurze Übersicht über die Anatomie und Physiologie des Herzes	1
1.1.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen und der Myokardinfarkt	2
1.1.3. Entzündungsreaktion und Heilung nach dem Myokardinfarkt	3
1.1.4. Faktoren, welche die Entzündung und Heilung nach MI beeinflussen	7
1.2. <i>Trained innate immunity</i> (TII)	8
1.2.1. Stimuli und Mechanismen, die zu <i>Trained innate immunity</i> führen	9
1.2.1.1. Die Induktion eines TII-Phänotyps durch β -Glucan	11
1.2.2. Einfluss von <i>Trained innate immunity</i> auf kardiovaskuläre Erkrankungen	13
2. Zielsetzung	16
3. Material	17
3.1. Geräte und Apparaturen	17
3.2. Verbrauchsmaterialien	18
3.3. Chemikalien und Kits	18
3.4. Puffer und Medien.....	19
3.5. Antikörper.....	20
3.6. Targeting-Ligand	22
3.7. Aminosäuresequenz des verwendeten Peptids	22
3.8. Software.....	22
4. Methoden	23
4.1. Tierversuche in der Maus	23
4.2. Das <i>Trained innate immunity</i> -Modell	23
4.2.1. TII und Induktion eines Myokardinfarkts	24
4.2.2. TII und folgende LPS-induzierte subkutane Entzündung	25
4.3. Ablauf und Durchführung von Messungen mittels Magnetresonanztomographie	25
4.3.1. Auswertung der gemessenen ^1H - und ^{19}F -MRT-Daten	27
4.4. Durchflusszytometrische Analysen.....	29

4.4.1.	Immunzellisolation aus Blut, Milz, Knochenmark, Herz und Matrigel	29
4.4.2.	Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Messung.....	31
4.5.	Herstellung von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs).....	35
4.6.	Untersuchung der <i>in vivo</i> PFC-Aufnahme vor und nach Induktion eines zweiten Stimulus	36
4.7.	Funktionelle Analysen von neutrophilen Granulozyten	37
4.7.1.	Aktivierungsmarker	37
4.7.2.	Endozytose	38
4.7.3.	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	39
4.7.4.	Migration.....	40
4.8.	<i>Ex vivo</i> Stimulation mit Zymosan A.....	40
4.8.1.	Analyse der ZyA-Aufnahme mit ^{AF488} Zymosan A	41
4.9.	Oberflächenexpression von β -Glucan-Rezeptoren.....	41
4.10.	Identifikation von Ly6G ^{low} neutrophilen Granulozyten	42
4.11.	Histologische Untersuchungen	44
4.11.1.	Histologie der Milz	44
4.11.2.	Histologie des Herzes	45
4.12.	Statistische Auswertung	46
5.	Ergebnisse	47
5.1.	Induktion eines <i>Trained innate immunity</i> -Phänotyps durch ZyA-Behandlung.....	48
5.1.1.	Erhöhte Immunzellzahlen im Blut, in der Milz und im Knochenmark.....	48
5.1.2.	Analyse von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark.....	50
5.2.	Behandlung mit Zymosan A erhöht die Infarktgröße, reduziert jedoch die PFC-Aufnahme nach Myokardinfarkt	51
5.3.	Einfluss der ZyA-Behandlung auf die Immunzellzahl nach einem Myokardinfarkt	53
5.4.	Verringertes ¹⁹ F-Signal nach ZyA-Behandlung im Matrigel und im Knochenmark.....	54
5.5.	Immunzellzahl im Matrigel/LPS-Modell nach ZyA-Behandlung	55
5.6.	Erhöhte Hämatopoese in ZyA-behandelten Mäusen nach einem Myokardinfarkt bzw. LPS-induzierter subkutaner Entzündung	57
5.7.	Behandlung mit Zymosan A reduziert PFC-Aufnahme <i>in vivo</i>	59
5.7.1.	Durchflusszytometrische Analysen der PFC-Aufnahme <i>in vivo</i> nach Matrigel/LPS-Implantation.....	59
5.7.2.	Reduziertes ¹⁹ F-Signal im Knochenmark und in der Milz nach erstem Stimulus	61
5.7.3.	Verringerte PFC-Aufnahme bereits nach ZyA-Behandlung	61
5.7.4.	Veränderte PFC-Aufnahme nach <i>ex vivo</i> Behandlung mit Zymosan A.....	63
5.8.	Zelluläre Aufnahme von ZyA primär durch neutrophile Granulozyten in der Milz und durch klassische Monozyten im Knochenmark	64
5.9.	Veränderte Rezeptorexpression nach ZyA-Behandlung.....	64
5.10.	Neutrophile Granulozyten – Besonders beeinflusst durch Zymosan A?	67
5.10.1.	<i>Ex vivo</i> Untersuchung der Endozytoseeigenschaften	67

5.10.2.	Funktionelle Analyse von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark	69
5.10.3.	Funktionelle Eigenschaften neutrophiler Granulozyten im Matrigel.....	70
5.11.	ZyA-Behandlung erhöht die Menge an Ly6G ^{low} -neutrophilen Granulozyten in Milz und Knochenmark.....	72
5.12.	Erhöhtes Milzgewicht nach Behandlung mit Zymosan A	74
5.13.	Einfluss von Zymosan A auf den Verlauf und die Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt bzw. einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung	76
5.13.1.	ZyA-Behandlung verschlechtert die Herzfunktion nach Myokardinfarkt.....	76
5.13.2.	Analyse der Fibrosierung und Ödembildung im Herzgewebe nach einem Myokardinfarkt ..	80
5.13.2.1.	Histologische Untersuchung des Herzes an Tag 28 nach Myokardinfarkt	82
5.13.3.	Verlauf einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung nach ZyA-Behandlung.....	84
5.13.4.	Untersuchung der Fibrosierung und Ödembildung im Matrigel.....	86
6.	Diskussion	88
6.1.	Induktion eines TII-Phänotyps mit Zymosan A aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
6.2.	Der TII-Phänotyp führt zu einem größeren Myokardinfarkt und einer verschlechterten Heilung.....	92
6.3.	Die Entzündungsbildgebung mittels ¹ H/ ¹⁹ F-MRT korreliert nicht mit der Immunzellzahl und dem Aktivierungsstatus	94
6.3.1.	Die ZyA-Behandlung reduziert die PFC-Aufnahme <i>in vivo</i> und resultiert in einem verringerten ¹⁹ F-Signal	96
6.3.2.	ZyA-behandelte Makrophagen zeigen eine verringerte Endozytosekapazität	98
6.4.	Weiterführende funktionelle Analysen geben einen Einblick in das Aktivitätsmuster ZyA-behandelter neutrophiler Granulozyten	99
6.5.	Ausblick.....	101
7.	Literaturverzeichnis	103
8.	Publikationsliste	112
8.1.	Veröffentlichungen	112
8.2.	Kongressbeiträge	114
9.	Anhang.....	115
9.1.	MRT-Messparameter	115
9.2.	<i>Gating</i> -Strategien für Immunzellen aus Milz, Knochenmark, Herz und Matrigel	116
9.3.	Ergebnisse der zweiten <i>Gating</i> -Strategie für Stamm- und Vorläuferzellen nach ZyA-Behandlung.....	120
9.4.	<i>Gating</i> -Strategie für Ly6G ^{low} -Zellen aus dem Herz und dem Matrigel	121
10.	Danksagung.....	122
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	123

1. Einleitung

1.1. Herzphysiologie und Entstehung eines Myokardinfarkts

1.1.1. Kurze Übersicht über die Anatomie und Physiologie des Herzes

Das kardiovaskuläre System ist anatomisch durch das Herz und die damit verbundenen Gefäße, Venen und Arterien aufgebaut. Durch rhythmische Herzkontraktionen wird das Blut kontinuierlich durch den Körper gepumpt, um ihn mit Sauerstoff sowie Nährstoffen zu versorgen und Kohlenstoffdioxid abzutransportieren. Des Weiteren dient das kardiovaskuläre System der Wärmeregulation des Körpers und ist an wichtigen immunregulatorischen Aufgaben beteiligt. Das Herz teilt sich in vier Binnenräume auf: Venöses sauerstoffarmes Blut gelangt über die *Vena cava* in das rechte Atrium (Vorhof) und von dort durch die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Durch die Pulmonalkappen und über die Pulmonalarterie strömt das sauerstoffarme Blut aus dem rechten Ventrikel bis in die Lunge. In den Kapillargefäßen der Lunge erfolgt anschließend der Gasaustausch: Das Blut gibt Kohlenstoffdioxid ab und nimmt Sauerstoff auf. Daraufhin gelangt das mit Sauerstoff angereicherte Blut über die Pulmonalvene in das linke Atrium und von dort durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Durch die Aortenklappe wird das sauerstoffreiche Blut in die Aorta und von dort in den gesamten Körper gepumpt, damit es die peripheren Blutgefäße erreichen kann. Durch ein intrinsisches elektrophysiologisches System, das die elektrischen Impulse schnell vom Sinusknoten zum Atrioventrikularknoten und entlang der Purkinje-Fasern zur Herzspitze (Apex) überträgt, kommt eine koordinierte Herzkontraktion zustande^{1,2}. Die anatomische und funktionelle Komplexität des Herzes erfordert ein ausgezeichnetes Zusammenspiel heterogener Zellpopulationen, um eine kontinuierliche Kontraktion und Entspannung bei unterschiedlichen Drücken, Belastungen und biophysikalischen Reizen in jeder Kammer zu ermöglichen. Das Herz wird aus multipotenten Vorläuferzellen gebildet, die zwei Herzfelder umfassen. Zellen des ersten Herzfeldes besiedeln in erster Linie den linken Ventrikel und Zellen des zweiten Herzfeldes den rechten Ventrikel. Jedoch tragen beide Herzfelder zu den Atrien bei. Die hämodynamischen Veränderungen in der postnatalen Periode und die unterschiedlichen genregulatorischen Netzwerke, die in jedem Herzfeld wirken, prägen die Genexpressionsmuster der adulten Herzzellen³. Das adulte humane Herz besteht aus unterschiedlichen Zelltypen: Kardiomyozyten, Perizyten und Fibroblasten. Diese Zelltypen weisen außerdem verschiedene atriale und ventrikuläre Untergruppen von Zellen mit unterschiedlichen Entwicklungsursprüngen und spezialisierten Eigenschaften auf. Bezogen auf Immunzellen zeigen sich vor allem kardial ansässige Makrophagen mit pro- und antiinflammatorischen Transkriptionssignaturen. Des Weiteren baut sich das Herz aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und weiteren myeloiden

sowie lymphoiden Immunzellen auf. Insgesamt machen den Großteil der Zellmasse die Kardiomyozyten aus, während den größten prozentualen Anteil die Endothelzellen haben⁴.

1.1.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen und der Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs) sind die weltweit häufigste Todesursache. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes (Destatis) starben im Jahr 2022 33,6 % der deutschen Bevölkerung an CVDs⁵ und davon 13 % an einem Myokardinfarkt⁶. Innerhalb der letzten Jahrzehnte ist die Todeszahl durch CVDs in den Industrieländern zurückgegangen, jedoch nimmt sie in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen zu. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass es in diesen Ländern kaum Präventions- und Behandlungsmaßnahmen gibt⁷.

Typischerweise handelt es sich bei CVDs um Erkrankungen, die mit dem Herzen, den Blutgefäßen und dem Gefäßsystem des Gehirns in Verbindung stehen wie z.B. die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, der Herzinfarkt, der Schlaganfall oder Aneurysmen⁸. Ein gemeinsamer Auslöser für viele kardiovaskuläre Erkrankungen ist die Atherosklerose. Diese ist eine degenerative Erkrankung der arteriellen Gefäßwände, die durch eine Endotheldysfunktion gekennzeichnet ist⁹. Aufgrund der Endotheldysfunktion kommt es zu der Infiltration von Leukozyten in das betroffene Gewebe und die Freisetzung von P-Selektin und des von-Willebrand-Faktors aus Endothelzellen wird gefördert, wodurch Leukozyten und Blutplättchen an die Endothelzellen binden können¹⁰. Als Folge entstehen atherosklerotische Plaques, die zu einer Gefäßverengung führen und letztlich das gesamte Gefäßlumen verschließen können (z.B. in den Herzkranzgefäßen). Ein weiteres Risiko besteht bei der Plaque-Ruptur, wodurch es zu Einblutungen und Thrombenbildung kommen kann, die wiederum in andere Gewebe ausgeschwemmt und in weiter entfernten kleineren Gefäßen zu einem Verschluss führen können (z.B. bei einer Lungenembolie)¹¹. Eine Reihe verschiedener Risikofaktoren, die in nicht-modifizierbar und modifizierbar unterteilt werden können, tragen zum Fortschreiten von CVDs bei. Zu den nicht-modifizierbaren Risiken gehören das Alter, das Geschlecht und genetische Ursachen, während Bluthochdruck, Diabetes, Dyslipidämie, Rauchen, falsche Ernährung und Fettleibigkeit wichtige prädisponierende modifizierbare Risikofaktoren sind⁸. Eine verbesserte und frühzeitige Diagnose von CVDs könnte dabei den Schwerpunkt der Therapie von der Behandlung auf die Vorbeugung verlagern und damit die Gesamtüberlebenszeit verbessern.

Im Bereich der Aortenwurzel entspringen die Herzkranzgefäße (Koronararterien), welche direkt auf dem Herzmuskel (Myokard) verlaufen und das Herz selbst mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen^{1,2}. Kommt es zu einer Verengung oder gar einem Verschluss in einer der Koronararterien,

durch z.B. atherosklerotische Plaques, Thromben oder seltener Spasmen und allergische Reaktionen, führt dies zu einer Sauerstoffunterversorgung des betroffenen Myokardbereichs, die als Ischämie bezeichnet wird^{12–14}. Durch die Ischämie sterben Kardiomyozyten ab und ein Myokardinfarkt ist die Folge. Der bisherige medizinische Fortschritt bietet Therapien, die bereits die akute Mortalität nach einem Myokardinfarkt vermindern. Allerdings sinkt bei Frauen die Sterblichkeitsrate langsamer und sie überleben schwere Herzinfarkte seltener als Männer¹⁵.

1.1.3. Entzündungsreaktion und Heilung nach dem Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt (MI) tritt auf, wenn eine anhaltende Unterbrechung des Blutflusses in einer Region des Herzes zu einem dauerhaften Absterben von Kardiomyozyten führt. Um diesen Verlust auszugleichen und die Funktion des Myokards wiederherzustellen, wird das Herzgewebe im infarzierten Myokard umgebaut. In den folgenden Tagen und Wochen werden die abgestorbenen Kardiomyozyten durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt. Dieses Fortschreiten der Wundheilung des Myokards nach einem Infarkt ist ein dynamischer Prozess, der im Allgemeinen in drei Phasen unterteilt wird (siehe Abb. 1): (i) Entzündung/Nekrose, (ii) Fibrose/Proliferation und (iii) langfristiger Umbau/Reifung^{16,17}.

Die inflammatorische Phase tritt bei Mäusen in den ersten drei und bei Menschen in den ersten sieben Tagen auf^{18,19}. Im Allgemeinen kommt es dabei primär zum Absterben der Kardiomyozyten, dem Abbau der extrazellulären Matrix und der Sekretion von DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) aus dem verletzten Myokard¹⁹. Die ausgesendeten DAMPs binden vorwiegend an TLRs (*toll-like receptors*) wie z.B. TLR2 oder TLR4, die auf der Immunzelloberfläche von z.B. Makrophagen exprimiert werden. Diese fördern durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie Chemokinen (z.B. Interleukin (IL)-1 α , IL-6, CCL2 (*chemokine ligand 2*), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)^{20,21}. Dadurch werden als erstes neutrophile Granulozyten, aber auch klassische Monozyten in den ischämischen Bereich rekrutiert^{22–24}. In dem Zusammenhang ist auch die sogenannte Notfall-Granulopoese nennenswert^{25,26}. Durch das Erkennen von DAMPs über z.B. TLR4 auf Endothelzellen sekretieren diese mehr G-CSF (*granulocyte stimulating factor*), das für eine verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren und darüber für die Differenzierung myeloider Vorläuferzellen in Granulozyten sorgt und essenziell für die Freisetzung der Granulozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation ist. Dadurch liegt eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut vor, die in den Infarktbereich infiltrieren können. Neutrophile Granulozyten fördern das proinflammatorische Milieu durch Degranulation, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

und sogenannten NETs (*neutrophil extracellular traps*)^{22,23}. Des Weiteren sind sie genau wie Makrophagen an der Phagozytose von Zelltrümmern und apoptotischen Zellen beteiligt, um den Infarktbereich zu säubern²⁷. Proinflammatorische M1-Makrophagen, die zum einen bereits im Gewebe vorliegen und sich zum anderen aus infiltrierten klassischen Monozyten differenzieren, schütten ebenfalls Zytokine wie z.B. IL-1 β , IL-6 und TNF α (Tumornekrosefaktor- α) aus, um weitere Immunzellen zu rekrutieren und zu aktivieren²⁸. Neben den Zellen der angeborenen Immunantwort werden nach einem MI z.B. auch T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten aktiviert und in den Infarktbereich rekrutiert²⁹. Dabei erfolgt die Rekrutierung von Typ-1-T-Helferzellen (T_H1-Zellen) oder T_H17-Zellen unter anderem durch die Zytokin- und Chemokinausschüttung (z.B. CXCL10) von neutrophilen Granulozyten und M1-Makrophagen. Über IL-12 bzw. IL-23, die von M1-Makrophagen oder dendritischen Zellen sezerniert werden, wird wiederum die Entwicklung von T_H1- bzw. T_H17-Zellen beeinflusst³⁰. Im Infarktbereich agieren sowohl T_H1- als auch T_H17-Zellen proinflammatorisch durch die Zytokinausschüttung von z.B. IFN- γ bzw. IL-17 und fördern darüber ebenfalls die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten^{31,32}. Der strukturelle Umbau des ischämischen Bereichs wird eingeleitet, wenn die inflammatorischen Immunzellen und nekrotischen Kardiomyozyten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) wie z.B. MMP-1, -8, -9 oder -13 sezernieren^{33,34}. Diese MMPs bauen die extrazelluläre Matrix ab und anstelle derer kommt es zu einem provisorischen Granulationsgewebe aus Fibrin, Fibronectin, Laminin und Glykosaminoglykanen^{33,35}. Bis Myofibroblasten die Sekretion von fibrillärem Kollagen, das zu dem primären Bestandteil des kardialen Narbengewebes wird, hochregulieren, sorgen diese Matrixproteine für eine vorübergehende strukturelle Unterstützung.

Gegen Ende der inflammatorischen Phase infiltrieren nicht-klassische Monozyten, die sich in M2-Makrophagen differenzieren können und durch die Expression von IL-10, TGF- β (*transforming growth factor beta*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) antiinflammatorisch wirken³⁶, in das infarzierte Myokard. Zusätzlich wirken auch infiltrierte regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) über die Sekretion von IL-10 sowie TGF- β antiinflammatorisch und fördern weiter die Polarisierung von M1- zu M2-Makrophagen, wodurch sie eine entscheidende Rolle bei dem Schutz des Myokards spielen^{37–39}. TGF- β gilt als das wichtigste antiinflammatorische Zytokin und wird als Kernregulator des Phasenübergangs der Inflammation zur Fibrose angesehen⁴⁰. Außerdem sorgt sekretiertes GDF-15, ein Mitglied der TGF- β -Familie, für den Abbau von Selektinen auf dem Endothel und verhindert somit das weitere Einwandern von neutrophilen Granulozyten⁴¹. Insgesamt liegen zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger neutrophile Granulozyten im Infarktbereich vor, denn durch die Freisetzung von Annexin A1 wird die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und deren Phagozytose durch Makrophagen gefördert⁴². Die antiinflammatorische Wirkung von IL-10 entsteht

dadurch, dass es die Expression proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen durch die Aktivierung des STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)-Signalweges verhindert⁴⁴⁻⁴⁶. Dadurch wird die Proliferationsphase eingeleitet, die sich im Allgemeinen durch die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten oder Endothelzellen und den Wiederaufbau der extrazellulären Matrix sowie Angiogenese auszeichnet¹⁹. In dieser Phase werden die Fibroblasten aktiviert und wandern in das infarzierte Gebiet ein⁴⁶. Verschiedene Zytokine/Chemokine (z.B. IL-1 β , IL-6, TGF- β) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF (*platelet-derived growth factor*), AREG (*Amphiregulin*)) spielen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten⁴⁷. Letztere sind ein wichtiger Produzent von Proteinen der extrazellulären Matrix wie z.B. Stressfasern und kontraktilen Proteinen^{48,49}. Außerdem produzieren sie MMPs (z.B. MMP-1) und deren Inhibitoren, sogenannte TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Daher ist ein stark reguliertes Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs für die Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix-Homöostase unerlässlich⁵⁰. Denn käme es zu einer übermäßigen und/oder unorganisierten Ablagerung der extrazellulären Matrix, würde dies im späteren Verlauf zu einer deutlich verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzes führen^{51,52}.

Am Ende des Heilungsprozesses eines Myokardinfarkts kommt es zur Apoptose der noch vorhandenen Immunzellen, die so eliminiert werden und zu der Auflösung der Inflammation führen⁵³. Es verbleiben vor allem Myofibroblasten, die weiterhin zum Umbau der extrazellulären Matrix beitragen¹⁹. In der Phase wird vor allem Kollagen III, welches sich durch seine große Elastizität auszeichnet, durch Kollagen I ersetzt, das ein steifes fibrilläres Protein ist und zu der Erhöhung der Zugfestigkeit der Narbe führt⁵⁴.

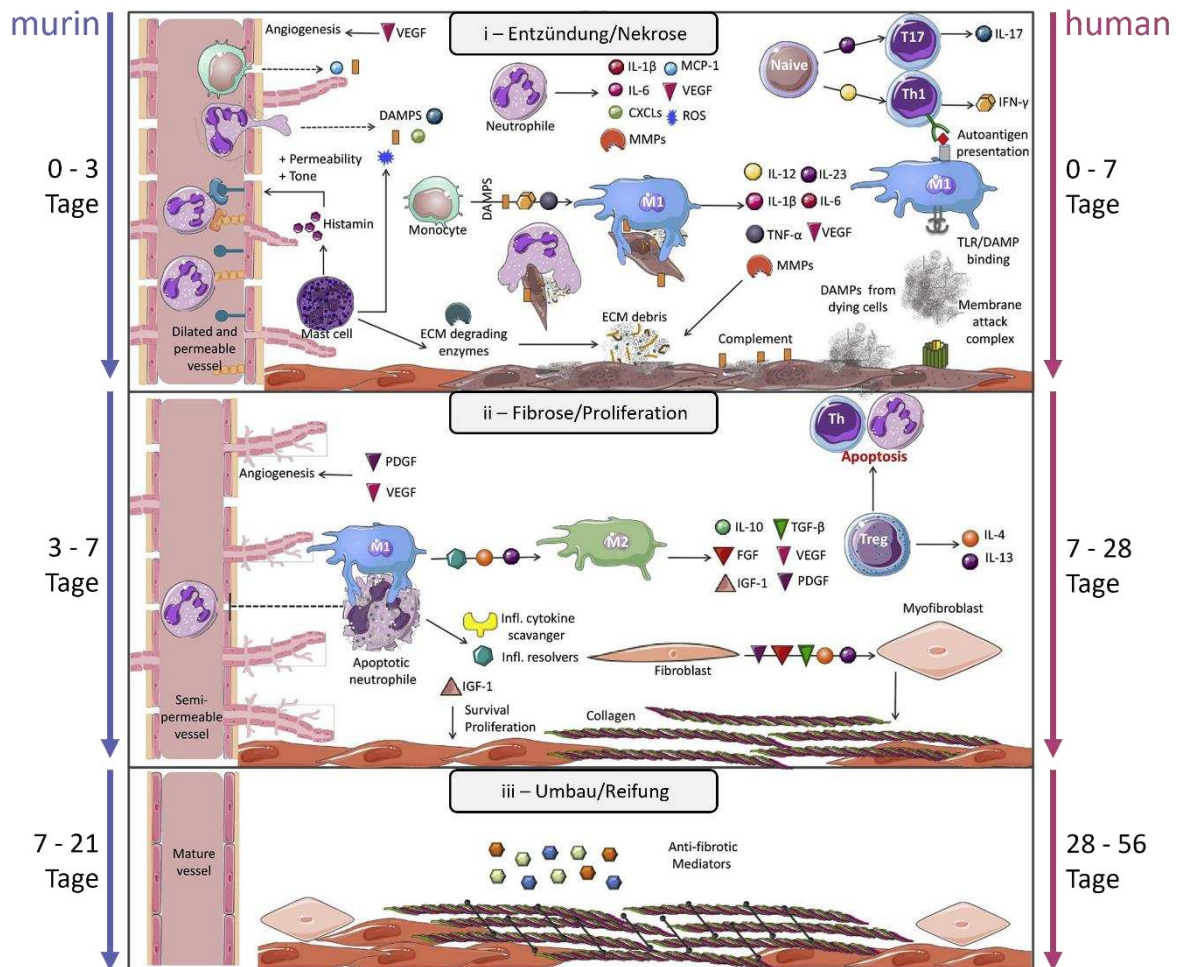


Abb. 1: Die drei Phasen der Heilung des Herzes nach einem Myokardinfarkt. In Folge eines Myokardinfarkts kommt es zur Nekrose von Kardiomyozyten, deren Verlust ausgeglichen werden muss, um die Funktion des Myokards wiederherzustellen. Aufgrund dessen wird das Herz in den folgenden Tagen und Wochen umgebaut und die abgestorbenen Kardiomyozyten werden durch eine kollagenreiche Narbe ersetzt. Dieses Fortschreiten der Wundheilung des Myokards nach einem Infarkt ist ein dynamischer Prozess, der im Allgemeinen in drei Phasen unterteilt wird und sich im zeitlichen Verlauf zwischen Mäusen (m) und Menschen (h) unterscheidet: (i) Entzündung/Nekrose (m: 0 - 3 Tage; h: 0 - 7 Tage), (ii) Fibrose/Proliferation (m: 3 - 7 Tage; h: 7 - 28 Tage) und (iii) Umbau/Reifung (m: 7 - 21 Tage; h: 28 - 56 Tage). Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen lauten wie folgt: CXCL = chemokine (C-X-C) motif ligand, DAMP = damage-associated molecular pattern, FGF = fibroblast growth factor, IFN- γ = interferon gamma, IGF-1 = insulin like growth factor 1, IL = interleukin, MCP-1 = monocyte chemoattractant protein 1, MMP = matrix metalloproteinase, TGF- β = transforming growth factor beta, Th1/17 = T helper cell type 1/17, TLR = toll-like receptor, TNF- α = tumor necrosis factor alpha, Treg = T regulatory cell, PDGF = platelet derived growth factor, ROS = reactive oxygen species, VEGF = vascular endothelial growth factor. Die Abbildung wurde nach Dittrich et al.³⁰ modifiziert.

1.1.4. Faktoren, welche die Entzündung und Heilung nach MI beeinflussen

Anhand der vorherigen Ausführungen über die Entzündung und Heilung nach MI zeigt sich, dass vor allem das angeborene Immunsystem eine ausschlaggebende Rolle bei der Entwicklung des Myokardumbaus spielt. Besonders neutrophile Granulozyten sind bei der Gestaltung der Entzündungsreaktion entscheidend⁵⁵, aber auch klassische Monozyten oder M1-Makrophagen tragen zu einem proinflammatorischen Milieu durch die Produktion von z.B. IL-1 β , IL-6 oder TNF α und die Rekrutierung weiterer Immunzellen bei²⁸. Maßgeblich ist im nächsten Schritt, dass die proinflammatorische Reaktion rechtzeitig eingedämmt wird und ein Wechsel in die antiinflammatorische Phase stattfindet, die durch apoptotische neutrophile Granulozyten oder M1-Makrophagen und deren Produktion von z.B. IL-10 oder TGF- β gekennzeichnet ist. Denn die übermäßige Aktivierung neutrophiler Granulozyten oder ein verzögerter Übergang von M1- zu M2-Makrophagen kann zu unkontrollierten Gewebeschäden durch eine übermäßige Fibrose und chronischen Entzündungen führen³⁰.

IL-10, das vor allem von M2-Makrophagen und T_{reg}-Zellen produziert wird, aktiviert über den Transkriptionsfaktor STAT3 die Genexpression von entzündungshemmenden Zytokinen (z.B. IL-10, TGF- β , VEGF)^{43,56}. STAT3 wird im Zusammenhang mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als ein wichtiger Regulator der Inflammation angesehen, denn es konnte bereits gezeigt werden, dass die gezielte Unterbrechung des STAT3-Gens in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in einem Mausmodell für septische Peritonitis zu einer übermäßigen proinflammatorischen Zytokinproduktion und einer erhöhten Sterblichkeit führte⁵⁷. Damit der Wechsel aus der pro- in die antiinflammatorische Phase erfolgen kann, ist eine effiziente Efferozytose von z.B. apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch z.B. Monozyten/Makrophagen essentiell^{58,59}. Bei der Efferozytose handelt es sich um die Beseitigung apoptotischer Zellen durch phagozytische Zellen, die diese durch sogenannte „eat-me“-Signale wie z.B. oxidierte Phospholipide, Phosphatidylserin, DNA oder Annexin A1 erkennen⁶⁰. Eine effiziente Efferozytose führt dabei innerhalb der phagozytierenden Zelle zu der Aktivierung entzündungslösender und -hemmender Signalwege⁶¹. Andererseits erzeugt eine defekte Efferozytose eine sekundäre postapoptotische Nekrose sowie eine Ausbreitung der Gewebse Nekrose und kann darüber zu einer chronischen und nicht-abklingenden Entzündung führen, wie bereits in Modellen der Atherosklerose oder dem Myokardinfarkt gezeigt wurde^{62–64}. Verschiedene Efferozytoserezeptoren werden von phagozytischen Zellen exprimiert, doch es wurde herausgefunden, dass der MerTK (*myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*)-Rezeptor, der von Makrophagen exprimiert wird, für die Beseitigung nekrotischer Kardiomyozyten erforderlich ist⁶⁵. Kommt es zu der Spaltung des MerTK-Rezeptors, führt dies zu einer verringerten

Efferozytose sowie einem verschlechterten Herzbau und kann eine Herzinsuffizienz zur Folge haben^{65,66}.

Anhand der genannten Beispiele zeigt sich, dass eine überschießende proinflammatorische Reaktion des angeborenen Immunsystems oder der defekte Wechsel aus der pro- in die antiinflammatorische Phase zu einem größeren Infarkt und einer schlechteren Heilung nach MI führen kann⁶⁷. Jedoch wurde bisher nicht untersucht, welchen Einfluss ein zuvor veränderter angeborener Immunstatus (*Trained innate immunity*) auf die Entwicklung eines MI nimmt.

1.2. *Trained innate immunity* (TII)

Der Erwerb eines immunologischen Gedächtnisses ist eine wichtige evolutionäre Strategie, die sich zum Schutz des Wirts vor wiederholten Erkrankungen durch Infektionserreger entwickelt hat. Lange Zeit wurde angenommen, dass das angeborene Immunsystem immer auf die gleiche, unspezifische Weise agiert und dass die Gedächtnisbildung ausschließlich im adaptiven Arm des Immunsystems mit der Bildung hochspezifischer T- und B-Zellen erfolgt. In den letzten 10 - 15 Jahren wurde jedoch deutlich, dass auch angeborene Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder neutrophile Granulozyten bei Restimulation langfristig verstärkte Reaktionen zeigen, was als *Trained innate immunity* (TII) bezeichnet wurde⁶⁸. Im Vergleich zur Gedächtnisbildung des adaptiven Immunsystems gibt es jedoch mehrere Unterschiede. In Abb. 2 ist schematisch die Induktion und der Verlauf eines TII-Phänotyps dargestellt. Nach einem ersten Zusammentreffen mit einem Stimulus, der einen TII-Phänotyp auslöst, ist die verstärkte sekundäre Reaktion nicht auf den ursprünglichen Auslöser beschränkt, sondern zeigt eine eher allgemeine verstärkte Reaktion auf sowohl exogene als auch endogene Stimuli⁶⁹. Des Weiteren wird die erhöhte Reaktionsfähigkeit durch epigenetische (Histon-Methylierung, Acetylierung) und metabolische (erhöhte Glykolyse, Laktatproduktion) Veränderungen in zirkulierenden Immunzellen, gewebeeigenen Zellen oder Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks aufrechterhalten⁷⁰. Außerdem ist die Zeitspanne des angeborenen Gedächtnisses kürzer sowie reversibel und reicht von Tagen, Wochen bis zu mehreren Monaten, im Vergleich zur Gedächtnisbildung des adaptiven Immunsystems, die nach einer natürlichen Infektion oder Impfung zu einer lebenslangen Resistenz führen kann⁶⁸. Dennoch führt die Stimulierung trainierter angeborener Immunzellen zu einer schnelleren und stärkeren Immunreaktion mit der Sekretion höherer Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dadurch kann der TII-Phänotyp vor Infektionskrankheiten schützen, aber

kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs) wie z. B. Atherosklerose⁷¹, abdominale Aortenaneurysmen⁷² oder Schlaganfälle⁷³ verschlimmern.

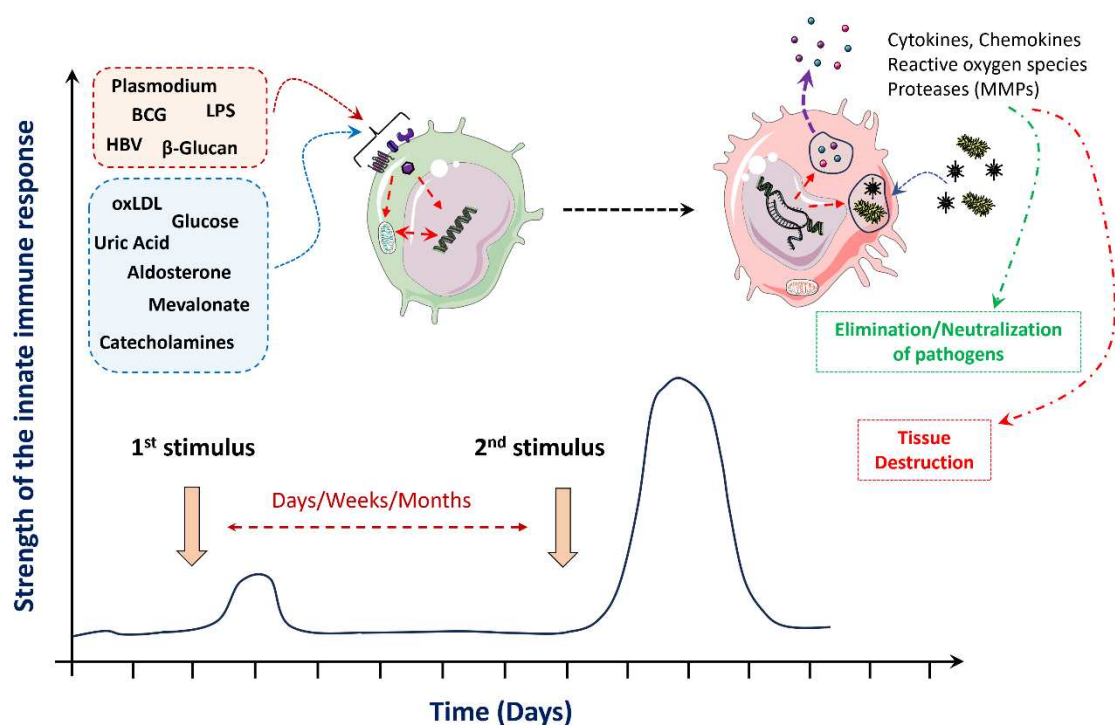


Abb. 2: Auslöser und Auswirkungen von *Trained innate immunity* (TII). Der erste Stimulus durch exogene oder endogene Faktoren führt bei Immunzellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Monozyten, neutrophilen Granulozyten) zu einer vorübergehenden Immunantwort mit erhöhter Zytokinexpression. Außerdem kann es zu metabolischen und epigenetischen Veränderungen kommen, die über Tage, Wochen und sogar Monate anhalten und den sogenannten TII-Phänotyp charakterisieren. Werden diese Zellen erneut stimuliert, führt dies zu einer verstärkten sekundären Reaktion mit erhöhter Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Dies kann die Bekämpfung von Infektionserregern unterstützen, aber im Rahmen von Autoimmun- oder autoinflammatorischen Erkrankungen zu Gewebeerstörungen führen. (BCG = *Bacille Calmette-Guérin*; HBV = Hepatitis-B-Virus; LPS = Lipopolysaccharid; oxLDL = oxidiertes *Low-Density-Lipoprotein*). Die Abbildung wurde aus Kleimann et al.⁷⁴ entnommen.

1.2.1. Stimuli und Mechanismen, die zu *Trained innate immunity* führen

Viele Arbeiten zum Thema TII beschäftigten sich vor allem mit Mikroorganismen, mikrobiellen Produkten einschließlich *Candida albicans* und dessen Zellwandbestandteil β-Glucan sowie dem *Bacille Calmette-Guérin* (BCG)-Impfstoff⁶⁹. Diese Studien zeigten, dass der TII-Phänotyp durch Infektionen oder sogar Impfungen einen unspezifischen Kreuzschutz erzeugen kann. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass neben β-Glucan und BCG auch andere exogene Faktoren wie z.B. Chitin⁷⁵, Muramyl-Dipeptid⁷⁶ oder Lipopolysaccharid (LPS)⁷⁷, aber auch endogene Moleküle wie Harnsäure⁷⁸, oxidiertes *Low-Density-Lipoprotein* (oxLDL)⁷⁹, Katecholamine⁸⁰ oder Hormone wie Aldosteron⁸¹ einen TII-Phänotyp induzieren können⁶⁹. Sogar körperliche Bewegung⁸² oder

*Plasmodium falciparum*⁸³, ein Parasit der Malaria auslöst, können nachweislich TII in Immunzellen auslösen.

Wie bereits zuvor erwähnt, führt die Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen oder NK-Zellen, mit β -Glucan oder oxLDL zu epigenetischen Veränderungen und/oder metabolischen Anpassungen, die eine verstärkte Reaktion mit erhöhter Zytokinfreisetzung zur Folge haben, wenn diese Zellen ein zweites Mal mit einem nicht verwandten Stimulus in Kontakt kommen (siehe Abb. 2). In diversen Studien wurden kultivierte Monozyten mit β -Glucan stimuliert und nach einer Woche mit einer niedrigen Dosis LPS restimuliert, wodurch es zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen wie IL-6, TNF α oder IL-1 β kam⁸⁴. Es wurde gezeigt, dass die β -Glucan-abhängige TII vor allem durch Dectin-1 und den Raf-1 (*rapidly accelerated fibrosarcoma-1*)-Signalweg vermittelt wird, was zu Veränderungen der Histon-Methylierung an H3K4, wie H3K4me1, H3K4me3 oder H3K27ac, führt⁸⁵. Diese epigenetischen Veränderungen zeigen sich wiederum in einer offenen Chromatinkonformation an Promotoren und Enhancern von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6 oder Interferon- γ (IFN- γ).

TII führt neben epigenetischen auch zu metabolischen Veränderungen, die wiederum zum Teil durch epigenetische Mechanismen vermittelt werden. Das Training von Monozyten und Makrophagen mit β -Glucan induziert eine metabolische Umstellung auf aerobe Glykolyse, auch als Warburg-Effekt bekannt⁸⁶. Des Weiteren können TII-induzierte Histonmodifikationen zu einer Hochregulierung glykolytischer Enzyme führen, die einen erhöhten Glukoseverbrauch, eine niedrigere Basalatmungsrate, die Produktion von Laktat und ein erhöhtes Verhältnis von NAD⁺ (Nicotinamadenindinukleotid) zu NADH zur Folge haben⁸⁷. Diese metabolischen Anpassungen werden durch den mTOR/HIF-1 α (*mammalian target of rapamycin/hypoxia inducible factor-1 α*)-Stoffwechselweg vermittelt, wie z.B. bei Mäusen gezeigt wurde, bei denen die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Metformin und dem myeloidspezifischen Knockout von HIF-1 α die ausgebildete Immunität aufhebt⁸⁸. Außerdem können Stoffwechselveränderungen, wie z. B. ein Anstieg von Fumarat oder Acetyl-Coenzym A, direkt epigenetische Modifikationen (Histonacetylierung und -methylierung) auslösen⁸⁹. Neben verschiedenen *in vitro* oder *ex vivo* Experimenten mit unterschiedlichen Stimuli wurden die Auswirkungen einer TII auch in mehreren Tierstudien und beim Menschen nachgewiesen, beispielsweise nach einer BCG-Impfung⁹⁰ oder bereits bei einer Hepatitis-B-Virus-Exposition *in utero*⁹¹.

1.2.1.1. Die Induktion eines TII-Phänotyps durch β -Glucan

Um einen experimentellen TII-Phänotyp *in vivo* zu induzieren, wurden bereits verschiedene PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) eingesetzt. Darunter fallen z.B. Hefen wie *Candida albicans* oder *Saccharomyces cerevisiae*, die über das in ihrer Zellwand vorhandene Zymosan, welches zu 73 % aus sich wiederholenden unlöslichen β -Glucanen aufgebaut ist, an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche von z.B. Monozyten oder neutrophilen Granulozyten binden und darüber die Zellen aktivieren⁹². β -Glucane sind β -D-Glucose-Polysaccharide, die in Getreide, Algen, Bakterien, Hefen und Pilzen vorkommen. Durch die unterschiedliche Bindung der Glucose-Moleküle kommt es zu verschiedenen β -Glucan-Strukturen, wobei am häufigsten β -1,3-, β -1,4- und β -1,6-Glucane auftreten. β -Glucan, das in Hefe und Pilzen vorkommt, enthält 1,3-Glucan-Bindungen und gelegentlich 1,6-Bindungen, während die β -Glucane aus Getreide (z. B. Hafer und Gerste) 1,3- und 1,4-Bindungen enthalten⁹³. Die hauptsächlichen PRRs (*pattern recognition receptors*) für β -1,3/1,6-Glucane sind Dectin-1, ein C-Typ-Lektin-Rezeptor und *Toll-like*-Rezeptor 2 (TLR2), das mit TLR6 auf der Zelloberfläche von z.B. Monozyten/Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten ein Heterodimer bildet⁹⁴. Interessant ist, dass β -Glucan eine höhere Bindungsaffinität für Dectin-1 gegenüber TLR2 aufweist und dass zusätzlich die Herkunft des β -Glucans einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften an den Rezeptor hat. Aus Zymosan stammendes β -Glucan zeigt eine höhere Affinität gegenüber Dectin-1 als β -Glucan, welches aus Gerste gewonnen wurde. Beide β -Glucan-Arten induzieren aber die Zusammenarbeit von Dectin-1 und TLR2, um die weiterführende Signalkaskade zu aktivieren⁹⁵. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Bindung von β -Glucan an den TLR und die anschließende Signalübertragung über den MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*)-Signalweg die wichtigste Interaktion für die Erkennung von Pilzliganden und deren Kontrolle seien. Jedoch zeigten weiterführende Studien, dass Dectin-1 sowohl seine eigene Signalwirkung entfalten als auch mit *Toll-like*-Rezeptoren synergetisch wirken kann. Dectin-1 spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Induktion einer erhöhten proinflammatorischen Zytokinantwort und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies^{96,97}. Die Signalkaskade von Dectin-1 kann dabei Syk (*spleen tyrosine kinase*)-abhängig oder -unabhängig aktiviert werden. Bei der Syk-abhängigen Aktivierung kommt es durch die Erkennung von β -Glucan zu einer Konformationsänderung der hemITAMs (*hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), die wiederum zu einer Stimulation der Src-Kinase (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma*) führt und die hemITAMs phosphoryliert. Die Phosphorylierung bietet eine Andockstelle für die Tyrosinkinase Syk und dadurch werden sowohl der Syk/CARD9/MAPK- als auch der Syk/PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Neben der Aktivierung von CARD9 (*caspase recruitment domain family member 9*) gefolgt von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) führt auch die Signalkaskade über PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) und AKT (*serine/threonine-specific protein*

kinases) zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), wodurch es zu der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α) kommt. Des Weiteren führen beide Signalwege zu der Aktivierung der NADPH-Oxidase, die in einer erhöhten ROS-Produktion resultiert⁹⁸. Der Syk-unabhängige Signalweg führt über Raf-1, PI3K und AKT ebenfalls zu der Aktivierung von NF- κ B und darüber zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine. Zusätzlich wird über diesen Signalweg die Phagozytose von β -Glucan induziert, die wiederum in der Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit verbunden in einer erhöhten ROS-Produktion endet. Neben dem Raf-1/PI3K/AKT- wird auch der PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α -Signalweg Syk-unabhängig aktiviert und führt zu der Histonmodifikation, die metabolische Veränderungen hervorruft und darüber Auswirkungen auf den epigenetischen Status der Zelle hat⁹⁸. Die Signalübertragung von TLR2 wird über die Rekrutierung der Adaptermoleküle MyD88 und TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) induziert und führt ebenfalls zu der Aktivierung von NF- κ B. Wenn Dectin-1 und TLR2 synergetisch aktiviert werden (Syk- und CARD9-abhängig), können ihre Signalwege miteinander interagieren, sich gegenseitig verstärken und die proinflammatorische Immunantwort erhöhen⁹⁹. Dieser Weg ist sehr wichtig, da die direkte Aktivierung von NF- κ B durch Dectin-1 und die folgende Zytokinproduktion sowohl von dem Zelltyp als auch der Umgebung abhängt. Daher ist es wichtig zu wissen, dass Dectin-1 mit *Toll-like*-Rezeptoren wie z.B. TLR2 oder TLR4 interagieren kann, damit auch in Zellen, in denen das Dectin-1-Signal zu keiner NF- κ B-Aktivierung führt, eine entsprechend starke Immunreaktion gegenüber PAMPs ausgelöst werden kann^{100,101}. Neben Dectin-1 und TLR2/6 sind auch *Scavenger*-Rezeptoren¹⁰² (z.B. CD36) oder der Komplementrezeptor 3 (CR3)¹⁰³ an der Erkennung und Internalisierung von β -Glucan beteiligt¹⁰⁴.

Verschiedene Studien befassten sich bereits mit der Induktion eines TII-Phänotyps im Mausmodell und nutzten β -Glucan aus *Candida albicans* (Soorpilz)^{88,105,106}, *Saccharomyces cerevisiae* (Backhefe)^{107,108} oder *Hordeum vulgare* (Gerste)¹⁰⁹. Dazu wurde den Mäusen an Tag -7 und Tag -4 je 1 mg β -Glucan intraperitoneal (i.p.) injiziert, bevor an Tag 0 die Induktion des zweiten Stimulus erfolgte. In dem Zusammenhang konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Akt/mTOR/HIF-1 α -abhängige Induktion der aeroben Glykolyse die metabolische Grundlage der TII darstellt⁸⁸. In einem weiteren Modell zeigte die Restimulation mit LPS erhöhte Serumlevel von TNF α , IL-6 und IL-10¹⁰⁵ und insgesamt wirkte das Training als Breitbandschutz gegen verschiedene tödliche bakterielle Infektionen (z.B. Listeriose)^{106,108}. Außerdem konnte die antitumorale Wirkung von TII in einem Modell des metastasenähnlichen Melanoms in der Lunge bewiesen werden¹⁰⁷.

1.2.2. Einfluss von *Trained innate immunity* auf kardiovaskuläre Erkrankungen

Trained innate immunity kann auf der einen Seite den Körper gegen infektiöse Mikroorganismen schützen^{68,106,110}, aber auf der anderen Seite kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs) oder chronische Nierenerkrankungen verstärken^{71,111–115}. Des Weiteren beeinflussen kardiovaskuläre Risikofaktoren wie z.B. ungesundes Essen, Hypercholesterinämie, Hyperglykämie, Rauchen und Stress selbst das angeborene Immunsystem und vor allem hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks. Das führt wiederum zu funktionellen Veränderungen in den Zellen, die chronische metabolische und vaskuläre Entzündungen fördern und damit kardiovaskuläre Erkrankungen verstärken^{111,112,114}. Die meisten Belege für einen direkten Zusammenhang zwischen TII und CVDs gibt es für Atherosklerose⁷¹. Oxidiertes LDL ist ein Schlüsselfaktor für die Entwicklung und das Fortschreiten der Atherosklerose, indem es z. B. das Wachstum von Schaumzellen auslöst und ein proinflammatorisches Milieu in der Arterienwand aufrechterhält¹¹³. Es hat sich jedoch auch gezeigt, dass oxLDL einen TII-Phänotyp in humanen Monozyten und Makrophagen induziert, indem es eine Umstellung des Stoffwechsels auf aerobe Glykolyse bewirkt. Dieser Effekt hängt von dem mTOR-Signalweg und der epigenetischen Umprogrammierung ab, wie durch die Anreicherung der Histonmarkierung H3K4me3 auf Genen, die für verschiedene proatherogene Zytokine und Chemokine kodieren, beobachtet wurde^{79,84,116}. Darüber hinaus führt oxLDL zu einem Anstieg der *Scavenger*-Rezeptoren und einer Verringerung der Cholesterin-Efflux-Transporter, was mit einer verstärkten Schaumzellenbildung einhergeht⁷⁹. Daher ist davon auszugehen, dass der durch oxLDL entwickelte TII-Phänotyp die Entwicklung und das Fortschreiten der Atherosklerose verschlimmert. Der Zusammenhang zwischen TII und CVDs wird auch durch *ex vivo* und *in vitro* Analysen von humanen Patientenzellen bestätigt. Monozyten von Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit wiesen nach 5-tägiger Differenzierung in Makrophagen eine erhöhte Fähigkeit zur Zytokinproduktion auf¹¹⁷. Darüber hinaus zeigte sich, dass die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in den Mitochondrien entstehen, durch das glykolytische Enzym Pyruvatkinase M2 (PKM2) reguliert werden, das auch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β steigert und charakteristisch für TII ist. Neben der Atherosklerose oder der koronaren Herzkrankheit wurde TII auch im perivaskulären Fettgewebe (PVAT) von abdominalen Aortenaneurysmen (AAAs) beobachtet⁷². Das PVAT war von Interesse, weil seine Funktionsstörung große Arterien in erster Linie durch die Infiltration von Immunzellen beeinflusst. Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl Immunzellen der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort in dem PVAT von AAAs zur Aufrechterhaltung eines schädigenden Kreislaufs beitragen. Mithilfe der *Reverse-Engineering*-Analyse wurde festgestellt, dass das PVAT von kleinen und großen AAAs z. B. mit H3K4me3/H3K4me1/H3K27ac-Signaturen in CD14⁺-Monozyten verbunden war, was typisch für TII ist⁷².

Häufig werden die schädlichen Auswirkungen von TII im Zusammenhang mit CVDs und speziell mit oxLDL erwähnt. Es gibt jedoch auch Faktoren, welche die Fähigkeit haben, oxLDL-induzierte TII zu unterdrücken¹¹⁸. In oxLDL-stimulierten Monozyten wurden Veränderungen im Gleichgewicht der intrazellulären Steroidhormone beobachtet. Weitere Analysen zeigten die einzigartige Fähigkeit von Progesteron, die erhöhte TNF α - und IL-6-Produktion über die nukleären Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren nach einer oxLDL-induzierten TII abzuschwächen¹¹⁸. Dies könnte ein interessantes Ziel sein, um die Entwicklung atherosklerotischer Plaques zu unterdrücken.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass TII in fast allen Humanstudien mit einer nachteiligen Auswirkung auf CVDs in Verbindung gebracht wurde. Hauptsächlich waren die negativen Einflüsse durch epigenetische Veränderungen und die daraus resultierende erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet, die zu einer Verschlimmerung von CVDs führen können (siehe Abb. 3 für einen Überblick über die komplexen Zusammenhänge zwischen TII und kardiovaskulären Erkrankungen). Es ist jedoch äußerst schwierig die Auswirkungen eines TII-Phänotyps auf CVDs zu entschlüsseln, da die TII selbst variabel ist und es sich bei CVDs zudem um sehr komplexe Krankheiten handelt, die von zahlreichen zellulären, physiologischen und genetischen Variablen beeinflusst werden (siehe Abb. 3). Außerdem ist festzuhalten, dass bisher keine Studien durchgeführt wurden, die den Einfluss eines TII-Phänotyps auf die Heilung und den Verlauf nach einem Myokardinfarkt untersucht haben.

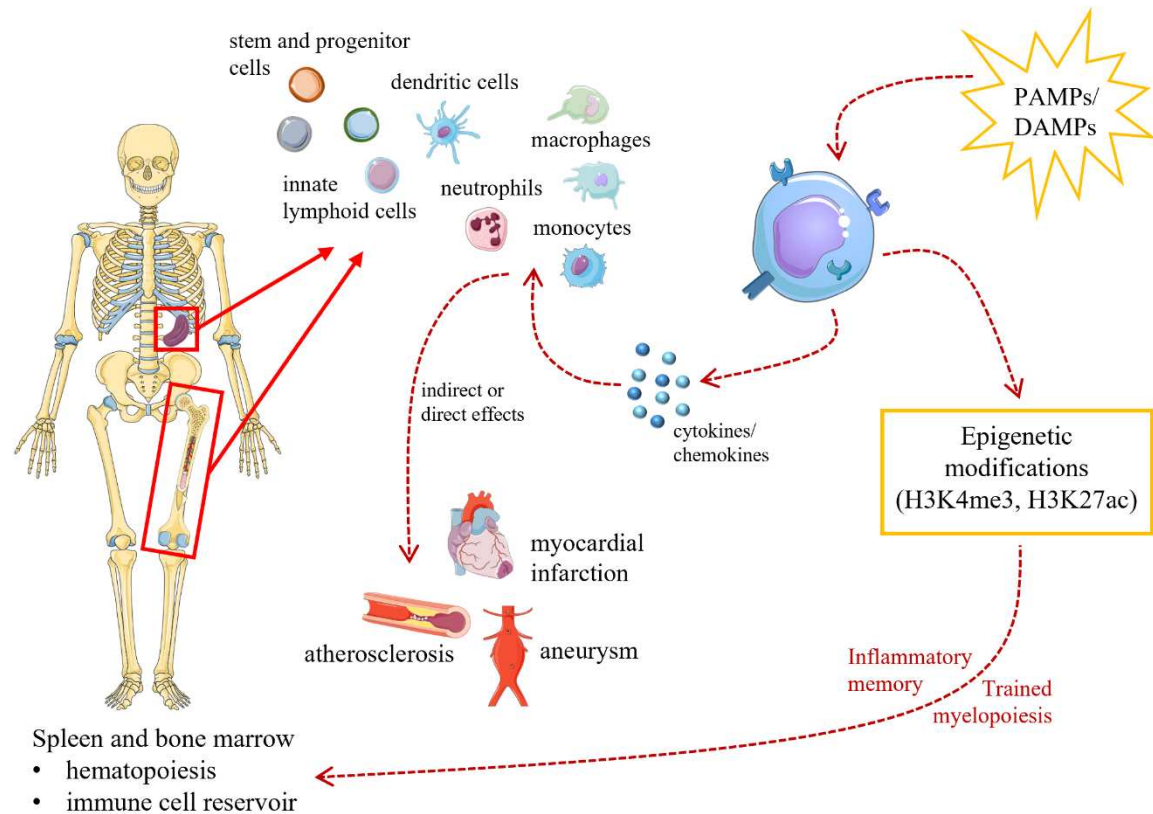


Abb. 3: Schematischer Überblick über die Wechselwirkungen zwischen TII und kardiovaskulären Erkrankungen. Verschiedene Immunzellen des angeborenen Immunsystems sowie deren Stamm- und Vorläuferzellen, die primär in der Milz und im Knochenmark zu finden sind, reagieren direkt oder indirekt auf verschiedene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) sowie *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Dies führt zu einer erhöhten Zytokin- sowie Chemokinproduktion und zur Aktivierung weiterer Immunzellen. Darüber hinaus können diese Stimuli auch epigenetische Veränderungen und metabolische Anpassungen hervorrufen, die ein Entzündungsgedächtnis des angeborenen Immunsystems sowie eine trainierte Myelopoese bewirken. Diese stimulierten Zellen wirken sich wiederum direkt oder indirekt auf die Entwicklung und das Fortschreiten verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Atherosklerose, Myokardinfarkt oder Aneurysmen aus. Die Abbildung wurde aus Kleimann et al.⁷⁴ entnommen.

2. Zielsetzung

Die Entstehung und der Verlauf eines Myokardinfarkts (MI) werden maßgeblich durch das angeborene Immunsystem beeinflusst. Dabei prägt das angeborene Immunsystem sowohl die Infarktgröße als auch die Heilung und Folgeerkrankungen nach einem MI. Im Fall der *Trained innate immunity* (TII) kommt es zu einer Veränderung der Immunzellen des angeborenen Immunsystems in Richtung eines proinflammatorischen Phänotyps. Im Zusammenhang mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. der Atherosklerose oder dem Schlaganfall zeigte der TII-Phänotyp bereits negative Auswirkungen, die das Krankheitsbild verschlechterten. Bisher wurden jedoch keine vergleichbaren Studien durchgeführt, die den Einfluss eines TII-Phänotyps auf die Entwicklung und Heilung nach einem MI untersucht haben, obwohl der MI zu den häufigsten Todesursachen weltweit gehört. Vor diesem Hintergrund wurden folgende Themeninhalte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht:

1. Etablierung einer Methode für die Induktion eines TII-Phänotyps im Mausmodell

- Lässt sich ein TII-Phänotyp durch die intraperitoneale Injektion von Zymosan A (ZyA) aus *Saccharomyces cerevisiae* induzieren?
- Welche Immunzellen werden durch die ZyA-Behandlung stimuliert?

2. Untersuchung des TII-Phänotyps auf die Entwicklung und Heilung nach einem MI

- Welchen Einfluss hat der TII-Phänotyp auf die Infarktgröße und Herzfunktion nach der Induktion eines Ischämie/Reperfusion-Modells?
- Bestimmung der Entzündungsreaktion mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT.
- Zeigen sich die gleichen Effekte in einem unsterilen Entzündungsmodell, der LPS-induzierten subkutanen Entzündung (Matrigel/LPS)?

3. Funktionelle Analysen von Immunzellen des angeborenen Immunsystems

- Nimmt die ZyA-Behandlung Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Immunzellen sowohl vor als auch nach einem zweiten Stimulus?
- Zeigen sich unterschiedliche Aktivierungsmuster durch die Induktion eines TII-Phänotyps allein oder in Kombination mit einem zweiten Stimulus?

3. Material

3.1. Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller, Typenbezeichnung
Analysenwaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214
Dispergiergerät (Ultra-Turrax)	IKA Werke (Staufen, Deutschland), T18
DLS-Analysegerät (<i>dynamic light scattering</i>)	Microtrac (Retsch GmbH, Haan, Deutschland), Nanotracer Wave II
Durchflusszytometer	BD Bioscience (San Jose, USA), FACSCanto™ II
gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer (Newton, USA), LV1
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), HERAcell 150i
Kryostat	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland), CM3050 S
Magnetrührer	IKA Werke (Staufen, Deutschland), RCT basic
Mikroskop	Olympus, BX61 (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom	Leica Biosystems (Nußloch, Deutschland), HistoCore MULTICUT
MR-Microimagingssystem	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), Mini 0,5
MR-Resonatorspule	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 25mm birdcage
MR-Spektrometer	Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 9,4 T Avance ^{III} Wide Bore
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic
Pinzetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stauschlauch	Prämeta (Troisdorf, Deutschland)
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, Deutschland). Somorex RK 100 H
Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie (UPLC)	Waters (Eschborn, Deutschland)
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland) VWR International (Radnor, Pennsylvania; USA)
Zentrifugen	Universal 320 R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland) Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) Centrifuge 5424 R, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Beckman Coulter (Brea, USA), Allegra X-30R

3.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-Well-Platte 96-Well-Rundbodenplatte	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Butterfly	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Corning-Zellsieb (70 µm, 100 µm)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Migrationskammer - Thincert Zellkultureinsatz für 24-Well-Platten (3 µm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Objektträger – SuperFrost Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spritzen (Omnifix-F 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated (Corning, New York)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)

3.3. Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Kits

Chemikalien	Molekulargewicht [g/mol]	Hersteller
ATTO 488-DPPE (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)	1.264	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
ATTO 647-DPPE	1.267	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
Corning Matrigel Basement Membrane Matrix	-	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)	350,25	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DAPI Fluoromount-G	-	SouthernBiotech (Birmingham, USA)
Dihydroethidium (DHE)	315,41	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat	177,99	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000])	2.790	Biochempeg Scientific (Watertown, USA)
DSPE-PEG ₂₀₀₀ -Maleimid	2.941,60	Avanti Polar Lipids (Alabama, USA)
Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)	437,55	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Glycerol	92,09	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Lipoid E80S	760	Lipoid (Ludwigshafen, Deutschland)
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>Salmonella typhimurium</i>	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Multi Tissue Dissociation Kit	-	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	137,99	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Neutrophil Isolation Kit, mouse	-	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Paraformaldehyd – Lösung 4 %	-	neoFroxx GmbH (Einhausen, Deutschland)
Perfluor-15-kronen-5-ether	580,07	fluorochem (Hadfield, UK)
pHrodo Green Dextran	10.000	Invitrogen (Waltham, USA)
pHrodo Green E. coli Bioparticles Konjugat	-	Invitrogen (Waltham, USA)
Wheat Germ Agglutinin (WGA) - Alexa Fluor 488 conjugate	38.000	Invitrogen (Waltham, USA)
Zymosan A (<i>S. cerevisiae</i>)	-	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Zymosan A (<i>S. cerevisiae</i>), Alexa Fluor 488 conjugate	-	Invitrogen (Waltham, USA)

3.4. Puffer und Medien

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Medien

Puffer/Medien	Chemikalien oder Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose + 10 % FCS	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) Eigene Herstellung enthält: 450 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose 50 ml FCS
Erythrozytenlysepuffer (pH = 7,4)	Hergestellt in der Zentralapotheke der Universitätsklinik Düsseldorf, enthält pro ml: 8,29 mg Ammoniumchlorid 1,00 mg Kaliumhydrogencarbonat 0,0375 mg Na-EDTA
FCS (Fetales Kälberserum)	Sigma Life Science (St. Louis, Missouri, USA)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MACS-Puffer	Eigene Herstellung enthält: 2 mM EDTA 0,5 % BSA 500 ml PBS
Phosphate-buffered saline (PBS) 1x	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphat-Glycerol-Puffer (pH = 7,4)	1 mM Phosphat 7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 3 mM Natriumdihydrogenphosphat 2,5 % m/m Glycerol

3.5. Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Spezifität	Fluorochrom/ Detektionskanal	Klon	Ursprung	Reaktivität	Firma
CD3	PE/Cyanine7	17A2	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD3/Gr-1/ CD11b/CD4 5R (B220)/ Ter-119 (Lineage Cocktail)	PE Ms	-	-	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD11b	APC	M1/70	Ratte	human/ murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD11b	PE/Cyanine7	M1/70	Ratte	murin	Invitrogen (Waltham, USA)
CD16/32	APC	93	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD18	FITC	M18/2	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)

CD34	PE/Cyanine7	SA376A4	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD36	Alexa Fluor 488	HM36	Hamster	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD45	PerCP/Cyanine5.5	30-F11	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD45R/ B220	APC/Cyanine7	RA3-6B2	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD62L	APC/Cyanine7	MEL-14	Ratte	murin	BD Bioscience (San Jose, USA)
CD63	APC	REA563	Ratte	murin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CD117 (c-Kit)	PerCP/Cyanine5.5	2B8	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD150	APC	W19132B	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
CD282 (TLR2)	FITC	6C2	Ratte	murin	Invitrogen (Waltham, USA)
CD369 (Dectin-1, CLEC7A)	PE	RH1	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
Col1A1	-	-	Kaninchen	human/ murin	Cell Signalling (Danvers, USA)
Col3A1	-	-	Kaninchen	human/ murin	abcam (Cambridge, UK)
IgG anti-Rabbit	Cy3	-	Ziege	Kaninchen	dianova (Hamburg, Deutschland)
Ly-6A/E (Sca-1)	APC/Cyanine7	D7	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
Ly-6C	APC/Cyanine7	HK1.4	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)

Ly-6G	FITC	1A8	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)
Ly-6G	PE	1A8	Ratte	murin	BioLegend (San Diego, USA)

3.6. Targeting-Ligand

Tabelle 6: Verwendeter Targeting-Ligand

Ligand	Liganden-Typ	Fluorochrom	Spezifität	Firma
mNP	Peptid	5(6)- Carboxyfluorescein	CD177	Genaxxon bioscience (Ulm, Deutschland)

3.7. Aminosäuresequenz des verwendeten Peptids

Tabelle 7: Aminosäuresequenz des verwendeten Peptids

Peptid	Aminosäuresequenz
mNP	5(6)-Carboxyfluorescein-Asp-Phe-Tyr-Lys-Pro-Met-Pro-Asn-Leu-Arg-Ile-Thr-Gly-Gly-Gly-Cys-NH ₂

3.8. Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programmpaket Microsoft 365 für die Verwendung von Word, Excel und PowerPoint genutzt. Alle weiteren Computerprogramme werden im direkten Zusammenhang mit der Methode unter Kapitel 4 erwähnt.

4. Methoden

4.1. Tierversuche in der Maus

Für diese Arbeit wurden ausschließlich 10 - 12 Wochen alte männliche C57BL/6-Mäuse mit einem Körpergewicht von 20 - 30 Gramm eingesetzt. Die verwendeten Tiere wurden von *Janvier* bezogen, in der zentralen Tieranlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder in unserem Institut in einem dafür vorgesehenen Klimaschrank im 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, mit Standardfutter gefüttert und erhielten Leitungswasser *ad libitum*. Die entsprechenden Tierversuchsanträge sind unter den Aktenzeichen 81-02.04.2018.A007, 81-02.04.2019.A466 und 81-02.04.2024.A012 gelistet.

4.2. Das *Trained innate immunity*-Modell

Die Induktion eines *Trained innate immunity* (TII)-Phänotyps erfolgte über die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Zymosan A (ZyA), einem etwa 3 µm großen Hefezellwandbestandteil. Den Mäusen wurde zweimal in einem Abstand von drei Tagen (Tag -7 und Tag -4) je 1 mg ZyA (100 µl) in PBS gelöst [10 mg/ml] i.p. injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt zu den gleichen Zeitpunkten je 100 µl PBS. Im Anschluss an die Behandlung mit ZyA bzw. PBS wurde ein zweiter Stimulus an Tag 0 induziert. Für diese Arbeit wurden sowohl der Myokardinfarkt (MI) als auch eine LPS-induzierte subkutane Entzündung (Matrigel/LPS) als zweiter Stimulus eingesetzt. Die jeweiligen Versuchsreihen wurden über zwei unterschiedliche Zeiträume ausgeführt (Abb. 4). Sowohl für die MI- als auch die Matrigel/LPS-Versuchsreihe wurden an Tag -7 basale MRT-Messungen vor erster Behandlung durchgeführt. Die MRT-Messungen wurden an Tag -4 wiederholt und an Tag 0 folgte die Induktion eines zweiten Stimulus. An Tag 1 nach MI wurden sogenannte LGE (*Late Gadolinium Enhancement*)-MRT-Messungen durchgeführt. Des Weiteren erfolgte an Tag 1 für beide Entzündungsmodelle die intravenöse (i.v.) Injektion von PFCE-PFCs, sodass an Tag 2 nach Induktion des zweiten Stimulus $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen durchgeführt werden konnten. Für die Analysen des direkten Einflusses von ZyA auf den zweiten Stimulus wurden die Tiere an Tag 2 nach den MRT-Messungen getötet und das Blut sowie die Organe für folgende durchflusszytometrische Messungen entnommen (Kapitel 4.4.1). Wie in Abb. 4 b) dargestellt, wurden die Mäuse für die Untersuchungen des Langzeiteffekts von ZyA auf den Verlauf und die Heilung nach zweitem Stimulus nicht an Tag 2 getötet, sondern über vier Wochen hinweg mittels ^1H -MRT untersucht. An Tag 28 nach MI wurden die Tiere getötet und das Herz für weiterführende histologische Untersuchungen entnommen und kryokonserviert. Im Zuge der LPS-induzierten subkutanen

Entzündung wurde den Mäusen an Tag 28 das Matrigel entnommen und in Bezug auf die Immunzellzahl mittels Durchflusszytometrie untersucht.

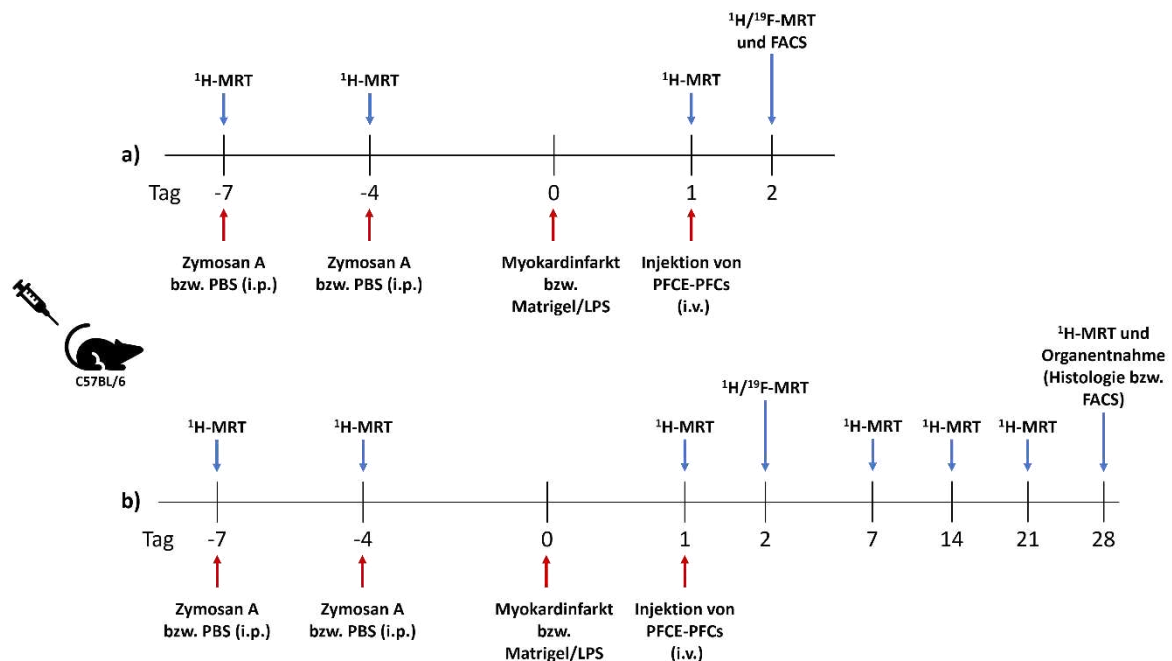


Abb. 4: Versuchsablauf der Induktion eines *Trained innate immunity* (TII)-Phänotyps und anschließendem Myokardinfarkt (MI) bzw. LPS-induzierter subkutaner Entzündung (Matrigel/LPS). a) Es wurde der direkte Einfluss eines TII-Phänotyps auf einen zweiten Stimulus untersucht. b) Analyse der Langzeitfolgen (vier Wochen) von TII auf den Verlauf und die Heilungsphase nach zweitem Stimulus (MI bzw. Matrigel/LPS). a)/b) Aufgeführt sind die intraperitonealen (i.p.) Injektionen des Zymosan A bzw. PBS sowie die Induktion eines zweiten Stimulus und die intravenöse (i.v.) Injektion von PFCE-PFCs. Des Weiteren sind die Zeitpunkte der ^1H -MRT und $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT sowie die finale Organentnahme für durchflusszytometrische Messungen bzw. histologische Untersuchungen dargestellt.

4.2.1. TII und Induktion eines Myokardinfarkts

Wie zuvor beschrieben wurden die Mäuse an Tag -7 und Tag -4 mit ZyA bzw. mit PBS (100 μl i.p.) behandelt. An Tag 0 folgte die Induktion eines Myokardinfarkts (MI). Die Operation wurde freundlicherweise von Herrn Dr. med. Zhaoping Ding aus dem Institut für Molekulare Kardiologie durchgeführt. Für die Induktion des MI wurde das 50-minütige Ischämie-Reperusions-Modell eingesetzt, das ein in der Literatur standardisiertes und seit Jahren in unserer Arbeitsgruppe genutztes Modell ist, welches dem klinischen Bild gut entspricht. Um den MI hervorzurufen wurden die Tiere zunächst narkotisiert. Die Einleitung der Isofluran-Narkose erfolgte in einer Plexiglas-Kiste bei 3 Vol.-% Isofluran und Sauerstoff. Die Tiere wurden anschließend orotracheal intubiert, beatmet und auf einem beheizten Operationstisch fixiert. Die Narkoseerhaltung erfolgte über eine Atemmaske mit 1,5 Vol.-% Isofluran. Zur Analgesie wurde 30 min präoperativ 0,3 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin subkutan (s.c.) injiziert. Über die gesamte Zeit befanden sich die Mäuse auf einer Wärmeplatte, um das Auskühlen zu verhindern. Dabei wurde die

Körpertemperatur der Tiere über ein Rektalthermometer kontrolliert. Anschließend wurde zum Schutz der Cornea Augensalbe appliziert und der Thoraxbereich mit einer Enthaarungscreme enthaart, gesäubert sowie desinfiziert. Der Thorax wurde mittels medialem Schnitt entlang der linken Seite des Sternums geöffnet und die LAD (*left anterior descending artery*) mittels 6/0 Polypropylen-Nahtmaterial ligiert. Nach 50 min wurde die Okklusion wieder gelöst. Abschließend wurde der Thorax mit zweischichtigen Wundverschlüssen wieder vernäht. Zur postoperativen Analgesie wurde zweimal täglich bis einschließlich Tag 2 nach Operation 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin s.c. injiziert sowie mit Buprenorphin versetztes Trinkwasser (0,3 mg/ml; Menge 120 ml) über Nacht angeboten.

4.2.2. TII und folgende LPS-induzierte subkutane Entzündung

Analog zu dem Versuchsablauf für den Myokardinfarkt wurden auch die Mäuse vor der Matrigel/LPS-Implantation an Tag -7 und Tag -4 mit ZyA bzw. PBS als Kontrollen behandelt. Für die Implantation des mit LPS versetzten Matrigels wurden die Mäuse ebenfalls mit Isofluran narkotisiert und zur Analgesie 30 min präoperativ mit 0,3 mg/kg Buprenorphin behandelt. Die Einleitung der Narkose erfolgte über eine Narkosekammer mit 3 Vol.-% Isofluran. Anschließend wurde die Narkose über eine Atemmaske mit 1,5 Vol.-% Isofluran aufrechterhalten. Während des gesamten Eingriffs befanden sich die Mäuse auf einer Wärmeplatte, die das Auskühlen verhinderte. Zum Schutz der Cornea wurde den Tieren Augensalbe appliziert, daraufhin der Nackenbereich rasiert, desinfiziert und 50 µl flüssiges Matrigel, welches mit 1 µg/µl LPS versetzt war, s.c. injiziert. Die Dauer des kompletten Eingriffs lag bei etwa 15 - 20 min. Zur postoperativen Analgesie wurde ebenfalls zweimal täglich bis einschließlich Tag 2 nach Operation 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin s.c. injiziert sowie mit Buprenorphin versetztes Trinkwasser (0,3 mg/ml; Menge 120 ml) über Nacht angeboten.

4.3. Ablauf und Durchführung von Messungen mittels Magnetresonanztomographie

Alle Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen wurden mit einem vertikalen 9,4 Tesla Bruker AVANCEIII Wide Bore NMR-Spektrometer (Bruker) durchgeführt. Das NMR-Spektrometer wurde über die Software ParaVision 5.1 gesteuert und arbeitete mit Frequenzen von 400,21 MHz für ¹H-Messungen und 376,54 MHz für ¹⁹F-Messungen unter Verwendung einer Bruker Microimaging-Einheit (Micro2.5) mit aktiv abgeschirmten Gradientensätzen. Bei der MRT handelt es sich um ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren. Dabei bietet die ¹H-MRT einen exzellenten Kontrast zwischen verschiedenen Geweben und kann darüber hinaus durch spektroskopische

Untersuchungen ergänzt werden. Für die bessere Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen oder Zellen werden Kontrastmittel eingesetzt. Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs) eignen sich besonders gut, da sie aufgrund ihres hohen Fluor (^{19}F)-Gehalts hintergrundfrei mittels ^{19}F -MRT detektiert werden können.

Für diese Arbeit wurden die MRT-Daten sowohl mit einem reinen 25-mm-Quadratur- ^1H -Resonator als auch einem 25-mm-Quadratur- $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Resonator erfasst. Für alle MRT-Messungen wurden die Mäuse zunächst in einer Narkosekammer platziert, in welcher die Einleitung der Narkose mit 3 Vol.-% Isofluran erfolgte. Anschließend wurden die Tiere in einem *Animal-Handling*-System im Probenkopf so platziert, dass das zu untersuchende Gewebe/Organ im Isozentrum des Resonators lag. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über eine Atemmaske mit 1,5 Vol.-% Isofluran und die Atmung wurde über einen Atemballon kontrolliert. Des Weiteren wurde das gesamte System auf einer Temperatur von 37 °C gehalten, damit die Tiere vor dem Auskühlen geschützt waren. Nachdem das *Animal-Handling*-System mit dem Versuchstier in den Magneten eingebracht und fixiert wurde, erfolgten zunächst orientierende anatomische Messungen mittels ^1H -MRT, um die Position der jeweiligen Organe zu identifizieren. Anschließend erfolgten hochaufgelöste anatomische, funktionelle und parametrische Untersuchungen (T1, T2), mit denen sich strukturelle Veränderungen des Gewebes ermitteln ließen und deren Messparameter in einer Tabelle im Anhang aufgelistet sind (Ergänzende Tabelle 1). Die Dauer der jeweiligen MRT-Messungen lag bei ca. 60 min.

Im Zuge der Untersuchungen des TII-Phänotyps auf einen **Myokardinfarkt** wurden an Tag -7 basale Herzfunktionsmessungen sowie basale parametrische Untersuchungen des Herzes mithilfe des sogenannten T1- und T2-Mappings durchgeführt, die im späteren Messverlauf Auskunft über die Fibrosierung und Ödembildung im Herzgewebe geben können. Mithilfe der ^1H -Herzfunktionsmessungen wurden das enddiastolische Volumen (EDV), endsystolische Volumen (ESV), die Ejektionsfraktion (EF) und die Wanddicke bestimmt. Aufnahmen von Mäuseherzen wurden sowohl in transversaler als auch coronaler Orientierung mit einer retrospektiv getriggerten schnellen *Low-Angle-Shot-Cine*-Sequenz (IntragateFLASH, Bruker) aufgenommen. Die Transversal-Messungen erfolgten über das gesamte Herz jeweils in einem Abstand von 1 mm Schritten mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die gleichen Messungen wurden je nach Versuchsablauf an Tag -4, Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 wiederholt. An Tag 1 nach MI erfolgten neben den zuvor erwähnten Messungen auch die *Late Gadolinium Enhancement* (LGE)-MRT-Messungen, die Aufschluss über die Infarktgröße gaben. Dazu wurde den Mäusen vor Messbeginn 200 µl eines Gadolinium-Komplexes (Multihance, 0,5 mmol/kg KG) i.p. injiziert. Nach den Messungen an Tag 1 erfolgte die i.v. Injektion von PFCE-PFCs (2 mmol/kg Körpergewicht) in die Schwanzvene. Dazu

wurden die Mäuse direkt nach der Messung aus dem *Animal-Handling-System* entnommen und auf eine 37 °C-Wärmeplatte gelegt und die Narkose über eine Atemmaske mit 1,5 Vol.-% Isofluran aufrechterhalten. An Tag 2 nach MI erfolgten daher die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen der Herzen. Nach der Aufnahme von anatomischen ^1H -Bildern in transversaler Orientierung wurde der Resonator auf ^{19}F abgestimmt und anatomisch passende ^{19}F -Bilder aufgenommen (Ergänzende Tabelle 1).

Neben dem MI wurde auch der Effekt des TII-Phänotyps auf eine LPS-induzierte subkutane Entzündung (**Matrigel/LPS**) untersucht. Dazu wurden ebenfalls an Tag -7 basale ^1H -MRT-Messungen durchgeführt. In diesem Versuchsaufbau handelte es sich dabei um T1- und T2-Messungen der beiden Hinterbeine, wobei der Fokus jeweils auf dem Knochenmark des Femurs lag. Die Messungen des Femurs wurden ebenfalls an Tag -4 vor und Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation wiederholt. An Tag 1 erfolgte die i.v. Injektion von PFCE-PFCs (2 mmol/kg Körpergewicht), sodass an Tag 2 das ^{19}F -Signal mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT sowohl im Knochenmark des Femurs als auch im Matrigel bestimmt werden konnte. Des Weiteren wurden T1- und T2-Messungen des Matrigels durchgeführt, die im Verlauf der Langzeitstudie an Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 wiederholt wurden. Sowohl für die ^1H - als auch die ^{19}F -Messungen wurden durch beide Hinterbeine je drei Schichten und durch das gesamte Matrigel je 11 Schichten mit 1 mm Schichtdicke gelegt.

Zusätzlich zu den Effekten eines zweiten Stimulus nach Induktion eines TII-Phänotyps, wurde auch der alleinige Effekt von ZyA auf das ^{19}F -Signal im Knochenmark des Femurs sowie der Milz untersucht. Dazu wurde der TII-Phänotyp induziert und an Tag -1 folgte die i.v. Injektion von PFCE-PFCs (2 mmol/kg Körpergewicht). An Tag 0, vor Induktion eines zweiten Stimulus, erfolgten die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen des Femurs beider Hinterbeine sowie der Milz.

4.3.1. Auswertung der gemessenen ^1H - und ^{19}F -MRT-Daten

Über Paravision 5.1. erfolgte die Analyse der ^1H -Datensätze der Herzen. Jedes Herz wurde über 7 bis 8 transversale ^1H -Scans vom Apex bis zur Basis aufgenommen und konnte darüber in Bezug auf die Herzfunktion ausgewertet werden. Dafür wurde der linke Ventrikel jedes Transversalschnitts in der Diastole und in der Systole über sogenannte *Regions of interest* (ROI) eingekreist, woraus sich das enddiastolische (EDV) und endsystolische (ESV) Volumen des jeweiligen Herzschnitts berechnen ließ. Das EDV und ESV wurde von allen Schnitten addiert und ergab das gesamte EDV und ESV des jeweiligen Herzes. Des Weiteren wurde über die mittventrikuläre Schicht die Wanddicke in der Diastole und in der Systole bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Analyse der regionalen Wanddicke im Infarktbereich in der Diastole an Tag 28 über die Software *ImageJ/Fiji*.

Für die Lokalisation des Infarktbereichs wurde das Gadoliniumsignal an Tag 1 verwendet. Anschließend wurden über den gesamten Infarktbereich fünf Messlinien vom Epikard bis Endokard gezogen und der Mittelwert der Wanddicke (in Pixel) gebildet. Aus dem EDV und ESV konnte weiterführend das Schlagvolumen berechnet werden, welches verrechnet mit der Herzfrequenz das Herzzeitvolumen ergab. Neben der Herzfunktion wurde auch der Gadoliniumgehalt an Tag 1 nach MI in den Transversalschnitten ausgewertet und für jedes Herz addiert. Dieser Wert gab Auskunft über die Infarktgröße des jeweiligen Herzes.

Die Auswertung der ^{19}F -Datensätze erfolgte über das „SNR-Tool“. Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ist eine dimensionslose Größe, die aus dem Quotienten der mittleren Signalstärke und der mittleren Standardabweichung des Hintergrundrauschens berechnet wird. Die Auswertung des ^{19}F -SNR erfolgte ebenfalls über ROI, die um das gemessene ^{19}F -Signal im Herz, im Matrigel, im Knochenmark oder in der Milz gelegt wurden. Für das gesamte ^{19}F -SNR wurde das ^{19}F -Signal über alle gemessenen Schichten addiert. Das ^{19}F -SNR des Femurs wurde für beide Beine bestimmt und anschließend der Mittelwert für jede Maus gebildet, sodass am Ende ein Datenpunkt pro Maus vorlag. Über das Programm „Overlay-Tool“ wurden die Überlagerungen der ^1H - und ^{19}F -Aufnahmen angefertigt.

Mithilfe der sogenannten „T1- bzw. T2-Map-Tools“ wurden die T1- und T2-Messungen ausgewertet. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch hier ROI in den gewünschten Bereich gelegt und quantifiziert, was Aufschluss über die T1- und T2-Zeiten [ms] und somit über die Fibrosierung bzw. Ödembildung des gewünschten Gewebes gab. Bei den Auswertungen des Femurs, wurde jeweils ein ROI ins Knochenmark und als Referenz in den Oberschenkelmuskel gelegt. Die T1- und T2-Maps wurden ebenfalls für beide Beine analysiert und anschließend gemittelt, sodass pro Maus ein Datenpunkt in den finalen Auswertungen aufgeführt wurde. Das Matrigel wurde insgesamt eingekreist und ausgewertet. Für die basalen Auswertungen der mittventrikulären Schicht des Herzes wurden zunächst die Werte des gesamten Myokards des linken Ventrikels bestimmt. Ab Tag 1 wurde zwischen dem intakten Myokard und dem infarzierten Bereich, der durch das Gadoliniumsignal identifiziert werden konnte, unterschieden.

4.4. Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine schnelle Messung der qualitativen und quantitativen Charakteristika von großen Zellpopulationen bzw. einzelnen Zellen. Diese Methode beruht auf der Analyse von ausgesendetem Streu- und Fluoreszenzlicht von Zellen, die zuvor über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper gekennzeichnet wurden. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals ist proportional zu der Dichte des Antigens bzw. zur Anzahl der gebundenen Antikörper. Es wird zwischen zwei Arten von Streulicht unterschieden: Wird der Laser an der Zelloberfläche abgelenkt, entsteht das Vorwärtsstreulicht (FSC; *Forward Scatter*), welches mit der Zellgröße und -komplexität korreliert. Das Seitwärtsstreulicht (SSC; *Side Scatter*) gibt aufgrund der Beugung an inneren Zellmembranen, Vesikeln oder am Zellkern Aufschluss über die Granularität der Zelle. Über das Fluoreszenzsignal kann eine Zellpopulation z.B. auf das Vorhandensein bestimmter Markerproteine getestet werden.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die Untersuchung verschiedener Aktivierungsmarker, die Analyse von Endozytoseeigenschaften über fluoreszenzmarkierte Partikel und die Bestimmung der Immunzellzahl eingesetzt. Durchflusszytometrische Analysen erfolgten nach ZyA- bzw. PBS-Behandlung an Tag 0 vor Induktion eines zweiten Stimulus sowie an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation und an Tag 2 nach MI bzw. Matrigel/LPS-Implantation. Abschließend wurde auch an Tag 28 nach Matrigel/LPS-Implantation die Gesamtzellzahl im Matrigel durchflusszytometrisch bestimmt. Die Aufreinigung der Zellen aus dem Blut, der Milz, dem Knochenmark, dem Herz und dem Matrigel verlief für jeden Versuch nach dem gleichen Schema. Daher wird im Folgenden ausführlich erläutert, wie die Immunzellen aus dem entsprechenden Gewebe, Organ oder Blut isoliert und welche Antikörper für die Charakterisierung einzelner Zellpopulationen eingesetzt wurden.

4.4.1. Immunzellisolation aus Blut, Milz, Knochenmark, Herz und Matrigel

Zunächst wurden den Mäusen 250 µl Heparin [100 U/ml] i.p. injiziert, um die Blutgerinnung zu verhindern. Heparin bindet an Antithrombin und vervielfacht dessen Wirkung. Dadurch wird Thrombin inaktiviert und Fibrinogen kann nicht mehr zu Fibrin gespalten werden, wodurch eine Gerinnung inhibiert wird. Anschließend wurden die Versuchstiere schmerzfrei mit einer i.p. Injektion von 150 µl einer Kombinationsnarkose (100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin gelöst in 150 mM NaCl) getötet. Sobald keine Zwischenzehenreflexe mehr vorhanden waren, wurde mit der finalen Blut-/Gewebeentnahme begonnen. Die Blutentnahme erfolgte über die *Vena cava inferior*. Dazu wurde der Maus das Bauchfell von caudal nach cranial

und die Unterhaut entlang der *Linea alba* geöffnet. Nach Freipräparation der *Vena cava* wurde mittels einer Kanüle 500 µl Blut entnommen, direkt in 5 ml Erythrozytenlysepuffer überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde das lysierte Blut für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte, die mit Zellen in Zusammenhang stehen, wurden für 5 min bei 300 x g durchgeführt. Wurden die Zellen anders zentrifugiert, wird es im Text erwähnt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet nochmals mit 2 ml Erythrozytenlysepuffer für 10 min auf Eis behandelt. Dann folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl DMEM+FCS (Fetales Kälberserum) [10 %] resuspendiert und auf Eis gelagert.

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde an Tag 2 nach MI der Rippenbogen geöffnet und das Herz durch einen Stich in den linken Ventrikel mit 20 ml kaltem PBS gespült. Anschließend wurde das Herz herausgeschnitten, gewogen und mithilfe des „*Multi Tissue Dissociation Kit 2*“ von Miltenyi Biotec verdaut. Das Herz wurde in die vorbereitete Enzym-Mischung überführt und zunächst mit einer Schere zerkleinert. Danach erfolgte der Verdau über das „gentleMACS“-System mit dem Programm „37C_Multi_G“. Anschließend wurde das verdaute Herz mit 7,5 ml DMEM+FCS gefiltert (70 µm Filter). Die Zellsuspension wurde daraufhin bei 600 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer für 10 min auf Eis lysiert. Nach der Lyse folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 600 x g, woraufhin der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml DMEM+FCS aufgenommen wurde. Folgend wurde die Zellsuspension für 1 min bei 50 x g zentrifugiert und der Überstand, in dem sich die Immunzellen befanden, abgenommen und nochmals bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde abschließend in 500 µl DMEM+FCS resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

Nach LPS-induzierter subkutaner Entzündung wurde an Tag 2 sowie an Tag 28 anstelle des Herzes das Matrigel für folgende durchflusszytometrische Messungen entnommen. Dazu wurde die Haut aus dem Bereich des Nackens, in den das Matrigel implantiert wurde, herausgeschnitten und mit Nadeln fixiert. Daraufhin konnte das Matrigel, welches nun gelartig an der Haut festsaß, mit Hilfe einer Schere entnommen werden. Das Matrigel wurde über einen 100 µm Filter mit 5 ml MACS-Puffer zerrieben und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml DMEM+FCS resuspendiert und anschließend auf Eis platziert.

Neben dem Herz bzw. dem Matrigel wurde auch die Milz entnommen, gewogen und über einen 100 µm Filter mit MACS-Puffer zerrieben. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis behandelt. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert, das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer

resuspendiert und gefiltert. Die gefilterten Milzzellen wurden abschließend mit MACS-Puffer gewaschen sowie zentrifugiert und das Zellpellet in 6,5 ml DMEM+FCS aufgenommen und auf Eis gelagert.

Nach Entnahme der Milz wurde das rechte Hinterbein abgeschnitten und von Fell, Muskeln sowie Fett befreit, sodass Femur und Tibia in ein präpariertes 500 µl Reaktionsgefäß überführt werden konnten. Die Knochen wurden für 30 Sekunden bei 10.000 x g zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und mit weiteren 3 ml Erythrozytenlysepuffer gefiltert (100 µm Filter). Daraufhin wurden die Erythrozyten für 10 min auf Eis lysiert, anschließend zentrifugiert und die verbliebenen Immunzellen in 4 ml MACS-Puffer aufgenommen sowie nochmals gefiltert. Die Zellsuspension wurde ein letztes Mal zentrifugiert, anschließend das Zellpellet in 1,5 ml DMEM+FCS resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

4.4.2. Antikörperfärbung und durchflusszytometrische Messung

Nachdem die Immunzellen aus dem Blut, der Milz, dem Knochenmark und dem Herz oder Matrigel isoliert vorlagen, wurden Antikörper-Mischungen für die folgenden durchflusszytometrischen Messungen vorbereitet. Um zwischen Immunzellen des angeborenen und denen des erworbenen Immunsystems zu unterscheiden, wurden zwei verschiedene Antikörper-Kombinationen verwendet. In beiden Färbungen wurde CD45-PerCP/Cy5.5 zur Identifizierung von Leukozyten und CD11b-APC für die Unterscheidung von Lymphozyten und myeloiden Zellen genutzt. Myeloide Zellen wurden weiter über Ly6G-PE in neutrophile Granulozyten und über Ly6C-APC/Cy7 in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten bzw. Makrophagen untergliedert. Lymphozyten konnten mit CD3-PE/Cy7 in T-Zellen und mit B220-APC/Cy7 in B-Zellen unterteilt werden. Beispielhaft ist in Abb. 5 das Gating-Schema für Immunzellen aus dem Blut dargestellt. Die weiteren Gating-Strategien für Immunzellen aus der Milz, dem Knochenmark, dem Herz und dem Matrigel sind im Anhang aufgeführt (Ergänzende Abb. 1 - 4).

Neben reifen Immunzellen wurden auch Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks analysiert. Dafür wurden zwei unterschiedliche *Gating*-Strategien eingesetzt, die sich in einem Antikörper bei der Differenzierung von Vorläuferzellen unterschieden und im Folgenden als Version 1 und Version 2 aufgeführt werden (siehe Abb. 6). Für beide Versionen wurden zunächst über einen sogenannten Lineage Cocktail-PE alle Lineage-positiven Zellen (reife Immunzellen) detektiert. Aus den Lineage-negativen Zellen konnte mithilfe von c-Kit-PerCP/Cy5.5 und Sca-1-APC/Cy7 zwischen LSK (Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺)- und LK (Lin⁻/Sca-1⁻/c-Kit⁺)-Zellen unterschieden werden. LSK-Zellen umfassen hämatopoetische Stammzellen und multipotente Vorläuferzellen. Die LK-Zellen, welche

Vorläuferzellen einschließen, konnten wiederum über CD150-APC (Version 1) bzw. CD16/32-APC (Version 2) und CD34-PE/Cy7 in CMP (*common myeloid progenitor*), MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) und GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) unterteilt werden. Es wurden zwei unterschiedliche *Gating*-Strategien eingesetzt, weil hämatopoetische Stammzellen sowie Vorläuferzellen keine klaren Populationen bilden und daher schwer voneinander abzugrenzen sind. Daher wurde zum einen eine bereits bekannte Strategie über CD16/32 und CD34 (Version 2) gewählt. Zum anderen orientierten wir uns an der Strategie von Olender et al.¹¹⁹, die über CD150 und CD34 (Version 1) eine vielversprechende Trennung der Vorläuferzellen aufzeigten. Ein wesentlicher Unterschied dabei ist, dass bei dem *Gating* über CD150 und CD34 die drei Populationen CMP, GMP und MEP unterschieden werden, während es bei Version 2 eine vierte undefinierte Population gibt, die CD16/32-positiv, aber CD34-negativ ist. In den folgenden Versuchen wurden sowohl Version 1 als auch Version 2 angewandt, wobei bei der Auflistung in den Ergebnissen der Vorläuferzellen nur Version 1 gezeigt wird. Die Ergebnisse für Version 2 können dem Anhang entnommen werden (Ergänzende Abb. 5).

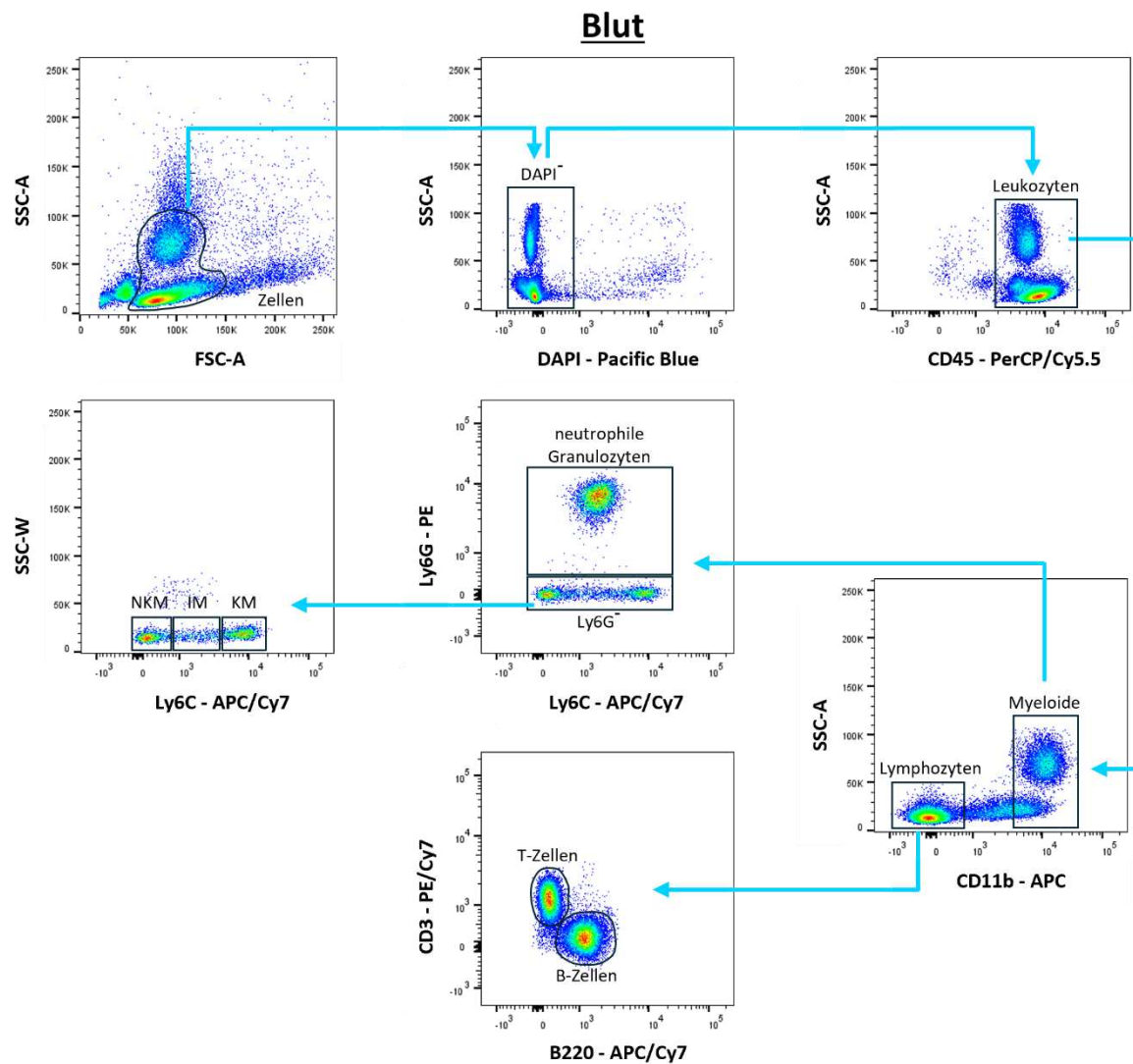


Abb. 5: Gating-Strategien für Immunzellen aus dem Blut. Über den Side (SSC-A) und Forward Scatter (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC myeloide Zellen (CD11b⁺) und Lymphozyten (CD11b⁻) differenziert. Aus den myeloiden Zellen werden über Ly6G-PE neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) und Ly6G-negative (Ly6G⁻)-Zellen unterschieden. Ly6G⁻-Zellen können weiter über Ly6C-APC/Cy7 in nicht-klassische (NKM), intermediäre (IM) und klassische (KM) Monozyten unterteilt werden. Lymphozyten werden über CD3-PE/Cy7 und B220-APC/Cy7 in T-Zellen und B-Zellen differenziert.

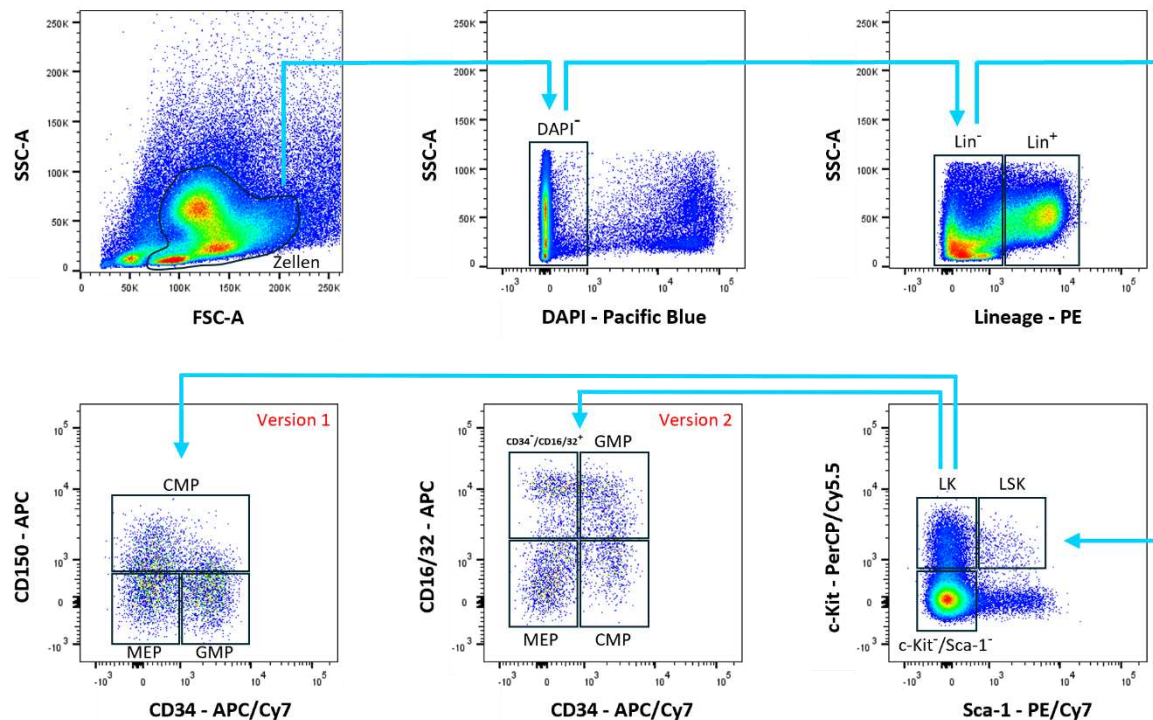


Abb. 6: Zwei Gating-Strategien für Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Aus den lebenden Zellen werden über den Lineage Cocktail-PE die Lineage-negativen (Lin⁻)- und Lineage-positiven (Lin⁺)-Zellen ausgewählt. Lin⁻-Zellen werden weiter über c-Kit-PerCP/Cy5.5 und Sca-1-PE/Cy7 in LSK- (Stammzellen), LK- (Vorläuferzellen) und c-Kit/Sca-1-Zellen unterteilt. Die LK-Zellen können über zwei verschiedene Gating-Strategien in CMP (*common myeloid progenitor*), MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) sowie GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) (Version 1 und 2) und zusätzlich CD34/CD16/32⁺-Zellen (Version 2) unterschieden werden. Für Version 1 werden die Antikörper CD150-APC sowie CD34-APC/Cy7 und für Version 2 CD16/32-APC sowie CD34-APC/Cy7 eingesetzt.

Alle Antikörper, bis auf CD150 [2:100; 4 µg/ml] und CD16/32 [1:50; 2,5 µg/ml], wurden 1:100 [2 µg/ml] in MACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Wenn in den folgenden Versuchen zusätzliche Antikörper verwendet und Änderungen vorgenommen wurden, wird dies in dem entsprechenden Abschnitt erwähnt.

Für jeden Ansatz wurden 100 µl der vorbereiteten Immunsuspension in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets mit 100 µl der jeweiligen Antikörper-Mischung für myeloide Zellen, Lymphozyten oder Stamm-/Vorläuferzellen resuspendiert. Die Antikörperfärbung erfolgte für 20 min bei 4 °C. Hiernach wurden die Zellen mit je 100 µl MACS-Puffer gewaschen und in 100 µl DAPI/MACS-Puffer [1 µg/ml] aufgenommen, um zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden zu können. Dabei sind alle DAPI-positiven Zellen tot, da der Farbstoff mit der DNA interkaliert. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem BD FACSCanto II über die BD FACSDiva™ Software. Zur Bestimmung der Zellzahlen war es wichtig, dass die Zellen immer über eine konstante Zeit und gleiche

Flussgeschwindigkeit gemessen wurden. Daher wurden Immunzellen aus dem Blut, dem Herz sowie dem Matrigel und Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark immer für 60 Sekunden auf „Low“ gemessen. In dieser Zeit maß das Gerät 10 µl der Zellsuspension und darüber konnte die Gesamtzellzahl des gewünschten Gewebes etc. berechnet werden. Immunzellen aus der Milz und dem Knochenmark wurden für 30 Sekunden auf „Low“ gemessen und dementsprechend wurden 5 µl der Zellsuspension analysiert. Für die Ergebnisdarstellung der Immunzellen aus Herz, Matrigel, Femur oder Milz wurde die Gesamtzellzahl des Organs, des Gewebes bzw. des Knochenmarks eines Beins angegeben. Im Blut wurde die Gesamtzellzahl pro Milliliter bestimmt.

Die qualitative und quantitative Analyse von allen durchflusszytometrischen Messungen erfolgte über das Programm FlowJo_v10.10.0.

4.5. Herstellung von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs)

Die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs) erfolgte über das Prinzip der Hochdruckhomogenisation mittels eines Microfluidizers (LV1). Dieses Verfahren wird in einer Strömungsdispergiermaschine durchgeführt und arbeitet nach dem Druckentspannungsprinzip. Zunächst wird eine heterogene Voremulsion hergestellt, aus der im folgenden Homogenisationsprozess eine Nanoemulsion gebildet wird. Der für diese Arbeit eingesetzte LV1-Microfluidizer besteht aus den folgenden Komponenten: Ein hydraulisches Antriebssystem versorgt den LV1 mit Strom und liefert der Hochdruckkolbenpumpe den Druck, den sie auf das benötigte Betriebsniveau (1000 bar) vervielfacht. Des Weiteren befindet sich im LV1 eine Keramik-Interaktionskammer, in der die Zerkleinerung der Emulsion stattfindet. Dabei wird die Emulsion bzw. werden die Partikel auf eine hohe Geschwindigkeit beschleunigt sowie einer intensiven Scherung und einem Aufprall ausgesetzt. Die Flüssigkeit, in diesem Fall die Voremulsion, wird durch die Hochdruckkolbenpumpe über das Einlassrückschlagventil gesogen, das während des Kraftstubs geschlossen wird. Währenddessen wird der Produktstrom auf ein konstantes Druckniveau angehoben und tritt in die Interaktionskammer ein. Dabei durchläuft die Emulsion mehrere Mikrokanäle, wodurch die Geschwindigkeit erhöht wird. Währenddessen wirken zwei primäre Kräfte auf die Emulsion: Die Scherung bewirkt die Verformung des Produktstroms, die durch den Kontakt mit den Kanalwänden bei hoher Geschwindigkeit entsteht, sowie die Kollision, die zustande kommt, wenn der Produktstrom mit hoher Geschwindigkeit auf sich selbst auftrifft. Durch dieses Verfahren können kleinste Partikelgrößen bis unter 100 nm erreicht werden.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether)-PFCs eingesetzt. Für die Herstellung von je 10 g PFCs wurden folgende Einwaagen verwendet: 20 % PFCE und 35 mM Lipid

E80S [760 g/mol] wurden mit Phosphat-Glycerol-Puffer (pH = 7,4) auf 10 g Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Gemisch wurde mithilfe eines Dispergiergeräts (Ultra-Turrax) auf höchster Stufe für 3 min voremulgiert, bevor es über 5 Zyklen bei 1000 bar über den LV1 homogenisiert wurde. Je nach Versuchsansatz wurden die PFCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488 (A488)-DPPE oder ATTO 647 (A647)-DPPE modifiziert. Für die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT wurden unmodifizierte PFCs eingesetzt, während für die *in vivo* und *ex vivo* PFC-Aufnahme mit folgender durchflusszytometrischer Analyse PFCs mit A488- bzw. A647-DPPE funktionalisiert wurden. Die $^{A488}\text{PFCs}$ für die *in vivo* Versuche wurden mit 400 μg A488-DPPE auf 10 g Gesamtvolumen hergestellt, während die $^{A488}\text{PFCs}$ für die *ex vivo* Versuche 200 μg A488-DPPE enthielten. Des Weiteren wurden PFCs für das aktive Targeting von neutrophilen Granulozyten mit DSPE-PEG₂₀₀₀-Maleimid [4,5 mol%] für die spätere Kopplung eines neutrophilen Granulozyten spezifischen Peptids (mNP) sowie DSPE-PEG₂₀₀₀ [0,5 mol%] und 200 μg A647-DPPE funktionalisiert. Die Kopplung von mNP erfolgte im fünffachen molaren Überschuss zu den vorhandenen Maleimidgruppen auf der Oberfläche der Emulsion. Daher wurden pro Milliliter Emulsion 60 μg Peptid [28,2 nM] eingesetzt. Das verwendete Peptid ist mit einem C-terminalen Cystein funktionalisiert, welches eine freie Sulfhydrylgruppe besitzt und darüber direkt an das Maleimid der PFCs gekoppelt werden kann. Die Kopplung erfolgte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei Raumtemperatur durch stetige Bewegung in einem Rotator. Die Charakterisierung der PFCs erfolgte über das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung an einem Nanotracs Wave II. Durch den ermittelten hydrodynamischen Durchmesser und den Polydispersitätsindex wurde Auskunft über die Homogenität der PFCs gegeben.

4.6. Untersuchung der *in vivo* PFC-Aufnahme vor und nach Induktion eines zweiten Stimulus

Um zu analysieren, welchen direkten Einfluss eine ZyA-Behandlung auf die PFC-Aufnahme hat, wurden die Mäuse wie zuvor mit ZyA oder PBS behandelt, erhielten jedoch an Tag -1 eine i.v. PFC-Injektion (2 mmol/kg Körpergewicht). An Tag 0, vor Induktion eines zweiten Stimulus, wurden die Mäuse dann in Bezug auf ihr ^{19}F -Signal im Knochenmark des Femurs und in der Milz mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT untersucht. Die MRT-Messungen und PFC-Injektionen wurden wie in Kapitel 4.3. beschrieben durchgeführt.

Zusätzlich zu den MRT-Messungen wurde die PFC-Aufnahme phagozytischer Immunzellen im Blut, in der Milz und im Knochenmark nach ZyA- bzw. PBS-Behandlung sowohl vor als auch nach Induktion eines zweiten Stimulus mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als zweiter Stimulus wurde das Matrigel/LPS-Modell eingesetzt. Dafür wurden die Mäuse wie in Kapitel 4.2. beschrieben

behandelt und erhielten an Tag 0 bzw. Tag 1 eine i.v. Injektion fluoreszenzmarkierter ^{A488}PFCs (2 mmol/kg Körpergewicht). Nach 2 h wurden die Tiere wie in Kapitel 4.4.1. erläutert getötet und die Immunzellen sowie die Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark isoliert. Die Zellen wurden anschließend mit der entsprechenden Antikörper-Mischung (Kapitel 4.4.2) gefärbt und konnten in Bezug auf das A488-Fluoreszenzsignal, das Aufschluss über die PFC-Aufnahme gab, durchflusszytometrisch untersucht werden.

4.7. Funktionelle Analysen von neutrophilen Granulozyten

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Messungen für die Bestimmung der Immunzellzahl bzw. der PFC-Aufnahme sowie MRT-Messungen nach Induktion eines TII-Phänotyps allein oder nach weiterem zweitem Stimulus erfolgte die funktionelle Analyse von isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und dem Matrigel bzw. generell phagozytischen Zellen aus dem Knochenmark. In diesem Zusammenhang wurden die Endozytose- und Migrationseigenschaften, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Expression von Aktivierungsmarkern bestimmt. Die Migration, ROS-Produktion sowie Aktivierungsmarker-Expression wurden von isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark von PBS- oder ZyA-behandelten Mäusen vor bzw. nach Matrigel/LPS-Implantation untersucht. Des Weiteren wurden die Analysen an Tag 1 auch für Immunzellen aus dem Matrigel durchgeführt. An Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation befanden sich nur neutrophile Granulozyten im Matrigel, daher wurden die Zellen nicht extra isoliert, sondern das Matrigel wie in Kapitel 4.4.1. beschrieben verarbeitet. Die Isolation von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark erfolgte über das *Neutrophil Isolation Kit (mouse)* von Miltenyi Biotec. Für die Analyse der Endozytoseeigenschaften wurden Immunzellen an Tag 0 vor und Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation aus dem Knochenmark präpariert und mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Partikeln durchflusszytometrisch analysiert.

4.7.1. Aktivierungsmarker

Bekannte Aktivierungsmarker von neutrophilen Granulozyten sind die Zelladhäsionsmoleküle CD11b (Integrin α -M), CD62L (L-Selektin) und CD63. Werden neutrophile Granulozyten aktiviert, zeigt sich eine erhöhte Expression von CD11b und CD63, während CD62L runterreguliert wird. Um zu prüfen, ob neutrophile Granulozyten des Knochenmarks nach alleiniger ZyA-Behandlung oder zusätzlich nach einem folgenden zweiten Stimulus eine unterschiedliche Aktivierung aufwiesen, wurde die Expression der Aktivierungsmarker mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür

wurden 100.000 isolierte neutrophile Granulozyten mit 100 µl der Antikörper-Mischung [1:100] bestehend aus CD11b-PE/Cy7 [2 µg/ml], CD62L-APC/Cy7 [2 µg/ml] und CD63-APC [3 µg/ml] für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in 100 µl DAPI/MACS-Puffer [1 µg/ml] aufgenommen. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Fluoreszenzintensität der eingesetzten Antikörper bestimmt werden, die Auskunft über die Expressionsstärke der ausgewählten Rezeptoren gab. Neben den neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark wurden auch die Immunzellen aus dem Matrigel an Tag 1 in Bezug auf Aktivierungsmarker untersucht. Dafür wurden ebenfalls 100.000 neutrophile Granulozyten mit der beschriebenen Antikörper-Mischung inkubiert und daraufhin das Fluoreszenzsignal der Antikörper durchflusszytometrisch gemessen.

4.7.2. Endozytose

In den zuvor aufgeführten Versuchsreihen wurde die PFC-Aufnahme *in vivo* analysiert. Zusätzlich dazu wurden die Endozytoseeigenschaften myeloider Zellen aus dem Knochenmark auch über die *ex vivo* Inkubation mit ^{A488}PFCs sowie fluoreszenzmarkierten Dextran-Partikeln (10 kDa) und *Escherichia coli* (*E. coli*)-Partikeln untersucht. Des Weiteren wurden ^{mNP.A647}PFCs eingesetzt, die spezifisch an neutrophile Granulozyten binden und einerseits ebenfalls Aufschluss über die Endozytoseaktivität geben, andererseits aber auch als Aktivierungsmarker fungieren. Das Peptid mNP, mit dem die ^{A647}PFCs funktionalisiert wurden, bindet an CD177, das nach Aktivierung eine erhöhte Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten aufweist. Die Analyse der Endozytoseeigenschaften erfolgte sowohl an Tag 0 nach Behandlung mit PBS oder ZyA als auch an Tag 1 nach zusätzlich induziertem zweitem Stimulus (Matrigel/LPS). In beiden Versuchsreihen wurden die Immunzellen wie in Kapitel 4.4.1. beschrieben aus dem Knochenmark des rechten Hinterbeins isoliert. Daraufhin wurden die Zellen gezählt und 100.000 neutrophile Granulozyten verwendet. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets der ^{A488}PFC- und ^{mNP.A647}PFC-Proben wurden in 1 ml DMEM+FCS resuspendiert. Zu jeder Probe wurden entsprechend 10 µl PFCs hinzugegeben. Anschließend erfolgte schwenkend die Inkubation der Proben bei 37 °C für 20 min. Die Zellen für die Dextran- und *E. coli*-Proben wurden in 500 µl DMEM+FCS aufgenommen und jeweils 25 µg der entsprechenden Partikel wurden hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben 1 h bei 37 °C schwenkend inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben zentrifugiert und mit 100 µl der passenden Antikörper-Mischung für myeloide Zellen (Kapitel 4.4.2) in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Für die Probe mit den ^{mNP.A647}PFCs wurde anstelle des CD11b-APC ein CD11b-PE/Cy7 eingesetzt, da das Fluoreszenzsignal

des APC mit dem A647 der PFCs ansonsten überlappt wäre. Anschließend wurden die Proben mit 100 µl MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden in 100 µl DAPI/MACS-Puffer [1 µg/ml] aufgenommen und konnten durchflusszytometrisch in Bezug auf das FITC-Fluoreszenzsignal der ^{A488}PFCs, Dextran- und *E. coli*-Partikel sowie das APC-Signal der mNP.A647 PFCs untersucht werden.

4.7.3. Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Aktiviert neutrophile Granulozyten regen ihre NADPH-Oxidase 2 (NOX2) an, um große Mengen an Superoxid zu erzeugen, das als Vorläufer von Wasserstoffperoxid und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dient. Diesen Prozess bezeichnet man als oxidativen Stress und er dient unter anderem der Auflösung und Zerstörung von Pathogenbestandteilen, die zuvor phagozytisch aufgenommen wurden. Dementsprechend steht eine erhöhte ROS-Produktion mit einer verstärkten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang. Aufgrund dessen war es von Interesse zu untersuchen, inwiefern eine ZyA-Behandlung mit oder ohne zweiten Stimulus Einfluss auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten hat.

Nach der Isolation von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark PBS- bzw. ZyA-behandelter Mäuse an Tag 0 vor oder Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation wurde die Zellzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend wurden 100.000 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl HBSS-Puffer mit Dihydroethidium (DHE) [20 µM] aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand indirekt in Bezug auf die Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels *Ultra-Performance-Flüssigkeitschromatographie* (UPLC) untersucht. Mithilfe dieser Methode wurde 2-Hydroxyethidium gemessen, das bei der Oxidation von DHE durch ROS, in dem Fall Superoxid, entsteht.

4.7.4. Migration

Als chemotaktischer Stimulus wurde das Peptid Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), welches Leukozyten anlockt, verwendet. Für die Untersuchung der Migrationseigenschaften wurden 100.000 isolierte neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark eingesetzt. Die Zellen wurden mit Ly6G-PE [2 µg/ml] in MACS-Puffer für 20 min bei 4 °C markiert und anschließend zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl DMEM+FCS [10 %] resuspendiert und in eine Migrationskammer mit einer Porengröße von 3 µm gegeben. Die Migrationskammer befand sich in einer 24-Well-Platte, die mit 1 ml DMEM+FCS und fMLP [0,1 µM] befüllt war. Nachdem die Zellen in die Migrationskammer gegeben wurden, folgte die Inkubation für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus der Platte entnommen und die Anzahl migrierter neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

4.8. *Ex vivo* Stimulation mit Zymosan A

Um den direkten Einfluss von ZyA auf die PFC-Aufnahme zu untersuchen, wurden Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark unbehandelter Mäuse isoliert und anschließend *ex vivo* mit ZyA stimuliert. Die Immunzellisolation erfolgte wie in Kapitel 4.4.1. dargestellt. Daraufhin wurden die Zellen gezählt und 100.000 neutrophile Granulozyten als Richtwert für die Zellzahl der zu stimulierenden Zellen eingesetzt. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml DMEM+FCS [10 %] resuspendiert. Es wurden je zwei unbehandelte und zwei Proben mit 10 µg ZyA vorbereitet. Die Zellen wurden anschließend schwenkend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 1 ml DMEM+FCS aufgenommen. Anschließend wurden jeweils zu einer unbehandelten und einer stimulierten Probe 10 µl ^{A488}PFCs hinzugegeben. Alle Proben wurden daraufhin 20 min bei 37 °C schwenkend inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 100 µl der Antikörper-Mischung für myeloide Immunzellen in eine 96-Well-Rundbodenplatte überführt. Die Zellen wurden 20 min bei 4 °C inkubiert und wurden anschließend mit 100 µl MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl DAPI/MACS-Puffer [1 µg/ml] aufgenommen. Abschließend konnte das Fluoreszenzsignal der ^{A488}PFCs in den Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

4.8.1. Analyse der ZyA-Aufnahme mit ^{AF488}Zymosan A

Mittels Durchflusszytometrie konnte die ZyA-Aufnahme in Immunzellen des Knochenmarks und der Milz untersucht werden. Dafür wurde mit Alexa Fluor 488 (AF488) markiertes ZyA eingesetzt. Wie oben beschrieben wurden die Immunzellen aus der Milz und dem Knochenmark isoliert und gezählt. Es wurde die gleiche Zellzahl eingesetzt und in 1 ml DMEM+FCS resuspendiert. Dazu wurden je 10 µg ^{AF488}ZyA hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C schwenkend inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit der entsprechenden Antikörper-Mischung für myeloide Zellen inkubiert. Anschließend konnten die Immunzellen mittels Durchflusszytometrie in Bezug auf ihr Fluoreszenzsignal untersucht und darüber die Bindung bzw. Aufnahme von ^{AF488}ZyA zellspezifisch bestimmt werden.

4.9. Oberflächenexpression von β -Glucan-Rezeptoren

Zymosan A ist ein β -1,3-Glucan-Polysaccharid, das aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) gewonnen wird und eine wichtige Rolle in dem Aufbau der Wirtszellwand spielt. Hefe enthält β -Glucan als Hauptbestandteil zusammen mit Mannose-reichen Proteinen in der äußeren Schicht, Nukleinsäuren und Chitin in der inneren Schicht. Die β -Glucan-Untereinheiten des ZyA binden wiederum an verschiedene Rezeptoren, die auf Immunzellen der angeborenen Immunantwort exprimiert werden und darüber die Zellen aktivieren (siehe Kapitel 1.2.1.1). Aufgrund dessen wurde die Expression von vier verschiedenen Rezeptoren (Dectin-1, TLR2, CD18, CD36), die bekannt dafür sind, eine Interaktion mit β -Glucan einzugehen, auf murinen Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark untersucht.

Die Analyse der murinen Rezeptorexpression erfolgte an Tag 0 nach Behandlung der Mäuse mit PBS oder ZyA. Wie in Kapitel 4.4.1. erklärt, wurden die Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark isoliert. Anschließend wurde eine Mischung mit Antikörpern gegen myeloide Immunzellen hergestellt und mit Dectin-1-PE [2 µg/ml], TLR2-FITC [5 µg/ml], CD18-FITC [5 µg/ml] oder CD36-AF488 [5 µg/ml] ergänzt. Die Zellen wurden daraufhin in 100 µl der Antikörper-Mischung aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert. In der Kombination mit Dectin-1 musste der Ly6G-PE-Antikörper durch Ly6G-FITC [5 µg/ml] ausgetauscht werden, da es ansonsten zu einer spektralen Überlappung der beiden Fluorochrome gekommen wäre. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl DAPI/MACS-Puffer [1 µg/ml] aufgenommen, um durchflusszytometrisch untersucht zu werden. Für die Analyse der Rezeptorexpression auf den jeweiligen Immunzellen wurde das Fluoreszenzsignal des entsprechenden Antikörpers ausgewertet.

4.10. Identifikation von Ly6G^{low} neutrophilen Granulozyten

Bisher waren neutrophile Granulozyten als eine sehr homogene Zellpopulation bekannt. Doch diverse Forschungsergebnisse zeigten, dass sich neutrophile Granulozyten z.B. im Verlauf unterschiedlicher Erkrankungen oder dem Inflammationsort in Bezug auf ihre funktionellen Eigenschaften und auf die Expression verschiedener Rezeptoren unterscheiden können. Ly6G^{low} neutrophile Granulozyten zeigten regenerative Eigenschaften nach ZyA-Behandlung im Zusammenhang mit Verletzungen des zentralen Nervensystems¹²⁰. Aufgrund dessen wurden die bereits ausgewerteten Ergebnisse der Immunzellzahlen nach PBS- bzw. ZyA-Behandlung an Tag 0 vor oder Tag 2 nach zweitem Stimulus (MI und Matrigel/LPS) in Hinblick auf den prozentualen Anteil an Ly6G^{low} neutrophilen Granulozyten analysiert. Das *Gating*-Schema für Ly6G^{low}-Zellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark kann Abb. 7 und das entsprechende für das Herz und das Matrigel dem Anhang (Ergänzende Abb. 6) entnommen werden.

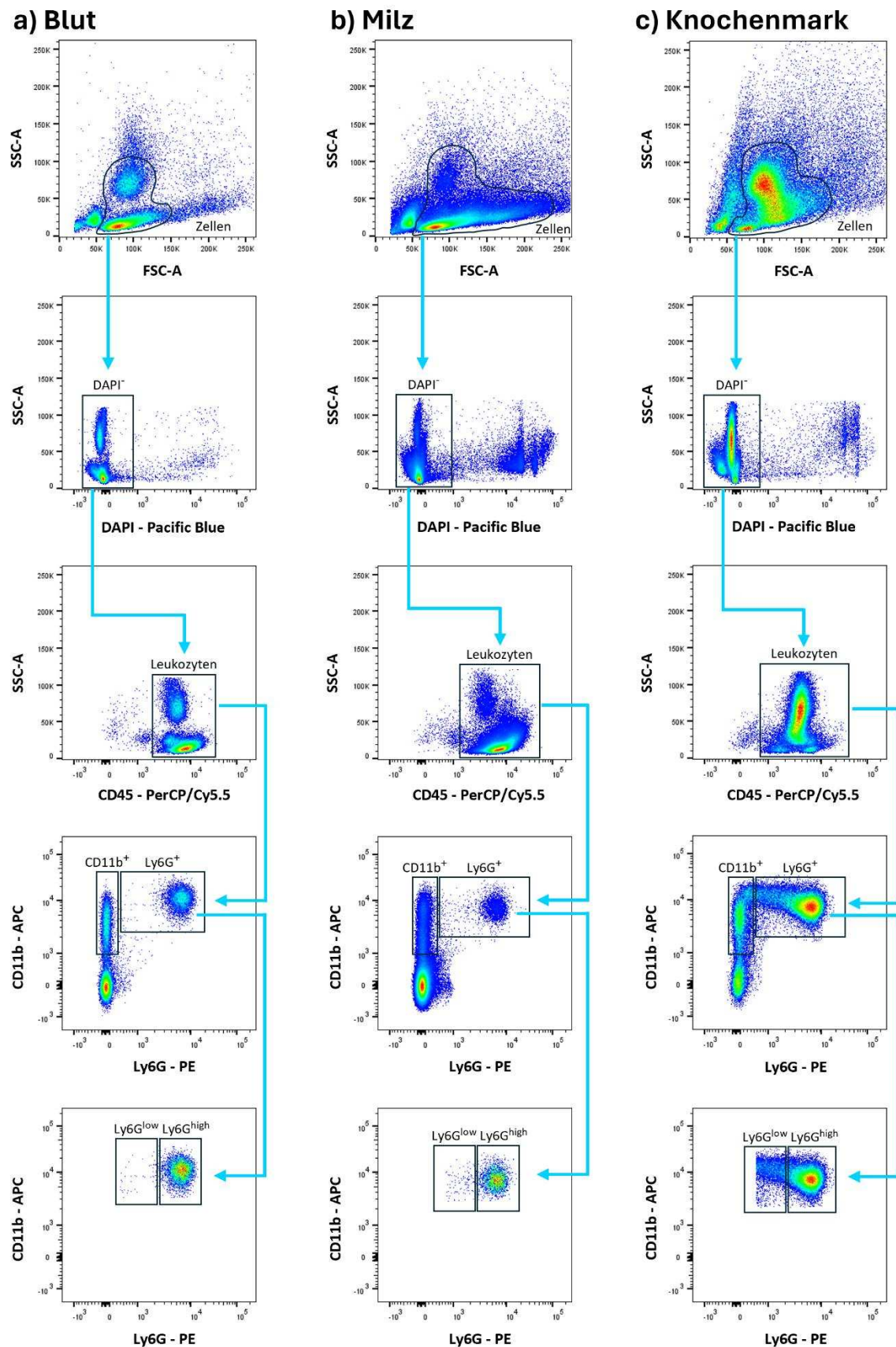


Abb. 7: Gating-Strategie für Ly6G^{low}-Zellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark. Über den Side (SSC-A) und Forward Scatter (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen anhand ihrer FSC/SSC-Eigenschaften ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mittels einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC und Ly6G-PE myeloide Zellen (CD11b⁺) und neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) differenziert. Die Ly6G⁺-Zellen können anschließend in zwei Subpopulationen unterteilt werden: Ly6G^{low} und Ly6G^{high}.

4.11. Histologische Untersuchungen

Die Wissenschaft der biologischen Gewebe wird als Histologie bezeichnet und ermöglicht durch dünne Schnitte einen genauen Einblick in strukturelle Veränderungen. Zunächst muss das gewünschte Organ fixiert werden, damit die enzymatische Autolyse des Gewebes verhindert und die Probe stabilisiert wird. Dabei kann zwischen verschiedenen Fixierungsmethoden unterschieden werden. Zum einen gibt es die chemische Fixierung durch z.B. Paraformaldehyd, auf die im Anschluss eine Paraffineinbettung des Organs folgt. Auf der anderen Seite gibt es die Kryofixierung durch Kälte, bei der das Organ in einem sogenannten *Tissue-Tek* Einbettmedium direkt fixiert und eingebettet wird. Das eingebettete Organ kann anschließend mithilfe eines Mikrotoms in der gewünschten Stärke geschnitten werden. Die erhaltenen Schnitte werden auf einen Objektträger überführt, nach gewünschtem Protokoll gefärbt und anschließend mikroskopiert.

Im Zuge der unterschiedlichen Versuchsreihen fiel auf, dass die Milz der ZyA-behandelten Mäuse deutlich schwerer war als die Milz der Kontrolltiere. Daher sollten mittels Histologie mögliche strukturelle Veränderungen oder Ablagerungen identifiziert werden. Neben der Milz wurde auch das Herz histologisch untersucht. Die histologische Untersuchung des Herzes an Tag 28 nach Induktion eines MI gab Auskunft über die Infarktgröße sowie über den strukturellen Umbau des linksventrikulären Myokards.

4.11.1. Histologie der Milz

Im Anschluss an die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen an Tag 0 der PBS- bzw. ZyA-behandelten Mäuse ohne zweiten Stimulus wurden die Mäuse, ohne aus der Narkose zu erwachen, mittels zervikaler Dislokation getötet. Daraufhin wurde die Milz entnommen und in 1 ml Paraformaldehyd [4 %] für 24 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Milzen in PBS überführt und weiterhin bei 4 °C bis zur Einbettung gelagert. Die folgende Paraffineinbettung sowie das Schneiden und Färben der Milzschnitte wurde freundlicherweise von Annika Zimmermann aus dem Institut für Translationale Pharmakologie übernommen. Für die Paraffineinbettung wurden die fixierten Milzen zunächst halbiert sowie über einen Längsschnitt geteilt und daraufhin in die Einbettkassette gelegt. Durch sich erhöhende Konzentrationen von Ethanol sowie letztlich Xylol wurde die Milz entwässert. Daraufhin wurde die dehydrierte Milz in der Einbettkassette in flüssiges Paraffin (58 °C) getaucht und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Mithilfe des HistoCore MULTICUT Mikrotoms wurden 4 µm-Schnitte angefertigt, die auf einen Objektträger überführt und mit Hämatoxylin sowie Eosin gefärbt wurden. Dafür wurden die Schnitte zunächst über eine absteigende Ethanol-Konzentrationsreihe hydriert, daraufhin 5 min mit Hämatoxylin sowie 30 Sekunden mit

Eosin gefärbt und anschließend dehydriert, um sie mit einem wasserfreien Eindeckmittel einzudecken. Nach dem Trocknen des Eindeckmediums wurden Aufnahmen der Schnitte mit dem Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop (Kamera: UC30) unter Verwendung eines vierfach Objektivs mit zehnfachem Okular gemacht. Die Analyse des prozentualen Anteils von Lymphfollikeln an der Milzgesamtoberfläche erfolgte über die Software *ImageJ/Fiji*.

4.11.2. Histologie des Herzes

Nach den finalen ^1H -MRT-Messungen an Tag 28 nach Induktion eines MI wurden die Mäuse, ohne aus der Narkose zu erwachen mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz herausgeschnitten. Daraufhin wurde das Herz gewogen sowie von Fett befreit und sowohl Aorta als auch obere Hohl- und Pulmonalvene abgeschnitten. Durch die entstandenen Öffnungen in die linke sowie rechte Herzkammer konnte das Herz über eine Kanüle mit dem Einbettmedium *Tissue-Tek* befüllt werden, damit es bei der sich anschließenden Kryokonservierung stabilisiert war. Das präparierte Herz wurde senkrecht in ein aus Alufolie vorgeformtes und mit *Tissue-Tek* gefülltes Hütchen hineingestellt, anschließend in $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Isopropanol vorgekühlt sowie für 5 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgehärtet. Im Anschluss wurden die in Alufolie gebetteten Herzen aus der Isopropanolflasche herausgeholt und konnten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Das sich anschließende Schneiden und Färben der Herzen wurde freundlicherweise von Claudia Dohle aus der Klinik für Anästhesiologie durchgeführt. Am Kryostat CM3050 S ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden $5\text{ }\mu\text{m}$ -Herzschnitte vom Apex bis zur Basis angefertigt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger überführt und bei Raumtemperatur luftdicht getrocknet. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Paraformaldehyd [4 %] für 10 min fixiert und daraufhin dreimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die mittventrikulären Schnitte ausgewählt und mit einem Primärantikörper gegen Kollagen I (Col1A1) bzw. Kollagen III (Col3A1) in *Normal Goat Serum* (2 %) über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem *Wheat Germ Agglutinin* ($\text{AF}^{488}\text{WGA}$) und dem Cy3 konjugierten Sekundärantikörper IgG anti-Rabbit gegen Col1A1/Col3A1 in *Normal Goat Serum* (2 %) für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen und konnten anschließend für die Färbung der Zellkerne mit je einem Tropfen DAPI-Eindeckmittel eingedeckt werden. Die Mikroskopie erfolgte an dem Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop (Kamera: F-View) unter Verwendung eines zehnfach und zwanzigfach Objektivs mit zehnfach Okular. Die Analyse der regionalen Wanddicke im Infarktgebiet erfolgte mit der Software *cellSens dimension*. Dafür wurden in dem durch WGA

stark angefärbten Infarktbereich fünf Messlinien vom Epikard bis Endokard gezogen und der Mittelwert gebildet.

4.12. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Versuchsdaten wurde das Programm GraphPad Prism 6 (La Jolla, USA) verwendet. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert und mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde die Normalverteilung über einen Shapiro Wilk Test untersucht. Lag eine Normalverteilung vor, wurde ein ungepaarter, einseitiger t-Test zur Untersuchung der Signifikanz durchgeführt. Konnte keine Normalverteilung der Daten angenommen werden, so wurde ein Mann-Whitney U Test berechnet. Zum Vergleich der Veränderungen im Laufe der Zeit für zwei verschiedene Behandlungen wurde eine 2-Way Anova über den Šidák-Test durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$) angesehen.

5. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines veränderten angeborenen Immunstatus (*Trained innate immunity*; TII) auf die akute Entzündungsreaktion und Heilung nach einem Myokardinfarkt (MI). Dafür wurden männliche C57BL/6-Mäuse zunächst mit dem Hefezellwandbestandteil Zymosan A (ZyA) vorbehandelt. Anschließend wurde experimentell ein Myokardinfarkt induziert, indem die LAD (*left anterior descending coronary artery*) für 50 min abgebunden und danach wieder reperfundiert wurde. Um den Einfluss eines TII-Phänotyps auf den MI zu untersuchen, wurden sowohl durchflusszytometrische Analysen, Herzfunktionsmessungen und T1-/T2-*Mapping* mittels ^1H -Magnetresonanztomographie (MRT) als auch Entzündungsbildgebung über kombinierte $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT durchgeführt.

Ergänzend zu einem MI als zweiten Stimulus wurde auch eine LPS-induzierte subkutane Entzündung eingesetzt (Matrigel/LPS-Modell), um den Effekt von ZyA sowohl auf eine sterile als auch unsterile Entzündung zu untersuchen. Es wurden ebenfalls durchflusszytometrische Analysen sowie Messungen mittels ^1H - und kombinierter $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT durchgeführt, um den Entzündungsverlauf über 28 Tage zu untersuchen.

Des Weiteren wurde geprüft, welchen direkten oder indirekten Einfluss ZyA auf Immunzellen - besonders auf neutrophile Granulozyten - in Bezug auf verschiedene funktionelle Eigenschaften wie z.B. die PFC-Aufnahme, die Endozytose im Allgemeinen oder die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hat. Dazu wurden die Zellen sowohl vor als auch nach Matrigel/LPS-Implantation untersucht.

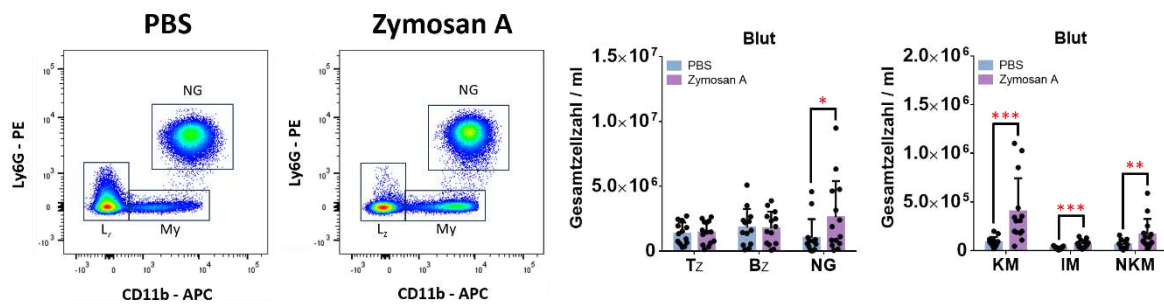
5.1. Induktion eines *Trained innate immunity*-Phänotyps durch ZyA-Behandlung

Um zu prüfen, ob die Stimulation mit ZyA einen *Trained innate immunity* (TII)-Phänotyp ausgelöst hat, wurde die Anzahl reifer Immunzellen im Blut, in der Milz und im Knochenmark sowie die Anzahl an Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark an Tag 0 vor Induktion eines zweiten Stimulus mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden C57BL/6-Mäuse zunächst zu zwei Zeitpunkten mit ZyA intraperitoneal (i.p.) (bzw. mit PBS als Kontrolle) behandelt (Tag -7 und Tag -4). An Tag 0 wurden die Tiere schmerzfrei getötet (Kapitel 4.4.1.), Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.

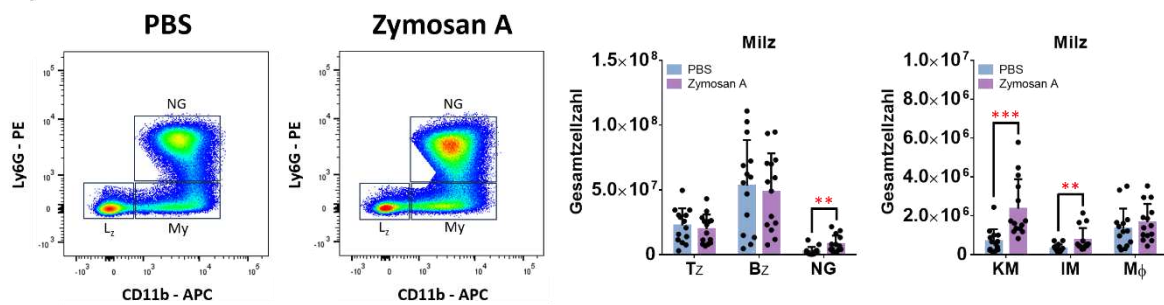
5.1.1. Erhöhte Immunzellzahlen im Blut, in der Milz und im Knochenmark

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nach ZyA-Behandlung deutlich mehr Immunzellen sowohl im Blut, in der Milz als auch im Knochenmark vorlagen. Auffällig war die signifikant erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten (NG) im Blut (Abb. 8 a)) und in der Milz (Abb. 8 b)) sowie die tendenziell höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten im Knochenmark (Abb. 8 c), $p = 0,057$). Des Weiteren konnte eine verstärkte Anzahl klassischer Monozyten (KM) sowohl im Blut, in der Milz als auch im Knochenmark ($p = 0,055$) gemessen werden. Darüber hinaus waren auch intermediäre Monozyten (IM) im Blut und in der Milz ZyA-behandelter Mäuse signifikant erhöht. Der gleiche Effekt zeigte sich bei nicht-klassischen Monozyten (NKM) im Blut, während in der Milz und im Knochenmark keine Unterschiede in der Makrophagenanzahl (M_{ϕ}) festgestellt werden konnten. Jedoch zeigten sich weder im Blut, in der Milz noch im Knochenmark Unterschiede in der Zellzahl in T-Zellen (T_z) oder B-Zellen (B_z). Die quantitativ berechnete erhöhte Zellzahl phagozytischer Zellen in ZyA-behandelten Mäusen zeigte sich bereits deutlich in den *Dotplots*, bei denen eine höhere Zellzahl mit mehr Punkten und einer intensiveren Farbe bzw. einem Wechsel der Pseudofarben von dunkelblau über grün und gelb nach rot korrelierte (Abb. 8 a) - c), links).

a) Blut



b) Milz



c) Knochenmark

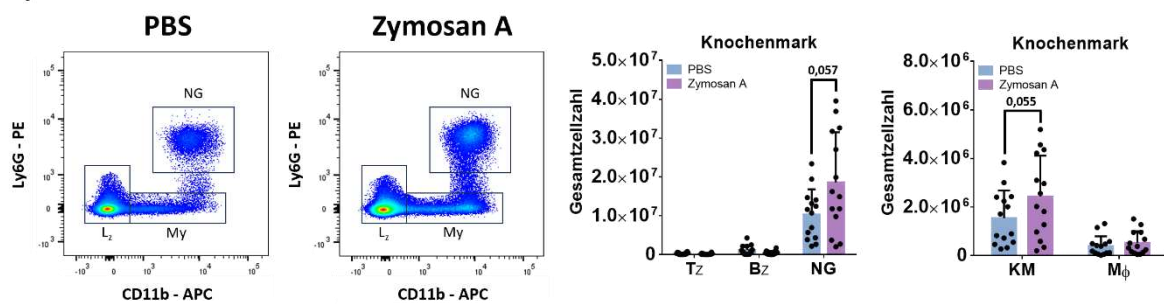


Abb. 8: ZYA-Behandlung beeinflusst Immunzellzahlen im Blut, in der Milz und im Knochenmark. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen an Tag 0 von isolierten murinen Immunzellen aus **a)** dem Blut, **b)** der Milz und **c)** dem Knochenmark nach zweimaliger Behandlung mit Zymosan A bzw. PBS. Quantifiziert wurde die Gesamtzellzahl pro Milz, Knochenmark eines Beins und pro Milliliter Blut. Des Weiteren ist beispielhaft je ein *Dotplot* aufgeführt, der mithilfe von Ly6G-PE und CD11b-APC eine Unterteilung in neutrophile Granulozyten (NG), Lymphozyten (Lz) und myeloide Zellen (My) zeigt. Mittels Durchflusszytometrie konnte zwischen T-Zellen (Tz), B-Zellen (Bz), neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M ϕ) unterschieden werden. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 13 - 14. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

5.1.2. Analyse von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark

Ergänzend zu den reifen Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark wurden auch die Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark vor Induktion eines zweiten Stimulus an Tag 0 analysiert. Während einer Entzündung wird die Hämatopoese im Knochenmark verstärkt und mehr Immunzellen werden in den Blutkreislauf entlassen^{25,26}. Um einen genaueren Einblick in die funktionellen Unterschiede im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse und entsprechender Kontrollen zu bekommen, wurden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark untersucht. Es wurden zwei verschiedene *Gating*-Strategien genutzt, um reife Leukozyten von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zu unterscheiden. Diese wurden in Kapitel 4.4.2. ausführlich erläutert und als Version 1 bzw. 2 benannt. Für die bessere Übersicht der Vorläuferzellen wurden in Abb. 9 nur die Zellzahlen von Version 1 aufgeführt. Die Daten für Version 2 können dem Anhang entnommen werden.

Es konnte eine signifikant erhöhte Anzahl Lineage-positiver (Lin⁺)-Zellen (Abb. 9 a), links) in ZyA-behandelten Mäusen gemessen werden, welche die Gesamtheit reifer Immunzellen umfasst. Des Weiteren zeigte sich eine leicht erhöhte Tendenz Lineage-negativer (Lin⁻)-Zellen in ZyA-behandelten Mäusen, die jedoch nicht durch ein verstärktes Vorkommen von LSK (Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺)- und LK (Lin⁻/Sca-1⁻/c-Kit⁺)-Zellen zustande kamen, sondern durch Lin⁻/c-Kit⁻/Sca-1⁻-Zellen, die unter anderem basophile Granulozyten und deren Vorläufer umfassen (Abb. 9 a)). Sowohl in den Populationen der LSK-Zellen (hämatopoetische Stammzellen und multipotente Vorläuferzellen) als auch LK-Zellen (Vorläuferzellen), die wiederum in CMP (*common myeloid progenitor*), MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) und GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) unterteilt werden konnten (Abb. 9 c)), zeigten sich zwischen beiden Versuchsgruppen keine Unterschiede in Bezug auf die Zellzahl (Abb. 9 b)). Erwähnenswert ist, dass mit der zweiten *Gating*-Strategie ähnliche Ergebnisse für LSK- und LK-Zellen sowie deren Subpopulationen erzielt wurden (siehe Anhang).

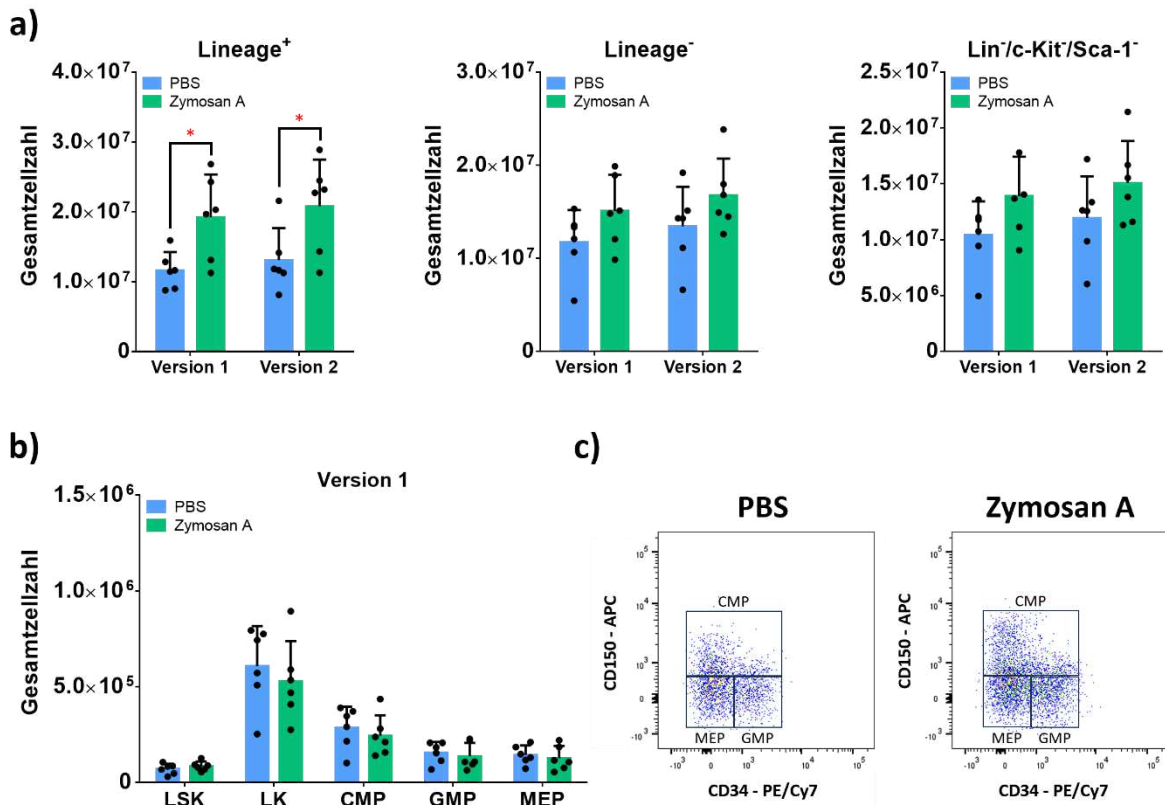


Abb. 9: Keine veränderte Anzahl von Stamm- und Vorläuferzellen nach ZyA-Behandlung an Tag 0. Dargestellt ist die quantitative Auswertung von **a)** Lineage⁺, Lineage⁻ und Lin⁻/c-Kit⁻/Sca-1⁻-Zellen (Version 1 und Version 2) sowie von **b)** Stamm (LSK)- und Vorläufer (LK)-Zellen (Version 1) an Tag 0 nach zweimaliger PBS- bzw. ZyA-Behandlung. Die LK-Population kann weiter in CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) und MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) differenziert werden. Beispielfhaft ist für eine PBS- und eine ZyA-behandelte Maus die Unterteilung in CMP, GMP und MEP in einem *Dotplot* dargestellt (**c**). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 6. * = p < 0,05

5.2. Behandlung mit Zymosan A erhöht die Infarktgröße, reduziert jedoch die PFC-Aufnahme nach Myokardinfarkt

Nachdem gezeigt wurde, dass die Behandlung mit ZyA zu einem TII-Phänotyp führt, wurden erneut Mäuse mit ZyA bzw. PBS i.p. vorbehandelt (Tag -7 und Tag -4). An Tag 0 erfolgte ein experimenteller Myokardinfarkt (MI), indem die linke hintere zum Apex verlaufende Kranzarterie (LAD) für 50 min mit einem Faden abgebunden wurde (Kapitel 4.2.1). Nach 50 min wurde der Verschluss wieder geöffnet (Reperfusion). Einen Tag nach MI erfolgten LGE (*Late Gadolinium Enhancement*)-Messungen sowie Herzfunktionsmessungen mittels ¹H-MRT zur Bestimmung der Größe des ischämischen Bereichs sowie der Ejektionsfraktion. Um zu prüfen, ob die ZyA-Behandlung zu einer verstärkten Entzündung im Herz führt, wurden den Mäusen im Anschluss an die Messungen Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs) intravenös (i.v.) injiziert. Nach weiteren 24 h wurde mittels kombinierter ¹H/¹⁹F-MRT das ¹⁹F-Signal im Infarktbereich bestimmt. Die Auswertung der LGE-MRT-Transversalschnitte einen Tag nach MI zeigte einen signifikant größeren

ischämischen Bereich für ZyA-behandelte Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren mit einer signifikant reduzierten Ejektionsfraktion (Abb. 10 a)). Aufgrund dessen wurde ein erhöhtes ^{19}F -Signal im Infarktgebiet ZyA-behandelter Mäuse erwartet, jedoch ein deutlich niedrigeres ^{19}F -Signal im Vergleich zu Kontrollmäusen detektiert (Abb. 10 b), links). Dies spiegelt sich auch in der quantitativen Auswertung des ^{19}F -Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) wider und zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen (Abb. 10 b), rechts). Im Gegensatz dazu war das ^{19}F -SNR in der Leber, einem der Hauptorgane, in denen PFCs passiv akkumulieren, vergleichbar in beiden Versuchsgruppen (Abb. 10 b), rechts).

Zusammengefasst zeigte diese Versuchsreihe, dass die Behandlung mit Zymosan A tendenziell zu einem größeren Infarkt führte, jedoch das lokale ^{19}F -Signal im infarzierten Herz nicht erhöht, sondern signifikant verringert war.

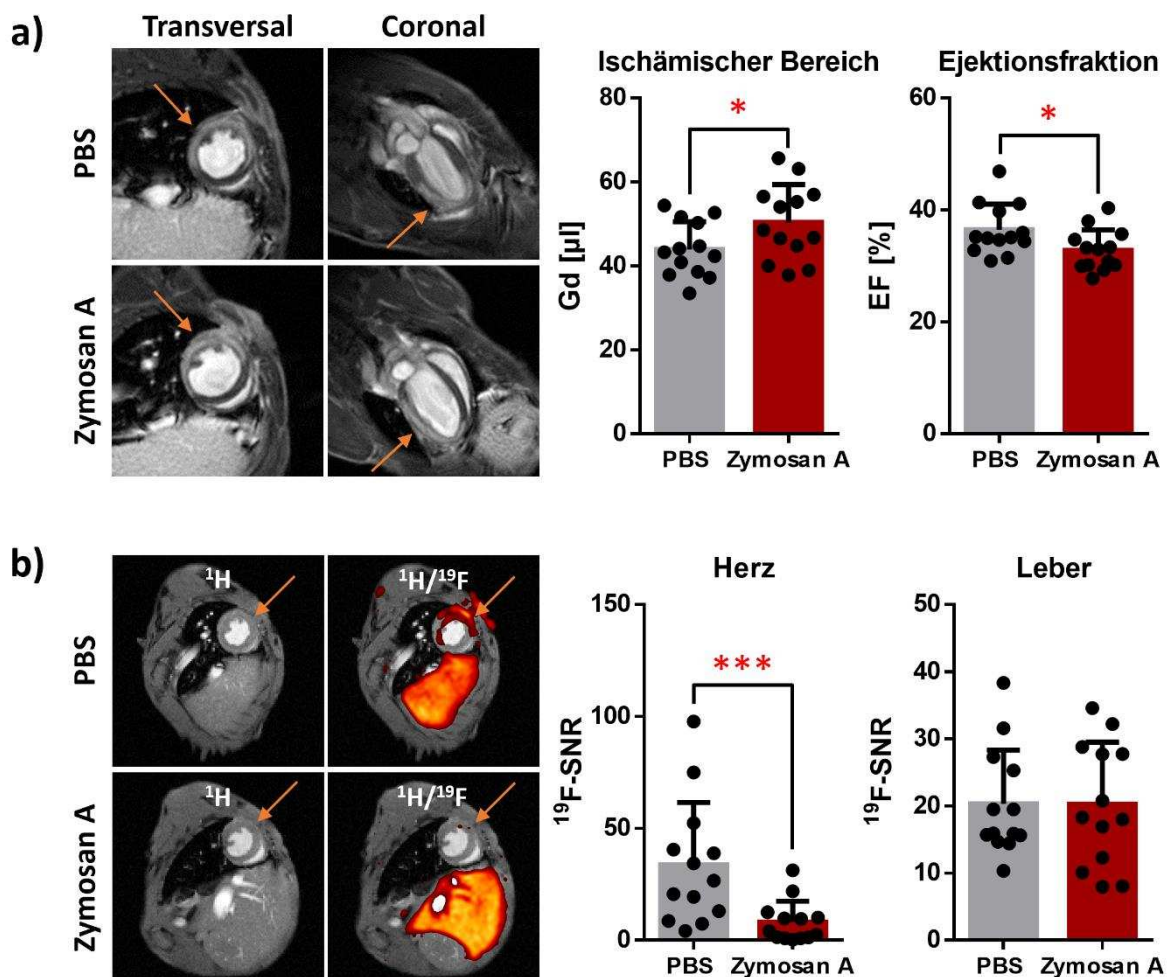


Abb. 10: Erhöhte Infarktgröße, aber reduziertes ^{19}F -Signal im Infarktgebiet ZyA-behandelter Mäuse. a) Gezeigt sind ^1H -LGE-MRT-Aufnahmen von Transversal- und Coronalschnitten ZyA- bzw. PBS-behandelter Mäuse an Tag 1 nach MI (links, orangefarbige Pfeile zeigen auf das Gadoliniumsignal/den ischämischen Bereich). Außerdem ist die quantitative Auswertung der Infarktgröße und Ejektionsfraktion beider Versuchsgruppen an Tag 1 nach MI aufgeführt (rechts). b) Abgebildet sind ^1H - und $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahmen an Tag 2 nach MI von Mäusen nach ZyA- bzw. PBS-Behandlung (links, orangefarbige Pfeile zeigen auf Infarktgebiet/ ^{19}F -Signal). Rechts ist das quantifizierte ^{19}F -SNR (Signal-Rausch-Verhältnis) des Herzes und der Leber gezeigt. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 13. * = p < 0,05; *** = p < 0,001

5.3. Einfluss der ZyA-Behandlung auf die Immunzellzahl nach einem Myokardinfarkt

Es wurde bereits vielfach beschrieben, dass das ^{19}F -Signal im Entzündungsbereich mit der Anzahl infiltrierter Monozyten und Makrophagen korreliert^{121,122}. Deswegen wurden nach den $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen die Mäuse wie in Kapitel 4.4.1. beschrieben getötet und Immunzellen aus dem Blut, der Milz, dem Knochenmark und dem Herz isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Gesamtzellzahl pro Herz, Milz, Femur und Tibia eines Beins sowie pro Milliliter Blut bestimmt. Im Herz wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Zellzahl von T-Zellen (T_z), klassischen Monozyten (KM), intermediären Monozyten (IM) oder Makrophagen (M_ϕ) zwischen ZyA-behandelten Mäusen und Kontrolltieren gemessen. Lediglich die Anzahl neutrophiler Granulozyten (NG) stieg in Mäusen nach ZyA-Behandlung leicht, jedoch nicht signifikant, an (Abb. 11 a), $p = 0,173$). Neben dem Herz wurden auch die Immunzellen im Blut, in der Milz und im Knochenmark untersucht, da eine akute Entzündung die Granulopoese im Knochenmark induziert und zur Freisetzung von Immunzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf führt^{25,26}. Des Weiteren handelt es sich bei der Milz um ein Immunzellreservoir, aus dem nach einem MI Monozyten freigesetzt werden¹²³. Zwischen ZyA- und PBS- behandelten Mäusen konnten keine Unterschiede im Blut, in der Milz und im Knochenmark in Bezug auf die Anzahl an T-Zellen und B-Zellen (B_z) festgestellt werden (Abb. 11 b) – d)). Auch klassische und nicht-klassische Monozyten (NKM) bzw. Makrophagen zeigten im Blut und im Knochenmark keine Differenz. Im Blut wurde nur ein Rückgang intermediärer Monozyten in ZyA-behandelten Mäusen gemessen (Abb. 11 b)). Dagegen waren klassische und intermediäre Monozyten in der Milz von Mäusen nach ZyA-Behandlung signifikant erhöht (Abb. 11 c)). Auffallend war, dass die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Gegensatz zu den Kontrollen sowohl im Blut, in der Milz als auch im Knochenmark signifikant höher lag. Dementsprechend hängt das niedrigere ^{19}F -Signal auch nicht mit einer reduzierten Anzahl phagozytischer Zellen zusammen.

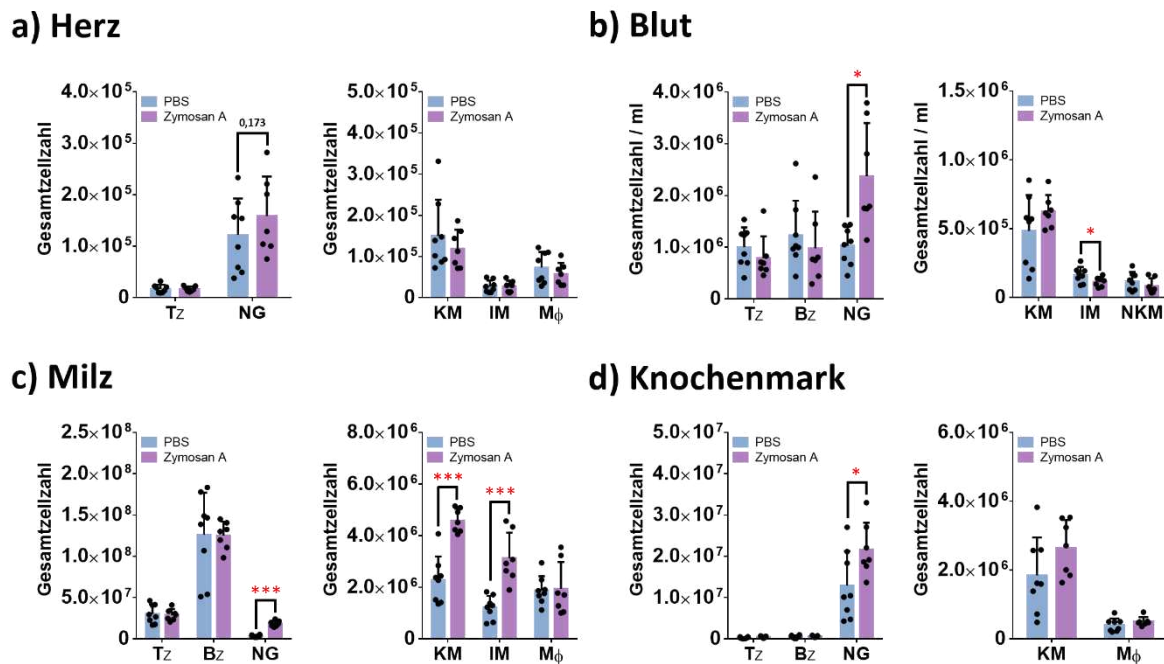


Abb. 11: ZyA-Behandlung beeinflusst Immunzellzahlen im Herz, im Blut, in der Milz und im Knochenmark. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen von isolierten Immunzellen aus **a)** dem Herz, **b)** dem Blut, **c)** der Milz und **d)** dem Knochenmark ZyA- und PBS-behandelter Mäuse an Tag 2 nach Induktion eines Myokardinfarkts. Dargestellt ist jeweils die Gesamtzellzahl pro Herz, Milz und Knochenmark eines Beins sowie pro Milliliter Blut. Mittels Durchflusszytometrie konnte zwischen T-Zellen (T_Z), B-Zellen (B_Z), neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M_φ) unterschieden werden. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 7 - 8. * = p < 0,05; *** = p < 0,001

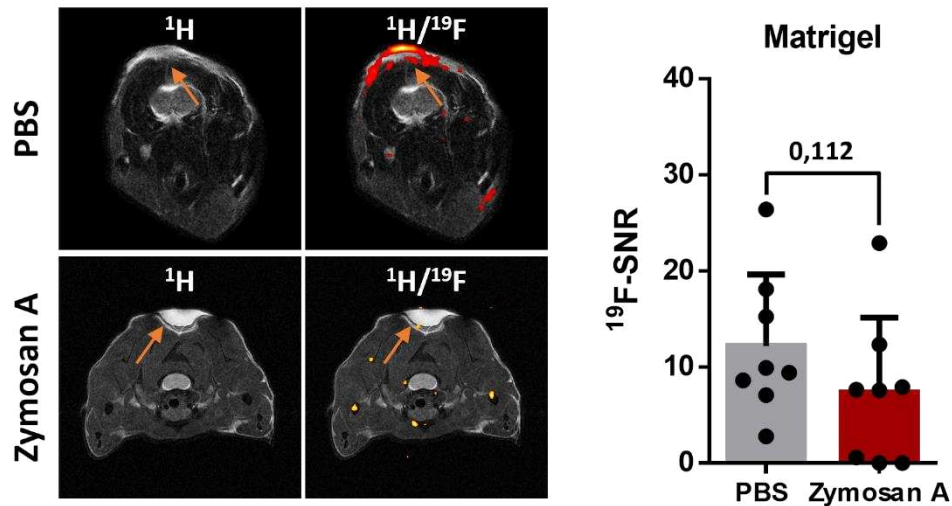
5.4. Verringerter ¹⁹F-Signal nach ZyA-Behandlung im Matrigel und im Knochenmark

Neben dem MI, der eine sterile Entzündung darstellt, wurde das Matrigel/LPS-Modell eingesetzt, das eine unsterile Entzündung auslöst und dadurch den Einfluss eines TII-Phänotyps in die Entwicklung von unterschiedlichen Krankheiten untermauert. Des Weiteren handelt es sich bei dem Matrigel/LPS-Modell um ein gut reproduzierbares Entzündungsmodell, das sich in unserer Arbeitsgruppe bereits als bewährtes Modell für die Untersuchung inflammatorischer Prozesse etabliert hat. Für die Induktion der subkutanen Entzündung wurde den zuvor mit PBS bzw. ZyA behandelten Mäusen an Tag 0 eine Kombination aus Matrigel und LPS subkutan in den Nacken implantiert (siehe Kapitel 4.2.2.). Einen Tag nach der Implantation wurden PFCs für die folgenden ¹H/¹⁹F-MRT-Messungen i.v. injiziert. Auch hier wurde das ¹⁹F-Signal im Entzündungsherd (Matrigel) gemessen und ergänzend erfolgte die Detektion im Knochenmark des Femurs. Das Knochenmark war von Interesse, da bekannt ist, dass eine Entzündung zu einer verstärkten Hämatopoese und dementsprechend zu einer erhöhten Zellzahl im Knochenmark führt^{25,26}.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Myokardinfarkts zeigte sich auch in dieser Versuchsreihe ein etwas geringeres ¹⁹F-SNR im Matrigel (Abb. 12 a), rechts) ZyA-behandelter Mäuse

im Gegensatz zu Kontrolltieren ($p = 0,112$). Des Weiteren konnte im Knochenmark des Femurs ein signifikant niedrigeres ^{19}F -Signal in ZyA-behandelten Mäusen detektiert werden (Abb. 12 b)).

a) Matrigel



b) Knochenmark

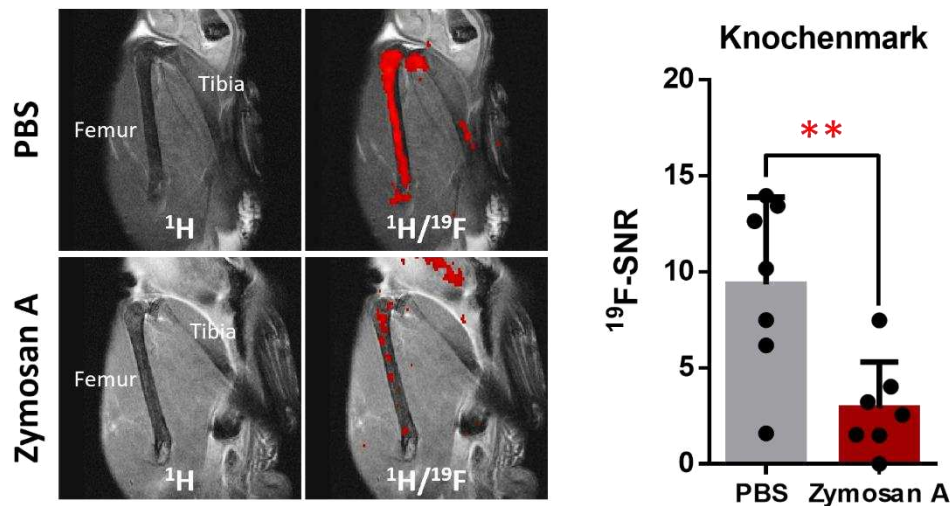


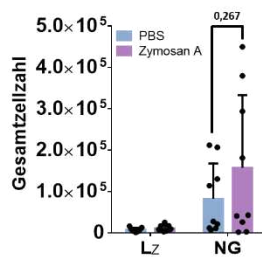
Abb. 12: Reduziertes ^{19}F -Signal im Matrigel und Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation. Dargestellt sind die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahmen (links) sowie die quantitative Analyse des ^{19}F -SNR (rechts) **a)** des Matrigels und **b)** des Knochenmarks des Femurs an Tag 2 nach subkutaner Implantation von Matrigel/LPS in PBS- bzw. ZyA-behandelte Mäuse. Orangefarbige Pfeile zeigen sowohl in den ^1H - als auch überlagerten $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Aufnahmen auf die Position des Matrigels (**a**), links). **b)** Die Daten wurden für beide Hinterbeine analysiert und der Mittelwert gebildet. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 7 - 8$. ** = $p < 0,01$

5.5. Immunzellzahl im Matrigel/LPS-Modell nach ZyA-Behandlung

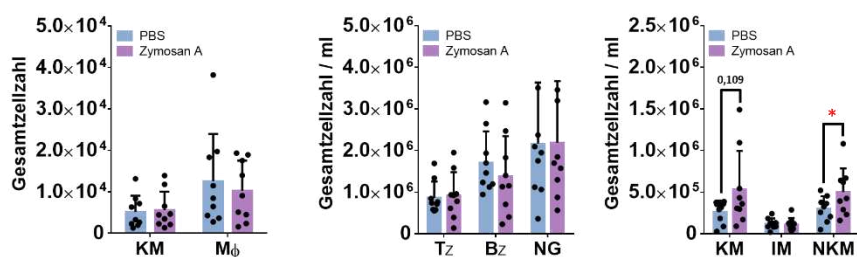
Nachdem die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen des Matrigels und des Knochenmarks an Tag 2 erfolgt waren, wurde auch in dieser Versuchsreihe die Immunzellzahl im Blut pro Milliliter, in der Milz, im Knochenmark von Femur und Tibia eines Beins sowie im Matrigel mittels Durchflusszytometrie

bestimmt. Die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen des Matrigels zeigte keinen Unterschied zwischen ZyA-behandelten Mäusen und Kontrolltieren in der Gesamtzellzahl von Lymphozyten (L_z), klassischen Monozyten (KM) und Makrophagen (M_ϕ) (Abb. 13 a)). Lediglich die Anzahl neutrophiler Granulozyten (NG) war in ZyA-behandelten Mäusen leicht erhöht ($p = 0,267$). Des Weiteren zeigten sich auch in diesem Modell keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Bezug auf T- (T_z) oder B-Zellen (B_z), weder im Blut noch in der Milz oder im Knochenmark. Im Blut (Abb. 13 b)) konnte eine signifikant höhere Anzahl nicht-klassischer Monozyten (NKM) sowie eine leicht erhöhte Anzahl klassischer Monozyten ($p = 0,109$) nach ZyA-Behandlung detektiert werden. Dagegen waren in der Milz (Abb. 13 c)) sowohl klassische als auch intermediäre Monozyten und neutrophile Granulozyten in Mäusen nach ZyA-Behandlung signifikant erhöht. Außerdem zeigte die Analyse des Knochenmarks (Abb. 13 d)) deutlich mehr klassische Monozyten ($p = 0,069$) und neutrophile Granulozyten ($p = 0,067$) in ZyA-behandelten Mäusen. Somit hängt auch im Matrigel/LPS-Modell das niedrigere ^{19}F -Signal ZyA-behandelter Mäuse nicht mit einer reduzierten Anzahl phagozytischer Zellen zusammen.

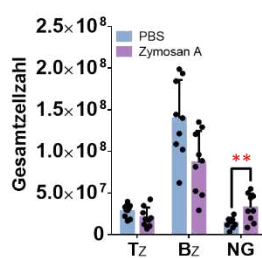
a) Matrigel



b) Blut



c) Milz



d) Knochenmark

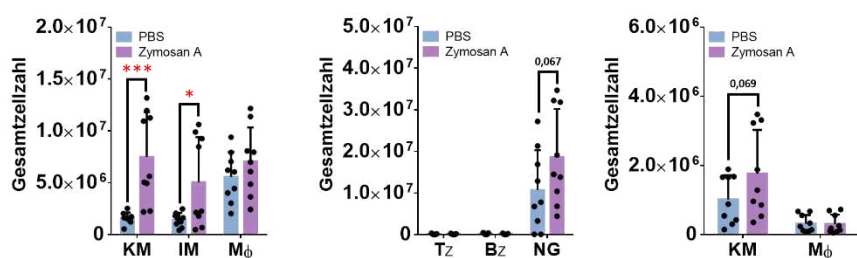
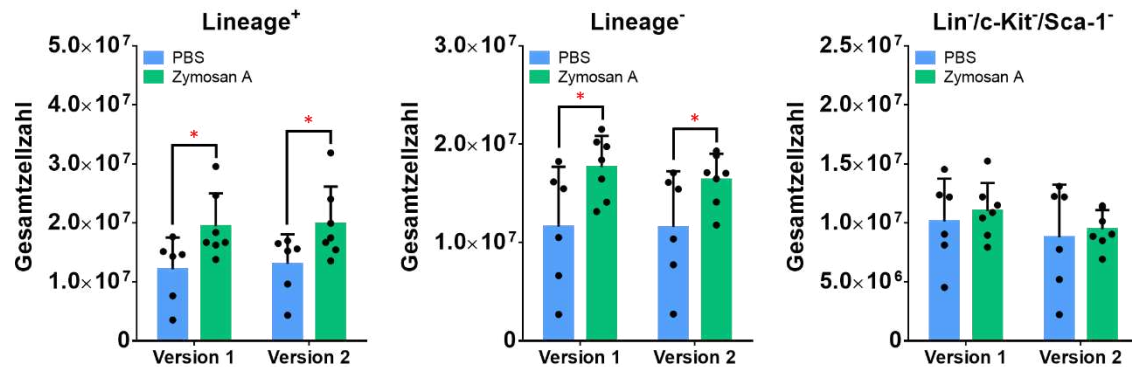


Abb. 13: ZyA-Behandlung verändert die Immunzellzahlen nach Matrigel/LPS-Implantation. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen von isolierten Immunzellen aus a) dem Matrigel, b) dem Blut, c) der Milz und d) dem Knochenmark ZyA- und PBS-behandelter Mäuse an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation. Gezeigt ist jeweils die Gesamtzellzahl pro Matrigel, Milz, Knochenmark eines Beins und pro Milliliter Blut. Mittels Durchflusszytometrie konnte zwischen Lymphozyten (L_z), T-Zellen (T_z), B-Zellen (B_z), neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M_ϕ) unterschieden werden. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 9$. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

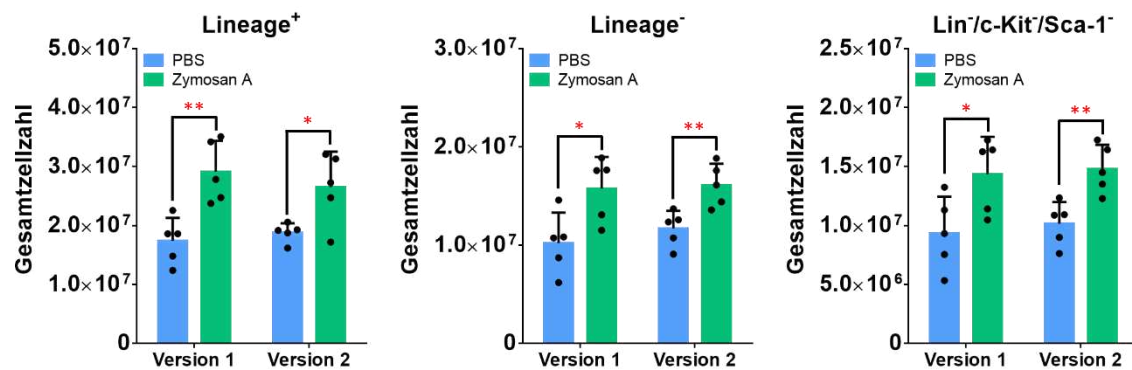
5.6. Erhöhte Hämatopoese in ZyA-behandelten Mäusen nach einem Myokardinfarkt bzw. LPS-induzierter subkutaner Entzündung

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass nach ZyA-Behandlung und folgendem Myokardinfarkt bzw. Matrigel/LPS-Implantation die Anzahl neutrophiler Granulozyten vor allem in der Milz und im Knochenmark erhöht waren. Wie bereits in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, ist bekannt, dass während einer Entzündung die Hämatopoese im Knochenmark verstärkt ist und mehr Immunzellen in den Blutkreislauf entlassen werden^{25,26}. Nach der ZyA-Behandlung konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Stamm- und Vorläuferzellen detektiert werden. Daher war es von Interesse, einen genaueren Einblick in die funktionellen Unterschiede im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse und entsprechender Kontrollen nach MI bzw. im Matrigel/LPS-Modell zu erhalten. Es wurden ebenfalls zwei verschiedene *Gating*-Strategien genutzt, die in Kapitel 4.4.2. ausführlich erläutert und als Version 1 bzw. 2 benannt wurden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass Lin⁺-Zellen (reife Leukozyten) ZyA-behandelter Mäuse sowohl nach MI als auch nach LPS-induzierter subkutaner Entzündung signifikant erhöht waren (Abb. 14 a)/b), links). Diese Ergebnisse passten zu der zuvor detektierten höheren Anzahl reifer Immunzellen im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse nach MI (Abb. 11 d)) und im Matrigel/LPS-Modell (Abb. 13 d)). Neben Lin⁺-Zellen lagen auch Lin⁻-Zellen in ZyA-behandelten Mäusen in beiden Entzündungsmodellen signifikant erhöht vor (Abb. 14 a)/b)). Dementgegen war die Anzahl Lin⁻/c-Kit⁻/Sca-1⁻-Zellen nach MI (Abb. 14 a)) in beiden Versuchsgruppen gleich, während sie im Matrigel/LPS-Modell (Abb. 14 b)) bei ZyA-behandelten Mäusen signifikant erhöht war. Weitere Unterschiede zwischen den beiden Entzündungsmodellen zeigten sich bei der Analyse der LSK- (Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺) und LK- (Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁻) Populationen. Signifikant höher lag die LSK-Population bei ZyA-behandelten Mäusen nach MI, während die LK-Population signifikant niedriger war (Abb. 14 c)). Im Matrigel/LPS-Modell zeigte sich für LSK-Zellen keine Differenz zwischen ZyA-behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe, dafür war die LK-Population in ZyA-behandelten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 14 d)). LK-Zellen konnten weiter in CMP (*common myeloid progenitor*), MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) und GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) unterteilt werden. Nach MI waren CMP (p = 0,066), GMP (p = 0,181) und MEP (p = 0,175) nicht signifikant verändert, zeigten jedoch eine tendenzielle Zellreduktion bei Mäusen, die mit ZyA stimuliert worden waren (Abb. 14 c)). Im Matrigel/LPS-Modell (Abb. 14d)) zeigte sich eine leichte Verringerung für ZyA-behandelte Mäuse in Bezug auf CMP (p = 0,111), GMP (p = 0,072) und MEP (p = 0,155). Auch hier ist erwähnenswert, dass mit der zweiten *Gating*-Strategie ähnliche Ergebnisse für LSK- und LK-Zellen sowie deren Subpopulationen erzielt wurden, die ebenfalls im Anhang zu finden sind.

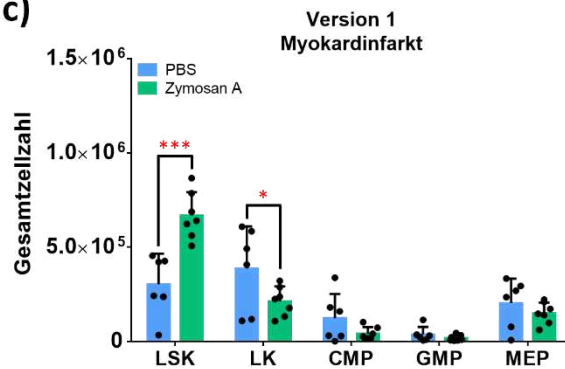
a) Myokardinfarkt



b) Matrigel/LPS



c)



d)

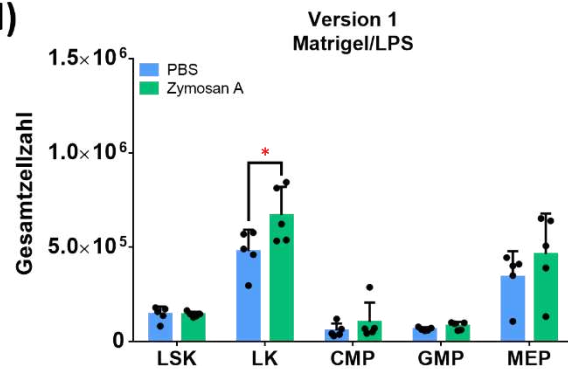


Abb. 14: Zymosan A beeinflusst Hämatopoese nach MI und Matrigel/LPS-Implantation. Gezeigt ist die quantitative Analyse Lineage-positiver (Lineage⁺)- und Lineage-negativer (Lineage⁻)-Zellen sowie der Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁻-Population von PBS- bzw. ZyA-behandelten Mäusen an Tag 2 nach a) MI oder b) Matrigel/LPS-Implantation. Lineage-Zellen wurden sowohl c) nach MI als auch d) im Matrigel/LPS-Modell weiter in Stammzellen (LSK) und Vorläuferzellen (LK) und diese wiederum in CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) und MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) unterteilt. Abgebildet sind Mittelwerte ± SD; n = 5 - 6. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

5.7. Behandlung mit Zymosan A reduziert PFC-Aufnahme *in vivo*

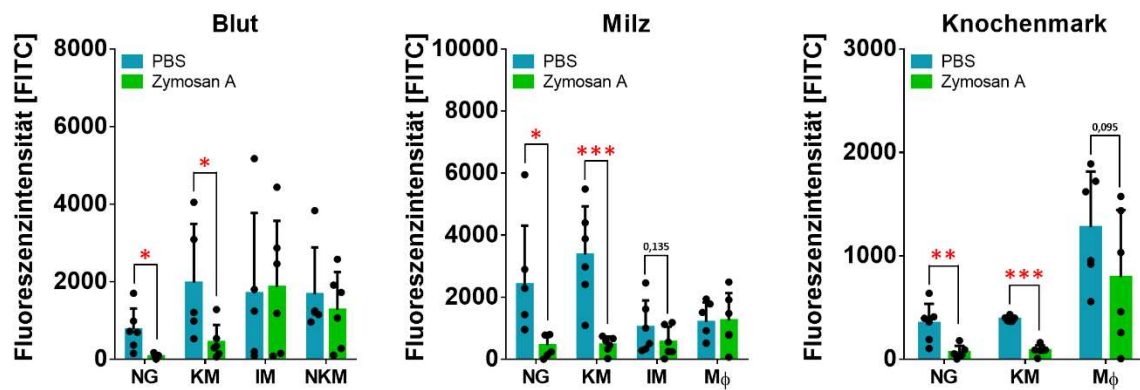
Weiterführend wurde die PFC-Aufnahme untersucht, weil die vorherigen Ergebnisse ein niedrigeres ^{19}F -Signal sowohl im Herz als auch im Matrigel und Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse zeigten, was jedoch nicht mit einer reduzierten Anzahl phagozytischer Immunzellen korrelierte. Die Zellzahl vornehmlich neutrophiler Granulozyten war sogar tendenziell erhöht. Um zu prüfen, welchen Einfluss ein TII-Phänotyp allein oder in Kombination mit einem zweiten Stimulus hat, wurden unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt, bei denen sowohl vor als auch nach Matrigel/LPS-Implantation die PFC-Aufnahme *in vivo* sowie *ex vivo* untersucht wurde. Des Weiteren wurde der direkte Einfluss von ZyA auf die PFC-Aufnahme *ex vivo* betrachtet.

5.7.1. Durchflusszytometrische Analysen der PFC-Aufnahme *in vivo* nach

Matrigel/LPS-Implantation

Für diesen Versuchsteil wurden Mäuse mit Zymosan A oder als Kontrollgruppe mit PBS behandelt und erhielten als zweiten Stimulus eine LPS-induzierte subkutane Entzündung (Matrigel/LPS). Einen Tag nach Matrigel/LPS-Implantation wurden den Mäusen fluoreszenzmarkierte $^{A488}\text{PFCE-PFCs}$ i.v. injiziert (Kapitel 4.6). Nach 2 h wurden die Mäuse wie in Kapitel 4.4.1. beschrieben getötet und Immunzellen aus dem Blut, der Milz sowie dem Knochenmark isoliert und in Bezug auf das Fluoreszenzsignal der $^{A488}\text{PFCE-PFCs}$ durchflusszytometrisch untersucht. Die quantitative Analyse zeigte deutliche Unterschiede in Bezug auf die PFC-Aufnahme PBS- und ZyA-behandelter Mäuse. Vor allem neutrophile Granulozyten (NG) und klassische Monozyten (KM) ZyA-behandelter Mäuse wiesen ein signifikant reduziertes Fluoreszenzsignal sowohl im Blut als auch in der Milz und im Knochenmark auf (Abb. 15 a)). Des Weiteren zeigte sich eine tendenziell niedrigere PFC-Aufnahme in intermediären Monozyten (IM, $p = 0,135$) der Milz und in Makrophagen (M_ϕ , $p = 0,095$) des Knochenmarks ZyA-behandelter Mäuse. Lediglich intermediäre und nicht-klassische (NKM) Monozyten des Blutes und Makrophagen der Milz zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch die Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks wiesen eine reduzierte PFC-Aufnahme nach ZyA-Behandlung auf (Abb. 15 b)). Das Fluoreszenzsignal war in Lineage-negativen (Lin^-)-Zellen sowie der $\text{Lin}^-/\text{c-Kit}^-/\text{Sca-1}^-$, LSK- und LK-Population signifikant reduziert. Das spiegelte sich auch in den Subpopulationen wider. GMP sowie MEP zeigten ein signifikant niedrigeres PFC-Signal und auch für CMP ($p = 0,110$) wurde ein tendenziell reduziertes Fluoreszenzsignal detektiert.

a) Reife Immunzellen



b) Stamm- und Vorläuferzellen

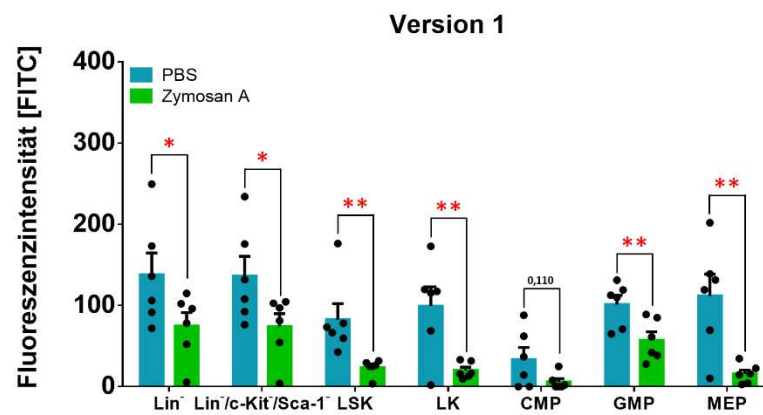


Abb. 15: ZyA-Behandlung führt zu verringerter PFC-Aufnahme *in vivo* an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messung des Fluoreszenzsignals von ^{A488}PFCs, die PBS- und ZyA-behandelten Mäusen einen Tag nach Matrigel/LPS-Implantation i.v. injiziert wurden. Das PFC-Signal wurde **a)** im Blut, in der Milz und im Knochenmark für neutrophile Granulozyten (NG), klassische (KM), intermediäre (IM) und nicht-klassische Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M ϕ) bestimmt. Des Weiteren erfolgte im Knochenmark die Analyse von **b)** Lineage-negativen (Lin⁻)-Zellen für Stamm- (LSK) und Vorläuferzellen (LK), die in CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) und MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) differenziert werden konnten. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 5 - 6. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

5.7.2. Reduziertes ^{19}F -Signal im Knochenmark und in der Milz nach erstem Stimulus

Um zu prüfen, ob das detektierte niedrigere ^{19}F -Signal und die geringe PFC-Aufnahme ZyA-behandelter Mäuse mit der Induktion des zweiten Stimulus in Zusammenhang stehen, wurde das ^{19}F -Signal in der Milz und im Knochenmark vor Induktion eines Myokardinfarkts bzw. vor Matrigel/LPS-Implantation an Tag 0 gemessen. Dafür wurden PBS- und ZyA-behandelten Mäusen PFCE-PFCs an Tag -1 i.v. injiziert und das Knochenmark sowie die Milz einen Tag später mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT gemessen (Abb. 16). Die quantitative Analyse zeigte ein signifikant niedrigeres ^{19}F -SNR im Knochenmark (Abb. 16 a), rechts) und ein schwächeres ^{19}F -SNR in der Milz (Abb. 16 b), rechts, $p = 0,121$) ZyA-behandelter Mäuse. Dementsprechend scheint die ZyA-Behandlung ausreichend zu sein, um zu einer Reduktion des ^{19}F -Signals zu führen.

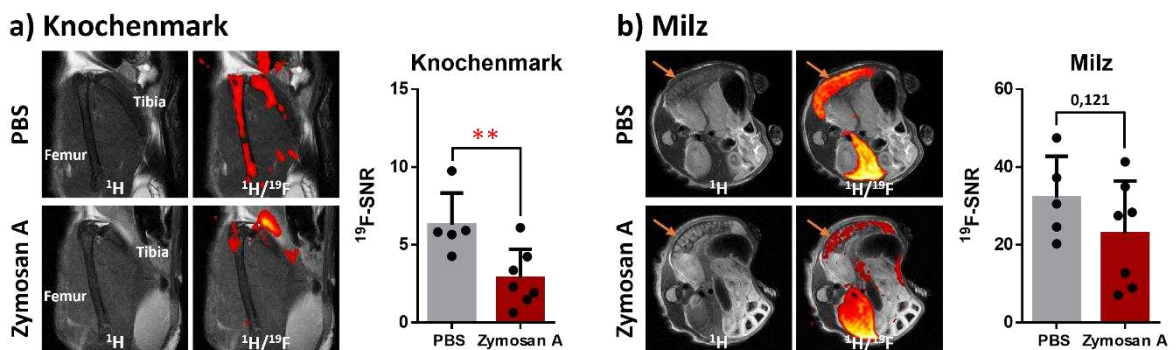


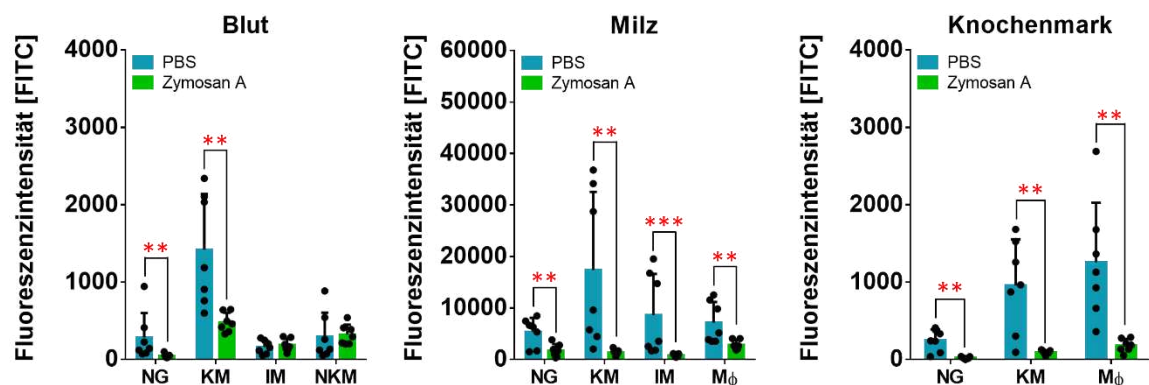
Abb. 16: ZyA-Behandlung führt zu reduziertem ^{19}F -Signal im Knochenmark und in der Milz. Dargestellt sind ^1H - und ^{19}F -MRT-Aufnahmen **a)** des Knochenmarks (links) und **b)** der Milz (links; orangene Pfeile markieren die Milz) PBS- und ZyA-behandelter Mäuse an Tag 0. Des Weiteren ist die quantitative Analyse des ^{19}F -SNR **a)** im Knochenmark des Femurs (rechts) und **b)** in der Milz (rechts) gezeigt. **a)** Die Daten wurden für beide Hinterbeine analysiert und der Mittelwert gebildet. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 5 - 7$. ** = $p < 0,01$

5.7.3. Verringerte PFC-Aufnahme bereits nach ZyA-Behandlung

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben zeigte sich bereits an Tag 0 nach ZyA-Behandlung sowohl in der Milz als auch im Knochenmark ein deutlich geringeres ^{19}F -Signal. Aufgrund dessen wurden ebenfalls durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, um die PFC-Aufnahme zellspezifisch zu analysieren. Dafür wurden die Mäuse mit ZyA oder mit PBS als Kontrollen behandelt und an Tag 0 folgte die i.v. Injektion von fluoreszenzmarkierten $^{\text{A488}}$ PFCs (Kapitel 4.6). Daraufhin wurden die Mäuse 2 h später getötet und reife Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark sowie Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark isoliert und das Fluoreszenzsignal der $^{\text{A488}}$ PFCs in den jeweiligen Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigte sich bei ZyA-behandelten Mäusen sowohl im Blut als auch in der Milz und im Knochenmark ein signifikant niedrigeres PFC-Signal für neutrophile Granulozyten (NG) und klassische Monozyten (KM) (Abb. 17 a)). Des Weiteren wurden in der Milz und im Knochenmark signifikant geringere

PFC-Signale in intermediären Monozyten (IM) und Makrophagen (M_{ϕ}) detektiert. Auch in Stamm- und Vorläuferzellen (Abb. 17 b)) wurden deutliche Unterschiede in der PFC-Aufnahme gemessen. Für Lineage⁻, Lin⁻/c-Kit⁻/Sca-1⁻, LK-Zellen und darunter die GMP-Population wurde ein signifikant niedrigeres PFC-Signal detektiert. Auch in LSK-Zellen ($p = 0,059$) sowie CMP ($p = 0,075$) und MEP ($p = 0,064$) wurden deutlich niedrigere Fluoreszenzsignale festgestellt. Diese Ergebnisse spiegeln auch die zuvor detektierten niedrigeren ¹⁹F-Signale in der Milz und im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse wider.

a) Reife Immunzellen



b) Stamm- und Vorläuferzellen

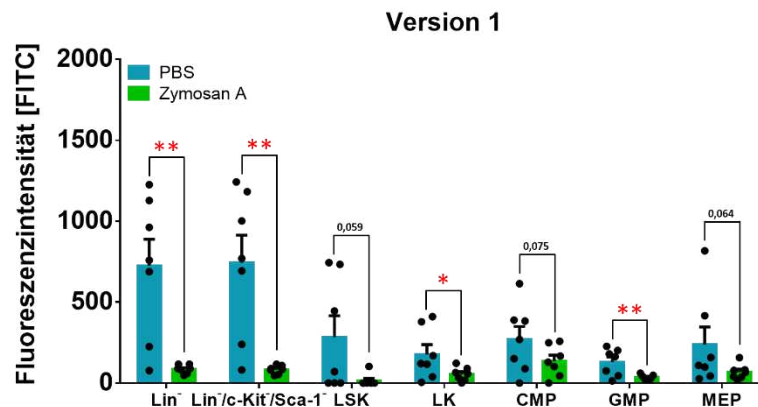


Abb. 17: Reduzierte PFC-Aufnahme nach ZyA-Behandlung. Gezeigt ist die quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Messung des Fluoreszenzsignals von ^{A488}PFCs, die PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag 0 i.v. injiziert wurden. Die Auswertung zeigt das ^{A488}PFC-Signal von **a)** reifen phagozytischen Immunzellen im Blut, in der Milz und im Knochenmark sowie von **b)** Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks. Mittels Durchflusszytometrie konnte zwischen neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M_{ϕ}) unterschieden werden (**a**)). Außerdem konnte über Lineage-negative (Lin⁻)-Zellen zwischen Stammzellen (LSK) sowie Vorläuferzellen (LK) und deren Subpopulationen CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) und MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) differenziert werden (**b**)). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 7$. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

5.7.4. Veränderte PFC-Aufnahme nach *ex vivo* Behandlung mit Zymosan A

Um den direkten Einfluss von Zymosan A auf die PFC-Aufnahme zu untersuchen, wurden Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark unbehandelter Mäuse isoliert und *ex vivo* mit Zymosan A stimuliert. Anschließend wurden die mit ZyA behandelten Zellen und entsprechende unbehandelte Kontrollen mit ^{A488}PFCs inkubiert und daraufhin in Bezug auf ihr Fluoreszenzsignal mittels Durchflusszytometrie analysiert. Interessanterweise zeigte sich nach der *ex vivo* Stimulation mit ZyA eine tendenziell erhöhte PFC-Aufnahme (Abb. 18) in neutrophilen Granulozyten (NG) sowohl im Blut ($p = 0,165$) als auch in der Milz ($p = 0,122$) und im Knochenmark ($p = 0,089$). Diese war nach *in vivo* Behandlung und folgender i.v. PFC-Injektion signifikant verringert (Abb. 17 a)). Dafür war das Fluoreszenzsignal ZyA-behandelter Zellen in klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen (NKM) Monozyten des Blutes (Abb. 18 a)) signifikant reduziert. Den gleichen Effekt konnte man auch in der Milz (Abb. 18 b)) feststellen. Dort war die PFC-Aufnahme in klassischen Monozyten ebenfalls signifikant niedriger und für intermediäre Monozyten ($p = 0,093$) sowie Makrophagen (M_ϕ , $p = 0,058$) tendenziell verringert. Im Knochenmark (Abb. 18 c)) ließ sich eine leichte Reduktion des Fluoreszenzsignals zwischen unbehandelten und ZyA-behandelten klassischen Monozyten ($p = 0,073$) und Makrophagen ($p = 0,129$) feststellen. Insgesamt zeigte die Analyse, dass auch die *ex vivo* Stimulation mit ZyA einen Einfluss auf die PFC-Aufnahme genommen hat. Die Effekte waren jedoch schwächer ausgeprägt als in den Versuchsreihen der *in vivo* PFC-Aufnahme.

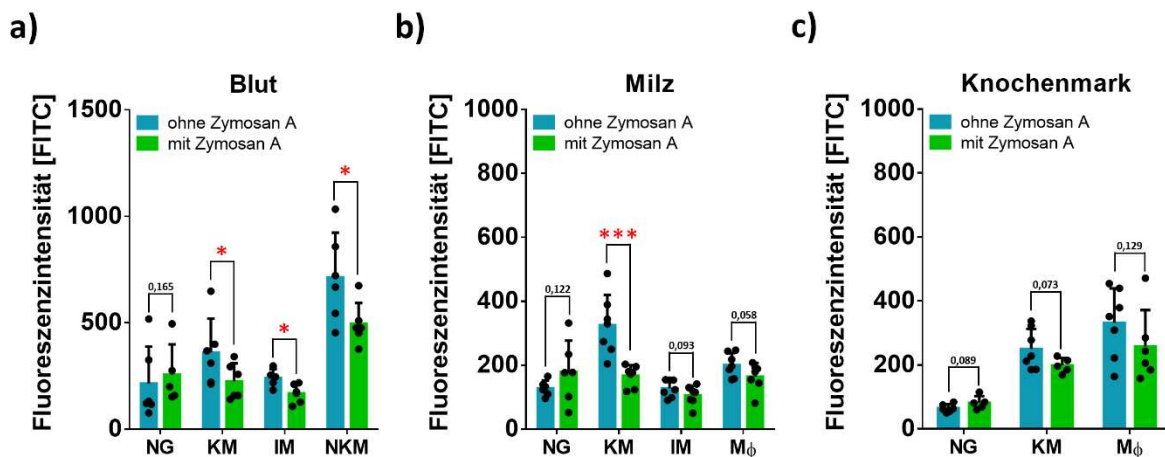


Abb. 18: PFC-Aufnahme von Immunzellen nach *ex vivo* ZyA-Behandlung. Gezeigt ist die quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Messung des Fluoreszenzsignals (PFC-Aufnahme) von unbehandelten (ohne Zymosan A) und ZyA-behandelten (mit Zymosan A) phagozytischen Immunzellen aus **a)** dem Blut, **b)** der Milz und **c)** dem Knochenmark unbehandelter Mäuse. Phagozytische Zellen wurden in neutrophile Granulozyten (NG), klassische (KM), intermediäre (IM) und nicht-klassische Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M_ϕ) unterteilt. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 5 - 7$. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

5.8. Zelluläre Aufnahme von ZyA primär durch neutrophile Granulozyten in der Milz und durch klassische Monozyten im Knochenmark

Aufgrund der zuvor generierten Ergebnisse, die eine erhöhte Zellzahl neutrophiler Granulozyten und klassischer Monozyten zeigten oder auch eine verringerte PFC-Aufnahme dieser Zellen nach Behandlung mit Zymosan A, stellte sich die Frage, welche Immunzellen primär ZyA aufnehmen. Dafür wurden Immunzellen aus der Milz und dem Knochenmark unbehandelter Mäuse mit fluoreszenzmarkiertem ZyA (AF488 ZyA) *ex vivo* inkubiert und das Fluoreszenzsignal mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte deutlich, dass weder in der Milz noch im Knochenmark AF488 ZyA von Lymphozyten (L_z) aufgenommen wurde (Abb. 19 a)/b)). Außerdem war auch die Aufnahme durch intermediäre Monozyten (IM) und Makrophagen (M_ϕ) sowohl in der Milz als auch im Knochenmark sehr gering. Auffällig war, dass vor allem neutrophile Granulozyten (NG) in der Milz ($50144,5 \pm 16388,0$) ein sehr starkes Fluoreszenzsignal aufwiesen, das sich jedoch nicht im Knochenmark ($15468,6 \pm 7093,4$) widerspiegelte. Vergleichbar war die AF488 ZyA-Aufnahme im Durchschnitt in klassischen Monozyten (KM). In der Milz lag das Fluoreszenzsignal bei $36810,2 \pm 12113,8$ und im Knochenmark bei $29112,3 \pm 8242,0$. Insgesamt zeigte sich, dass AF488 ZyA vor allem von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten aufgenommen wurde.

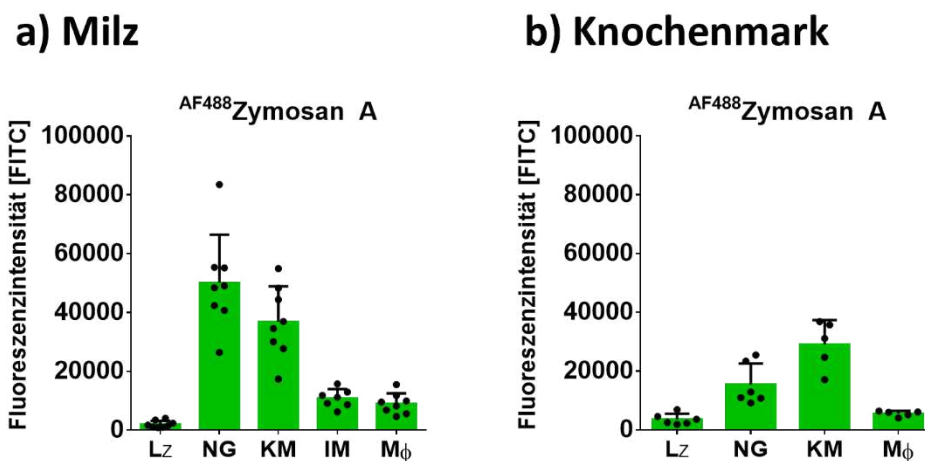


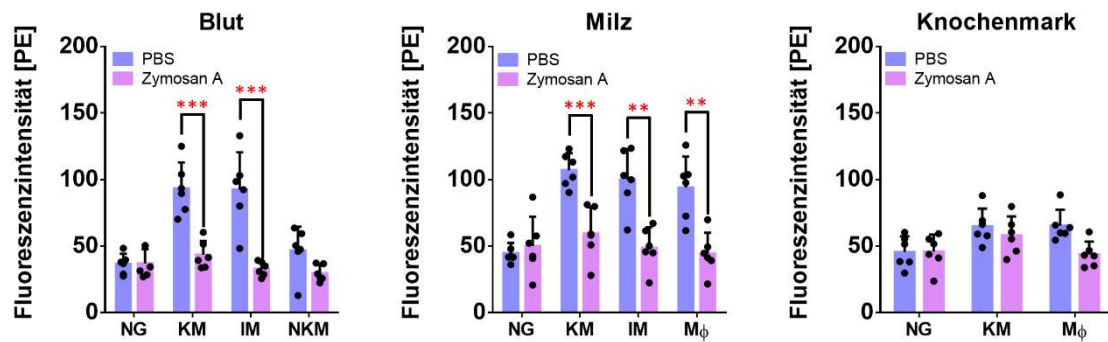
Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der AF488 ZyA-Aufnahme durch Immunzellen der Milz und des Knochenmarks. a)/b) Dargestellt ist die quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals von Lymphozyten (L_z), neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen Monozyten (KM), intermediären Monozyten (IM) und Makrophagen (M_ϕ) nach *ex vivo* Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem AF488 ZyA aus der Milz und dem Knochenmark. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Milz: $n = 7 - 8$; Knochenmark: $n = 5 - 6$.

5.9. Veränderte Rezeptorexpression nach ZyA-Behandlung

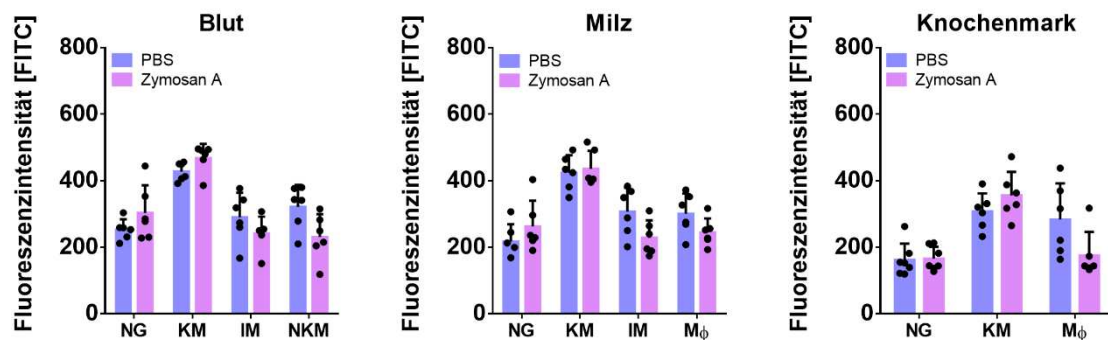
Verschiedene Rezeptoren auf Zellen des angeborenen Immunsystems interagieren mit β -Glucan, aus dem Zymosan A aufgebaut ist. Die vorangegangenen Versuche zeigten unterschiedliche Reaktionen auf ZyA: einmal je nach Zelltyp, aber auch danach ob die Zellen aus dem Blut, der Milz

oder dem Knochenmark untersucht wurden. Des Weiteren gibt es einige Rezeptoren, die auch an Endozytoseprozessen beteiligt sind. Aufgrund dessen war es von Interesse zu untersuchen, inwiefern Dectin-1, TLR2 (*toll-like receptor 2*), CD18 und CD36 auf den myeloiden Immunzellen des Blutes, der Milz und des Knochenmarks vertreten sind und ob sich nach ZyA-Behandlung Unterschiede in der Oberflächenexpression zeigen würden. Dafür wurden Mäuse wie zuvor beschrieben zweimal mit ZyA oder als Kontrollen mit PBS behandelt. An Tag 0, vor Induktion eines zweiten Stimulus, wurden die Mäuse wie in Kapitel 4.4.1. beschrieben getötet und Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark isoliert. Anschließend wurde die Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Analyse zeigte, dass Dectin-1 (Abb. 20 a)) im Blut vor allem auf klassischen (KM) und intermediären (IM) Monozyten exprimiert wurde und in ZyA-behandelten Mäusen eine signifikante Reduktion von etwa 50 % vorlag. Das gleiche Muster zeigte sich in der Milz. Zusätzlich war dort die Expression von Dectin-1 auf Makrophagen sehr hoch und ebenfalls nach ZyA-Behandlung signifikant reduziert. Die Expression auf klassischen und intermediären Monozyten im Blut und in der Milz sowie Makrophagen in der Milz PBS-behandelter Mäuse lag ungefähr doppelt so hoch wie die Expression auf allen anderen Zellpopulationen. Neutrophile Granulozyten (NG) wiesen sowohl im Blut als auch in der Milz und im Knochenmark keine Unterschiede zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen auf. Auch für nicht-klassische Monozyten (NKM) im Blut sowie klassische Monozyten und Makrophagen (M_{ϕ}) im Knochenmark gab es keine Differenz in der Expression zwischen den beiden Gruppen. In Bezug auf TLR2, CD18 und CD36 konnte weder im Blut noch in der Milz oder im Knochenmark in einer der Zellpopulationen ein Unterschied zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen detektiert werden (Abb. 20 b) - d)). TLR2 (Abb. 20 b)) war tendenziell auf klassischen Monozyten stärker vertreten, ansonsten jedoch eher homogen auf neutrophilen Granulozyten, intermediären sowie nicht-klassischen Monozyten und Makrophagen verteilt. Deutlicher zeigte sich die CD36-Expression (Abb. 20 d)) vor allem auf nicht-klassischen Monozyten im Blut, aber auch auf Makrophagen in der Milz und im Knochenmark, während CD36 auf neutrophilen Granulozyten sowie klassischen und intermediären Monozyten kaum exprimiert wurde. Als vierter Rezeptor wurde die Expression von CD18 (Abb. 20 c)) untersucht, welches mit CD11b den MAC-1-Rezeptor bildet. Die Expression von CD18 war im Knochenmark generell niedrig und auf neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten sowie Makrophagen gleich vertreten. Auch in der Milz zeigten sich keine großen Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den Zellpopulationen, jedoch war CD18 auf Makrophagen am stärksten exprimiert. Im Blut zeigte sich die höchste CD18-Expression, sowohl für intermediäre als auch nicht-klassische Monozyten. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass nur Dectin-1 aufgrund der Behandlung mit ZyA herunterreguliert wurde, während alle anderen Rezeptoren davon nicht beeinflusst waren.

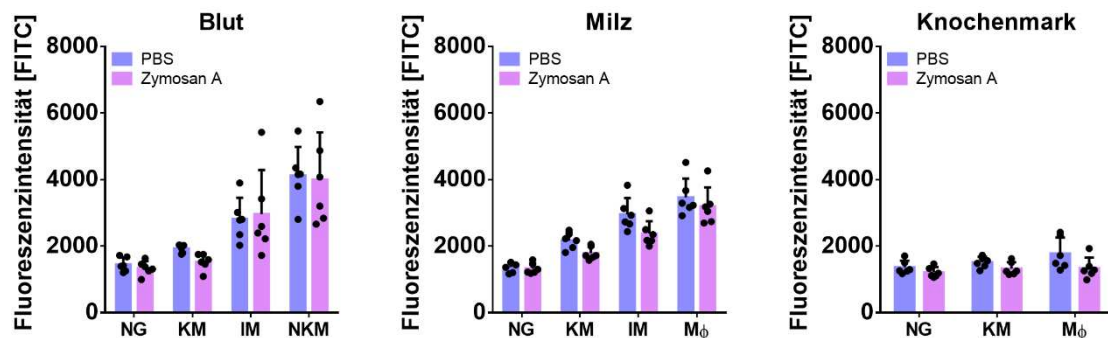
a) Dectin-1



b) TLR2



c) CD18



d) CD36

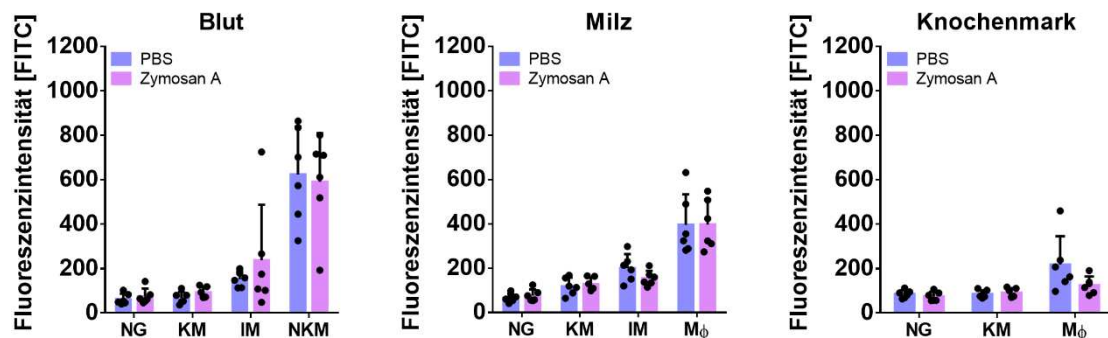


Abb. 20: Oberflächenexpression von Dectin-1, TLR2, CD18 und CD36 in PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag 0. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Daten der Expression von **a) Dectin-1**, **b) TLR2**, **c) CD18** und **d) CD36** auf neutrophilen Granulozyten (NG), klassischen (KM), intermediären (IM) und nicht-klassischen Monozyten (NKM) sowie Makrophagen (M_φ) aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark PBS- und ZyA-behandelter Mäuse. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 6. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

5.10. Neutrophile Granulozyten – Besonders beeinflusst durch Zymosan A?

In den zuvor durchgeführten Versuchsreihen zeigte sich nach ZyA-Behandlung vor allem eine Veränderung (erhöhte Zellzahl) bei neutrophilen Granulozyten. Auffällig war, dass sowohl vor als auch nach einem zweiten Stimulus die Anzahl neutrophiler Granulozyten sowohl im Blut als auch in der Milz und im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse erhöht war. Des Weiteren war die PFC-Aufnahme *in vivo* in beiden Versuchsmodellen in neutrophilen Granulozyten signifikant reduziert, wobei sie nach *ex vivo* Stimulation tendenziell erhöht vorlag. Aufgrund dessen lag der Fokus in den folgenden Versuchen vor allem auf der Analyse neutrophiler Granulozyten.

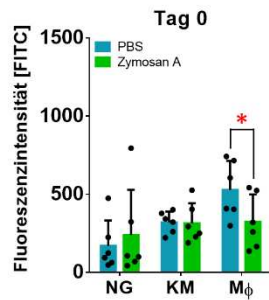
5.10.1. *Ex vivo* Untersuchung der Endozytoseeigenschaften

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse der PFC-Aufnahme stellte sich die Frage, ob die *in vivo* Behandlung mit Zymosan A allein oder gefolgt von einem zweiten Stimulus einen generellen Einfluss auf die Endozytoseeigenschaften von myeloiden phagozytischen Zellen hat. Dafür erfolgte die Immunzellisolation aus dem Knochenmark (siehe Kapitel 4.4.1.) entweder an Tag 0 vor oder an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation als zweitem Stimulus. Es wurden einerseits die bekannten ^{A488}PFCs eingesetzt, aber auch fluoreszenzmarkierte *Escherichia coli* (*E. coli*)- und Dextran-Partikel (10 kDa). Über *E. coli*-Partikel können die Phagozytoseeigenschaften der Zellen geprüft werden¹²⁴, während Dextran-Partikel Auskunft über die Pinozytose geben¹²⁵. Des Weiteren wurde das für neutrophile Granulozyten spezifische Peptid „mNP“ gekoppelt an ^{A647}PFCs (^{mNP.A647}PFCs) als Aktivitätsmarker eingesetzt. Das Peptid bindet an CD177, welches bei Aktivierung neutrophiler Granulozyten eine erhöhte Expression aufweist^{126,127}, auf der Zelloberfläche.

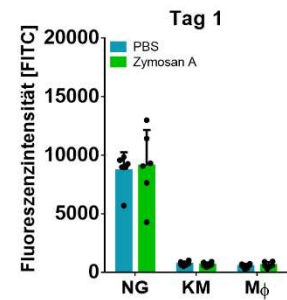
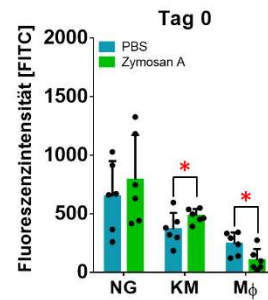
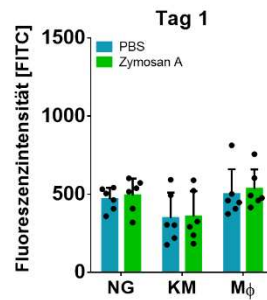
Die Analyse der Endozytoseeigenschaften zeigte an Tag 0 sowohl für ^{A488}PFCs als auch für *E. coli* und Dextran eine signifikant niedrigere Aufnahme durch Makrophagen (M ϕ) nach ZyA-Behandlung (Abb. 21 a) - c)). Für neutrophile Granulozyten (NG) und klassische Monozyten (KM) konnte an Tag 0 kein Unterschied in der Endozytose von ^{A488}PFCs sowie Dextran zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert werden (Abb. 21 a)/c)). Interessanterweise war die Phagozytose von *E. coli* an Tag 0 nach ZyA-Behandlung in neutrophilen Granulozyten leicht erhöht ($p = 0,247$) und bei klassischen Monozyten signifikant stärker (Abb. 21 b)). An Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation wurde keine unterschiedliche Endozytose von ^{A488}PFCs, *E. coli* und Dextran durch neutrophile Granulozyten, klassische Monozyten sowie Makrophagen in PBS- oder ZyA-behandelten Mäusen gemessen. Auffällig war, dass im Gegensatz zu Tag 0 an Tag 1 *E. coli* um das Zehnfache verstärkt von neutrophilen Granulozyten phagozytiert wurden. Die Auswertung der Aufnahme von ^{mNP.A647}PFCs durch neutrophile Granulozyten war an Tag 0 nach ZyA-Behandlung signifikant erhöht,

während sie an Tag 1 in beiden Versuchsgruppen gleich hoch war (Abb. 21 d)). Jedoch ist festzuhalten, dass das Fluoreszenzsignal beider Gruppen an Tag 1 gegenüber Tag 0 im Schnitt verdoppelt vorlag. Demnach zeigte die Behandlung mit ZyA bereits eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die durch Induktion eines zweiten Stimulus weiter verstärkt wurde, aber letztlich sowohl für PBS- als auch ZyA-behandelte Mäuse gleich hoch war.

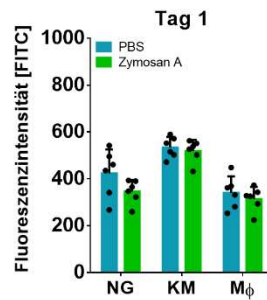
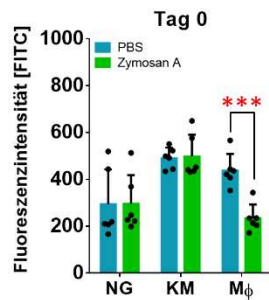
a) A^{488} PFCE



b) *E. coli*



c) Dextran



d) mNP.A647PFCE

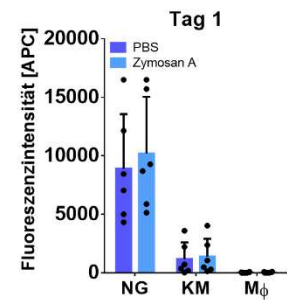
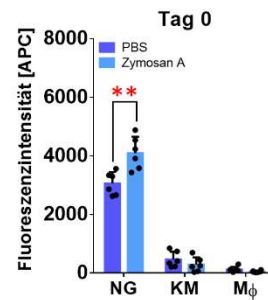


Abb. 21: Untersuchung von Endozytose-Eigenschaften nach ZyA-Behandlung. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten **a)** PFCs (A^{488} PFCE), **b)** *Escherichia coli* (*E. coli*)- und **c)** Dextran-Partikeln (10 kDa) durch neutrophile Granulozyten (NG), klassische Monozyten (KM) und Makrophagen (M ϕ) aus dem Knochenmark nach PBS- bzw. ZyA-Behandlung an Tag 0 vor bzw. Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation untersucht. Außerdem wurde über das aktive Targeting mit dem neutrophilen Granulozyten spezifischen Peptid (mNP) gekoppelt an fluoreszenzmarkierte PFCs (mNP.A647PFCE) die Aktivität neutrophiler Granulozyten bestimmt (**d**)). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 6

5.10.2. Funktionelle Analyse von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark

Um zu prüfen, welchen Einfluss die ZyA-Behandlung allein oder in Kombination mit einem zweiten Stimulus auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten hat, wurden neben den Endozytoseeigenschaften auch verschiedene Aktivierungsmarker (CD11b, CD62L, CD63), die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Migrationseigenschaften in Richtung eines chemotaktischen Faktors (fMLP) untersucht. Dazu wurden neutrophile Granulozyten zellspezifisch aus dem Knochenmark an Tag 0 vor oder an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation isoliert und analysiert.

Mittels *Ultra-Performance*-Flüssigkeitschromatographie konnte indirekt die Menge an extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bestimmt werden. Dabei wird 2-Hydroxyethidium gemessen, das bei der Oxidation von DHE durch ROS (Superoxid) entsteht. Darüber lässt sich auf die Menge an ROS schließen. Die Analyse zeigte, dass die ZyA-Behandlung keinen Effekt auf die Bildung von ROS hatte, denn sowohl an Tag 0 als auch an Tag 1 konnte kein Unterschied zwischen PBS- bzw. ZyA-behandelten Mäusen detektiert werden (Abb. 22 a)). Jedoch lag die ROS-Produktion in beiden Versuchsgruppen an Tag 1 im Durchschnitt ca. 14.000 nM höher als an Tag 0. Nach ZyA-Behandlung wurde an Tag 0 eine signifikant verstärkte Migration von neutrophilen Granulozyten in fMLP-Richtung gemessen (Abb. 22 b)). Auch an Tag 1 zeigte sich eine leicht erhöhte Migration ZyA-behandelter Mäuse ($p = 0,247$). Mittels Durchflusszytometrie wurde ebenfalls die Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker gemessen. Für CD11b (Abb. 22 c)) zeigte sich an Tag 0 eine leicht erhöhte Expression in ZyA-behandelten Mäusen ($p = 0,260$), während sie für CD63 (Abb. 22 d)) tendenziell niedriger war ($p = 0,159$). An Tag 1 konnte zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen kein Unterschied in der Oberflächenexpression von CD11b und CD63 festgestellt werden. Die CD62L-Expression (Abb. 22 e)) war an Tag 0 tendenziell niedriger nach ZyA-Behandlung ($p = 0,138$) und sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen an Tag 1 um die Hälfte reduziert, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gemessen wurde.

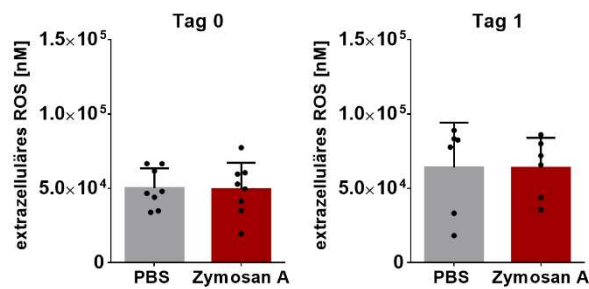
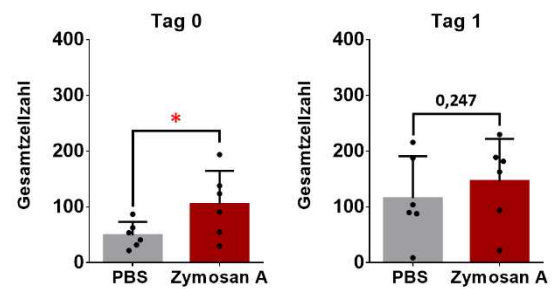
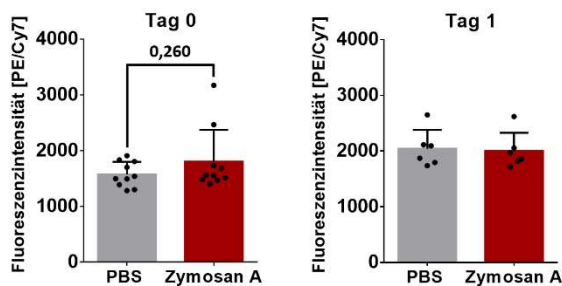
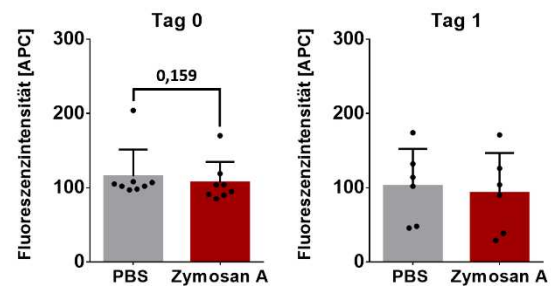
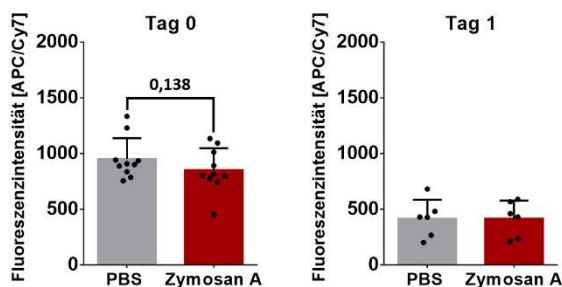
a) ROS**b) Migration****c) CD11b****d) CD63****e) CD62L**

Abb. 22: Funktionelle Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark vor und nach Induktion eines zweiten Stimulus. Aufgeführt ist die Expression der Aktivierungsmarker **c) CD11b**, **d) CD63** und **e) CD62L** sowie **a) die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)** und **b) die Gesamtzellzahl migrierter neutrophiler Granulozyten in Richtung eines Entzündungsfaktors (fMLP).** Die verwendeten neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark PBS- oder ZyA-behandelter Mäuse wurden entweder an Tag 0 vor oder an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation isoliert. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Tag 0: n = 6 - 10; Tag 1: n = 6. * = p < 0,05

5.10.3. Funktionelle Eigenschaften neutrophiler Granulozyten im Matrigel

Ergänzend zu den Analysen neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark wurden an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation auch Immunzellen aus dem Matrigel isoliert und ebenfalls mit A488 PFCs *ex vivo* inkubiert sowie in Bezug auf ihre ROS-Produktion und Aktivierungsmarker (CD11b, CD62L, CD63) untersucht. An Tag 1 liegen primär neutrophile Granulozyten im Matrigel vor, die nicht spezifisch isoliert wurden, sodass man jedoch davon sprechen kann, dass auch in diesem Versuch die Eigenschaften neutrophiler Granulozyten analysiert wurden. Die durchflusszytometrischen Analysen der CD11b-Expression (Abb. 23 c)) zeigten keinen Unterschied

zwischen ZyA- und PBS-behandelten Mäusen, während die CD63-Expression (Abb. 23 d)) in ZyA-behandelten Mäusen signifikant erhöht war. Jedoch lag das CD11b-Signal insgesamt sehr hoch, sodass davon auszugehen ist, dass sowohl neutrophile Granulozyten PBS- als auch ZyA-behandelter Mäuse stark aktiviert waren. Dieses Ergebnis würde auch das nicht messbare CD62L-Signal (Abb. 23 e)) erklären, das auf eine starke Aktivierung neutrophiler Granulozyten hinweist und mit einem deutlichen Rückgang der CD62L-Expression auf der Zelloberfläche einhergeht¹²⁸. Des Weiteren war die ^{A488}PFC-Aufnahme (Abb. 23 b)) und auch die ROS-Produktion (Abb. 23 a)) sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen gleich hoch und zeigte in dieser Hinsicht keine funktionellen Unterschiede infiltrierter neutrophiler Granulozyten aus dem Matrigel.

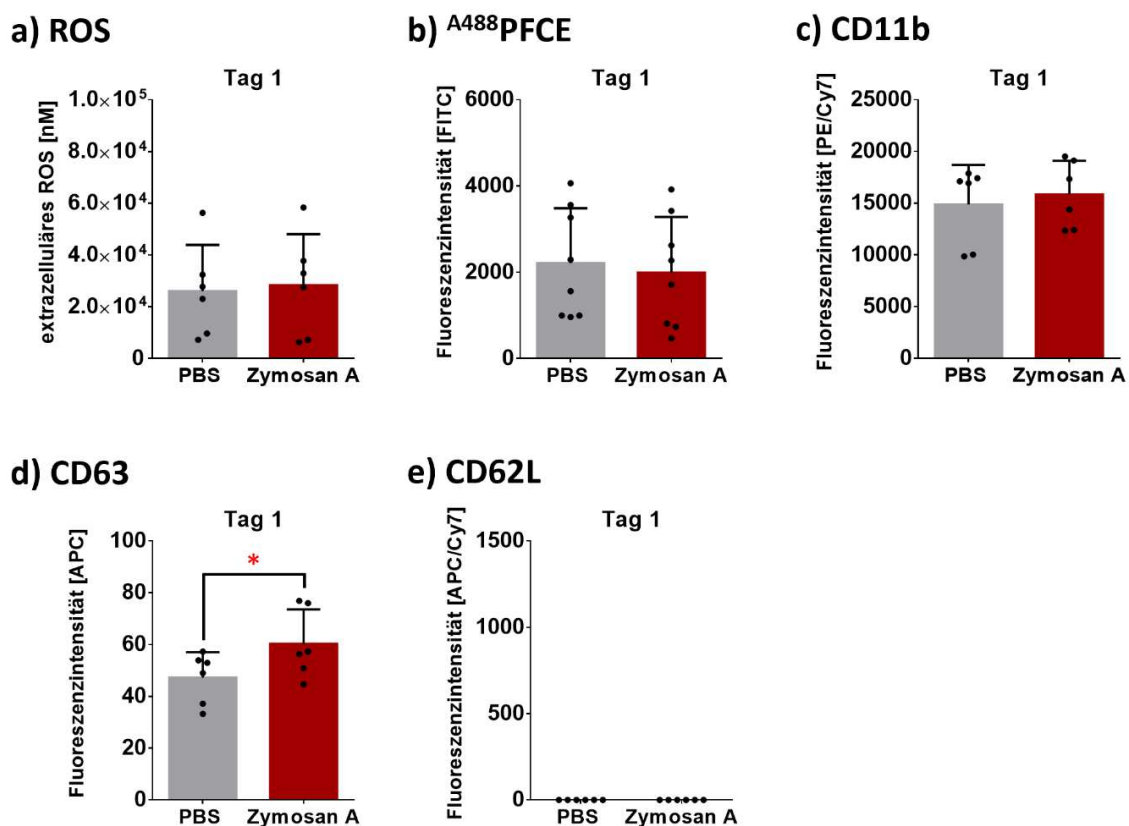


Abb. 23: Funktionelle Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten aus dem Matrigel an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation. Gezeigt ist **a)** die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), **b)** die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten PFCs (^{A488}PFCE) sowie die Expression der Aktivierungsmarker **c)** CD11b, **d)** CD63 und **e)** CD62L von neutrophilen Granulozyten aus dem Matrigel. Das Matrigel wurde sowohl PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen einen Tag nach Matrigel/LPS-Implantation entnommen und neutrophile Granulozyten wurden isoliert. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; n = 6 - 8. * = p < 0,05

5.11. ZyA-Behandlung erhöht die Menge an Ly6G^{low}-neutrophilen Granulozyten in Milz und Knochenmark

Neutrophile Granulozyten waren bisher insbesondere für ihre proinflammatorische Wirkung bekannt. Kürzlich wurde jedoch eine bisher unbekannte Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten in Tiermodellen für z.B. Krebs, Herzinfarkt, Infektionen und Erkrankungen des zentralen Nervensystems beschrieben^{120,129–131}. Diese als „N2“ bzw. Ly6G^{low} benannten Populationen zeigten im Vergleich mit herkömmlichen neutrophilen Granulozyten eher entzündungshemmende als -fördernde Aktivitäten. Besonders interessant war der Zusammenhang von ZyA-Injektionen, die zu einer Entwicklung von sogenannten Ly6G^{low}CD14^{hi}-Zellen führten und unter anderem neuroprotektive und regenerative Eigenschaften aufwiesen^{120,132}. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die vorliegenden Daten auch in Bezug auf die Ly6G^{low}-Population untersucht. Dazu wurden die durchflusszytometrischen Messungen der Immunzellen aus dem Blut, der Milz, dem Knochenmark, dem Herz und dem Matrigel von PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag 0 vor Induktion eines zweiten Stimulus (Abb. 24 a)) und an Tag 2 nach Myokardinfarkt (MI) (Abb. 24 b)) bzw. Matrigel/LPS-Implantation (Abb. 24 c)) neu ausgewertet. Im Folgenden wurde der prozentuale Anteil von Ly6G^{low}-Zellen an der Gesamtheit Ly6G-positiver (Ly6G⁺)-Zellen, die zuvor im Allgemeinen als neutrophile Granulozyten beschrieben wurden, ermittelt. Zunächst wurde festgestellt, dass die alleinige ZyA-Behandlung zu einem signifikanten Ly6G^{low}-Anstieg in der Milz ($14,2 \pm 2,6$ %) und im Knochenmark ($16,4 \pm 2,7$ %) führte. Im Blut zeigten sich an Tag 0 keine Unterschiede im prozentualen Anteil von Ly6G^{low}-Zellen, der mit $2,5 \pm 0,9$ % für PBS-behandelte und $2,4 \pm 0,8$ % für ZyA-behandelte Mäuse sehr gering war. Auffällig war, dass der prozentuale Anteil von Ly6G^{low}-Zellen nach Induktion eines zweiten Stimulus sowohl in PBS- als auch in ZyA-behandelten Mäusen im Blut, in der Milz und im Knochenmark deutlich anstieg. Des Weiteren zeigte sich nur in der Milz ZyA-behandelter Mäuse nach MI eine signifikant erhöhte Ly6G^{low}-Population ($24,6 \pm 9,7$ %). Im Blut, im Knochenmark und im Herz waren die Werte zwischen beiden Gruppen etwa gleich, wobei der prozentuale Anteil von Ly6G^{low}-Zellen im Herz ungefähr um 50 % höher lag als im Blut und im Knochenmark. Interessanterweise zeigte sich nach Matrigel/LPS-Implantation ein ganz anderes Ergebnis. Dort war sowohl im Matrigel als auch im Knochenmark die Ly6G^{low}-Population in ZyA-behandelten Mäusen signifikant geringer als bei Kontrolltieren. Im Blut und in der Milz zeigten sich dagegen ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

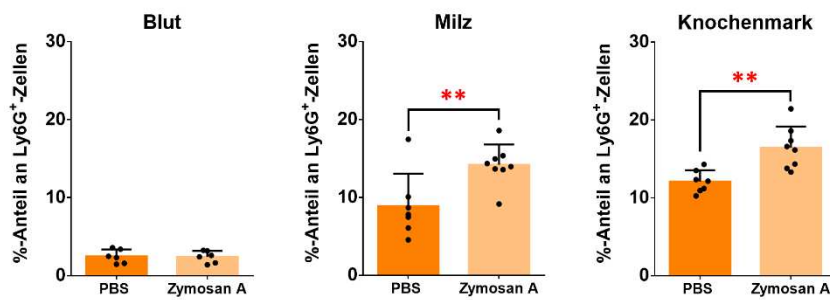
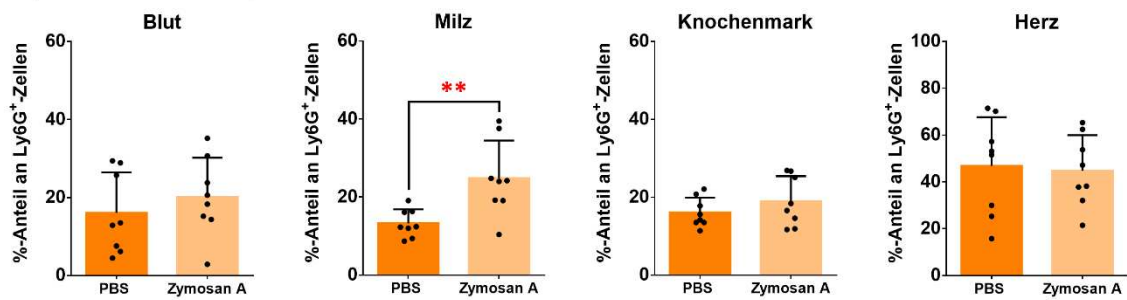
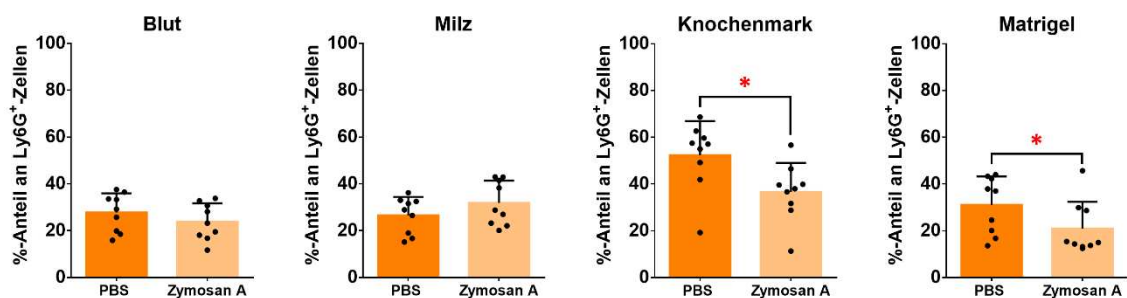
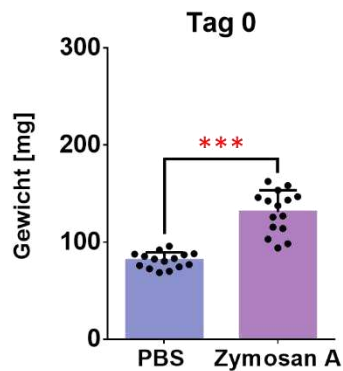
a) Tag 0 – Ly6G^{low}**b) Myokardinfarkt – Ly6G^{low}****c) Matrigel/LPS – Ly6G^{low}**

Abb. 24: Veränderte Ly6G-Expression nach ZYA-Behandlung. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Messung des prozentualen Anteils von Ly6G^{low}-Zellen an der Gesamtheit Ly6G⁺-Zellen im Blut, in der Milz, im Knochenmark, im Herz sowie im Matrigel PBS- und ZYA-behandelter Mäuse. Die Messungen erfolgten an **a)** Tag 0 vor Induktion eines zweiten Stimulus sowie an Tag 2 **b)** nach Induktion eines Myokardinfarkts (MI) bzw. **c)** nach LPS-induzierter subkutaner Entzündung (Matrigel/LPS). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Tag 0: n = 6 - 8; MI: n = 8; Matrigel/LPS: n = 9. * = p < 0,05; ** = p < 0,01

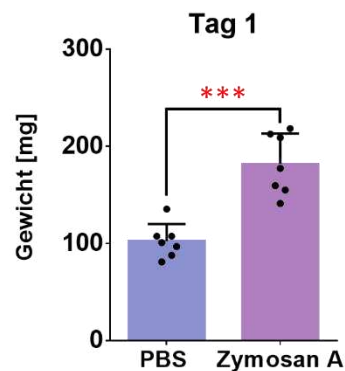
5.12. Erhöhtes Milzgewicht nach Behandlung mit Zymosan A

Die Immunzellzahl-Analysen betreffend fiel auf, dass die Milz der mit ZyA behandelten Mäuse optisch deutlich größer war als die Milz der PBS-behandelten Mäuse. Aufgrund dessen wurden die Milzen sowohl an Tag 0 vor als auch an Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation und Tag 2 nach Induktion eines Myokardinfarkts gewogen. Sowohl ohne (Abb. 25 a)) als auch mit zweitem Stimulus (Abb. 25 b)/c)) zeigte sich, dass die Milz ZyA-behandelter Mäuse signifikant schwerer war als die der PBS-behandelten Mäuse. Außerdem nahm das Milzgewicht nach zweitem Stimulus im Durchschnitt zu. Die Ergebnisse des Milzgewichts passen zu den vorherigen Immunzellzahlen, die ebenfalls nach Behandlung mit ZyA anstiegen. Des Weiteren wurden histologische Untersuchungen von Milzen PBS- und ZyA-behandelter Mäuse vor Induktion eines zweiten Stimulus durchgeführt, um einen besseren Einblick in den strukturellen Aufbau und eventuelle Unterschiede nach ZyA-Behandlung zu erlangen. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Milzen der in Kapitel 5.7.2 beschriebenen Mäuse genutzt. Die Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, über die z.B. DNA sowie Zellkerne blau und Proteine des Zytoplasmas rot angefärbt werden, zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 25 d), oben). Auch die quantitative Auswertung des prozentualen Flächenanteils von Lymphfollikeln an der gesamten Milzfläche von je drei Schnitten PBS- bzw. ZyA-behandelter Mäuse war für beide Versuchsgruppen ungefähr gleich (Abb. 25 e)). Auffällig war, dass sowohl PBS- als auch ZyA-behandelte Mäuse eine verstärkte Ansammlung von Erythrozyten aufwiesen, die sich durch ihren fehlenden Zellkern und die starke Rotfärbung von der restlichen Milz abhoben (Abb. 25 d), unten).

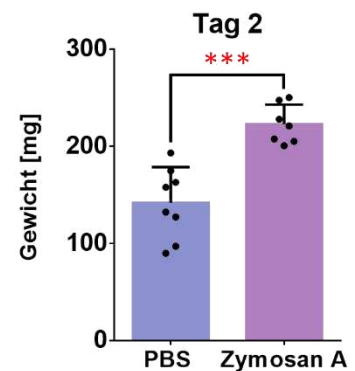
a) Tag 0



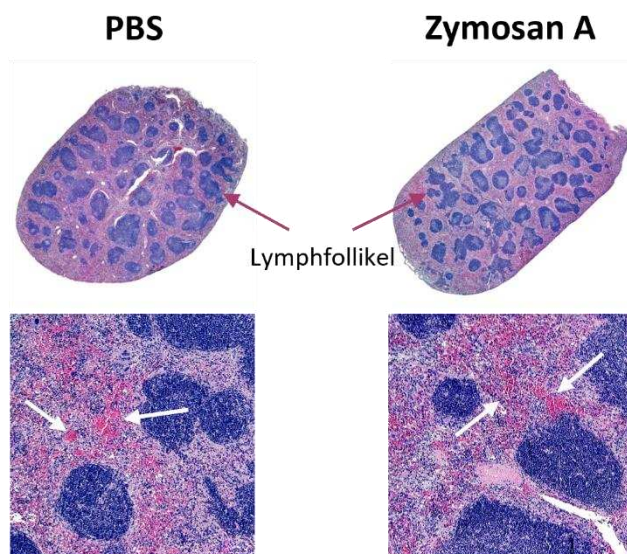
b) Matrigel/LPS



c) Myokardinfarkt



d) Histologie



e) Lymphfollikel

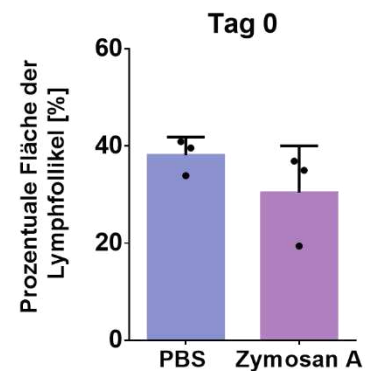


Abb. 25: Verändertes Milzgewicht durch ZyA-Behandlung. Abgebildet ist das Milzgewicht PBS- und ZyA-behandelter Mäuse an **a)** Tag 0 vor Induktion eines zweiten Stimulus, **b)** Tag 1 nach Matrigel/LPS-Implantation und **c)** Tag 2 nach Myokardinfarkt. **d)** Außerdem ist beispielhaft je eine mikroskopische Übersichtsaufnahme (aufgenommen mit 40-facher Vergrößerung) und ein Ausschnitt mit 100-facher Vergrößerung von 4 μ m-Milzschnitten, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden, nach PBS- bzw. ZyA-Behandlung und PFC-Injektion an Tag 0 gezeigt. Die roten Pfeile zeigen auf Lymphfollikel und die weißen Pfeile zeigen auf Erythrozyten, die sich in der Milz angesammelt haben. **e)** Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils an Lymphfollikeln an der gesamten Milzfläche von je drei Milzschnitten PBS- bzw. ZyA-behandelter Mäuse an Tag 0. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Tag 0: n = 14; Tag 1: n = 7; Tag 2: n = 7 - 8; Histologie: n = 3. *** = $p < 0,001$

5.13. Einfluss von Zymosan A auf den Verlauf und die Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt bzw. einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung

In den vorherigen Versuchen wurde primär der direkte Effekt eines zweiten Stimulus – Myokardinfarkt oder Matrigel/LPS – nach einer vorangegangenen ZyA-Behandlung untersucht und im weiteren Verlauf hinzukommend auch, welchen Einfluss ZyA allein auf die PFC-Aufnahme und weitere funktionelle Eigenschaften phagozytischer Zellen hat. Daher galt es zu untersuchen, welchen Effekt der veränderte Immunstatus auf den Verlauf des Heilungsprozesses nach einem Myokardinfarkt oder nach einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung hat. Dafür wurden die Mäuse nicht wie zuvor zwei Tage nach Induktion des zweiten Stimulus für durchflusszytometrische Analysen getötet, sondern über 28 Tage mittels ^1H -MRT untersucht.

5.13.1. ZyA-Behandlung verschlechtert die Herzfunktion nach Myokardinfarkt

Wie zuvor erläutert wurden die Mäuse an Tag -7 und Tag -4 mit ZyA oder mit PBS als Kontrollen behandelt. Daraufhin erfolgte an Tag 0 die Induktion eines Myokardinfarkts (MI). An Tag -7, vor erster Injektion, wurden die basalen Herzfunktionsmessungen sowie die Ermittlung der T1- und T2-Zeiten mittels ^1H -MRT durchgeführt. Die gleichen Messungen erfolgten ebenfalls an Tag -4 vor sowie Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach MI.

Im Zuge der Herzfunktionsmessungen konnten die Ejektionsfraktion (EF), das enddiastolische (EDV) sowie endsystolische (ESV) Volumen, das Herzzeitvolumen (HZV) und die mittventrikuläre Wanddicke während der Diastole (d_{mitt}) des linken Ventrikels ermittelt werden. Die Ejektionsfraktion bezeichnet das prozentuale Blutvolumen, welches während der Systole aus dem linken Ventrikel gepumpt wird, und wird sowohl aus dem linksventrikulären enddiastolischen als auch aus dem endsystolischen Volumen berechnet. Demnach ist sie ein direktes Maß für die linksventrikuläre Funktion. Die Auswertungen der basalen (Tag -7) ^1H -MRT-Messungen der Transversalschnitte des linken Ventrikels zeigten eine Ejektionsfraktion von etwa 54,5 % (Abb. 26 a)). Einen Tag nach Induktion eines MI fiel die Ejektionsfraktion auf $35,1 \pm 6,8$ % bei Kontrolltieren und $32,8 \pm 3,7$ % bei ZyA-behandelten Mäusen ab. Während die Ejektionsfraktion der PBS-behandelten Mäuse über die Zeit fast gleichblieb und an Tag 28 nach MI $34,2 \pm 8,9$ % betrug, sank sie in ZyA-behandelten Tieren auf $27,6 \pm 6,5$ % ab. Die Unterschiede in den Gruppen wiesen jedoch keine Signifikanz auf. Dementsprechend zeigten auch das enddiastolische (Abb. 26 b)) und endsystolische (Abb. 26 c)) Volumen an Tag 28 nach einem Myokardinfarkt Differenzen zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen. Der Basalwert des enddiastolischen Volumens lag bei etwa 65,2 μl und für das endsystolische Volumen bei ungefähr 29,8 μl . Sowohl das endsystolische als

auch das enddiastolische Volumen stiegen in PBS- und ZyA-behandelten Mäusen nach Induktion eines MI an. In der Kontrollgruppe stieg das enddiastolische Volumen von $72,2 \pm 7,8 \mu\text{l}$ an Tag 1 auf $92,8 \pm 17,8 \mu\text{l}$ an Tag 28 nach MI leichter an, während es bei ZyA-behandelten Mäusen von $72,5 \pm 7,8 \mu\text{l}$ an Tag 1 auf $111,3 \pm 22,6 \mu\text{l}$ an Tag 28 anstieg. Daher zeigte sich an Tag 28 ein signifikanter Unterschied zwischen dem enddiastolischen Volumen der beiden Gruppen.

Der gleiche Effekt zeigte sich bei der Analyse des endsystolischen Volumens, das in der Kontrollgruppe von $46,9 \pm 6,9 \mu\text{l}$ an Tag 1 auf $62,3 \pm 18,7 \mu\text{l}$ an Tag 28 und in ZyA-behandelten Mäusen von $48,8 \pm 6,4 \mu\text{l}$ an Tag 1 auf $81,6 \pm 24,8 \mu\text{l}$ an Tag 28 anstieg. Auch hier ergab der statistische Test an Tag 28 einen signifikanten Unterschied zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen an Tag 28 nach MI ist jeweils auch in den ^1H -Aufnahmen eines beispielhaft gezeigten Transversal- und Coronalschnitts einer mit PBS- bzw. ZyA-behandelten Maus zu sehen (Abb. 26 d)). Auf der Abbildung erkennt man, dass der linke Ventrikel der ZyA-behandelten Maus im Gegensatz zu dem Kontrolltier tendenziell dilatierter ist, was zu dem erhöhten enddiastolischen und endsystolischen Volumen und der daraus hervorgehenden niedrigeren Ejektionsfraktion passt. Des Weiteren wurde das Herzzeitvolumen bestimmt, welches das aus dem Herz in den Kreislauf gepumpte Blutvolumen pro Minute angibt. Dadurch ist es ein Maß für die Herzleistung und berechnet sich aus dem Produkt der Herzfrequenz sowie des Schlagvolumens. Bestimmend für das Herzzeitvolumen sind Kontraktilität, Vor- und Nachlast sowie Ventrikelgröße, Herzwanddicke und Klappenfunktion. Basal lag das Herzzeitvolumen (Abb. 26 e)) bei ca. $16,5 \text{ ml/min}$ und verringerte sich einen Tag nach MI auf $11,2 \pm 2,6 \text{ ml/min}$ in Kontrollmäusen und $11,3 \pm 1,3 \text{ ml/min}$ in ZyA-behandelten Mäusen. Auch im weiteren Verlauf zeigte sich in Bezug auf das Herzzeitvolumen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. An Tag 28 nach MI betrug es für PBS-behandelte Mäuse $12,7 \pm 1,2 \text{ ml/min}$ und für ZyA-behandelte Mäuse $14,1 \pm 1,5 \text{ ml/min}$.

Abschließend wurde die myokardiale Wanddicke der mittventrikulären Schicht des linken Ventrikels während der Diastole bestimmt, die umso dünner ist, je dilatierter das Herz ist. Die Wanddicke (Abb. 26 f)) lag basal im Durchschnitt bei etwa $0,84 \text{ mm}$. Einen Tag nach Induktion eines MI erhöhte sich die Wanddicke sowohl für PBS- als auch für ZyA-behandelte Mäuse auf $0,98 \pm 0,1 \text{ mm}$. Über die Zeit von vier Wochen verringerte sich die Wanddicke und lag letztlich an Tag 28 für Kontrolltiere bei $0,80 \pm 0,06 \text{ mm}$ und für ZyA-behandelte Mäuse bei $0,65 \pm 0,2 \text{ mm}$. Zusätzlich zu der gesamten Wanddicke des linken Ventrikels wurde auch die regionale Wanddicke des Infarktbereichs während der Diastole an Tag 28 bestimmt. Die Analyse zeigte, dass das infarzierte, linksventrikuläre Myokard ZyA-behandelter Mäuse gegenüber den Kontrolltieren signifikant dünner war (Abb. 26 h)).

Nach den MRT-Messungen wurden die Mäuse gewogen, um den Schweregrad und die Auswirkungen des Myokardinfarkts zu beobachten. Im Durchschnitt lag das Gewicht der Mäuse zu Beginn der Versuchsreihe bei 27 g (Abb. 26 g)). Auffällig war, dass die alleinige ZyA-Behandlung bereits zu einer Gewichtsabnahme der Mäuse vor Induktion eines zweiten Stimulus führte. Daher wogen die Kontrolltiere an Tag -4 $27,6 \pm 1,7$ g und ZyA-behandelte Mäuse $26,0 \pm 1,9$ g. Der Effekt des ZyA auf das Mausgewicht spiegelte sich auch an Tag 1 und 2 nach MI wider. An Tag 2 wurde das niedrigste Gewicht gemessen. Es lag für PBS-behandelte Mäuse bei $25,7 \pm 2,1$ g und für ZyA-behandelte Mäuse bei $24,2 \pm 1,9$ g. Jedoch nahmen die ZyA-behandelten Mäuse deutlich besser zu und letztlich lag das Gewicht an Tag 28 signifikant erhöht gegenüber Tag 2 bei $28,3 \pm 1,8$ g. Für die Kontrollgruppe wurden an Tag 28 $28,6 \pm 2,6$ g gemessen. Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass Zymosan A zu einem größeren Infarkt führt und im weiteren Verlauf zu einem dilatierten linken Ventrikel, der eine geringere Ejektionsfraktion mit sich bringt. Jedoch waren die Tiere körperlich davon nicht beeinträchtigt und nahmen im Vergleich zu der Kontrollgruppe sogar besser zu.

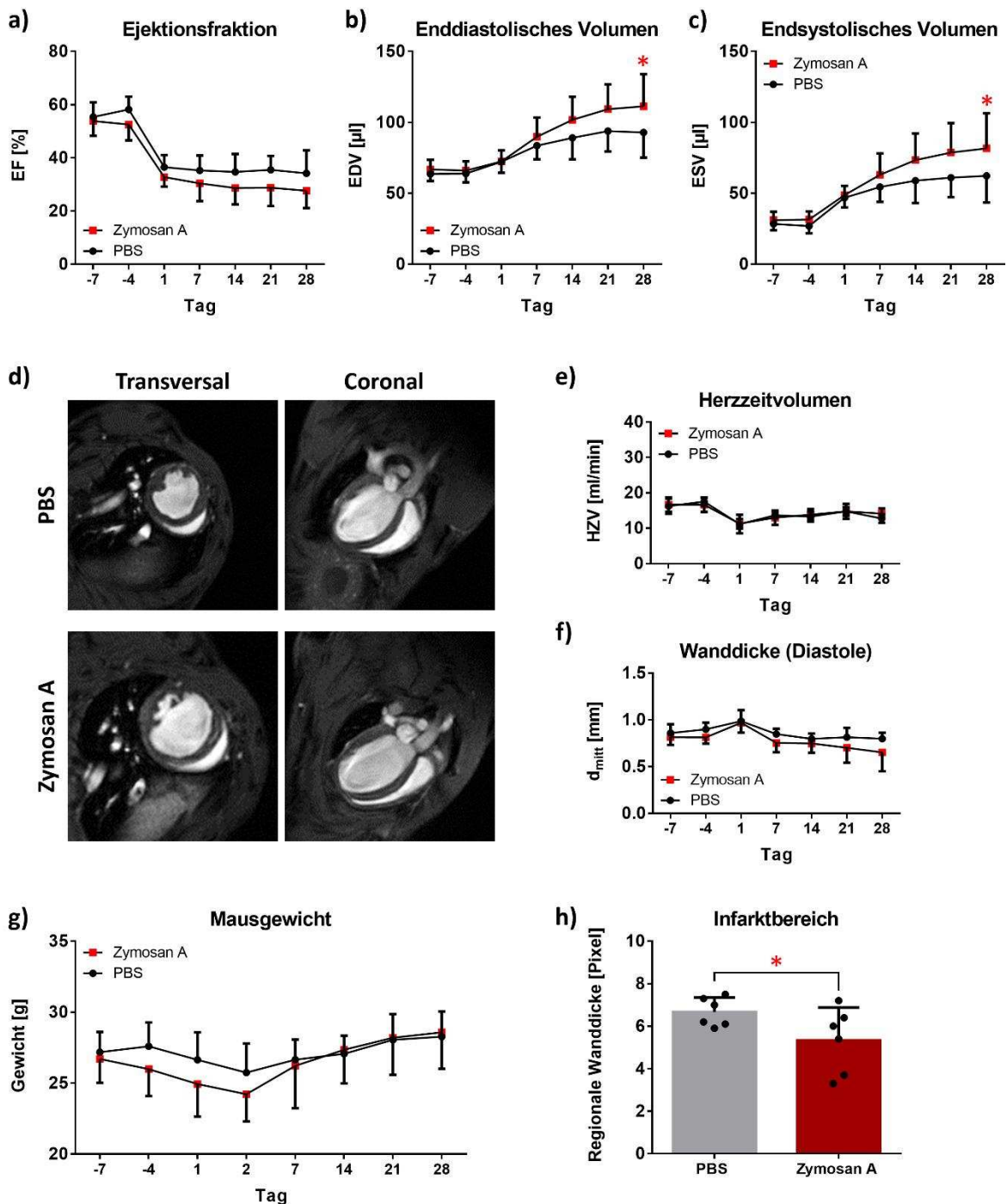
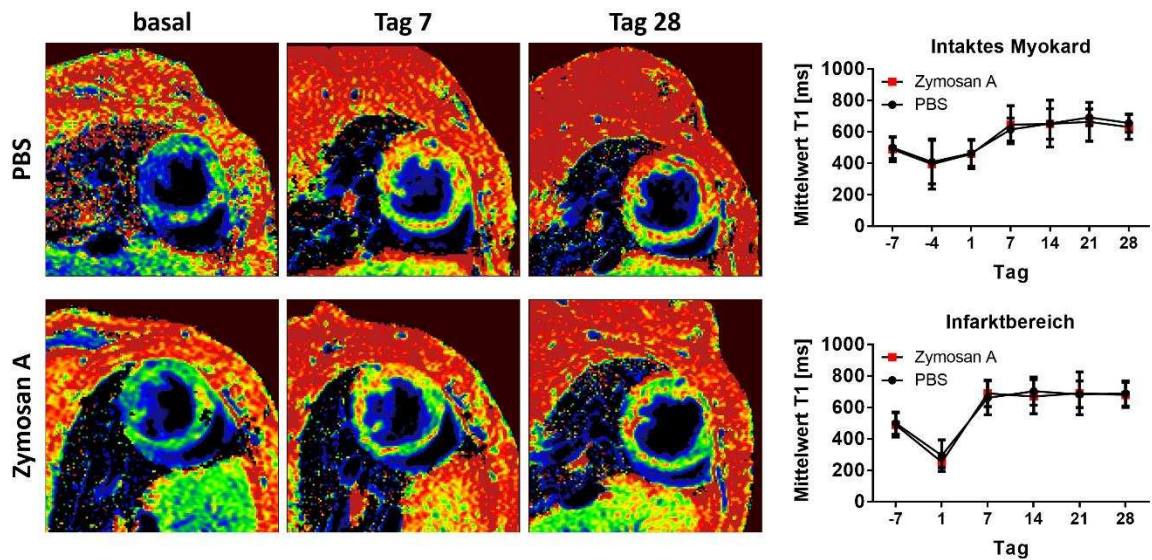


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf des Einflusses von Zymosan A auf die Herzfunktion und Heilung nach Myokardinfarkt (MI). Es wurden ^1H -MRT-Messungen des Herzes an Tag -7 (basal) und Tag -4 vor MI sowie an Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach MI durchgeführt. In dem Zusammenhang wurde die **a)** Ejektionsfraktion, das **b)** enddiastolische und **c)** endsystolische Volumen sowie das **e)** Herzzeitvolumen, die **f)** mittventrikuläre Wanddicke und die **h)** regionale Wanddicke des Infarktbereichs des linken Ventrikels während der Diastole an Tag 28 bestimmt. **d)** Gezeigt ist beispielhaft je ein Transversal- und Coronalschnitt des Herzes von PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag 28 nach MI. **g)** Dargestellt ist das Gewicht PBS- und ZyA-behandelter Mäuse über den gesamten Verlauf der Versuchsreihe. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Tag -7 - 1: $n = 13 - 15$; Tag 7 bis 28: $n = 6$. * = $p < 0,05$

5.13.2. Analyse der Fibrosierung und Ödembildung im Herzgewebe nach einem Myokardinfarkt

Neben der Herzfunktion wurden wie oben beschrieben auch die T1- und T2-Zeiten mittels sogenanntem T1- bzw. T2-*Mapping* ermittelt. Dabei geben verlängerte T1-Zeiten Aufschluss über irreversible Schäden des Myokards wie z.B. eine Myokardfibrose^{133,134}. Verlängerte T2-Zeiten deuten wiederum auf akute inflammatorische Prozesse hin und geben Hinweise auf ein Myokardödem^{135,136}. Das gesamte Myokard des linken Ventrikels wurde an Tag -7 (basal) und an Tag -4 ausgewertet. Nach Induktion des MI wurde der Infarktbereich getrennt von dem intakten Myokard analysiert. Die T1-Zeit lag basal bei ungefähr 494,4 ms und stieg an Tag 7 nach MI im Infarktbereich auf $660,5 \pm 107,6$ ms in der Kontrollgruppe und auf $689,1 \pm 83,4$ ms in ZyA-behandelten Mäusen an (Abb. 27 a)). Einen ähnlichen Effekt der T1-Zeiten sah man auch im nicht-infarzierten Bereich. Der niedrige Wert an Tag 1 nach MI kam durch das verabreichte Gadolinium für die LGE-¹H-MRT zustande, da Gadolinium die T1-Zeit verkürzt. Sowohl im intakten Myokard als auch im Infarktbereich veränderten sich die T1-Zeiten kaum über die Zeit. Somit wurde im Infarktbereich PBS-behandelter Mäuse an Tag 28 nach MI eine T1-Zeit von $688,5 \pm 80,1$ ms gemessen und in ZyA-behandelten Mäusen betrug die T1-Zeit $679,3 \pm 79,4$ ms. Das gleiche Ergebnis zeigte sich für die T2-Zeiten, die einen Basalwert von ungefähr 22,5 ms aufwiesen (Abb. 27 b)). An Tag 1 nach MI erhöhte sich die T2-Zeit im Infarktbereich und stieg bis Tag 7 nach MI auf $29,8 \pm 2,6$ ms in PBS-behandelten Mäusen sowie auf $31,1 \pm 4,0$ ms in ZyA-behandelten Mäusen an. Im weiteren Verlauf sank die T2-Zeit im Infarktbereich wieder leicht ab und lag an Tag 28 nach MI für die Kontrollgruppe bei $29,1 \pm 1,2$ ms und für ZyA-behandelte Mäuse bei $27,6 \pm 3,6$ ms. Für den nicht-infarzierten Bereich konnten ebenfalls keine großen Unterschiede nachgewiesen werden und die T2-Zeit lag an Tag 28 für beide Gruppen bei etwa 26,7 ms. In Abb. 27 a) und b) sind beispielhaft je „basal“ sowie an „Tag 7“ und „Tag 28“ nach MI sowohl T1- als auch T2-*Maps* der beiden Gruppen dargestellt. Auch visuell erkennt man keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen, ebenso wenig in der quantitativen Analyse.

a) T1-Mapping



b) T2-Mapping

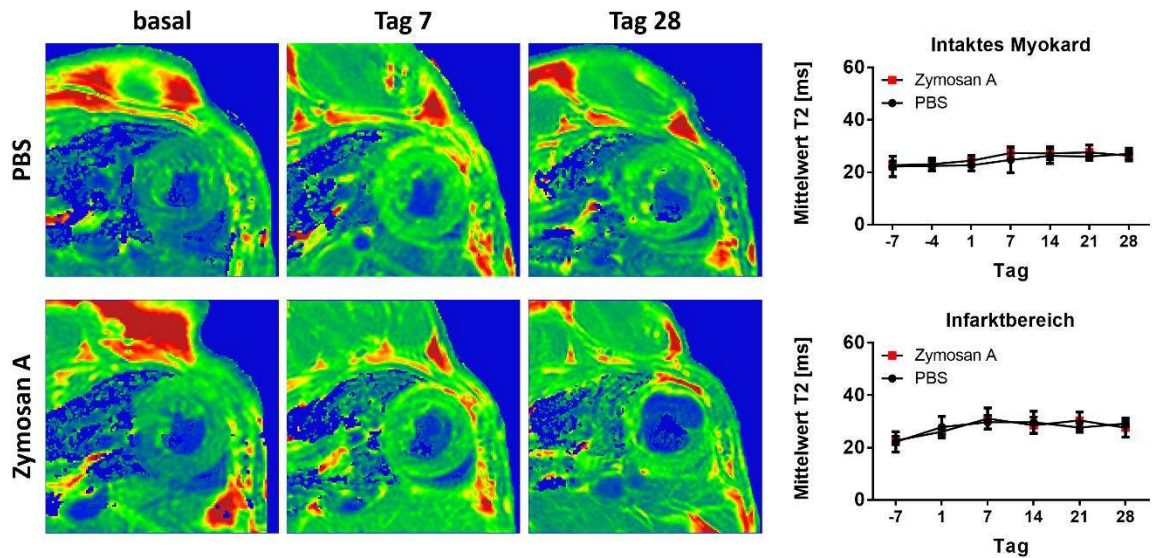


Abb. 27: T1- und T2-Mapping nach ZyA-Behandlung und Verlauf nach Induktion eines Myokardinfarkts (MI). a)/b) Dargestellt sind beispielhaft sowohl T1- als auch T2-Maps des Herzes von PBS- und ZyA-behandelten Mäusen an Tag -7 (basal) und an Tag 7 sowie Tag 28 nach MI. Rechts von den Bildern ist die Analyse der a) T1- bzw. b) T2-Zeiten gezeigt. Diese wurden sowohl für das nicht-infarzierte Myokard als auch den Infarktgebiet über fünf Wochen bestimmt. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; T1-Mapping: n = 6; T2-Mapping: n = 4 - 6.

5.13.2.1. Histologische Untersuchung des Herzes an Tag 28 nach Myokardinfarkt

Die angefertigten Herzschnitte von PBS- bzw. ZyA-behandelten Mäusen an Tag 28 nach MI wurden mit WGA (grün), Kollagen I (rot) und DAPI (blau) gefärbt. WGA färbt Zuckerreste und fibrotisches Gewebe an, wodurch der Kontrast zwischen der Infarktnarbe und dem gesunden Gewebe deutlich dargestellt werden kann. Daher gab die histologische Untersuchung des Herzes Aufschluss über die Größe der Infarktnarbe sowie die regionale Wanddicke im Infarktgebiet an Tag 28. Als Beispiel wurde die linksventrikuläre regionale Wanddicke einer PBS- und einer ZyA-behandelten Maus bestimmt. Die Analyse zeigte für ZyA-behandelte Mäuse eine deutlich schmalere Infarktnarbe, die mit einem dünneren linken Ventrikel einherging (Abb. 28 c)) und bereits mittels ^1H -MRT dargestellt werden konnte. Wie erwartet zeigte sich an Tag 28 eine starke Kollagen I (Col1A1)-Färbung, während kein Kollagen III (Col3A1) detektiert werden konnte. Daher wurde in der Abbildung nur die Ko-Färbung von DAPI/WGA/COL1A1 dargestellt (Abb. 28 a)/b)). Anhand der Col1A1-Färbung konnte visuell kein direkter Unterschied zwischen dem Kollagennetzwerk PBS- bzw. ZyA-behandelter Mäuse festgestellt werden. Entsprechend der Breite der Infarktnarbe wirkte das Kollagennetzwerk PBS-behandelter Mäuse fester und verzweigter. Mithilfe der DAPI-Färbung konnten sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen intakte Kardiomyozyten neben der Infarktnarbe detektiert werden.

Außerdem wurden wie zuvor die Milzen auch die Herzen gewogen, bevor sie an Tag 2 nach Myokardinfarkt (MI) für durchflusszytometrische Messungen verwendet bzw. an Tag 28 nach MI für die histologischen Untersuchungen eingebettet wurden. An Tag 2 nach MI konnten keine Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 28 d)). Im Gegensatz dazu waren die Herzen ZyA-behandelter Mäuse an Tag 28 signifikant schwerer als die Herzen der Kontrollgruppe (Abb. 28 e)).

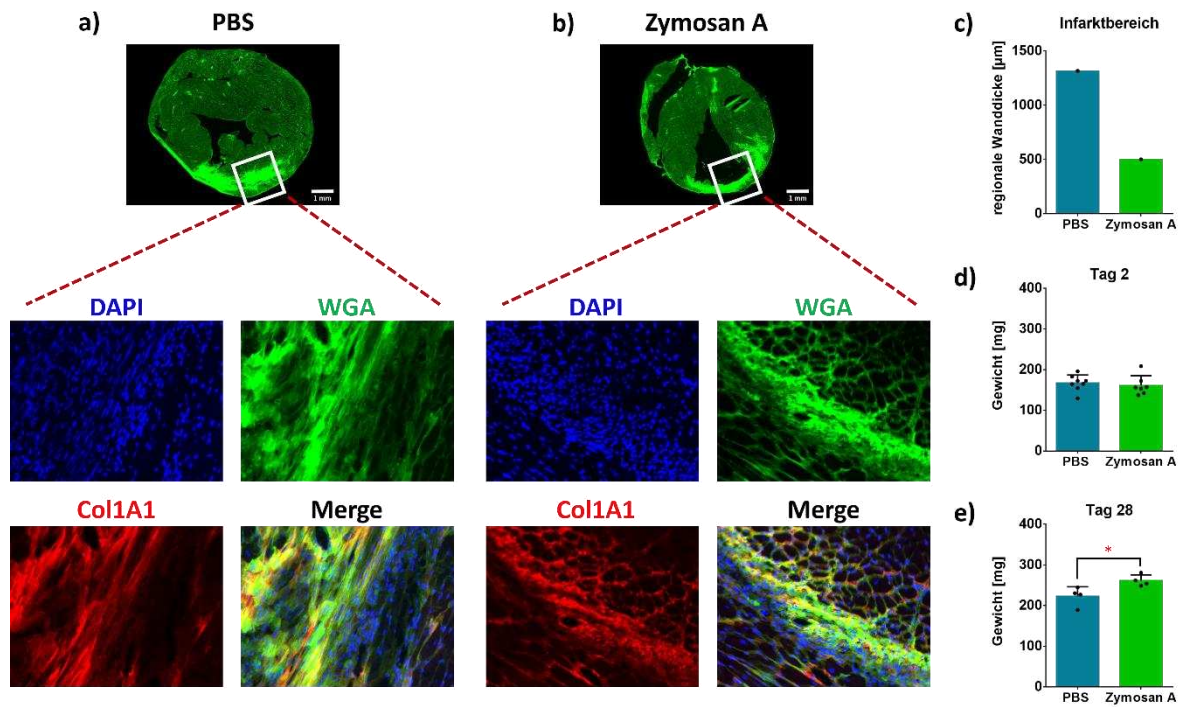


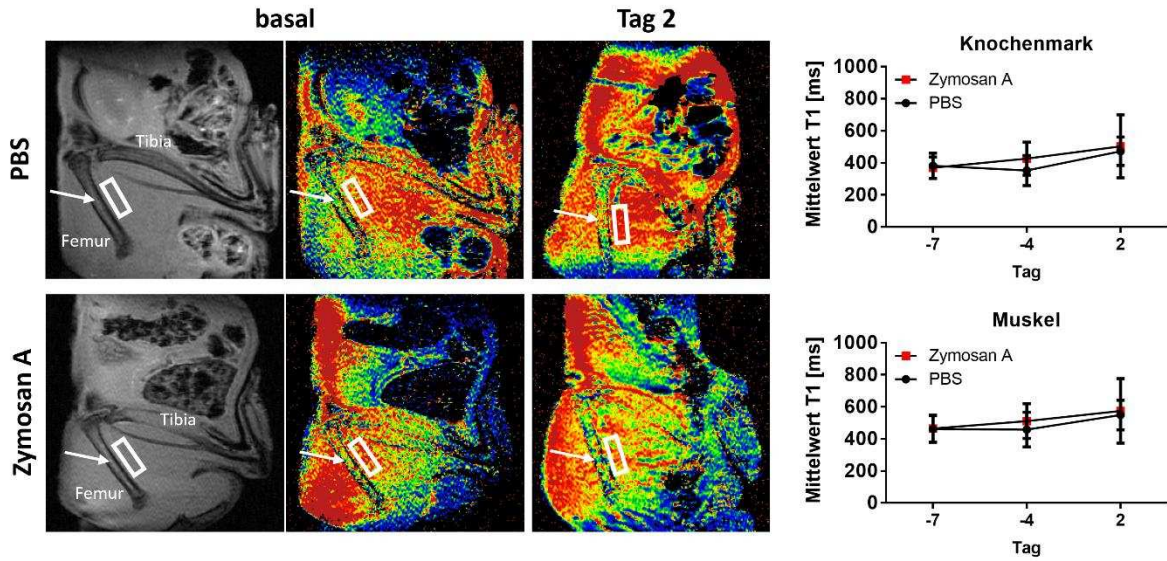
Abb. 28: Histologische Untersuchung und Gewicht des Herzes von PBS- bzw. ZYA-behandelten Mäusen. Ko-Färbung von DAPI (blau), WGA (grün) und Kollagen I (Col1A1; rot) an Herzschnitten von **a)** PBS- bzw. **b)** ZYA-behandelten Mäusen an Tag 28 nach MI. Oben: MIA (*multiple image alignment*)-Aufnahme mit 100-facher Vergrößerung der WGA-Färbung eines Herzes, das Narbengewebe und normales Gewebe zeigt. Der weiße Kasten umrandet den Bereich der Infarktnarbe, der für die folgende 200-fache Vergrößerung ausgewählt wurde. Unten: 200-fache Vergrößerung eines mit DAPI/WGA/Col1A1-gefärbten Herzes. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau), das Narbengewebe sowie gesundes Gewebe mit WGA (grün) und Kollagen I mit Col1A1 (rot) angefärbt. Jede Färbung wird einzeln und als eine Überlagerung (Merge) gezeigt. **c)** Quantitative Auswertung der regionalen Wanddicke im Infarktbereich eines Herzes nach PBS- bzw. ZYA-Behandlung an Tag 28 nach MI. **d)** und **e)** zeigen das Herzgewicht PBS- bzw. ZYA-behandelter Mäuse an Tag 2 sowie Tag 28 nach MI. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; Herz-Histologie: Tag 28: $n = 1$, Herzgewicht: Tag 2: $n = 7 - 8$; Tag 28: $n = 4$. * = $p < 0,05$

5.13.3. Verlauf einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung nach ZyA-Behandlung

Nachdem der Einfluss von Zymosan A auf die Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt untersucht wurde, folgte die Analyse des Verlaufs einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung nach ZyA-Behandlung. Um den alleinigen Effekt von ZyA zu untersuchen, wurden die T1- und T2-Zeiten des Knochenmarks an Tag -7 (basal) und Tag -4 vor zweitem Stimulus sowie anschließend an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation gemessen. Daraufhin folgten die Messungen der T1- und T2-Zeiten im Entzündungsherd – in diesem Fall dem Matrigel – über vier Wochen. Nach der letzten Messung an Tag 28 wurden die Mäuse getötet und die Immunzellzahl im Matrigel mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Das T1- und T2-*Mapping* erfolgte wie die ^{19}F -MRT im Knochenmark des Femurs. Des Weiteren wurden die T1- und T2-Zeiten im Oberschenkelmuskel bestimmt. Insgesamt gesehen zeigten sich keine auffälligen Unterschiede zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen (Abb. 29). Die basale T1-Zeit lag im Knochenmark im Durchschnitt bei 375,2 ms und im Muskel bei 463,2 ms (Abb. 29 a), rechts). Sowohl im Knochenmark als auch im Muskel stieg die T1-Zeit nach ZyA-Behandlung im Gegensatz zu der Kontrollgruppe leicht an. An Tag 2 nach Induktion eines zweiten Stimulus erreichte die T1-Zeit der beiden Gruppen wieder einen ähnlichen Wert. Für ZyA-behandelte Mäuse betrug die T1-Zeit an Tag 2 im Knochenmark $502,7 \pm 196,4$ ms und für PBS-behandelte Mäuse $471,8 \pm 88,8$ ms. Der gleiche Effekt zeigte sich auch im Oberschenkelmuskel. Für die T2-Zeiten wurde im Knochenmark ein Basalwert von ungefähr 22,7 ms und im Muskel von etwa 28,6 ms gemessen (Abb. 29 b), rechts). Die ZyA-Behandlung zeigte keine Wirkung auf die T2-Zeit im Knochenmark oder im Muskel und so waren die Werte an Tag -4 ähnlich zu dem Basalwert. Anders sah es an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation aus. Im Muskel sanken die T2-Zeiten sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen leicht ab. Dagegen stieg die T2-Zeit im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse auf $23,9 \pm 2,2$ ms an und reduzierte sich in Kontrolltieren auf $21,4 \pm 1,8$ ms. Insgesamt zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Auch die T1- bzw. T2-*Maps* ließen visuell auf keine Differenzen zwischen PBS- und ZyA-behandelten Mäusen schließen (Abb. 29 a)/b), links).

a) T1-Mapping



b) T2-Mapping

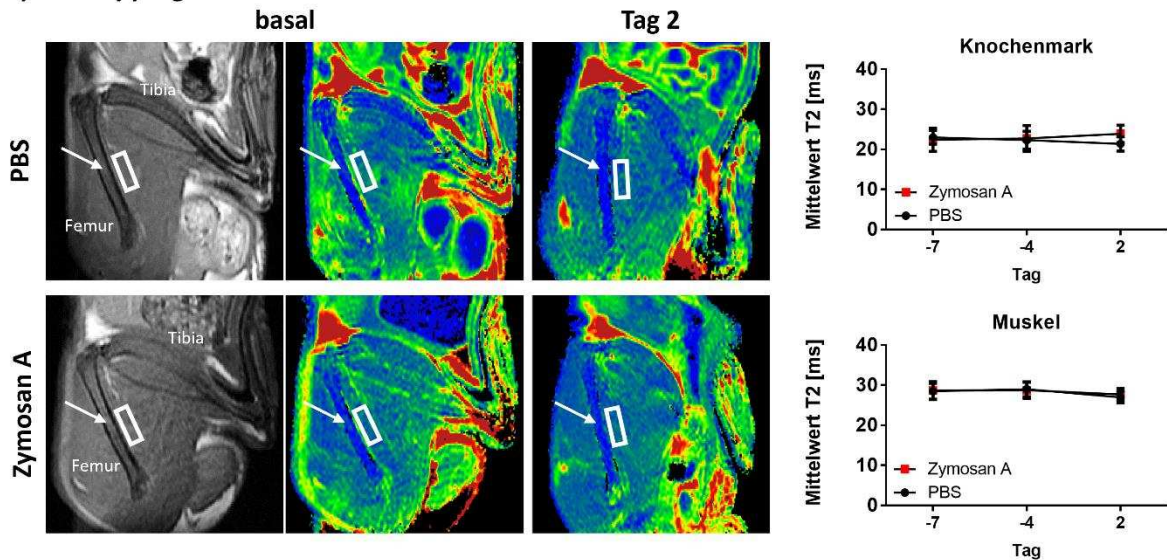


Abb. 29: Einfluss von Zymosan A und einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung auf die T1- und T2-Zeiten des Knochenmarks. An Tag -7 (basal) und Tag -4 vor sowie an Tag 2 nach Matrigel/LPS-Implantation erfolgte das **a) T1-** bzw. **b) T2-Mapping** im Knochenmark des Femurs sowie im Oberschenkelmuskel PBS- und ZyA-behandelter Mäuse. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der **a) T1-** bzw. **b) T2-Zeiten** (rechts) sowie eine ^1H -Aufnahme mit passender T1- bzw. T2-Map (links) an Tag -7 (basal) und einer entsprechenden T1- bzw. T2-Map an Tag 2 nach zweitem Stimulus. Weiße Pfeile zeigen auf das Knochenmark des Femurs. Weiße Rechtecke markieren den ausgewerteten Bereich des Muskels. Die Daten wurden für beide Hinterbeine analysiert und der Mittelwert gebildet. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n = 8$.

5.13.4. Untersuchung der Fibrosierung und Ödembildung im Matrigel

Die Analysen der T1- und T2-Zeiten des Knochenmarks gaben Auskunft über den direkten Einfluss von Zymosan A sowie den Einfluss von ZyA in Kombination mit einem folgenden zweiten Stimulus. Weiterführend wurden die T1- und T2-Zeiten im Matrigel selbst über vier Wochen hinweg gemessen, um den möglichen Einfluss von Zymosan A auf den Entzündungsverlauf zu untersuchen. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied im Entzündungsherd zwischen den beiden Versuchsgruppen sowohl in den T1- als auch in den T2-Zeiten detektiert werden (Abb. 30 a)). Die T2-Zeit nahm im Laufe der Wochen in beiden Gruppen leicht ab, wobei angemerkt werden muss, dass die Probandenzahl an Tag 28 für ZyA-behandelte Mäuse nur bei zwei und in der Kontrollgruppe bei drei lag. An Tag 2 betrug die T2-Zeit in PBS-behandelten Mäusen $87,3 \pm 6,7$ ms, während sie in ZyA-behandelten Mäusen bei $83,0 \pm 9,0$ ms lag. Nach vier Wochen waren die T2-Zeiten in beiden Gruppen um 10 ms reduziert. Im Gegensatz dazu war die T1-Zeit an Tag 28 sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen leicht erhöht. Sie stieg von $1172,2 \pm 354,8$ ms auf $2444,0 \pm 630,0$ ms für PBS-behandelte Mäuse und von $1538,9 \pm 531,1$ ms auf $2114,8 \pm 520,2$ ms für ZyA-behandelte Mäuse an. Ergänzend zu den T1- und T2-Zeiten wurde auch die Anzahl infiltrierter Immunzellen im Matrigel an Tag 28 bestimmt (Abb. 30 c)). Dabei zeigte sich ein ähnlicher Trend wie bei den analysierten Matrigelen an Tag 2 nach zweitem Stimulus (Abb. 13 a)). Auch an Tag 28 war die Anzahl neutrophiler Granulozyten (NG, $p = 0,199$) in ZyA-behandelten Mäusen leicht erhöht. Des Weiteren konnte auch eine tendenziell höhere Anzahl klassischer Monozyten (KM, $p = 0,103$) detektiert werden, während die Makrophagenanzahl (M_{ϕ}) in beiden Gruppen gleich war. Es wurden auch in diesem Fall die Mäuse nach allen MRT-Messungen gewogen, wobei sich zeigte, dass die Behandlung mit Zymosan A zu einer Gewichtsreduktion führte und an Tag 2 nach Induktion eines zweiten Stimulus das niedrigste Gewicht erreichte (Abb. 30 b)). Jedoch erholten sich die ZyA-behandelten Mäuse tendenziell besser als die Kontrolltiere und das Gewicht stieg von Tag 2 ($24,3 \pm 1,8$ g) bis Tag 28 ($27,5 \pm 0,7$ g) an.

a) T1-/T2-Mapping

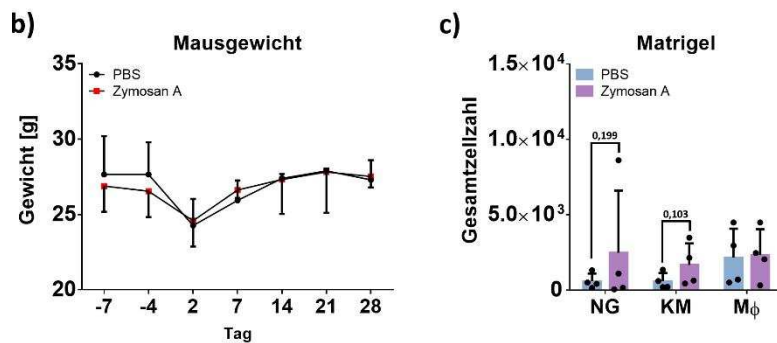
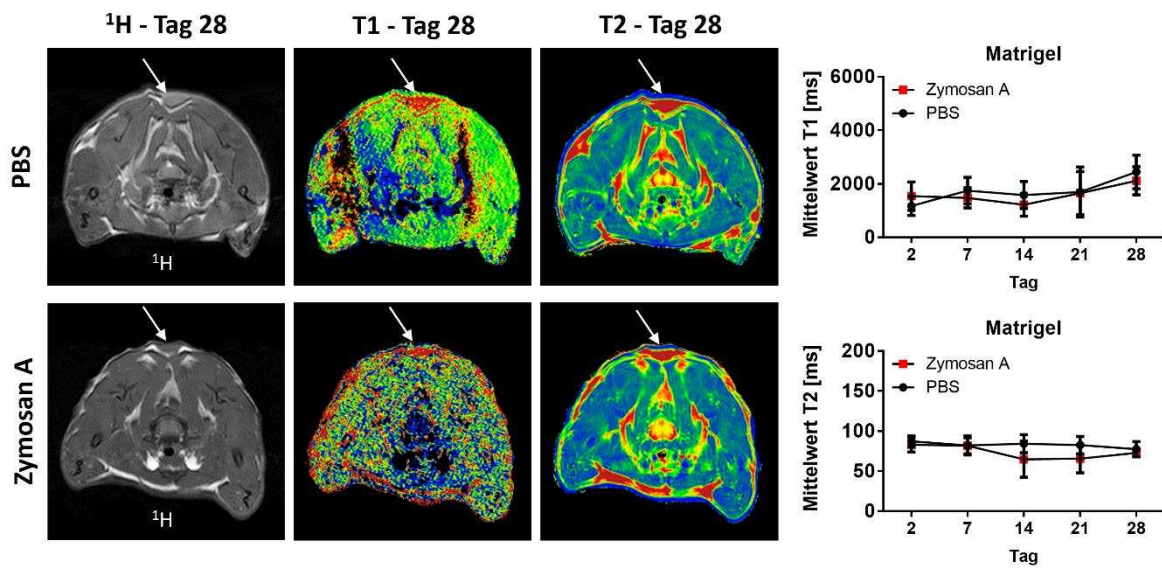


Abb. 30: Analyse des Verlaufs einer LPS-induzierten subkutanen Entzündung nach ZyA-Behandlung mittels T1- und T2-Mapping. a) Aufgeführt ist die quantitative Auswertung (rechts) der T1- bzw. T2-Zeiten PBS- und ZyA-behandelter Mäuse an Tag 2, Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 nach Matrigel/LPS-Implantation. Beispielhaft ist eine ^1H -Aufnahme des Transversalschnitts eines Matrigels (weißer Pfeil) an Tag 28 mit der entsprechenden T1- bzw. T2-Map für eine PBS- und eine ZyA-behandelte Maus dargestellt. b) Gezeigt ist das Mausgewicht über den gesamten Verlauf der Behandlung. c) Durchflusszytometrische Analyse der Immunzellzahlen im Matrigel an Tag 28. Detektiert wurden neutrophile Granulozyten (NG), klassische Monozyten (KM) und Makrophagen (M_ϕ). Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; a) $n = 2 - 6$; b) $n = 2 - 14$; c) $n = 4$.

6. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland⁵. An erster Stelle stehen dabei chronische ischämische Herzkrankheiten, dicht gefolgt von dem akuten Myokardinfarkt (MI)⁶. Durch die verbesserte Akutversorgung, z.B. durch die perkutane Koronarintervention (PCI), wurde die frühe Mortalität des MI bereits stark reduziert¹³⁷. Jedoch entwickelt eine nicht unerhebliche Anzahl Menschen nach MI eine progressive Herzinsuffizienz, deren Hintergründe bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnten¹³⁸. Es gibt allerdings Hinweise, dass ein immunologisches Ungleichgewicht im angeborenen Immunsystem mit einer verstärkten proinflammatorischen Reaktion daran beteiligt ist. Denn sowohl die Größe des Infarktbereichs als auch die Heilung nach einem MI werden maßgeblich durch das Zusammenspiel von Immunzellen der angeborenen Immunantwort geprägt⁶⁷. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass neben T- und B-Zellen auch z.B. Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder natürliche Killerzellen ein immunologisches Gedächtnis ausbilden können, welches auf epigenetischen sowie metabolischen Veränderungen basiert⁶⁸. Bei Restimulation zeigen diese Immunzellen eine langfristig verstärkte Reaktion, was als *Trained innate immunity* (TII) bezeichnet wird. Der in den Zellen ausgelöste TII-Phänotyp kann die Immunantwort gegen pathogene Erreger unterstützen, aber auf der anderen Seite die Entstehung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen fördern⁷⁴. Obwohl es aussagekräftige Hinweise und Belege dafür gibt, dass TII die Atherosklerose verstärken kann^{71,79}, ist bisher nicht untersucht worden, welchen Einfluss TII auf einen MI nimmt. Aufgrund dessen war es von Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss ein veränderter angeborener Immunstatus (*Trained innate immunity*) auf die Immunzellinfiltration und die sich anschließende Entzündungs- und Heilungsphase nach einem MI hat.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass durch die intraperitoneale Injektion von Zymosan A (ZyA) ein TII-Phänotyp induziert werden konnte, der primär durch eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten und klassischer Monozyten im Blut, in der Milz und im Knochenmark geprägt war. Dieser führte im Vergleich zu der PBS-behandelten Kontrollgruppe zu einem größeren Myokardinfarkt mit niedriger Ejektionsfraktion und zeigte im Verlauf über vier Wochen eine verschlechterte Heilung. Letztere spiegelte sich in einem erhöhten enddiastolischen sowie endsystolischen Volumen und einem dilatierten linken Ventrikel mit dünner Infarktnarbe wider. Es zeigte sich an Tag 2 nach MI im Herz keine erhöhte Anzahl proinflammatorischer Immunzellen, die den größeren MI erklären konnte. Interessanterweise konnten eine verschlechterte Endozytosekapazität bzw. PFC-Aufnahme von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten im Blut, in der Milz und im Knochenmark detektiert werden, die sich auch in einem

geringeren ¹⁹F-Signal im infarzierten Myokard widerspiegeln. Dies könnte wiederum auf eine verminderte Efferozytose durch Makrophagen hindeuten, die grundsätzlich zu einer verschlechterten Heilung nach MI beitragen kann.

Ein TII-Phänotyp kann sowohl durch exogene (z.B. Bakterien, Viren, Pilze) als auch endogene (z.B. oxLDL, Hormone, Harnsäure) Faktoren⁶⁹, aber auch durch körperliche Bewegung⁸², Ernährungsweisen^{73,139,140} oder Vorerkrankungen^{141,142} ausgelöst werden. Dabei werden neben Monozyten oder Makrophagen auch neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen, aber auch Stroma- und Epithelzellen epigenetisch sowie metabolisch verändert, wodurch ein proinflammatorisch geprägter TII-Phänotyp entsteht^{68,70,143}. Durch die Vielfalt an Zellen, die ein inflammatorisches Gedächtnis ausbilden können, wird auch die Bandbreite an klinischen Szenarien größer, die häufig mit TII in Verbindung gebracht werden. Diese beschränken sich nicht nur auf Infektionskrankheiten oder Krebs, sondern auch kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Atherosklerose)⁷¹, neurodegenerative Erkrankungen^{144,145} oder die Abstoßung von Organtransplantaten¹⁴⁶ werden im TII-Zusammenhang untersucht. Der Einfluss eines TII-Phänotyps wurde bereits in verschiedenen Modellen kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. der Atherosklerose⁷¹, dem Schlaganfall⁷³ oder abdominalen Aortenaneurysmen⁷² analysiert. Schädliche Auswirkungen zeigten sich dabei sowohl auf die Entstehung als auch auf den Verlauf dieser Krankheiten⁷⁴. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang häufig nur der Einfluss von bereits bekannten Faktoren, die kardiovaskuläre Erkrankungen auslösen wie z.B. oxLDL⁷⁹, Hypercholesterinämie¹⁴¹ oder Hyperglykämie¹⁴², als erster Stimulus für die Induktion eines TII-Phänotyps eingesetzt⁷⁴. Eine Ausnahme stellte die Analyse der Wirkung einer BCG-Impfung auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques dar, um eine Verbindung zwischen Infektionskrankheiten, die einen TII-Phänotyp auslösen, und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen zu schaffen¹⁴⁷. Es ist bekannt, dass sich verschiedene Infektionen wie z.B. Virus- oder Protozoeninfektionen sowie bakterielle und mykotische Infektionen auf das kardiovaskuläre System auswirken und an der Schädigungen des Herzes wie z.B. bei einer infektiösen Endokarditis beteiligt sind^{148,149}. Dabei ist nicht auszuschließen, dass der negative Effekt von Infektionskrankheiten auf die Entstehung und Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen durch einen TII-Phänotyp ausgelöst oder verschlechtert wird. Unter diesen Umständen wäre es von Interesse zu erfahren, welche Immunzellen primär durch z.B. Pilzliganden stimuliert und welche physiologischen Eigenschaften dadurch verändert werden. Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf der Induktion eines TII-Phänotyps mit Zymosan A (ZyA), einem Hefezellwandbestandteil¹⁵⁰, und dessen Bedeutung für die Entwicklung und Heilung nach einem MI.

6.1. Induktion eines TII-Phänotyps mit Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Induktion eines TII-Phänotyps wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits in diversen Krankheitsmodellen mit verschiedenen Stimuli durchgeführt^{68,74,151,152}. Häufig wurde β -Glucan, ein β -D-Glucose-Polysaccharid, eingesetzt, das über seine β -1,3/1,6-glykosidischen-Bindungen an verschiedene Rezeptoren (z.B. Dectin-1, TLR2) auf der Zelloberfläche von Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen oder neutrophilen Granulozyten binden kann und darüber die Zellen aktiviert^{94,95}. Es gibt strukturell unterschiedlich aufgebaute β -Glucan-Varianten (z.B. aus *Candida albicans*, *Hordeum vulgare*, *Saccharomyces cerevisiae*), die bereits genutzt wurden, um den Effekt der TII vor allem auf Infektionskrankheiten oder Tumore zu analysieren^{68,83-85,87,91,104-108,150,151}. Interessanterweise wurden im Zusammenhang mit der Untersuchung eines TII-Phänotyps und dessen Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen vor allem endogene Stimuli (z.B. oxLDL)⁷⁹, Vorerkrankungen (z.B. Hypercholesterinämie, Hyperglykämie)^{141,142} oder Ernährungsweisen (z.B. *high-fat diet*, *high salt*)^{73,139,140} als erster Stimulus verwendet. Es ist bereits bekannt, dass das angeborene Immunsystem sowohl an der akuten Entzündung als auch der Heilungsreaktion nach MI beteiligt ist⁶⁷. Daher ist davon auszugehen, dass die Modulation des angeborenen Immunsystems durch die Induktion eines TII-Phänotyps sowohl die Entzündungs- als auch Heilungsphase beeinflusst. Hinweise darauf, dass die Veränderung der angeborenen Immunantwort eine Bedeutung für die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen hat, kommt wie oben beschrieben durch den Einfluss von Infektionskrankheiten wie z.B. bei der infektiösen Endokarditis^{148,149}. Daher wurde in dieser Arbeit der Hefezellwandbestandteil ZyA für die Induktion eines TII-Phänotyps eingesetzt und im Folgenden dessen Wirkung auf einen MI untersucht.

Um einen TII-Phänotyp zu induzieren, wurde den Mäusen, wie bereits in mehreren anderen Studien beschrieben, zu zwei Zeitpunkten (Tag -7 und -4) je 1 mg ZyA gelöst in 100 μ l PBS i.p. injiziert^{88,105-109}. Dabei ist zu beachten, dass ZyA wasserunlöslich und dessen Molekulargewicht nur schwer zu bestimmen ist. Daher sind gewisse Abweichungen der injizierten ZyA-Menge, die Einfluss auf die Ausprägung der Entzündungsreaktion nehmen können, nicht auszuschließen¹⁵⁵. Die ZyA-Behandlung löste in der Maus eine systemische Entzündungsreaktion aus, die mittels durchflusszytometrischer Messungen von Immunzellen aus dem Blut, der Milz und dem Knochenmark an Tag 0 detektiert wurde (Abb. 8). Die Wirkung des Stimulus beschränkte sich dabei nur auf das angeborene Immunsystem und war durch eine vermehrte Immunzellzahl von neutrophilen Granulozyten sowie klassischen Monozyten gekennzeichnet, die sich auch in einem erhöhten Milzgewicht widerspiegeln (Abb. 25 a)). Zusätzlich zeigte die *in vitro* Inkubation von Immunzellen aus dem Knochenmark und der Milz mit fluoreszenzmarkiertem ZyA (^{AF488}ZyA) eine

deutliche Bindung/Aufnahme durch klassische Monozyten sowie neutrophile Granulozyten, während für T- und B-Zellen weder Veränderungen der Zellzahl noch eine deutliche ZyA-Aufnahme detektiert wurden (Abb. 19). Insgesamt konnten erhöhte Zellzahlen nur bei reifen Immunzellen des angeborenen Immunsystems gemessen werden und es kam zu keiner überschießenden Reaktion von Stamm- und Vorläuferzellen. Dies spricht dafür, dass das angeborene Immunsystem stimuliert wurde, es jedoch zu keiner gravierenden systemischen Reaktion kam, die den Gesamtzustand der Maus verschlechterte (Abb. 9). Diese Ergebnisse passen zu vorherigen Studien, die ebenfalls nach der Stimulation mit ZyA aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Candida albicans* und vor Induktion des zweiten Stimulus erhöhte Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten sowie intermediären und nicht-klassischen Monozyten in der Milz, im Knochenmark bzw. im Blut detektiert haben^{106,108}.

Für diese Arbeit wurde als erster Stimulus ZyA aus *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, das zu 73 % aus sich wiederholenden unlöslichen β -Glucan-Verbindungen aufgebaut ist^{150,155}. Wichtig war zu beachten, dass ZyA in der richtigen Dosis eingesetzt wurde, um einen TII-Phänotyp im Mausmodell zu induzieren und nicht eine Peritonitis auszulösen. Eine hohe intraperitoneale ZyA-Dosis (0,5 - 1,0 mg/g Körpergewicht) wird als Modell für Multiorganversagen eingesetzt, das in Folge toxischer oder ischämischer Parenchymschädigungen auftritt. Erste Anzeichen der Zymosan-induzierten systemischen Entzündung (ZIGI) sind gesträubtes Fell, Durchfall, lethargisches Verhalten und eine Reduktion des Körpergewichts¹⁵⁶. Außerdem wurden eine schnelle und anhaltende Verringerung der ventrikulären kontraktilen Funktion sowie eine Verlangsamung der ventrikulären Erregungsleitung festgestellt¹⁵⁷. Insgesamt liegt die Mortalitätsrate des ZIGI-Modells in den ersten zwei Tagen bei 10 - 35 %¹⁵⁶. All diese Faktoren wurden im Zusammenhang mit der Versuchsdurchführung in dieser Arbeit nicht festgestellt. Daher handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um einen induzierten TII-Phänotyp und nicht um das ZIGI-Modell, da es neben erhöhten Zellzahlen lediglich zu einer leichten Abnahme des Körpergewichts kam, was jedoch zu keiner verstärkten Mortalitätsrate führte. Außerdem wurde eine gleichbleibende Herzfunktion gemessen, die mittels ¹H-MRT an Tag -7 (basal) und Tag -4 ermittelt wurde (Abb. 26). Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Nachweis, dass es sich um einen TII-Phänotyp handelt, sind epigenetische und metabolische Veränderungen. Durch eine TII-induzierte Histonacetylierung oder -methylierung kommt es an Histon H3K4 zu einer offenen Chromatinkonformation an Promotoren und Enhancern von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6 oder IFN- γ . Außerdem sind eine erhöhte Glykolyse und Laktatproduktion von z.B. Monozyten/Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten ebenfalls charakteristisch für den TII-Phänotyp⁶⁸.

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass die ZyA-Behandlung zu einem TII-Phänotyp geführt hat und aufgrund dessen weitere Versuche durchgeführt werden konnten. Jedoch sollten in Zukunft für eine vertiefte Verifizierung des TII-Phänotyps epigenetische und metabolische Analysen durchgeführt werden.

6.2. Der TII-Phänotyp führt zu einem größeren Myokardinfarkt und einer verschlechterten Heilung

Nachdem der TII-Phänotyp wie oben beschrieben durch die ZyA-Behandlung induziert wurde, folgte an Tag 0 die Induktion eines Myokardinfarkts (MI) durch eine 50-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion. Es wurden die Infarktgröße sowie die Ejektionsfraktion an Tag 1 nach MI mittels ^1H -MRT bestimmt. Dabei zeigte sich bei ZyA-behandelten Mäusen ein signifikant größerer Infarktbereich mit einer verschlechterten Ejektionsfraktion (Abb. 10 a)). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ZyA-behandelte Mäuse ein proinflammatorisch geprägtes angeborenes Immunsystem besitzen und es dadurch direkt nach der Induktion des MI zu einer verstärkten Entzündungsreaktion gekommen ist⁶⁷. Des Weiteren wurden über die Zeit von 28 Tagen Herzfunktionsmessungen durchgeführt, die eine stetige Zunahme des enddiastolischen und endsystolischen Volumens und damit einhergehend eine verschlechterte Ejektionsfraktion ZyA-behandelter Tiere zeigten. Letztendlich konnte an Tag 28 nach MI ein dünneres Myokard im Infarktbereich und ein dilatierter linker Ventrikel ZyA-behandelter Mäuse gegenüber Kontrollmäusen gemessen werden (Abb. 26). Diese Ergebnisse wurden durch histologische Untersuchungen bestätigt, die ebenfalls eine deutlich dünnere Infarktnarbe einer ZyA-behandelten Maus zeigten (Abb. 28).

Es wurde bereits in diversen Studien beschrieben, dass eine überschießende bzw. nicht-abklingende Entzündung zu einem größeren Infarkt und dadurch zu einem nachteiligen Umbau des linken Ventrikels führen kann, woraus häufig eine Herzinsuffizienz resultiert^{67,158,159}. Dabei tragen Monozyten, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten zur Entstehung einer Herzinsuffizienz bei, indem sie z.B. Fibroblasten aktivieren und aufgrund dessen die interstitielle Myokardfibrose fördern, die ventrikuläre Dilatation durch Proteolyse der Kollagenmatrix erleichtern (ungünstiger linksventrikulärer Umbau) oder intakte Kardiomyozyten durch die Sekretion proapoptotischer Faktoren schädigen^{158,160}. Auch eine defekte Efferozytose kann durch die Erzeugung einer postapoptotischen Nekrose eine chronische sowie nicht-abklingende Entzündung auslösen. Dies wurde bereits in Modellen der Atherosklerose oder auch dem MI gezeigt und führte über die Zeit zu einer Herzinsuffizienz^{62–64}. In diesem Zusammenhang lässt die dünnere

Infarktnarbe darauf schließen, dass der Matrixumbau durch die ZyA-Behandlung negativ beeinflusst wurde. Jedoch konnte über das durchgeführte T1-Mapping kein genereller Unterschied in der Fibrosierung des Myokards zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert werden (Abb. 27). Ein veränderter Matrixumbau spricht ebenso für eine verstärkte Entzündungsreaktion, die z.B. durch eine verminderte/eingeschränkte Efferozytose oder eine vermehrte bzw. anhaltende Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen ausgelöst werden kann. Physiologisch betrachtet beschreibt die Efferozytose das Aufräumen von apoptotischen Zellen durch phagozytische Zellen und ist daher essentiell für die Beseitigung von nekrotischen Kardiomyozyten und im weiteren Verlauf apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen im infarzierten Myokard^{58,59,66}. Die Apoptose von neutrophilen Granulozyten selbst fördert die Polarisation von inflammatorischen Makrophagen in Richtung eines reparativen Phänotyps, der unter anderem durch eine gesteigerte Efferozytose geprägt ist¹⁶¹. Das bedeutet, dass, wenn die Efferozytoseeigenschaften der Makrophagen durch die ZyA-Behandlung gehemmt sind und/oder es zusätzlich zu keinem rechtzeitigen Wechsel pro- zu antiinflammatorisch geprägter neutrophiler Granulozyten kommt, die Entzündungsreaktion weiterhin abläuft und nicht vollständig reguliert wird. Aufgrund dessen wurden Immunzellen aus dem Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse isoliert und *in vitro* mit fluoreszenzmarkierten *E. coli*- und Dextran-Partikeln (10 kDa) in Bezug auf ihre Phagozytose- bzw. Pinozytosekapazität untersucht. Interessanterweise zeigten Makrophagen ZyA-behandelter Mäuse eine signifikant reduzierte *E. coli*- sowie Dextran-Aufnahme (Abb. 21). Diese Ergebnisse könnten auch auf eine verringerte Efferozytose von ZyA-behandelten Makrophagen im Myokard hindeuten. Dementgegen waren die Endozytoseeigenschaften von Immunzellen aus dem Knochenmark nach ZyA-Behandlung und zusätzlichem zweiten Stimulus (Matrigel/LPS) mit PBS-behandelten Mäusen gleich und es müsste weiterführend untersucht werden, inwiefern sich die Endozytoseeigenschaften von isolierten Makrophagen aus dem infarzierten Herz nach ZyA-Behandlung von den Kontrolltieren unterscheiden. Außerdem könnte die Efferozytose gezielt analysiert werden, indem isolierte Makrophagen aus dem Herz mit apoptotischen neutrophilen Granulozyten inkubiert werden und deren Phagozytose gemessen wird. Aufgrund einer veränderten Efferozytose, keinem Wechsel von pro- zu antiinflammatorisch geprägten Immunzellen und einer anhaltenden Entzündungsreaktion kann es auch zu einer weiterhin erhöhten Ausschüttung von den Gelatinasen MMP-2 und -9 kommen, die unter anderem von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert werden. Sowohl MMP-2 als auch -9 sind für die Spaltung von Kollagen, Fibronectin, Elastin und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix verantwortlich, wodurch weitere inflammatorische Immunzellen (z.B. Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten) in das infarzierte Myokard rekrutiert werden^{162,163}. Die daraus resultierende Entzündung und Zerstörung der Basalmembranstruktur

kann zu einem pathologischen linksventrikulären Umbau führen, wenn die MMPs nicht rechtzeitig durch TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) gehemmt werden. Ein zusätzlicher interessanter Punkt ist, dass MMP-9 auch weitere intrazelluläre Proteine wie z.B. Annexin 1 abbaut und dadurch die Apoptose von neutrophilen Granulozyten vermindert, wodurch die Entzündungsreaktion verlängert wird^{42,163,164}. Festzuhalten ist, dass bereits in einem *in vitro*-Modell mit oxLDL-trainierten und TLR2/TLR4-Ligand-restimulierten Makrophagen erhöhte MMP-2/-9-Konzentrationen gemessen wurden⁷⁹, die hypothetisch mit dem durch die ZyA-Behandlung verschlechterten Matrixumbau nach einem MI in Verbindung gebracht werden können. Daher sollten in Zukunft auch die MMP-2/-9-Konzentrationen im infarzierten Myokard analysiert werden, die ebenfalls Aufschluss über die Entstehung einer dünneren Infarkt Narbe nach ZyA-Behandlung und Induktion eines MI geben können.

Abschließend lässt sich zu diesem Versuchsteil konstatieren, dass ein durch ZyA-induzierter TII-Phänotyp zu einem größeren Infarktbereich und weiterführend zu einer verschlechterten Heilung nach einem MI geführt hat. Aufgrund dessen war es von Interesse, das Ausmaß der Entzündungsreaktion mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT sowie die Immunzellzusammensetzung über Durchflussszytometrie zu untersuchen.

6.3. Die Entzündungsbildgebung mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT korreliert nicht mit der Immunzellzahl und dem Aktivierungsstatus

Neben der ^1H -MRT, die verwendet wurde, um die Infarktgröße, die Herzfunktion sowie die T1-/T2-Zeiten (Fibrosierung/Ödembildung) zu bestimmen, kam die ^{19}F -MRT für die Entzündungsbildgebung zum Einsatz. Mithilfe von Perfluorcarbon-Nanoemulsionen (PFCs) können phagozytische Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die in den Inflammationsherd eingewandert oder dort sessil sind, detektiert werden^{121,165–168}. Dazu wurden den Mäusen einen Tag nach MI PFCs intravenös injiziert und 24 h später konnte das ^{19}F -Signal im Herz sowie in der Leber bestimmt werden. Hier ließ sich die Hypothese aufstellen, dass das ^{19}F -Signal ZyA-behandelter Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe im Infarktbereich höher sein müsste, da ein größerer Infarkt mit einer verstärkten Entzündungsreaktion (erhöhte Immunzellzahl und/oder -aktivität) einherginge und dementsprechend mehr PFCs im Inflammationsherd vorhanden wären. In vorherigen Studien konnte bereits über das passive Targeting von Monozyten/Makrophagen der Inflammationsherd nach Induktion eines MI sowie nach der Auslösung einer fokalen zerebralen Ischämie mittels ^{19}F -MRT detektiert werden¹²¹. Des Weiteren korrelierte ein stärkeres ^{19}F -Signal gewöhnlich mit einer erhöhten Entzündungsreaktion, die z.B. im

Mausmodell die Transplantatabstoßung einer abdominalen Herztransplantation visualisierte¹⁶⁵. Die Analyse der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen in dieser Arbeit zeigte jedoch, dass das ^{19}F -Signal ZyA-behandelter Mäuse im Herz signifikant verringert war, obwohl sie einen größeren Infarkt aufwiesen, während das Signal in der Leber für beide Gruppen gleich stark war (Abb. 10). Die Leber ist das Hauptorgan, in dem PFCs passiv akkumulieren^{121,122}, und durch das vergleichbare ^{19}F -Signal konnte ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche PFC-Mengen injiziert wurden. Daher war davon auszugehen, dass das niedrigere Signal im Infarktgebiet nach ZyA-Behandlung mit einem anderen Faktor zusammenhing. Ein weiterer ausschlaggebender Punkt bei der ^{19}F -MRT ist die Immunzellzahl, die in vorherigen Studien mit der Signalstärke korrelierte. Dabei konnte z.B. eine verstärkte Makrophagenanzahl im Herz nach Induktion eines MI im Schwein und in der Aorta in einer Maus für abdominale Aortenaneurysmen/-dissektionen mit einem erhöhten ^{19}F -Signal in Verbindung gebracht werden^{166,169}. Aufgrund dessen wurde die Immunzellzahl des Herzes an Tag 2 nach MI mittels Durchflusszytometrie bestimmt und zeigte vergleichbare Zellzahlen für Monozyten/Makrophagen in beiden Versuchsgruppen und eine leicht erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in ZyA-behandelten Mäusen (Abb. 11 a)). Folgend konnte das verringerte ^{19}F -Signal auch nicht durch niedrigere Immunzellzahlen erklärt werden. Zusätzlich wurden die Immunzellzahlen im Blut, in der Milz und im Knochenmark untersucht, die eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in ZyA-behandelten Mäusen aufwiesen (Abb. 11). Vergleichbare Daten zeigten auch Théroude et al., die zwei Tage nach Induktion einer Listeriose erhöhte Immunzellzahlen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut sowie der Milz ZyA-behandelter Mäuse detektierten¹⁰⁸. Diese Ergebnisse sprechen für eine verstärkte Entzündungsreaktion und Notfallmyelopoese bzw. -granulopoese, die sich in dieser Arbeit auch in einer gesteigerten Anzahl von Stammzellen und multipotenten Vorläuferzellen (LSK-Zellen) widerspiegelte, während die Vorläuferanzahl (LK-Zellen) niedriger war, was auf einen vorzeitigen verstärkten Auswurf von noch unreifen Immunzellen in den Blutkreislauf hindeutet (Abb. 14 a)/c)). Die Notfallmyelopoese bezeichnet einen Prozess, bei dem unter Stressbedingungen durch eine verstärkte myeloische Differenzierung neue Immunzellen entstehen, die aufgrund infektiöser oder inflammatorischer Ereignisse in der Peripherie benötigt werden^{170,171}. Deshalb werden auch Populationen von Immunzellen (z.B. Monozyten, neutrophile Granulozyten) aus dem Knochenmark und der Milz nach einer ischämischen Verletzung ins Herz rekrutiert, wo sie die Beseitigung und Reparatur des geschädigten Myokards fördern¹⁷². Bezieht sich die gesteigerte Immunzellzahl auf grundsätzlich sehr kurzlebige neutrophile Granulozyten, wird in diesem Zusammenhang von der Notfallgranulopoese gesprochen, die wichtig ist, um die Verfügbarkeit von neutrophilen Granulozyten für die Eindämmung eindringender Pathogene oder Entzündungsprozesse zu gewährleisten¹⁷³. Während der Notfallgranulopoese kommt es auch nicht nur zu der Auswanderung

reifer neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark, sondern auch unreife Zellen werden in die Zirkulation freigesetzt¹⁷⁴.

Um zu prüfen, ob sich dieser Effekt nur nach der Induktion eines TII-Phänotyps und einem sich anschließenden MI zeigt, wurde die Entzündungsbildgebung auch im Matrigel/LPS-Modell untersucht. Es zeigte sich auch nach LPS-induzierter subkutaner Entzündung ein niedrigeres ¹⁹F-Signal im Inflammationsherd (Matrigel) und zusätzlich im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse (Abb. 12), das ebenfalls nicht durch eine niedrigere Zellzahl erklärt werden konnte. Im Gegenteil: Mittels Durchflusszytometrie wurde an Tag 2 nach Induktion des zweiten Stimulus sogar eine tendenziell erhöhte Zellzahl neutrophiler Granulozyten sowohl im Matrigel als auch im Knochenmark detektiert (Abb. 13).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass das verringerte ¹⁹F-Signal ZyA-behandelter Mäuse in beiden Entzündungsmodellen nicht mit der Immunzellzahl korreliert und dass die Behandlung mit ZyA offensichtlich einen Einfluss auf die PFC-Aufnahme hat.

6.3.1. Die ZyA-Behandlung reduziert die PFC-Aufnahme *in vivo* und resultiert in einem verringerten ¹⁹F-Signal

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurden weiterführende Untersuchungen der PFC-Aufnahme durchgeführt, da das geringe ¹⁹F-Signal weder mit einer verringerten Immunzellzahl noch mit einer niedrigeren Menge an PFCs in beiden Entzündungsmodellen nach ZyA-Behandlung in Verbindung gebracht werden konnte. Dafür wurde die PFC-Aufnahme *in vivo* sowohl ohne als auch mit zweitem Stimulus (Matrigel/LPS) mittels ¹H/¹⁹F-MRT und Durchflusszytometrie überprüft. Bereits die alleinige ZyA-Behandlung führte *in vivo* zu einem verringerten ¹⁹F-Signal in der Milz und im Knochenmark (Abb. 16). Dies wurde durch eine reduzierte PFC-Aufnahme von reifen phagozytischen Immunzellen im Blut, in der Milz und im Knochenmark sowie von Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark bestätigt (Abb. 17). Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach zusätzlicher Induktion eines zweiten Stimulus in etwas abgeschwächter Form (Abb. 15). Diese Ergebnisse sprechen für eine Veränderung der Endozytoseeigenschaften der Zellen durch ZyA. Jedoch passen sie nicht zu der bisherigen Annahme, dass aktivierte bzw. proinflammatorische Zellen eine erhöhte Phagozytosekapazität, die essentiell für die Entfernung von Zelldebris und fortschreitend für die Beendigung der Entzündungsreaktion ist, aufweisen^{175–178}. Außerdem wurde bisher beschrieben, dass die Behandlung mit β -Glucan bzw. ZyA die antibakterielle Aktivität von Monozyten/Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten direkt verstärkt. Dadurch wird die Phagozytose gefördert und mehr Zytokine, Chemokine sowie andere Entzündungsmediatoren

werden produziert, damit der Organismus schnell von dem Pathogen befreit werden kann^{179,180}. Des Weiteren wurde dargestellt, dass Antigen-präsentierende Zellen, die durch partikuläres β -Glucan aktiviert wurden, die Phagozytose von Tumorzellen effektiver durchführen. In klinischen Studien wurden bereits mehrere β -Glucan-Varianten auf ihre therapeutische Wirkung bei einer Vielzahl von Krebsarten untersucht^{104,181,182}. Die dabei beobachtete Antitumoreffizienz dürfte zumindest teilweise auf die erhöhte Phagozytoseaktivität der Immunzellen zurückzuführen sein und insbesondere neutrophile Granulozyten gelten als die primären Effektorzellen der β -Glucan-vermittelten Tumorthherapie^{183,184}.

Der genaue Mechanismus für die Endozytose von PFCs konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Auf der einen Seite wird die Phagozytose, ein Aktin-abhängiger Mechanismus, von PFCs durch Makrophagen beschrieben¹⁸⁵. Jedoch wird die Phagozytose grundsätzlich als eine Aufnahme von großen Partikeln ($> 0,5 \mu\text{m}$) dargestellt und die hier genutzten PFCs hatten lediglich einen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 150 nm ¹⁸⁶. Auf der anderen Seite wird davon ausgegangen, dass es sich bei der PFC-Aufnahme vor allem um einen Clathrin-abhängigen Weg (rezeptorvermittelte Endozytose) handelt¹⁸⁷. Daher ist es schwierig davon abzuleiten, ob die niedrigere PFC-Aufnahme eventuell mit einer reduzierten Oberflächenexpression von bestimmten Rezeptoren im Zusammenhang steht oder eine veränderte Aktinpolymerisation/Bewegung des Zytoskeletts die Phagozytose beeinflusst, die durch die ZyA-Behandlung zustande gekommen ist. Dectin-1 ist der Hauptrezeptor von β -Glucan und ist über den Syk-unabhängigen Weg für die Phagozytose von ZyA zuständig. Primär wird Dectin-1 von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert^{188,189}, aber auch auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ist es vertreten¹⁹⁰. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass klassische sowie intermediäre Monozyten und Makrophagen im Blut bzw. in der Milz eine starke Oberflächenexpression von Dectin-1 aufwiesen. Nach der ZyA-Behandlung *in vivo* war Dectin-1 auf diesen Zellen signifikant geringer exprimiert (Abb. 20 a)). Das bestätigt die Relevanz von Dectin-1 als ZyA-Rezeptor und könnte eventuell einen Zusammenhang mit der reduzierten PFC-Aufnahme darstellen. Es wurde beschrieben, dass es sich bei der Internalisierung von löslichem β -Glucan durch Dectin-1 auf Makrophagen ebenfalls um einen Clathrin-abhängigen Weg handelt¹⁹¹ und auch für lösliches β -1,6-Glucan konnte ein Clathrin-abhängiger Mechanismus gezeigt werden¹⁹². Dazu ist wichtig anzumerken, dass es sich bei ZyA um partikuläres β -Glucan handelt, das zunächst von Peritonealmakrophagen phagozytiert und in kleinere lösliche Partikel fragmentiert wird, die in den Extrazellularraum freigelassen werden. Diese Fragmente diffundieren in das umgebende Gewebe und gelangen über die Blutkapillaren, Arteriolen oder Venolen der submesothelialen Schicht des Peritoneums in die Zirkulation^{104,193}. Jedoch würde es in dieser Arbeit nicht die niedrige PFC-Aufnahme durch neutrophile Granulozyten erklären, da diese sowohl im Blut, in der Milz als

auch im Knochenmark eine geringe Dectin-1-Expression aufwiesen, die auch nicht durch ZyA beeinflusst wurde (Abb. 20 a)). Daher wäre es möglich, dass sich nicht nur die Rezeptorexpression auf den verschiedenen Zelltypen, sondern auch deren Mechanismus für die PFC-Aufnahme unterscheiden.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die ZyA-Behandlung die PFC-Aufnahme beeinflusst und dadurch das ^{19}F -Signal im Entzündungsherd verringert ist. Jedoch lässt sich aus den bisherigen Erkenntnissen nicht ableiten, durch welchen Mechanismus die PFC-Aufnahme verändert wird und auf welchem Weg dies mit einer verschlechterten Heilung nach MI in Verbindung steht.

6.3.2. ZyA-behandelte Makrophagen zeigen eine verringerte Endozytosekapazität

Weiterführend wurde die PFC-Aufnahme auch *in vitro* untersucht und mit den Ergebnissen der Endozytose von *E. coli*- bzw. Dextran-Partikeln verglichen, um zu prüfen, ob es sich um einen PFC-spezifischen Effekt handelt. Dafür wurden ebenfalls Immunzellen aus dem Knochenmark isoliert und sowohl nach dem ersten als auch zweiten Stimulus (Matrigel/LPS) mit $^{488}\text{PFCs}$ inkubiert. Die Ergebnisse der *in vitro* PFC-Aufnahme unterschieden sich deutlich von den Ergebnissen der *in vivo* Versuche. Wie bereits bei der Phagozytose von *E. coli*-Partikeln und der Pinozytose von FITC-Dextran zeigten nur Makrophagen nach ZyA-Behandlung eine verringerte Aufnahme von $^{488}\text{PFCs}$ (Abb. 21 a)). Nach der Induktion des zweiten Stimulus war die Partikel-Aufnahme in Makrophagen von ZyA-behandelten Mäusen sogar genauso stark wie von PBS-behandelten Tieren. Daher scheint es einen Unterschied zu machen, ob die Zellen *in vitro* mit PFCs inkubiert werden oder ob die PFCs *in vivo* über den Blutkreislauf und im Gewebe aufgenommen werden. Jedoch verstärkt dieses Ergebnis nochmals die Vermutung, dass die Efferozytoseeigenschaften von Makrophagen durch die ZyA-Behandlung gehemmt werden und es dadurch eventuell auch zu einer geringeren Phagozytose von Zelldebris und apoptotischen Zellen durch Makrophagen im Infarktgebiet kommt⁶³.

Zusätzlich zu der passiven Aufnahme wurde ein aktives Targeting von neutrophilen Granulozyten genutzt, um deren Aktivität zu messen. Dafür wurde das neutrophile Granulozyten spezifische Peptid (mNP), das an CD177 auf der Zelloberfläche bindet, welches eine erhöhte Expression bei Zellaktivierung aufweist, an PFCs gekoppelt und ebenfalls mit den Immunzellen aus dem Knochenmark *in vitro* inkubiert^{126,127,194}. Die Ergebnisse zeigten, dass neutrophile Granulozyten nach alleiniger ZyA-Behandlung eine erhöhte CD177-Expression bzw. Aufnahme von $^{647}\text{mNP.PFCs}$ aufwiesen, was auf eine Aktivierung der Zellen hindeutet (Abb. 21 d)). Das spricht wiederum dafür, dass die Endozytosekapazität nach der ZyA-Behandlung nicht vollständig gehemmt ist, sondern

rezeptorabhängig verläuft. Die Matrigel/LPS-Implantation führte sowohl in PBS- als auch in ZyA-behandelten Mäusen zu einer verstärkten Aktivierung neutrophiler Granulozyten, jedoch war nach dem zweiten Stimulus kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen sichtbar. Die generelle Aktivierung neutrophiler Granulozyten nach Induktion des zweiten Stimulus zeigte sich auch bei der Phagozytose von *E. coli*-Partikeln, die in beiden Gruppen deutlich erhöht war, aber ebenfalls keinen Unterschied untereinander aufwies. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Effekt um sogenannte „ermüdete“ Immunzellen. Dies ist ein Phänomen, das vor allem von T-Zellen bekannt ist, aber auch bei neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte^{195–199}. Durch eine anhaltende Exposition gegenüber Infektionen während z.B. einer Sepsis wird die Ermüdung der T-Zellen hervorgerufen, die sich durch einen fortschreitenden Verlust der T-Effektorzellen-Funktion auszeichnet¹⁹⁵. Dabei reicht die Bandbreite von völligem Fehlen der Effektor-Funktion bis hin zu einer veränderten Funktionalität zur Vorbeugung von Immunpathologien, wobei mögliche Unterschiede zwischen Krebs und chronischen Infektionen bestehen¹⁹⁶. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit einer Sepsis, wo diese bereits ihre gespeicherten Granula und NETs ausgeworfen haben und dadurch auf einen erneuten Reiz weniger stark reagieren^{197–199}.

Abschließend lässt sich aktuell noch nicht vollständig erklären, warum die Immunzellen weniger PFCs aufnehmen und dadurch zu einem niedrigeren ¹⁹F-Signal im Herz, im Matrigel oder im Knochenmark ZyA-behandelter Mäuse nach zweitem Stimulus führen. Daher wäre es sinnvoll, in Zukunft die Endozytoseeigenschaften nach MI *in vivo* zu untersuchen und das Augenmerk auf infiltrierte Immunzellen im infarzierten Myokard zu richten.

6.4. Weiterführende funktionelle Analysen geben einen Einblick in das Aktivitätsmuster ZyA-behandelter neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten reagieren als erste Abwehr sowohl auf PAMPs (z.B. LPS)²⁰⁰ als auch auf DAMPs (z.B. oxLDL)²⁰¹ und erfüllen daher eine wichtige Funktion bei der inflammatorischen Immunreaktion. Essentielle Aufgaben der neutrophilen Granulozyten bei der Bekämpfung von Pathogenen und ihrer Wirkung bei inflammatorischen Prozessen sind die Degranulation, Phagozytose, Apoptose, Freisetzung von ROS und die Bildung von NETs²⁰². Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Leukodiapedese, die es den neutrophilen Granulozyten ermöglicht, in das inflammatorische Gewebe zu infiltrieren²⁰³. Daraus resultiert, dass bereits in verschiedenen Krankheitsmodellen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten detektiert wurde, die eine verstärkte Aktivierung aufweisen und sich durch eine gesteigerte Zytokin- und

Chemokinausschüttung sowie ROS-Produktion charakterisieren lassen²⁰⁴. Auch im Zusammenhang mit der TII erhielten neutrophile Granulozyten bereits viel Aufmerksamkeit und wurden vor allem positiv in Bezug auf die Bekämpfung von Infektionskrankheiten und Tumoren angesehen, während sie den Gewebeschaden bei kardiometabolischen oder entzündlichen Erkrankungen verstärkten²⁰⁵.

Um herauszufinden, welche funktionellen Veränderungen durch ZyA hervorgerufen werden, wurden neutrophile Granulozyten tiefergehend analysiert. Dazu wurden neutrophile Granulozyten nach der ZyA-Behandlung an Tag 0 oder an Tag 1 nach einem zusätzlichen zweiten Stimulus (Matrigel/LPS) aus dem Knochenmark sowie Matrigel isoliert und in Bezug auf die Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern (CD11b, CD63, CD62L), ihre ROS-Produktion und Migrationseigenschaften untersucht. Die alleinige ZyA-Behandlung führte dabei zu keiner Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark (Abb. 22), die durch eine höhere ROS-Produktion oder verstärkte Expression der Aktivierungsmarker gekennzeichnet gewesen wäre^{84,128,200,206}. Lediglich die Anzahl migrierter neutrophiler Granulozyten war signifikant erhöht (Abb. 22 b)) und passte zu den vorherigen Daten dieser Arbeit, die eine tendenziell vermehrte Zellzahl im Inflammationsherd ZyA-behandelter Mäuse gezeigt haben und für eine verstärkte Entzündungsreaktion sprechen^{203,207}. Des Weiteren konnte nach der Induktion eines TII-Phänotyps keine erhöhte ROS-Produktion detektiert werden, die ansonsten häufig mit TII in Verbindung gebracht wurde^{84,205}. Gefolgt von dem zweiten Stimulus kam es sowohl in PBS- als auch ZyA-behandelten Mäusen zu einer verstärkten ROS-Produktion durch neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark. Diese war in beiden Gruppen gleich stark, aber spricht für eine Aktivierung der Zellen durch LPS²⁰⁸. Die Aktivierung konnte auch anhand der erhöhten CD11b-Expression und der verringerten CD62L-Expression festgestellt werden. Neutrophile Granulozyten aus dem Matrigel zeigten ebenfalls eine starke Aktivierung, die durch ein nicht-detektierbares CD62L-Signal und eine sehr starke CD11b-Expression gekennzeichnet war, sich aber nicht zwischen den beiden Versuchsgruppen unterschieden hat (Abb. 23). Nur die CD63-Expression war für ZyA-behandelte Mäuse im Matrigel höher und deutet zum einen auf eine etwas verstärkte Aktivierung neutrophiler Granulozyten hin¹²⁷ und könnte zum anderen ein Marker für apoptotische Zellen sein, wie bereits in einer Studie mit humanen neutrophilen Granulozyten gezeigt wurde²⁰⁹.

Zusammengefasst konnte anhand dieser Ergebnisse nicht direkt auf eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch ZyA geschlossen werden, obwohl die verstärkte Migration ZyA-behandelter Zellen, die erhöhte CD177-Expression und der verschlechterte Myokardumbau darauf hindeuten. In Zukunft müssen die Untersuchungen mit einem MI als zweiten Stimulus wiederholt werden. Dabei sollte der Fokus vor allem auf den eingewanderten Immunzellen im Infarktgebiet liegen, um deren mechanistischen Einfluss auf den Myokardumbau zu analysieren.

6.5. Ausblick

Die wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass ein durch Zymosan A (*Saccharomyces cerevisiae*) induzierter TII-Phänotyp zu einem größeren Myokardinfarkt und folgend zu einer verschlechterten Heilung des linken Ventrikels führt. Dies würde im Menschen mit einem gesteigerten Risiko für eine daraus resultierende Herzinsuffizienz einhergehen. Wie bereits erwähnt, wurden bisher vor allem Vorerkrankungen, Ernährungsweisen oder DAMPs als TII-Stimulus verwendet, um deren Einfluss auf die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen zu untersuchen^{73,79,139–142}. Die eingesetzten Stimuli sind dabei schon als Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt. Daher ist es besonders interessant und wichtig zu sehen, dass ein Zellwandbestandteil eines Hefepilzes – repräsentativ für eine Infektion – ebenfalls durch die Induktion eines TII-Phänotyps einen negativen Einfluss auf die Entwicklung und den Heilungsverlauf eines MI hat.

Weiterführend muss geklärt werden, welche Immunzellen für den verschlechterten Heilungsprozess verantwortlich sind, wobei hier der Fokus vor allem auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten gerichtet werden sollte. Folgend müssen die Immunzellzusammensetzung im Herz sowie deren funktionelle Eigenschaften, wie z.B. die Efferozytose-/Endozytosekapazität oder Zytokin- und Chemokinproduktion, sowohl vor als auch nach dem zweiten Stimulus tiefergehend analysiert werden. Des Weiteren wäre es von Interesse zu untersuchen, inwiefern z.B. Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten an den nachteiligen Prozessen beteiligt sind, da verschiedene Studien bereits zuvor zeigten, dass Untergruppen von neutrophilen Granulozyten diverse phänotypische (z.B. ringförmige oder segmentierte Zellkerne, unterschiedliche Ly6G- oder CD14-Expression) und funktionelle (z.B. gewebeverletzende/-reparierende oder pro-/antikarzinogene) Eigenschaften in Bezug auf den Ausbruch und das Fortschreiten von Krankheiten aufweisen²¹⁰. *Single-Cell* RNA-Sequenzierungen können dabei Aufschluss über epigenetische Veränderungen geben, die einen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Immunzellen haben. Besonders interessant sind die im Zusammenhang mit einer intraokularen Zymosan-Injektion und Schädigung des Sehnervs detektierten Ly6G^{low} neutrophilen Granulozyten. Diese Subpopulation wies im Gegensatz zu reifen neutrophilen Granulozyten proregenerative und neuroprotektive Eigenschaften auf, die sich jedoch erst nach der Durchquerung der Blut-Augen-Schranke entwickelten¹²⁰. Es ist unklar, ob die Differenzierung der funktionellen Eigenschaften durch gewebeeigene Faktoren beeinflusst wird und sich die Diversität der Subpopulationen dadurch noch vergrößert²¹⁰. Jedoch ist festzuhalten, dass die genauere Analyse der neutrophilen Granulozyten im Infarktbereich dazu beitragen könnte, dass eine Möglichkeit der Hemmung des proinflammatorischen Phänotyps erreicht wird oder die Zellen am Ort der Entzündung funktionell stimuliert werden, um einen antiinflammatorischen

Subtyp zu bilden. Es werden bereits Mechanismen untersucht, um TII auf der einen Seite in Bezug auf die Bekämpfung von Infektionskrankheiten oder Krebs zu fördern und auf der anderen Seite bei kardiovaskulären Erkrankungen zu hemmen²¹¹. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass das Gleichgewicht zwischen Inflammation und Gewebereparatur, welches unter anderem durch neutrophile Granulozyten aufrechterhalten wird, nicht komplett zerstört wird, da neutrophile Granulozyten sowohl nützliche als auch schädliche Wirkungen ausüben²⁰⁴. Deswegen ist es wichtig zu wissen, an welcher Stelle der TII-Phänotyp im Zusammenhang mit einem Myokardinfarkt inhibiert werden kann, um erstens die Auswirkungen der TII auf die Entstehung eines MI zu minimieren und zweitens die Heilung nach einem MI sogar zu fördern. Von Interesse könnte ein theranostisches Verfahren sein, bei dem z.B. sogenannte Resolvine mithilfe von PFCs zielgerichtet an z.B. neutrophile Granulozyten gesteuert werden, die dabei mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT detektiert werden können. Resolvine sind potente Lipidmediatoren, die einerseits die proinflammatorische Aktivität von z.B. neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Zytokinfreisetzung, ROS-Produktion, Migration) verringern und andererseits die Apoptose, Efferozytose und Differenzierung von Monozyten in M2-Makrophagen, die damit einhergehend den Übergang zur Auflösungs- und Heilungsphase fördern, begünstigen²¹².

7. Literaturverzeichnis

1. Christ, J. *BASICS Kardiologie*. (Elsevier, 2022).
2. Hans-Christian Pape, Armin Kurtz, & Stefan Silbernagl. *Physiologie*. (Thieme, 2023).
3. Meilhac, S. M. & Buckingham, M. E. The deployment of cell lineages that form the mammalian heart. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 705–724 (2018).
4. Litviňuková, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* **588**, 466–472 (2020).
5. Todesursachen. *Statistisches Bundesamt* https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html. Zuletzt besucht am 01.08.2024
6. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. *Statistisches Bundesamt* <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. Zuletzt besucht am 01.08.2024
7. Franco, M., Cooper, R. S., Bilal, U. & Fuster, V. Challenges and Opportunities for Cardiovascular Disease Prevention. *Am. J. Med.* **124**, 95–102 (2011).
8. Flora, G. D. & Nayak, M. K. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Curr. Pharm. Des.* **25**, 4063–4084.
9. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).
10. Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M. & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759–2767 (2014).
11. Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A. & Nasri, H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int. J. Prev. Med.* **5**, 927–946 (2014).
12. Srikanth, S. & Ambrose, J. A. Pathophysiology of Coronary Thrombus Formation and Adverse Consequences of Thrombus During PCI. *Curr. Cardiol. Rev.* **8**, 168–176 (2012).
13. Wakabayashi, K., Nishikura, T., Shinke, T. & Tanno, K. Acute myocardial infarction caused by persistent coronary spasm associated with high-grade macrophage accumulation. *BMJ Case Rep.* **13**, e234502 (2020).
14. Mukta, V., Chandragiri, S. & Das, A. K. Allergic Myocardial Infarction. *North Am. J. Med. Sci.* **5**, 157–158 (2013).
15. April 2017, am 19. Gendermedizin: Frauen überleben schwere Herzinfarkte seltener als Männer. <https://dggk.org/pressemitteilungen/2017-jahrestagung/2017-jt-aktuelle-pm/2017-jt-aktuelle-pm-tag1/gendermedizin-frauen-ueberleben-schwere-herzinfarkte-seltener-als-maenner/>.
16. Holmes, J. W., Borg, T. K. & Covell, J. W. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **7**, 223–253 (2005).
17. Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C. & Frangogiannis, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 504–511 (2010).
18. Yang, F. *et al.* Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp. Physiol.* **87**, 547–555 (2002).
19. Schotman, M. & Dankers, P. Factors Influencing Retention of Injected Biomaterials to Treat Myocardial Infarction. *Adv. Mater. Interfaces* **9**, 2100942 (2022).
20. Ong, S.-B. *et al.* Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* **186**, 73–87 (2018).
21. Pluijmert, N. J., Atsma, D. E. & Quax, P. H. A. Post-ischemic Myocardial Inflammatory Response: A Complex and Dynamic Process Susceptible to Immunomodulatory Therapies. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 647785 (2021).
22. Ma, Y. Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction. *Cells* **10**, 1676 (2021).
23. Puhl, S.-L. & Steffens, S. Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution? *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 25 (2019).
24. Kino, T., Khan, M. & Mohsin, S. The Regulatory Role of T Cell Responses in Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5013 (2020).
25. Moggio, A., Schunkert, H., Kessler, T. & Sager, H. B. Quo Vadis? Immunodynamics of Myeloid Cells after Myocardial Infarction. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15814 (2022).

26. Wang, J., Erlacher, M. & Fernandez-Orth, J. The role of inflammation in hematopoiesis and bone marrow failure: What can we learn from mouse models? *Front. Immunol.* **13**, 951937 (2022).
27. Shook, P. L., Singh, M. & Singh, K. Macrophages in the Inflammatory Phase following Myocardial Infarction: Role of Exogenous Ubiquitin. *Biology* **12**, 1258 (2023).
28. Wagner, M. J., Khan, M. & Mohsin, S. Healing the Broken Heart; The Immunomodulatory Effects of Stem Cell Therapy. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
29. Hofmann, U. & Frantz, S. Role of T-cells in myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **37**, 873–879 (2016).
30. Dittrich, A. & Lauridsen, H. Myocardial infarction and the immune response - Scarring or regeneration? A comparative look at mammals and popular regenerating animal models. *J. Immunol. Regen. Med.* **4**, 100016 (2019).
31. Liuzzo, G. *et al.* Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation* **103**, 1509–1514 (2001).
32. Liao, Y.-H. *et al.* Interleukin-17A Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating Cardiomyocyte Apoptosis and Neutrophil Infiltration. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 420–429 (2012).
33. Lindsey, M. L. & Zamilpa, R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc. Ther.* **30**, 31–41 (2012).
34. Vanhoutte, D., Schellings, M., Pinto, Y. & Heymans, S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc. Res.* **69**, 604–613 (2006).
35. Dewald, O. *et al.* Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* **164**, 665–677 (2004).
36. Saparov, A. *et al.* Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* **66**, 739–751 (2017).
37. Groux, H. *et al.* A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
38. Levings, M. K. *et al.* IFN- α and IL-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells¹. *J. Immunol.* **166**, 5530–5539 (2001).
39. Weirather, J. *et al.* Foxp3⁺ CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ. Res.* **115**, 55–67 (2014).
40. Dobaczewski, M., Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 600–606 (2011).
41. Kempf, T. *et al.* GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat. Med.* **17**, 581–588 (2011).
42. Scannell, M. *et al.* Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Macrophages¹. *J. Immunol.* **178**, 4595–4605 (2007).
43. Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S. & Schreiber, R. D. Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway: REQUIREMENT FOR TWO DISTINCT RECEPTOR-DERIVED SIGNALS FOR ANTI-INFLAMMATORY ACTION*. *J. Biol. Chem.* **274**, 16513–16521 (1999).
44. Matsukawa, A. *et al.* Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 3354–3359 (2005).
45. Krishnamurthy, P. *et al.* IL-10 Inhibits Inflammation and Attenuates Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction via Activation of STAT3 and Suppression of HuR. *Circ. Res.* **104**, e9–e18 (2009).
46. Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* **74**, 184–195 (2007).
47. Yang, B., Qiao, Y., Yan, D. & Meng, Q. Targeting Interactions between Fibroblasts and Macrophages to Treat Cardiac Fibrosis. *Cells* **13**, 764 (2024).
48. Frangogiannis, N. G. *et al.* Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 1428–1430 (2001).

49. Santiago, J.-J. *et al.* Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **239**, 1573–1584 (2010).
50. Fan, D., Takawale, A., Lee, J. & Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 15 (2012).
51. Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 298–309 (2017).
52. Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 549–574 (2014).
53. Richardson, W., Clarke, S., Quinn, T. & Holmes, J. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr. Physiol.* **5**, 1877–1909 (2015).
54. Singh, D., Rai, V. & Agrawal, D. K. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol. Cardiovasc. Med.* **7**, 5–16 (2023).
55. Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N. & Montecucco, F. Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* **110**, 501–514 (2013).
56. Levy, D. E. & Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 651–662 (2002).
57. Matsukawa, A. *et al.* Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking STAT3 in macrophages and neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 6198–6205 (2003).
58. Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. A. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol. CB* **11**, R795–805 (2001).
59. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* **189**, 1059–1070 (2010).
60. Ravichandran, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–455 (2011).
61. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
62. Vandivier, R. W., Henson, P. M. & Douglas, I. S. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* **129**, 1673–1682 (2006).
63. Li, S. *et al.* Defective phagocytosis of apoptotic cells by macrophages in atherosclerotic lesions of ob/ob mice and reversal by a fish oil diet. *Circ. Res.* **105**, 1072–1082 (2009).
64. Thorp, E. B. Contrasting Inflammation Resolution during Atherosclerosis and Post Myocardial Infarction at the Level of Monocyte/Macrophage Phagocytic Clearance. *Front. Immunol.* **3**, 39 (2012).
65. DeBerge, M. *et al.* MerTK Cleavage on Resident Cardiac Macrophages Compromises Repair After Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Circ. Res.* **121**, 930–940 (2017).
66. Wan, E. *et al.* Enhanced Efferocytosis of Apoptotic Cardiomyocytes Through Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase Links Acute Inflammation Resolution to Cardiac Repair After Infarction. *Circ. Res.* **113**, 1004–1012 (2013).
67. Matter, M. A. *et al.* Inflammation in acute myocardial infarction: the good, the bad and the ugly. *Eur. Heart J.* **45**, 89–103 (2024).
68. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 375–388 (2020).
69. Tercan, H., Riksen, N. P., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Bekkering, S. Trained Immunity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 55–61 (2021).
70. Mitroulis, I. *et al.* Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* **172**, 147–161.e12 (2018).
71. Riksen, N. P., Bekkering, S., Mulder, W. J. M. & Netea, M. G. Trained immunity in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 1–13 (2023) doi:10.1038/s41569-023-00894-y.
72. Piacentini, L., Vavassori, C. & Colombo, G. I. Trained Immunity in Perivascular Adipose Tissue of Abdominal Aortic Aneurysm—A Novel Concept for a Still Elusive Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, (2022).

73. Lin, T.-Y. *et al.* Trained immunity induced by high-salt diet impedes stroke recovery. *EMBO Rep.* **24**, e57164 (2023).
74. Kleimann, P., Irschfeld, L.-M., Grandoch, M., Flögel, U. & Temme, S. Trained Innate Immunity in Animal Models of Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 2312 (2024).
75. Rizzetto, L. *et al.* Fungal Chitin Induces Trained Immunity in Human Monocytes during Cross-talk of the Host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **291**, 7961–7972 (2016).
76. Mourits, V. P. *et al.* BCG-Induced Trained Immunity in Healthy Individuals: The Effect of Plasma Muramyl Dipeptide Concentrations. *J. Immunol. Res.* **2020**, 5812743 (2020).
77. Lajqi, T. *et al.* LPS Induces Opposing Memory-like Inflammatory Responses in Mouse Bone Marrow Neutrophils. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9803 (2021).
78. Crişan, T. O. *et al.* Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 755–762 (2016).
79. Bekkering, S. *et al.* Oxidized Low-Density Lipoprotein Induces Long-Term Proinflammatory Cytokine Production and Foam Cell Formation via Epigenetic Reprogramming of Monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1731–1738 (2014).
80. van der Heijden, C. D. C. C. *et al.* Catecholamines Induce Trained Immunity in Monocytes In Vitro and In Vivo. *Circ. Res.* **127**, 269–283 (2020).
81. van der Heijden, C. D. C. C. *et al.* Aldosterone induces trained immunity: the role of fatty acid synthesis. *Cardiovasc. Res.* **116**, 317–328 (2020).
82. Murugathasan, M. *et al.* Moderate exercise induces trained immunity in macrophages. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **325**, C429–C442 (2023).
83. Crabtree, J. N. *et al.* Lymphocyte crosstalk is required for monocyte-intrinsic trained immunity to *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* **132**, (2022).
84. Bekkering, S. *et al.* In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 926–933 (2016).
85. Saeed, S. *et al.* Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**, 1251086 (2014).
86. Bindu, S. *et al.* Prophylactic and therapeutic insights into trained immunity: A renewed concept of innate immune memory. *Hum. Vaccines Immunother.* **18**, 2040238 (2022).
87. van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., Riksen, N. & Netea, M. G. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* **68**, 40–44 (2015).
88. Cheng, S.-C. *et al.* mTOR/HIF1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* **345**, 1250684 (2014).
89. Bekkering, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. B., Riksen, N. P. & Netea, M. G. Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **39**, 667–693 (2021).
90. Arts, R. J. W. *et al.* BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* **23**, 89-100.e5 (2018).
91. Hong, M. *et al.* Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. *Nat. Commun.* **6**, 6588 (2015).
92. Kankkunen, P. *et al.* (1,3)- β -Glucans Activate Both Dectin-1 and NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. *J. Immunol.* **184**, 6335–6342 (2010).
93. Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. A. & Singh, G. S. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2**, 94–103 (2011).
94. Chan, G. C.-F., Chan, W. K. & Sze, D. M.-Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2**, 25 (2009).
95. Patidar, A. *et al.* Barley beta-Glucan and Zymosan induce Dectin-1 and Toll-like receptor 2 co-localization and anti-leishmanial immune response in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* **92**, e12952 (2020).
96. Dennehy, K. M. & Brown, G. D. The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 253–258 (2007).
97. Goodridge, H. S., Simmons, R. M. & Underhill, D. M. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 3107–3115 (2007).

98. Mata-Martínez, P., Bergón-Gutiérrez, M. & del Fresno, C. Dectin-1 Signaling Update: New Perspectives for Trained Immunity. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
99. Goodridge, H. S., Wolf, A. J. & Underhill, D. M. β -glucan Recognition by the Innate Immune System. *Immunol. Rev.* **230**, 38–50 (2009).
100. Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* **197**, 1107–1117 (2003).
101. Dennehy, K. M. *et al.* Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* **38**, 500–506 (2008).
102. Sigola, L. B., Fuentes, A.-L., Millis, L. M., Vapenik, J. & Murira, A. Effects of Toll-like receptor ligands on RAW 264.7 macrophage morphology and zymosan phagocytosis. *Tissue Cell* **48**, 389–396 (2016).
103. Baert, K., Sonck, E., Goddeeris, B. M., Devriendt, B. & Cox, E. Cell type-specific differences in β -glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev. Comp. Immunol.* **48**, 192–203 (2015).
104. Zhang, Y. *et al.* The phagocytic receptors of β -glucan. *Int. J. Biol. Macromol.* **205**, 430–441 (2022).
105. Garcia-Valtanen, P., Guzman-Genuino, R. M., Williams, D. L., Hayball, J. D. & Diener, K. R. Evaluation of trained immunity by β -1, 3 (d)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 601–610 (2017).
106. Ciarlo, E. *et al.* Trained Immunity Confers Broad-Spectrum Protection Against Bacterial Infections. *J. Infect. Dis.* **222**, 1869–1881 (2020).
107. Alexander, M. P., Fiering, S. N., Ostroff, G. R., Cramer, R. A. & Mullins, D. W. Beta-glucan-induced inflammatory monocytes mediate antitumor efficacy in the murine lung. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 1731–1742 (2018).
108. Théroude, C. *et al.* Trained Immunity Confers Prolonged Protection From Listeriosis. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
109. dos Santos, J. C. *et al.* β -Glucan-Induced Trained Immunity Protects against *Leishmania braziliensis* Infection: a Crucial Role for IL-32. *Cell Rep.* **28**, 2659-2672.e6 (2019).
110. Dagenais, A., Villalba-Guerrero, C. & Olivier, M. Trained immunity: A “new” weapon in the fight against infectious diseases. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
111. Mitroulis, I., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Bone marrow inflammatory memory in cardiometabolic disease and inflammatory comorbidities. *Cardiovasc. Res.* cvad003 (2023) doi:10.1093/cvr/cvad003.
112. Mitroulis, I., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Trained Immunity and Cardiometabolic Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 48–54 (2021).
113. Poznyak, A. V. *et al.* Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front. Pharmacol.* **11**, 613780 (2020).
114. Schloss, M. J., Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Modifiable Cardiovascular Risk, Hematopoiesis, and Innate Immunity. *Circ. Res.* **126**, 1242–1259 (2020).
115. Speer, T., Dimmeler, S., Schunk, S. J., Fliser, D. & Ridker, P. M. Targeting innate immunity-driven inflammation in CKD and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **18**, 762–778 (2022).
116. Sohrabi, Y. *et al.* mTOR-Dependent Oxidative Stress Regulates oxLDL-Induced Trained Innate Immunity in Human Monocytes. *Front. Immunol.* **9**, (2019).
117. Shirai, T. *et al.* The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *J. Exp. Med.* **213**, 337–354 (2016).
118. Groh, L. A. *et al.* Immune modulatory effects of progesterone on oxLDL-induced trained immunity in monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **112**, 279–288 (2022).
119. Olender, L., Thapa, R. & Gazit, R. Isolation of Murine Myeloid Progenitor Populations by CD34/CD150 Surface Markers. *Cells* **11**, 350 (2022).
120. Sas, A. R. *et al.* A new neutrophil subset promotes CNS neuron survival and axon regeneration. *Nat. Immunol.* **21**, 1496–1505 (2020).
121. Flögel, U. *et al.* In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by ^{19}F magnetic resonance imaging. *Circulation* **118**, 140–148 (2008).

122. Temme, S., Bönner, F., Schrader, J. & Flögel, U. 19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **4**, 329–343 (2012).
123. Coppin, E. *et al.* Splenic hematopoietic stem cells display a pre-activated phenotype. *Immunol. Cell Biol.* 10.1111/imcb.12035 (2018) doi:10.1111/imcb.12035.
124. Berger, S. B. *et al.* SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 920–927 (2010).
125. Li, L. *et al.* The effect of the size of fluorescent dextran on its endocytic pathway. *Cell Biol. Int.* **39**, 531–539 (2015).
126. Lévy, Y. *et al.* CD177, a specific marker of neutrophil activation, is associated with coronavirus disease 2019 severity and death. *iScience* **24**, 102711 (2021).
127. Bouvain, P. *et al.* Non-invasive mapping of systemic neutrophil dynamics upon cardiovascular injury. *Nat. Cardiovasc. Res.* 1–18 (2023) doi:10.1038/s44161-022-00210-w.
128. Boer, K., Vogelsang, H., Deufel, T., Pfister, W. & Kiehntopf, M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.* **43**, 1351–1355 (2010).
129. Chen, F. *et al.* Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat. Immunol.* **15**, 938–946 (2014).
130. Tsuda, Y. *et al.* Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* **21**, 215–226 (2004).
131. Cuartero, M. I. *et al.* N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke. *Stroke* **44**, 3498–3508 (2013).
132. Baldwin, K. T., Carbajal, K. S., Segal, B. M. & Giger, R. J. Neuroinflammation triggered by β -glucan/dectin-1 signaling enables CNS axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2581–2586 (2015).
133. Everett, R. J. *et al.* Assessment of myocardial fibrosis with T1 mapping MRI. *Clin. Radiol.* **71**, 768–778 (2016).
134. Marques, M. D. *et al.* Myocardial fibrosis by T1 mapping magnetic resonance imaging predicts incident cardiovascular events and all-cause mortality: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **23**, 1407–1416 (2022).
135. Amano, Y. *et al.* T2-Weighted Cardiac Magnetic Resonance Imaging of Edema in Myocardial Diseases. *Sci. World J.* **2012**, 194069 (2012).
136. Montant, P., Sigovan, M., Revel, D. & Douek, P. MR imaging assessment of myocardial edema with T2 mapping. *Diagn. Interv. Imaging* **96**, 885–890 (2015).
137. Akutversorgung des akuten Myokardinfarktes. *springermedizin.de*
<https://www.springermedizin.de/akutversorgung-des-akuten-myokardinfarktes/9178786>.
138. Torabi, A., Cleland, J. G., Rigby, A. S. & Sherwi, N. Development and course of heart failure after a myocardial infarction in younger and older people. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* **11**, 1–12 (2014).
139. Lu, Y. *et al.* ER stress mediates Angiotensin II-augmented innate immunity memory and facilitates distinct susceptibilities of thoracic from abdominal aorta to aneurysm development. *Front. Immunol.* **14**, 1268916 (2023).
140. Lu, Y. *et al.* Aorta in Pathologies May Function as an Immune Organ by Upregulating Secretomes for Immune and Vascular Cell Activation, Differentiation and Trans-Differentiation-Early Secretomes may Serve as Drivers for Trained Immunity. *Front. Immunol.* **13**, 858256 (2022).
141. Christ, A. *et al.* Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* **172**, 162–175.e14 (2018).
142. Edgar, L. *et al.* Hyperglycemia Induces Trained Immunity in Macrophages and Their Precursors and Promotes Atherosclerosis. *Circulation* **144**, 961–982 (2021).
143. Riksen, N. P. & Netea, M. G. Immunometabolic control of trained immunity. *Mol. Aspects Med.* **77**, 100897 (2021).
144. Noz, M. P. *et al.* Trained Immunity Characteristics Are Associated With Progressive Cerebral Small Vessel Disease. *Stroke* **49**, 2910–2917 (2018).

145. Wendeln, A.-C. *et al.* Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* **556**, 332–338 (2018).
146. Braza, M. S. *et al.* Inhibiting Inflammation with Myeloid Cell-Specific Nanobiologics Promotes Organ Transplant Acceptance. *Immunity* **49**, 819–828.e6 (2018).
147. Leentjens, J. *et al.* Trained Innate Immunity as a Novel Mechanism Linking Infection and the Development of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **122**, 664–669 (2018).
148. Farina, J. M. *et al.* Infections and Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **81**, 71–80 (2023).
149. Drake, S. & Sandoe, J. Fungal cardiovascular infections. in *Oxford Textbook of Medical Mycology* (eds. Kibbler, C. C. *et al.*) 0 (Oxford University Press, 2018). doi:10.1093/med/9780198755388.003.0021.
150. Fizpatrick, F. W. & DiCarlo, F. J. Zymosan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **118**, 235–261 (1964).
151. Netea, M. G., Quintin, J. & van der Meer, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
152. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, aaf1098 (2016).
153. Mishra, V., Tripathi, V., Yadav, P. & Singh, M. P. Beta glucan as an immune stimulant in tumor microenvironment — Insight into lessons and promises from past decade. *Int. J. Biol. Macromol.* **234**, 123617 (2023).
154. Brichkina, A. & Simon, H.-U. A novel role for mitochondrial fission in macrophages: trained innate immunity induced by beta-glucan. *Cell. Mol. Immunol.* **20**, 864–866 (2023).
155. Venkatachalam, G., Arumugam, S. & Doble, M. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Aminated Zymosan. *ACS Omega* **5**, 15973–15982 (2020).
156. Volman, T. J. H., Hendriks, T. & Goris, R. J. A. ZYMOSAN-INDUCED GENERALIZED INFLAMMATION: EXPERIMENTAL STUDIES INTO MECHANISMS LEADING TO MULTIPLE ORGAN DYSFUNCTION SYNDROME. *Shock* **23**, 291–297 (2005).
157. Monroe, L. L. *et al.* Zymosan-induced peritonitis: Effects on cardiac function, temperature regulation, translocation of bacteria and role of dectin-1. *Shock Augusta Ga* **46**, 723–730 (2016).
158. Westman, P. C. *et al.* Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 2050–2060 (2016).
159. Nian, W., Huang, Z. & Fu, C. Immune cells drive new immunomodulatory therapies for myocardial infarction: From basic to clinical translation. *Front. Immunol.* **14**, 1097295 (2023).
160. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. *Science* **339**, 161–166 (2013).
161. Wang, L., Li, H., Tang, Y. & Yao, P. Potential Mechanisms and Effects of Efferocytosis in Atherosclerosis. *Front. Endocrinol.* **11**, (2021).
162. Matsumura, S. *et al.* Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* **115**, 599–609 (2005).
163. Iyer, R. P., Jung, M. & Lindsey, M. L. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **311**, H190–H198 (2016).
164. Cauwe, B., Martens, E., Proost, P. & Opdenakker, G. Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* **1**, 404–426 (2009).
165. Flögel, U. *et al.* Noninvasive detection of graft rejection by in vivo ¹⁹F MRI in the early stage. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 235–244 (2011).
166. Bönner, F. *et al.* Monocyte imaging after myocardial infarction with ¹⁹F MRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts. *Eur. Heart J. - Cardiovasc. Imaging* **16**, 612–620 (2015).
167. van Heeswijk, R. B. *et al.* Cardiovascular Molecular Imaging With Fluorine-19 MRI: The Road to the Clinic. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **16**, e014742 (2023).
168. Ebner, B. *et al.* Early Assessment of Pulmonary Inflammation By ¹⁹F MRI In Vivo. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **3**, 202 (2010).
169. Temme, S. *et al.* Beyond Vessel Diameters: Non-invasive Monitoring of Flow Patterns and Immune Cell Recruitment in Murine Abdominal Aortic Disorders by Multiparametric MRI. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, (2021).

170. Chavakis, T., Mitroulis, I. & Hajishengallis, G. Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nat. Immunol.* **20**, 802–811 (2019).
171. Chavakis, T., Wielockx, B. & Hajishengallis, G. Inflammatory Modulation of Hematopoiesis: Linking Trained Immunity and Clonal Hematopoiesis with Chronic Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **84**, 183–207 (2022).
172. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
173. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
174. Malengier-Devlies, B., Metzemaekers, M., Wouters, C., Proost, P. & Matthys, P. Neutrophil Homeostasis and Emergency Granulopoiesis: The Example of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
175. Hortová-Kohoutková, M. *et al.* Phagocytosis–Inflammation Crosstalk in Sepsis: New Avenues for Therapeutic Intervention. *Shock Augusta Ga* **54**, 606–614 (2020).
176. Kourtzelis, I., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
177. Maderna, P. & Godson, C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1639**, 141–151 (2003).
178. Daseke, M. J. *et al.* Neutrophil signaling during myocardial infarction wound repair. *Cell. Signal.* **77**, 109816 (2021).
179. Camilli, G. *et al.* Impaired phagocytosis directs human monocyte activation in response to fungal derived β -glucan particles. *Eur. J. Immunol.* **48**, 757–770 (2018).
180. Brown, G. D. & Gordon, S. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell. Microbiol.* **7**, 471–479 (2005).
181. Kalafati, L. *et al.* Innate Immune Training of Granulopoiesis Promotes Anti-tumor Activity. *Cell* **183**, 771–785.e12 (2020).
182. Steimbach, L. *et al.* Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients - A systematic review of clinical trials. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **40**, 3104–3113 (2021).
183. Hong, F. *et al.* Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res.* **63**, 9023–9031 (2003).
184. Allendorf, D. J. *et al.* C5a-Mediated Leukotriene B₄-Amplified Neutrophil Chemotaxis Is Essential in Tumor Immunotherapy Facilitated by Anti-Tumor Monoclonal Antibody and β -Glucan1. *J. Immunol.* **174**, 7050–7056 (2005).
185. Nienhaus, F. *et al.* Phagocytosis of a PFOB-Nanoemulsion for 19F Magnetic Resonance Imaging: First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *Molecules* **24**, 2058 (2019).
186. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623 (1999).
187. Day, R. A. *et al.* Systematic Study of Perfluorocarbon Nanoemulsions Stabilized by Polymer Amphiphiles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 38887–38898 (2020).
188. Herre, J. *et al.* Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**, 4038–4045 (2004).
189. Kimberg, M. & Brown, G. D. Dectin-1 and its role in antifungal immunity. *Med. Mycol.* **46**, 631–636 (2008).
190. Martínez, A. *et al.* TLR2 and Dectin-1 Signaling in Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Impacts the Ability of the Antigen Presenting Cells They Produce to Activate CD4 T Cells. *Cells* **9**, 1317 (2020).
191. Ozment, T. R., Goldman, M. P., Kalbfleisch, J. H. & Williams, D. L. Soluble Glucan Is Internalized and Trafficked to the Golgi Apparatus in Macrophages via a Clathrin-Mediated, Lipid Raft-Regulated Mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **342**, 808–815 (2012).
192. Noss, I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of fungal β -(1→6)-glucan in macrophages. *Innate Immun.* **21**, 759–769 (2015).
193. Solass, W. *et al.* Functional vascular anatomy of the peritoneum in health and disease. *Pleura Peritoneum* **1**, 145–158 (2016).
194. Bai, M. *et al.* CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* **130**, 2092–2100 (2017).

195. Geng, S., Pradhan, K. & Li, L. Signal-Strength and History-Dependent Innate Immune Memory Dynamics in Health and Disease. in *Toll-like Receptors in Health and Disease* (ed. Kumar, V.) 23–41 (Springer International Publishing, Cham, 2022). doi:10.1007/164_2021_485.
196. Blank, C. U. *et al.* Defining ‘T cell exhaustion’. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 665–674 (2019).
197. Ward, P. A. The dark side of C5a in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 133–142 (2004).
198. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol. Off. J. Can. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **2**, 98–108 (2006).
199. Hong, C.-W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* **17**, 298–306 (2017).
200. Gomes, N. E. *et al.* Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **43**, 853–858 (2010).
201. Obama, T. & Itabe, H. Neutrophils as a Novel Target of Modified Low-Density Lipoproteins and an Accelerator of Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8312 (2020).
202. Malech, H. L., DeLeo, F. R. & Quinn, M. T. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1124**, 3–10 (2014).
203. Filippi, M.-D. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* **133**, 2149–2158 (2019).
204. Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F. & Zychlinsky, A. The Neutrophil. *Immunity* **54**, 1377–1391 (2021).
205. Kalafati, L., Hatzioannou, A., Hajishengallis, G. & Chavakis, T. The role of neutrophils in trained immunity. *Immunol. Rev.* **n/a**,.
206. Checa, J. & Aran, J. M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J. Inflamm. Res.* **13**, 1057–1073 (2020).
207. de Oliveira, S., Rosowski, E. E. & Huttenlocher, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 378–391 (2016).
208. Khan, M., Farahvash, A. & Licht, J.-C. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
209. Beinert, T., Münzing, S., Possinger, K. & Krombach, F. Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 369–373 (2000).
210. Fukushima, K., Nabeshima, H. & Kida, H. Revealing the diversity of neutrophil functions and subsets. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 781–783 (2021).
211. van Leent, M. M. T. *et al.* Regulating trained immunity with nanomedicine. *Nat. Rev. Mater.* **7**, 465–481 (2022).
212. Serhan, C. N. & Levy, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* **128**, 2657–2669 (2018).

8. Publikationsliste

8.1. Veröffentlichungen

Fluorine-19 Magnetic Resonance Imaging of Activated Platelets - Xiaowei Wang, Sebastian Temme, Christoph Grapentin, Jathushan Palasubramaniam, Aidan Walsh, Wolfgang Krämer, Patricia Kleimann, Asli Havlas, Rolf Schubert, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel, Karlheinz Peter - 2020, in Journal of the American Heart Association, <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016971>

¹⁹F-MRT basierte Visualisierung von entzündlichen Prozessen im Gefäßsystem - Sebastian Temme, Florian Simon, Patricia Kleimann, Pascal Bouvain, Maria Grandoch, Johannes Stegbauer, Ulrich Flögel - 2022, in Gefäßchirurgie, <https://doi.org/10.1007/s00772-022-00947-5>

Aktives Targeting zur Visualisierung von thrombotischen Prozessen mittels ¹⁹F-MRT - Sebastian Temme, Patricia Kleimann, Maria Grandoch, Xiaowei Wang, Karlheinz Peter, Florian Simon, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel - 2022, in Gefäßchirurgie, <https://doi.org/10.1007/s00772-022-00961-7>

Non-invasive mapping of systemic neutrophil dynamics upon cardiovascular injury - Pascal Bouvain, Zhaoping Ding, Shiwa Kadir, Patricia Kleimann, Nils Kluge, Zeynep-Büsra Tiren, Bodo Steckel, Vera Flocke, Ria Zalfen, Patrick Petzsch, Thorsten Wachtmeister, Gordon John, Nirojah Subramaniam, Wolfgang Krämer, Tobias Strasdeit, Mehrnaz Mehrabipour, Jens M. Moll, Rolf Schubert, Mohammad Reza Ahmadian, Florian Bönner, Udo Boeken, Ralf Westenfeld, Daniel Robert Engel, Malte Kelm, Jürgen Schrader, Karl Köhrer, Maria Grandoch, Sebastian Temme, Ulrich Flögel - 2023, in Nature Cardiovascular Research, <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00210-w>

Bildgebung von thromboentzündlichen Prozessen durch multispektrale ¹⁹F-MRT - Patricia Kleimann, Pascal Bouvain, Christoph Jacoby, Florian Simon, Ulrich Flögel, Sebastian Temme - 2023, in Gefäßchirurgie, <https://doi.org/10.1007/s00772-023-01045-w>

Trained innate immunity in animal models of cardiovascular diseases - Patricia Kleimann, Lisa-Marie Irschfeld, Maria Grandoch, Ulrich Flögel, Sebastian Temme - 2024, in International Journal of Molecular Sciences, <https://doi.org/10.3390/ijms25042312>

Transient high salt intake aggravates T cell-mediated hypertensive vascular injury - Mina Yakoub, Masudur Rahman, Patricia Kleimann, Jasmina Hoffe, Milena Feige, Pascal Bouvain, Christina Alter, Jennifer Kluczny, Sophia Reidel, Rianne Nederlof, Lydia Hering, Doron Argov, Denada Arifaj, Marta Kantauskaite, Jaroslawna Meister, Markus Kleinewietfeld, Lars Rump, Jonathan Jantsch, Ulrich Flögel, Dominik Müller, Sebastian Temme, Johannes Stegbauer - 2024, in Revision bei Hypertension

Inflammatory stimuli impact on cellular uptake and biodistribution of perfluorocarbon nanoemulsions - Katrin Becker, Zhaoping Ding, Pascal Bouvain, Jeny Koshy, Timo Massold, Patricia Kleimann, Ulrich Flögel, Sebastian Temme - 2024, in Revision bei Journal of Leukocyte Biology

A robust flow cytometric approach for phenotypical and functional analysis of human monocyte subsets in healthy and diseased states - Talia Ahrazoglu, Jennifer-Isabel Kluczny, Patricia Kleimann, Lisa-Marie Irschfeld, Fabian Nienhaus, Florian Bönner, Norbert Gerdes, Sebastian Temme - 2024, in Revision bei Biomolecules

Zymosan-induced trained innate immunity aggravates myocardial infarction - Patricia Kleimann, Zhaoping Ding, Pascal Bouvain, Ulrich Flögel, Sebastian Temme - 2024, Manuskript in Vorbereitung

8.2. Kongressbeiträge

European Molecular Imaging Meeting - EMIM, Thessaloniki, Griechenland, 2022 - Poster-Präsentation: Visualization of key players in thromboinflammation by multiplex ^{19}F MRI

Red Hot Fluorine (^{19}F) MRI and Small Animal MRI Symposiums (SAMS) - Düsseldorf, Deutschland, 2022 - Poster-Präsentation: Visualization of key players in thromboinflammation by multiplex ^{19}F MRI

Deutscher Anästhesiecongress - DAC, Düsseldorf, Deutschland, 2023 - Poster-Präsentation: Simultane Visualisierung inflammatorischer Zielstrukturen mittels Multiplex ^{19}F -MRT

European Molecular Imaging Meeting - EMIM, Porto, Portugal, 2024 - Vortrag: Imaging of zymosan induced functional alterations of phagocytic immune cells by $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI

European Congress of Immunology - ECI, Dublin, Irland, 2024 - Poster-Präsentation: Zymosan-induced trained innate immunity in mice aggravates myocardial infarction

9. Anhang

9.1. MRT-Messparameter

Ergänzende Tabelle 1: Auflistung der für Herz, Knochenmark und Matrigel eingesetzten ¹H- und ¹⁹F-MRT- sowie T1- und T2-Mapping-Messparameter

Scan	Sequenz	TE [ms]	N° of Rep.	N° of Avg.	TR [ms]	T _{Acq}	FOV [mm ²]	Matrix	TH [mm]	RARE Faktor	α
¹ H Herz	FLASH	1,262	150	1	5,8	1 min 53 sec	30 x 30	256 x 256	1	/	12°
¹ H Knochenmark	RARE	4,368	1	2	4000	2 min 8 sec	25,6 x 40	256 x 256	1	16	180°
¹ H Matrigel	RARE	4,435	1	4	2500	2 min 40 sec	25,6 x 25,6	256 x 256	1	16	180°
T1 Herz	FLASH	1,262	100	1	5,8	1 min 16 sec	30 x 30	256 x 256	1	/	2°, 5°, 8°, 11°, 14°
T1 Knochenmark	FLASH	1,262	100	1	11,6	2 min 30 sec	25,6 x 40	256 x 256	1	/	2°, 5°, 8°, 11°, 14°
T1 Matrigel	FLASH	1,262	100	1	5,8	1 min 16 sec	25,6 x 25,6	256 x 256	1	/	2°, 5°, 8°, 11°, 14°
T2 Herz	ME	3,356	1	4	500	4 min 16 sec	30 x 30	128 x 128	1	/	171°
T2 Knochenmark	ME	3,356	1	2	500	2 min 8 sec	25,6 x 40	128 x 128	1	/	133°
T2 Matrigel	ME	3,356	1	4	500	4 min 16 sec	25,6 x 25,6	128 x 128	1	/	180°
¹⁹ F Herz	RARE	4,368	1	256	2500	21 min 20 sec	30 x 30	64 x 64	1	32	180°
¹⁹ F Knochenmark	RARE	4,368	1	256	2500	21 min 20 sec	25,6 x 40	64 x 64	1	32	180°
¹⁹ F Matrigel	RARE	4,368	1	256	2500	21 min 20 sec	25,6 x 25,6	64 x 64	1	32	180°

Abkürzungsverzeichnis:

FLASH = Fast low angle shot

RARE = Rapid acquisition with relaxation enhancement

ME = Multi-echo

TE = echo time

N° of Rep. = number of repetitions

N° of Avg. = number of averages

TR = repetition time

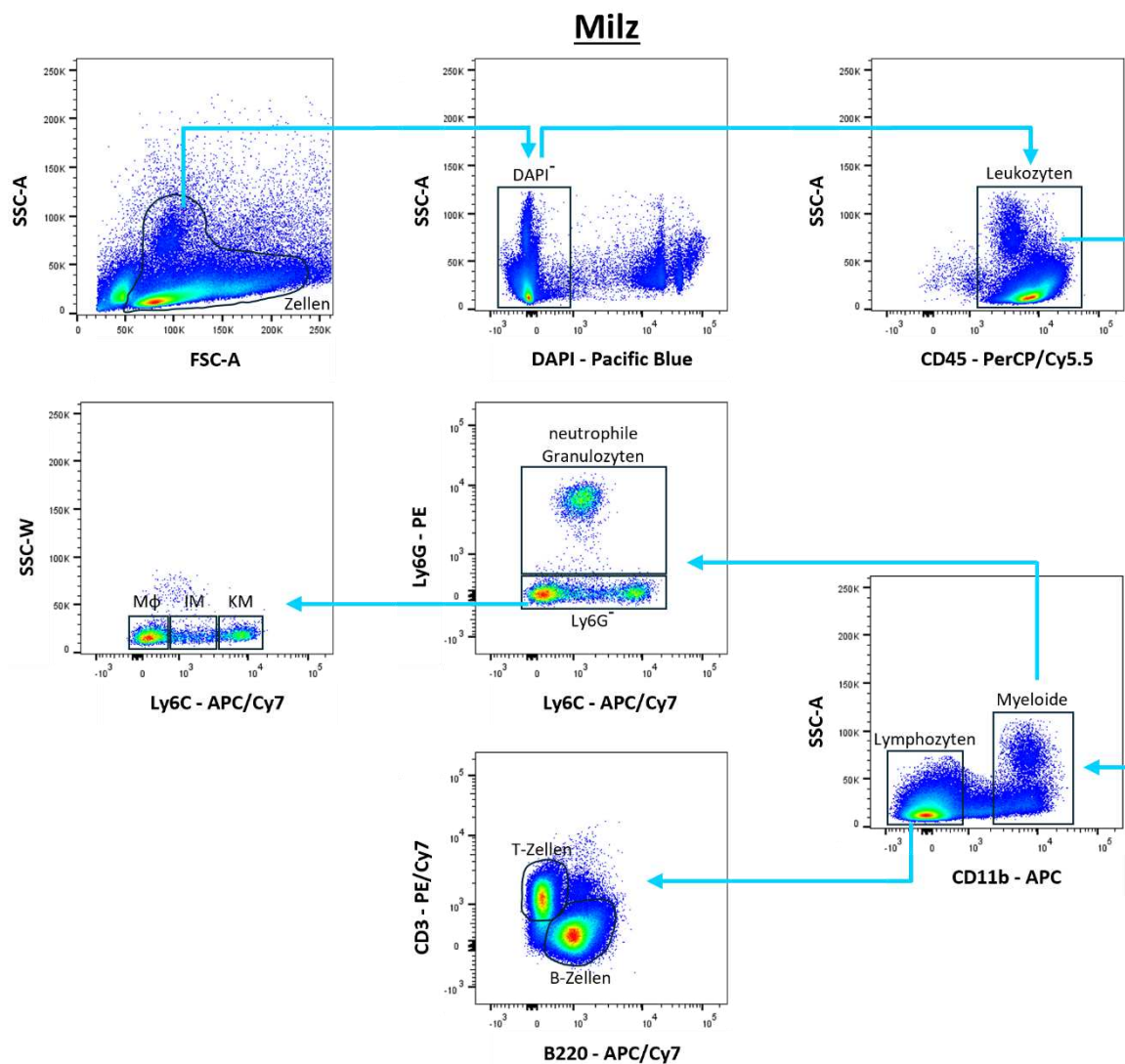
T_{Acq} = acquisition time

FOV = field of view

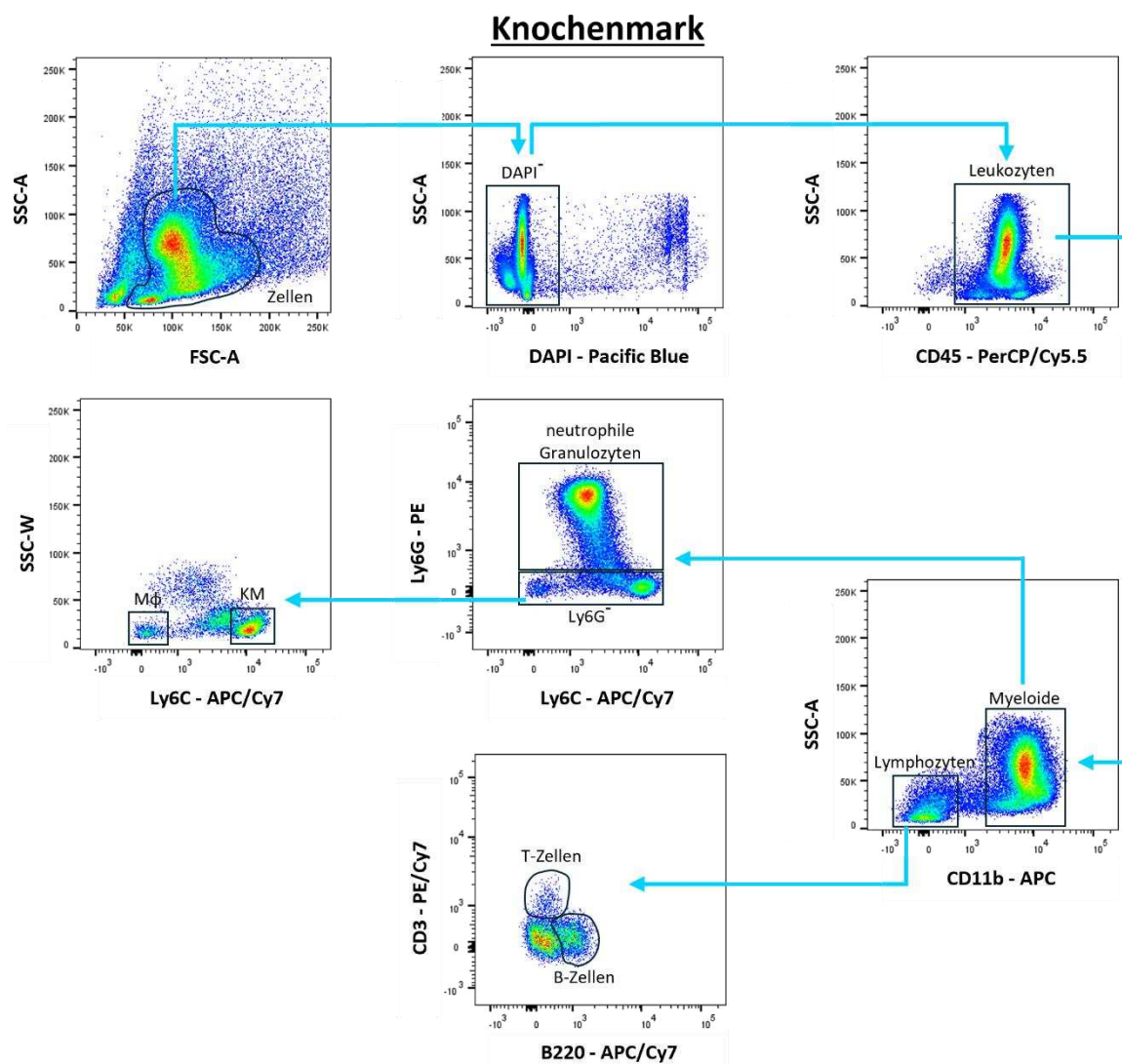
TH = slice thickness

α = flip angle

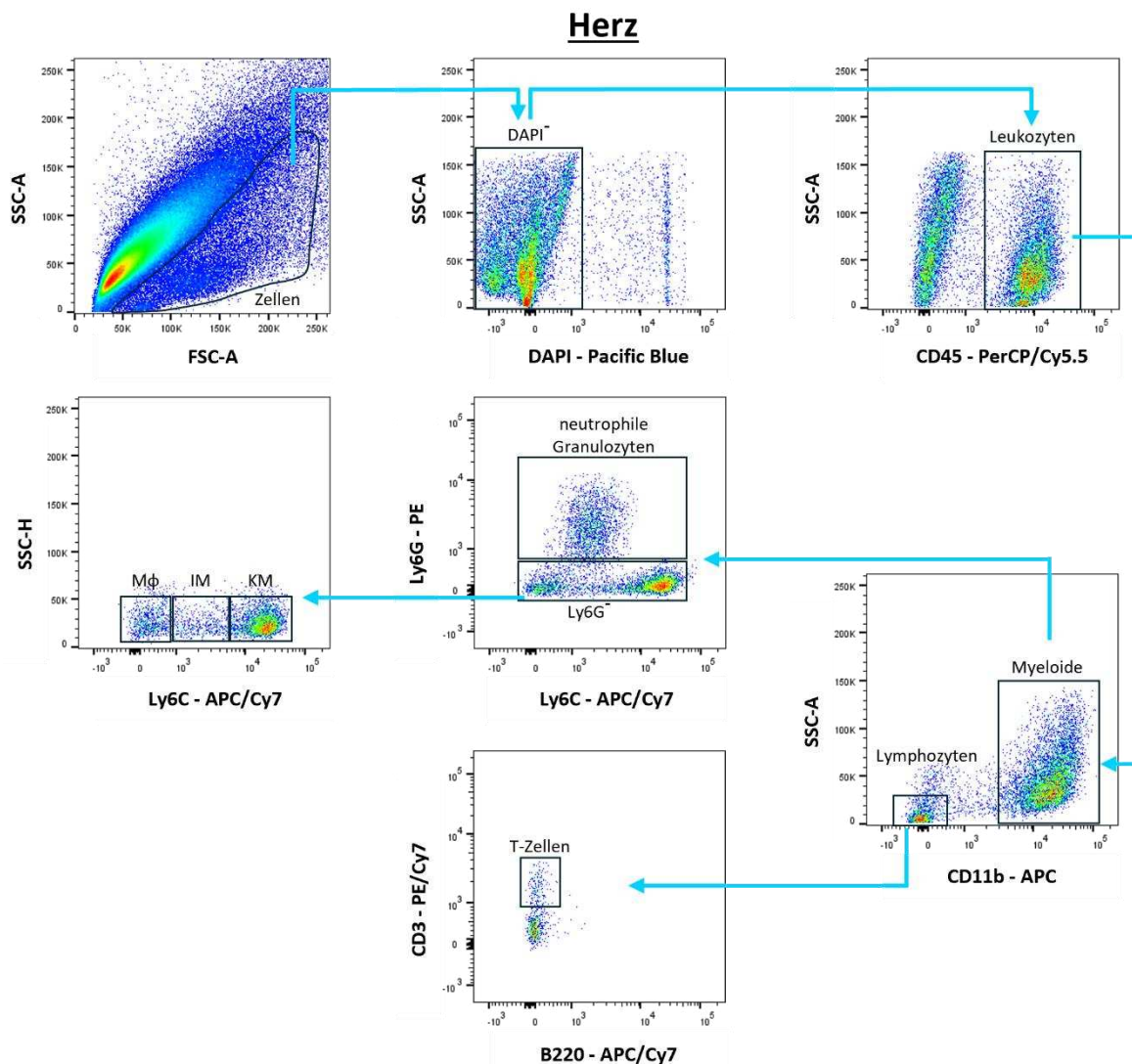
9.2. Gating-Strategien für Immunzellen aus Milz, Knochenmark, Herz und Matrigel



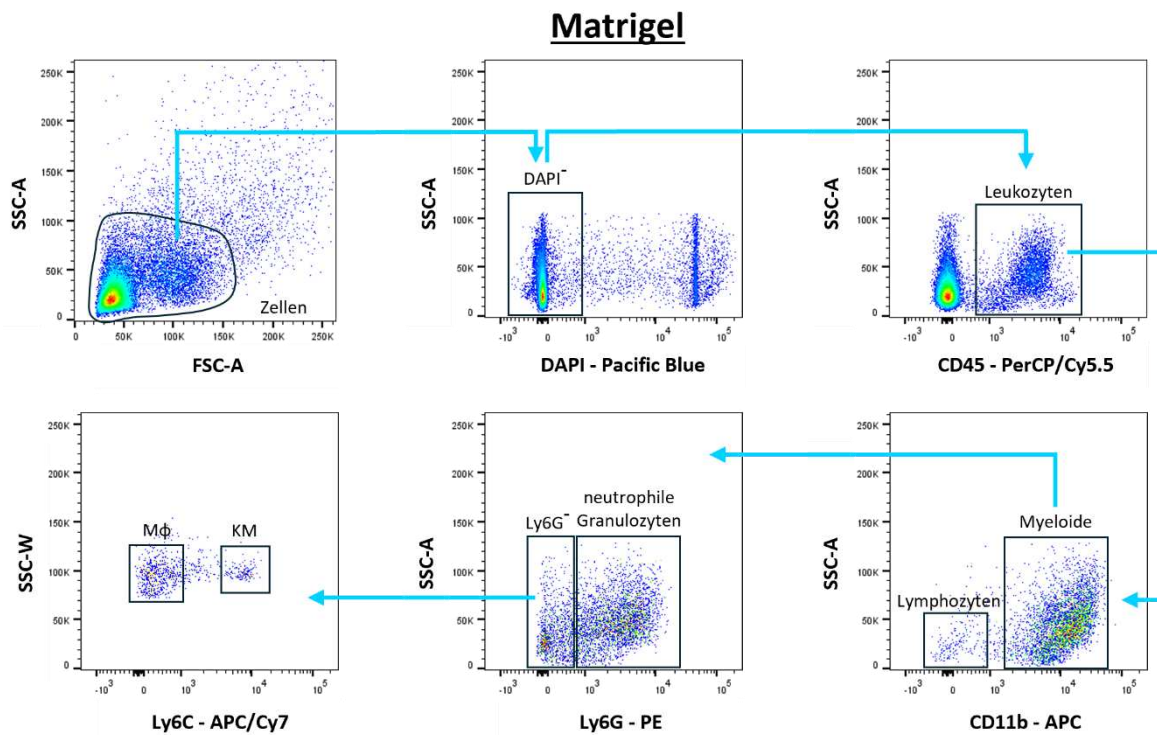
Ergänzende Abb. 1: Gating-Strategien für Immunzellen aus der Milz. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC myeloide Zellen (CD11b⁺) und Lymphozyten (CD11b⁻) differenziert. Aus den myeloiden Zellen werden über Ly6G-PE neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) und Ly6G-negative (Ly6G⁻)-Zellen unterschieden. Ly6G⁻-Zellen können weiter über Ly6C-APC/Cy7 in klassische (KM) sowie intermediäre Monozyten (IM) und Makrophagen (M_φ) unterteilt werden. Lymphozyten werden über CD3-PE/Cy7 und B220-APC/Cy7 in T- und B-Zellen differenziert.



Ergänzende Abb. 2: Gating-Strategien für Immunzellen aus dem Knochenmark. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI-) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC myeloide Zellen (CD11b⁺) und Lymphozyten (CD11b⁻) differenziert. Aus den myeloiden Zellen werden über Ly6G-PE neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) und Ly6G-negative (Ly6G⁻)-Zellen unterschieden. Ly6G⁻-Zellen können weiter über Ly6C-APC/Cy7 in klassische Monozyten (KM) sowie Makrophagen (M ϕ) unterteilt werden. Lymphozyten werden über CD3-PE/Cy7 und B220-APC/Cy7 in T- und B-Zellen differenziert.

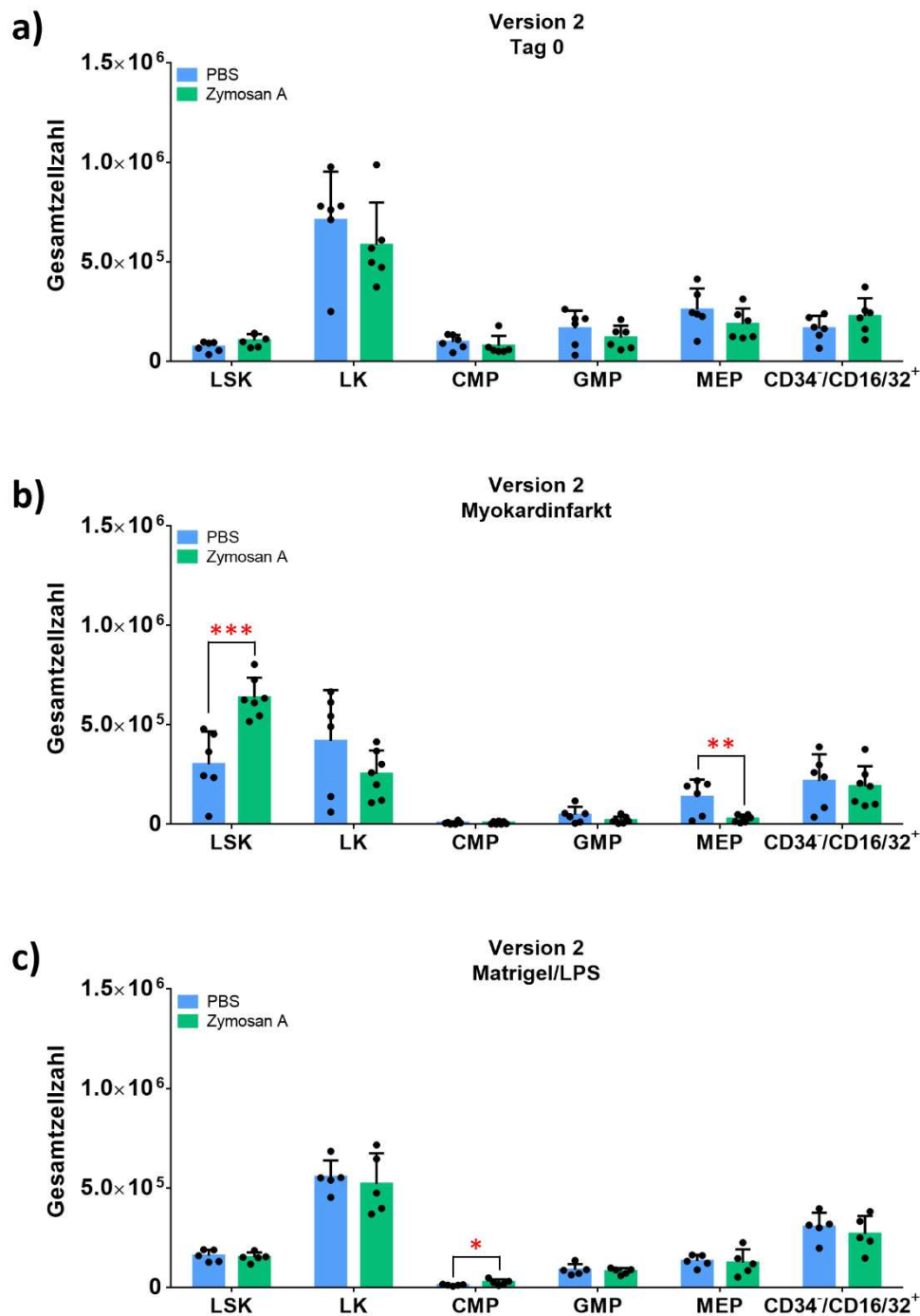


Ergänzende Abb. 3: Gating-Strategien für Immunzellen aus dem Herz. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC myeloide Zellen (CD11b⁺) und Lymphozyten (CD11b⁻) differenziert. Aus den myeloiden Zellen werden über Ly6G-PE neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) und Ly6G-negative (Ly6G⁻)-Zellen unterschieden. Ly6G⁻-Zellen können weiter über Ly6C-APC/Cy7 in klassische (KM) sowie intermediäre Monozyten (IM) und Makrophagen (M ϕ) unterteilt werden. Aus den Lymphozyten werden über CD3-PE/Cy7 und B220-APC/Cy7 T-Zellen bestimmt.



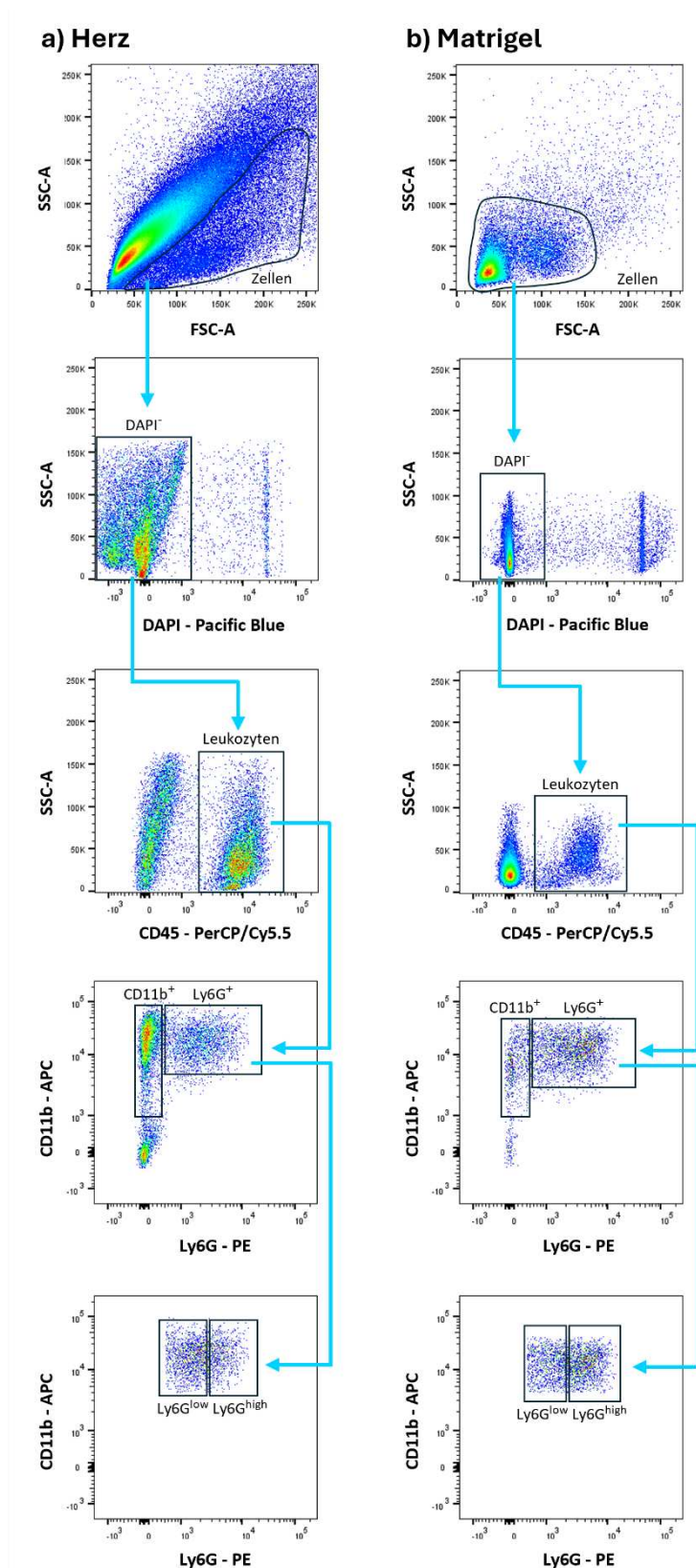
Ergänzende Abb. 4: Gating-Strategie für Immunzellen aus dem Matrigel. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC myeloide Zellen (CD11b⁺) und Lymphozyten (CD11b⁻) differenziert. Aus den myeloiden Zellen werden über Ly6G-PE neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) und Ly6G-negative (Ly6G⁻)-Zellen unterschieden. Ly6G⁻-Zellen können weiter über Ly6C-APC/Cy7 in klassische (KM) und Makrophagen (Mφ) unterteilt werden.

9.3. Ergebnisse der zweiten *Gating*-Strategie für Stamm- und Vorläuferzellen nach ZyA-Behandlung



Ergänzende Abb. 5: Einfluss von ZyA auf die Hämatopoese im Knochenmark. Gezeigt ist die quantitative Analyse der LSK-Population (Stammzellen) und LK-Population (Vorläuferzellen), die weiter in CMP (*common myeloid progenitor*), GMP (*granulocyte-monocyte progenitor*) sowie MEP (*megakaryocyte-erythrocyte progenitor*) und in die undefinierte Population der CD34-/CD16/32⁺-Zellen mithilfe des zweiten Gating-Schemas (Version 2) unterteilt wurde. Die Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen erfolgte an **a)** Tag 0 nach alleiniger ZyA- bzw. PBS-Behandlung sowie an Tag 2 nach zweitem Stimulus: **b)** Myokardinfarkt oder **c)** Matrigel/LPS-Implantation. Abgebildet sind Mittelwerte $\pm$ SD; a)/b) n = 6, c) n = 5. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

9.4. Gating-Strategie für Ly6G^{low}-Zellen aus dem Herz und dem Matrigel



Ergänzende Abb. 6: Gating-Strategie für Ly6G^{low}-Zellen aus a) dem Herz und b) dem Matrigel. Über den *Side* (SSC-A) und *Forward Scatter* (FSC-A) werden zunächst die gewünschten Zellen allgemein ausgewählt. Daraus werden die lebenden Zellen (DAPI⁻) mithilfe einer DAPI-Färbung bestimmt. Mithilfe von CD45-PerCP/Cy5.5 werden Leukozyten und daraus über CD11b-APC und Ly6G-PE myeloide Zellen (CD11b⁺) und neutrophile Granulozyten (Ly6G⁺) differenziert. Die Ly6G⁺-Zellen können anschließend in zwei Subpopulationen unterteilt werden: Ly6G^{low} und Ly6G^{high}.

10. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation stets unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an Sebastian Temme, der mir nicht nur die Möglichkeit gab, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, sondern mich auch schon bei meiner Bachelor- und Masterarbeit betreut hat. Ich danke dir für den stetigen fachlichen Austausch, die Unterstützung bei allen Projekten (auch wenn sie mal nicht so laufen, wie man es sich vorstellt) und deine immerwährende Positivität.

Zudem danke ich Uli Flögel und Herrn Prof. Jürgen Schrader, die es mir ermöglicht haben, die Labore und Geräte des Instituts für Molekulare Kardiologie und der Abteilung für Experimentelle Kardiovaskuläre Bildgebung zu nutzen.

Herrn Prof. Axel Gödecke danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Claudia Dohle und Amin Zennati aus der Klinik für Anästhesiologie, Annika Zimmermann aus dem Institut für Translationale Pharmakologie sowie Bodo Steckel aus dem Institut für Molekulare Kardiologie, die mich experimentell unter anderem bei der Anfertigung histologischer Schnitte und der Messung reaktiver Sauerstoffspezies unterstützt haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die stets gute Zusammenarbeit und die Gewissheit, dass man bei Fragen oder Problemen auf jeden Fall eine Antwort sowie eine Lösung findet. Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Zhaoping Ding für die großartige Durchführung der Herzinfarkt-Operationen. Außerdem geht ein großer Dank an Tamara Straub, ohne die ich wahrscheinlich nie in dieser Arbeitsgruppe gelandet wäre.

Besonders hervorheben möchte ich Pascal Bouvain, der nicht nur fachlich ein toller Ansprechpartner ist, sondern auch der beste und lustigste Arbeitskollege, der ein echter Freund geworden ist. Ich bin mehr als glücklich, dass wir uns (mit Frau Menke) ein Büro geteilt haben und ich mich darauf verlassen konnte, dass du mir im Labor zur Seite stehst.

Auch den (zahn)medizinischen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe, Lisa, Georgina, Vanessa, Talia, Timo und Fady, möchte ich danken. Es war nicht nur schön, mit euch zusammenzuarbeiten und die ein oder andere Inkubationszeit für einen Plausch zu nutzen, sondern auch einige gemütliche Abende bei leckerem Essen mit euch zu verbringen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer ein offenes Ohr hatten und mich auch mal mit nicht-wissenschaftlichen Themen abgelenkt haben. Meiner Patentante danke ich besonders für das akribische Korrekturlesen. Unter meinen Freunden möchte ich vor allem Kiku und Maren erwähnen. Ohne euch wäre allein das Bachelorstudium nur halb so lustig gewesen und ich freue mich über jedes weitere Treffen bei koreanischem Essen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich schon mein ganzes Leben lang aus tiefstem Herzen unterstützen und mich auf meinem Weg begleiten. Ich danke euch für alles, was ihr mir in all den Jahren ermöglicht habt. Außerdem habt ihr euch nicht nur alle Geschichten aus dem Labor angehört, sondern schon im Bachelorstudium mit mir gelernt. Ich werde euch auch noch in zehn Jahren fragen, was Libelle auf „schlau“ heißt – Odonata.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe die Stellen gekennzeichnet, die ich wörtlich oder inhaltlich den benutzten Quellen entnommen habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Ich versichere, dass alle von mir gemachten Angaben wahrheitsgemäß und vollständig sind.

Düsseldorf, 27.08.2024

Ort, Datum

Patricia Klümann

Unterschrift