

Aus der Klinik für Innere Medizin III
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Direktor Prof. Dr. med. M. Böhm
Fachbereich Klinische Medizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen bei Patienten im kardiogenen Schock

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2015

vorgelegt von **Dr. rer. nat. María del Rosario Espinoza Mora**
geb. am 01.02.1980 in San José, Costa Rica

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung	7
	2.1 Inflammation in der Pathogenese von akuten Koronarsyndromen	7
	2.2 Infarktbedingter kardiogener Schock	9
	2.3 T-Zellantwort bei akuten Koronarsyndromen	10
	2.4 Regulatorischer T-Zellen (Treg-Zellen)	11
	2.5 Andere T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften	12
	2.6 2.Funktionen der Regulatorischen T-Zellen	13
	2.7 T-Helferzellen-Typ 17 (Th17-Zellen)	14
	2.8 Th17- und Treg-Zellen bei akuten Koronarsyndromen	17
	2.9 Eigene Fragestellung und Zielsetzung	20
3	Methoden und Materialien	21
	3.1 Studiendesign und Studienpopulation	21
	3.1.1 Studiendesign	21
	3.1.2 Probanden und Kontrollkollektive	22
	3.1.3 Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock	22
	3.2 Hämodynamische Messungen	23
	3.3 Blutproben und Laboranalyse	24
	3.4 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	25
	3.5 Generelle Bedingungen der Zellkultur	25
	3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
	3.7 Zellzählung	26
	3.8 Durchflusszytometrie	26
	3.8.1 Foxp3 Färbung	26
	3.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung	27
	3.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	28
	3.10 Statistische Analyse	29
	3.11 Materialien	30
	3.11.1 Laborgeräte	30
	3.11.2 Plastikwaren	30
	3.11.3 Chemikalien	31

3.11.4 Reagenzien für biochemische und zellbiologische Arbeiten	31
3.11.5 Antikörper	31
3.11.6 Medien für eukaryotische Zellen	31
3.11.7 Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten	32
3.11.8 Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten	32
4 Ergebnisse	34
4.1 „Baseline“ Charakteristika	34
4.2 Inflammatorische Proteine.....	35
4.3 T-Helferzellpopulationen	37
4.4 Intrazelluläre Expression von Zytokinen.....	40
4.5 Zirkulierende Zytokine.....	40
5 Diskussion	42
5.1 Regulatorischer T-Zellen und das Zytokinprofil im Schock.....	43
5.2 Regulatorische T-Zellen und die Th1-/Th17-Immunantwort im Schock.....	43
5.3 Antiinflammatorische Zytokine in T-Zellpopulationen im Schock.....	44
5.4 Transforming growth factor β (TGF β) im kardiogenen Schock	44
5.5 Interleukin 6 im kardiogenen Schock	45
5.6 Interleukin 17 im kardiogenen Schock.....	45
5.7 Perspektiven dieser Arbeit	46
6 Schlussfolgerung	47
7 Literaturverzeichnis	48
8 Abkürzungsverzeichnis	54
9 Danksagung	58
10 Publikationen	59
10.1 Nutzungsberechtigung	60
11 Lebenslauf	61

1 Zusammenfassung

Einleitung: Typ 17 Helfer T (Th17) Zellen produzieren das proinflammatorische Zytokin Interleukin (IL)-17. Regulatorische T-Zellen (Treg), welche antiinflammatorische Zytokine wie „transforming growth factor beta (TGF β) und Interleukin (IL)-10 sezernieren, sind in der Lage Th17-Zellen zu inhibieren. Ein Ungleichgewicht des Verhältnisses zwischen Th17- und Treg-Zellen (Th17/Treg-Ratio) in Richtung der Th17-Zellpopulation ist in die Pathogenese der Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque und damit des akuten Koronarsyndroms (ACS) involviert. Daten bezüglich einer Auswirkung der Verschiebung des Th17/Treg Gleichgewichts in infarktbedingtem kardiogenem Schock (CS) existieren nicht. Das Ziel dieser Studie ist es, die Rolle der Th17/Treg-Ratio bei Patienten im infarktbedingtem kardiogenem Schock zu evaluieren.

Methoden: In dieser monozentrischen Beobachtungsstudie wurden Blutproben von altersentsprechenden gesunden Kontrollen (healthy controls, HC, n = 20), von Patienten mit unkompliziertem akutem Myokardinfarkt (AMI, n = 20), von Patienten mit infarktbedingtem kardiogenem Schock, die zumindest 28 Tage überlebten (cardiogenic shock survivors, CS-S, n = 20), und von nichtüberlebenden Patienten im kardiogenem Schock (cardiogenic shock, non-survivors, CS-NS, n = 20) analysiert. Zirkulierende Th17-Zellen und Treg-Zellen, sowie ihre intrazellulären Zytokinexpressionen, wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Konzentrationen der zirkulierenden Th17-assoziierten proinflammatorischen Zytokine, IL-6 und IL-17, und der Treg assoziierten antiinflammatorischen Zytokine, TGF β und IL-10, wurden anhand „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) bestimmt.

Ergebnisse: In Abhängigkeit des klinischen Schweregrades eines akuten Myokardinfarktes hatten Patienten im infarktbedingtem kardiogenem Schock, welche nicht überlebten (CS-NS), die höchste Anzahl an Th17-Zellen ($p < 0.001$) und die niedrigste Anzahl an Treg-Zellen ($p < 0.001$), was eine Verschiebung der Th17/Treg-Ratio in Richtung einer proinflammatorischen Th17-Antwort zur Folge hatte ($p < 0.001$). Die Veränderung dieser T-Zellpopulationen ermöglicht die Etablierung eines proinflammatorischen Zytokinmilieus mit erhöhter Sekretion von IL-6 ($p < 0.001$) und IL-17 ($p < 0.001$) und eine Reduktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF β ($p < 0.001$) und IL-10 ($p = 0.057$).

Schlussfolgerung: Bei Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock könnte eine Th17/Treg-Ratio zugunsten einer Th17-Antwort einen weiteren Parameter für eine ungünstige Prognose darstellen und ihre Modulationen ein neuer Therapieansatz in der Behandlung des kardiogenen Schocks sein. Hierzu bedarf es weiterer klinischer Studien mit größeren Fallzahlen.

Summary

Introduction: Type 17 helper T (Th17) cells producing the pro-inflammatory signature cytokine interleukin (IL)-17 are counterregulated by regulatory T cells (Treg) producing anti-inflammatory cytokines like transforming growth factor (TGF)- β and interleukin-(IL)-10. An imbalance of the Th17/Treg ratio towards Th17 cell subset was shown to be involved in plaque destabilization and acute coronary syndrome (ACS), while no data exist in cardiogenic shock (CS). The objective of this study was to evaluate the role of Th17/Treg and their related cytokines in complicated ACS. Uncomplicated acute myocardial infarction (AMI) and infarction-related cardiogenic shock (CS) were compared with healthy controls.

Methods: In an observational mono-centric study blood sample from age-matched healthy controls (HC, n=20), patients with uncomplicated AMI (n=20), patients with CS who survived for at least 28 days (CS survivors, n=20) and CS non-survivors (n=20) were analysed. Circulating Th17 and Treg cell subsets and their intracellular cytokine expression were measured by flow cytometry and associated with circulating pro-inflammatory Th17 derived cytokines IL-6, IL-17 and their anti-inflammatory Treg derived cytokines TGF β and IL-10 measured by enzyme immunoassay.

Results: According to the severity of ACS, CS non-survivors showed the highest levels of Th17 ($p < 0.001$) and the lowest levels of Treg cells ($p < 0.001$) favouring a Th17/Treg imbalance toward the pro-inflammatory Th17 response ($p < 0.001$). Changes of T cell subsets were also associated with a pro-inflammatory cytokine expression measured by increased IL-6 ($p < 0.001$) and IL-17 levels ($p < 0.001$) and decreased TGF β ($p < 0.001$) and IL-10 levels ($p = 0.057$).

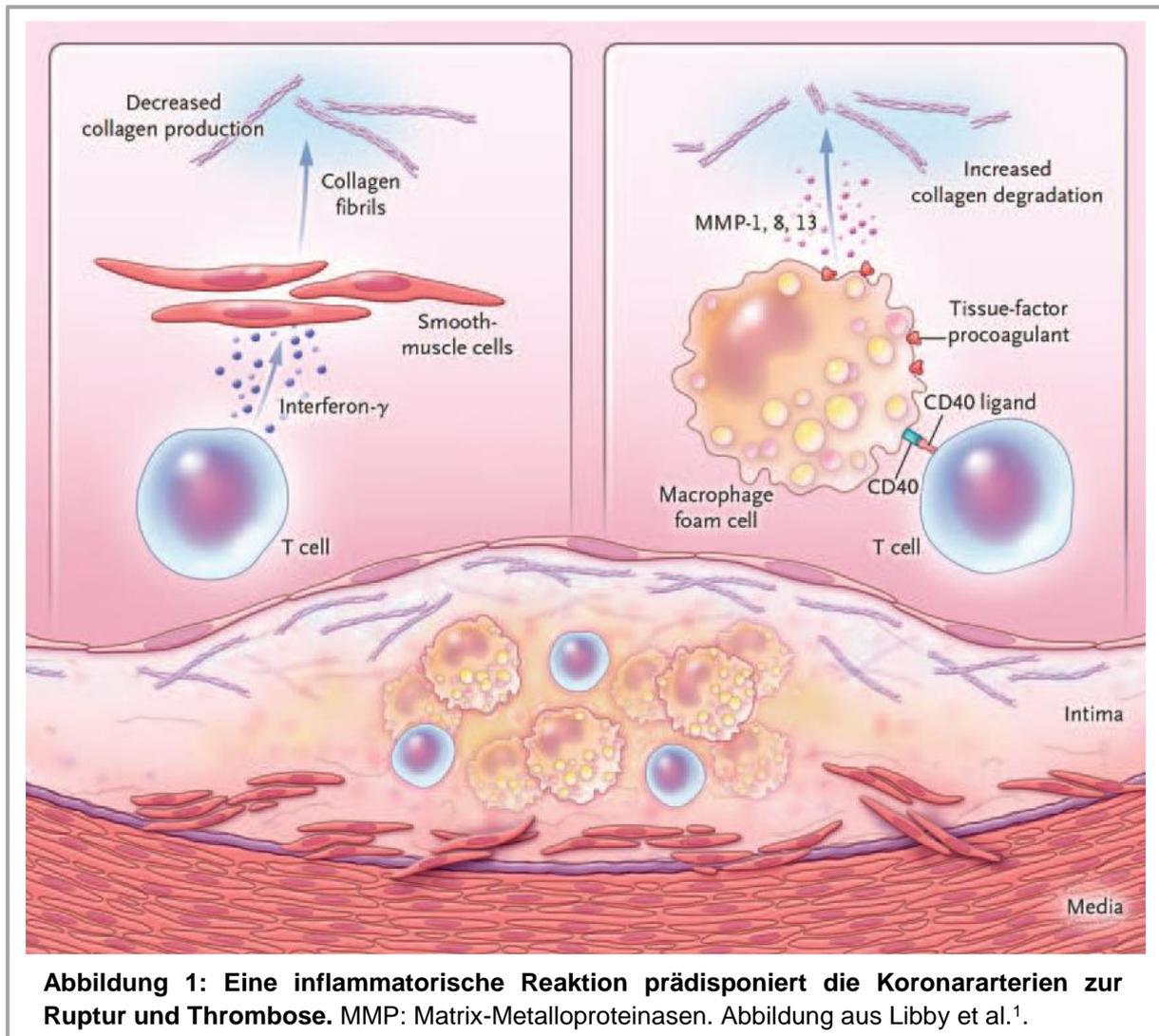
Conclusion: A Th17/Treg imbalance toward a Th17 shift might represent a promising candidate as therapeutic target and risk indicator in cardiogenic shock. Further studies are required to investigate this.

2 Einleitung

2.1 Inflammation in der Pathogenese von akuten Koronarsyndromen

Akute Koronarsyndrome – wie die instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt (AMI), der infarktbedingte kardiogene Schock (CS) – sind in der Regel auf eine Instabilität und Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit konsekutiver Thrombenbildung zurückzuführen¹. Wenngleich die Ursachen für eine Plaqueruptur bis heute nicht geklärt sind, konnte in den letzten Jahren immer wieder gezeigt werden, dass inflammatorische Signalwege des angeboren und des erworbenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei einer Plaqueruptur und Thombusbildung spielen². Als Auslöser einer Immunreaktion werden zum einen exogene Faktoren, sog. „pathogen associated patterns“ (PAMPs), diskutiert wie z. B. gramnegative Bakterien (z.B. *Chlamydia pneumoniae*)^{3,4}, Viren (Cytomegalovirus, Herpes simplex)^{5,6}, oxidiertes LDL⁷, mikrobielle und humane *Heat Shock Proteine* (HSP)⁸. Zum anderen können aber auch endogene Faktoren, sog. „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), welche im Rahmen von Ischämie und Reperfusion durch Gewebeschädigung freigesetzt werden, wie z. B. High Mobility Group Box 1 (HMGB1)⁹ oder *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs)^{10,11}, das angeborenen und das erworbene Immunsystem aktivieren und zur einer Destabilisierung und Ruptur der Plaque beitragen¹².

Der Bereich einer Plaque mit dem größten Rupturrisiko ist die fibröse Kappe, welche eine hohe Dichte aktivierter T-Zellen, insbesondere CD4⁺ T-Lymphozyten, aufweist^{13,14}. Aktivierte Th1-Zellen segregieren Interferon-(IFN)- γ , das die Produktion neuen interstitiellen Kollagens, welches für die Wiederherstellung und Erhaltung der fibrösen Schutzschicht eines Atheroms notwendig ist, verhindert¹⁵⁻¹⁷. T-Zellen können auch durch die Expression des CD40 Liganden (CD154), der den korrespondierenden Rezeptor auf Phagozyten aktiviert, eine Läsion in der Intima der Gefäßwand induzieren. Dieser inflammatorische Signalweg verursacht eine Überproduktion an interstitiellen Kollagenasen (Matrix-Metalloproteinasen [MMPs] 1, 8 und 13), dem initialen Schritt der Kollagenzerstörung¹⁸ (Abbildung 1).



Die CD40-Ligation führt auch zu einer Überexpression von Prokoagulanzen durch Makrophagen (z.B. *tissue-factor procoagulant*). Dementsprechend führt der entzündliche Signalweg zu einer doppelten Gefährdung für das Kollagen in der fibrösen Kappe der Plaque, eine verringerte Neusynthese und eine erhöhte Schädigung machen die Schutzschicht anfällig für Rupturen. Die inflammatorische Aktivierung verstärkt auch die Produktion von Thromboplastin (Faktor III, Gewebefaktor, CD142), das die Thrombusbildung in einer rupturierten Plaque auslöst. Mittels dieser Mechanismen können Entzündungsreaktionen in einer Plaque zu thrombotischen Komplikationen in Atherosklerose führen, welche klinisch in Form akuter Koronarsyndrome imponieren¹. Durch Apoptose aber auch durch Ischämie und Reperfusion bedingte Gewebsschädigungen werden körpereigene Liganden freigesetzt, sog. DAMPs, welche die Inflammation auslösen und unterhalten können

2.2 Infarktbedingter kardiogener Schock

Der infarktbedingte kardiogene Schock, der sich meistens als Folge eines linksventrikulären Versagens manifestiert, ist mit einer Mortalität von 30 bis 80 % die häufigste Todesursache beim akuten Herzinfarkt²¹. Eine entscheidende Ursache für die hohe Sterblichkeit beim kardiogenen Schock ist die Entwicklung eines Multiorgandysfunktions-Syndroms (MODS) infolge einer Organminderperfusion²².

In Abhängigkeit der Schwere eines akuten Myokardinfarktes kommt es zu einer massiven Reduktion der myokardialen Kontraktilität und damit des Herzzeitvolumens. Es folgt die typische Schockreaktion mit Zentralisation, Hypotonie, Organminderperfusion und schließlich ein Organversagen²³. Klinisch manifestiert sich ein kardiogener Schock in Form von kalten Extremitäten, Marmorierung der Haut, Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten bis hin zur Vigilanzminderung, Hypotonie, Tachykardie, Tachypnoe, Lungenödem und Oligurie. Parametrisch erfolgt die Definition mittels eines invasiven hämodynamischen Monitorings²⁴. Systolischer Blutdruck < 90 mmHg in Abwesenheit von Hypovolämie, Katecholaminbedarf oder eine Verringerung des systolischen Blutdrucks um 30 mmHg für mindestens 30 min, ein reduziertes Herzzeitvolumen (Herzindex=Cardiac Index (CI) < 1.8 L/min/m²) und / oder eine Erhöhung des pulmonalkapillären Verschlussdrucks („pulmonary capillary wedge pressure“ (PCWP) > 18 mmHg). Neben diesen Parametern konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass dem Cardiac Power Index (CPI) eine prognostische Bedeutung im kardiogenen Schock zukommt. Bei dem Cardiac Power Index handelt es sich um eine mathematische Größe, einem Produkt aus Cardiac Index (CI) und mittlerem systemarteriellen Blutdruck (MAP): $CPI = CI \times MAP \times 0.0022$. Patienten im kardiogenen Schock haben einen Cardiac Power Index (CPI) < 0.4 W / m²^{25,26}.

Für die Prognose eines kardiogenen Schocks ist eine frühzeitige Wiederöffnung der verschlossenen Koronararterie, in der Regel mittels perkutaner Koronarintervention (PCI), entscheidend. Die Schockbehandlung beinhaltet die medikamentöse Therapie mittels Inotropika und Vasopressoren und wird anhand eines hämodynamischen Monitorings gesteuert²¹.

2.3 T-Zellantwort bei akuten Koronarsyndromen

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung der adaptiven Immunität in der Pathogenese des akuten Koronarsyndroms intensiv untersucht²⁷. Myokardischämie verursacht eine inflammatorische Reaktion, die an der kardialen Regeneration beteiligt ist. Dieser Prozess ist von regulatorischen Mechanismen, welche eine exzessive Gewebsentzündung hemmen, abhängig. In der Pathophysiologie der atherosklerotischen Koronarkrankheit und des akuten Myokardinfarktes weist experimentelle Evidenz auf eine wichtige Rolle von T-Zellen hin^{28,29}. Die klinische und ggf. auch therapeutische Relevanz dieses lymphozytären Kompartimentes bei Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock ist bisher noch nicht geklärt.

Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigen eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden CD4⁺ T-Lymphozyten, was mit einer gesteigerten Interferon-(IFN)- γ - und Tumor necrosis factor-(TNF)- α -Produktion einhergeht¹³. Spezifische CD4⁺ T-Zellpopulationen, inklusive Th1-Zellen¹², CD4⁺CD28^{null} T-Zellen³⁰, regulatorische T-Zellen (Treg)³¹ und eine vor kurzem beschriebene Abstammungslinie von CD4⁺ T-Zellen, die Typ 17 T-Helfer-(Th17)-Zellen, sind bei der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque-Instabilität und damit bei der Entstehung von akuten Koronarsyndromen beteiligt^{32,33}. Ein proinflammatorisches Milieu begünstigt eine Plaqueinstabilität und -ruptur sowie eine Thromboseneigung. Somit besitzt die T-Zellaktivierung eine Schlüsselfunktion in der Umwandlung einer chronisch-stabilen in eine instabile Plaque mit konsekutivem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms¹⁷.

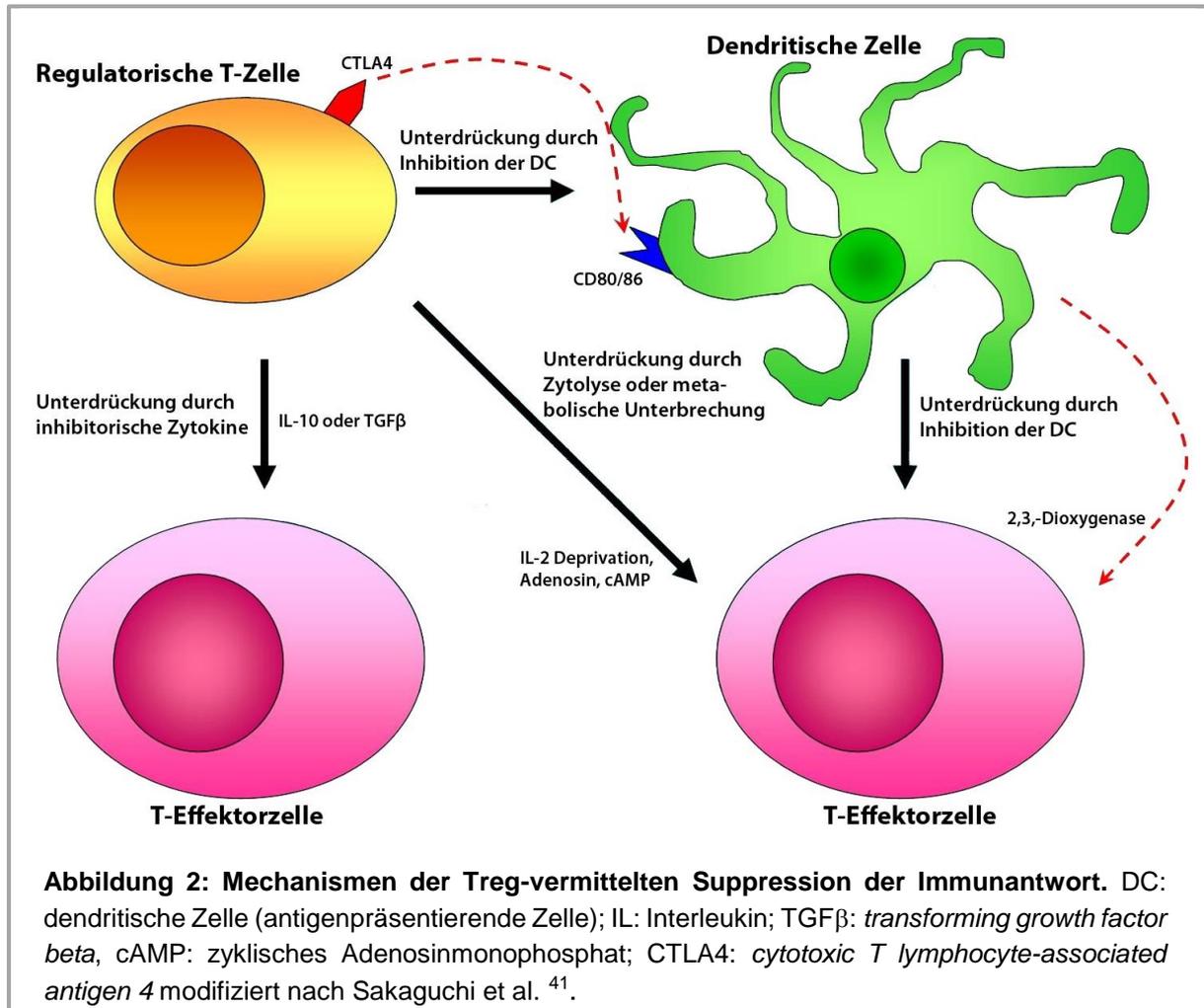
Eine inverse Korrelation zwischen Treg- und Th1-Effektorzellen könnte die Instabilität einer atherosklerotischen Plaque begünstigen³⁴. Eine frühe Rekrutierung von Treg-Zellen durch Induktion regulatorischer Chemokine (z.B. CCR5) limitiert die Inflammation und ein ungünstiges myokardiales Remodeling beim akuten Herzinfarkt³⁵. Die Gabe von Statinen vor der Koronarangiographie könnte eine Erhöhung von Treg-Zellen bei Patienten mit Myokardinfarkt bedingen³⁶. Genaue Kenntnisse über die Rolle von Treg-Zellen bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen und im kardiogenen Schock sind bisher nicht bekannt.

2.4 Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen)

„*Naturally occurring*“ regulatorische T-Zellen (natürliche Treg), generiert im Thymus, werden durch die extrazelluläre Expression des Oberflächenmoleküls CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors, und die intrazelluläre Expression des „forkhead / winged helix“ Transkriptionsfaktors (Foxp3), dem Hauptregulator der Treg-Funktion, charakterisiert³⁷. Das Molekül Foxp3 ist jedoch mehr als ein Marker zur Identifikation von Treg-Zellen. Als Transkriptionsfaktor führt Foxp3 zur Induktion des regulatorischen Phänotyps in diesen Zellen³⁸.

In den neunziger Jahren wurde erstmals die Funktion der Treg-Zellen beschrieben^{39,40}. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen besitzen antiinflammatorische Eigenschaften und sind für die Homöostase des adaptiven Immunsystems und die Toleranzinduktion zuständig⁴¹. Diese Zellen haben nur ein geringes Proliferationspotenzial, sowohl wenn sie spezifisch, als auch unspezifisch stimuliert werden⁴².

Etwa 2% bis 5% der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen sind natürliche Treg-Zellen, die durch die konstitutive Expression von Foxp3 und CD25 gekennzeichnet sind. Im Gegensatz dazu werden „*inducible*“ Treg-Zellen (induzierte Treg, iTreg) in der Peripherie aus CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nach Stimulation des T-Zellrezeptors generiert⁴³. Transforming growth factor-(TGF)- β und Retinsäure sind für die Induktion der iTreg-Zellen sehr wichtig. Die Zugabe von TGF β induziert eine Foxp3-Expression in murinen und humanen naiven T-Zellen *in vitro*⁴⁴. Die Suppression der T-Effektorzellen (Teff) bei Treg-Zellen wird indirekt durch Modifizierung der Funktion dendritischer Zellen (DC) oder direkt durch Zellkontakt vermittelt (Abbildung 2). Die bisher bekannten inhibitorischen Mechanismen der Treg-Zellen sind zellkontaktabhängige Suppression, Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, IL-35 und TGF β), zytolytische Effekte (durch Sekretion von Granzymen und Perforin), proapoptische Aktivitäten über Teff (Induktion des *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-death receptor 5*-(TRAIL-DR5)-Weges), metabolische Unterbrechung (IL-2-Deprivation durch CD25, Produktion deszyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP), Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)) und Unterdrückung der Teff durch Inhibition von DC (mittels „*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*“ (CTLA4) „*lymphocyte-activation gene 3*“ (LAG-3) oder Adenosin)⁴⁵⁻⁴⁷.



2.5 Andere T-Zellpopulationen mit suppressiven Eigenschaften

Neben nTreg-Zellen und iTreg-Zellen, haben auch andere Zellpopulationen, welche bei der peripheren Induktion der Toleranz eine bedeutende Rolle spielen, regulatorische Funktionen. Adaptive Typ 1 regulatorischen T-Zellen (CD4⁺ Foxp3⁺ Tr1-Zellen) werden peripher aus naiven T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 und einem Antigenstimulus induziert. Sie produzieren große Mengen an IL-10 und TGF β ⁴⁸ und charakterisieren sich durch die Expression der Oberflächenmarker CD49b und LAG-3 ⁴⁹. Die Tr1-Zellen sind an der Toleranzinduktion in Schleimhäuten und der Verhinderung inflammatorischer Darmerkrankungen beteiligt ⁵⁰⁻⁵².

Antigenspezifische CD4⁺Foxp3⁺ Th3-Zellen produzieren hauptsächlich TGF β und IL-10, welche Th1- und Th2-Zellen inhibieren können ^{53,54}. Th3-Zellen können durch Applikation eines Antigen via oral *in vivo* induziert werden und können aus

konventionellen T-Zellen nach der Stimulierung mit TGF β , IL-4 und IL-10 in Abwesenheit von IL-12 in Zellkultur generiert werden ⁴³.

Ein weiterer Subtyp der regulatorischen Zellen sind CD8⁺ CD28⁺ Foxp3⁺ T-Zellen. Sie besitzen nur schwache zytotoxische und proliferative Eigenschaften und sezernieren IL-10. CD8⁺ Treg werden durch CD40-Ligand-stimulierte plasmazytoide Zellen („*dendritic cell type 2*“, DC2) aktiviert ⁵⁵ und ihre Induktion ist von TGF β und IL-10 abhängig ⁵⁶.

2.6 Funktionen der Regulatorischen T-Zellen

Obwohl Treg-Zellen nur eine kleine Fraktion der gesamten Lymphozytenpopulation ausmachen, werden sie als die potenteste und stabilste T-Zellgruppe, die suppressive Eigenschaften aufweist und Autoimmunität durch dominante Toleranzinduktion kontrolliert, erachtet. nTreg-Zellen sind die wichtigsten Mediatoren der peripheren Toleranz ^{41,57}.

Numerische oder funktionelle Einschränkungen der Treg-Populationen können die Entstehung chronisch inflammatorischer Reaktionen, Atopie und Autoimmunerkrankungen wie z. B. rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I und chronisch entzündliche Darmerkrankungen begünstigen ⁴². Außerdem existieren primäre Immundefekte mit Mangel an funktionellen Treg-Subsets, z.B. Omenn-Syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom, Hyper-IgE-Syndrom und IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*)-Syndrom ⁵⁸.

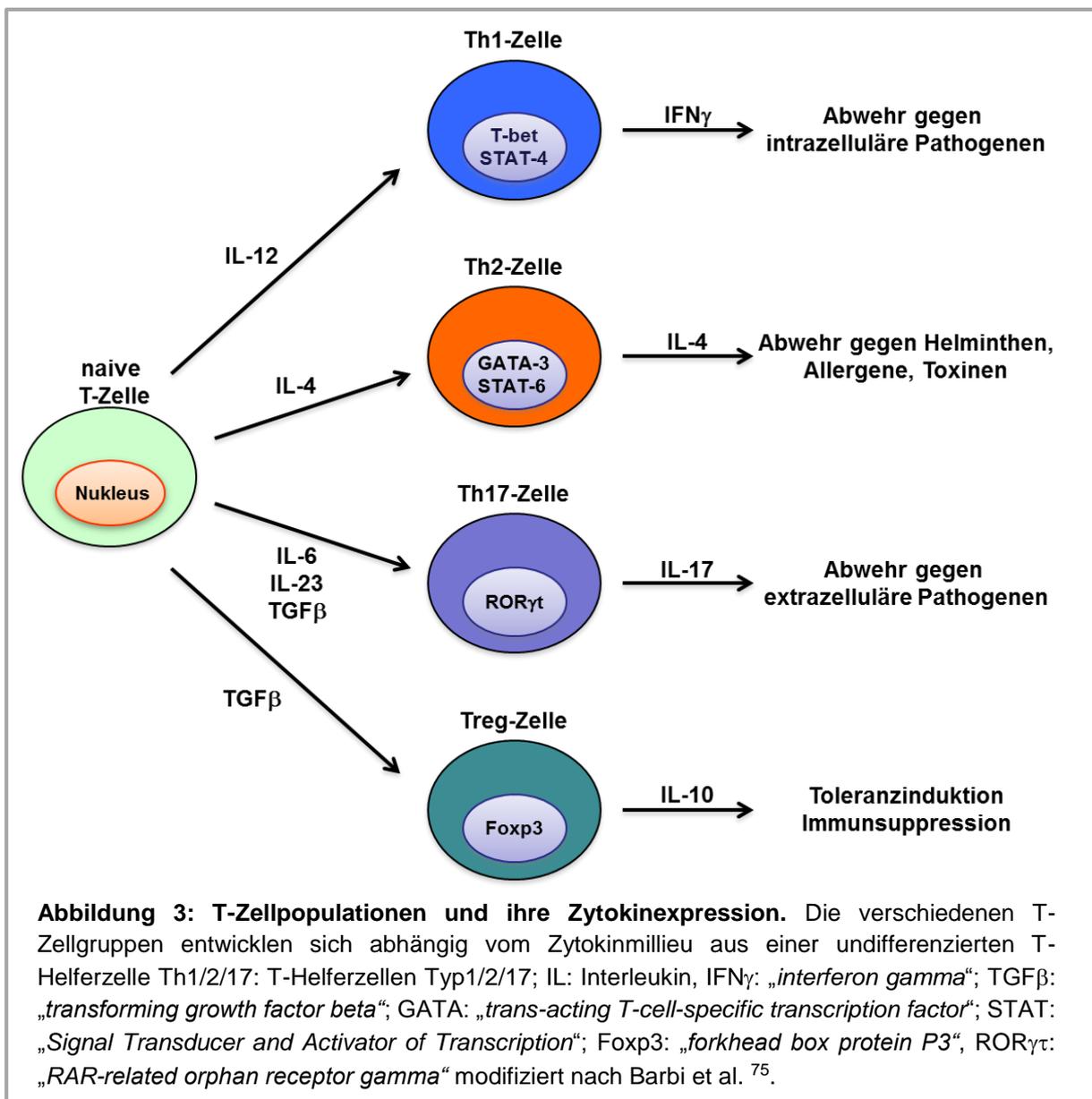
Treg-Zellen sind für die Begrenzung der chronischen Inflammation, die Limitierung der *graft versus host disease* (GVHD) und die Prävention der Autoimmunität entscheidend ^{59,60}. Allerdings können diese T-Zellen auch die Generierung einer sterilen Immunität gegen Pathogenen blockieren ⁶¹, die Etablierung einer effektiven Immunantwort gegen Tumorzellen verhindern und die impfungsinduzierte Reaktionen abschwächen ⁶². Deshalb ist die Modulation der Treg-Zellen ein attraktiver Angriffspunkt, um zahlreiche Krankheitsprozesse therapeutisch zu beeinflussen ⁶³.

Bei Patienten im Schock ist die Relevanz der Treg-Zellen bisher nicht ausreichend untersucht. Im septischen Schock wurde eine Erhöhung zirkulierender Treg-Zellen beobachtet ⁶⁴. Diese Erhöhung war mit der Entstehung einer lymphozytärer Anergie ⁶⁵

assoziiert. Weitere Untersuchungen, insbesondere auch eine Modulation der Treg-Zellen, wurden bisher weder tierexperimentell noch klinisch durchgeführt. Bei Patienten im kardiogenen Schock liegen bisher keine Daten in Bezug auf Anzahl, Funktion und Modulation der Treg-Zellen vor.

2.7 T-Helferzellen Typ-17 (Th17-Zellen)

Nach einer Antigenstimulierung werden naive CD4⁺ T-Zellen aktiviert und proliferieren bzw. differenzieren in verschiedene effektorische Phänotypen (Abbildung 3). Th1-Zellen, induziert durch den Transkriptionsfaktor T-bet, produzieren IFN γ , Interleukin 2 (IL-2) und Lymphotoxin und sind notwendig für den Abbau intrazellulärer Pathogene. Extrazelluläre Pathogene werden im Gegensatz dazu durch Th2-Zellen abgebaut. Diese werden durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 und STAT-6 induziert und produzieren IL-4, IL-5, IL-13. Th17 Zellen stellen einen zusätzlichen Subtyp der Effektor-T-Helferzellen dar. Sie produzieren IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF α , „*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“ (GM-CSF) und andere Faktoren



Th17-Zellen haben eine Schlüsselfunktion in der Abwehr gegen Pathogene (z.B. extrazelluläre und intrazelluläre Bakterien und Pilze) und wurden als notwendiger Faktor in der Entstehung allergischer Reaktionen identifiziert ⁶⁷. Th17 Zellen treten in Bereichen autoimmuner Gewebeerkrankungen auf und werden mit der Auslösung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis, chronischen Darmentzündungen, rheumatoider Arthritis, Diabetes Typ 1, multipler Sklerose und GVHD in Verbindung gebracht ⁶⁸.

Th17-Zellen werden durch eine Kombination der Zytokine TGF β , IL-6 und IL-21 differenziert, welche die Expression von ROR γ t („RAR-related orphan receptor gamma“) induzieren, einem Transkriptionsfaktor der für die Erzeugung dieser Zellen notwendig ist. IL-23 ist für eine Stabilisierung der Th17 Zellen sehr wichtig ⁶⁹⁻⁷¹. Ein Polymorphismus des Rezeptors für IL-23 (IL-23R) wurde genetisch mit verschiedenen

Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, inklusive Psoriasis, inflammatorischen Darmerkrankungen und ankylosierender Spondylitis. Der Kontakt mit IL-23 verringert die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in Th17-Zellen im Entwicklungsstadium, was diese Zellen pathogen macht. Th17-Zellen induzieren ohne einen vorherigen Kontakt zu IL-23 keine Autoimmunerkrankungen ⁶⁶.

Viele inflammatorische Effekte der Th17-Zellen werden durch IL-17 vermittelt. Der IL-17-Rezeptor (IL-17R) wird auf Immunzellen (T und B-Zellen, Neutrophilen), aber auch in anderen Gewebsarten (Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, mesenchymalen Stromazellen und Keratinozyten) exprimiert. Andere Quellen von IL-17 sind $\gamma\delta$ T-Zellen und angeborene Lymphozyten. IL-17A fördert die Granulopoese im Knochenmark, erhält die Integrität und Homöostase der Darmschleimhaut aufrecht und stimuliert die Chemotaxis von Granulozyten ^{72,73}.

Auch wenn Th17-Zellen häufig als pathogen beschrieben werden, konnte mehrfach auch die Existenz von nichtpathogenen IL-17 produzierenden Th17 Zellen nachgewiesen werden ^{68,74}. Es ist jedoch weiterhin nicht geklärt, unter welchen Umständen diese Zellen induziert werden und was sie pathogen oder nichtpathogen werden lässt ⁷². Verschiedene Studien haben gezeigt, dass GM-CSF für die Pathogenität dieser Zellen notwendig ist ⁷¹. Die Wichtigkeit der Th17-Antwort wurde bei Patienten mit einer autosomal dominante Form des Hyper-IgE-Syndroms (Job's-Syndrom) dargestellt, welche eine inaktivierende STAT-3-Mutation haben und keine Th17-Zellen generieren können. Diese Patienten haben rezurrenente Infekte, Ekzeme und mukokutane Mykosen. Ähnliche Komplikationen werden auch während einer HIV-Infektion dokumentiert, welche mit einem früheren Verlust der Th17-vermittelten Darmimmunität assoziiert sind ⁶⁶.

Die Th17-Differenzierung aus naiven T-Zellen kann *in vitro* durch TGF β und IL-6 ausgelöst und gesteuert werden. TGF β alleine induziert jedoch Foxp3⁺ in Treg-Zellen. Die Anwesenheit von IL-6 hemmt die Entwicklung der Treg-Zellen und induziert eine Th17-Differenzierung. Th17-Zellen und Treg-Zellen haben gegenteilige Funktionen im adaptiven Immunsystem und das Equilibrium zwischen Th17-Zellen und Treg-Zellen scheint in der Entwicklung bzw. Prävention der inflammatorischen und Autoimmunpathologien sehr wichtig zu sein, vergleichbar mit der Th1/Th2 Dichotomie ^{75,76}.

2.8 Th17- und Treg-Zellen bei akuten Koronarsyndromen

Ein numerisches und funktionelles Ungleichgewicht des Th17/Treg Verhältnisses, der sog. Th17/Treg-Ratio, bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) hat eine kausale Bedeutung in der Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque³³. Ferner wurde eine Assoziation zwischen der Zunahme von Th17- und Th1-Zellen bei gleichzeitiger Reduktion von Treg-Zellen mit dem Auftreten akuter kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit ACS in Verbindung gebracht^{34,77}.

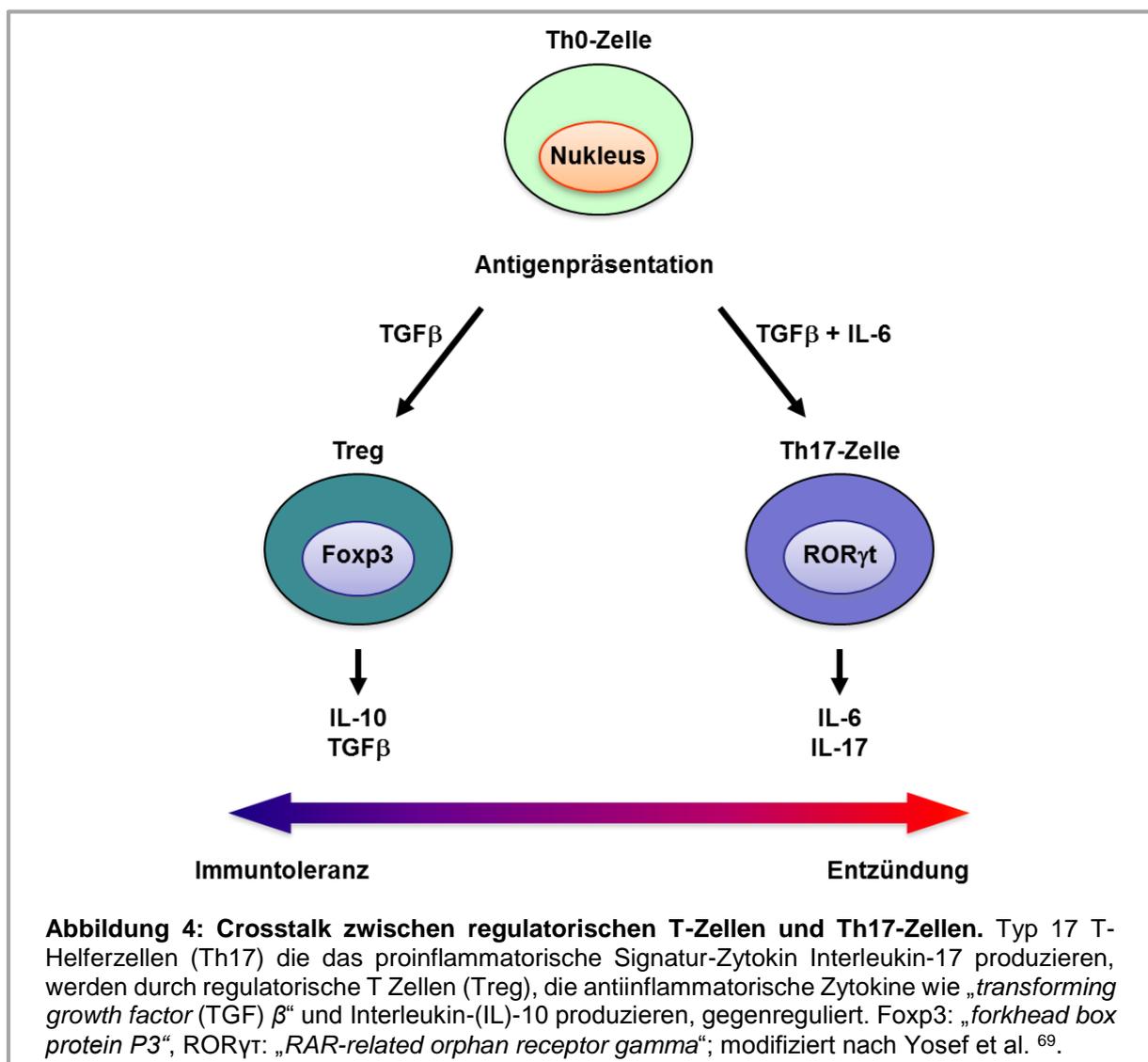
Th17- und Treg- Zellen weisen im Immunsystem gegenläufige Funktionen auf. Eine Erhöhung der Th17 Zellantwort wirkt gewebsentzündend und kann zu Autoimmunerkrankungen führen⁷⁰. Auch wenn bekannt ist, dass IL-17 produzierende Th17-Zellen an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind, sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher größtenteils unklar. Eine pathogene Rolle von IL-17 Zytokinen im Myokardinfarkt wurde kürzlich beschrieben, welche möglicherweise ein wichtiger Faktor in der Entzündungsantwort nach dem Infarkt, der neutrophile Rekrutierung und der Apoptose sein könnte⁷⁸⁻⁸⁰.

Demgegenüber konnte in verschiedenen Studien eine antiinflammatorische Wirkung durch eine erhöhte Treg-Antwort bzw. proinflammatorische Effekte im Falle einer erniedrigten Treg Antwort gezeigt werden. Im murinen Modell war eine verringerte Treg Anzahl mit einer erhöhten Bildung von atherosklerotischen Plaques assoziiert^{81,82}. Sardella et al. beobachteten eine Erniedrigung von Treg-Zellen bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI)⁸³. Eine Fehlregulation der Immunantwort tritt bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt bei Vorliegen einer verringerten Treg Aktivität auf. Diese unkontrollierte proinflammatorische Antwort ist bei diesen Patienten häufig mit kardiovaskulären Ereignissen/Komplikationen assoziiert⁸⁴. Die pathologische autoreaktive Immunantwort bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom wird möglicherweise durch einen Toleranzdefekt durch eine ineffiziente Regulation von T-Effektorzellen verursacht³⁴.

Umwelteinflüsse und Änderungen im lokalen Zytokinmilieu können das Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Entzündung durch eine veränderte T-Zelldifferenzierung entweder in Richtung der Treg- oder der Th17- Zelllinie verschieben (Abbildung 4)⁷⁵. Deswegen kann das Equilibrium zwischen Th17-Zellen und Treg-Zellen für die Entstehung bzw. die Vermeidung von akuten Koronarsyndromen (ACS) relevant sein.

Bisher sind keine Daten in Bezug auf diese Immunmechanismen bei Patienten im kardiogenen Schock (CS) bekannt.

Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom wurde ein numerisches und funktionelles Ungleichgewicht des Th17/Treg Verhältnisses beschreiben, welches eine Plaquestabilisierung zur Folge hat ^{32,33}. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass IL-17 und IFN γ produzierende T-Zellen, die in atherosklerotischen Plaques lokalisiert sind, die Inflammation fördern ^{15,85}. Allerdings könnte die Induktion von Th17-Zellen in Präsenz antiinflammatorischer Zytokine schützende und regulatorische Effekte haben. Th17-Zellen, die sich in Anwesenheit von IL-6 und TGF β differenzieren, produzieren proinflammatorisches IL-17 und antiinflammatorisches IL-10 ⁸⁶.



2.9 Eigene Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation soll evaluiert werden, ob Störungen der T-Zellpopulationen mit dem klinischen Schweregrad von akuten Koronarsyndromen (ACS) –unkomplizierter akuter Myokardinfarkt (AMI) versus komplizierter Myokardinfarkt mit konsekutivem kardiogenen Schock (CS) – korrelieren. Dabei soll insbesondere die Rolle der regulatorischen T-Zellen (Treg, sog. CD4⁺Foxp3⁺) und ihre Interaktionen mit T-Effektorzellen (z.B. Th17-Zellen) charakterisiert werden. Hierzu werden verschiedene T-Zellpopulationen und die zugehörigen Zytokine bei Patienten mit AMI und CS und bei altersentsprechenden gesunden Kontrollpersonen gemessen und miteinander verglichen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Ist die systemische Inflamationsreaktion (SIRS) im kardiogenen Schock mit einer numerischen oder funktionellen Beeinträchtigung supprimierender Treg-Zellen assoziiert?
2. Welche T-Zellantwort (Th1, Th2, Th17) ist im kardiogenen Schock dominant?
3. Welches Zytokinmilieu ist im kardiogenen Schock dominant?
4. Haben Treg-Zellen einen inhibitorischen Effekt auf die Expansion und die Zytokinproduktion der Th17-Zellen im kardiogenen Schock?
5. Korreliert ein Th17/Treg Ungleichgewicht mit dem klinischen Schweregrad eines akuten Myokardinfarktes: unkomplizierter Verlauf versus komplizierter Verlauf mit kardiogenem Schock (differenziert nach Überlebenden und Nichtüberlebenden)?

3 Methoden und Materialien

3.1 Studiendesign und Studienpopulation

3.1.1 Studiendesign

Mit schriftlichem Einverständnis der Patienten bzw. ihrer gesetzlichen Betreuer, mit Zustimmung der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethikvotum 177/12) und gemäß den WHO-Leitlinien für klinische Studien und der Deklaration von Helsinki ⁸⁷, wurden im Zeitraum zwischen September 2008 und Oktober 2010 auf der internistischen Intensivstation des Universitätsklinikums des Saarlandes alle Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock in ein „kardiogenes Schock-Register“ aufgenommen.

Aus diesem Register wurde eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie generiert (Tabelle 1). Hierin wurden 40 Patienten im kardiogenen Schock (CS) nach akutem Myokardinfarkt eingeschlossen, davon jeweils 20 Überlebende und 20 Nicht-Überlebende. Als Vergleichskontrollen dienten zum einen 20 Patienten mit unkompliziertem akutem Myokardinfarkt (AMI) und 20 gesunde Probanden („*healthy controls*“, HC), die bzgl. ihres Lebensalters gleichverteilt zur CS-Gruppe waren.

Tabelle 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns

Fall-Kontroll-Studie			
Kontrollkollektive		Fälle	
Gesunde Probanden (HC)	Patienten mit unkompliziertem akutem Infarkt (AMI)	Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock (CS)	
		Überlebende	Nicht-Überlebende
n = 20	n = 20	n = 20	n = 20

3.1.2 Probanden und Kontrollkollektive

In der Literatur gibt es für die zu untersuchenden immunologischen Laborwerte keine Referenzwerte und insbesondere keine altersentsprechenden Normwerte. Daher erfolgten die immunologischen Laboruntersuchungen bei 20 gesunden Probanden (HC = healthy controls) bzw. Patienten mit unkompliziertem akuten Herzinfarkt (AMI), dem Lebensalter der Patienten im kardiogenen Schock entsprechend (Altersgruppe 40-80 Jahre; Tabelle 1).

3.1.3 Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock

Aus dem „kardiogenen Schock-Register“ wurden alle Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock selektiert, welche folgende Kriterien erfüllten:

- Klinische Zeichen der Kreislaufzentralisation
- Hämodynamische Zeichen des kardiogenen Schocks
- Akutkoronarangiographie mit Koronarintervention (PCI) und Erreichen eines TIMI-III-Flusses im Infarktgefäß.
- Ausgeschlossen wurden klinisch manifeste Infektionen, anamnestisch chronisch inflammatorische, autoimmune, hämatologische oder onkologische Erkrankungen und Patienten unter immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Therapien.
- Auch eine prähospital stattgehabte kardiopulmonale Reanimation galt als Ausschlusskriterium.

Alle Patientendaten des „kardiogenen Schock-Register“ wurden entsprechend der Chronologie ihrer Registratur auf Ein- und Ausschlusskriterien überprüft und bei Eignung in die Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen. Die Patienten der Fall-Kontroll-Studie wurden anhand ihrer 28-Tage-Mortalität den beiden Gruppen „Überlebende“ und „Nicht-Überlebende“ sukzessive zugeteilt, bis in jeder Gruppe eine Fallzahl von n=20 erreicht war.

Der kardiogene Schock (CS) ist definiert durch klinische Zeichen der Kreislaufzentralisation verbunden mit einem Rückwärtsversagen des linken Ventrikels, wie beispielsweise dem Lungenödem, und / oder verbunden mit einem Vorwärtsversagen, wie beispielsweise kalten Extremitäten, Marmorierung der Haut,

Vigilanzminderung und systemarterieller Hypotonie. Die Diagnose eines CS kann auch anhand folgender hämodynamischer Parameter bestimmt werden: systolischer Blutdruck < 90 mmHg in Abwesenheit von Hypovolämie, Katecholaminbedarf, reduzierter Herz-Index (Cardiac-Index, $CI < 1.8 \text{ L/min/m}^2$) und / oder Erhöhung des pulmonalkapillären Verschlussdrucks (Pulmonary capillary wedge pressure, PCWP > 18 mmHg. Der Cardiac Power Index ($CPI = \text{Cardiac Index} * \text{mittlerer systemarterieller Blutdruck} * 0,0022$) berücksichtigt, dass die Organdurchblutung sowohl vom Blutfluss (CI) als auch vom Perfusionsdruck (mittlerer systemarterieller Blutdruck) abhängig ist. Der CPI ist ein unabhängiger Prädiktor für die Prognose eines CS-Patienten; je niedriger der CPI desto höher die Sterblichkeit ($CPI < 0,4 \text{ mmHg/l/min/m}^2$)^{25,26}.

Bei jedem Patienten im CS wurde eine Akutkoronarangiographie mit Koronarintervention (PCI) durchgeführt. Nur diejenigen Patienten, bei denen durch die PCI ein TIMI-III-Fluss im Infarktgefäß erzielt werden konnte⁸⁸, wurden in die Studie aufgenommen. Die Anwendung von Inotropika sowie die Implantation einer intraaortalen Ballonpumpe (IABP) wurden vom zuständigen Arzt nach dem klinischen Bedarf und Patientenverlauf entschieden und hatte keinen Einfluss auf den Studien-Ein-/Ausschluss.

Der klinischer Zustand der Patienten wurde bei ihrer Aufnahme auf der Intensivstation nach dem „*Simplified Acute Physiology Score II (SAPS II)*“ ermittelt⁸⁹.

3.2 Hämodynamische Messungen

Bei allen Patienten mit kardiogenem Schock wurden folgende hämodynamischen Parameter mittels Pulmonalkatheter (Swan-Ganz-Katheter) gemessen: Herzfrequenz, mittlerer systemarterieller Druck (*mean arterial blood pressure*, MAP), mittlerer pulmonalarterieller Verschlussdruck (*mean pulmonary capillary wedge pressure*, PCWP), mittlerer pulmonalarterieller Druck (*mean pulmonary artery pressure*, PAP), Herzindex (*cardiac index*, CI), *cardiac power index* (CPI), zentraler Venendruck (ZVD), zentralvenöse Sauerstoffsättigung (SvO₂) und systemvaskulärer Gefäßwiderstand (*systemic vascular resistance*, SVR).

3.3 Blutproben und Laboranalyse

Die Basisblutproben wurden direkt im Anschluss an die Akutkoronarangiographie in EDTA- (ethylene diamine tetraacetic acid), Citrat- und Heparinröhrchen abgenommen. Blutbild, Troponin T, Kreatin-Kinase („*creatin-kinase*“, CK), C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin und Lipidprofil wurden nach laborchemischen Routineprotokollen im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes bestimmt.

Die Blutentnahmen erfolgten aus einer liegenden arteriellen Verweilkanüle, welche bei allen kritisch kranken Patienten zum kontinuierlichen Monitoring der Hämodynamik und zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes des Blutes erforderlich ist. Es wurden pro immunologische Untersuchung 40 mL Blut benötigt, d.h. insgesamt wurden für die Studie 3 x 40 mL = 120 mL Blut pro Patient bei der Aufnahme entnommen.

Folgende speziellen immunologischen Parameter wurden zur Beurteilung der erworbenen Immunität bestimmt:

- T-Helfer-Zellsubpopulationen (Th)
 - Th1 durch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$
 - Th2 durch die Produktion von IL-4
 - Th17 durch die Produktion von IL-17
- Regulatorische T-Zell-Subpopulationen (Treg-Zellen)
 - CD4^+ Foxp3^+ Treg-Population
 - CD8^+ Foxp3^+ Treg-Population

Zur Beurteilung des zirkulierenden Zytokinstatus wurden folgende Parameter determiniert:

- proinflammatorische Zytokine:
 - Interleukin-(IL)-2, IL-4, IL-6, IL-17,
 - Interferon-(IFN)- γ ,
 - *Tumor necrosis factor*-(TNF)- α
- antiinflammatorische Zytokine:
 - Interleukin-(IL)-IL-10,
 - *Transforming growth factor*-(TGF)- β

3.4 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen (PBMC = „peripheral blood mononuclear cells“) wurden aus heparinisiertem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation durch ein hydrophiles Kolloid aus Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (*Ficoll*) aufgereinigt. Die isolierten PBMC wurden zweimal mit PBS („*phosphate buffered saline*“) gewaschen und in RPMI 1640 Medium mit 10% inaktiviertem fetalen bovines Serum (FBS), 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin / Streptomycin (Fischer Scientific, USA) in 1×10^6 Zellen / mL resuspendiert.

3.5 Generelle Bedingungen der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in CO₂-Brutschränken bei 37°C und 95% O₂ / 5% CO₂ kultiviert. Lösungen und Labormaterialien aus Kunststoff wurden vor Gebrauch für 20 Minuten bei 135°C und 2,2 bar autoklaviert, Glasgeräte wurden für drei Stunden bei 180°C sterilisiert.

3.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Aufbewahrung eukaryotischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196°C), da sie dort über lange Zeit gelagert und nach dem Auftauen erneut in Kultur genommen werden können. Zum Einfrieren wurden jeweils 5×10^6 Zellen durch Zentrifugation pelletiert und langsam mit 1 mL vorgekühltem Einfriermedium versetzt. Dieses enthält 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), das stark hygroskopisch ist und so die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verhindert. Die Zellsuspension wurde danach in Kryoröhrchen pipettiert, welche über Nacht bei -70 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch mehrfaches Waschen mit Vollmedium, um das DMSO zu entfernen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 mL Vollmedium resuspendiert und nach der Bestimmung der Zellzahl in Kultur genommen.

3.7 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zellen unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Lebendzellzahl wurde durch den Trypan

Ausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren aus während tote Zellen angefärbt werden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung gemischt und die Zellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

3.8 Durchflusszytometrie

Die Anfärbung der Zellen mit Fluorochrom und die Waschschriffe bei den durchflusszytometrischen Analysen erfolgten nach einem standardisierten Protokoll. Für die Zellfärbungen wurden die folgende Antikörper benutzt: APC-, FITC- PerCP- und PE anti-Human CD3, CD4, CD8, CD25, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IL-35, IFN γ , TGF β , TNF α , Foxp3 und passende Isotyp-Kontrollen (IgG κ).

Pro Färbung wurden 2×10^5 bis 3×10^6 Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C, 5 Minuten) pelletiert und der Überstand entsorgt. Anschließend wurde das Pellet in 100 μ L FACS-Puffer resuspendiert und PBS mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) zugegeben, um die unspezifischen Bindungsstellen zu belegen. Nach 30 min Inkubation wurden jeder Probe 50 μ L Antikörperlösung zur Färbung der Zellen zugegeben und erneut für 30 min inkubiert. Im darauffolgenden Waschvorgang wurden 2 mL FACS-Puffer zugegeben, die Proben durch Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 5 min) pelletiert und der Überstand entsorgt. Im letzten Schritt wurde das Pellet zur Fixierung in 400 μ L 1 x PBS mit 1 % Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Für die Oberflächenfärbung der Lymphozyten wurden anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 und anti-CD25 Antikörper verwendet. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Zellen in 1% PFA fixiert und mit Saponin permeabilisiert.

3.8.1 Foxp3 Färbung

Die intrazelluläre Foxp3-Färbung erfolgte mit Hilfe eines Foxp3-Färbeset (*Foxp3 Staining Kit*, BD Pharmingen, Germany) nach den Anleitungen des Herstellers. Es wurden 5×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Vor der intrazellulären Färbung mit anti-Foxp3-Antikörper, wurde die Oberfläche der Zellen mit anti-CD4 (1:100) und anti-CD8 (1:100) gefärbt. Den Zellen wurde 2 mL FACS-Puffer zugegeben, die Proben durch Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 5 min) pelletiert und der Überstand entsorgt. Im

nächsten Schritt wurde das Pellet mit 1 mL Fixierungs-Permeabilisierungslösung permeabilisiert. Darauf folgte ein erneuter Waschschrift, bei dem die Proben durch Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 5 min) pelletiert, der Überstand entsorgt und das Pellet in 2 mL FACS-Puffer resuspendiert wurde. Nach einem erneutem Zentrifugations- und Pelletierungsschritt wurde das Pellet der Zellen mit 2 mL Permeabilisierungspuffer resuspendiert und 1,5 µL anti-Foxp3-Antikörper für 30 min zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 mL Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 250 µL PBS mit 1% PFA fixiert und im Durchflusszytometer analysiert.

3.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung erlaubt es Zellen, die spezifisch Zytokine produzieren, durchflusszytometrisch zu erfassen. Hierzu wird die Zytokinfreisetzung durch Zugabe von Golgi-Plaquer (Brefeldin A) gehemmt, die Zellmembran permeabilisiert und ein Antikörper gegen das Zytokin (in dieser Studie: IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IL-35, IFN γ , TGF β und TNF α) hinzugegeben. Der Antikörper markiert Zellen, die mit Zytokinproduktion reagiert haben (Böttler, 2005). Für jede Probe wurden 4-5 unterschiedliche Färbungen angefertigt.

Je Probe wurden 2×10^5 Zellen verwendet, die durch Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 5 min) pelletiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Oberflächenfärbung mit 50 µL „Blocking“-Antikörper zusammen mit 50 µL anti-CD4 oder anti-CD8 Antikörper in einer Verdünnung 1:100. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C folgte ein erneuter Waschvorgang, um daraufhin die Zellen in 200 µL Cytofix/Cytoperm zu resuspendieren. Auf eine Einwirkperiode von 15 Minuten bei 4°C und einen Standardwaschschrift folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 mL Perm/Wash. Dem Pellet wurde dann, zur Durchführung der intrazellulären Färbung Antikörper (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, IL-35, IFN γ , TGF β , TNF α) 1:100 in Perm/Wash verdünnt, zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Perm/Wash und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Als letzter Schritt wurde das Pellet zur Fixierung in 400 µL 1x PBS mit 1% PFA resuspendiert. Nach der Fixierung wurden die Proben bis zur Analyse bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Für die intrazelluläre Färbung des IL-17 wurden die Zellen mit 1 µg/mL Phorbolmyristataacetat (PMA) und 50 µg/mL Ionomycin in 500 µg/mL Brefeldin A

stimuliert. Das darin enthaltene PMA stimuliert die Zytokinproduktion von T-Zellen unabhängig vom T-Zell-Rezeptor. Die Proben wurden über 4 h bei 37 °C und 95% O₂ / 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit, wurden die Zellen gewaschen und 10 min mit Saponin (Sigma-Aldrich, Germany). Nach einem erneuten Waschschrift, wurden die Zellen mit anti-CD3 und anti-IL-17 Antikörper gefärbt. Für jede Probe wurde eine Kontrollprobe ohne Stimulation mit PMA / Ionomycin eingesetzt.

Bei jeder Analyse wurden Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörper durchgeführt (IgG κ), um das Ausmaß einer unspezifischen Antikörperbindung beurteilen zu können. Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte Mithilfe des „FACSCalibur“ Durchflusszytometers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) und dem Programm „CELLQuest“ (BD Biosciences). Bei den Auswertungen wurden ausschließlich Zellen im Lymphozyten-Gate berücksichtigt.

3.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Heparinisierte Blutproben von Patienten und Kontrollen wurden nach der Entnahme zentrifugiert und das Serum wurde unter -80°C gefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Sera wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert und die Konzentration von IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TGF- β , TNF- α wurde mittels quantitativer *sandwich*-ELISA bestimmt. Die ELISA-Platten wurden mit dem jeweiligen Capture-Antikörper in *coating*-Puffer beschichtet (50 μ L/Well). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation der Platten mit 200 μ L Blockpuffer pro Well bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgten drei Waschschriffe mit Waschpuffer, bevor 50 μ L Serum zugegeben wurde. Auf jeder Platte wurde zudem eine Verdünnungsreihe eines externen Standards mitgeführt (jeweils Doppelwerte). Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ELISA-Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit je 50 μ L eines biotinylierten Detektions-Antikörpers inkubiert (in 1 x PBS mit 0,1% BSA verdünnt). Die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt und nach drei weiteren Waschvorgängen mit Waschpuffer das Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben (1:200 in 1 x PBS mit 0,1% BSA verdünnt). Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen der ELISA-Platte wurden 100 μ L Farbsubstratlösung in jedes Well pipettiert. Die durch die HRP katalysierte Reaktion

des farblosen Tetramethylbenzidins zu einem blauen Farbstoff wurde nach fünf bis zehn Minuten durch Zugabe von je 25 μ L Stopppuffer beendet. Daraufhin wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anhand des mitgeführten Standards die jeweilige Zytokinkonzentration berechnet.

3.10 Statistische Analyse

Kategoriale Variablen wurden als absolute und prozentuale Patientenzahl angegeben und Fisher`s-Exact-Test (Überlebende vs. Nicht-Überlebende im CS) oder Chi-Quadrat-Test (HC, AMI, Überlebende, Nicht-Überlebende im CS) verglichen. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder als Spannweite angegeben und mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Überlebende vs. Nicht-Überlebende im CS) oder *one-way* ANOVA (HC, AMI, Überlebende, Nicht-Überlebende im CS) verglichen. Die Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe von Spearman-Test kalkuliert.

Alle quantitativen Parameter zeigten eine Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-test). Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert kleiner als 0.05 festgelegt. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc; California, USA, 2012) und StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

3.11 Materialien

3.11.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	BD Bioscience, USA
Durchflusszytometrie-Software CELLQuest Pro	BD Bioscience, USA
Inverses Mikroskop	Olympus, Japan
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm ²)	Brandt, Wertheim
pH-Meter	Eutech Instruments, USA
Reflotron Plus Photometer	Roche Diagnostics, Schweiz
Schüttelinkubator	Stuart, UK
ELISA-Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Sterile Arbeitsbank Laminair Flow	Heraeus Instruments, Hanau
Tischschüttelgerät	VWR International, Pennsylvania, USA
Tischzentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q-Plus Millipore, Frankreich

3.11.2 Plastikwaren

Kryoröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, USA
96-Well ELISA-Platten	R&D Systems, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen und Kanülen	BD Bioscience, USA
Sterile Filtriergefäße	Millipore, Bedford, USA
Zentrifugenröhrchen 15 mL; 50 mL	Falcon/BD Bioscience, USA

3.11.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

3.11.4 Reagenzien für biochemische und zellbiologische Arbeiten

Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Avidin-HRP	BD Bioscience, USA
Diaminobenzidin (DAB)	BioRad, München
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein
Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (<i>Ficoll</i>)	Biochrom, Cambridge, UK
Gentamicin	GibcoBRL, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	GibcoBRL, Eggenstein
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Poole, UK
Ionomycin (250 ng/mL)	Sigma-Aldrich, Poole, UK
Phorbolmyristataacetat (PMA) (10 ng/mL)	Sigma-Aldrich, Poole, UK
Saponin	Sigma-Aldrich, Poole, UK
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	GibcoBRL, Eggenstein
Streptavidin-HRP	BD Bioscience, USA
Trypanblau	Serva Feinbiochemika, Hamburg

3.11.5 Antikörper

APC-, FITC-, PerCP-, PE-anti-Human CD3, CD4, CD8, CD25, IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ , TNF α und Foxp3	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC-anti-Human TGF β , PE-anti-Human IL-35	R&D Systems, Wiesbaden
APC-anti-Human IL-17A	eBioscience, California, USA
APC-, FITC-, PE-Ratte-anti-Human IgG1 κ	BD Pharmingen, Heidelberg
“Blocking”-Antikörper (IgG1)	BD Bioscience, USA

3.11.6 Medien für eukaryotische Zellen

Fetales Kälberserum (FCS):

Vor Gebrauch für 30 Minuten auf 56°C erhitzt zur Inaktivierung des Komplementsystems

RPMI 1640 mit 10% FCS:

500 mL RPMI 1640

50 mL FCS

5 mL L-Glutamin (200 mM)

2,5 mL Gentamicin

3.11.7 Puffer und Stammlösungen für biochemische Arbeiten

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und für zelluläre Arbeiten vor Gebrauch steril filtriert oder autoklaviert.

Lösung für intrazelluläres FACS:

1,6 µL Ionomycin

20 µL PMA (1:250 vorverdünnt)

20 µL Golgi-Stop

960 µL Vollmedium

PBS-Tween für ELISA:

0,1% Tween 20 in 1 x PBS

Stoppuffer für ELISA:

2M H₂SO₄

Substratpuffer für ELISA (pH 5,5):

100 mM NaH₂PO₄

Waschpuffer für ELISA:

0,05% Tween 20 in PBS

3.11.8 Puffer und Stammlösungen für zellbiologische Arbeiten**Erythrozytenlyse-Puffer (pH 7,5):**

10% 0,1 M Tris/HCl

90% 0,158 M NH₄Cl

Einfriermedium:

50% FCS; 40% RPMI mit 10%FCS; 10% DMSO

Antikörperlösung zur Färbung von Zellen:

1:100 Antikörper (APC, FITC, PE, PerCP) in FACS Puffer

IMDM/10% FCS (Vollmedium):

500 mL IMDM

50 mL FCS

5 mL L-Glutamin (200 mM)

2,5 mL Gentamicin

Trypanblau-Lösung:

2 mg/100 mL in PBS

FACS-Puffer:

1x PBS, 5% FCS

0,01% NaN₃

FACS-Fixierer:

4% Paraformaldehyd in PBS

4 Ergebnisse

4.1 „Baseline“ Charakteristika

Tabelle 2 zeigt die „baseline“ Charakteristika der Patienten. In Bezug auf Alter, Geschlecht und kardiovaskulären Risikofaktoren gab es keinen statistischen Unterschied zwischen Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt (AMI) oder kardiogenem Schock Patienten (CS). Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock zeigten bereits bei Aufnahme auf die Intensivstation signifikante Unterschiede bezüglich der Schwere ihrer Erkrankung, gemessen anhand des SAPSII-Scores ($p < 0.001$), der Myokardinfarktgröße, gemessen anhand von Troponin T ($p = 0.026$), und folgender hämodynamische Parameter: Herzfrequenz ($p < 0.001$), mittlerem systemarterielle Blutdruck (MAP, $p < 0.001$), Herzindex (CI, $p < 0.001$) und cardiac power index (CPI, $p = 0.003$) festgestellt.

Tabelle 2: „Baseline“ Charakteristika, begleitende Therapien und hämodynamische Parameter bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt (AMI) und Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock getrennt nach Überlebenden und Nicht-Überlebenden.

	Kontrolle		Kardiogener Schock		p-Werte	
	Gesunde	AMI	Überlebende	Nicht-Überlebende	Überlebende vs. Nicht-Überlebende	Alle Gruppen
Inflammatorische Proteine						
Nummer, n	20	20	20	20	---	---
Alter, Jahre	63 (43;86)	68 (47;92)	69 (39;90)	69 (47;85)	0.932	< 0.001
Geschlecht (w/m)	8 / 12	8 / 12	6 / 14	5 / 15	1.0 *)	0.680 **)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren						
Nikotinabusus, n	5 (25%)	8 (40%)	8 (40%)	7 (35%)	1.0 *)	0.725 **)
Diabetes mellitus, n	0	7 (35%)	5 (25%)	6 (30%)	1.0 *)	0.039 **)
Hyperlipidämie, n	0	16 (80%)	14 (70%)	15 (75%)	1.0 *)	< 0.001 **)
Hypertension, n	0	7 (35%)	13 (65%)	7 (35%)	0.113 *)	< 0.001 **)
Critical illness Score						
SAPSII score, points	---	28 (16; 44)	32 (22;48)	42 (23;66)	0.003	< 0.001
Myokardinfarkt						
STEMI / NSTEMI, n	---	10 / 10	7 / 13	8 / 12	0.748 *)	0.950 **)
Troponin T [pg/mL]	---	2.59 ± 2.42	3.56 ± 4.51	12.73 ± 16.10	0.026	< 0.001
Creatine kinase [U/L]	---	1716 ± 2560	2209 ± 3324	5410 ± 6860	0.068	< 0.001
Zeitverzögerung: Symptome bis PCI [h]	---	9.3 ± 7.5	8.9 ± 6.7	9.6 ± 8.7	0.747	< 0.001
Begleitende Therapien						
PCI + Stent, n, (%)		20 (100)	20 (100)	20 (100)	---	---
IABP, n, (%)		0	20 (100)	20 (100)	---	---
ASS+Clopidogrel, n,(%)		20 (100)	20 (100)	20 (100)	---	---
Vasopressoren, n (%)		0	15 (75)	20 (100)	0.047	---
Ejektion Fraktion						
EF (%)	---	36.4 ± 14.2	31.8 ± 12.6	34.3 ± 13.6	0.55	< 0.001
Hämodynamische Parameter						
Herzfrequenz	68.3 ± 7.6	81.7 ± 7.6	98.4 ± 23.1	107.1 ± 23.1	0.243	< 0.001
MAP [mmHg]	64.4 ± 11.3	63.8 ± 6.9	62.1 ± 9.9	53.5 ± 11.9	0.018	< 0.001
Herzindex [L/min/m ²]		2.4 ± 0.2	2.9 ± 1.6	1.6 ± 0.9	0.004	< 0.001
CPI [mmHg/L/min/m ²]		0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.004	0.003

Kategoriale Variablen sind als absolute (n) und prozentuale (%) Patientenzahl gezeigt und wurden mittels Fisher's exact Test oder Chi-square Test verglichen. Kontinuierliche Variablen sind als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung (standard deviation, SD; Minimum, Maximum) gezeigt und wurden mittels Mann-Whitney Test oder one-way ANOVA verglichen. SAPS-II: Simplified Acute Physiology Score; STEMI: ST-elevation myocardial infarction (ST-Hebungsinfarkt); NSTEMI: non-ST-elevation myocardial infarction (Nicht-ST-Hebungsinfarkt); PCI: percutaneous coronary intervention (perkutane Koronarintervention); IABP: intraaortale Ballonpumpe, ASS: Acetylsalicylsäure; EF: Ejektionsfraktion; MAP: mean arterial pressure (mittlerer systemarterieller Druck); CPI: cardiac power index (= Cardiac Index * MAP * 0.0022)

4.2 Inflammatorische Proteine

In Tabelle 3 sind die in dieser Studie gemessenen Immunparameter der Patienten im kardiogenen Schock und der Kontrollen dargestellt. Im Verhältnis zu Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt, zeigten Patienten im kardiogenen Schock sehr stark erhöhte Spiegel des C-reaktiven Proteins ($p < 0.001$). Allerdings wurde kein Unterschied in Procalcitonin-Werten dokumentiert. Kein Patient hatte klinische Symptome einer Infektion, obwohl die Procalcitonin-Werte in der Gruppe der Nicht-Überlebenden im kardiogenen Schock erhöht waren ($> 0.5 \mu\text{g/L}$).

Tabelle 3: Inflammatorische Parameter bei gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt (AMI) und Patienten mit infarktbedingtem kardiogenen Schock getrennt nach Überlebenden und Nicht-Überlebenden.

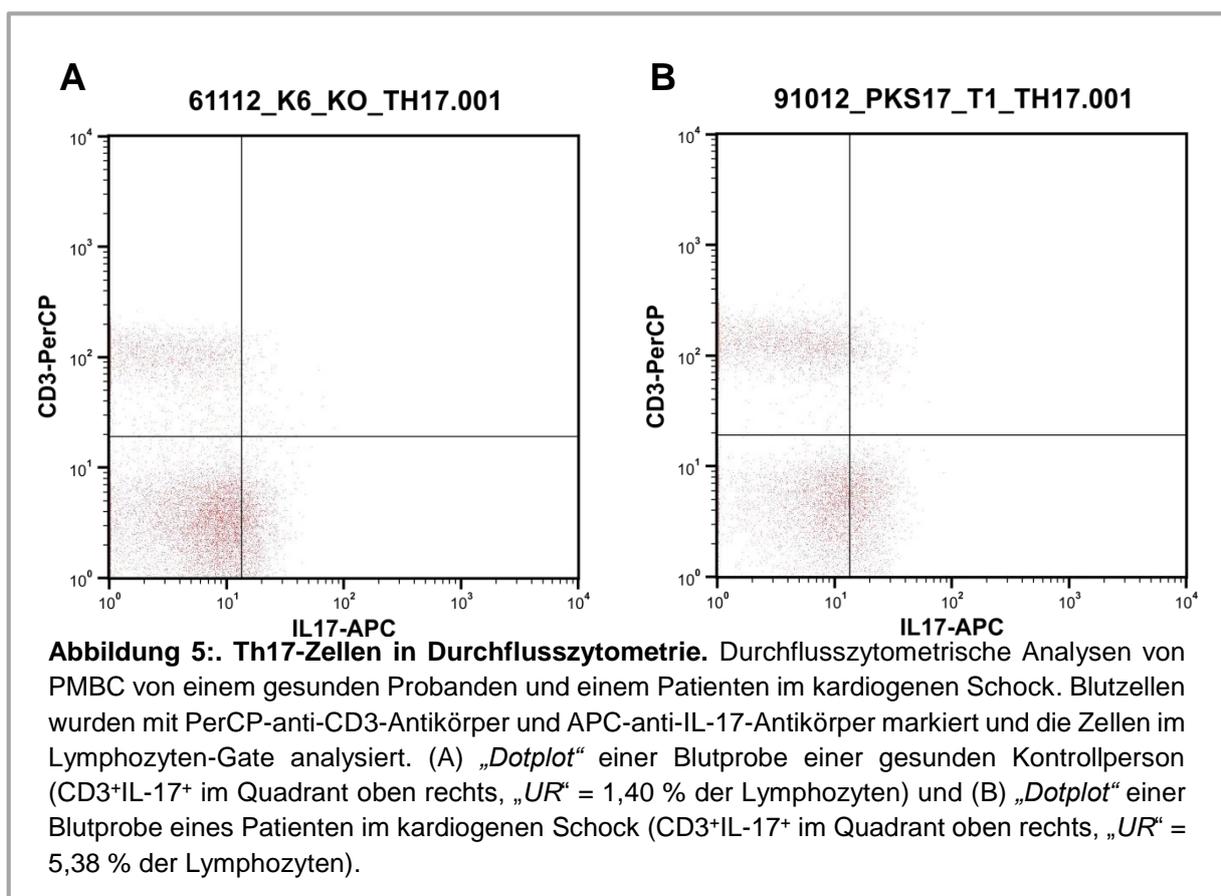
	Kontrolle		Kardiogener Schock		p-Werte	
	Gesunde	AMI	Überlebende	Nicht-Überlebende	Überlebende vs. Nicht-Überlebende	Alle Gruppen
inflammatorische Proteine						
C-reaktives Protein [mg/L]	0.07 ± 0.04	6.83 ± 3.76	50.23 ± 73.66	52.47 ± 80.29	0.928	< 0.001
Procalcitonin [µg/L]	0.13 ± 0.16	0.58 ± 0.74	0.15 ± 0.09	1.22 ± 2.07	0.047	0.004
Leukozyten						
Leukozyten [$10^9/\text{L}$]	8.19 ± 1.92	11.79 ± 4.63	12.67 ± 5.81	15.07 ± 6.78	0.237	< 0.001
Monozyten [$10^9/\text{L}$]	0.74 ± 0.17	1.06 ± 0.42	1.14 ± 0.52	1.36 ± 0.61	0.237	< 0.001
Lymphozyten [$10^9/\text{L}$]	3.19 ± 0.75	4.48 ± 1.76	5.19 ± 2.38	6.18 ± 2.78	0.236	< 0.001
T-Helferzellen (%)						
Th1-Zellen (CD3 ⁺ IFN γ ⁺)	1.05 ± 0.36	4.39 ± 4.19	2.37 ± 1.53	3.60 ± 1.59	0.044	0.022
Th2-Zellen (CD3 ⁺ IL4 ⁺)	1.92 ± 0.77	2.61 ± 1.85	1.80 ± 2.62	3.37 ± 2.43	0.159	0.218
Th17-Zellen (CD4 ⁺ IL17 ⁺)	0.87 ± 0.42	0.75 ± 0.60	0.95 ± 0.41	2.95 ± 1.49	< 0.001	< 0.001
Treg (CD4 ⁺ Foxp3 ⁺)	6.56 ± 2.64	7.71 ± 3.43	7.19 ± 3.40	3.46 ± 1.41	< 0.001	< 0.001
Intrazelluläre Zytokinexpression in T-Zellen (% von Lymphozyten)						
CD3 ⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen	1.05 ± 0.36	4.39 ± 4.19	2.37 ± 1.53	3.60 ± 1.59	0.044	0.022
CD3 ⁺ IL4 ⁺ T-Zellen	1.92 ± 0.77	2.61 ± 1.85	1.80 ± 2.62	3.37 ± 2.43	0.159	0.218
CD3 ⁺ IL10 ⁺ T-Zellen	1.49 ± 0.88	1.93 ± 1.62	2.12 ± 1.64	1.86 ± 1.17	0.659	0.723
CD3 ⁺ IL35 ⁺ T-Zellen	1.30 ± 0.63	3.83 ± 1.98	2.89 ± 2.00	3.05 ± 0.14	0.5	0.111
CD3 ⁺ TGF β ⁺ T-Zellen	1.22 ± 0.84	3.20 ± 1.72	2.50 ± 1.81	3.59 ± 2.44	0.172	0.017
Zirkulierende proinflammatorische Zytokine (pg/mL)						
TNF α	15.06 ± 2.57	44.37 ± 5.41	35.44 ± 18.95	43.92 ± 16.41	0.138	< 0.001
IFN γ	14.42 ± 14.60	114.70 ± 9.39	282.20 ± 182.10	231.50 ± 108.70	0.321	< 0.001
IL-2	85.79 ± 4.72	136.70 ± 9.32	131.50 ± 2.18	132.20 ± 2.56	0.484	< 0.001
IL-6	3.26 ± 3.14	27.57 ± 37.63	64.74 ± 42.46	106.70 ± 46.13	0.004	< 0.001
IL-17	22.75 ± 7.16	60.34 ± 28.50	146.50 ± 95.13	271.90 ± 158.00	0.011	< 0.001
Zirkulierende antiinflammatorische Zytokine (pg/mL)						
IL-4	35.43 ± 4.85	18.18 ± 3.49	16.68 ± 2.34	17.24 ± 2.95	0.635	< 0.001
IL-10	156.10 ± 34.06	143.70 ± 4.37	140.00 ± 4.35	143.60 ± 5.65	0.044	0.057
TGF β	662.20 ± 156.70	380.20 ± 131.00	358.70 ± 155.30	366.60 ± 163.90	0.881	< 0.001

Kontinuierliche Daten sind als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung (standard deviation, SD; Minimum, Maximum) gezeigt und wurden mittels Mann-Whitney-Test oder one-way ANOVA verglichen. Th: T-Helferzellen, Treg: regulatorische T-Zellen; TNF: tumor necrosis factor; IFN: Interferon; IL: Interleukin; TGF: transforming growth factor.

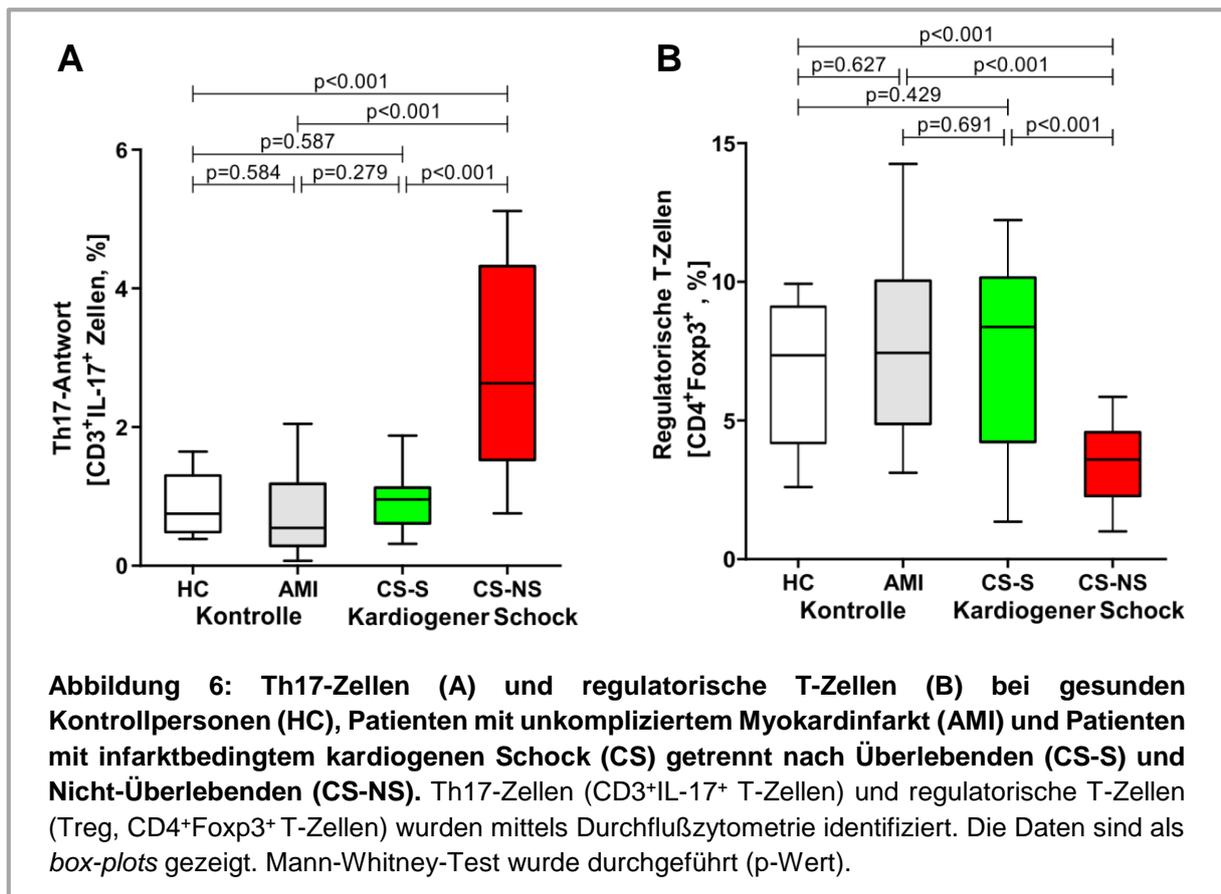
4.3 T-Helferzellpopulationen

Die Th1-Zellen waren bei allen Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht, aber die Anzahl der Th1-Zellen beim akuten Myokardinfarkt und beim kardiogenen Schock waren nicht signifikant unterschiedlich. Die Th2-Zellen zeigten sich unverändert im Vergleich zwischen den Gruppen (Tabelle 3).

Abbildung 5 zeigt ein Beispiel einer intrazellulären FACS-Analyse auf IL-17 in CD3⁺ T-Zellpopulationen bei einer gesunden Kontrollperson (A) und einem Patienten im kardiogenem Schock (B).



Die Anzahl an Th17-Zellen war niedrig bei Überlebenden im kardiogenen Schock, bei unkomplizierten Myokardinfarkt-Patienten und gesunden Kontrollpersonen, aber dreifach erhöht bei Nicht-Überlebenden im kardiogenen Schock (Tabelle 3, Abbildung 6A). Im Gegensatz dazu, war der prozentuale Anteil an spezifischen regulatorischen T-Zellen ($CD4^+Foxp3^+$ Treg) bei Nicht-Überlebenden im kardiogenen Schock signifikant reduziert ($p < 0.001$, Tabelle 3, Abbildung 6B).



Der Anstieg von Th17-Zellen bei Nicht-Überlebenden im kardiogenem Schock war assoziiert mit einer Reduktion der regulatorischen T-Zellen (Treg). Für jeden Patienten mit kardiogenem Schock konnte eine inverse Korrelation zwischen zirkulierenden Th17-Zellen und Treg-Zellen bestätigt werden ($n=40$, $r^2 = 0.439$, $p < 0.001$, Abbildung 7 A). Außerdem wurde eine inverse Korrelation zwischen der Th1-Antwort und Treg-Zellen dokumentiert ($n=40$, $r^2 = 0.297$, $p=0.003$, Abbildung 7B).

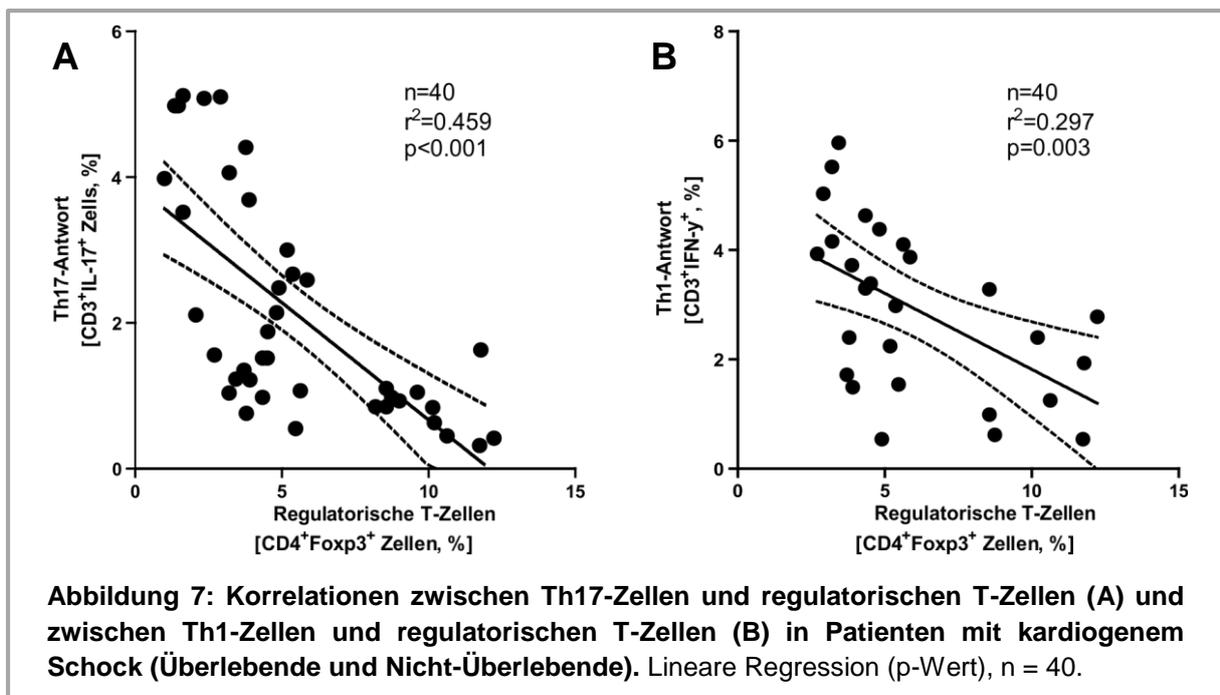
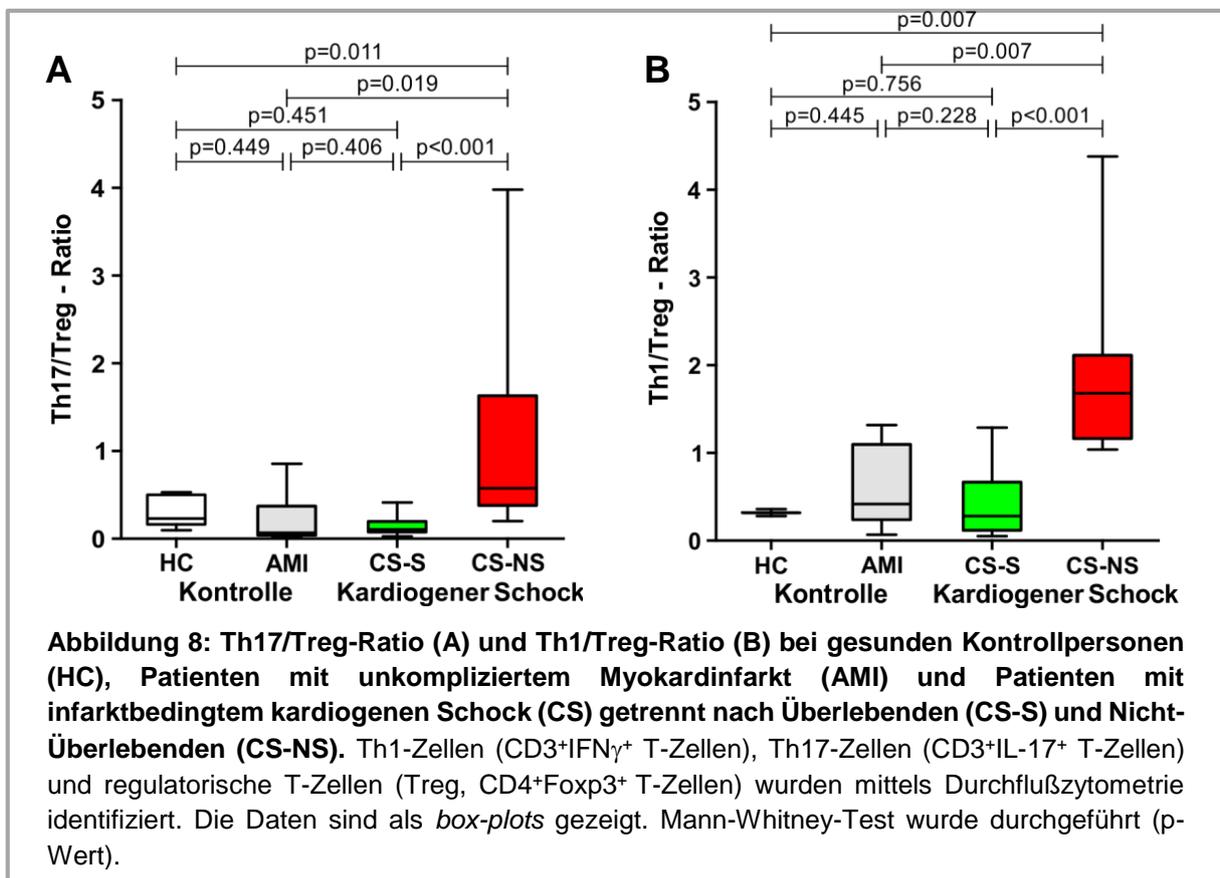


Abbildung 8 zeigt die Th17/Treg - und die Th1/Treg - Ratio bei gesunden Kontrollen, Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt und Patienten im kardiogenen Schock, getrennt nach Überlebenden und Nicht-Überlebenden. Bei Nicht-Überlebenden im kardiogenen Schock wurden hochsignifikante Th17/Treg - und Th1/Treg - Ratios gefunden, die eine proinflammatorische Th1- und Th17-Antwort förderten ($p < 0.001$, Abbildung 8).

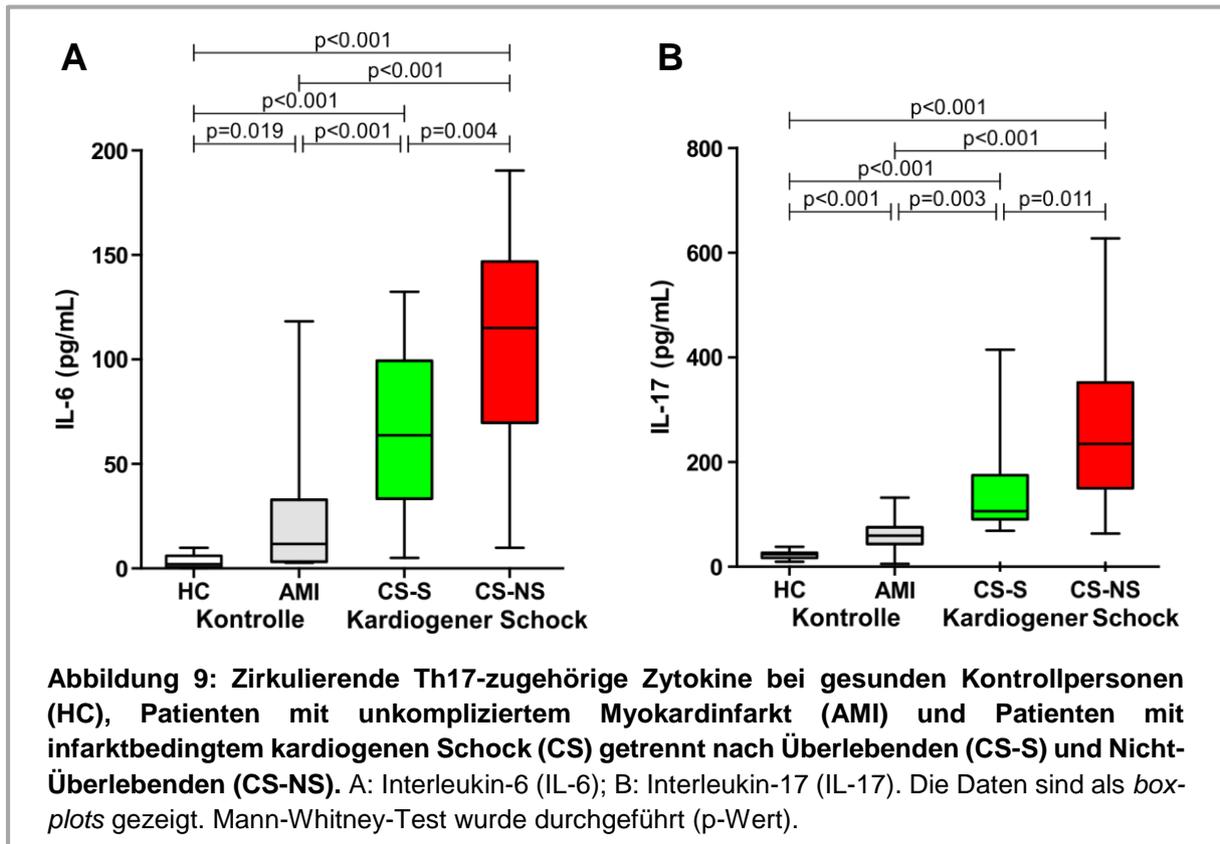


4.4 Intrazelluläre Expression von Zytokinen

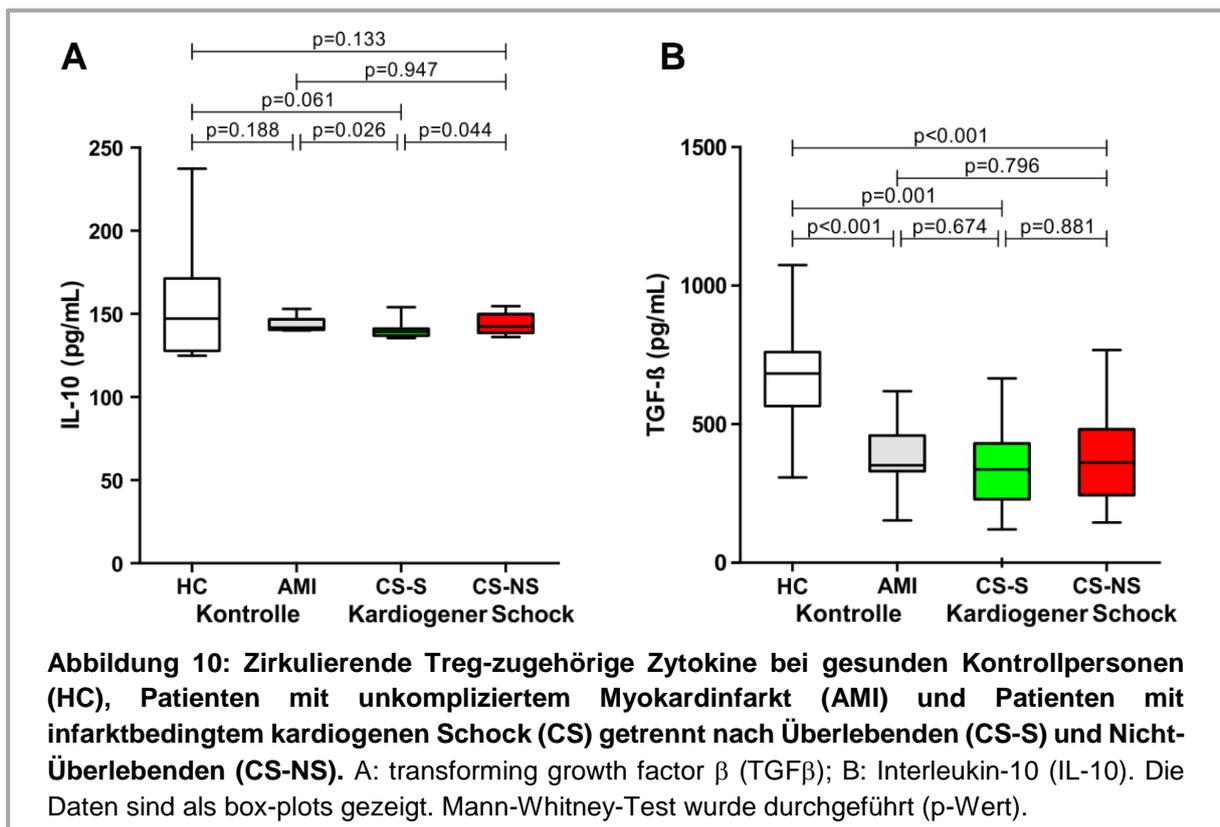
Die intrazelluläre Expression diverser Zytokine in T-Zell-Subpopulationen ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Th1-Antwort, gemessen durch die Frequenzen $\text{IFN}\gamma$ produzierender CD3^+ T-Zellen, war bei Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt und im kardiogenen Schock im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant gesteigert ($p < 0.022$). Myokardinfarktpatienten zeigten einen breiten Bereich in dieser T-Zellpopulation. Die $\text{IFN}\gamma^+\text{CD3}^+$ T-Zellen zeigten sich in nicht überlebenden kardiogener Schock Patienten stärker erhöht als in überlebenden Patienten ($p < 0.044$). Die Th2-Antwort, gemessen durch die Produktion von IL-4 und IL-10 in CD3^+ T-Zellen, war dagegen nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen. Eine Änderung der intrazellulären Expression von IL-35 und $\text{TGF}\beta$ konnte nicht nachgewiesen werden.

4.5 Zirkulierende Zytokine

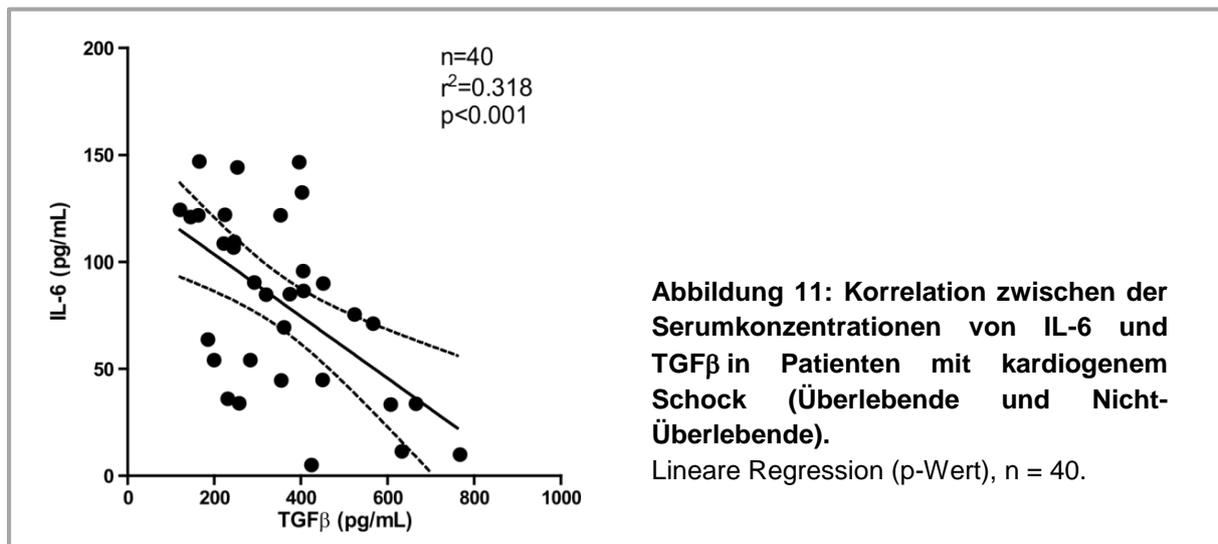
Alle Patienten mit akuten Koronarsyndromen zeigten eine Steigerung der folgenden proinflammatorischen Zytokine: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-6 und IL-17 (Tabelle 3). Jedoch wies nur die Expression von IL-6 und IL-17 einen direkten Zusammenhang mit dem Schweregrad oder der Progression eines kardiogenen Schocks auf. Nicht-Überlebende im kardiogenen Schock hatten deutlich erhöhte Plasmaspiegel beider Zytokine (IL-6: 106.70 ± 46.13 vs. 64.74 ± 42.46 pg/mL, $p = 0.004$; IL-17: 271.90 ± 158.00 vs. 146.50 ± 95.13 pg/mL, $p = 0.011$; Abbildung 9).



Im Gegensatz dazu waren die zirkulierenden antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β bei akuten Koronarsyndromen signifikant vermindert (Abbildung 10).



Allerdings korrelierte die Reduktion antiinflammatorischer Zytokine mit der Schwere der akuten Koronarsyndrome in dieser Studie nicht (Tabelle 3). Es wurden keine signifikante Korrelationen zwischen den Treg-Frequenzen und den Serumkonzentrationen von folgenden zirkulierenden Zytokinen gefunden: IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ und TNF α (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich aber eine inverse Korrelation zwischen IL-6 und TGF β (Abbildung 11).



5 Diskussion

Diese Arbeit konnte erstmals nachweisen, dass der Schweregrad eines infarktbedingten kardiogenen Schocks und seine Folgen (28-Tage-Mortalität) in enger Beziehung mit (1) einem Th17/Treg Ungleichgewicht in Richtung einer Th17 Differenzierung und (2) einer Änderung des Zytokinmilieu steht, welche eine Erhöhung von IL-6 begünstigt. Patienten im kardiogenem Schock, die nicht überlebten, zeigten eine deutliche Th17-Polarisierung mit Reduktion der Treg-Anzahl im Verhältnis zu Überlebenden im kardiogener Schock und Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt.

Eine effektive Koordination des Immunsystems benötigt ein adäquates Gleichgewicht der verschiedenen T-Helfer-Zellpopulationen. IL-17-produzierende Th17-Zellen spielen eine Schlüsselrolle in Immunreaktionen gegen extrazelluläre Pathogene, der Induktion verschiedener Autoimmunerkrankungen und der Atopie⁶⁶. Die Th17-Antwort könnte auch in der Pathogenese der Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque

und der Entstehung von akuten Koronarsyndromen involviert sein ⁹⁰. Des Weiteren wurde auch eine Verminderung der Treg-Zellen in mehreren Autoimmunpathologien ⁵⁹ und bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen ^{33,34} beschrieben.

5.1 Regulatorischer T-Zellen und das Zytokinprofil im Schock

Der Einfluss von zirkulierenden Zytokinen auf die Proliferation und Aktivierung der Treg-Zellen im kardiogenen Schock ist nicht bekannt; umgekehrt ist auch nicht bekannt welchen Effekt Treg-Zellen auf die Zytokinproduktion im Schock haben. In dieser Arbeit konnte keine starke Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an Treg-Zellen und den Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ und TNF α im Serum gefunden werden. Daher erscheinen Treg-Zellen für die Modulierung der inflammatorischen Antwort im kardiogenen Schock nicht unverzichtbar zu sein.

IL-10 gilt als eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine und ist für verschiedene inhibitorischen Inflammationsmechanismen verantwortlich ^{50,91}. IL-10 ist in die Treg-vermittelte Suppression involviert und hemmt die Th1-Antwort ^{52,92}. Diese Studie dokumentierte nur eine marginale Diminution des IL-10-Niveaus im Serum in Patienten im kardiogenem Schock die nicht überlebten. Diese Ergebnisse können eine protektive Rolle von IL-10 in der Magnitude der Immunantwort im kardiogenen Schock nicht stützen.

5.2 Regulatorische T-Zellen und die Th1-/Th17-Immunantwort im Schock

In dieser Arbeit wurde eine Verminderung der regulatorischen T-Zellen (Treg) mit konsekutiver Induktion der proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen zu Beginn eines kardiogenen Schocks nachgewiesen. IL-17-produzierende Th17-Zellen sind bei Nicht-Überlebenden im kardiogenen Schock im Verhältnis zu Überlebenden und Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt signifikant angestiegen. In Konkordanz mit vorherigen Beobachtungen bei Myokardinfarkt-Patienten ³² wurde in dieser Studie ein Ungleichgewicht zwischen den Frequenzen von Treg-Zellen und Th17-Zellen nicht nur bei Patienten mit unkompliziertem Myokardinfarkt sondern auch bei Patienten im infarktbedingten kardiogenen Schock gefunden. Die Frequenz von Th1-Zellen war bei akuten Koronarsyndromen ebenfalls signifikant erhöht. Es wurde eine inverse Korrelation zwischen Th1-Zellen und Treg-Zellen nachgewiesen. Das Th2-

Kompartiment zeigte in den verschiedenen Gruppen von akuten Koronarsyndromen keine signifikanten Unterschiede. In der Literatur wurde eine Prädominanz der Th1-Antwort, kombiniert mit einer starken inversen Korrelation zwischen Treg-Zellen und Th1-Zellen, bei akuten Koronarsyndromen beschrieben³⁴. Bei einer mangelhaften suppressiven Treg-Funktion können Th1-Zellen während akuter kardialer Ereignisse proliferieren und dadurch die proinflammatorische Zytokin-Antwort steigern^{77,82}.

5.3 Antiinflammatorische Zytokine in T-Zellpopulationen im Schock

Patienten, die infolge eines infarktbedingten kardiogenen Schocks innerhalb von 28 Tagen verstarben, hatten deutlich weniger regulatorische T-Zellen (Treg) als Überlebende. Die funktionellen Eigenschaften der Treg-Zellen wurden in dieser Studie nicht direkt evaluiert. Allerdings war die numerische Reduktion der Treg-Zellen in Nicht-Überlebenden eines kardiogenen Schocks nicht mit einer Dysfunktion dieser T-Zellpopulation assoziiert, da die intrazelluläre Expression von TGF β und IL-10 in dieser T-Zellsubpopulation nicht eingeschränkt war. Die Expression von IL-35, einem wichtigen Faktor für die Expansion und Funktion der Treg-Zellen^{93,94}, zeigte sich auch gleichbleibend.

5.4 Transforming growth factor β (TGF β) im kardiogenen Schock

Auch wenn die intrazelluläre T-Zellproduktion des antiinflammatorischen TGF β im kardiogenen Schock unverändert war, waren die Serumkonzentrationen dieses Zytokins bei allen akuten Koronarsyndromen deutlich erniedrigt, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zwischen Myokardinfarkt und kardiogenem Schock. TGF β wird nicht nur von Lymphozyten sondern auch von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert⁹⁵. Deshalb können mehrere Zellpopulationen für die Senkung von TGF β in akuten Koronarsyndromen verantwortlich sein. Aktives TGF β ist wichtig für die Treg-vermittelte Immunsuppression und die Erhaltung der peripheren Toleranz^{44,96}. Die verminderte TGF β -Produktion zeigt im Zusammenhang mit der Treg-Depletion eine deutliche Unterdrückung der regulatorischen Mechanismen während des Schocks. Diese Treg Depletion könnte sogar zur Morbidität/Mortalität dieser Patienten beitragen.

5.5 Interleukin 6 im kardiogenen Schock

Im Allgemeinen ist der kardiogene Schock mit hohen Niveaus zirkulierenden IL-6 assoziiert. IL-6 ist ein von Th17-Zellen produziertes Zytokin, welches potente proinflammatorische Effekte aufweist⁸⁵. IL-6 gehört zu den sensitivsten inflammatorischen Marker für kardiovaskuläre Ereignisse^{97,98} und besitzt eine prognostische Relevanz bei akuten Koronarsyndromen⁹⁹. In dieser Studie hatten Patienten mit höheren IL-6-Niveaus eine schlechtere Prognose, was darauf hindeutet, dass Patienten mit einer übererhöhten proinflammatorischen Antwort während des kardiogenen Schocks eine Hochrisikopopulation für kardiovaskuläre Komplikationen repräsentieren.

Naive CD4⁺ T-Zellen differenzieren sich in verschiedenen Subpopulationen abhängig vom Zytokinmilieu. IL-6 und IL-23 induzieren die Differenzierung der T-Zellen in IL-17-produzierende Th17-Zellen⁷⁰. Von Treg-Zellen exprimiertes TGF β induziert auch die Th17- Differenzierung in Anwesenheit von IL-6. TGF β alleine stimuliert die Treg-Differentiation, aber die Präsenz von IL-6 inhibiert die Entwicklung von Treg-Zellen und favorisiert die Th17-Polarisierung^{71,75}. Da TGF β für die Differenzierung beider T-Zellpopulationen benötigt wird, ist es bisher nicht klar wie das Th17/Treg Equilibrium erreicht wird und inwiefern IL-6 eine Th17-Polarisierung beeinflusst^{69,76}.

Die verminderte TGF β -Sekretion in Kombination mit erhöhten IL-6-Werten ist der führende Mechanismus, welcher eine Reduktion der Treg-Anzahl mit begleitender Erhöhung der Th17-Zellen in Patienten mit kardiogenem Schock erklären könnte. Dieser Mechanismus wurde von der inversen Korrelation zwischen IL-6 und TGF β bzw. Th17- und Treg-Zellen in dieser Arbeit unterstützt.

5.6 Interleukin 17 im kardiogenen Schock

Die Präsenz einer akuten Inflammation im kardiogenen Schock hat sich in dieser Studie bei den erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ , TNF- α , IL-2, IL-6 und IL-17 bestätigt. Die Relevanz von IL-17 in akutem Koronarsyndrom ist unklar, wenngleich einige Studien die proatherogene Rolle von IL-17 unterstützen^{79,80,90}. Eine schützende Funktion von IL-17 in koronaren Herzkrankheiten wurde ebenfalls angedeutet^{74,100}. Eine vor kurzem publizierte Studie

legt nahe, dass eine verminderte Konzentration an zirkulierendem IL-17 mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko wie Myokardinfarkt und Mortalität verbunden ist ¹⁰¹. Allerdings unterstützen die Ergebnisse unserer Studie die Hypothese, dass erhöhte IL-17-Konzentrationen im Kontext eines kardiogenen Schocks schädlich sein können. Diese Ergebnisse liefern eine weitere Evidenz für eine Funktion von IL-17, welche über die Instabilität der Plaque hinausgeht, und mit einem hämodynamischen Versagen sowohl im septischen Schock ¹⁰² als auch im kardiogenen Schock einhergeht (unsere Studie) ¹⁰³.

5.7 Perspektiven dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieses Projektes war es die Mechanismen der T-Zellregulation bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen zu charakterisieren. Bisher gab es keine Daten über die Rolle der regulatorischen T-Zellen (Treg) im kardiogenen Schock.

Eine wichtige Frage für zukünftige Studien ist es zu beurteilen, ob die reduzierte Anzahl an Treg-Zellen einen Risikofaktor für die Entwicklung und die Schwere des Verlaufes von akuten Koronarsyndromen (unkomplizierter Myokardinfarkt, kardiogener Schock, Mortalität) bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung ist. Prospektive Studien sind notwendig, um zu erforschen inwiefern eine Treg-„down“-Regulation ein neuer prädiktiver Marker für Prognose von akuten Koronarsyndromen sein könnte. Da viele verschiedene Treg-Populationen existieren, muss eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Treg-Zellen in akuten Koronarsyndromen erfolgen. Diese Erkenntnisse könnten bedeutende therapeutische Folgen haben, da die Induktion regulatorischer T-Zellpopulationen über verschiedene Mechanismen erfolgen kann.

Für die Stimulation der Treg-Zellen gibt es verschiedene Strategien, die bereits in anderen klinischen Kontexten hilfreich sind. Die Induktion der Treg-Zellen mittels IL-2-Anwendung wird in der Transplantationsmedizin zur Prävention der graft versus host disease (GVHD) erfolgreich genutzt ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Statine sind auch in der Lage Treg-Zellen durch die Modulation antigenpräsentierender Zellen positiv zu beeinflussen ³⁶. Eine frühe Rekrutierung von Treg durch Induktion regulatorischer Chemokine kann plaquestabilisierend wirken, die inflammatorischen Reaktionen limitieren und ein ungünstiges Remodeling nach dem Myokardinfarkt verhindern ^{35,107}. Durch die Inhibierung inflammatorischer Mechanismen könnte sich eine Stimulierung der Treg-

Zellen günstig auf den Verlauf eines infarktbedingten kardiogenen Schocks auswirken.

6 Schlussfolgerung

Die Messung der T-Zellpopulationen und Zytokine in dieser Arbeit lieferte wichtige Informationen über die inflammatorischen Prozesse während der ersten Stunden nach Beginn des kardiogenen Schocks. Auch wurden Hinweise über die Präsenz multipler Immunabnormitäten im kardiogenen Schock gefunden. Das Ungleichgewicht zwischen pathogenen Th1-Zellen, inflammatorischen Th17-Zellen und protektiven Treg-Zellen kann für den Verlauf und die Prognose des infarktbedingten kardiogenen Schocks entscheidend sein. Das Th1/Th17/Treg Ungleichgewicht könnte einen Risikoindikator und eine vielversprechendes therapeutisches Target im kardiogenen Schock repräsentieren.

Allerdings ist diese Studie wegen ihres retrospektiven Designs und der relativ kleinen Patientenzahl limitiert. Trotzdem bieten die Befunde dieser Arbeit eine wichtige Einsicht bezüglich der T-Zellregulation bei Patienten mit kardiogenem Schock und weisen auf eine neue Therapiemöglichkeit der Immunmodulation im kardiogenen Schock hin. Weitere Forschungen zur pathophysiologischen Bedeutung der Th17/Treg-Ratio und ihrer Immunmodulation als neue therapeutische Strategie im kardiogenen Schock sind notwendig.

7 Literaturverzeichnis

1. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *The New England journal of medicine* 2013;368:2004-13.
2. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2005;352:1685-95.
3. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-reactive protein, an inflammatory marker, and infectious serology as risk factors for coronary artery disease and myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 1998;32:35-41.
4. Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, et al. Increased incidence of Chlamydia species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 1996;27:1555-61.
5. Melnick JL, Hu C, Burek J, Adam E, DeBaakey ME. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *Journal of medical virology* 1994;42:170-4.
6. Shi Y, Tokunaga O. Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. *Pathology international* 2002;52:31-9.
7. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Progress in lipid research* 2006;45:466-86.
8. Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1113:217-37.
9. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature reviews Immunology* 2005;5:331-42.
10. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research* 2004;63:582-92.
11. Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, Davi G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Internal and emergency medicine* 2009;4:389-401.
12. De Palma R, Del Galdo F, Abbate G, et al. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-cell recruitment within unstable plaque: evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism. *Circulation* 2006;113:640-6.
13. de Boer OJ, van der Wal AC, Verhagen CE, Becker AE. Cytokine secretion profiles of cloned T cells from human aortic atherosclerotic plaques. *The Journal of pathology* 1999;188:174-9.
14. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;100:2135-9.
15. Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2009;119:1424-32.
16. Laurat E, Poirier B, Tupin E, et al. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2001;104:197-202.
17. Liuzzo G, Vallejo AN, Kopecky SL, et al. Molecular fingerprint of interferon-gamma signaling in unstable angina. *Circulation* 2001;103:1509-14.

18. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circulation research* 1997;81:448-54.
19. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1-5.
20. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428-35.
21. Werdan K, Russ M, Buerke M, et al. Cardiogenic shock due to myocardial infarction: diagnosis, monitoring and treatment: a German-Austrian S3 Guideline. *Deutsches Arzteblatt international* 2012;109:343-51.
22. Ouweneel DM, Henriques JP. Percutaneous cardiac support devices for cardiogenic shock: current indications and recommendations. *Heart* 2012;98:1246-54.
23. Buerke M, Lemm H, Dietz S, Werdan K. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of infarction-related cardiogenic shock. *Herz* 2011;36:73-83.
24. Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, et al. Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *The New England journal of medicine* 1999;341:625-34.
25. Fincke R, Hochman JS, Lowe AM, et al. Cardiac power is the strongest hemodynamic correlate of mortality in cardiogenic shock: a report from the SHOCK trial registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;44:340-8.
26. Torgersen C, Schmittinger CA, Wagner S, et al. Hemodynamic variables and mortality in cardiogenic shock: a retrospective cohort study. *Critical care* 2009;13:R157.
27. Mazzone A, De Servi S, Vezzoli M, et al. Plasma levels of interleukin 2, 6, 10 and phenotypic characterization of circulating T lymphocytes in ischemic heart disease. *Atherosclerosis* 1999;145:369-74.
28. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis. *Seminars in immunopathology* 2009;31:23-33.
29. Lahoute C, Herbin O, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nature reviews Cardiology* 2011;8:348-58.
30. Liuzzo G, Biasucci LM, Trota G, et al. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;50:1450-8.
31. Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *European heart journal* 2006;27:2530-7.
32. Cheng X, Yu X, Ding YJ, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clinical immunology* 2008;127:89-97.
33. Li Q, Wang Y, Chen K, et al. The role of oxidized low-density lipoprotein in breaking peripheral Th17/Treg balance in patients with acute coronary syndrome. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;394:836-42.
34. Han SF, Liu P, Zhang W, et al. The opposite-direction modulation of CD4+CD25+ Tregs and T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clinical immunology* 2007;124:90-7.
35. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American journal of pathology* 2010;176:2177-87.
36. Zhang D, Wang S, Guan Y, et al. Effect of oral atorvastatin on CD4+CD25+ regulatory T cells, FoxP3 expression, and prognosis in patients with ST-segment elevated myocardial

- infarction before primary percutaneous coronary intervention. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2011;57:536-41.
37. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of immunology* 2001;167:1245-53.
 38. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
 39. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-8.
 40. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 1995;155:1151-64.
 41. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 2005;6:345-52.
 42. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews* 2006;212:8-27.
 43. Becker C, Stoll S, Bopp T, Schmitt E, Jonuleit H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Medical microbiology and immunology* 2006;195:113-24.
 44. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 2003;198:1875-86.
 45. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology* 2009;21:1105-11.
 46. Sansom DM, Walker LS. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological reviews* 2006;212:131-48.
 47. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology* 2008;8:523-32.
 48. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 2006;212:28-50.
 49. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* 2013;19:739-46.
 50. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103:131-6.
 51. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009;31:401-11.
 52. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *Journal of immunology* 2006;177:5852-60.
 53. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *Journal of immunology* 2007;178:179-85.
 54. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *Journal of immunology* 2007;178:172-8.

55. Gilliet M, Boonstra A, Paturol C, et al. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 2002;195:953-8.
56. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature clinical practice Neurology* 2008;4:384-98.
57. Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology* 2005;6:327-30.
58. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2012;26:2253-76.
59. Hansen W, Westendorf AM, Buer J. Regulatory T cells as targets for immunotherapy of autoimmunity and inflammation. *Inflammation & allergy drug targets* 2008;7:217-23.
60. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 2011;10:744-55.
61. Nie CQ, Bernard NJ, Schofield L, Hansen DS. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress CD4+ T-cell function and inhibit the development of Plasmodium berghei-specific TH1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. *Infection and immunity* 2007;75:2275-82.
62. Moore AC, Gallimore A, Draper SJ, Watkins KR, Gilbert SC, Hill AV. Anti-CD25 antibody enhancement of vaccine-induced immunogenicity: increased durable cellular immunity with reduced immunodominance. *Journal of immunology* 2005;175:7264-73.
63. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunological reviews* 2008;223:371-90.
64. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Critical care medicine* 2004;32:2329-31.
65. Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)/CD25 (+)/CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive care medicine* 2009;35:678-86.
66. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* 2013;121:2402-14.
67. Robinson KM, Manni ML, Biswas PS, Alcorn JF. Clinical consequences of targeting IL-17 and TH17 in autoimmune and allergic disorders. *Current allergy and asthma reports* 2013;13:587-95.
68. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology* 2007;8:345-50.
69. Yosef N, Shalek AK, Gaublomme JT, et al. Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 2013;496:461-8.
70. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2013;18:247-65.
71. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 2012;13:991-9.
72. Li L, Boussiotis VA. The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical immunology* 2013;148:246-53.
73. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 2013;62:175-82.

74. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, et al. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012;32:273-80.
75. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological reviews* 2013;252:52-77.
76. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2012;34:727-39.
77. Zhao Z, Wu Y, Cheng M, et al. Activation of Th17/Th1 and Th1, but not Th17, is associated with the acute cardiac event in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2011;217:518-24.
78. Barry SP, Ounzain S, McCormick J, et al. Enhanced IL-17 signalling following myocardial ischaemia/reperfusion injury. *International journal of cardiology* 2013;163:326-34.
79. Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *Journal of the American College of Cardiology* 2012;59:420-9.
80. Zhu F, Wang Q, Guo C, et al. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clinical immunology* 2011;141:152-60.
81. Herbin O, Ait-Oufella H, Yu W, et al. Regulatory T-cell response to apolipoprotein B100-derived peptides reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012;32:605-12.
82. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine* 2007;17:113-8.
83. Sardella G, De Luca L, Francavilla V, et al. Frequency of naturally-occurring regulatory T cells is reduced in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Thrombosis research* 2007;120:631-4.
84. Bodi V, Sanchis J, Nunez J, et al. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread. *American heart journal* 2008;156:1065-73.
85. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coronary artery disease* 2006;17:699-706.
86. Liuzzo G, Trotta F, Pedicino D. Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad, and the unknown. *European heart journal* 2013;34:556-9.
87. Idanpaan-Heikkila JE. WHO guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products: responsibilities of the investigator. *Annals of medicine* 1994;26:89-94.
88. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *The New England journal of medicine* 1985;312:932-6.
89. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *Jama* 1993;270:2957-63.
90. Gao Q, Jiang Y, Ma T, et al. A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. *Journal of immunology* 2010;185:5820-7.
91. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Chen W, Nakao S, Hess AD. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood* 2002;100:2650-8.

92. Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *Journal of immunology* 2006;176:5839-47.
93. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-9.
94. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *European journal of immunology* 2007;37:3021-9.
95. Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *Journal of leukocyte biology* 2009;85:29-33.
96. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *Journal of immunology* 2005;174:1446-55.
97. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS medicine* 2008;5:e78.
98. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
99. Empana JP, Jouven X, Canoui-Poitrine F, et al. C-reactive protein, interleukin 6, fibrinogen and risk of sudden death in European middle-aged men: the PRIME study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010;30:2047-52.
100. Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:2067-77.
101. Simon T, Taleb S, Danchin N, et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *European heart journal* 2013;34:570-7.
102. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Critical care* 2010;14:R19.
103. del Rosario Espinoza Mora M, Bohm M, Link A. The Th17/Treg imbalance in patients with cardiogenic shock. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2014;103:301-13.
104. Haase D, Starke M, Puan KJ, Lai TS, Rotzschke O. Immune modulation of inflammatory conditions: regulatory T cells for treatment of GvHD. *Immunologic research* 2012;53:200-12.
105. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 2011;365:2055-66.
106. Matsuoka K, Koreth J, Kim HT, et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Science translational medicine* 2013;5:179ra43.
107. Heller EA, Liu E, Tager AM, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 2006;113:2301-12.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent, von Hundert
°C	Grad Celsius, SI-Einheit für Temperatur
$\gamma\delta$ -T-Zelle	T-Zellsubtyp (TCR $\gamma\delta$)
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Tyrosin
A2AR	Adenosin Rezeptor 2A
Abb.	Abbildung
ACS	akutes Koronarsyndrom (<i>acute coronary syndrome</i>)
AMI	akuter Myokardinfarkt (<i>acute myocardial infarction</i>)
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
ATP	Adenosintriphosphat
B7-Molekülen	CD80 und CD86
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
CD25	α -Kette des IL-2-Rezeptors
CD152	CTLA4
CD223	LAG3 (<i>lymphocyte-activation gene 3</i>)
CI	Herzindex (<i>cardiac index</i>)
cm, mm, μ m, nm	Zenti-, Milli-, Mikro, Nanometer
CO ₂	Kohlendioxid
CPI	<i>cardiac power index</i>
CS	kardiogener Schock (<i>cardiogenic shock</i>)
CTLA4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i> (CD152)
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DR5	<i>death receptor 5</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
et al.	<i>et alli</i>

FACS	Fluoreszenzaktivierter Zell-Sortierer (<i>fluorescence activated cell sorter scanning</i>)
Fas	Fas-Rezeptor
FasL	<i>Fas-ligand</i> (Ligand des Fas-Rezeptors)
Fc	<i>fraction crystallizable</i>
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
Foxp3	<i>forkhead/winged helix transcription factor 3; forkhead box protein p3</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter) im Durchflusszytometer
g, mg, µg, ng, fg	Gramm, Milli-, Mikro-, Nano-, Femtogramm
GATA	<i>trans-acting T-cell-specific transcription factor</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNF-like receptor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GVHD	<i>graft versus host disease</i>
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.v.	intravenös
IABP	intraaortale Ballonpumpe
IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN γ	<i>interferon gamma</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G; häufigster Isotyp im Blut; Verwendung für Kontrollfärbungen zur Ermittlung der unspezifischen Bindung von monoklonalen Antikörpern
IgGκ	Immunglobulin G Typ kappa <i>light-chain</i> Antikörper
IL	Interleukin
IPEX	<i>immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked Syndrome</i>
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
kDa	Kilodalton
LAG-3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i> (CD223)
LT α	Lymphotoxin alpha
M, mM, µM	Molarität, Milli- und Mikromolarität
MAP	mittlere arterielle Druck (<i>mean arterial blood pressure</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHC-I	MHC-Klasse-I-Komplex
MHC-II	MHC-Klasse-II-Komplex

mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Zelle mit Eigenschaften von natürlichen Killerzellen und T-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt (<i>non-ST-elevation myocardial infarction</i>)
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
p	p-Wert
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i> , perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischen Logarithmus der Konzentration an H_3O^+
PMA	Phorbolmyristataacetat
PRR	Rezeptor für PAMP (<i>pattern recognition receptor</i>)
PCWP	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck (<i>pulmonary capillary wedge pressure</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROR- γ	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium
SI	Internationales Einheitensystem (<i>Système international d'unités</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>) im Durchflusszytometer
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i> , ST-Hebungsinfarkt
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TCR α β	T-Zell-Rezeptor bestehend aus α und β Kette (häufiger TCR-Typ)
TCR γ δ	T-Zell-Rezeptor bestehend aus γ und δ Kette (seltener TCR-Typ)
TEff	T-Effektorzelle
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	T-Helferzelle
TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i>

Tr1	regulatorische T-Zelle Typ 1
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Hydroxymethylaminomethan
U	Unit: Einheit der Enzymaktivität
UR	Rechter oberer Quadrant in einem Dotplot (<i>upper right quadrant</i>)
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbare Anteil des Licht
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel

9 Danksagung

Ich möchte mich bei PD Dr. med. Andreas Link und bei Prof. Dr. med. Michael Böhm für ihre Betreuung, Empfehlungen und Beratung in der Planung und Durchführung dieses Forschungsprojekts bedanken. Ein besonderer Dank gilt Frau Nina Rebmann für ihre exzellente technische Unterstützung bei der Verarbeitung der Proben und die Generierung der Daten. Ebenso möchte ich mich beim Personal der Klinik für Innere Medizin III Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Unterstützung während der Durchführung dieses Projektes bedanken. Die Realisierung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die finanzielle Förderung der Deutschen Herzstiftung und der Universität des Saarlandes.

10 Eigene Publikationen

- 2014 **Espinoza Mora MR**, Böhm M, Link A. Cardiogenic shock leads to immunoparalysis. *In preparation*.
- 2014 **Espinoza Mora MR**, Chan Cheng H, León Bratti MP. Immunopathology of the human immunodeficiency virus (HIV). *In revision*.
- 2014 **Espinoza Mora MR**, Chan Cheng H, León Bratti MP. Report of cases from the Uveitis Clinic, 2013-2014, Hospital México, Costa Rica. *In revision*.
- 2014 **Espinoza Mora MR**, Lazo Páez G. Vaccination guidelines for receptors of haematopoietic stem cells transplantation, Costa Rica, 2014. *Submitted*.
- 2014 Link A, Schirmer SH, Pöss J, Hohl M, Rbah R, **Espinoza Mora MR**, Feth L, Böhm M. Differential Induction of the Toll-Like-Receptor 4 MyD88-Dependent and -Independent Signaling in Cardiogenic Shock. *Crit Care Med*. *In revision*.
- 2014 **Espinoza Mora MR**, Steeg C, Tartz S, Heussler V, Sparwasser T, Fleischer B, Link A, Jacobs T. Depletion of regulatory T cells augments a vaccine-induced T effector cell response against the liver-stage of malaria but fails to increase memory. *PLoS One*. 2014 Aug 12; 9 (8): e104627. doi: 10.1371/journal.pone.0104627.
- 2013 **Espinoza Mora MR**, Böhm M, Link A. The Th17/Treg imbalance in patients with cardiogenic shock. *Clin Res Cardiol*. 2014 Apr; 103 (4): 301-13. doi: 10.1007/s00392-013-0656-0. Epub 2013 Dec 28.
- 2013 **Espinoza Mora MR**, Böhm M, Link A. Th17 response and regulatory T cells in cardiogenic shock. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2013, 4; 359
- 2010 **Espinoza Mora MR**. Role of regulatory T-cells during experimental infection with *Plasmodium berghei* in mice (Naturwissenschaftliche Doktorarbeit). Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, University of Hamburg, Germany, 2010.
- 2007 **Espinoza Mora MR**. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of components of trees from the species *Cedrela odorata*, *C. tonduzii* and *C. salvadorensis* (Masterarbeit). University Medical Center "Hospital San Juan de Dios", San José, Costa Rica; University for Medical Sciences (UCIMED), San José, Costa Rica; National University of Costa Rica (UNA), Heredia, Costa Rica; University of Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.

10.1 Nutzungsberechtigung

SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 23, 2015

This is a License Agreement between Maria d Rosario Espinoza Mora ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3574880110752
License date	Feb 23, 2015
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Clinical Research in Cardiology
Licensed content title	The Th17/Treg imbalance in patients with cardiogenic shock
Licensed content author	Maria del Rosario Espinoza Mora
Licensed content date	Jan 1, 2013
Volume number	103
Issue number	4
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures
Author of this Springer article	Yes and you are the sole author of the new work
Order reference number	None
Original figure numbers	Tables 1, 2; figures 1, 2, 3, 4, 5, 6
Title of your thesis / dissertation	Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen bei Patienten im kardiogenen Schock
Expected completion date	Feb 2015
Estimated size(pages)	66
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Introduction

The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Limited License

With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry.