

**Die Rolle von Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 im
Remodeling des reperfundierten Myokardinfarktes
bei Mäusen**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von
Kim Sabine Winkelmann
aus Attendorn

Erscheinungsjahr 2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Welz

2. Gutachter: PD Dr. med. Tiemann

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.12.2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
 Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
 Bonn

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Armin Welz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Glossar	8
1 Einleitung	10
1.1 Einführung in die Thematik	10
1.2 Pathomechanismus der Arteriosklerose	10
1.3 Ischämie und Myokardinfarkt	11
1.4 Reperfusion	13
1.4.1 Auswirkungen der Inflammation während der Reperfusion	13
1.5 Inflammation und beeinflussende Mediatoren	15
1.5.1 Zytokine	15
1.5.2 Charakterisierung wichtiger Zytokine	16
1.6 Chemokine	18
1.6.1 Klassifizierung und Nomenklatur von Chemokinen	19
1.7 Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1)	20
1.8 Arbeitshypothese	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Definition der untersuchten Mäusegruppen	23
2.2 Tieroperative Techniken	24
2.2.1. Implantation der Ligatur	24
2.2.2. Myokardischämie und –Reperfusion	26
2.2.3 Entnahme der Herzen	27
2.2.4 Histologische Fixierungsmethoden	28
2.3 Histologische Techniken	30
2.3.1 Auswahl der histologischen Präparate	30
2.3.2 Allgemeine Schritte bei histologischen Färbungen	30
2.3.3 Hämatoxylin-Eosin	31
2.3.4 Kollagenfärbung mit Sirius Rot	32
2.4 Immunhistochemische Techniken	32
2.4.1 Makrophagenfärbung (F4/80-Antigen)	32
2.4.2 Neutrophile Granulozyten	33

	Seite
2.4.3 Färbung arterieller Gefäße und Myofibroblasten (α SMAc)	34
2.4.4 Endothelzellenfärbung mit CD31 Antikörper	35
2.5 Auswertung der Histologie	36
2.5.1 Kollagenauswertung	36
2.5.2 Auswertung der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten	37
2.5.3 Auswertung der α SMAc-Färbung	37
2.5.4 CD31-Auswertung	38
2.5.5 Auswertung der perfusionsfixierten Herzen	38
2.6 Molekularbiologische Methoden	40
2.6.1 RNA-Isolation	40
2.6.2 RNA-Protection-Assay (RPA) - allgemeine Voraussetzungen	41
2.6.2.1 RPA Protokoll	42
2.6.2.2 Synthese der cRNA-Sonde	42
2.6.2.3 Markierung der cRNA-Sonden	42
2.6.2.4 Präparation der Proben	44
2.6.2.5 RNase Behandlung	45
2.6.2.6 Präparation der Gelelektrophorese-Apparatur	46
2.6.2.7 Präparation des Urea-Polyacrylamid Gels	47
2.7 Analyse der Messungen mit Image Quant	48
2.8 Statistische Auswertung	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Operative Ergebnisse	50
3.2 Histologischer Vergleich: WT- versus MCP-1 ^{-/-} -Mäuse	50
3.2.1 Wundheilung in WT-Mäusen	50
3.2.2 Verzögerte Wundheilung bei MCP-1 ^{-/-} -Mäusen	51
3.3 Immunhistochemische Ergebnisse	52
3.3.1 Makrophagenmigration	52
3.3.2 Neutrophile Granulozyten	53
3.3.3. Myofibroblasten als Marker der verzögerten Wundheilung bei MCP-1 ^{-/-} -Mäusen	54

	Seite
3.3.4 Myozytenphagozytose bei MCP-1 ^{-/-} -Mäusen	54
3.3.5 Einfluss von MCP-1 auf die Angiogenese	55
3.4 Molekularbiologische Ergebnisse	56
3.4.1 mRNA-Expression der Zytokine	56
3.4.1.1 Interleukin-1 β -Expression	56
3.4.1.2 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression	57
3.4.1.3 IL-6-mRNA-Expression	58
3.4.1.4 Interleukin-10-mRNA-Synthese	59
3.4.1.5 TGF- β -mRNA-Synthese	60
3.4.1.6 Osteopontin-mRNA-Expression	63
3.5 Chemokin Expression	64
3.5.1 MIP-1 α und MIP-1 β -mRNA-Expression	64
3.5.2 MIP-2-mRNA-Expression	66
3.6 Auswirkung von MCP-1 auf das Remodeling und die Herzform	67
4 Diskussion	68
5 Zusammenfassung	79
6 Abbildungen	81
7 Verzeichnis der Diagramme und Abbildungen	85
7.1 Abbildungen	85
7.2 Diagramme	85
8 Literaturverzeichnis	86
9 Danksagung	99
10 Lebenslauf	101

Glossar:

-/-	Knock Out (gezielte Deaktivierung eines bestimmten Gens)
Abb.	Abbildung
AMI	Akuter Myokardinfarkt
CD	Differenzierungseinheit (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
DAB	Diaminobenzol
dH ₂ O	De-ionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
kDA	Kilodalton
KO	Knock Out (gezielte Deaktivierung eines bestimmten Gens)
IL	Interleukin
IP	Interferon- γ -induzierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
log	logarithmisch
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
MCP	Monozyten-Chemoattraktor-Protein (<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>)
MCSF	Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor

ml	Milliliter
MIP	Makrophageninflammatorisches Protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mRNA	Botenribokuleinsäure
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatpuffer
PE	Polyethylen
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	RNA-Quantifizierungsverfahren (<i>RNA Protection Assay</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
αSMAc	glattes Muskel-Aktin α (<i>α smooth muscle actin</i>)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
VEGF	Gefäß-Endothel-Wachstums-Faktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Die koronare Herzerkrankung (KHK) entsteht durch eine Einengung des Lumens der Koronararterien aufgrund von arteriosklerotischen Ablagerungen und ist für etwa 14% aller weltweiten Todesfälle verantwortlich (WHO, 1999). Diese Ablagerungen verhindern im späteren Verlauf der KHK die physiologische Anpassung der Koronarperfusion (Vasodilatation) an einen gesteigerten metabolischen Bedarf, insbesondere in einer Belastungssituation. Es entsteht eine Myokardischämie, die zunächst bei kurzer Dauer noch reversibel ist und keine Myokardschädigung hervorruft. Eine längere Episode der Myokardischämie führt dagegen häufig zum Myokardinfarkt und damit zum irreversiblen Verlust des Gewebes und der Pumpfunktion. Der akute Myokardinfarkt ist mit verschiedenen, zum Teil schwerwiegenden klinischen Komplikationen, verbunden, wie z.B. einer persistierenden ventrikulären Dysfunktion, Arrhythmien, Ventrikelruptur und kardiogenem Schock (Boersma et al., 2003). Die Therapie des Myokardinfarktes besteht aus einer frühzeitigen Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes (Reperfusion). Diese Reperfusion ist mit einer Entzündungsreaktion verbunden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Heilung und den Erhalt der myokardialen Funktion hat. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von spezifischen Mediatoren der Entzündungsreaktion (Chemokinen) im myokardialen Heilungsprozess.

1.2 Pathomechanismus der Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine chronische, generalisierte Erkrankung der Arterien, die mit einer Verdickung und Verkalkung der Gefäßwand einhergeht, und somit zu einer dadurch bedingten fortschreitenden Einengung des freien Gefäßlumens führt. Voraussetzung für die Entstehung eines arteriosklerotischen Prozesses ist eine Läsion in der Endothelschicht der Intima, hervorgerufen unter anderem durch Hypertonie, Diabetes mellitus oder bakterielle Infektionen. Monozyten migrieren in das geschädigte Gewebe

und differenzieren sich dort weiter zu Makrophagen. Dieser Vorgang wird besonders begünstigt, wenn sich an der Arterienwand bereits cholesterinhaltige Lipoproteine geringer Dichte (*low-density-lipoprotein*) aus dem Blut abgelagert haben. Diese Lipoproteine werden von den Makrophagen phagozytiert, die sich anschließend in sogenannte Schaumzellen umwandeln und absterben. Bei diesem Vorgang werden Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt, die einen entzündlichen Prozess in der Intima und später auch in der Media initiieren. Somit kommt es zu einem Gewebeumbau der Arterienwand, der aktiv von proliferierenden glatten Muskelzellen unterstützt wird. Es entsteht ein Plaque mit einem Lipidkern und einer fibrösen Kapsel. In beginnenden Stadien der Plaquebildung kann sich die Arterie noch kompensatorisch weiten und entsprechend kann die Arteriosklerose über Jahre bis Jahrzehnte klinisch unerkannt bleiben (Glagov et al., 1987). Nach langjährigem Verlauf kann es schließlich durch zunehmende Plaquegröße zur Einengung der Gefäße und somit zur Veränderung der Durchblutung an den betroffenen Stellen kommen, was sich insbesondere am Herzen klinisch bemerkbar macht. Die Entwicklung eines Plaques ist mit einer Infiltration von inflammatorischen Zellen, vor allem von Makrophagen verbunden, und kann somit als ein chronisch inflammatorischer Prozess betrachtet werden (Ross, 1993; Ross, 1999)

1.3 Ischämie und Myokardinfarkt

Im Krankheitsverlauf der Arteriosklerose kann es durch die ständige Entzündung in der Arterienwand zu einer Verminderung der Fibrinschicht kommen, die schützend auf dem arteriosklerotischen Plaque liegt. Diese Verjüngung in der Fibrinschicht kann zu Fissuren am Plaque führen, die bis in das subendotheliale Gewebe reichen. Bei Kontakt des Subendotheliums mit vorbeifließenden Blutzellen wird eine Gerinnungskaskade aktiviert, die eine intraluminale Thrombose auslösen kann (Rauch et al., 2001). Der entstehende Thrombus, der sich rasch auf dem geschädigten Plaque ablagert, kann einen totalen Verschluss der epikardialen Koronararterie verursachen, wodurch die Perfusion des umliegenden Gewebes unterbrochen wird. Als Folgeerscheinung tritt eine Ischämie des Myokardgewebes auf.

Die schwerwiegendsten Folgen einer Ischämie sind die myokardiale Hypoxie und der daraus resultierende anaerobe Metabolismus. Die Auswirkungen können bei den betroffenen Patienten stark variieren. Einige Patienten bleiben klinisch unauffällig, andere bekommen einen akuten Myokardinfarkt oder erleiden sogar einen plötzlichen Herztod (Shah, 1997). Kurze Ischämieepisoden können zu einer protrahierten ventrikulären Dysfunktion führen, ein Status, der als „*Myocardial Stunning*“ bezeichnet wird (Kloner et al., 1998). Dabei ist das Myokard in Ruhe akinetisch und kann durch Belastung oder inotrope Substanzen nicht rekrutiert werden. Diese reversible funktionale Abnormalität des „*Myocardial Stunning*“ wird hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffradikale ausgelöst (Bolli und Marban, 1999). Innerhalb von 24 bis 48 Stunden regeneriert sich das geschädigte Gewebe wieder und es treten keine Entzündungszeichen oder morphologischen Veränderungen auf.

Die chronische Ischämie induziert Veränderungen im Stoffwechsel der Kardiomyozyten, die funktionell in Ruhe ebenso mit einer eingeschränkten Pumpleistung einhergehen. Im Gegensatz zum „*Myocardial Stunning*“ führen Belastung und inotrope Stimulation zur Normalisierung der Pumpfunktion, die aber auf Grund der niedrigen Reserve sehr schnell zu einem Myokardinfarkt führen kann. (Kloner et al., 1998).

Eine Okklusion, die länger als 20 Minuten andauert, führt bei Menschen zu irreversiblen Myokardschäden: ein akuter Myokardinfarkt (AMI) entsteht (Hermens et al., 1992). Nach 20 Minuten beginnt sich der Zelltod (Nekrose) der Kardiomyozyten vom Subendokardium in Richtung des Subepikardiums in einer zeitlich abhängigen Wellenlinie auszubreiten (Ganz et al., 1990; Reimer und Jennings, 1979). Eine transmurale Nekrose hat sich beim Menschen ca. 4-6 Stunden nach der Okklusion der Koronararterie ausgebildet.

Die zeitabhängige Ausbreitung der Myokardnekrose nach der Okklusion einer Koronararterie lässt nur einen begrenzten Handlungszeitraum offen. Erfolgreiche Reperfusion des betroffenen Gebietes, durch Auflösung oder Entfernung des Thrombus, kann die fortschreitende Welle der Nekrose aufhalten und die Ausbreitung des Infarktes deutlich verringern. Möglichst rasche Wiederherstellung der Blutzufuhr verbessert somit die Überlebensrate des angegriffenen Myokardiums und reduziert signifikant das Auftreten von Arrhythmien, Herzversagen und Tod (Abbate et al., 2003).

1.4 Reperfusion

Seit Beginn der 80iger Jahre hat die Reperfusionstherapie bei akutem Myokardinfarkt Eingang in die klinische Routine gefunden (Rupprecht und Meyer, 2002). Dabei wird das Gefäß entweder durch eine Akut-PTCA (Perkutane-Transluminare-Coronare-Angioplastie), durch konservative intravenöse Thrombolyse oder durch eine Bypass-Operation eröffnet. Je früher der Patient dem Arzt vorgestellt wird und je ausgeweiteter der ischämische Bereich ist, desto größer ist die Effektivität der Behandlung (Andersen et al., 2003).

Die Reperfusion eines akuten Myokardinfarktes hat einen signifikanten Effekt auf den Remodelingprozess des Herzens. Sie verhindert die weitere Ausdehnung des Infarktes und eine spätere Dilatation des geschädigten Bereichs. Selbst wenn die Reperfusion erst nach der Ausbildung eines transmuralen Infarktes erreicht werden kann, zeigen sich in der Langzeitprognose deutlich verbesserte Ergebnisse im Vergleich zum nicht-reperfundierten Infarkt (Michael et al., 1999). Kardiales Remodeling kann definiert werden als molekulare, zelluläre und interstitielle Veränderungen, die sich klinisch in Umgestaltungen der Größe, Form und Funktion des Herzens nach kardialen Verletzungen manifestieren. Dieser Remodelingprozess wird durch hämodynamische Verhältnisse, neurohormonale Aktivierung und andere, noch zu erforschende Faktoren, beeinflusst. Neben Myozyten spielen auch Fibroblasten und inflammatorische Zellen eine wichtige Rolle im Remodeling. Insbesondere sind ab dem Zeitpunkt der Reperfusion die Zellinfiltrationen, -Nekrose und Apoptose wichtig (Cohn et al., 2000).

1.4.1 Auswirkungen der Inflammation während der Reperfusion

Nach einer Myokardischämie tritt immer eine entzündliche Reaktion auf, dessen Stärke von der Reperfusion abhängig ist. (Entman und Smith, 1994; Frangogiannis et al., 1998; Mehta und Li, 1999). Bereits 1939 wurde beim akuten Myokardinfarkt ein Inflamationsprozess nachgewiesen. So beschrieben schon 1939 Mallory und Salcedo-Salgar: „*polymorphkernige Leukozyten werden angelockt und infiltrieren in und um den*

nekrotischen Muskel herum“ (Mallory GK, 1939). Lange Zeit wurde angenommen, dass dieser Prozess zur Heilung beiträgt.

Ein Tiermodell für antiinflammatorische Strategien bei myokardialer Ischämie und Reperfusion hat 1971 gezeigt, dass die Inhibition der Entzündung die Größe des Infarktes verringert (Maroko et al., 1971; Maroko et al., 1972). Aus diesen Ergebnissen wurde damals abgeleitet, dass Inflammationsprozesse eine größere Myokardverletzung verursachen. In anschließenden Studien wurde durch die systematische Anwendung von Kortikosteroiden die Entzündungsreaktion unterdrückt (Johnson et al., 1953; Libby et al., 1973; Spath et al., 1974) und die mit Kortikosteroiden behandelten Versuchstiere hatten eine wesentlich geringere Infarktausdehnung als eine unbehandelte Vergleichsgruppe. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse wurde 1976 eine klinische Studie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt durchgeführt. Das Kortikosteroid Methylprednisolon wurde den Patienten zur Unterdrückung der Inflammation verschrieben. Eine zunehmende Anzahl von ventrikulären Arrhythmien und ausgedehnten Infarktgrößen waren die verheerenden Folgen (Roberts et al., 1976). Auf diesen Ergebnissen basierende Untersuchungen haben nachgewiesen, dass Kortikosteroide zwar den Entzündungsprozess abschwächen und die Anzahl der infiltrierenden Leukozyten vermindern können, aber zur selben Zeit den Heilungsprozess und die Kollagenablagerung verzögern (Kloner et al., 1978).

Nach heutigem Wissensstand wird die inflammatorische Reaktion durch die Reperfusion verstärkt, wobei zunächst paradoxerweise zusätzlicher Schaden am Myokard induziert wird. Diese Entzündungsreaktion soll den Remodelingprozess begünstigen, kann aber zu einer starken Fibrose führen, die im weiteren Verlauf die Herzfunktion einschränken kann (Frangogiannis et al., 2002). Aus diesem Grund erscheint eine zielgerichtete entzündungshemmende Therapie sinnvoll. Reperfusion eröffnet somit zwar die Möglichkeit besserer Gewebeheilung, es müssen jedoch noch effektivere Methoden entwickelt werden, um den schädlichen Remodeling-Prozess zu reduzieren, der ein führender Grund für Herzversagen und Tod ist.

1.5 Inflammation und beeinflussende Mediatoren

Die mit einem akuten Myokardinfarkt einhergehenden zellulären und molekularen Ereignisse müssen erst besser verstanden werden, bevor in den Heilungsprozess erfolgreich interveniert werden kann.

Eine Myokardnekrose induziert das Komplementsystem und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Diese wiederum aktivieren eine Zytokinkaskade durch die Ausschüttung von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Frangogiannis et al., 2002). Im Falle einer Reperfusion erfolgt somit eine intensive inflammatorische Reaktion. In das ischämische und reperfundierte Herz migrieren neutrophile Granulozyten. Diese wurden durch die Synthese des Zytokins Interleukin-8 (IL-8) und die Aktivierung des Komplementfaktors C5a rekrutiert. Es wurde nachgewiesen, dass eingewanderte neutrophile Granulozyten potente zytotoxische Effekte durch die Freisetzung von proteolytischen Enzymen (Jaeschke und Smith, 1997) und durch ihre Adhäsion mit „Intracellular-Adhesion-Molecule-1“- (ICAM-1) exprimierenden Kardiomyozyten auslösen können (Frangogiannis et al., 2002). Trotz dieser möglichen Schäden durch die immigrierenden neutrophilen Granulozyten gibt es deutliche Hinweise, dass die Reperfusionstherapie die Mortalität bei Patienten deutlich senkt. Aus Monozyten herangereifte Makrophagen und Mastzellen könnten Zytokine und Wachstumsfaktoren synthetisieren, die für die Fibroblastenproliferation und Neovaskularisierung notwendig sind. Dies führt zu einem effektiven Reparaturvorgang und zu einer komplexen Narbenbildung.

1.5.1 Zytokine

Es wird davon ausgegangen, dass myokardiale Ischämie und eine Ausweitung der Verletzung durch Reperfusion mit entzündlichen Prozessen einhergehen, die verschiedene Zelltypen und Zytokine umspannen (Entman und Smith, 1994; Fishbein et al., 1978b), wobei nachgewiesen wurde, dass insbesondere Zytokine wichtige Entzündungsmediatoren nach Ischämie und Reperfusion sind (Hansen, 1995). Zytokine sind kleine Polypeptidprodukte (~24kDa), die in den meisten Fällen von aktivierten

Lymphozyten und Makrophagen synthetisiert werden. Sie haben einen Effekt auf ihre eigene Anzahl, Streuung und Aktivität während der Entwicklung eines akuten Myokardinfarktes. Die Gruppe der Zytokine moduliert die Funktionsweise und Aktivität anderer Zelltypen, zum Beispiel von Wachstumsfaktoren, Interleukinen und Chemokinen aber auch von „kolonie-stimulierenden-Faktoren“. Zytokine werden weiterhin bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen synthetisiert. Dabei ist ihre Sekretion typischerweise transient und engmaschig reguliert.

Zytokine können in fünf Untergruppen unterteilt werden:

- Zytokine, die die Lymphozytenfunktion regeln
- Zytokine, die in die unspezifische Immunabwehr involviert sind
- Zytokine, die Entzündungszellen während der spezifischen Immunantwort aktivieren
- Zytokine, die die Hämatopoese stimulieren
- Zytokine, die chemotaktische Funktionen erfüllen => Chemokine

1.5.2 Charakterisierung wichtiger Zytokine

Zytokine können in proinflammatorische, antiinflammatorische und regulatorische Mediatoren (sowohl pro- als auch antiinflammatorisch) unterteilt werden.

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen beteiligt ist und einen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen hat. Weiterhin wirkt IL-1 β pyrogen und spielt eine Rolle bei der Auslösung der „akuten Phase Antwort“ und bei der Lymphozytenaktivierung. Es wird hauptsächlich von mononukleären und endothelialen Zellen bei Entzündung, Verletzung oder Infektion synthetisiert.

Die Aktivierung des Endothels und das Wanderverhalten von Lymphozyten wird von TNF- α mitreguliert. TNF- α wirkt ebenfalls direkt pyrogen, es kann indirekt Hormone beeinflussen, sowie die Ausschüttung von IL-1 verstärken. Dieses Zytokin wird von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und T-Zellen synthetisiert.

IL-6 kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Proinflammatorisch wirkt es über die Induktion von Fieber, antiinflammatorisch ist die unterdrückende Wirkung von IL-6 auf die Expression von TNF- α . IL-6 hat weiterhin einen wichtigen Einfluss auf das Immunsystem, auf die Aktivierung von B-Zellen und weiterhin auf die T-Zellen, bei denen die vermehrte Produktion von Rezeptoren für IL-2 induziert wird.

IL-10 wirkt dahingegen ausschließlich antiinflammatorisch. Das Zytokin hat einen starken Einfluss auf die Aktivierung von Th-1 Zellen. Weiterhin ist IL-10 ein potenter Deaktivator von proinflammatorischen, von Monozyten/Makrophagen synthetisierten, Zytokinen. Es suprimiert die Sekretion von TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 α und MIP-1 β .

Die Transforming-Growth-Factor- β - (TGF- β)-Expression ist wichtig für die Regulierung von Matrixablagerungen, Fibroblastendifferenzierung und Narbenbildung. Die drei in Säugetieren exprimierten Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3) wurden besonders gründlich untersucht. TGF- β 1 ist die am häufigsten auftretende Isoform. Dieses Zytokin hat wichtigen regulatorischen Einfluss auf verschiedene Faktoren bei physiologischen-, immunologischen- und Wachstumsprozessen. Ursprünglich wurde TGF- β 1 als Wachstumsfaktor für Fibroblasten entdeckt. Heutzutage ist aber bekannt, dass TGF- β 1 eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, Gewebs- und Wundheilung, in der Entzündung und Immunregulation spielt. Studien, die den Reparationsprozess bei Hautwunden von Ratten untersucht haben, zeigten, dass sowohl TGF- β 1 als auch TGF- β 2 zu einer exzessiven Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen anregen, die zu einer Narbenbildung führt. Wenn exogen TGF- β 3 hinzugefügt wird, erscheint diese Ablagerung von Matrixproteinen und die Narbenbildung deutlich reduziert. Die unterschiedliche Expression der TGF- β -Isoformen scheint das Remodeling der extrazellulären Matrix zu beeinflussen.

Osteopontin (OPN) ist ein extrazelluläres Matrixprotein, dass von verschiedenen Zelltypen, einschließlich Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten synthetisiert wird (Ashizawa et al., 1996; Giachelli et al., 1995; Singh et al., 1995). Es scheint die Fähigkeit zu besitzen, unterschiedliche biologische Funktionen, wie zum Beispiel die Zelladhäsion und Chemotaxis, zu beeinflussen (Denhardt und Guo, 1993; Giachelli et al., 1995). Somit spielt OPN eine wichtige Rolle in der Gewebeheilung, dem Remodeling und der Entzündungsreaktion (Denhardt et al., 2001; O'Regan und Berman, 2000). OPN

gilt weiterhin als ein Marker für die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Krause et al., 1996). Nach Myokardschäden wird Osteopontin von Makrophagen, die in das Gewebe einwandern, stark exprimiert (Murry et al., 1994). Es interagiert mit Fibronektin und Kollagen, was auf eine mögliche Rolle in der Matrixorganisation und/oder der Stabilität hinweist (Beninati et al., 1994; Kaartinen et al., 1999; Mukherjee et al., 1995).

1.6 Chemokine

Die Bezeichnung „Chemokin“ wurde 1992 festgesetzt und steht für „chemotaktisches Zytokin“ (*chemotactic cytokine*) (Lindley IJD, 1993). Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine und stellen eine große Familie von Entzündungs- und Immunabwehrmediatoren dar, die alle eine chemotaktische Funktion erfüllen. Über 50 Chemokine und dazugehörige Rezeptoren wurden innerhalb der letzten Dekade identifiziert und charakterisiert. Chemokine sind außerdem Sekretproteine, die von Leukozyten und Gewebezellen entweder konstitutiv oder nach einem Impuls synthetisiert werden. Sie regulieren die Inflammation, die Leukozytenmigration und die Immunzellendifferenzierung (Olson und Ley, 2002) und spielen dabei unter anderem eine Rolle bei der Organogenese (Ma, 1998), der Hämatopoese (Kim und Broxmeyer, 1999), der neuronalen Kommunikation mit Mikroglia (Harrison et al., 1998) und der Leukozytenmigration (Cyster, 1999).

Mit einem Gewicht zwischen 8 und 14 kDa und einer Zusammensetzung aus 80-120 Aminosäuren sind Chemokine relativ kleine Proteine. Die Primärstruktur vieler Chemokine ist sehr ähnlich, daher unterscheidet sich auch ihre Sekundär- und Tertiärstruktur nur gering. Die Induktion von Chemokinen ist ein wichtiger Faktor in der inflammatorischen Antwort auf den Infarkt (Frangogiannis et al., 2002). Neuere Forschungsergebnisse, bei denen experimentelle Myokardinfarktmodelle verwendet wurden, haben eine Induktion von verschiedenen Chemokinen gezeigt, die die Rekrutierung von Leukozyten, die Angiogenese und die Heilung beeinflussen (Birdsall et al., 1997).

1.6.1 Klassifizierung und Nomenklatur von Chemokinen

Basierend auf der Position der ersten zwei von vier konservierten Cysteinen am N-Terminus können vier Hauptgruppen unterschieden werden:

- α oder CXC-Chemokine: In dieser Gruppe werden die ersten beiden konjugierten Cysteine durch eine Aminosäure unterbrochen.
- β oder CC-Chemokine: In dieser Gruppe folgen zwei Cysteine direkt aufeinander.
- γ oder XC-Chemokine: Bei diesen Chemokinen findet sich am N-Terminus nur ein Cystein.
- δ oder CX3C-Chemokine: Drei intervenierende Aminosäuren befinden sich zwischen den beiden Cysteinen.

Die Nomenklaturordnung, beschlossen 1996 bei der „Gordon Conference for Chemotactic Cytokines“, legt fest, dass sowohl die Proteine als auch die Rezeptoren nach ihrer Hauptfamilie benannt werden. Entsprechend ihrer Funktion wird L für Ligand oder R für Rezeptor hinzugefügt. Zum Beispiel trägt das Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (*Monocyte-Chemoattractant-Protein-1*) (MCP-1) offiziell den Namen CCL2 (CC-L-2). Die meisten Chemokine werden allerdings auch heute noch mit ihren traditionellen Namen bezeichnet.

Ein Rezeptor bindet verschiedene Chemokine. Auf der anderen Seite können verschiedene Chemokine an unterschiedliche Rezeptoren binden. Durch diese Promiskuität stellt sich die Frage, ob ein einzelnes Chemokin eine entscheidende Rolle in der inflammatorischen Antwort *in vivo* spielen kann. Wenn die Antwort negativ wäre, könnte eine Therapie, die auf ein einziges Chemokin abzielt, wahrscheinlich nicht erfolgreich sein, da andere Chemokine dessen Inaktivität kompensieren könnten (Rollins, 1997).

Chemokine spielen eine kritische Rolle bei basalen und inflammatorischen Migrationen verschiedener Zellen (Gerard und Rollins, 2001). Die von Chemokinen am stärksten beeinflussten Zellen werden im Knochenmark synthetisiert (Frangogiannis, 2004), wobei sie einen Einfluss auf Migration, Zelladhäsion, -aktivierung und -degranulation sowie auf die Apoptose haben können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression von Chemokinen eine wichtige Rolle bei vielen

verschiedenen Krankheitsbildern mit entzündetem Gewebe spielt (Multiple Sklerose, Lungenentzündung, Entzündung in den Gefäßen bei Arteriosklerose) (Baggiolini, 2001).

Zu der CC-Familie zählen auch die „Makrophagen-Inflammatorischen-Proteine-1 α (MIP-1 α) und MIP-1 β . MIP-1 α und MIP-1 β regulieren das Trafficking und die Aktivierung von bestimmten Inflammationszellen (Lymphozyten, Eosinophilen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen). Einen besonders starken chemotaktischen Einfluss scheinen MIP-1 α und MIP-1 β auf Monozyten auszuüben (Wolpe und Cerami, 1989; Wolpe et al., 1988). Obwohl eine erhöhte Expression von MIP-1 α bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachgewiesen wurde (Parissis et al., 2002), verbleibt die Bedeutung von MIP-1 α und MIP-1 β noch weitgehend im Unklaren. Es gilt allerdings als gesichert, dass MIP-1 α und MIP-1 β pyrogen wirken und bei der Leukozytenadhäsion am Endothelium mitwirken.

1.7 Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1)

Serologische Studien haben eine Steigerung der Expression spezifischer Chemokine bei menschlichem Herzversagen beschrieben (Aukrust et al., 1998). Insbesondere ist die Synthese von MCP-1 in vielen verschiedenen Zelltypen als Antwort auf eine Verletzung oder aber auch durch Induktion anderer Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α oder Interferon- γ) nachgewiesen worden (Rollins et al., 1990; Shyy et al., 1993).

MCP-1 wurde erstmals 1989 in seiner Eigenschaft als monozytisch wirksamer chemotaktischer Faktor entdeckt (Matsushima et al., 1989). Das Chemokin wurde damals aus aufbereitetem Medium von glatten Muskelzellen aus der Aorta eines Pavianes aufgereinigt. Später wurde dann die menschliche Version des MCP-1 aus Tumorzelllinien isoliert (Tilton et al., 1997). Humanes MCP-1 ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes CC-Chemokin mit einer N-terminalen Pyroglutaminsäure. Das Gen liegt auf Chromosom 17 (17q 11.2-12) (Mehrabian et al., 1991; Rollins et al., 1991). Das Maus-Homolog ist JE und wurde erstmalig bei wachstumsfaktor-stimulierten Mäusefibroblasten nachgewiesen (Cochran et al., 1983).

MCP-1 kann in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert werden, wie zum Beispiel in Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen, aber auch in

Myozyten, wenn diese vorher entsprechend stimuliert werden (zum Beispiel durch TNF- α und Angiotensin II).

MCP-1 ist für die höchste monozytische chemotaktische Aktivität verantwortlich, die bei Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen *in vitro* beobachtet wurde (Cushing et al., 1990). Außer Monozyten werden durch das Chemokin aber auch dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen, natürliche Killer-Zellen und basophile Granulozyten beeinflusst (Luster, 1998). Das Chemokin könnte weiterhin eine wichtige Rolle bei der Progression von Reperfusionsverletzungen spielen. Eine Studie hat gezeigt, dass die MCP-1-mRNA Expression in spezifischen kleinen Venen des Hundeherzens direkt und ausschließlich nach der Reperfusion induziert wird (Kumar et al., 1997). Eine MCP-1 Blockade hat in einer anderen Studie eine Ausweitung der Verletzung im Myokard nach Reperfusion verhindern können (Ono et al., 1999).

Eine primäre biologische Funktion von MCP-1 scheint das Anlocken von Monozyten und anderen mononukleären Zellen in Entzündungsgebiete zu sein (Birdsall et al., 1997; Krishnaswamy et al., 1999). Der Rezeptor, durch den das Chemokin erkannt wird, CCR2, wird ständig von Monozyten exprimiert. Die Monozyten reifen, vermutlich unter dem Einfluss von „Makrophagen-Kolonie-Stimulierendem-Faktor“ (*Macrophage-colony-stimulating-factor*) (M-CSF), zu Makrophagen heran (Frangogiannis et al., 2003), die Schlüsselrollen bei der Regulation von Inflammation und Gewebserneuerung spielen können (Frangogiannis et al., 1999). Die spezifische Rolle von Makrophagen in der Regulation der Wundheilung ist bis heute nicht vollständig erforscht, es gibt aber Hinweise, dass sie eine wichtige Quelle für Zytokine und Wachstumsfaktoren sind (Weihrauch et al., 1995). Mastzellen und Makrophagen besitzen die Fähigkeit proteolytische Enzyme und eine große Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren (Gordon und Galli, 1990a; Gordon und Galli, 1990b). Makrophagen können außerdem die Regulation des Metabolismus der extrazellulären Matrix beeinflussen, indem sie Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren synthetisieren (Frangogiannis et al., 2000a; Ganz, 1993).

Es wurde nachgewiesen, dass MCP-1 bei der Rekrutierung von Makrophagen in verschiedenen Entzündungsmodellen und Krankheiten eine wichtige Rolle spielt (Furie und Randolph, 1995; Strieter et al., 1996). Eine gesteigerte Expression von MCP-1 im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt induziert die Infiltration und Aktivierung von

Entzündungszellen wie Makrophagen und Leukozyten. MCP-1 kann aber ebenso durch parakrine Effekte die Induktion von anderen Zytokinen, Matrix-Metalloproteinasen und TGF- β vermitteln (Gharaee-Kermani et al., 1996).

Somit scheint das Chemokin MCP-1 einen besonderen Einfluss auf die Migration von Makrophagen, auf die Inflammationsreaktion nach akutem Myokardinfarkt und letztendlich auf den Remodelingprozess des infarzierten Herzens auszuüben.

1.8 Arbeitshypothese

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der folgenden Fragestellung:

Welchen Einfluss hat MCP-1 auf die Entzündungsreaktion und den Gewebsumbau in einem reperfundierten Myokardinfarkt bei Mäusen, insbesondere hinsichtlich der kompensatorischen Zytokininduktion und der Angiogenese?

2 Materialien und Methoden

2.1 Definition der untersuchten Mäusegruppen

Um die Hypothese der vorliegenden Arbeit zu prüfen, wurden Wildtyp-Mäuse (WT) des Stammes C57BL/6 (Harlan Sprague-Dawley, Houston, TX, USA) herangezogen und mit MCP-1 defizienten Mäuse (MCP-1^{-/-}) verglichen. Die MCP-1-defizienten Tiere können das MCP-1 Protein nicht mehr funktionell synthetisieren. Um diesen Effekt zu erreichen hat die Gruppe um B. J. Rollins vom Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, eine Teildeletion des 2. Exons des MCP-1 kodierenden Gens (SCYA2) vorgenommen. Das veränderte Gen wurde in eine geeignete Expressionskaskade eingebaut und in eine Blastozyste einer C57BL/6 Maus eingesetzt. Daraus resultierende heterozygote Tiere wurden bis zur Homozygotie weiter bebrütet (Lu et al., 1998). Die Genotypisierung der einzelnen „Founder“-Mäuse, wie auch deren Nachkommen, erfolgte mittels der Southern Blot Technik (Laird et al., 1991). Dr. Rollins hat uns freundlicherweise für unsere Studie MCP-1^{-/-} Brütungspaare zur Verfügung gestellt. In einem geeigneten Tierstall im DeBakey Heart Center am Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA wurde unsere MCP-1^{-/-} Kolonie gezüchtet. Die Räumlichkeiten sind ein ausgelagerter Teil der Tierstalleinrichtungen vom Baylor College of Medicine und von den amerikanischen Bundesbehörden genehmigt. Es wurde streng auf die Auflagen des National Institute of Health (Guide for the Care of Laboratory Animals, NIH Publikationen 85-23, revidiert 1985) geachtet und das Tierversuchsprotokoll wurde vom Baylor Animal Care Committee genehmigt.

Die Mäuse beider Geschlechter wurden für Experimente in einem Alter von 8 bis 12 Wochen bei einem Gewicht zwischen 18 und 22 g verwendet. Nach Induktion des Myokardinfarktes durch eine 60-minütige Okklusion des Ramus interventrikularis anterior (RIVA) (siehe 2.2.1) wurden die Herzen nach jeweils unterschiedlichen Reperusionszeiten untersucht.

Die einzelnen Versuchsgruppen setzten sich aus jeweils 8 Tieren folgendermaßen zusammen:

- Histologie: WT-Mäuse und MCP-1^{-/-}-Mäuse nach 1, 3 und 7 Tagen Reperfusion
- Perfusion-Fixation: WT-Mäuse und MCP-1^{-/-}-Mäuse nach 7 Tagen Reperfusion
- RNA-Studie: WT-Mäuse und MCP-1^{-/-}-Mäuse nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion. Als Kontrollgruppe wurden initialoperierte Tiere ohne Myokardinfarkt beider Stämme verwendet.

2.2 Tieroperative Techniken

2.2.1 Implantation der Ligatur

Die Initialoperation wurde nach einer von Nossuli et al. (Nossuli et al., 2000) entwickelten Methode durchgeführt, die es ermöglicht, die Myokardischämie und -reperfusion bei geschlossenem Thorax vorzunehmen. Dadurch wird der Einfluss vom chirurgischen Trauma und der damit verbundenen Entzündungsreaktion auf die zu untersuchende Myokardischämie minimiert.

Zur Initialoperation wurde das Versuchstier durch eine intraperitoneale Injektion (0.025 ml/g) mit einer Mischung aus 73% Natriumchlorid (0,9%), 8% Natrium-Pentobarbitol (50 mg/ml, Nembutal, Abbott, Abbott Park, IL, USA) und 19% Ethanol (Harleco, Kansas City, MO, USA) anästhesiert. Anschließend wurde der Thorax der Maus rasiert und die Maus auf dem Rücken liegend auf einem geheizten Operationstisch fixiert. Über die Extremitäten wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet. Eine Schlinge wurde mit einem 5-0 Faden (5-0 Prolene®, Ethicon, Sommerville, NJ, USA) um die Schneidezähne der Maus gelegt und somit der Nacken überstreckt. Der Hautschnitt erfolgte vom Submentum bis zum Xiphoid. Nachdem die Halsmuskeln stumpf zur Seite präpariert worden waren, erfolgte unter Sichtkontrolle die Intubation mit einem Tubus (Polyethylen (PE) 90, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Der Tubus wurde 5-8 mm in die Trachea vorgeschoben und die Beatmung (Harvard rodent ventilator Modell 683, Harvard Apparatus, S. Natick, MA, USA) wurde gestartet. Die Maus wurde mit einem Tidalvolumen von ca. 200µl und einer Beatmungsfrequenz von 110/Minute mit 100%-igem Sauerstoff beatmet. Die Operation wurde mit Hilfe eines

Mikroskops (Stemi 2000-CS Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Thorakotomie erfolgte links parasternal unter Durchtrennung der 3. bis 5. Rippe und die dabei entstehenden Blutungen wurden mit einem Mikrokoagulator (Codman, Randolph, MA, USA) gestillt. Um den Zugang zum Herzen zu ermöglichen, wurden drei Fäden (6-0 Prolene®) nahe der Thorakotomie durch die Thoraxwand geführt und zwei zur linken und einer zur rechten Seite aufgespannt.

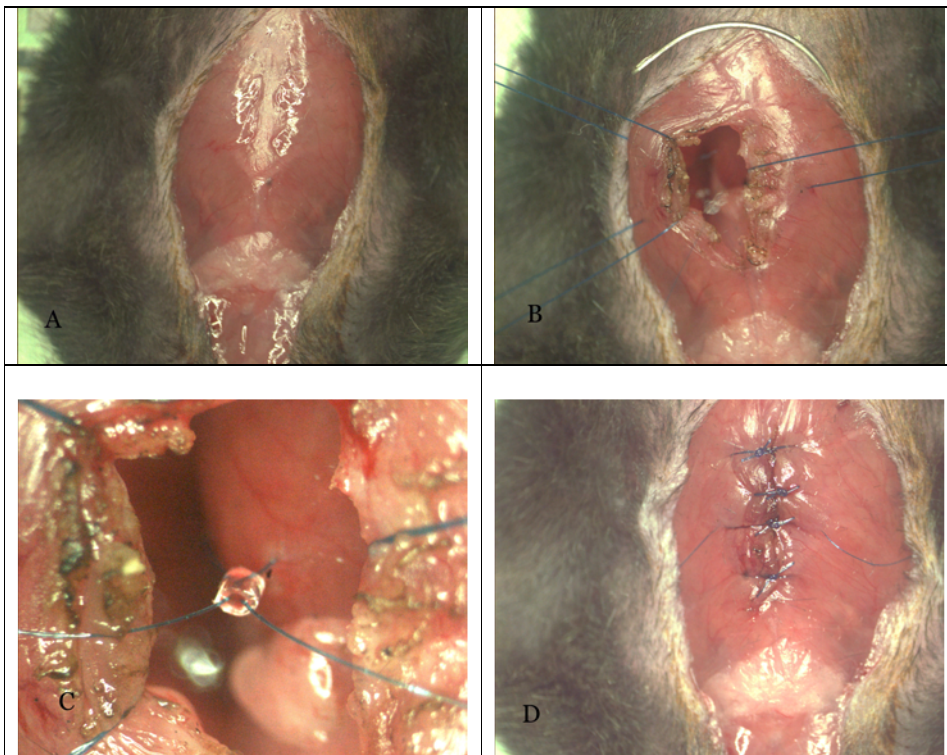


Abbildung 1: Initial- Operation: In Bild A ist der Mäusethorax nach Eröffnung der Haut zu sehen. Im Anschluss an die Thorakotomie (Bild B) wurden drei Fäden 6-0 Prolene® durch die Thoraxwand geführt, um diese nach außen aufzuspannen und einen besseren Einblick in das Operationsfeld zu gewährleisten. Die Ligatur (Bild C) wurde mit einem 8-0 Prolene® Faden um den RIVA gelegt, so dass mit Hilfe eines PE- Röhrchens eine Schlaufe entstand. Die Fadenenden wurden seitlich durch die Thoraxwand geführt. Nach erfolgtem Eingriff wurde der Thorax mit 3-4 Stichen wieder verschlossen (Bild D) und die Fäden, die zur Ligatur führen wurden in Hauttaschen verstaut.

Nach vorsichtiger Eröffnung des Perikards wurde eine 8-0 Prolene® Ligatur um den Ramus interventrikularis anterior (RIVA) gelegt. Für diesen Zweck wurde die Nadel U-förmig gebogen, um die Ligatur somit präzise eng um den RIVA verlegen zu können. Nach der Entfernung der Nadel wurden die beiden Enden des Fadens durch ein 1 mm langes Stück eines PE-10 Röhrchens (Becton Dickinson) gefädelt. Auf diese Weise ist eine Schlaufe um die RIVA entstanden. Als nächstes wurden die beiden Fadenenden mit Hilfe einer Kalt 3 Nadel (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA) auf der jeweiligen Seite durch die Thoraxwand geführt und anschließend in den vorher angelegten Hauttaschen verstaut. Der Brustkorb wurde mit drei Einzelknoten mit dem 6-0 Prolene® Faden wieder verschlossen. Vor dem Zusammenziehen des letzten Knotens wurde die Lunge aufgebläht, um freie Luft aus dem Thorax zu entfernen. Die Beatmung wurde eingestellt und die Spontanatmung setzte innerhalb von 30 Sekunden wieder ein. Die Haut wurde unter Verwendung eines 6-0 Prolene® Fadens mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Das Tier wurde extubiert und zurück in den Käfig gelegt. Zur Vorbeugung einer Unterkühlung wurde eine Wärmelampe eingesetzt. Zusätzlich bekamen die Tiere 100%-igen Sauerstoff bis zum vollständigen Erwachen zugeführt. Nach der Operation wurden intraperitoneal 0,1 ml Buprenorphin (2,5 µg/ml) zur Analgesie verabreicht. Weitere Buprenorphin- Gaben erfolgten nach 12, 24 und 48 Stunden.

2.2.2 Myokardischämie und -Reperfusion

Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte 7 bis 10 Tage nach der Initialoperation. Die Anästhesie erfolgte mit einer 1,5%-igen Isofluranbeimischung (Forene; Abbott) bei 1 l/min O₂-Fluss über eine Nasenmaske bei Spontanatmung. Die Extremitäten wurden auf dem ebenfalls für die Initialoperation genutzten Operationstisch fixiert und ein EKG wurde über die Ableitung II nach Einthoven aufgezeichnet. Nach Eröffnung der Haut wurden die beiden 8-0 Prolene® Fadenenden aus den subkutanen Taschen herausgenommen und mit Hilfe von Klebestreifen vorsichtig an zwei Metallbeschwerern befestigt.

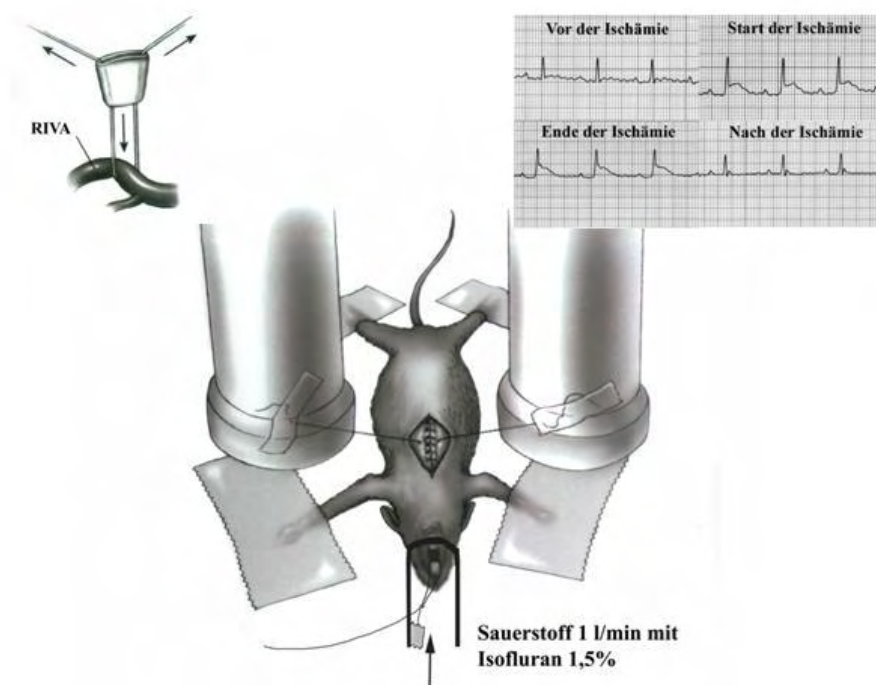


Abbildung 2: Versuchsaufbau

Diese Zylinder wurden dann vorsichtig unter EKG-Kontrolle auseinandergezogen, bis eine ST-Hebung auftrat. Die somit induzierte Myokardischämie wurde für 60 Minuten aufrechterhalten. Anschließend wurde der 8-0 Faden vollständig entfernt um den RIVA zu reperfundieren. Zuletzt wurde die Hautnaht wieder in oben genannter Technik angefertigt. Die Tiere bekamen am Ende der Operation intraperitoneal 0,1 ml Buprenorphin zur Analgesie verabreicht.

2.2.3 Entnahme der Herzen

Am Ende des jeweiligen Versuchsprotokolls wurden die Mäuse mit einer Überdosis des Pentobarbitalgemisches anästhesiert. Nach dem Einsetzen der Schnappatmung wurde rasch die Thorakotomie durchgeführt und das Herz in noch schlagendem Zustand entnommen. Die Herzen wurden kurz in einer kardioplege Lösung gespült und

anschließend sofort entweder für molekularbiologische Untersuchungen in Flüssigstickstoff schockgefroren oder in Zink-Formalin für histologische Untersuchungen fixiert.

Zusammensetzung der kardioplegen Lösung:

Die folgenden Ingredientien wurden in einem Liter NaCl (Baxter) aufgelöst.

- 4 g NaCl (EM Science, Gibbstown, NJ, USA)
- 1 g NaHCO₃ (Sigma, St.Louis, MO, USA)
- 2 g Glukose (Sigma)
- 3 g 2,3-Butandion Monoxim (Sigma)
- 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure (Sigma)
- 0,2 mg Nifedipin (Sigma)
- 10 ml Heparin (1000 IE/ml) (American Pharmaceutical Partners, Los Angeles, CA, USA)
- 3,73 g KCl (EM Science)

An Herzen für molekularbiologische Untersuchungen wurden Perikard, große Gefäße und beide Vorhöfe vollständig entfernt und nur die beiden Ventrikel weiter verwendet.

2.2.4 Histologische Fixierungsmethoden

Um die Mäuseherzen in der Histologie weiter verwenden zu können, musste das Gewebe in einen Zustand gebracht werden, in dem es über längere Zeiträume (Jahre) unverändert konserviert werden konnte. Eine gängige Praxis ist die Konservierung in Formaldehyd. Die hier verwendeten Herzen wurden mit Zink-Formalin (Z-fix, Anatech, Battle Creek, MI, USA) fixiert. Z-fix setzt sich zusammen aus Formaldehyd (HCOH), ionisiertem Zink und Pufferlösung. Die Herzen wurden 24h in Z-fix gelagert und anschließend in 70%-igem Ethanol bis zur Paraffineinbettung eingelegt.

Für eine spezielle Gruppe der Mäuse wurde eine so genannte Perfusion-Fixations Methode angewendet, indem die Herzen zunächst mit der kardioplegen Lösung perfundiert wurden um im enddiastolischen Zustand zu verbleiben.

Anschließend wurden die Organe für 10 Minuten unter konstantem Druck mit Z-fix perfundiert. Danach wurden sie 2x 45 Minuten in Z-fix Lösung eingelegt und in einer Alkoholreihe mit 50%-, 60%- und 70%-igem Ethanol für je 30 Minuten entwässert. Im 70%-igem Alkohol konnten die Präparate bis zu 24 Stunden verweilen.

Zur dauerhaften Fixierung wurde das Gewebe beider Fixierungsmethoden nach vollständiger Dehydrierung in wasserabweisendem Paraffin (Wachs) eingebettet. Dies erfolgte automatisch unter Verwendung eines Gewebereinbettautomaten (Citadel 1000 Tissue Processor, Thermo-Shandon, Waltham, MA, USA). In dieser Maschine durchliefen die Herzen folgende Prozedur:

- 40 Minuten in 70%-igem EtOH (Harleco), 3x 40 Minuten in 95%-igem EtOH und 2 x 40 Minuten in 100%-igem EtOH, um die Herzen von Rückständen der Fixierungsflüssigkeit zu säubern,
- Anschließend wurden sie in absteigender zeitlicher Reihenfolge jeweils 15, 10 und 5 Minuten in Xylol (Xylene, EMD, Darmstadt, Deutschland) eingelegt, um den Alkohol zu entfernen und das Gewebe vollständig zu entwässern.

Die Herzen wurden am Ende unter Verwendung von einer Paraffineinbetteneinheit (Microm Embedding Center AP 280-2, Richard Allen Scientific, Kalamazoo, MI, USA) in die richtige Position gebracht, mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus, VWR, West Chester, PA, USA) infiltriert und bis zur Erhärtung stehen gelassen.

Die Paraffinblöcke wurden von Herzbasis bis Apex durchgeschnitten, wobei alle 250 µm jeweils zehn 5 µm dicke Schnitte im Microm (HM 310, Richard Allen) angefertigt wurden. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad (42 °C) auf die Objektträger übertragen und eine Stunde luftgetrocknet.

2.3 Histologische Techniken

2.3.1 Auswahl der histologischen Präparate

Um eine Übersicht über die Infarktausdehnung im Herzen zu bekommen, wurde aus jedem 250 µm Abschnitt ein Schnitt ausgewählt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Diese wurden unter dem Mikroskop (Axioskop 50, Carl Zeiss) begutachtet, um daraus die geeigneten Schnitte für später anschließende Färbungen nach folgenden Kriterien auszuwählen:

- Morphologie des Schnittes
- maximale Infarktgröße
- in weitem Abstand zur Ligaturstelle und der damit entstandenen Narbe
- in der Papillarmuskelebene und zugleich möglichst apexnah
- zusammenhängender Infarktbereich.

2.3.2 Allgemeine Schritte bei histologischen Färbungen

Für die histologischen Färbungen musste vor dem eigentlichen Färbeprotokoll eine Deparaffinisierung und Rehydrierung stattfinden, um das Gewebe für die hydrophilen Reagenzien aufnahmebereit zu machen. Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

(„Dip“ bedeutet hierbei ein einmaliges rasches Eintauchen in die entsprechende Lösung)

- 3 x 5 Minuten in Xylol (Histology Grade, EMD)
- 3 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol (Harleco Dehydratation Alkohol, EM Science, Gibbstown, NJ, USA)
- 3 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol (Harleco)
- 2 x 15 Dips in 75%-igem Ethanol (Harleco)
- 1 x 15 Dips in deionisiertem Wasser (dH₂O)
- 5 Minuten waschen in dH₂O

Nach erfolgter Färbung müssen die Präparate erneut dehydriert und gegengefärbt werden:

- 15 Dips in 95%-igem Ethanol
- 2 Dips in Eosin (Eosin Y, Harleco) (Ausnahme Sirius Rot => siehe 2.3.5)
- 15 Dips in 95%-igem Ethanol
- 15 Dips in 100%-igem Ethanol
- 3 x 15 Dips in Xylol

Nach abgeschlossener Dehydrierung wurden die Präparate mit Deckblättchen (Micro cover glasses, VWR) unter Verwendung eines entsprechenden Klebers (Cytoseal 60, Richard Allen Scientific) bedeckt und für 24 h luftgetrocknet.

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin

Hämatoxylin-Eosin (HE) ist eine Standardfärbung. Alle Zellkerne innerhalb eines Präparates werden mit dieser Methode dunkel gefärbt, das restliche Gewebe erscheint rosa. Es wurde nach dem Färbeprotokoll von Carson vorgegangen (so genannte regressive Methode, Freida L. Carson, 1996):

1. 3 x 3 Minuten Xylol
2. 2 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
3. 2 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
4. 1 x 15 Dips in 75%-igem Ethanol
5. 1 x 15 Dips in dH₂O
6. 1 x 3 Minuten in Hämatoxylin (Hämatoxylin Stain, Stat Lab, Lewisville, TX, USA)
7. einmaliger Dip in ein Salzsäure-Ethanol-Gemisch (70% EtOH mit 1%-iger HCl- Lösung; HCl, Lab Chem, Pittsburgh, PA, USA)
8. 1 x 15 Dips in dH₂O

9. 1 x 15 Dips in NaH₄OH (1%-ige NaH₄OH in Wasser (NaH₄OH; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)
10. 1 x 15 Dips in dH₂O
11. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
12. 1x 15 Dips in Eosin (Eosin Y, Stat Lab)
13. 1 x 15 Dips in 95%-igem Ethanol
14. 3 x 15 Dips in 100%-igem Ethanol
15. 3x 15 Dips in Xylol

2.3.4 Kollagenfärbung mit Sirius Rot

Nach der Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Präparate 3 Minuten in Sirius Rot Lösung belassen und anschließend ohne Gegenfärbung wieder dehydriert.

Die 0,1%-ige Sirius Rot Lösung wurde aus 0,2 g Direct Red (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) und 200 ml gesättigter Pikrinsäure (Picrid Acid, EM Science) gemischt und 10 Minuten stengelassen.

2.4 Immunhistochemische Techniken

2.4.1 Makrophagenfärbung (F4/80 Antigen)

In dieser Färbung detektiert der monoklonale Antikörper Cl:A3-1 (Rat anti mouse pan tissue fixed macrophages, RDI, Flanders, NJ, USA) das F4/80 Antigen, ein 120-160 kDa großes Glykoprotein, dass vermutlich bei der Makrophagen-Adhäsion mitwirkt (Hume et al., 1984). Dieses Antigen wird in Makrophagen und ihren Vorläuferzellen exprimiert. Die F4/80 Färbung wurde mit Hilfe von Vectastain ABC Elite Rat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durchgeführt:

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. Auswaschen für 5 Minuten in dH₂O

3. Gewebe mit Paraffin-Stift (ImmunEdges Pen, Vector) umranden und 15 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) inkubieren
4. 2 x 2 Minuten mit dPBS (Bio Witthaker, Walkersville, MD, USA) auswaschen
5. Inkubation für 30 Minuten mit IgG Block (250 µl Rabbit Stock Solution auf 15 ml dPBS)
6. IgG Block von den Präparaten abschütteln und 120 min (oder über Nacht bei 4°C) mit F4/80 Antikörper inkubieren (Verhältnis 1:250 auf IgG Block-Lösung)
7. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
8. Inkubation für 30 Minuten mit Biotin-IgG (25 µl auf 5 ml IgG Block)
9. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
10. Inkubation für 30 Minuten mit ABC Peroxidase Lösung (jeweils 100 µl von den Kit-Lösungen A und B auf 5 ml dPBS, mindestens 30 Minuten vorher vorbereiten)
11. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
12. Diaminobenzol (DAB) Färbung anfertigen aus 5 ml dH₂O und 100 µl Puffer Stammlösung mit 200 µl DAB Lösung, sowie 100 µl H₂O₂ und 100 µl Nickel-Lösung (Vector).
Die Färbung erfolgt unter Sichtkontrolle im Mikroskop bis die geeignete Positivkontrolle schwarz angefärbt ist.
13. Beendigung der Färbung durch 5-minütiges Waschen in dH₂O
14. Eosin Gegenfärbung und Dehydrierung

2.4.2 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten wurden nach demselben Protokoll wie die Makrophagen angefärbt. Der verwendete Antikörperklon MCA 771G (Rat Anti Mouse Neutrophils; Serotec Ltd, Kidlington, Oxford, UK) erkennt polymorphe 40 kDa Antigene, die von polymorphkernigen Zellen, nicht aber von gewebständigen Makrophagen, synthetisiert werden (Hirsch und Gordon, 1983). Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 verwendet.

2.4.3 Färbung arterieller Gefäße und Myofibroblasten (α SMAc)

α -Aktin der glatten Muskelzellen (α SMAc) befindet sich in allen arteriellen Gefäßen und kann zusätzlich als Marker der Myofibroblasten im Gewebe verwendet werden. Ein N-terminal synthetisiertes Decapeptid von α SMAc wurde von dem Antikörperklon 1A4 detektiert (Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) und mit Hilfe von M.O.M Peroxidase Kit (Vector) angefärbt (Skalli et al., 1986):

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. 5 Minuten waschen in dH₂O
3. Gewebe mit Paraffin-Stift umranden und 15 Minuten in 3%igem Wasserstoffperoxid (Sigma) inkubieren
4. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
5. Inkubieren für 60 Minuten mit IgG Block (200 μ l IgG Block Lösung auf 5 ml dPBS)
6. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
7. Inkubieren für 5 Minuten mit verdünnter M.O.M Protein Lösung (1200 μ l Proteinkonzentrat auf 15 ml dPBS)
8. Herunterschütteln der M.O.M Protein Lösung und Inkubation mit Monoclonal Anti- α -Smooth-Muscle-Actin-Antikörper für 30 Minuten (Verhältnis 1:250)
10. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
11. Inkubieren mit Biotin-IgG für 10 Minuten (20 μ l biotinisierendes IgG auf 5 ml M.O.M Block Lösung)
12. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
13. Inkubieren mit ABC-Peroxidase Lösung für 5 Minuten (jeweils 200 μ l von den Kit-Lösungen A und B auf 5 ml dPBS, mindestens 30 Minuten vorher vorbereiten)
14. 2 x 2 Minuten in dPBS auswaschen
15. Diaminobenzol (DAB)-Färbung wie unter 2.4.1 beschrieben
16. Stoppen der DAB-Färbung in dH₂O für 5 Minuten
17. Eosin Gegenfärbung

2.4.4 Endothelzellenfärbung mit CD31 Antikörper

Das CD31, ein Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie, ist ein 130 kDa großes integrales Membranprotein. CD31 (auch bekannt als Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) wird kontinuierlich von Endothelzellen exprimiert und lässt sich somit als ein Angiogenese-Marker benutzen. Das CD31 der Endothelzellen wird vom MEC 13.3 Antikörper (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, USA) erkannt und ist ein zuverlässiger Marker der Endothelzellen (Vecchi et al., 1994). Somit lassen sich Arteriolen, Venolen und Kapillaren nachweisen und entsprechend quantifizieren. Die CD31-Epitope müssen für diesen Zweck vor der Färbung mit Trypsin angedaut werden. Zusätzlich wurde eine Amplifizierung des Biotin-Signals vorgenommen. In der CD31 Färbung kam wieder das Vectastain ABC Elite Rat Kit (Vector) zum Einsatz:

1. Deparaffinisierung und Rehydrierung
2. Auswaschen für 5 Minuten in dH₂O
3. Gewebe mit Paraffin-Stift umranden und 15 Minuten in 3%-igem Wasserstoffperoxid (Sigma) inkubieren
4. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
5. Demaskierung: Inkubation bei 37° C für 10 Minuten mit Trypsin Andaulösung (Verhältnis 3:1 von Trypsin Konzentrat und dessen Lösung; Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA)
6. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
7. Inkubation für 30 Minuten mit IgG Block (300 µl Rabbit Stock Solution auf 15 ml dPBS)
8. IgG Block von den Präparaten herunterschütteln und 120 min (oder über Nacht bei 4 °C) mit Anti-Maus CD31 Antikörper inkubieren (Verdünnung 1:250)
9. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
11. Inkubation für 30 Minuten mit Biotin IgG (25 µl auf 5 ml IgG Block)
12. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
13. Inkubation für 30 Minuten mit ABC Peroxidase Lösung 10 (jeweils 100 µl von den Kit-Lösungen A und B auf 5 ml dPBS, mindestens 30 Minuten vorher vorbereiten)
14. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen

15. Inkubation für 10 Minuten mit Biotinyl-Tyramide (Verhältnis 1:50) (TSA Biotin System, Perkin Elmer, Boston, MA, USA)
16. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
17. Inkubation für 30 Minuten mit ABC Peroxidase Lösung
18. 2 x 2 Minuten mit dPBS auswaschen
19. DAB-Färbung: Färben unter Sichtkontrolle im Mikroskop (siehe auch 2.4.1)
20. Stoppen der Färbung durch 5 minütiges Waschen in dH₂O
21. Eosin Gegenfärbung und Dehydrierung

2.5 Auswertung der Histologie

Die Präparate wurden unter dem Mikroskop (Axioskop 50, Carl Zeiss) begutachtet, die geeigneten Abschnitte aus den erfolgreich angefärbten Präparaten mit einer Digitalkamera (Carl Zeiss AxioCamHrc, Version 5.05.10, Carl Zeiss) computergesteuert photographiert und in einer Auflösung von 2600x2060 Pixel abgespeichert (Software Axio Vision 3.1.2.1, Carl Zeiss). Abhängig von der jeweiligen Färbung wurde hierbei eine 10-fache (Plan-Neofluar, 10X/0,30, Zeiss), 20-fache (Plan-Apochromat, 20X/0,60, Zeiss) oder 40-fache (Plan-Neofluar 4 ^/0,85 Pol, Zeiss) Vergrößerung verwendet. Bilder vom Infarktbereich, als auch von nicht geschädigtem Septumgewebe (als interne Kontrolle), wurden auf diese Art und Weise aufgenommen und abgespeichert. Es wurden zwei Schnitte aus den benachbarten 10-er Serien (Abstand 250 µm) von jedem Tier untersucht. Abhängig von Infarktausdehnung, Herzgröße und Vergrößerung entstanden somit 20-30 Bilder pro Maus.

2.5.1 Kollagenauswertung

Die Sirius Rot Färbung zeigte keine wesentliche Unterschiede des Kollagens zwischen WT und MCP-1^{-/-}-Mäusen und somit wurde auf eine aufwendige Quantifizierung verzichtet.

2.5.2 Auswertung der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten

Die Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung eingescannt und abgespeichert. Mit dem Programm ImageProPlus 5.4.1.29 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA) wurde zuerst die notwendige Kalibrierung (10X; 20X; 40X mal der eingestellten Pixelanzahl 2060*2600) eingestellt. Im Anschluss wurde in der Kategorie „Measurements“ das geschädigte Areal auf jedem Bild umrandet und so die entsprechende Fläche in μm^2 ermittelt. Unter der Option „Manual Tag“ konnte per Mausklick jede Zelle einzeln markiert und gezählt werden. Die schwarz angefärbten und gut erkennbaren Makrophagen, bzw. neutrophilen Granulozyten, wurden auf diese Weise ausgezählt.

Die ermittelten Daten wurden in Microsoft Excel 2002 (Microsoft, Redmond, CA, USA) abgespeichert und als Mittelwert der positiven Zellen pro mm^2 aus dem Infarktbereich und dem nicht-ischämischen Septum errechnet.

⇒ Siehe auch Abbildungen 4+5 (Seite 82/83)

2.5.3 Auswertung der α SMAc-Färbung

Da sich das α -Aktin der glatten Muskelzellen in allen arteriellen Gefäßen befindet, ließen sich diese sehr gut mit der α SMAc Färbung darstellen. Auch die Myofibroblasten, die ein sehr polymorphes Erscheinungsbild haben, wurden durch α SMAc angefärbt und waren dabei durch ihre Morphologie eindeutig von den Gefäßen zu unterscheiden. Die Präparate wurden bei 100-facher Vergrößerung fotografiert und eingescannt. Die Auszählung erfolgte im Programm Image ProPlus und mit denselben Einstellungen wie bei der Makrophagenzählung (siehe 2.5.2). Alle als Arteriolen erkennbaren Strukturen wurden markiert und ausgezählt, wobei, zum besseren Vergleich zu der CD31 Auswertung, zwischen großen (Durchmesser $>25 \mu\text{m}$) und kleinen (Durchmesser $<25 \mu\text{m}$) Arteriolen unterschieden wurde.

⇒ siehe auch Abbildung 6 (Seite 83)

2.5.4 CD31-Auswertung

Bei Anwendung der CD31-Färbung wurden Endothelzellen und somit alle Gefäße, d.h. Kapillaren, Venolen und Arteriolen angefärbt. Der gesamte Infarktbereich wurde mit 200-facher Vergrößerung fotografiert und eingescannt. Die Auszählung erfolgte wie in 2.5.3 dargestellt im Programm Image ProPlus und mit denselben Optionen. Es wurden alle Gefäße im Infarktbereich und nicht-ischämischen Septum ausgezählt, wobei die Gefäße mit einem Durchmesser $<25 \mu\text{m}$ als Kapillaren gewertet wurden. Strukturen mit einem Durchmesser $>25 \mu\text{m}$ waren entweder Venolen oder Arteriolen und die Anzahl der Venolen wurde durch Subtraktion der αSMAc -positiven von den CD31-positiven Gefäßen errechnet.

⇒ Siehe auch Abbildung 7 (Seite 84)

2.5.5 Auswertung der perfusionsfixierten Herzen

Die initiale Auswahl erfolgte ebenso wie bei den nur mit Z-fix fixierten Herzen. Jeder zehnte Schnitt (Abstand $250 \mu\text{m}$) wurde mit HE angefärbt. Alle mit HE angefärbten Präparate eines Herzens wurden von der Basis bis zur Apex in 12,5-facher Vergrößerung fotografiert und die Bilder anschließend in den Computer eingescannt. Mit dem Programm Image ProPlus wurde jeweils in der X und Y Achse der Durchmesser des linken Ventrikels aller Präparate ausgemessen.

Zur Berechnung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (EDV) wurden zunächst die Werte aus dem Präparat mit maximalen Durchmesser X oder Y genommen. Diese Werte wurden dann unter Berücksichtigung des arithmetisch größeren Wertes (X oder Y) in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{EDV} = X * Y [2 * (\max X; \max Y)]$$

Diese Formel ist eine Standardmethode aus dem klinisch echokardiographischen Bereich. Da durch die Fixierung und Paraffinisierung im Gewebe Wasser verloren

gegangen ist, wurde angenommen, dass das fixierte Präparat um ca. 30% geschrumpft ist. Dieser Volumenverlust wurde rechnerisch durch einen Korrekturfaktor wieder ausgeglichen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 RNA-Isolation

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Homogenisierung des entnommenen Herzens mit Hilfe eines Homogenisators (Tissue Tearor TM Modell 398, Biospec Products, Bartlesville, OK, USA) in 2 ml gekühlter RNASTat 60 Lösung (Tel-Test, Friendswood, TX, USA)
2. Reinigung des Homogenisators von Geweberesten zwischen den verschiedenen Herzen mit einer Nadel, anschließend Auswaschen in 0,1%-iger SDS-Lösung (Sodiumdodecylsulfat, Sigma) und dH₂O
3. Zusatz von 200 µl 99%-igem R- Chloroform (Sigma) zur Phasentrennung
4. Inkubation auf Eis für 15 Minuten
5. Zentrifugation bei 4°C mit 12000 G für 15 Minuten (Beckmann-Coulter, Avanti J25, Palo Alto, CA, USA)
6. Überführung des RNA-haltigen wässrigen Überstandes in ein 25 ml Röhrchen
7. Zusatz von äquivalenten Mengen 99%-igem Isopropanol (Sigma) zur Ausfällung der RNA
8. Inkubation bei 4°C für 60 Minuten
9. Zentrifugation bei 4°C mit 12000 G für 15 Minuten
10. Verwurf des Überstandes
11. Zweimaliges Auswaschen des Pellets mit je 2 ml 75%-igem Ethanol (AAPER, Shelbyville, KY, USA)
12. Zentrifugation bei 4°C mit 12000G für 15 Minuten
13. Verwurf des Überstandes
14. Lufttrocknung des Pellets für 10 Minuten
15. Resuspension mit 80 µl RNAase freiem H₂O (DEPC-treated ddH₂O, Sigma)
16. Feststellung der RNA-Konzentration
Verdünnung von 5 µl RNA mit 495 µl H₂O (1:100)
Messung der Extinktion bei 260 und 280nm (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK)
17. Errechnung der RNA- Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes.

Die Qualität der RNA wurde durch das Verhältnis 260 nm/ 280 nm errechnet (>1,6)

18. 10 µg RNA in 1 ml Verwahrungslösung überführen

Zusammensetzung der Lösung:

- 700 µl eiskaltes 100%-iges Ethanol (AAPER)
- 270 µl H₂O
- 30 µl 3 molares Na-Acetat (Sigma)

19. Aufbewahrung bei -80°C

2.6.2 RNA-Protection Assay (RPA) - allgemeine Voraussetzungen

Eine sensitive, schnelle und sehr spezifische Methode zur Quantifizierung und Detektierung von mRNA-Transkripten ist der „Ribonuclease Protection Assay“ (RPA). Eine einzelsträngige cRNA-Sonde wurde dabei mit einer spezifischen RNA unbekannter Konzentration hybridisiert. Die gewünschte spezifische cDNA-Vorlage („Template“) wurde in einem Plasmid kloniert und mit einem Promotor versehen, so dass eine Transkription durch Polymerasen *in vitro* möglich war. Es entstand eine der zu detektierenden RNA komplementäre cRNA-Sonde, die durch gelelektrophoretische Auftrennung später eine Quantifizierung des gesuchten Genes ermöglichte.

Ein RPA wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ausgeführt. Dabei wurde am ersten Tag eine einzelsträngige, radioaktiv-markierte „Antisense“ (5`-3`) cRNA-Sonde (Probe) hergestellt, die über Nacht mit der zu untersuchenden RNA hybridisieren konnte. Am zweiten Tag wurden alle einzelsträngigen RNA-Stücke verdaut und die Probe soweit gesäubert, dass nur die jetzt doppelsträngige, radioaktiv markierte mRNA:cRNA Sonde in der Probe vorhanden blieb. Diese ließ sich mit Hilfe eines Phosphorimaging-Films und durch Autoradiographie darstellen.

2.6.2.1 RPA-Protokoll

2.6.2.2 Synthese der cRNA-Sonde

Ein speziell von der Firma Pharmingen entwickeltes Template wurde als cDNA-Vorlage herangezogen. In einem pPMG-Vektor wurde mit Hilfe eines Promotors für die T7 Bakteriophagen-Polymerase die benötigte cDNA kloniert. Dabei war es wichtig, darauf zu achten, dass das 3' Ende der ausgewählten cDNA direkt dem T7 Promotor anlag. Am 5' Ende wurde das Plasmid mit einem Restriktionsenzym geschnitten und somit linearisiert (Downstream). Somit wurde eine Transkription *in vitro* ermöglicht. Es entstand nach der Transkription eine, der gewünschten mRNA komplementäre, Antisense-(5'-3')-cRNA-Sonde, die mit der in der Probe zu identifizierenden mRNA hybridisieren konnte. Um eine spätere gelelektrophoretische Auftrennung zu ermöglichen, war es notwendig, auf adäquate Längenunterschiede zwischen den einzelnen cDNAs zu achten. Um eine Standardisierung der Quantität der einzelnen mRNA-Expressionen zu bekommen, wurden jedem „Template Set“ die „Housekeeping“ Gene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und L 32 hinzugesetzt.

Für diese Arbeit wurden folgende „Template-Sets“ verwendet:

1. Zytokine: TNF- α , IL-1 β , OPN, IL-10, IL-6, M-CSF, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3.
2. Chemokine: MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, IP-10, MCP-1.

2.6.2.3 Markierung der cRNA-Sonden

Alle hier verwendeten Materialien stammen aus dem „*In Vitro* Transkriptions-Kit“ von Pharmingen.

1. Auftauen der vorher auf -20°C gelagerten Reagenzien und anschließende Zentrifugation (Eppendorf, 5415 C, Mikrozentrifuge, Hamburg, Deutschland)
2. Pipettierung folgender Reagenzien in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen
 - 1 μ l RNAsin (40 U/ μ l plazentarer Ribonuclease Inhibitor)

- 1 µl GACU Pool (GTP, ATP, CTP: 2,75 mM; UTP 61 mM)
 - 2 µl DTT (100 mM Dithiothreitol)
 - 4 µl Transkriptionspuffer 5X
3. Erwärmung auf Raumtemperatur
 4. Zusatz von 1 µl des linearisierten "Template- Sets" (50ng/µl)
 5. Zusatz von 10 µl UTP [α - P32]
 6. Zusatz von 1,5 µl T7 Polymerase (15-20 U/µl)
 7. Vermischung und kurze Zentrifugation
 8. Inkubation bei 90°C für 90 Minuten => *in vitro* Transkription
 9. Beendigung der Transkription durch Zugabe von 2 µl RNase freier DNase (1 U/ µl)
 10. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten => Verdauung der cDNA
 11. Zugabe von Phenol-Chloroform zur Extraktion der Enzyme
 - 26 µl EDTA (20 mM)
 - 25 µl Tris-gesättigtes Phenol
 - 25 µl Chloroform: Isoamyl Alkohol (50:1)
 - 2 µl Hefe tRNA (2 mg/ ml)
 12. Zentrifugation bis zur Ausbildung der Phenol-Chloroform Lage
 13. Überführung des RNA-haltigen Überstandes in ein neues Eppendorf-Röhrchen
 14. Zusatz von 50 µl Chloroform
 15. Zentrifugation
 16. Überführung des klaren RNA-haltigen Überstandes in ein neues Eppendorf-Röhrchen, gefüllt mit:
 - 50 µl Ammoniumazetat (4 M)
 - 250 µl eiskaltem 100%-igem Alkohol
 17. Verwahrung bei -80°C für 30-35 Minuten => Ausfällung der cDNA
 18. Zentrifugation der cRNA-Lösung für 15 Minuten
 19. Entfernung des wässrigen Überstandes
 20. Auswaschen des Pellets mit 100 µl eiskaltem 90%-igem Ethanol
 21. Kurz-Zentrifugation
 22. Entfernung des Ethanol

23. Lufttrocknung bei Raumtemperatur für 10 Minuten
24. Zusatz von 50 µl Hybridisierungspuffer (RPA Kit, Pharmingen)
25. Überprüfung der radioaktiven Aktivität
 - 1 µl der Lösung in 10 ml Szintillisations-Flüssigkeit (Ecolume, ICN Biomedicals Inc; Irvine, CA ,USA) verdünnen
 - Messung der Radioaktivität im Szintillisationszähler (LKB Wallac, 1219 Rackbeta, Turku, Finnland)

Ein erfolgreicher Transkriptionsprozess zeichnet sich durch ein Maximum von 5×10^6 Cherenkov counts/ µl und einem Minimum von 3×10^5 counts/ µl aus.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Antisense cDNA Sonde auf 1×10^6 counts/ µl verdünnt.

2.6.2.4 Präparation der Proben

Für die weitere Behandlung der Proben wurde das RPA-Kit von Pharmingen verwendet.

1. Zentrifugation der RNA Proben aus 2.7.1.2 mit 14.000 g für 30 Minuten
2. Verwurf des wässrigen Überstandes, Pellet bleibt übrig
3. Reinigung der Pellets mit 150 µl eiskaltem 75%-igem Alkohol
4. Zentrifugation für 15 Minuten
5. Lufttrocknung der Pellets für 10 Minuten
6. Zusatz von 8 µl Hybridisierungspuffer
7. Verdünnung der Antisense cDNA-Sonde auf 1×10^6 counts/ µl
8. Zusammenführung von 2 µl Antisense-cDNA-Sonde (siehe 2.6.2.3) mit der Probenlösung
9. Verschluss des Reaktionsgemisches mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma)
10. Inkubation bei 90 °C für 5 Minuten
11. Abkühlung (1 °C pro Minute) auf Hybridisierungs-Temperatur (56 °C)
12. Hybridisierung bei 56 °C über Nacht

2.6.2.5 RNase Behandlung

1. Langsame Abkühlung der Proben auf 37 °C
2. Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten
3. Zubereitung des RNase Cocktails (für 20 Proben)
 - 2,5 ml RNase Puffer (Ribonuclease digestion buffer)
 - 6 µl RNase A +T1 Mix (A: 80 ng/ ml, T1 250 U/ µl)
4. Zusatz von je 100 µl RNase Cocktail je Probe
5. Inkubation bei 30 °C für 90 Minuten
 - => Verdau der einzelsträngigen, überhängenden und in Loops gefalteten RNA
6. Zubereitung des Proteinase-Cocktails (für je 20 Proben)
 - 390 µl Proteinase K Puffer
 - 30 µl Proteinase K (10 mg/ ml)
 - 30 µl Hefe tRNA (2 mg/ ml)
7. Pipettierung von je 18 µl Proteinase-Cocktail in frische Eppendorf-Röhrchen
8. RNA-Reaktionsgemisch unter Mineralöltropfen herauspipettieren und zum Proteinase-Cocktail hinzufügen
9. Kurze Zentrifugation
10. Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten => Inaktivierung der RNAsen
11. Zusatz von
 - 65 µl trisaturiertem Phenol (pH 7,5 - 7,7; Roche, Mannheim, Deutschland)
 - 65 µl Chloroform: Isoamylalkohol (50:1)
 - ⇒ Denaturierung der Enzyme
12. Zentrifugation für 5 Minuten
13. Überführung des RNA-Überstandes in neues Röhrchen
14. Zusatz zur RNA von 120 µl Ammoniumazetat (4M)
15. Zusatz von 650 µl eiskaltem 100%-igem Ethanol
 - ⇒ Präzipitation
16. Inkubation bei -80 °C für 30-35 Minuten
17. Zentrifugation
18. Entfernung des Überstandes
19. Auswaschen des Pellets mit 100 µl eiskaltem 90%-igem Ethanol

20. Kurz-Zentrifugation
21. Entfernung des Ethanol
22. Lufttrocknung für 10 Minuten bei Raumtemperatur
 - ⇒ Pellet besteht jetzt aus mRNA-cRNA-Sonde-Hybriden
23. Lösung des Pellets in 5 µl Ladungspuffer
24. Versetzung von original cRNA-Sonde mit 7 µl Puffer => Kontrollprobe
25. Inkubation bei 90°C für 5 Minuten => Denaturierung
26. Sofortige Kühlung auf Eis für eine Minute
27. Beladung des Gels

2.6.2.6 Präparation der Gelelektrophorese-Apparatur

1. Glasplatten gründlich mit Wasser und Seife reinigen und mit Papiertüchern trocknen
2. Benetzung der Glasplatten mit 2-5 ml 10%-igem SDS
3. Einwirkzeit von 5 Minuten beachten
4. Abspülen der Glasplatten mit H₂O
5. Reinigung der Glasplatten mit 95%-igem Ethanol
6. Obere, dünnere Glasplatte mit 3-5 ml Silikon einreiben und trocknen lassen
 - ⇒ Verhinderung der Haftung des Gels an der Glasplatte
7. Zusammenfügung der Gelelektrophorese-Apparatur
 - „Spacer“ kommen an die äußeren Seiten
 - => Garantie für 0,4 mm Hohlraum zwischen den Platten
 - Verschluss der seitlichen Glasplatten mit Klemmen
 - Verschluss des Bodens mit Plastikklammer mit Gummiabdichtung
 - => Kammer enthält Öffnung zum Einspritzen des Gels

2.6.2.7 Präparation des Urea-Polyacrylamid-Gels

1. Herstellung von 5%-gem Polyacrylamidgel
 - 80 ml Sequagel (6%-ge Sequenziertgel Lösung, Arylamid: Bisacrylamid 19:1; National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)
 - 20 ml Sequagel Complete (5X BE und TEMED; National Diagnostics)
 - 800 µl Ammoniumpersulfat-Lösung (10%, Sigma)
2. Gel mit Hilfe einer Spritze in die Kammer einführen, dabei ist auf die Vermeidung von Blasenbildung zu achten
3. gewaschener Kamm am oberen Ende einfügen
4. Polymerisation des Gels für 120 Minuten
5. Entfernung des Kammes aus dem polymerisierten Gel
6. Vertikale Ausrichtung der Gelelektrophorese-Apparatur
7. Auffüllung der oberen Glaskammer mit 0,5 X TBE Puffer (10X: 1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,01 mM EDTA, pH 3,6; Invitrogen, LTD, Raisley, Schottland, UK)
 - ⇒ Möglichkeit zum kontinuierlichen Stromflusvertikal durch das Gel
8. Probelauf des Gels bei 70 W für 60 Minuten
9. Ausspülung der Kammern (s.o) mit Puffer (2X)
10. Pipettierung der Reaktionslösung und der cRNA-Sonden (siehe 2.7.1.4) in die einzelnen Kammern
11. Gelelektrophoretische Auftrennung bei 60 W über 180-210 Minuten
12. Nach Beendigung der Laufzeit Stromzufuhr unterbrechen, Puffer entfernen und die obere Glasplatte 3-5 Minuten mit Eis bedecken
 - => dies ermöglicht eine bessere Löslichkeit des Gels von der Platte
13. Entfernung einer Glasplatte
14. Bedeckung des Gels mit einer Polyvinylchloridfolie (Fisher Scientific International Inc, Hampton, NH, USA)
15. Trocknung des Gel-Folien-Komplexes im Gelrockner (Gel Dryer 583, Bio Rad, Hercules, CA, USA) bei 80°C unter Vakuum für 60 Minuten
16. Permanente Fixierung des Gels auf dem Filterpapier

17. Mit Filterpapier verbackenes Gel in Filmkassette mit radioaktiv-sensitiven Film über Nacht lagern (Low Energy Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)

2.7 Analyse der Messungen mit Image Quant

Von dem Gel wurde eine Autoradiographie angefertigt. Dabei wurde ein Röntgenfilm (Biomax Film, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) 48 Stunden bei -80°C von dem Gel belichtet.

Neben der Autoradiographie wurde auch noch ein digitales Negativ des Gels erstellt. Dabei wurden die, vom Gel ausgehenden γ -Strahlen von seltenen Edelmetallen, die sich in einem „Low Energy Storage Phosphor Screen“ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) befinden, aufgenommen. Zu diesem Zwecke wurde das Gel über Nacht zusammen mit einem radioaktiv-sensitiven Film gelagert. Die desensitorische Analyse des Films wurde mit Hilfe des Storm 860 Scanners (Molecular Dynamics) vorgenommen. Bei 50 Micron und 42 Minuten Scannzeit zeigte der Scanner die absorbierte Strahlung in Signale (Counts) pro Fläche an und auf dem Bildschirm projizierte sich ein dem Gel identisches, digitales Negativ, indem die Signale als schwarze Banden sichtbar wurden. Diese Banden konnten mit dem Programm Image Quant (Version 5.2, Molecular Dynamics) ausgewertet werden. Die Anzahl der Signale (Counts) wurde in einen positiven Ausschlag (Peak) transferiert. Die Höhe des Ausschlags ließ sich durch das Integral, also der Fläche unter den einzelnen Signalspitzen (Peaks), errechnen. Als Längenstandard wurde die Sondenlösung verwendet, mit deren Hilfe auch die einzelnen Ausschläge den verschiedenen Genen zugeordnet werden konnten.

Die bei dieser Messmethode für die einzelnen Banden (Gene) erhaltenen Ergebnisse wurden in eine Exceltabelle übertragen und in ein Verhältnis zu dem ribosomalen Protein L32 gesetzt, dass als interner Standard genommen wurde. In unterschiedlichen Zellen des Organismus werden die „Housekeeping Genes“ L32 und GADPH relativ konstant exprimiert und können so als Standard verwendet werden (Muller et al., 2001). Diese Normierung der Daten war notwendig, um die einzelnen

Messergebnisse miteinander vergleichen zu können. Durch die Anzahl der Tiere in den verschiedenen Versuchsgruppen war es technisch leider nicht möglich, die gleichen Zeitintervalle von WT und MCP-1^{-/-}-Mäusen in einer einzigen RPA zu untersuchen und deswegen mussten die einzelnen RPAs untereinander gut vergleichbar sein. Ein Problem ist dabei, dass die Qualitäten der einzelnen RPAs aufgrund vieler verschiedener Faktoren variieren kann. Beispiele für Variationen sind die Reinheit der verwendeten RNA, eine unterschiedliche Aktivität der Enzyme, schwankende Inkubationstemperaturen und die Degradierung der RNA durch RNAsen. Da die Ergebnisse der einzelnen Gene mit L32 in Verhältnis gesetzt werden kann ein Vergleich zwischen den einzelnen RPAs mit relativ geringem systematischem Fehler verantwortet werden.

2.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden unter Verwendung des ANOVA-Testes (Student-Newman-Keuls-Test) mit nachfolgendem T-Test für ungepaarte Stichproben und bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p < 0,05$ überprüft. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von Graph Pad InStat Software (Version 3.06; Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Operative Ergebnisse

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 188 Mäuse operiert. 31,9% der Versuchstiere konnten nicht in die Studie aufgenommen werden, da sie entweder infolge der Initialoperation oder des Infarktes frühzeitig verstorben waren (4,8%) oder trotz 60-minütiger Okklusion der RIVA keinen ausreichenden Infarkt erlitten hatten (27,1%). Es hat sich kein markanter Unterschied in der Mortalität oder in der Ausbildung eines Infarktes zwischen Wildtyp- (WT) und MCP-1^{-/-}-Mäusen feststellen lassen.

An 128 Tieren konnte erfolgreich ein Myokardinfarkt ausreichender Größe erzeugt werden. Davon wurden für die histologischen Untersuchungen 70 Mäuse verwendet. Für molekularbiologische Erhebungen sind 58 Tiere herangezogen worden.

3.2 Histologischer Vergleich: WT- versus MCP-1^{-/-}-Mäuse

3.2.1 Wundheilung in WT-Mäusen

Bei den WT-Mäusen haben sich unterschiedliche zelluläre Veränderungen nach einem Myokardinfarkt und anschließender Reperfusion beobachten lassen, die zum großen Teil auf die inflammatorische Reaktion zurückzuführen waren.

Ein reperfundierter Myokardinfarkt war mit einer rapiden Infiltration von inflammatorischen Zellen in dem geschädigten Gebiet verbunden. 24 Stunden nach dem Infarkt war lichtmikroskopisch eine Koagulationsnekrose zu erkennen. Dabei waren die Zellgrenzen der einzelnen Myozyten nur unklar auszumachen. Der Zellkern zeigte verklumptes und an den Rand gedrängtes Chromatin, begleitet von einer starken Eosinophilie in den betroffenen Gebieten. Zusätzlich war eine starke Infiltration von Entzündungszellen erkennbar. 72 Stunden nach dem Infarkt hatte sich bereits ein Granulationsgewebe gebildet, das weiterhin zahlreiche inflammatorische Zellen beinhaltete. Fast alle geschädigten Myozyten waren zu diesem Zeitpunkt phagozytiert. Nach einer Reperfusionszeit von 7 Tagen war bereits ein nahezu vollständig

organisiertes Narbengewebe entstanden: mit einer kontrahierten Narbe, parallel angeordneten Kollagenfasern und nur noch geringfügiger zellulärer Infiltration (=> siehe Abbildung 3, Seite 81).

3.2.2 Verzögerte Wundheilung bei MCP-1^{-/-}-Mäusen

Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen zeigte sich 24 Stunden nach dem Infarkt ein morphologisch ähnliches Bild wie bei den WT-Mäusen. In dem Gewebe waren neben einer massiven zellulären Infiltration eine Koagulationsnekrose, Veränderungen der Zellkernstruktur und eine erkennbare Eosinophilie der Zellen auszumachen. Nach 72 Stunden Reperfusion wurden aber bereits deutliche Unterschiede in der Gewebemorphologie im Gegensatz zu den WT-Mäusen erkennbar. Ein Großteil der geschädigten Myozyten war in den Knock-Out-Mäusen noch nicht abgeräumt und es hatte sich noch kein vollständiges Granulationsgewebe gebildet. 7 Tage nach der Okklusion war aber auch bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen ein Narbengewebe nachzuweisen. Diese Narbe war allerdings nicht so hoch organisiert wie in der WT-Gruppe. Die Kollagenfasern lagen bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen zu diesem Zeitpunkt noch ungeordnet und das Gewebe war nur mäßig zellulär infiltriert (=> siehe Abbildung 3, Seite 81).

3.3 Immunhistochemische Ergebnisse

3.3.1 Makrophagenmigration

Bei den WT-Mäusen akkumulierten sich 24 Stunden nach dem Infarkt eine große Anzahl von Monozyten/ Makrophagen im geschädigten Gewebe (Diagramm 1). Diese anfänglich starke Infiltration hat mit der Progression des Heilungsprozesses kontinuierlich abgenommen. Das Migrationsverhalten der Monozyten/Makrophagen in den MCP-1^{-/-}-Mäusen unterschied sich dahingegen deutlich von den WT-Mäusen. Nach 24 Stunden Reperfusion war eine deutlich geringere Infiltration von Monozyten/Makrophagen (Ma) in dem infarzierten Gewebe zu erkennen. 3 Tage nach dem Infarkt kam es interessanterweise zu einer weiteren Zunahme der Makrophagendichte im Gewebe: WT 792 ± 52 Ma/mm² versus MCP-1^{-/-} 1153 ± 99 Ma/mm²; ($p < 0,05$). Die Makrophagendichte war nach 7 Tagen Reperfusion bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen deutlich vermindert und sogar 3,5-fach geringer als bei den WT-Mäusen (siehe Abbildung 4, Seite 82).

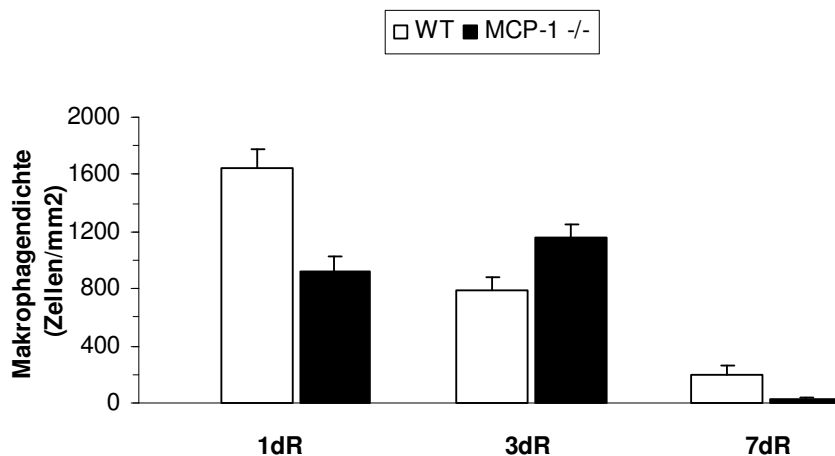


Diagramm 1: Makrophagenimmigration in den infarzierten Bereich

3.3.2 Neutrophile Granulozyten

24 Stunden nach dem Infarkt kam es sowohl bei den WT- als auch den MCP-1^{-/-}-Mäusen zu einer rapiden Zunahme von neutrophilen Granulozyten. Mit einem Peak von bis über 1000 neutrophilen Granulozyten pro mm² war zu diesem Zeitpunkt der Höhepunkt der Infiltration in beiden Mäusegruppen erreicht (Diagramm 2). Anschließend nahm sowohl bei den WT-Mäusen als auch den MCP-1^{-/-}-Mäusen die Anzahl der neutrophilen Granulozyten mit Fortschreiten der Wundheilung kontinuierlich ab. Zwischen WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen hat sich kein signifikanter Unterschied in der Neutrophilendichte nachweisen lassen (siehe Abbildung 5, Seite 83).

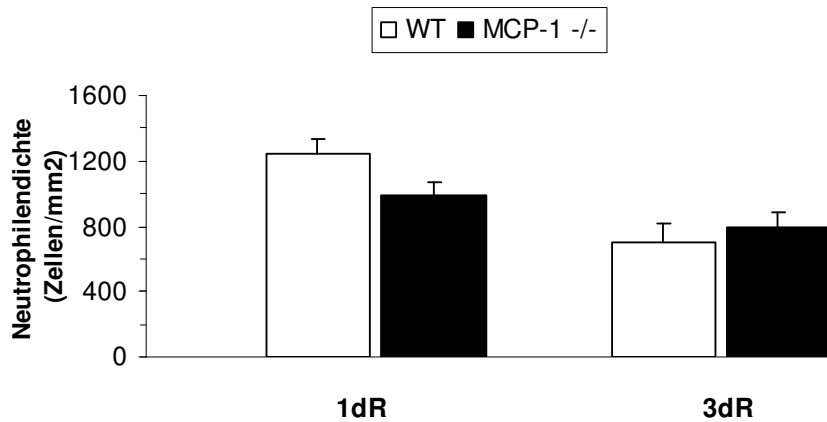


Diagramm 2: Neutrophile Granulozyten im infarzierten Bereich

3.3.3. Myofibroblasten als Marker der verzögerten Wundheilung bei MCP-1^{-/-}-Mäusen

Die Färbung mit spezifischem Antikörper gegen α -Aktin der glatten Muskelzellen ermöglichte die Darstellung von Myofibroblasten. Myofibroblasten konnten in den WT-Mäusen nur 72 Stunden nach der Okklusion der RIVA gefunden werden. Die organisierte Infarkt Narbe wies 7 Tage nach dem Infarkt kaum noch Myofibroblasten auf. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen fand sich 3 Tage nach dem Infarkt eine wesentlich geringere Anzahl von Myofibroblasten als bei den WT-Tieren. Die noch nicht vollständig organisierte Narbe nach 7 Tagen Reperfusion beinhaltete weiterhin zahlreiche Myofibroblasten (siehe Abbildung 6, Seite 83). Dies deutet auf ein verzögertes Remodeling und eine verzögerte Wundheilung in den MCP-1^{-/-}-Mäusen hin. Eine quantitative Auswertung war aufgrund der nur schwach abgrenzbaren Zellkonturen nicht möglich.

3.3.4 Myozytenphagozytose bei MCP-1^{-/-}-Mäusen

Bei den WT-Mäusen wurden die kranken Myozyten schnell phagozytiert und abgeräumt. 3 Tage nach dem Infarkt waren keine geschädigten Herzmuskelzellen im Gewebe mehr nachzuweisen. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen waren nach 3 Tagen Reperfusion noch viele kranke Myozyten im Infarktbereich zu erkennen. Diese waren durch ein zelluläres Ödem, Verlust der Sarkomere und Chromatinveränderungen gekennzeichnet. Nach 7 Tagen waren sowohl in den WT- als auch in den MCP-1^{-/-}-Mäusen keine Myozyten im geschädigten Bereich mehr zu nachzuweisen (siehe Abbildung 3, Seite 81).

3.3.5 Einfluss von MCP-1 auf die Angiogenese

Durch eine Kombinationen der CD31-Färbung des Endothels und der α -SMAc-Färbung der glatten Muskelzellen konnte die Anzahl der Arteriolen, Venolen und Kapillaren im Gewebe ermittelt werden (siehe Abbildungen 6 und 7, Seite 83/84). Wie in Diagramm 3 zu erkennen ist, fand sich 7 Tage nach dem Infarkt im infarzierten Gewebe eine geringere Kapillardichte als im Kontrollbereich (492 ± 45 Kapillaren pro mm^2 im Infarkt versus 2659 ± 237 Kapillaren/ mm^2 im Kontrollgebiet; $p < 0,01$). Die WT-Mäuse hatten mit $9,8 \pm 1,9$ mehr Arteriolen gebildet als die MCP-1^{-/-}-Mäuse mit $7,0 \pm 2,1$ Arteriolen. Dagegen fanden sich im Infarktgebiet der WT-Mäuse $15,3 \pm 10,5$ Venolen versus $22,8 \pm 5,44$ Venolen bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant unterschiedlich.

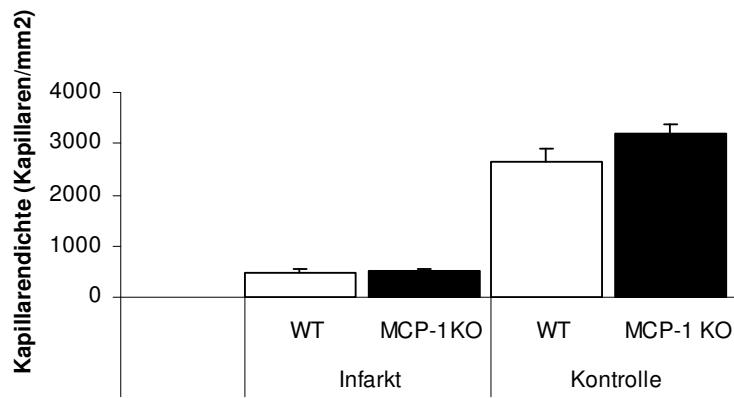


Diagramm 3: Kapillardichte im Infarkt- und im Kontrollbereich

3.4 Molekularbiologische Ergebnisse

Um die molekularen Signale, die für die zellulären Veränderungen im Infarkt zuständig sind, nachzuweisen, wurde die mRNA-Expression für ausgewählte inflammatorische Marker überprüft. Deutliche Unterschiede im Vergleich WT- versus MCP-1^{-/-}-Mäuse waren in der mRNA-Synthese von folgenden Molekülen zu erkennen.

3.4.1 mRNA-Expression der Zytokine

3.4.1.1 Interleukin-1 β -Expression

Die Interleukin-1 β -mRNA-Expression war 6 Stunden nach dem Infarkt im Herzen der WT-Mäuse stark erhöht (>25-fach im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ohne Infarkt; $p < 0,001$). Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren hingegen ließ sich zum selben Zeitpunkt eine deutlich geringere Expression von IL-1 β -mRNA nachweisen. Bei einem Vergleich der Expression von IL-1 β -mRNA nach 6 Stunden Reperfusion wurde im Herzen der WT-Mäuse 2,3 mal mehr IL-1 β -mRNA gebildet als bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen ($p < 0,01$). Nach 24 Stunden Reperfusion war in beiden Mäusegruppen nur noch eine leicht erhöhte Synthese von IL-1 β nachzuweisen. Bereits 72 Stunden nach dem Infarkt hatten sich die mRNA-Level in beiden Mäusegruppen wieder normalisiert.

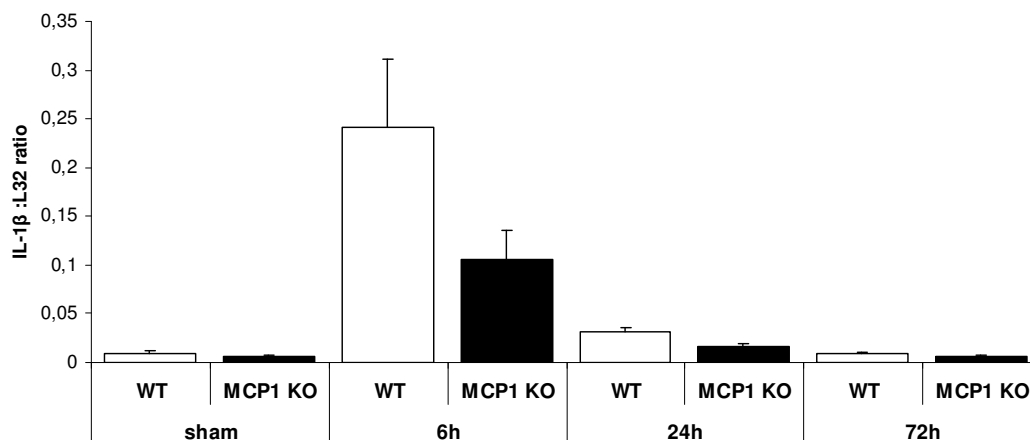


Diagramm 4: IL-1 β -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.4.1.2 Tumor-Nekrose-Faktor- α -Expression

Ein wichtiger Mediator bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen ist TNF- α . 6 Stunden nach dem Infarkt war die Expression von TNF- α -mRNA bei den WT-Mäusen im Vergleich zu den sham-Tieren um das 3,8-fache erhöht ($p < 0,01$). Die MCP-1-defizienten Tiere haben zum selben Zeitpunkt wesentlich weniger TNF- α -mRNA exprimiert ($p < 0,01$). Nach 24 Stunden Reperfusion sanken die TNF- α -mRNA-Werte in beiden Mäusegruppen wieder und waren nach 72 Stunden nicht mehr von den sham-Leveln abgehoben. Dies wird in Diagramm 5 graphisch ersichtlich:

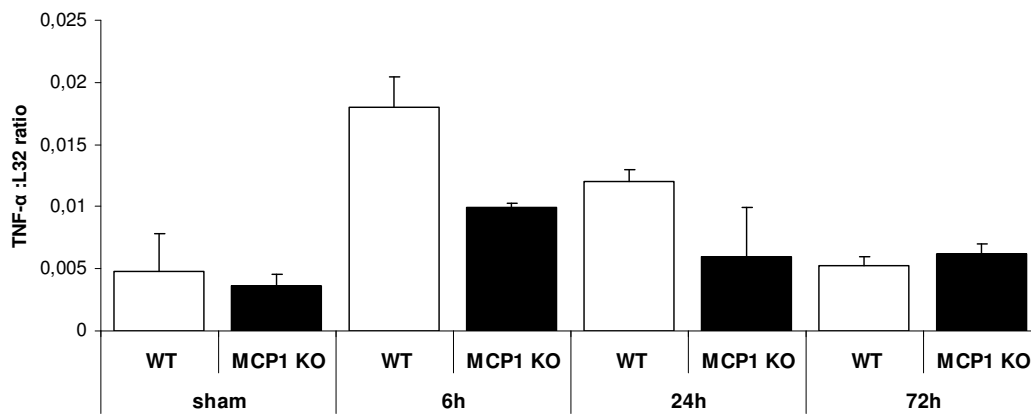


Diagramm 5: TNF- α -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.4.1.3 IL-6-mRNA-Expression

IL-6 hat sowohl anti- als auch proinflammatorische Eigenschaften (Oppenheim und Feldman, 2001). Diagramm 6 zeigt, dass IL-6 nach 6 Stunden Reperfusion bei den WT-Mäusen gegenüber den sham-WT-Tieren 31,6-fach vermehrt exprimiert wurde ($p < 0,001$): 42% mehr als bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (WT vs. MCP-1^{-/-}, 24 Stunden Reperfusion, $p < 0,05$). 24 Stunden nach dem Infarkt sanken die IL-6-mRNA-Level in beiden Gruppen stark ab und waren gegenüber den sham-Tieren nur noch 4,3- (WT) bzw. 3,6-fach (MCP-1^{-/-}) erhöht. Auffällig ist, dass nach 3 Tagen Reperfusion bei den MCP-1-defizienten Tieren ein erneuter leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg, zu beobachten war: es wurde aber immerhin noch 10-mal mehr IL-6-mRNA synthetisiert, als bei den sham-MCP-1^{-/-}-Mäusen.

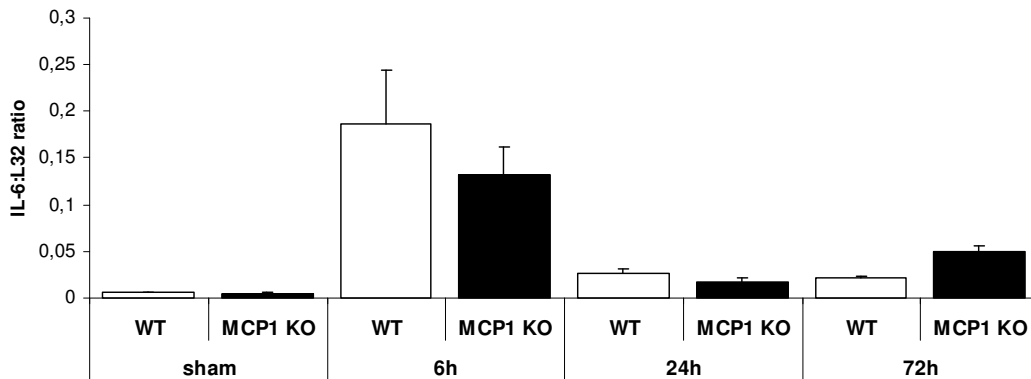


Diagramm 6: IL-6-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.4.1.4 Interleukin-10-mRNA-Synthese

IL-10 ist ein inhibitorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der proinflammatorischen Mediatoren. Wie in Diagramm 7 ersichtlich ist, war bereits bei den sham-Tieren ein deutlicher Unterschied zwischen WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen in der IL-10-Expression zu erkennen, da bei den voroperierten WT-Mäusen 4-mal mehr IL-10 ausgeschüttet wurde als bei den vergleichbaren MCP-1-defizienten Tieren. Die höchste Expression von IL-10-mRNA fand bei den WT-Tieren 6 Stunden nach dem Infarkt statt und lag 5-fach höher als die Expression bei den MCP-1^{-/-}-Tieren zum gleichen Zeitpunkt ($p < 0,05$). Im Gegensatz zu TNF- α und IL-1 β waren die mRNA-Level von IL-10-mRNA bei den WT-Mäusen bis mindestens 3 Tage nach dem Infarkt erhöht und sanken nur langsam mit Abklingen der Entzündung. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen stieg die IL-10-mRNA-Synthese kontinuierlich bis mindestens 72 Stunden nach dem Infarkt an (21-fach höher gegenüber den sham-MCP-1^{-/-}-Mäusen; $p < 0,01$).

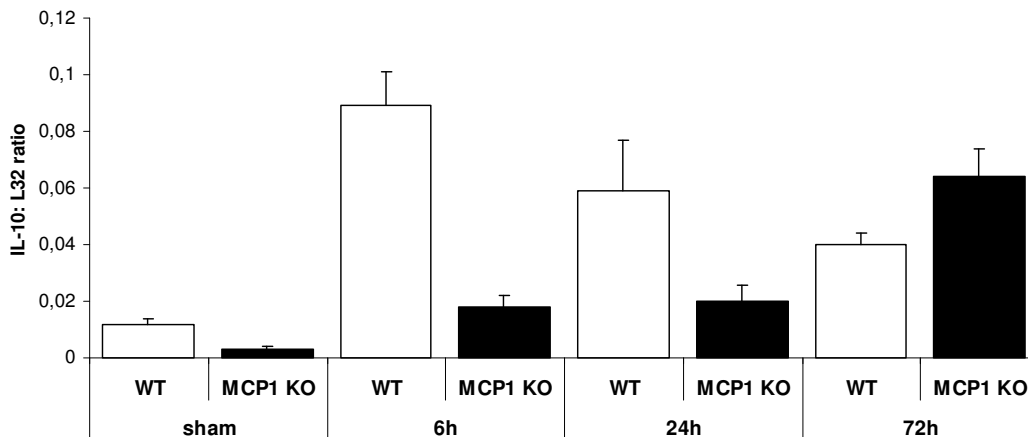


Diagramm 7: IL-10-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.4.1.5 TGF- β -mRNA-Synthese

TGF- β kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Es wird zwischen den Isoformen TGF- β 1, - β 2 und - β 3 unterschieden.

In der Synthese von TGF- β 1-mRNA hat sich eine Verdopplung von TGF- β 1 sowohl bei den WT- als auch bei MCP-1^{-/-}-Mäusen nach 6 Stunden Reperfusion gezeigt. Der Anstieg der TGF- β -Synthese hat sich allerdings in beiden Mäusegruppen nicht signifikant unterschieden. Im Diagramm 8 ist zu erkennen, dass die erhöhte Expressionsrate des Zytokins bis zu 72 Stunden nach dem Infarkt in beiden Mäusegruppen nachweisbar blieb.

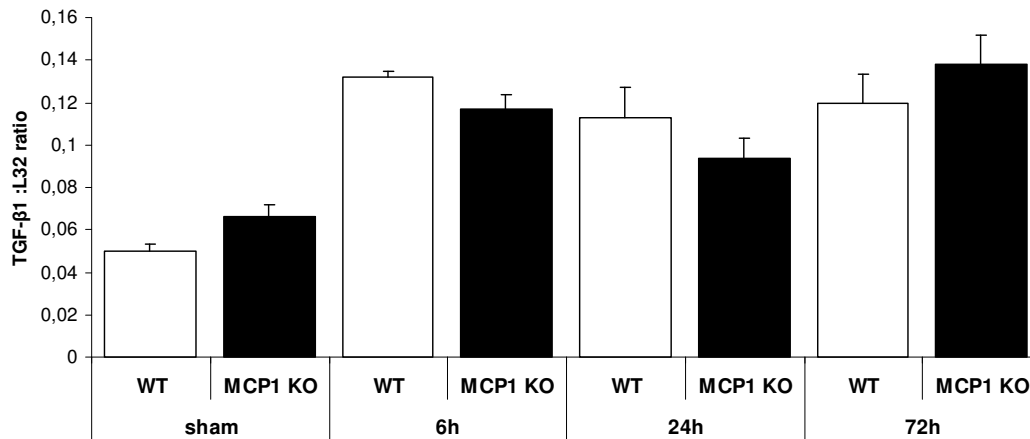


Diagramm 8: TGF- β 1-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

Bei der TGF- β 2 Form (Diagramm 9) war ebenfalls eine Erhöhung des mRNA-Levels in beiden Mäusegruppen zwischen 6 und 72 Stunden nach dem Infarkt nachzuweisen. Dabei stiegen die mRNA-Werte auf das 3-4-fache des Ausgangswertes. Es waren allerdings signifikante Unterschiede in der Expression von TGF- β 2-mRNA zwischen den beiden Mäusegruppen zu erkennen. So wurde bei den WT-Mäusen nach 6 Stunden Reperfusion 4-mal mehr TGF- β 2-mRNA synthetisiert als bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen ($p < 0,001$). Es ist dabei aber zu beachten, dass die TGF- β 2-Synthese in den sham-WT-Mäusen um das 5-fache gegenüber den sham-MCP-1^{-/-}-Mäusen erhöht war. Auch 24 und 72 Stunden nach der Okklusion fanden sich signifikante Expressionsunterschiede von TGF- β 2 zwischen WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen (je $p < 0,01$).

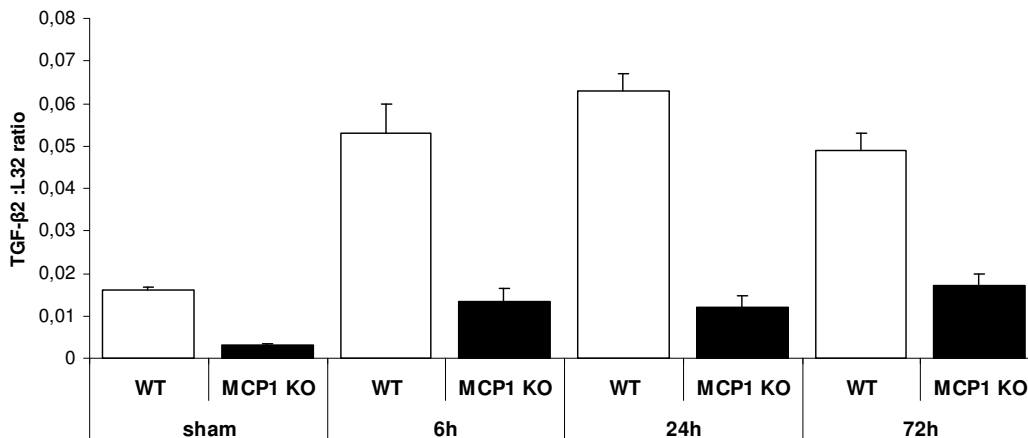


Diagramm 9: TGF- β 2-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

Im Gegensatz zu TGF- β 1 und TGF- β 2 fand sowohl bei den WT als auch bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine verzögerte Expression von TGF- β 3 statt. Dies wird in Diagramm 10 gut ersichtlich. Die Werte stiegen mit dem Verstreichen der Zeit kontinuierlich an und nach 72 Stunden Reperfusion wurde 3,5-fach mehr TGF- β 3 exprimiert als bei den sham-WT-Tieren ($p < 0,001$). Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen war ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Allerdings war die TGF- β 3-mRNA-Expression nicht so ausgeprägt. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde signifikant mehr TGF- β 3 bei den WT-Mäusen als bei den MCP-1-defizienten Tieren ausgeschüttet ($p < 0,001$), auch 72 Stunden nach dem Infarkt lag die TGF- β 3-Expression bei den WT-Mäusen noch deutlich höher als bei den MCP-1^{-/-}-Tieren ($p < 0,001$).

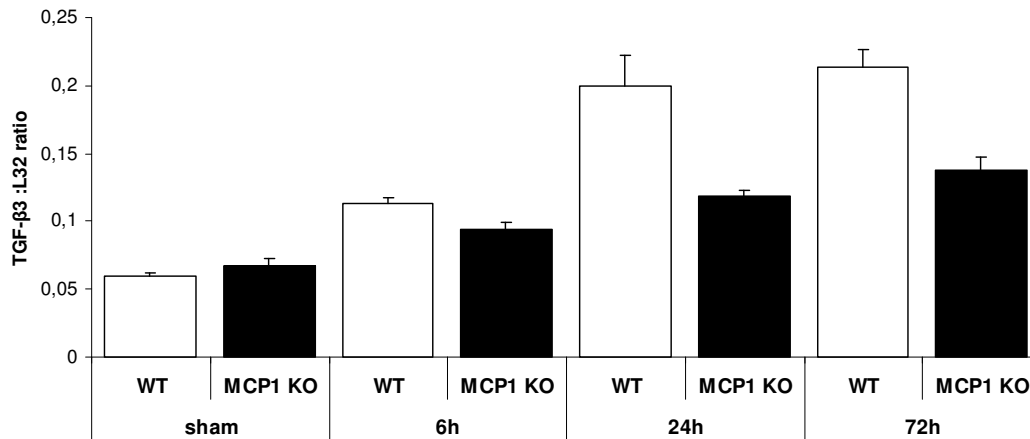


Diagramm 10: TGF- β 3-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

Osteopontin-mRNA-Expression

Diagramm 11 verdeutlicht, dass bei den WT-Mäusen die Synthese von OPN-mRNA innerhalb von 72 Stunden auf das 47-fache des Ausgangspunktes angestiegen ist ($p < 0,001$). Über die verschiedenen Zeiträume verteilt zeigte sich eine kontinuierliche Steigerung. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen war in den ersten 24 Stunden nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Synthese zu verzeichnen. Besonders auffällig war dieser Expressionsunterschied nach 24 Stunden Reperfusion ($p < 0,01$, WT vs. MCP-1^{-/-}). Zu diesem Zeitpunkt haben die Knock-Out-Tiere 3,8-mal weniger OPN synthetisiert als die WT-Mäuse. Nach 72 Stunden Reperfusion wurde bei den MCP-1-defizienten Tieren sprunghaft ein ähnliches OPN-mRNA-Level erreicht wie bei den WT-Mäusen. Dies ist gegenüber dem sham-Level der MCP-1^{-/-}-Mäuse eine 17-fache Steigerung ($p < 0,001$).

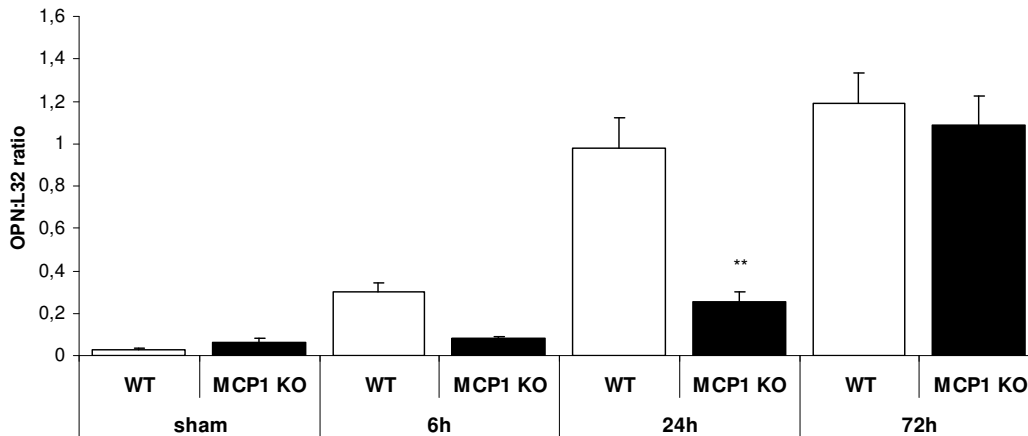


Diagramm 11: OPN-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.5 Chemokin-Expression

Als Untergruppe der Zytokine wurde in dieser Studie auch die Expression einiger ausgewählter Chemokine in Herzen mit Myokardinfarkt untersucht.

3.5.1 MIP-1 α und MIP-1 β -mRNA-Expression

MIP-1 α und MIP-1 β sind Mitglieder der CC-Chemokin-Gruppe. Sowohl MIP-1 α - als auch MIP-1 β -mRNA wurden nach 6 Stunden Reperfusion stark vermehrt synthetisiert. Diagramm 12 lässt erkennen, dass bei den WT-Mäusen 6 Stunden nach dem Infarkt ein Anstieg der MIP-1 α -mRNA-Expression um das 18-fache des sham-Wertes stattgefunden hat ($p < 0,01$). Auch die MIP-1 α -m-RNA-Expression bei den MCP1^{-/-}-Tieren stieg zum selben Zeitpunkt auf vergleichbar hohe Werte an ($p < 0,05$ vs. sham). Schon nach 24 Stunden Reperfusion wurde in beiden Gruppen kaum noch erhöht MIP-1 α -mRNA exprimiert.

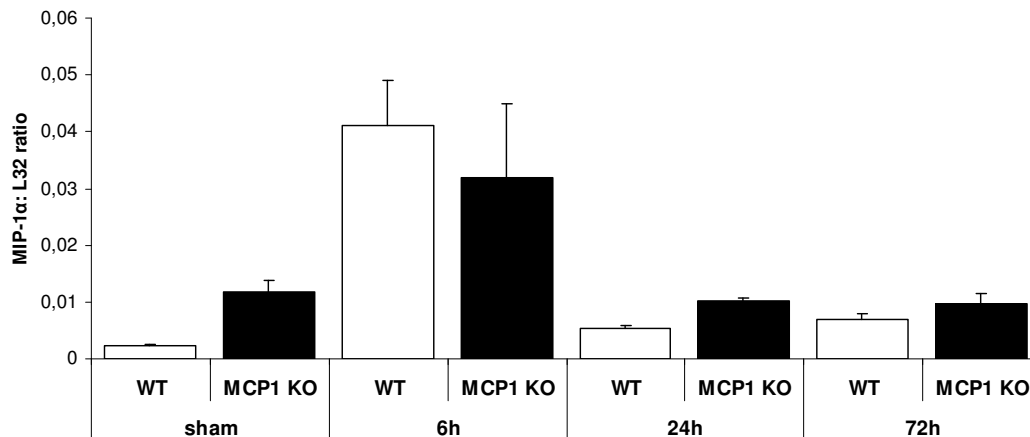


Diagramm 12: MIP-1 α -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

Wie in Diagramm 13 deutlich wird, stieg die MIP-1 β -mRNA-Expression bei den WT-Mäusen 6 Stunden nach dem Infarkt gegenüber den sham-Mäusen um das 28,7-

fache an ($p < 0,001$). Die Steigerung bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen betrug nur das 5,5-fache ($p < 0,001$). In den sham-MCP-1^{-/-}-Mäusen wurde signifikant ($p < 0,001$) mehr MIP-1 β -mRNA synthetisiert als bei den sham-WT-Mäusen. Auch bei MIP-1 β sank die erhöhte mRNA-Konzentration in beiden Mäusegruppen bereits 24 Stunden nach dem Infarkt wieder zurück auf das Ausgangsniveau.

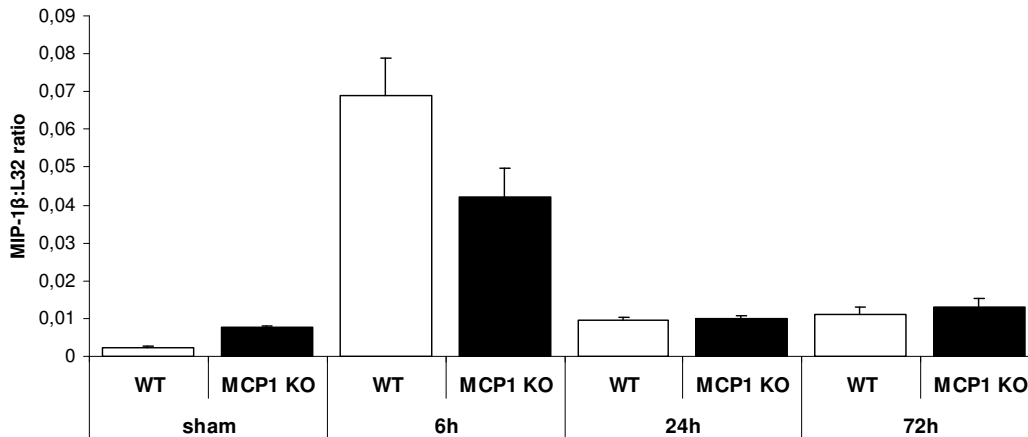


Diagramm 13: MIP-1 β -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.5.2 MIP-2-mRNA-Expression

Auch bei der mRNA-Expression von MIP-2 war eine deutliche Steigerung der Synthese nach 6 Stunden Reperfusion zu beobachten. So war zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Chemokin-Expression bei den WT-Tieren um den 50-fachen Wert nachzuweisen ($p < 0,01$ vs. sham). Bei den MCP-1-defizienten Tieren hingegen war ebenfalls eine deutlich vermehrte Synthese nachzuvollziehen, jedoch nur 10-fach im Vergleich zu den sham-Tieren ($p < 0,05$ vs. sham). Insgesamt betrachtet war die Expression nach 6 Stunden Reperfusion zwischen WT- und MCP^{-/-}-Tieren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. In beiden Mäusegruppen fiel die MIP-2-mRNA-Expression bereits nach 24 Stunden Reperfusion auf den Ausgangswert zurück.

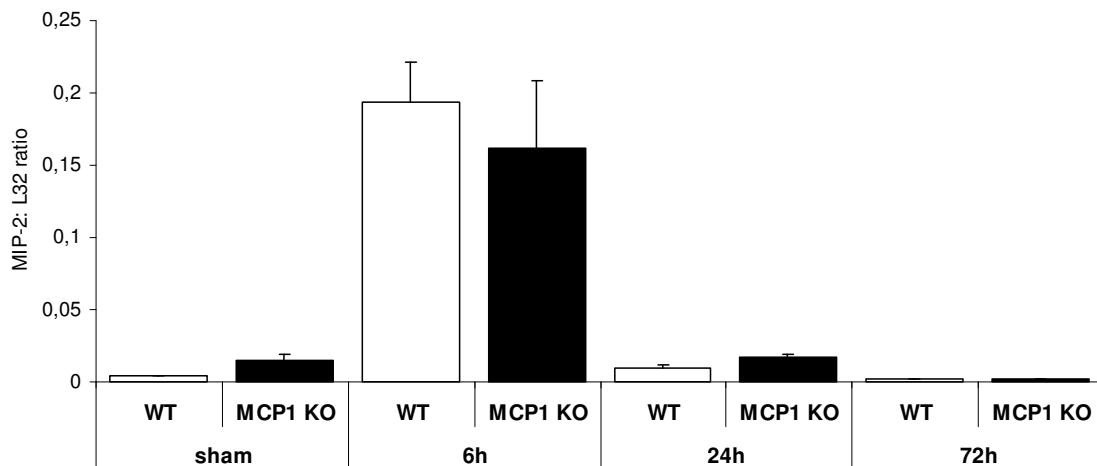


Diagramm 14: MIP-2-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion

3.6 Auswirkung von MCP-1 auf das Remodeling und die Herzform

Mit der Ellipsoid-Methode kann ein Eindruck über die Auswirkungen des Myokardinfarktes auf das enddiastolische Volumen des Herzens nach dem Infarkt gewonnen werden.

Bei diesem Experiment wurden nur Mäuse ausgewertet, die einen ausreichend großen Infarkt erlitten hatten (mindestens 5% des gesamten Myokardgewebes). Bei den WT-Mäusen und MCP-1-defizienten Tieren fand sich im Durchschnitt ein ähnlich großes geschädigtes Areal (WT, $8,9\% \pm 1,14$, versus MCP-1^{-/-}, $8,6\% \pm 1,44$; $p=NS$). Der enddiastolische Durchmesser in seiner maximalen Ausweitung (LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser) zeigte bei den WT-Tieren eine signifikante Dilatation im Vergleich zu den MCP-1^{-/-}-Tieren (WT, $4,26 \pm 0,2$ mm versus MCP-1^{-/-}, $3,74 \pm 0,15$ mm; $p=0,05$). Ebenfalls zeigte sich ein Trend zu einem verminderten enddiastolischen Volumen (LVEDV: linksventrikuläres enddiastolisches Volumen) bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (WT, $68,7 \pm 7,1$ mm³ versus MCP-1^{-/-}, $50,2 \pm 7$ mm³; $p=0,09$).

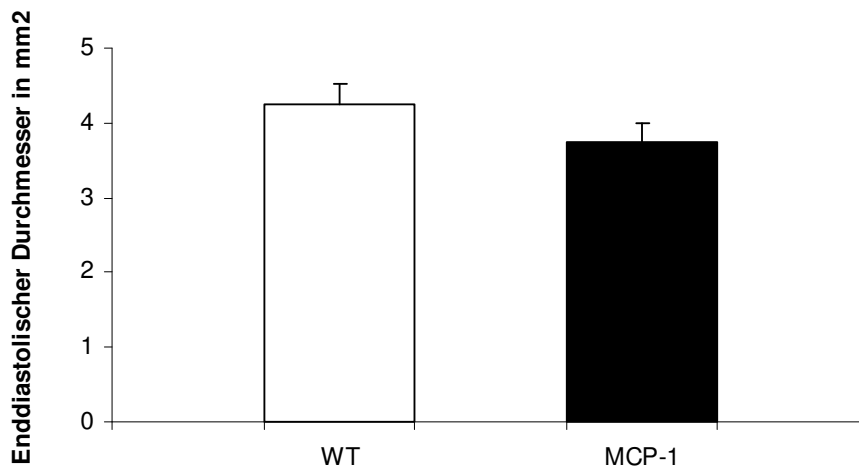


Diagramm 15: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser nach 7 Tagen Reperfusion

4 Diskussion

Die Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI) lag selbst mit modernsten Behandlungsmethoden in Deutschland 2003 noch bei 7,5% (Statistisches Bundesamt, 2004). Durch die Reperfusionstherapie wurden bereits wichtige klinische Erfolge erzielt, durch die die Ausweitung des Infarktgebietes drastisch eingeschränkt und somit die Überlebensrate von Patienten mit akutem Myokardinfarkt deutlich gesteigert wurde. Dennoch sind bis heute Reperfusionsschäden nach AMI ein wichtiges, weitgehend ungeklärtes Problem. Diese Schäden nach Reperfusion haben direkten Einfluss auf das kardiale Remodeling und die langfristige Pumpfunktion des Herzens.

Kardiales Remodeling kann als physiologischer und pathologischer Zustand nach einem AMI auftreten. Dabei durchläuft das geschädigte Herzgewebe einen Prozess der reparativen Fibrose und wird durch Narbengewebe ersetzt. Die spätere kardiale Funktion ist dabei abhängig von der Menge des überlebenden Myokardgewebes und der Lokalisation des Schadens (Fishbein et al., 1978a; Pfeffer et al., 1979), wobei ein großer AMI häufig zur ventrikulären Dilatation und daraus resultierenden Herzinsuffizienz führen kann. Remodeling umfasst eine Vielzahl von zellulären Veränderungen, die eine Myozytenhypertrophie, Nekrose (Tan et al., 1991), Apoptose (Olivetti et al., 1997; Sharov et al., 1996; Teiger et al., 1996), Ersatzfibrose (Anderson et al., 1979), eine erhöhte Ablagerung von fibrillärem Kollagen (Weber et al., 1990) und eine Fibroblastenproliferation (Villarreal et al., 1993) umfassen. Dabei ist zu beachten, dass ein verheilter Infarkt nicht nur ein azelluläres Gewebe ist, sondern aus fibrillären Kollagen besteht und einen metabolisch aktiven Zellverband darstellt.

Beim Menschen wurde nachgewiesen, dass die Größe der Infarktnarbe mit der Ausdehnung des späteren Remodeling-Prozesses einhergeht. Einen Monat nach einem ischämischen Insult weisen ausgedehnte Infarkte eine größere Dilatation und vermehrt Merkmale von systolischen und diastolischen Stresserscheinungen auf als kleinere Infarkte (Anversa und Capasso, 1991). Nach einem Infarkt nimmt das enddiastolische Volumen durch eine progressive Dilatation des Herzens ständig zu und die Ejektionsfraktion nimmt proportional dazu ab, was zu einer terminalen Herzinsuffizienz

und daraus resultierender steigender Mortalität führen kann (Gaudron et al., 1993; White et al., 1987). In dieser Arbeit wurde die Dilatation des Herzens sieben Tage nach Infarkt und Reperfusion untersucht. Dabei war der enddiastolische Durchmesser, bei nahezu identischer Infarktgröße, bei den MCP-1-defizienten Tieren signifikant geringer. Dies kann auf einen gestörten bzw. verzögerten Remodelingprozess bei MCP-1^{-/-}-Mäusen zurückgeführt werden, der wahrscheinlich durch die Suppression von proinflammatorischen Zytokinen, verminderte Makrophagenaktivierung und gestörte Myofibroblastenfunktion verursacht wird.

Der Remodelingprozess wird vorwiegend durch die Myofibroblastenfunktion beeinflusst, die die zelluläre Basis für die kontinuierliche Kollagenproduktion und damit für die Fibrose bilden (Cleutjens et al., 1995). Myofibroblasten produzieren die extrazellulären Matrixbestandteile, die für das Wachstum innerhalb der Zellen und für die neu wachsenden Gefäße benötigt werden (Gailit und Clark, 1994). Bei den Myofibroblasten handelt es sich um α -SMAc und Vimetin-positive Zellen (Frangogiannis et al., 2000b), die zur aktiven Proliferation fähig sind und dabei die wichtigsten kollagenbildenden Zellen im heilenden Myokardinfarkt darstellen. Myofibroblasten spielen durch die Bildung eines Granulationsgewebes (Darby et al., 1990) eine Rolle in der Wundheilung und werden apoptotisch, wenn die Narbe reift (Desmouliere et al., 1995).

Das Vorkommen der Myofibroblasten im reperfundierten Herz nach 72 Stunden Reperfusion ist in dieser Studie bei MCP-1^{-/-}-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen deutlich verzögert. Dies deutet darauf hin, dass MCP-1 einen Einfluss auf den Fibroblasten-Metabolismus hat und somit auch auf die Ablagerung von Kollagen.

MCP-1 verstärkt durch eine endogene Stimulation die TGF- β -Synthese (Gharaee-Kermani et al., 1996). Die Produktion von TGF- β wiederum kann die Kollagen-Expression durch einen autokrinen Mechanismus aktivieren. TGF- β ist ein fibrotisch wirkendes Zytokin, das den Reparationsprozess des Gewebes beeinflusst (Thompson et al., 1988). Es scheint weiterhin eine wichtige Rolle in der Myofibroblasten-Differenzierung zu übernehmen, indem es die α SMAc-Regulation dieser Zellen beeinflusst (Desmouliere et al., 1993). Somit hat MCP-1 sowohl auf indirektem Wege

über die Stimulation von TGF- β als auch auf direktem Weg über die Beeinflussung des Fibroblastenmetabolismus einen Einfluss auf die Narbenbildung.

In der vorliegenden Studie wurde eine verzögerte Induktion in der TGF- β -mRNA-Expression in MCP-1^{-/-}-Mäusen gefunden. Da die Makrophagen wichtige TGF- β produzierende Zellen sind, kann dieser Befund durch die signifikant geringere Makrophageninfiltration im ischämischen Bereich und daraus resultierender geringerer Makrophagenaktivität zum Teil erklärt werden. Eine weitere Erklärung bietet auch das verzögerte Vorkommen von Myofibroblasten in MCP-1^{-/-}-Mäusen, die ebenso viel TGF- β während des Remodeling produzieren. Die insgesamt geringere Expression der TGF- β 3-Isoform unterstreicht dies, insbesondere in Bezug auf die verminderte Fibrose bei den Tieren. Die spätere Ausbildung von Granulationsgewebe und das damit verzögerte Remodeling können durch die oben erklärten Mechanismen verursacht werden, obwohl diese nur eine von verschiedenen beschriebenen Signalkaskaden ist.

MCP-1-mRNA wird kontinuierlich in geringer Konzentration im Myokard synthetisiert. Es scheint aber eine wichtige Rolle bei Reperfusionsverletzungen nach AMI zu spielen. Matsumori konnte in einer klinischen Studie eine Steigerung der Serumkonzentration von MCP-1 bereits drei Stunden nach Auftreten der ersten Brustschmerzen nachweisen. Nach sechs Stunden hat die Expression von MCP-1 ihren Scheitelpunkt erreicht und sinkt anschließend wieder ab (Matsumori et al., 1997). Auch tierexperimentell wurde nachgewiesen, dass eine zum Infarkt führende Ischämie und anschließende Reperfusion zur transienten Erhöhung der MCP-1-mRNA-Expression führt (Ono et al., 1999). Bei fehlender Reperfusion indessen wurde in einem Hundemodell nach einer Ischämie keine signifikante Induktion von MCP-1 gefunden (Kumar et al., 1997). Das lässt darauf schließen, dass die MCP-1-Induktion von der Reperfusion abhängig ist.

Die in dieser Studie erhobenen Daten lassen nach reperfundiertem Myokardinfarkt eine verminderte inflammatorische Reaktion der MCP-1^{-/-}-Mäuse im Vergleich mit den WT-Mäusen erkennen. Dabei infiltrieren zuerst neutrophile Granulozyten, die primär für die Reperfusionsverletzung verantwortlich gemacht werden, in das geschädigte Gewebe (Hawkins et al., 1996). Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten war bei den hier erhobenen Daten zwischen den beiden Mäusestämmen

ähnlich. Dies kann durch die vergleichbare Expression von MIP-2, dem potentesten Chemoattraktor für diese Zellen, begründet werden.

Zeitlich verzögert migrieren anschließend Monozyten/Makrophagen in das reperfundierte Areal (Birdsall et al., 1997; Morita et al., 1993). Monozyten/Makrophagen werden durch variable immunologische Faktoren zu einem Entzündungsherd gelockt. Ein wichtiger chemotaktischer Faktor für die Makrophagen ist dabei MCP-1, das praktisch in allen Zellen synthetisiert und dessen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-1, TNF- α und anderen, induziert wird (Liebler et al., 1994; Takahashi et al., 1995).

In der vorliegenden Studie migrierten die Makrophagen deutlich verspätet in den Infarktbereich und verweilten dafür länger im geschädigten Gewebe der MCP-1-defizienten Mäuse. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass MCP-1 einen direkten Einfluss auf Migration von Makrophagen und anderen Zellen ins reperfundierte Herzgewebe besitzt und ein Schlüsselfaktor bei der Reperfusionsschädigung ist.

Makrophagen spielen eine fundamentale Rolle in der Initialisierung, Amplifizierung, Orchestrierung und Auslösung einer inflammatorischen Reaktion (Smith et al., 2001). Aus diesen Gründen und aufgrund der verspäteten Migration der Makrophagen verläuft die Entzündungsreaktion bei MCP-1^{-/-}-Mäusen abgeschwächt und verzögert. Proinflammatorische Zytokine werden bei MCP-1^{-/-}-Mäusen nach dem Infarkt deutlich vermindert synthetisiert, darunter sind sowohl IL-6, IL-1 β als auch TNF- α Zytokine, die von Monozyten/Makrophagen nach einem Schlüsselreiz exprimiert werden. Bei verminderter Makrophagenimmigration kommt es somit auch zu verminderter Synthese dieser proinflammatorischen Mediatoren, durch die die Entzündungsreaktion in den MCP-1^{-/-}-Mäusen deutlich abgeschwächt wird.

Antiinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-10, werden bei MCP-1^{-/-}-Mäusen reduziert und verzögert exprimiert. IL-10 ist ein potenter Inhibitor von proinflammatorischen, von Monozyten/Makrophagen synthetisierten, Zytokinen und es unterdrückt die Sekretion von TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 α und MIP-1 β . Das Zytokin IL-10 wird unter anderem von Monozyten und B-Zellen exprimiert (Oppenheim und Feldman, 2001) und hat dabei dominierend supprimierende Effekte auf die

Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die von den Monozyten und Neutrophilen synthetisiert werden. Weiterhin reguliert IL-10 die Expression von aktivierenden und ko-stimulierenden Molekülen, die Einfluss auf Monozyten und dendritische Zellen haben. Deswegen kann IL-10 auch als Makrophagen-deaktivierender Faktor charakterisiert werden (Appella et al., 1990). Da MCP-1 einen starken Einfluss auf Monozyten/Makrophagen ausübt, war auch der Einfluss auf IL-10 von Interesse. Die Synthese des Interleukins ist bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen verzögert. Dies kann auf zwei unterschiedlichen Ursachen beruhen. Zum einen verläuft bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen die inflammatorische Reaktion generell reduziert ab, so dass durch die niedrige Konzentration bestimmter Faktoren die Aktivierung von IL-10 niedriger ausfällt. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass durch die verzögerte, verminderte Aktivierung der Makrophagen ein möglicher Aktivierungsfaktor von IL-10 fehlt und deswegen die Expression dieses Zytokins im Vergleich zu den WT-Mäusen verzögert ist. Dafür spräche auch der hohe Anstieg der IL-10-Expression bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen nach sieben Tagen Reperfusion. Nach diesem Zeitraum wurden die Makrophagen letztendlich doch noch adäquat aktiviert und haben somit für IL-10 einen entsprechenden Stimulus gegeben, der gesteigerten Entzündungsreaktion entgegenzuwirken. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen vermindert und die Synthese von antiinflammatorischen Zytokinen verzögert auftritt.

Der F4/80-Antikörper, der in dieser Studie verwendet wurde, detektiert nahezu alle Monozyten und Makrophagen unabhängig von ihrem Aktivitätszustand. Es lässt sich also nicht direkt eine Aussage über die Funktionalität der detektierten Makrophagen treffen. Makrophagen können sich selbst, sich gegenseitig oder andere Zellen beeinflussen, indem sie MCP-1 innerhalb weniger Stunden nach der Reperfusion synthetisieren (Kakio et al., 2000). Makrophagen können durch MCP-1 über die Freisetzung von lysosomalen Enzymen und durch die Produktion von aktivierten Sauerstoffradikalen stimuliert werden (Furie und Randolph, 1995). Es ist also möglich, dass nicht nur die Rekrutierung der Makrophagen, sondern auch ihre Aktivierung durch das Fehlen von MCP-1 beeinflusst wird. Die Anwesenheit einer gesteigerten Anzahl von Makrophagen in MCP-1^{-/-}-Mäusen, in denen die sonstige Wundheilung gestört ist, zeigt

auch, dass nicht nur die Präsenz, sondern auch die adäquate Aktivität dieser Zellen ein wichtiger Faktor für den Verlauf der Wundheilung ist (Martin, 1997; Sunderkotter et al., 1994). Die verzögerte Wundheilung, trotz der Anwesenheit von Makrophagen, könnte durch eine verspätete Aktivierung, Rekrutierung oder eine behinderte Funktion der Makrophagen erklärt werden. Aktiviert bedeutet in diesem Fall, dass die Zellgröße zunimmt, die Zellen mehr lysosomale Enzyme produzieren, einen aktiveren Metabolismus aufbauen und eine größere Fähigkeit besitzen, phagozytierte Bestandteile zu verdauen.

Die Aktivierung von Makrophagen durch MCP-1 besteht mindestens aus zwei Phasen: einerseits einer kurzlebigen Phase, in der das zytosolische Kalzium erhöht, das Aktin polymerisiert und β 2-Integrine verstärkt synthetisiert werden. Durch diese Veränderungen wird die Zellmigration und eine feste Bindung an endothelialen Gegenrezeptoren ermöglicht (Gu et al., 1999; Rollins, 1997). Zum anderen wird in der langandauernden Phase der „*procoagulant initiator tissue factor*“ und das Interzelluläre-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) in Makrophagen sowie in Zellen, die positiv für Aktin der glatten Muskelzellen sind, exprimiert. Weiterhin werden in dieser Phase reaktive Sauerstoffradikale freigesetzt (Gu et al., 1999; Ikeda et al., 1993). In summa initiieren diese Effekte einen großen Schritt in einen aktivierten Zustand der Makrophagen und die Relevanz der unspezifischen Immunantwort wird durch die Fähigkeit von MCP-1, Makrophagen zu rekrutieren und zu aktivieren, erhöht. Die letzte Schlussfolgerung wurde durch Resultate an MCP-1 überexprimierenden Mäusen (Fuentes et al., 1995; Grewal et al., 1997; Kolattukudy et al., 1998) und an MCP-1^{-/-}-Mäusen (Rollins, 1996) nachgewiesen. Weitere Unterstützung bekommt diese These durch eine Studie mit MCP-1 blockierenden-Antikörpern (Jones et al., 1992).

Die Abwesenheit von MCP-1 kann einen Einfluss auf den Aktivitätszustand der Makrophagen haben. Darauf deuten auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie hin. Viele der durch Makrophagen synthetisierten Zytokine werden vermindert und/oder verzögert exprimiert. Die makrophagenspezifischen Aufgaben, wie zum Beispiel die Phagozytose, wurden nur unzureichend ausgeführt. So waren nach drei Tagen Reperfusion immer noch nekrotische Myozyten im infarzierten Bereich nachweisbar. MCP-1 scheint somit einen Einfluss auf den Aktivitätszustand der Makrophagen auszuüben, der wahrscheinlich über eine spätere Th2-Polarisation vermittelt wird.

Aber auch die erfolgreiche Makrophagenrekrutierung und –aktivierung ist kritisch zu betrachten. Lange wurde sie als das Nonplusultra in der Wundheilung angesehen. Ferguson zeigte 1996, dass auch bei einer geringen Anzahl von immigrierten Makrophagen und einer verminderten inflammatorischen Reaktion Wunden gut abheilen (Ferguson et al., 1996). Obwohl Makrophagen nachweislich förderlich zur Abwehr von Mikroorganismen sind, können sie durch eine verlängerte und dysregulierte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, aktivierten Sauerstoffradikalen und NO zur Autotoxizität beitragen und eine verzögerte Heilung verursachen (Smith et al., 2001). Überschießende Inflammation und/oder proteolytische Aktivität führen zu verzögerten oder chronischen Wundheilungsprozessen, die zu einer signifikanten Steigerung der Morbidität oder sogar Mortalität führen können.

Am marktantesten trat in einer Studie von Low die Wundheilungsstörung nach drei Tagen Reperfusion in Augenschein. Dort wurde die Reepithalisierung, die Angiogenese und die Kollagenablagerung nach drei Tagen Reperfusion als signifikant verzögert beschrieben (Low et al., 2001). Dies hat sich mit den in dieser Studie erhobenen Ergebnissen bestätigen lassen. Bei WT-Mäusen sind nach drei Tagen Reperfusion fast alle geschädigten Myozyten abgeräumt worden und es hat sich ein massives inflammatorisches Infiltrat gezeigt. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen waren die geschädigten Myozyten nach drei Tagen Reperfusion zu großen Teilen noch nicht phagozytiert. Im Granulationsgewebe befand sich außerdem ein reichliches zelluläres Infiltrat in dem ein besonders hoher Anteil von Makrophagen nachzuweisen war. Nach sieben Tagen Reperfusion zeigen Infarkte in WT-Mäusen eine Verdünnung und eine verminderte zelluläre Infiltration. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen hingegen hatte sich zwar bereits eine Narbe ausgebildet, diese war allerdings noch nicht vollständig organisiert. Die Wundheilung ist bei MCP-1^{-/-}-Mäusen damit durch die spätere Rekrutierung und Aktivierung der Makrophagen deutlich verzögert.

Auch das Zytokin Osteopontin (OPN) wird in Abwesenheit von funktionalem MCP-1 deutlich verändert synthetisiert. OPN ist ein extrazelluläres Matrixprotein und beeinflusst aber auch die Akkumulation von Zellen im entzündeten Gewebe. Es kann auch die Migration von Makrophagen und glatten Muskelzellen aktivieren. OPN wird weiterhin als ein Marker für Makrophagenmaturation angesehen (Frangogiannis et al., 1998; Krause

et al., 1996), der vermutlich Einfluss auf die Migration und Funktion von Makrophagen ausübt (Giachelli et al., 1998). In dieser Studie wurde OPN deutlich verzögert synthetisiert. Insbesondere nach 24 Stunden Reperfusion war ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen auszumachen. Da OPN zwar von Makrophagen, aber auch von verschiedenen anderen Zelltypen, darunter Fibroblasten, Kardiomyozyten und Endothelzellen exprimiert wird, ist diese verzögerte Expression nicht allein durch die verspätete Immigration der Monozyten zu erklären. Es könnte also sein, dass MCP-1 eine direkte Rolle in der Induktion von OPN ausübt.

Die gesteigerte Expression von MIP-1 α und MIP-1 β kompensiert zum Teil die gestörte Aktivierung der Makrophagen, die durch die Abwesenheit von MCP-1 ausgelöst wurde. MIP-1 α und MIP-1 β wurden *in vitro* als potente Chemokine für Makrophagen und Lymphozyten erkannt (Rollins, 1997). Antikörperneutralisierungs- und Gen-Deletions-Studien haben in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen, dass MIP-1 α und MIP-1 β auch *in vivo* eine zentrale Rolle als Lockstoffe für Monozyten und Lymphozyten in die Peripherie und in das zentrale Nervensystem spielen (DiPietro et al., 1998; Locati und Murphy, 1999). Durch einen autokrinen Mechanismus moduliert MIP-1 α , aber nicht MIP-1 β , den Aktivierungsstatus von Makrophagen. Die Behandlung von Makrophagen mit MIP-1 α in Mäusen stimuliert die Synthese von Zytokinen (TNF- α , IL- 1) und fördert die Tumoraktivität (Fahey et al., 1992).

In der vorliegenden Studie liegt die Expression von MIP-1 α und MIP-1 β bei den MCP-1^{-/-}-Kontrollmäusen signifikant höher als bei den WT-Mäusen. Dies deutet auf eine kompensatorische homöostatische Expression von MIP-1 α und MIP-1 β aufgrund des MCP-1-Mangels hin. Nach Ischämie und Reperfusion werden MIP-1 α und MIP-1 β bei den Knock-Out Mäusen allerdings nicht erhöht exprimiert. Beide Chemokine werden 6 Stunden nach dem Infarkt um ein Vielfaches vermehrt ausgeschüttet, aber es war kein signifikanter Unterschied zwischen den WT und MCP-1-defizienten Mäusen nachzuweisen. Dies könnte auf weitere, noch nicht geklärte Mechanismen in der Chemokininduktion bei pathologischen Zuständen zurückgeführt oder durch andere, in dieser Studie nicht untersuchte Mediatoren (freie sauerstoffradikal-abhängige Enzyme), mitverursacht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden neben den hier dargestellten Ergebnissen zu den inflammatorischen Mediatoren auch die Expression der Angiogenesefaktoren untersucht (Heil et al., 2004). Die Bildung von neuen Blutgefäßen ist entscheidend für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des heilenden Infarktgewebes. In einem Mäusemodell der permanenten Okklusion ohne Reperfusion der Arteria femoralis zeigte die Gruppe um W. Schaper eine Abhängigkeit der Angiogenese von der Anwesenheit von MCP-1. Sie ist abhängig von einer komplexen Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix, Endothelzellen und Perizyten, die durch eine Balancierung zwischen angiogenetischen, wie z.B. dem „*vascular-endothelial-growth-factor*“ (VEGF) (Hashimoto et al., 1994; Li et al., 1996) und angiostatischen Faktoren, wie dem „*Interferon- γ -inducible-Protein-10*“ (IP-10), entsteht (Carmeliet, 2000; Carmeliet und Jain, 2000). Insbesondere die CXC-Gruppe der Chemokine spielt eine wichtige Rolle in der Neosynthese von Gefäßen (Strieter et al., 1995a; Strieter et al., 1995b). MCP-1 ist ein direkter Mediator der Angiogenese. Es sorgt für die Expression von CCR2-Rezeptoren durch Endothelzellen und hat somit auch Einfluss auf die Gefäßbildung in der Wundheilung (Frangogiannis, 2004; Salcedo et al., 2000; Weber et al., 1999). Weiterhin zeigen MCP-1^{-/-}-Mäuse eine verspätete Bildung von Gefäßen in der Wunde mit einer geringeren kapillaren Dichte als Kontrolltiere (Low et al., 2001).

In den hier vorgestellten Experimenten konnten keine signifikanten Unterschiede in der Neoangiogenese zwischen MCP-1^{-/-}- und WT-Mäusen evaluiert werden. Zwar hat sich eine deutlich verminderte vaskuläre Dichte im Infarktbereich bestätigen lassen, jedoch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen zu erkennen. Allerdings zeigen die in dieser Studie untersuchten MCP-1^{-/-}-Mäuse einen verminderten Anteil an reifen Gefäßen im Vergleich zu den WT-Tieren. Die Methode der Quantifizierung mit CD31 sollte allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da die Färbequalität in den einzelnen Präparaten eingeschränkt war. Die Ergebnisse in den einzelnen Gruppen waren zwar variabel und somit nicht signifikant, haben aber eine Tendenz angezeigt. So konnten die vorliegenden Daten die in früheren Studien gezeigten Ergebnisse, das heißt eine verminderte und gestörte Angiogenese in der Abwesenheit von MCP-1, nur zum Teil bestätigen. Der Grund dafür sind neben den methodischen Unterschieden vielmehr die Tatsache, dass in dieser Studie der Infarkt reperfundiert wurde.

Bei der Übertragbarkeit der vorliegenden Studie auf das menschliche Herz müssen verschiedene Faktoren beachtet werden. Vorhergehende Untersuchungen haben signifikante Unterschiede in der inflammatorischen Antwort zwischen Mäusen und höheren Säugetieren herausgearbeitet (Dewald et al., 2004). Die Beschaffenheit von Chemokinen und das Verhalten der unterschiedlichen inflammatorischen Zellen unterscheidet sich teilweise deutlich zwischen den einzelnen Arten (Birmingham et al., 2001; Modi und Yoshimura, 1999). So wurde zum Beispiel die Ablagerung von Kollagen bei der Wundheilung zwischen Ratten und Hunden verglichen und dabei nachgewiesen, dass Ratteninfarkte schneller heilen, dabei aber auch weniger Kollagen in dem geschädigten Gewebe abgelagert werden (Jugdutt et al., 1996). In einer anderen Studie wurde die zytokin-induzierte Expression von Selektin zwischen Mäusen und Primaten verglichen (Yao et al., 1999). Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die inflammatorische Antwort nach einem Infarkt bei Mäusen einige wesentliche Gesichtspunkte aufweist, die auch bei höheren Säugetieren nachgewiesen werden (Dewald et al., 2004). Die Heilung verläuft allerdings bei Mäusen wesentlich rascher und mit einer stärkeren zellulären Infiltration als zum Beispiel bei Hunden. Weiterhin finden sich bei heilenden Mäuseinfarkten keine Mastzellen. Diese Unterschiede sollten bei dem Versuch, die gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen, unbedingt beachtet werden. Mäuse können heutzutage gentechnisch verändert werden und bieten sich somit an, um die Auswirkungen von spezifischen Genen (hier MCP-1) auf den Heilungsprozess zu untersuchen.

MCP-1 spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung nach reperfundiertem Myokardinfarkt. Eine MCP-1-Defizienz verzögert die Makrophageninfiltration, depriviert den Aktivitätszustand der Makrophagen und sorgt somit für eine protrahierte Heilung und eine verzögerte Abräumung der Kardiomyozyten und eine verzögerte Differenzierung der Fibroblasten. Weiterhin ist die Expression von proinflammatorischen Zytokinen depriviert und die Synthese der Zytokine mit antiinflammatorischen Effekt merklich verzögert. Das Granulationsgewebe wird bei MCP-1^{-/-}-Tieren erst deutlich verspätet ausgebildet. Diese doch eher reduzierte inflammatorische Reaktion auf den reperfundierten Myokardinfarkt führt zu einer geringeren ventrikulären Dilatation und somit auch zu einem geringeren enddiastolischen Volumen (Dewald et al., 2005).

Demnach könnte die Modifikation von MCP-1 ein Ansatz zur Reduzierung der inflammatorischen Reaktion und zu einem gezielten Remodeling nach akutem, reperfundiertem Myokardinfarkt sein. Es bleibt aber zu beachten, dass bereits frühere Versuche die inflammatorische Reaktion zu reduzieren unternommen wurden, teilweise jedoch mit katastrophalen Folgen für die teilnehmenden Probanden (Johnson et al., 1953; Libby et al., 1973; Spath et al., 1974). Durch die verzögerte Wundheilung kann es zu proarrhythmogenen Effekten, zu einer Ruptur der Herzwand oder zur Ausbildung eines Aneurysmas kommen. Aus diesem Grund sollte die Strategie der MCP-1-Suppression nach AMI erst noch weitreichender untersucht werden, bevor eine Aussage über ein Therapie-Konzept gemacht werden kann.

5 Zusammenfassung

Die Reperfusion eines Myokardinfarktes führt zu einer Entzündungsreaktion, die eine entscheidende Rolle im Remodeling und in der nachfolgenden Entwicklung der linksventrikulären Dysfunktion spielt. Die Ausdehnung der Entzündungsreaktion wird neben der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auch durch die Induktion von Chemokinen reguliert. Verschiedene Zellen des Immunsystems werden durch Chemokine beeinflusst, darunter ist das CC-Chemokin MCP-1, ein potenter chemotaktischer Faktor für Monozyten und Makrophagen.

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle von MCP-1 im Remodeling nach Reperfusion eines Myokardinfarktes untersucht. Die Myokardischämie und –reperfusion wurde experimentell in einem „closed chest“ Modell an Wildtyp- und MCP-1^{-/-}-Mäusen vorgenommen. Die durch Reperfusion induzierte Infiltration von neutrophilen Granulozyten war vergleichbar zwischen den beiden Mäusestämmen. Nach 24 Stunden zeigten die MCP-1-defizienten Mäuse dagegen eine geringere Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und eine verzögerte Einwanderung von Makrophagen in das ischämische Myokard. Die Phagozytose der geschädigten Kardiomyozyten und die Differenzierung der Myofibroblasten waren dadurch bei MCP-1-defizienten Tieren signifikant verzögert und im Gegensatz zu den Wildtypmäusen war das Granulationsgewebe nach drei Tagen Reperfusion noch nicht vollständig ausgebildet. Die Induktion von antiinflammatorischem IL-10 und den für Fibrose verantwortlichen TGF- β -Isoformen war gleichzeitig reduziert und erreichte das Maximum erst nach sieben Tagen Reperfusion. Die spätere Induktion von Osteopontin, einem Marker der reifen Makrophagen, unterstreicht die verzögerte Narbenbildung bei MCP-1^{-/-} Mäusen. Trotz dieser Effekte zeigten sich keine Unterschiede in der Neoangiogenese oder Infarktausdehnung, während funktionell lediglich eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation bei den MCP-1-defizienten Mäusen beobachtet wurde.

Zusammenfassend hat MCP-1 wichtige Effekte auf die Produktion von Zytokinen, Infiltration und auf die Funktion der Makrophagen sowie auf die Differenzierung von Myofibroblasten im reperfundierten Myokardinfarkt. Die MCP-1-Defizienz führte über eine verlängerte Entzündungsreaktion mit späterer Phagozytose der geschädigten

Kardiomyozyten zur verzögerten Ausbildung von Granulationsgewebe und damit länger andauernden linksventrikulären Remodeling.

6.0 Abbildungen

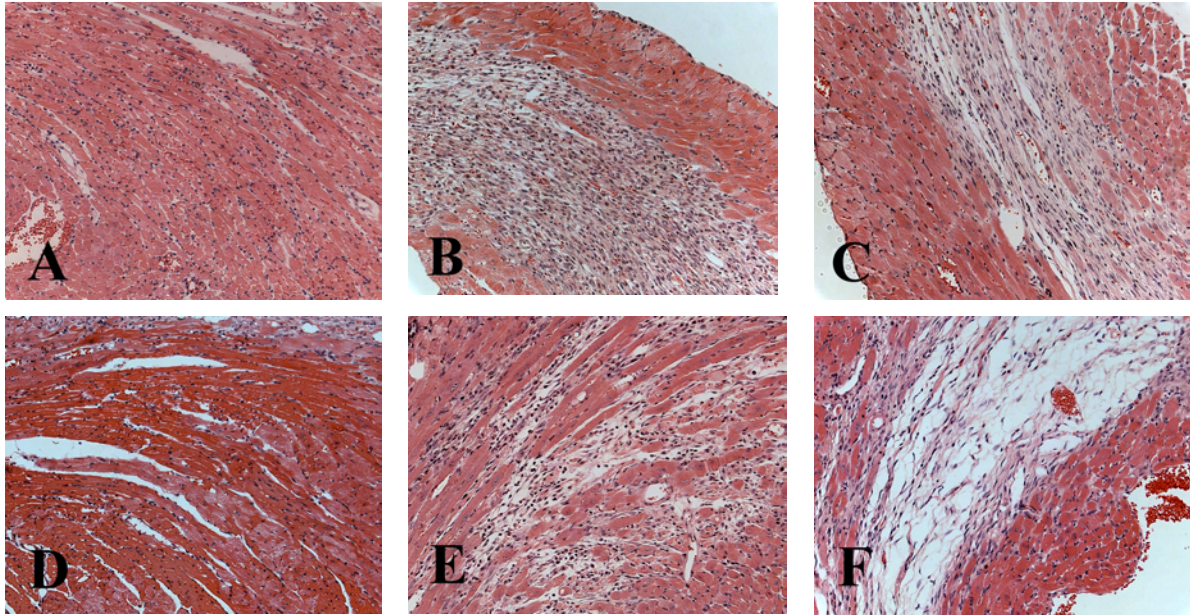


Abbildung 3: Unterschiede im Remodelingprozess nach reperfundiertem Myokardinfarkt zwischen WT- und MCP-1^{-/-}- Mäusen.

Sowohl bei WT- (A) als auch bei MCP-1^{-/-}-Mäusen (D) zeigt sich 24 Stunden nach dem Infarkt eine diffuse Leukozyteninfiltration. Nach drei Tagen Reperfusion hat sich bei den WT-Mäusen (B) ein kompaktes, stark zelluläres Granulationsgewebe gebildet. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (E) hingegen sieht man nach drei Tagen Reperfusion noch deutlich die geschädigten Myozyten im Infarktbereich. Sieben Tage nach dem Infarkt hat sich bei den WT-Tieren (C) ein organisiertes Narbengewebe gebildet, wohingegen bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (F) das Gewebe noch aufgelockert ist.

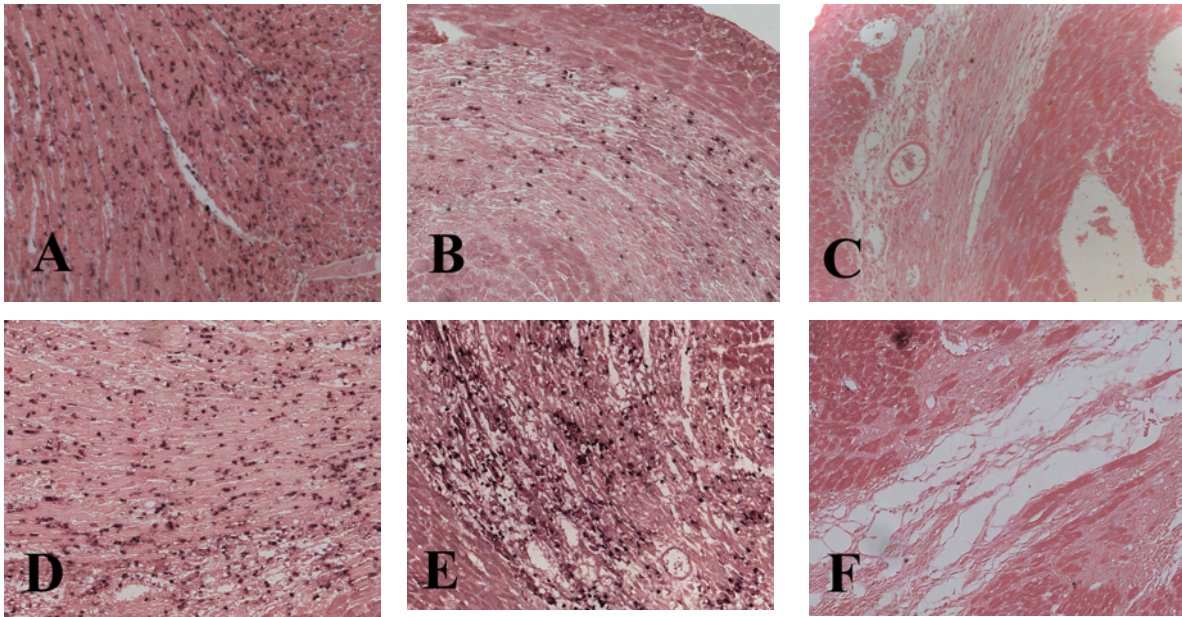


Abbildung 4: Makrophageninfiltration in reperfundierten Myokardinfarkt bei WT- und MCP-1^{-/-}-Mäusen

24 Stunden nach dem Infarkt ist sowohl bei WT- (A) als auch bei MCP-1^{-/-}-Tieren (D) eine hohe Infiltration von Makrophagen zu erkennen. Diese hat nach 3 Tagen Reperfusion bei den WT-Mäusen (B) stark ab-, bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (E) allerdings noch deutlich zugenommen. Nach 7 Tagen (C) haben sich diese Unterschiede wieder ausgeglichen, man sieht bei den MCP-1^{-/-}-Tieren (F) allerdings ein noch nicht organisiertes Narbengewebe.

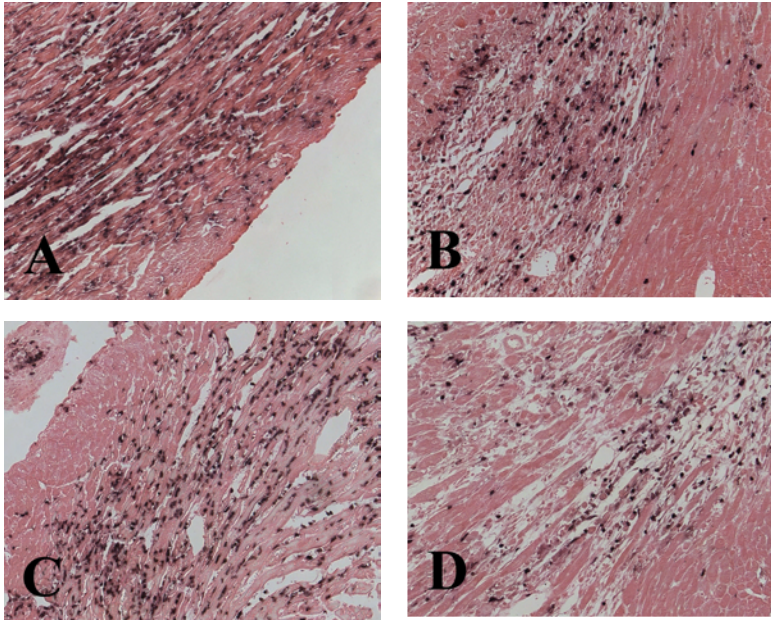


Abb. 5: Neutrophile Granulozyten
 Sowohl bei den WT- (A) als auch bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (C) war nach 24 Stunden Reperfusion eine vergleichbar hohe Anzahl von neutrophilen Granulozyten in das geschädigte Areal migriert. Diese hohe Infiltration hat nach 3 Tagen Reperfusion bei WT- (B) als auch bei MCP-1^{-/-} (D) Mäusen deutlich abgenommen.

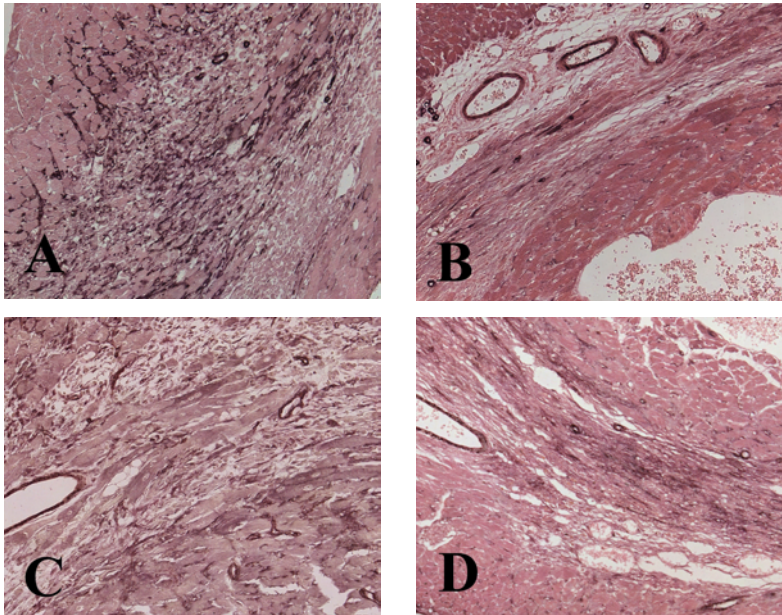


Abb. 6: α SMA

Die Myofibroblasten waren bei den WT-Mäusen (A) 3 Tage nach dem Infarkt zahlreich, während man bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (C) zum selben Zeitpunkt noch geschädigte Kardiomyozyten und nur wenige Myofibroblasten im infarzierten Bereich finden konnte. Nach 7 Tagen Reperfusion waren bei den WT-Tieren (B) keine Myofibroblasten mehr zu finden, wohin gegen bei den MCP-1^{-/-} Mäusen (D) noch immer vereinzelte zu erkennen waren.

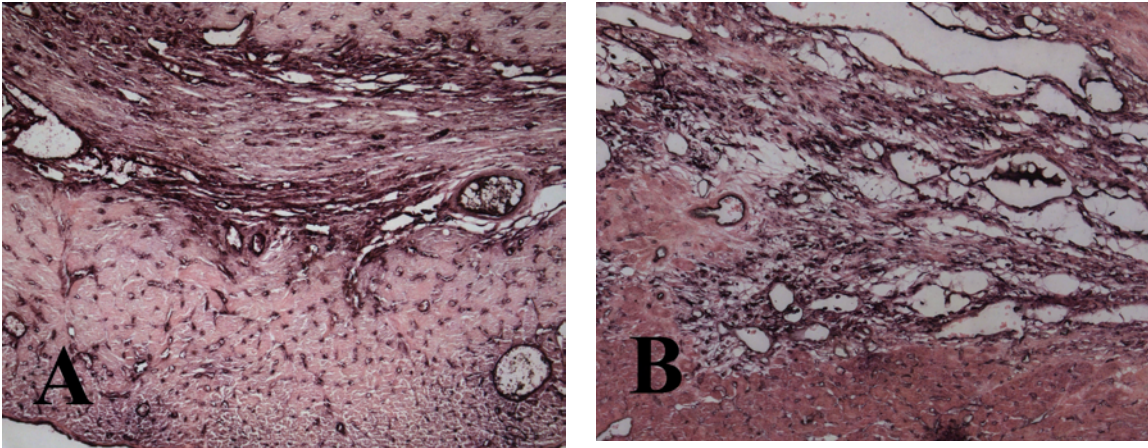


Abbildung 7: Gefäßbildung nach Myokardinfarkt

Bei der Färbung der Endothelien mit CD31 waren keine signifikanten Unterschiede in der Vaskularisierung des infarzierten Gebietes nach 7 Tagen Reperfusion zwischen WT- (A) und MCP-1^{-/-}-Mäusen (B) zu erkennen. Auffällig ist wieder die höhere Organisation des Narbengewebes bei den WT-Tieren (A).

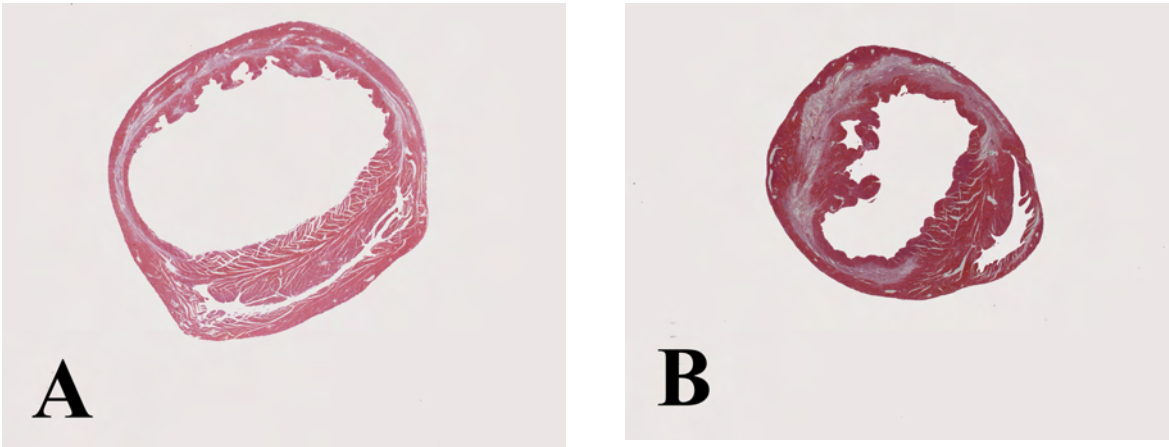


Abbildung 8: Dilatation des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt

Bei den WT-Mäusen (A) ist nach 7 Tagen Reperfusion eindeutig eine hoch organisierte Narbe entstanden, der Ventrikel ist bereits dilatiert. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen (B) hingegen ist die Narbe noch diffus und der Ventrikel zeigt eine verringerte Dilatation.

7 Verzeichnis der Diagramme und Abbildungen

7.1 Abbildungen		Seite
1	Initialoperation	25
2	Versuchsaufbau	27
3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	81
4	F4/80- Färbung: Darstellung der Monozyten/Makrophagen	82
5	Neutrophile Granulozyten	83
6	α SMAc-Färbung: Myofibroblasten und Angiogenese	83
7	CD31-Färbung: Darstellung der Endothelien	84
8	Perfusionsfixierte Herzen: Darstellung der Ventrikeldilatation	84
7.2 Diagramme		Seite
1	Makrophagenimmigration in den infarzierten Bereich	52
2	Neutrophile Granulozyten im infarzierten Bereich	53
3	Kapillardichte im Infarkt- und im Kontrollbereich	55
4	IL-1 β -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	56
5	TNF- α -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	57
6	IL-6-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	58
7	IL-10-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	59
8	TGF- β 1-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	60
9	TGF- β 2-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	61
10	TGF- β 3-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	62
11	OPN-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	63
12	MIP-1 α -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	64
13	MIP-1 β -Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	65
14	MIP-2-Expression nach 6, 24 und 72 Stunden Reperfusion	66
15	LVEDD nach 7 Tagen Reperfusion	67

8 Literaturverzeichnis

1. Abbate A, Biondi-Zoccai GGL, Baldi A, Trani C, Biasucci LM, Vetovec GW. The 'Open-Artery Hypothesis': New Clinical and Pathophysiologic Insights. *Cardiology* 2003; 100: 196-206.
2. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, Abildgaard U, Pedersen F, Madsen JK, Grande P, Villadsen AB, Krusell LR, Haghfelt T, Lomholt P, Husted SE, Vigholt E, Kjaergard HK, Mortensen LS. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 349: 733-742.
3. Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 1979; 128: 79-85.
4. Anversa P, Capasso JM. Cellular basis of aging in the mammalian heart. *Scanning Microsc* 1991; 5: 1065-1073
5. Appella E, Matsushima K, Oppenheim JJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Clore GM, Gronenborn AM. Determination of the primary and secondary structure of NAP-1/IL-8 and a monocyte chemoattractant protein, MCP-1/MCAF. *Prog Clin Biol Res* 1990; 349: 405-417.
6. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest* 1996 ;98: 2218-2227.
7. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1136-1143.
8. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104.
9. Beninati S, Senger DR, Cordella-Miele E, Mukherjee AB, Chackalaparampil I, Shanmugam V, Singh K, Mukherjee BB. Osteopontin: its transglutaminase-catalyzed posttranslational modifications and cross-linking to fibronectin. *J Biochem (Tokyo)* 1994; 115: 675-682.
10. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997; 95: 684-692.

11. Birmingham DJ, Rovin BH, Yu CY, Hebert LA. Of mice and men: the relevance of the mouse to the study of human SLE. *Immunol Res* 2001; 24: 211-224.
12. Boersma E, Mercado N, Poldermans D, Gardien M, Vos J, Simoons ML. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361: 847-858.
13. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634.
14. Bundesamt DS. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen: Statistisches Bundesamt Deutschland; 2004. http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=10530&suchstring=Sterbefälle_nach_den_10_häufigsten_Todesursachen&query_id=&sprache=D&fund_typ=TAB&methode=1&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=8&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gast&p_aid=42096350&hlp_nr=3&p_janein=J (Zugriff 08.07.2007)
15. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
16. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
17. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325-338.
18. Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 33: 939-947.
19. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569-582.
20. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5134-5138.
21. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999; 286:2098-2102.
22. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63: 21-29.
23. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 723-749.

24. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J* 1993; 7: 1475-1482.
25. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111.
26. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56-66.
27. Dewald, Ren G, Duerr R, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis N. Of mice and dogs: species- specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-677
28. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005; 96: 881-889.
29. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest* 1998; 101: 1693-1698.
30. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1301-1311.
31. Fahey TJ, 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol* 1992; 148: 2764-2769.
32. Ferguson MW, Whitby DJ, Shah M, Armstrong J, Siebert JW, Longaker MT. Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 854-860.
33. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978a; 90: 57-70.
34. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978b; 73: 843-849.
35. Frangogiannis N. The Role of the Chemokines in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Current Vascular Pharamcology* 2004; 2. 163-174

36. Frangogiannis NG, Burns AR, Michael LH, Entman ML. Histochemical and morphological characteristics of canine cardiac mast cells. *Histochem J* 1999; 31: 221-229.
37. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000a ;165: 2798-2808.
38. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Ren G, Akrivakis S, Jackson PL, Michael LH, Smith CW, Entman ML. MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H483-492.
39. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res* 2000b ;48: 89-100.
40. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 31-47.
41. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576.
42. Fuentes ME, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, Lira SA. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* 1995; 155: 5769-5776.
43. Furie MB, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol* 1995;146:1287-1301.
44. Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 717-725.
45. Ganz T. Macrophage function. *New Horiz* 1993; 1: 23-27.
46. Ganz W, Watanabe I, Kanamasa K, Yano J, Han DS, Fishbein MC. Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia--half reperfused and half not reperfused. *Circulation* 1990; 82: 1020-1033.
47. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993; 87: 755-763.
48. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-115.

49. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 17779-17784.
50. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. Osteopontin expression in cardiovascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 109-126.
51. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 1998; 152: 353-358.
52. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371-1375.
53. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990a; 346: 274-276.
54. Gordon JR, Galli SJ. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced development of functionally active mast cells in W/Wv but not Sl/Sld genetically mast cell-deficient mice. *Blood* 1990b; 75: 1637-1645.
55. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ. Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J Immunol* 1997; 159: 401-408.
56. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol* 1999; 72: 7-29.
57. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 9: 1872-1885.
58. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafra MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10896-10901.
59. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994; 267: H1948-54.

60. Hawkins HK, Entman ML, Zhu JY, Youker KA, Berens K, Dore M, Smith CW. Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol* 1996; 148: 1957-1969.
61. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004; 94: 671-677.
62. Hermens WT, Willems GM, Nijssen KM, Simoons ML. Effect of thrombolytic treatment delay on myocardial infarct size. *Lancet* 1992; 340: 1297.
63. Hirsch S, Gordon S. Surface antigens as markers of mouse macrophage differentiation. *Int Rev Exp Pathol* 1983; 25: 51-75.
64. Hume DA, Perry VH, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia. *Anat Rec* 1984; 210: 503-512.
65. Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, Takahashi M, Kasahara T, Kano S, Shimada K. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines. *Atherosclerosis* 1993; 104: 61-68.
66. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 647-653.
67. Johnson AS, Gerisch RA, Girton FW, Scheinberg SR, Saltzstein HC. Effect of cortisone on the size of experimentally produced myocardial infarcts. *J Mich State Med Soc* 1953; 52: 1298-1299;
68. Jones ML, Mulligan MS, Flory CM, Ward PA, Warren JS. Potential role of monocyte chemoattractant protein 1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J Immunol* 1992; 149: 2147-2154.
69. Jugdutt BI, Joljart MJ, Khan MI. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. *Circulation* 1996; 94: 94-101.
70. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 1729-1735.

71. Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest* 2000; 80: 1127-1136.
72. Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 6-15.
73. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97: 1848-1867.
74. Kloner RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation* 1978; 57: 56-63.
75. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol* 1998; 152: 101-111.
76. Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 540-545.
77. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 91-104.
78. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith CW, Entman ML. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; 95: 693-700.
79. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4293.
80. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996; 270: H1803-11.
81. Libby P, Maroko PR, Bloor CM, Sobel BE, Braunwald E. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J Clin Invest* 1973; 52: 599-607.

82. Liebler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, Strieter RM. Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. Disparate responses to phytohemagglutinin and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; 152: 241-249.
83. Lindley IJD WJ, Kunkel SL. Nomenclature announcement - the chemokines. *Immunol Today* 1993; 14.
84. Locati M, Murphy PM. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 1999: 425-440.
85. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 457-463.
86. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 1998; 187: 601-608.
87. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.
88. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9448-9453.
89. Mallory GK WP, Salcedo- Salgar J. The speed of healing of myocardial infarction: A study of the pathologic anatomy in seventy- two cases. *Am Heart J* 1939; 18: 647- 671.
90. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J, Jr., Braunwald E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* 1971; 43: 67-82.
91. Maroko PR, Libby P, Ginks WR, Bloor CM, Shell WE, Sobel BE, Ross J, Jr. Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1972; 51: 2710-2716.
92. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.
93. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Matsushima K, Sasayama S. Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 419-423.

94. Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 1989; 169: 1485-1490.
95. Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusic AJ. Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. *Genomics* 1991; 9: 200-203.
96. Mehta JL, Li DY. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardiovasc Res* 1999; 43: 291-299.
97. Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: H660-8.
98. Modi WS, Yoshimura T. Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol Biol Evol* 1999; 16: 180-193.
99. Morita M, Kawashima S, Ueno M, Kubota A, Iwasaki T. Effects of late reperfusion on infarct expansion and infarct healing in conscious rats. *Am J Pathol* 1993; 143: 419-430.
100. Mukherjee BB, Nemir M, Beninati S, Cordella-Miele E, Singh K, Chackalaparampil I, Shanmugam V, DeVouge MW, Mukherjee AB. Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 201-212.
101. Muller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J Immunol Methods* 2001; 249: 155-165.
102. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1994; 145: 1450-1462.
103. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: 1049-1055.
104. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.
105. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R7-28.

106. Ono K, Matsumori A, Furukawa Y, Igata H, Shioi T, Matsushima K, Sasayama S. Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1999; 79: 195-203.
107. Oppenheim J, Feldman M, editors. *Cytokine Reference*: MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall, UK; 2001.
108. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 373-390.
109. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentziko DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 223-229.
110. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503-512.
111. Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134: 224-238.
112. Reimer KA, Jennings RB. The changing anatomic reference base of evolving myocardial infarction. Underestimation of myocardial collateral blood flow and overestimation of experimental anatomic infarct size due to tissue edema, hemorrhage and acute inflammation. *Circulation* 1979; 60: 866-876.
113. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1976; 53: 1204-6.
114. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1996; 2: 198-204.
115. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928.
116. Rollins BJ, Morton CC, Ledbetter DH, Eddy RL, Jr., Shows TB. Assignment of the human small inducible cytokine A2 gene, SCYA2 (encoding JE or MCP-1), to 17q11.2-12: evolutionary relatedness of cytokines clustered at the same locus. *Genomics* 1991; 10: 489-492.
117. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136: 1229-33.
118. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

119. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
120. Rupprecht HJ, Meyer J. [Modern reperfusion management in acute myocardial infarct]. *Internist (Berl)* 2002; 43: 90-95.
121. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96: 34-40.
122. Shah P. Pathophysiology of acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 1997; 79: 790-792.
123. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; 148: 141-149.
124. Shyy YJ, Li YS, Kolattukudy PE. Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 693-699.
125. Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270: 28471-28478.
126. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2787-2796.
127. Smith PD, Smythies LE, Wahl SM. Macrophage Effector Function. In: Rich RE, editor. *Clinical Immunology*: Mosby International Limited; 2001. p. 19.1- 19.7.
128. Spath JA, Jr., Lane DL, Lefer AM. Protective action of methylprednisolone on the myocardium during experimental myocardial ischemia in the cat. *Circ Res* 1974; 35: 44-51.
129. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* 1995a; 4: 155-160.
130. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opdenakker G, Van Damme J, Kunkel SL. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 1995b; 57: 752-762.
131. Strieter RM, Standiford TJ, Huffnagle GB, Colletti LM, Lukacs NW, Kunkel SL. "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol* 1996; 156: 3583-3586.
132. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 410-422.

133. Takahashi M, Masuyama J, Ikeda U, Kasahara T, Kitagawa S, Takahashi Y, Shimada K, Kano S. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995; 76: 750-757.
134. Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-1195.
135. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2891-2897.
136. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors* 1988; 1: 91-99.
137. Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA, Thelen M. G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 28096-28101.
138. Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A, et al. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994; 63: 247-254.
139. Villarreal FJ, Kim NN, Ungab GD, Printz MP, Dillmann WH. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 1993; 88: 2849-2861.
140. Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2085-2093.
141. Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990; 82: 1387-1401.
142. Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. *Mol Cell Biochem* 1995; 147: 13-19.
143. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987; 76: 44-51.

144. World Health Organisation, 1999, The world health report 1999; making a difference; <http://www.who.int/whr/1999/en/index.html>
145. Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *Faseb J* 1989; 3: 2565-2573.
146. Wolpe SD, Davatellis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988; 167: 570-581.
147. Yao L, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* 1999; 94: 3820-3828.

9 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. A. Welz, Direktor der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, für seine Betreuung und die Durchsicht des Manuskripts danken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Oliver Dewald, der mir durch die Bereitstellung des Themas, die Einführung in die Thematik und Methoden und seine umfassende Betreuung diese Arbeit erst ermöglicht hat. Er hat mir insbesondere in den ersten Wochen in Houston mit Rat, Tat und Freundschaft das Einarbeiten und Einleben erleichtert, wofür ich mich sehr herzlich bedanken möchte. Weiterhin hat er mir durch Anregungen und Kritik bei der Erstellung des Manuskripts tatkräftig und außerordentlich zur Seite gestanden.

Frau Anna Körting hat maßgeblich an der Erarbeitung der molekularbiologischen Ergebnisse mitgewirkt und zum Teil die Experimente selbst durchgeführt, wofür ich mich ganz besonders bedanken möchte. Weiterhin hat sie alle Sorgen und Nöte bei der Erstellung dieser Arbeit geteilt und mir immer konstruktiv und freundschaftlich zur Seite gestanden. Herzlichen Dank.

Bei meinen Experimenten in Houston wurde ich in spezieller Weise von Herrn Dr. Nikolaos Frangogiannis betreut, der immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte und mir bei der Erarbeitung der immunhistochemischen Protokolle immer zur Seite gestanden hat.

Frau Sandra Haudek Ph.D. hat mich insbesondere bei den ersten schriftlichen Versuchen mit Rat und Tat umfassend beraten und hatte immer ein offenes Ohr und ein offenes Haus für mich - auch außerhalb der Arbeit.

Zum Gelingen dieser Arbeit und bei der Durchführung der Experimente waren verschiedene Personen im Labor des Cardiovascular Sciences und DeBakey Heart Center, Baylor College of Medicine unter Mark L Entman M.D. von großer Bedeutung. Ganz besonders danke ich Herrn Mark L. Entman M.D. für die finanzielle Förderung und diese einmalige Gelegenheit, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Weiterhin danke ich unter anderem Alida Evens, Pawel Zymek, Jennifer Pocius und Guofeng Ren für ihre tatkräftige Unterstützung.

Für Korrekturvorschläge und konstruktive Kritik bedanke ich mich besonders bei Anna Körting, Robin Hiesinger, Sandra Haudek, Till Winkelmann, Henrik Winkelmann sowie Ann-Kristin Meyer.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinen Eltern Heidemarie und Johannes Winkelmann danken, die mich stets beraten und in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben und so dieses Studium und entsprechend die Promotion erst ermöglicht haben.

10 Lebenslauf

Geboren am: 20.08.1981 in Attendorn
 Eltern: Dr. med Johannes Winkelmann
 Heidemarie Winkelmann, geb. Overbeck

Schulbesuch

1987-1991 Grundschule „Sonnenschule“ in Attendorn
 1991-2000 Rivius Gymnasium Attendorn
 05/2000 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Seit 8/2000 Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
 08/ 2002 Physikum
 03/2003- 03/2004 Promotion am DeBakey Heart Center, Baylor College of Medicine Houston, Texas, USA unter Prof. Dr. med. Welz von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
 ab 04/2004 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
 08/2006-12/2006 Praktisches Jahr: Teil Chirurgie im Tribhuvan University Teaching Hospital; Akademisches Lehrkrankenhaus der Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal
 12/2006-03/2007 Praktisches Jahr: Teil Innere Medizin im Spital Aarberg, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Bern, Aarberg, Schweiz
 03/2007-07/2007 Praktisches Jahr: Teil Pädiatrie in der Asklepios Klinik Sankt Augustin, Akademisches Lehrkrankenhaus der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Sankt Augustin
 11/2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung