

**Tragen Fibrosierung und Hypoxie im Herzgewebe zum
kardioprotektiven Effekt in Cx3cr1-defizienten Mäusen
nach transverser aortaler Konstriktion bei?**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lisa Faye Slater

aus Münster

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. Christina K. Weisheit
2. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Zimmer

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.03.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1 Linksherzhypertrophie – Ursache, Folgen und Therapiemöglichkeiten	7
1.2 Die Durchblutung des Herzens	9
1.3 Die Adaptation des Herzens auf erhöhte Druckbelastung	11
1.3.1 Die Fibrosierung des Herzgewebes	13
1.4 Erhöhte linksventrikuläre Druckbelastung im Mausmodell.....	16
1.5 Die Rolle des Immunsystems	17
1.6 Der Fraktalkinrezeptor (Cx3cr1).....	18
1.7 Thematische Eingrenzung	20
1.8 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Substanzen und Materialien	22
2.1.1 Reagenzien.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Puffer und Lösungen	23
2.1.4 Geräte.....	24
2.1.5 Antikörper	24
2.1.5.1 Primäre Antikörper	24
2.1.5.2 Sekundärer Antikörper	24
2.2 Versuchstiere	25
2.3 Gruppendifinition	25
2.4 Aufbereitung und Fixierung der Schnitte.....	26
2.5 Quantitative Real Time PCR.....	26

2.6	Histologie	27
2.6.1	Übersichtsfärbung.....	27
2.6.2	Pikro-Siriusrot-Färbung.....	27
2.6.3	Immunfluoreszenz-Färbung	28
2.6.3.1	HIF-1 α und HIF-2 α	29
2.6.3.2	Kollagen III	29
2.7	Mikroskopie.....	30
2.8	Auswertung.....	30
2.8.1	MATLAB-basierter Algorithmus	31
2.8.2	Auswertung der Immunfluoreszenz gefärbten Präparate.....	31
2.8.2.1	HIF-1 α	31
2.8.2.2	HIF-2 α	32
2.8.2.3	Kollagen III	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff	33
3.1.1	HIF-1 α Expression im Herzgewebe der Maus mittels Immunfluoreszenz.....	34
3.1.2	HIF-2 α Expression im Herzgewebe der Maus mittels Immunfluoreszenz.....	35
3.2	Kollagen I und III.....	38
3.2.1	Die mRNA-Expression von Kollagen I und III (q-RT-PCR)	38
3.2.2	Der Kollagenquotient	39
3.2.3	Kollagen I im Gewebe (Pikro-Siriusrot-Färbung)	40
3.2.4	Kollagen III im Gewebe (Immunfluoreszenz-Färbung).....	42
4.	Diskussion	44
4.1	Hypoxiemarker als Ausdruck der myokardialen Sauerstoffversorgung.....	44
4.1.1	HIF-2 α und die chronische Hypoxie.....	45
4.2	Die Fibrosierung des linken Ventrikels als Folge der Druckbelastung	47

4.2.1	Verminderte Kollagen-I-Expression im Gewebe der Cx3cr1 ^{-/-} -Mäusen als bestimmender Faktor der Kardioprotektion	47
4.2.2	Die erhöhte Kollagen-III-Deposition könnte zu einem Erhalt der Pumpfunktion beitragen	50
4.2.3	Die Rolle der Makrophagen und Cx3cr1 bei der Fibrosierung	51
4.3	Hypoxie und Fibrosierung – gibt es eine Verbindung?	52
4.4	Bedeutung für zukünftige Forschung	54
4.5	Modell-Limitationen	56
5.	Zusammenfassung	57
6.	Abbildungsverzeichnis	59
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Danksagung	73

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AF	Autofluoreszenz
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CCR	C-C-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cx3cl1	Spezifischer Cx3Cr1 Ligand
Cx3cr1	Cx3C-Rezeptor-1
Cx3cr1 ^{-/-}	Cx3C-Rezeptor-1 knock-out
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EZM	Extrazellulärmatrix
EGFP	Grünfluoreszierendes Protein
FB	Fibroblasten
HET	Haus für experimentelle Therapie
HFpEF	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
HFrEF	<i>Heart Failure with reduced Ejection Fraction</i>
HI	Herzinsuffizienz
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSV	<i>Hue Saturation Value</i>
IL	Interleukin
LAD	Ramus interventricularis der linken Koronararterie
LCx	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCA	Rechte Koronararterie
SGLT	Natrium-Glukose-Cotransport
TAC	Transaortale Konstriktion
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Linksherzhypertrophie – Ursache, Folgen und Therapiemöglichkeiten

Es gibt viele verschiedene Krankheitsbilder, die über eine erhöhte Druck- oder Volumenbelastung des linken Ventrikels zu einer Hypertrophie als Anpassungsmechanismus führen. Hierzu gehören als häufige Vertreter vor allem die arterielle Hypertonie und die Aortenklappenstenose, die über die erhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels zu einer konzentrischen Hypertrophie führen (Slivnick und Lampert, 2019). Im Gegensatz dazu führen insbesondere insuffiziente Klappen zu einer exzentrischen Hypertrophie, die auf eine erhöhte Volumenbelastung zurückzuführen ist. Diese Arbeit konzentriert sich aufgrund der hohen Prävalenz auf die druckinduzierte linksventrikuläre Hypertrophie (LVH).

Fast jeder dritte Erwachsene in Deutschland leidet an arterieller Hypertonie, bei den über 65-Jährigen sind es fast zwei Drittel (Neuhauser et al., 2017). Eine Metaanalyse von 30 Studien hat gezeigt, dass bei 36-41 % der bekannten Hypertoniker eine LVH vorliegt (Cuspidi et al., 2012). Bei Betrachtung der höchsten Risikogruppe (schwere oder therapieresistente Hypertonie) steigt die Prävalenz auf 59-77 % (Cuspidi et al., 2012). Die LVH ist bei einer adäquaten Behandlung der Grunderkrankung häufig reversibel (Hellowell und Margulies, 2012). Es gibt Daten, die zeigen, dass weniger als die Hälfte (ca. 43 %) der Patienten von ihrer Erkrankung wissen (Chow et al., 2013; Paudel et al., 2020). Ein Grund hierfür ist, dass die Hypertonie häufig keine Symptome aufweist.

Die hohe Prävalenz sowohl der Grunderkrankung als auch der dadurch induzierten LVH zeigt die Wichtigkeit dieser Erkrankung, da die Endstrecke der Hypertrophie in vielen Fällen die Herzinsuffizienz (HI) ist. Die Anpassungsreaktion des Herzens auf die erhöhte Druckbelastung stellt kurzfristig eine sinnvolle Adaptation dar, fördert jedoch langfristig die Progression der Erkrankung in eine Herzinsuffizienz (Garcia-Menendez et al., 2013; Slivnick und Lampert, 2019).

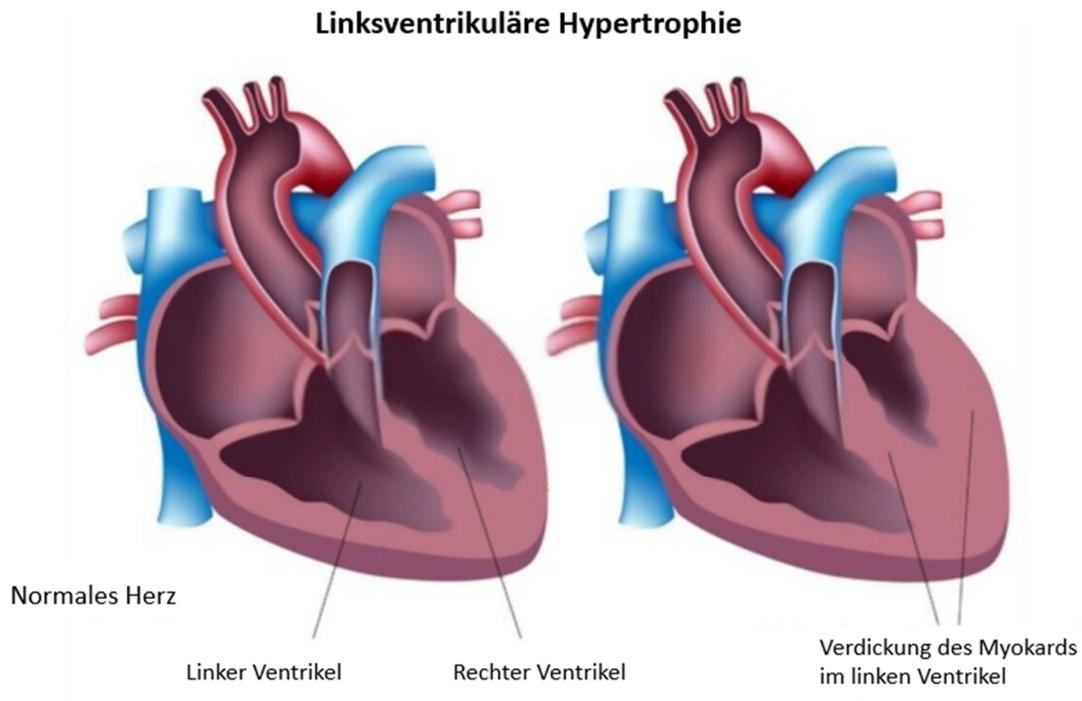


Abb. 1: Linksventrikuläre Hypertrophie. Konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels als Reaktion auf erhöhte kardiale Belastung. Eine Verdickung des Myokards führt zu einem geringeren diastolischen Volumen im linken Ventrikel und damit zu einer konsekutiv verminderten Auswurfmenge des Herzens. Links ist das normale Herz dargestellt, rechts das Herz mit linksventrikulärer Hypertrophie (Abbildung modifiziert aus Ravi, 2024).

Die Herzinsuffizienz kann auf verschiedene Weise unterteilt werden. Es gibt die z. B. durch konzentrische Hypertrophie entstehende diastolische Herzinsuffizienz, bei der der linke Ventrikel während der Diastole nicht ausreichend gefüllt werden kann (s. Abb. 1). In dieser Form liegt häufig die HFpEF (Heart Failure with preserved Ejection Fraction) vor, da die Ejektionsfraktion (die Menge des ausgeworfenen Blutes am gesamten enddiastolischen Blutvolumen) nicht erniedrigt ist, das absolute Blutvolumen jedoch aufgrund des geringen enddiastolischen Blutvolumens dem Bedarf des Körpers nicht genügt. Auf der anderen Seite gibt es z. B. durch exzentrische Hypertrophie verursachte systolische HI, bei welcher häufig die Kraft des Herzmuskels nicht ausreicht, um genug Blutvolumen in den Kreislauf zu pumpen. Diese Form geht häufig mit einer verminderten Ejektionsfraktion einher (HFrEF) (Simmonds et al., 2020).

Liegt die Herzinsuffizienz erst einmal vor, ist diese nicht mehr reversibel. Die Therapie beinhaltet viele verschiedene Medikamente: ACE-Hemmer, Mineralcorticoid-Rezeptor Antagonisten, β -Blocker und neuerdings auch SGLT-2 Inhibitoren (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2023). Zusätzlich erfolgt häufig bei einer Ejektionsfraktion unterhalb von 35 % die Implantation eines Defibrillators, da eine Herzinsuffizienz mit einem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod einhergeht. Die pharmakologische Therapie kann die Symptome lindern und auch die Progression der Erkrankung verlangsamen, sie kann jedoch die Erkrankung nicht heilen.

Die Prävalenz bei über 80-Jährigen mit Herzinsuffizienz liegt oberhalb von 10 % (Bleumink et al., 2004). Zudem beträgt die Mortalität der Herzinsuffizienz im NYHA-IV-Stadium (Beschwerden in Ruhe) etwa 50 % pro Jahr (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2019). Die Herzinsuffizienz ist somit ein Krankheitsbild mit einer hohen Morbidität und Mortalität. 2015 war die Herzinsuffizienz der häufigste Grund für Krankenhauseinweisungen und die kostspieligste Krankheit für das Gesundheitssystem überhaupt (Pflaumbaum, 2018). Dieses Problem wird sich aufgrund des demographischen Wandels und paradoxerweise durch die verbesserte Versorgung myokardialer Ischämien, welche ebenso zu einer LVH führen können, verschärfen. Daher besteht ein großes Interesse darin, den Übergang von LVH zur Herzinsuffizienz zu verhindern und das Fortschreiten der Erkrankung zu bremsen, bevor die Herzinsuffizienz eintritt.

1.2 Die Durchblutung des Herzens

Das Herz hat einen überdurchschnittlichen Bedarf an Sauerstoff (Schünke et al., 2015). Über die linke und rechte Koronararterie werden die verschiedenen Anteile des Herzens mit Blut versorgt. Bereits in Ruhe extrahiert das myokardiale Gewebe mehr Sauerstoff aus dem Blut als andere Organe. Im Umkehrschluss besteht dementsprechend bei erhöhter Belastung des Herzens eine geringere Reservekapazität. Somit muss bei Belastung die Koronardurchblutung als Anpassung erhöht werden, um alle myokardialen Zellen ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Da die Koronararterien aufgrund der Lokalisation ihres Abgangs aus der Aorta direkt oberhalb der Aortenklappe in der Diastole

durchblutet werden, kann die Erhöhung des Pulses, welche mit einer Verkürzung der Diastole einhergeht, nicht wesentlich die Durchblutung fördern (Schünke et al., 2015).

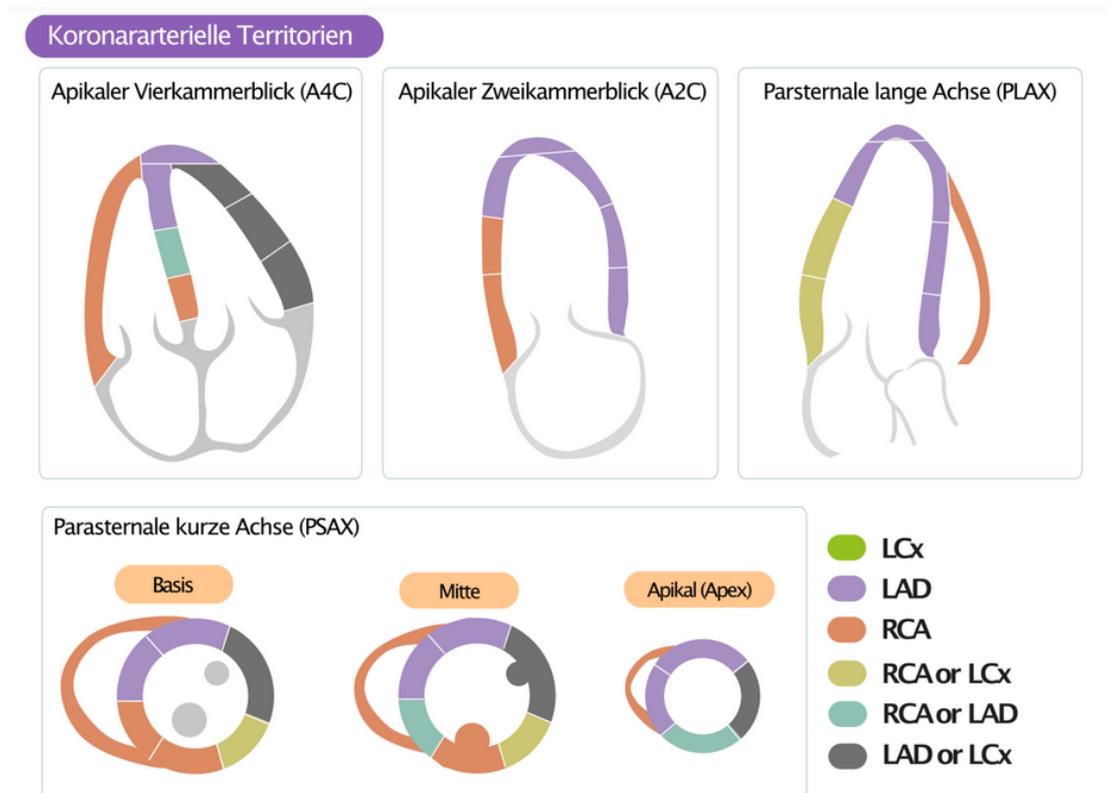


Abb. 2: Grafische Darstellung der Durchblutung des Herzens durch die Koronararterien. Die rechte Koronararterie versorgt den größten Teil des rechten Herzens sowie den hinteren Teil des Septums interventricularis, das die linke von der rechten Herzkammer trennt. Die linke Herzkammer wird vom Ramus circumflexus versorgt, der aus der linken Koronararterie entspringt. Der ebenfalls aus der linken Koronararterie entspringende Ramus interventricularis versorgt den linken Vorhof und einen Teil der hinteren linken Herzkammer. Aufgrund der verschiedenen anatomischen Gegebenheiten gibt es Variationen in der Durchblutungsmorphologie. Diese sind in der Grafik mit eigenen Farben hinterlegt (gelb/grau/türkis). Das Herz ist aus verschiedenen Achsen dargestellt, welche insbesondere in der Sonographie genutzt werden. LCx: Ramus circumflexus der linken Koronararterie; LAD: Ramus interventricularis der linken Koronararterie; RCA: rechte Koronararterie (Abbildung aus EKG & ECHO, 2021).

Das Septum, das die beiden Herzkammern voneinander trennt, wird von einer der Endarterien der rechten Koronararterie (bei etwa 75 % der Menschheit, andere Versorgungstypen bekannt) versorgt (s. Abb. 2.) (Kalbfleisch und Hort, 1976). Bei der Linksherzhypertrophie kommt es aufgrund der Hypertrophie der Kardiomyozyten zu einer Verdickung des Myokards und des Septums. Da die Versorgung der Koronararterien von außen nach

innen gerichtet ist, werden die endokardnahen Areale zuletzt versorgt (Schünke et al., 2015). Durch die Verdickung des Myokards wird die Diffusionsstrecke verlängert, und die endokardnahen Kardiomyozyten werden schlechter mit Sauerstoff versorgt und dementsprechend früher hypoxisch. Somit führt die LVH zu einer Störung der Mikrozirkulation, und folglich wird das pathologische kardiale Remodeling in Gang gesetzt (s. Kap. 1.3).

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α gilt als anerkannter Marker der akuten Hypoxie, der zur Beurteilung der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff herangezogen wird, da unter normoxischen Bedingungen die Degradation dieses Faktors erfolgt und nur bei Abwesenheit von Sauerstoff der Abbau verhindert wird (Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Die Prolyl-Hydroxylase, welche die Alpha-Einheit des HIF hydroxyliert und dadurch zu deren Abbau durch das Proteasom führt, benötigt als Cofaktor Sauerstoff, weshalb unter hypoxischen Bedingungen der Transkriptionsfaktor stabilisiert und in den Zellkern transportiert wird (Masoud und Li, 2015). Ein weiterer, jedoch bislang weniger erforschter Transkriptionsfaktor, HIF-2 α , akkumuliert im Gewebe bei chronischer Hypoxie (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Takeda et al., 2010).

1.3 Die Adaptation des Herzens auf erhöhte Druckbelastung

Obwohl arterielle Hypertonie häufig symptomarm verläuft und von Patienten häufig nicht als Gefahr wahrgenommen wird, wird durch die chronische erhöhte Druckbelastung ein Remodelingprozess im Myokard angestoßen, der die Morphologie des Gewebes erheblich verändert.

Kardiales Remodeling als Reaktion auf chronische Druckbelastung des Herzens ist daher bereits seit einigen Jahrzehnten ein wichtiger Bestandteil der Forschung. Die Hoffnung ist, dass durch die Identifikation wichtiger Faktoren gegebenenfalls neue Ziele für medikamentöse Therapien gefunden werden können, die das kardiale Remodeling aufhalten oder ausbremsen können.

Die Beteiligung des sympathischen Nervensystems und des RAA-Systems, zusammengefasst als neurohumorale Achse, in der Entwicklung der LVH ist bekannt. Die neurohumorale Achse induziert und stimuliert verschiedene Signalwege, welche die Hypertrophie

der Kardiomyozyten und die Modulation der Fibroblasten beeinflussen. Durch die chronisch erhöhte Druckbelastung kommt es im Rahmen des kardialen Remodelings zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie einer erhöhten Fibrosierung (Slivnick und Lampert, 2019). Dieses führt initial zu einer erhöhten Kontraktilität der Kardiomyozyten, um dem erhöhten Druck standzuhalten und die Blutversorgung des Körpers zu gewährleisten (Slivnick und Lampert, 2019).

Das Laplace-Gesetz liefert eine Erklärung für die Hypertrophie des Myokards als Reaktion auf die Nachlasterrhöhung. Es beschreibt den Zusammenhang zwischen der Wanddicke und der Wandspannung in Bezug auf den Druck, der auf beides einwirkt (Li, 1986). Eine Zunahme des Drucks führt über die erhöhte Wandspannung zu einer Zunahme der Wanddicke, wodurch die Wandspannung wiederum abnimmt. In Bezug auf das Herz zeigt sich, dass durch die Verdickung des linken Ventrikels die Wandspannung abnimmt und im Umkehrschluss kurzfristig zu einem Erhalt der kardialen Leistung führt (Nakamura und Sadoshima, 2018).

Die Problematik des pathologischen kardialen Remodelings ist, dass dieses langfristig eine Fehlregulation darstellt und häufig in einer Herzinsuffizienz mündet, die nur schwierig behandelbar ist und mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (s. Abb. 3).

Der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hypertrophie und der Wahrscheinlichkeit, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, wurde in einer Studie von De Simone et al. (2008) untersucht. Das Resultat dieser Studie zeigte, dass jede 1 %ige Erhöhung der linksventrikulären Hypertrophie mit einer 1 %igen erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Herzinsuffizienz einhergeht.

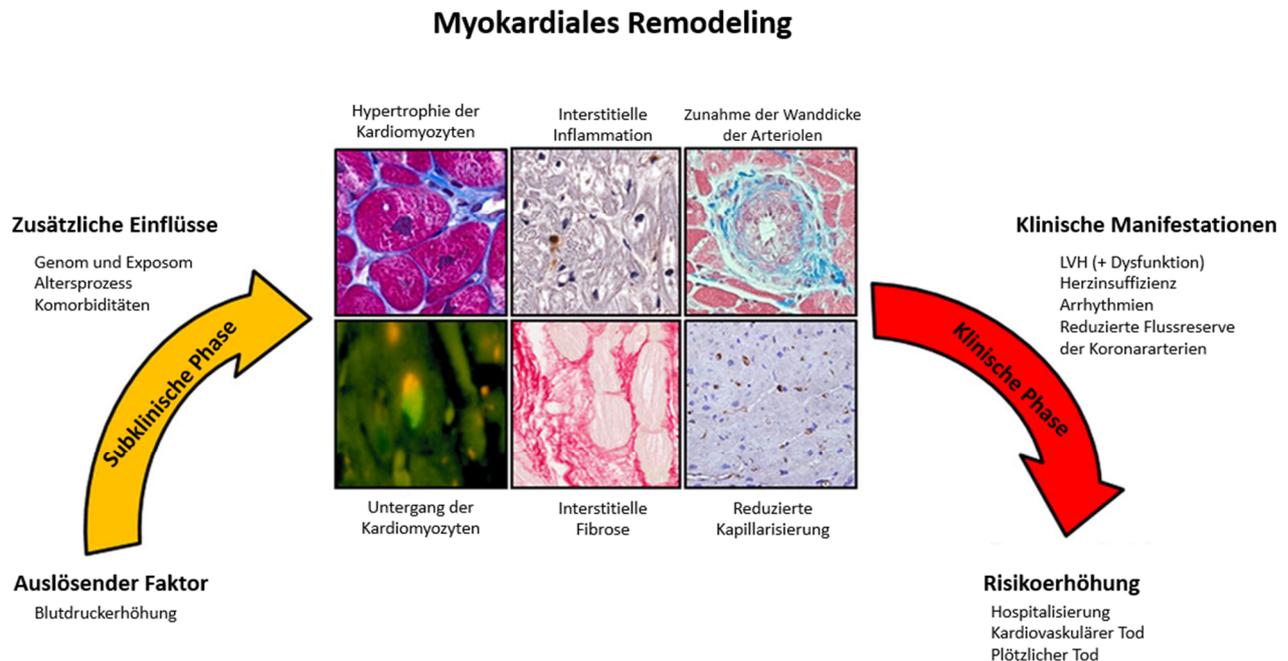


Abb. 3: Darstellung des Entstehungsmechanismus des pathologischen myokardialen Remodelings. Durch auslösende Faktoren, wie beispielsweise arterielle Hypertonie sowie zusätzliche Einflussfaktoren (Genom, Exposom, dem Altersprozess, Komorbiditäten) kommt es subklinisch zu einem Remodeling-Prozess im Herzen. Dieser Prozess beinhaltet eine Hypertrophie bzw. den Untergang der Kardiomyozyten, eine interstitielle Inflammation und Fibrose, eine Zunahme der Wanddicke der Arteriolen und eine reduzierte Kapillarisation. Diese pathologischen Veränderungen führen zu einer klinischen Manifestation im Rahmen einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH), einer Herzinsuffizienz, kardialen Arrhythmien und einer reduzierten Flussreserve der Koronararterien. Endgültig münden diese klinischen Manifestationen in einer Risikoerhöhung für vermehrte Hospitalisierungen, kardiovaskulär bedingte Tode sowie den plötzlichen Herztod (Abbildung modifiziert aus González et al., 2018a).

1.3.1 Die Fibrosierung des Herzgewebes

Die Kollagenfasern sind ausschlaggebend, um die Kontraktion der Kardiomyozyten in myokardiale Kraft zu übertragen (Baicu et al., 2003). Physiologischerweise sind Fibroblasten im Herzen für die Regulation und Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Kollagenproduktion und -abbau zuständig, wie Eghbali et al. (1988) zeigten. Die kardialen Fibroblasten besitzen die Möglichkeit, unter pathologischen Umständen durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie mechanischer Belastung zu Myofibroblasten zu differenzieren (Tomasek et al., 2002). Hieraus resultiert, dass eine veränderte Stimulation

bzw. Regulation der Fibroblasten zu einer Änderung des Gleichgewichts zwischen Abbau und Aufbau der EZM führen kann, da Myofibroblasten diese im Gegensatz zu Fibroblasten verändert bilden. Myofibroblasten verändern das Verhältnis von MMPs und deren Inhibitoren, wodurch eine verstärkte Fibrosierung hervorgerufen wird (Berk et al., 2007). Insbesondere TGF- β 1 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und dementsprechend in der Fibrosierung ein (Berk et al., 2007).

Es ist bekannt, dass die veränderte Fibrosierung des Herzens eine zentrale Rolle bei der Progression der LVH und dementsprechend einer HI spielt (Slivnick und Lampert, 2019). Bereits 1989 wurde von Jalil et al. (1989) gezeigt, dass anders als beim Myokardinfarkt die Kardiomyozyten nicht durch Kollagen ersetzt werden, sondern das Volumen von Kollagen stärker zunimmt, als das Volumen der Kardiomyozyten, wodurch das Verhältnis zugunsten von Kollagen verschoben wird. Dieses beschreibt die reaktive Fibrose, bei der vor allem eine Kollagenakkumulation im Interstitium und perivaskulär beschrieben wird (Brilla und Weber, 1992). Im Kontrast dazu steht die reparative Fibrose, wie sie z. B. im Rahmen eines Myokardinfarkts stattfindet (ein Vorgang, bei dem nekrotisch untergegangene Kardiomyozyten durch Narbengewebe ersetzt werden). Ob diese beiden Arten der Fibrosierung zwei strikt getrennte Vorgänge sind oder diese parallel ablaufen, ist noch nicht endgültig geklärt.

Die verstärkte Fibrosierung wirkt sich im Herzen über verschiedene Mechanismen pathologisch aus (s. Abb. 4). Erstens resultiert eine verminderte diastolische Funktion aufgrund der erhöhten passiven Steifheit des Herzens. Zweitens liegt ebenso eine aktive Steifheit der Kardiomyozyten vor, weshalb die systolische Funktion ebenfalls vermindert ist. Auf drittem Wege birgt die verstärkte Fibrosierung eine erhöhte Gefahr für Arrhythmien, welches den erhöhten Anteil an plötzlichen Herztoden im Rahmen der HI erklärt (González et al., 2018a).

Eine wichtige Unterscheidung bei der Fibrosierung des Herzens sind die verschiedenen Kollagentypen. Unter physiologischen Umständen stellen Kollagen Typ I und III den weitestgehend größten Anteil an Kollagenfasern dar (Jugdutt, 2003; Stanchev et al., 2020). Während Kollagen Typ I unter anderem für die Ausbildung der Zugsteifigkeit und Festigkeit in Sehnen zuständig ist, ist Kollagen III vor allem in elastischem Gewebe vorhanden (Gelse et al., 2003). Diese beiden Kollagentypen kommen häufig gemeinsam vor und das Verhältnis

der beiden ist entscheidend für den Effekt der Kollagenfasern auf die Herzfunktion. Während im Herzen eine erhöhte Kollagen I Ablagerung mit einer verminderten linksventrikulären Elastizität verbunden ist, fördert die erhöhte Kollagen III Ablagerung eine flexiblere Narbenbildung (Jugdutt, 2003).

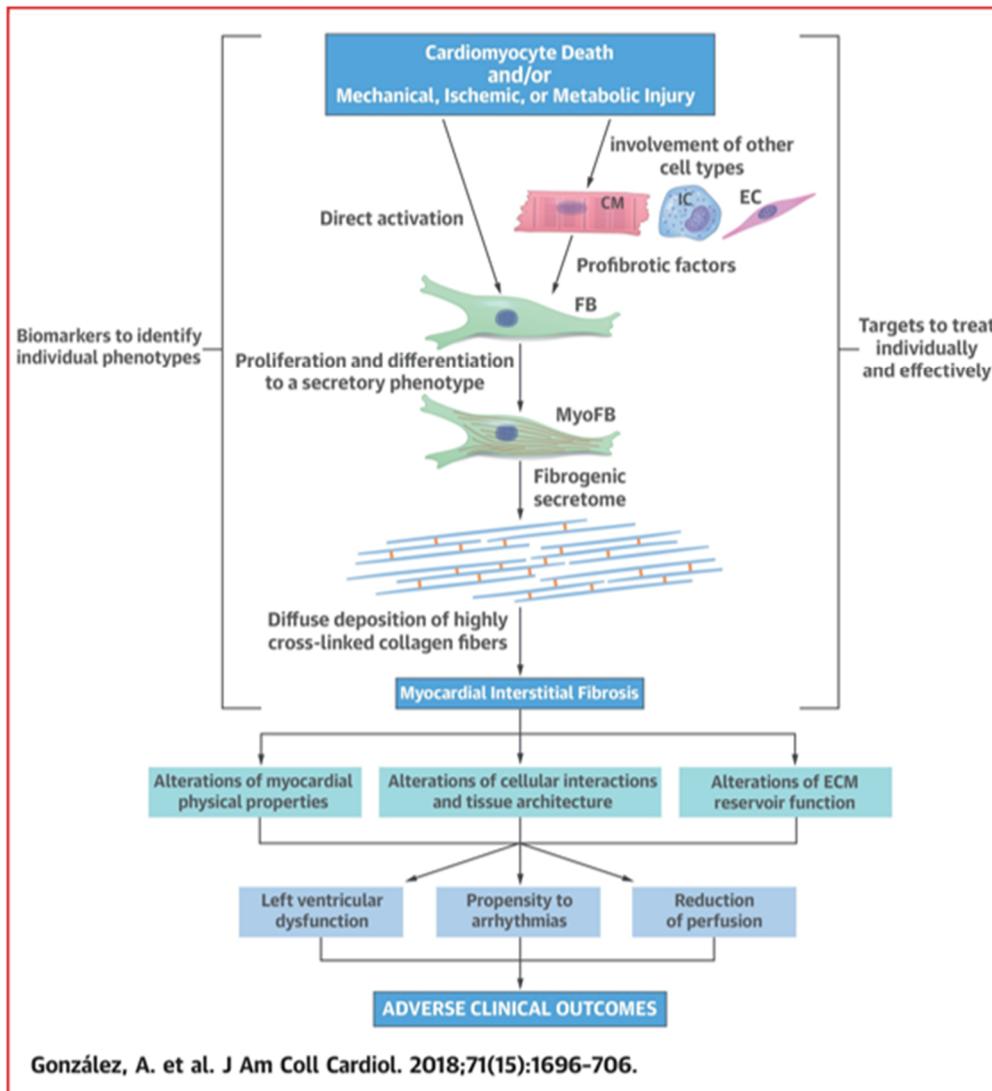


Abb. 4: Die Entstehung der myokardialen interstitiellen Fibrose. In der Abbildung ist die Kaskade dargestellt, die durch den Untergang bzw. die Schädigung der Kardiomyozyten in Gang gesetzt wird. Durch Schädigung der Kardiomyozyten werden Fibroblasten (FB) entweder direkt oder in Kombination mit anderen Zelltypen über profibrotische Faktoren aktiviert. Die Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten (MyoFB), welche zu einer vermehrten Kollagenablagerung führen. Aus dieser resultieren verschiedene Konsequenzen, wie eine veränderte Zellinteraktion mit erhöhter linksventrikulärer Dysfunktion, einer erhöhten Gefahr für Arrhythmien sowie einer reduzierten Durchblutung. Diese Konsequenzen münden anschließend in einem ungünstigen klinischen Ergebnis (Abbildung modifiziert aus González et al., 2018b).

1.4 Erhöhte linksventrikuläre Druckbelastung im Mausmodell

Wie Rockman et al. (1991) bereits zeigten, ist das Modell der transversen aortalen Konstriktion (TAC) bislang die effizienteste Methode, die erhöhte Druckbelastung des linken Herzens, wie sie im Rahmen einer arteriellen Hypertonie beim Menschen vorliegt, im Mausmodell nachzustellen. Das kardiale Remodeling und die Linksherzhypertrophie werden vergleichbar zum Menschen in diesem Modell beobachtet und können durch genauere Untersuchungen wichtige Hinweise zu ursächlichen Faktoren liefern (deAlmeida et al., 2010; Rockman et al., 1991).

Um das Trauma der Mäuse so gering wie möglich zu halten, wurde für die Behandlung die minimal invasivere Methode der Operation, etabliert von Eichhorn et al. (2018), genutzt, bei welcher der Brustkorb verschlossen bleibt. Das Prinzip der TAC-OP ist die Einschnürung der Aorta transversa mithilfe eines 6.0 Fadens zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der linken Arteria carotis communis (s. Abb. 5). Durch die Konstriktion der Aorta an dieser Stelle wird die erhöhte kardiale Druckbelastung, ähnlich wie bei arterieller Hypertonie, nachgestellt (deAlmeida et al., 2010). Liegt der Druckunterschied zwischen rechter und linker Carotide derselben Maus zwischen 4 und 10mmHg, ist eine erfolgreiche TAC anzunehmen.

Da diese Arbeit vor allem mit den histologischen Präparaten und Kardiomyozyten der Mäuse arbeitet, wird an dieser Stelle auf die ausführliche Arbeitsanweisung in der Literatur für die TAC-OP und die hämodynamischen Ergebnisse dieser verwiesen (Eichhorn et al., 2018; Weisheit et al., 2021).

Die Sham-Operation erfolgte alleinig durch das Umschlingen der Aorta ohne Konstriktion. Ansonsten erfolgte die Operation analog zu dem in der Arbeitsanweisung ausführlich beschriebenen minimal invasivem Eingriff.

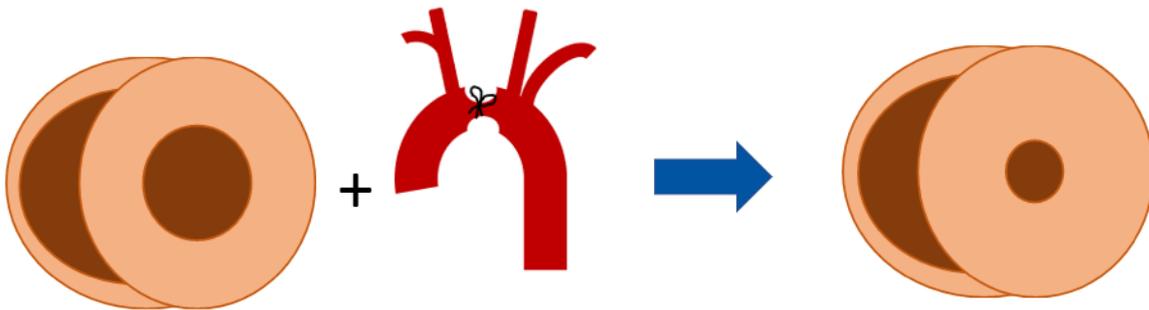


Abb. 5: Grafische Darstellung der Auswirkung der TAC-OP auf den linken Ventrikel der Mäuse. 21 Tage nach der TAC-Behandlung führt die Konstriktion der Aorta beim Wildtyp zu einer linksventrikulären Hypertrophie.

1.5 Die Rolle des Immunsystems

Aktuelle Untersuchungen legen eine enge Beziehung zwischen dem Immunsystem und der Entwicklung einer LVH nahe (Adamo et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl angeborene als auch adaptive Immunzellen eine zentrale Rolle in der pathophysiologischen Entwicklung einer druckinduzierten LVH einnehmen, wobei jedoch die Makrophagen in der Immunantwort im frühen Stadium der LVH die vorherrschende Zellpopulation darstellen. Zusätzlich wurde dem angeborenen Immunsystem eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Herzinsuffizienz zugesprochen (Shinagawa und Frantz, 2015). Die T-Zellen stehen vor allem im späteren Verlauf, bei der bereits eingetretenen HI im Vordergrund.

Wie beim Menschen gibt es auch bei der Maus verschiedene Makrophagen-Subpopulationen. Auf der einen Seite gibt es die embryonal abgeleiteten gewebehomöostatischen $\text{Ly6C}^{\text{low}}\text{CCR2}^-$ -Makrophagen (C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 2), welche durch eine lokale Proliferation aufrechterhalten werden. Die Makrophagen dieser Subpopulation exprimieren viel Cx3cr1 und führen, unabhängig von einer Entzündungsreaktion, eine patrouillierende Funktion entlang der Blutgefäße aus. Sie gelten als residente Makrophagen und üben physiologischerweise eine schützende und vorteilhafte Wirkung auf das Herzgewebe der Mäuse aus (Bajpai et al., 2019). Auf der anderen Seite stehen die proinflammatorischen CCR2^+ -Makrophagen, die durch $\text{Ly6C}^{\text{hi}}\text{CCR2}^+$ -Monozyten aus dem Blutkreislauf aufgefüllt werden, und helfen, Monozyten an verletzte Stellen zu rekrutieren und eine

schädliche Gewebsreaktion auszulösen (Epelman et al., 2014). Sie exprimieren weniger Cx3cr1, haben eine kürzere Halbwertszeit im Vergleich zu den residenten Makrophagen und lösen eine akute Inflammation aus (Weisheit et al., 2014). Nach dem Absterben von Kardiomyozyten, wie beispielsweise nach einem Myokardinfarkt (MI), spielt der Verlust von CCR2⁻-residenten Makrophagen und der Ersatz durch infiltrierende Monozyten-abgeleitete CCR2⁺-Makrophagen eine zentrale Rolle in der folgenden Entzündungs- und Umbaureaktion.

Es wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass nach einer TAC-Behandlung von Wildtyp-Mäusen eine vermehrte Migration von Ly6C^{low}-Makrophagen in das Herzgewebe erfolgt (Weisheit et al., 2014). Zusätzlich wurde eine vermehrte Expression des Fraktalkinrezeptors (Cx3cr1) auf den Makrophagen im hypertrophierten Herzen beobachtet.

1.6 Der Fraktalkinrezeptor (Cx3cr1)

Aus den vorherigen Untersuchungen zu den Makrophagen und der Erkenntnis der zentralen Rolle des Fraktalkinrezeptors in der Makrophagen-/ Monozytenrekrutierung ist dieser in den Fokus unserer wissenschaftlichen Fragestellung gerückt.

Cx3cr1 – Chemokinrezeptor (C-X3-C) Receptor 1- ist ein Chemokinrezeptor, an dem Cx3cl1 bindet. Er wird vorwiegend von Monozyten und Makrophagen exprimiert, unter anderem jedoch auch von einigen dendritischen Zellen (Jung et al., 2000). Die Cx3cr1-Cx3cl1 Achse ist vor allem an der Migration von Leukozyten beteiligt. Es wird dem Rezeptor, exprimiert von den Ly6C^{low}-Makrophagen, vor allem die Funktion als „Wächter des Endothels“ im Herzen zugeschrieben (Auffray et al., 2007). Somit besitzt dieser Rezeptor in erster Linie eine regulatorische Funktion (Cormican und Griffin, 2021). Der Cx3cr1-Cx3cl1 Signalweg wurde im Rahmen von arteriosklerotischen Plaques mit einem erhöhten Überleben von Monozyten durch anti-apoptotische Signale assoziiert, welches zu einer Progression der Plaques führte (Landsman et al., 2009). Durch Cx3cr1 knock-out konnte dieser Effekt aufgehoben werden.

Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Mäuse, welche den Fraktalkinrezeptor nicht besitzen (knock-out Mäuse), einen kardioprotektiven Phänotyp aufweisen

(Weisheit et al., 2021) (s. Abb. 6). Während sich die Ejektionsfraktion und das Herzzeitvolumen bei dem Wildtyp 21 Tage nach der TAC-Behandlung signifikant verschlechterte, wurde dieser Unterschied bei den Cx3cr1-defizienten Mäusen nicht beobachtet. Zusätzlich blieb die bekannte Hypertrophie der Kardiomyozyten beim Wildtyp bei den Cx3cr1-defizienten Mäusen aus (Weisheit et al., 2021).

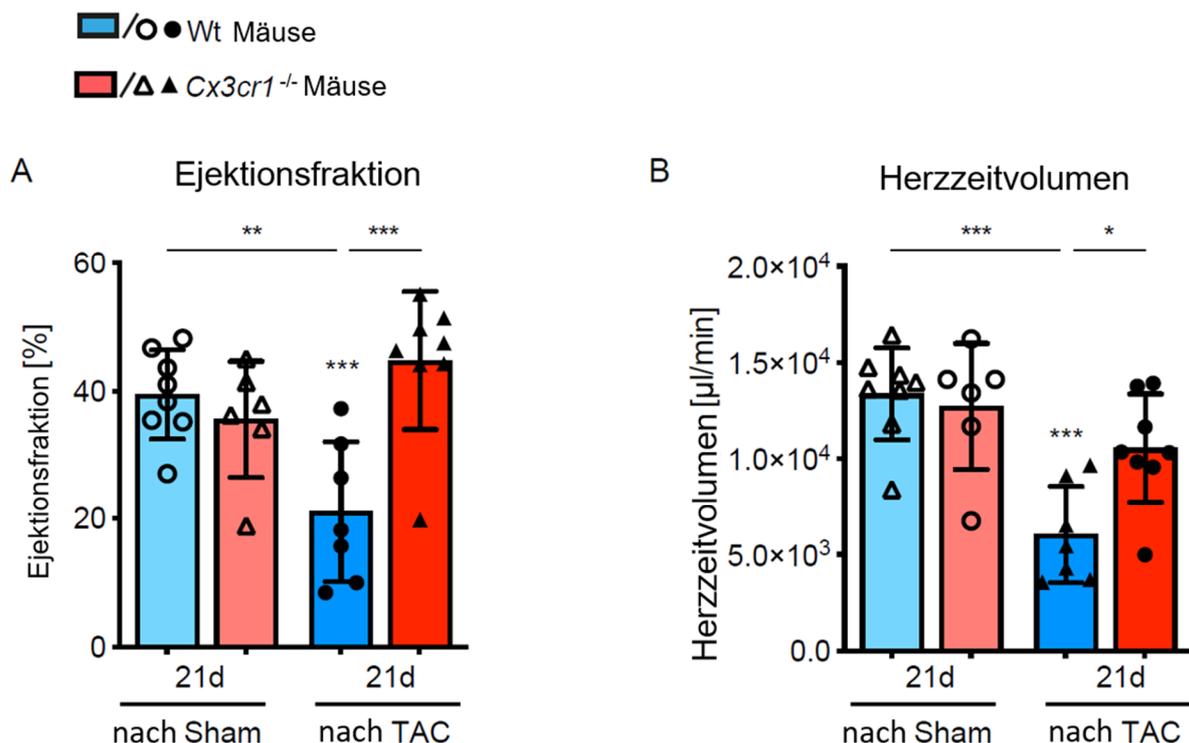


Abb. 6: Der kardioprotektive Effekt der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse bei chronisch überhöhter Druckbelastung. Kardiale Leistung 21 Tage nach TAC-Operation gemessen anhand der Ejektionsfraktion (A) und des Herzzeitvolumens (B). N = 6-8 Mäuse/Gruppe * über Balken entspricht signifikanten Unterschieden zwischen TAC- und jeweiliger Sham-Gruppe; *p<0,05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 (Abbildung modifiziert aus Weisheit et al., 2021).

Auf der Grundlage dieser vorherigen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit Untersuchungen mit Cx3cr1-defizienten Mäusen durchgeführt, in denen durch die TAC-Operation (s. Kap 1.5) die Reaktion auf eine erhöhte linksventrikuläre Druckbelastung analysiert wurde.

Die Erkenntnis, dass die Pumpfunktion des Herzens bei den Cx3cr1-defizienten Mäusen besser erhalten bleibt als bei den Wildtyp-Mäusen, könnte wichtige therapeutische

Konsequenzen in der Zukunft zur Behandlung oder Prävention des kardialen Remodelings haben, sodass es zukünftig nicht ausschließlich symptomatische Medikamente für die druckinduzierte Linksherzhypertrophie und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz gibt. Um diesem Ziel näher zu kommen, müssen jedoch die Faktoren verstanden werden, welche maßgeblich für die Unterschiede im kardialen Remodeling des Herzgewebes verantwortlich sind, aus denen die verbesserte Pumpleistung der Herzen der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse resultiert. Diesem Punkt widmen sich die Untersuchungen dieser Arbeit.

1.7 Thematische Eingrenzung

Diese Arbeit basiert auf der Erkenntnis, dass die Defizienz des Fraktalkinrezeptors (Cx3cr1) zu einem kardioprotektiven Phänotyp als Reaktion auf eine erhöhte linksventrikuläre Druckbelastung führt. Die zugrunde liegenden Mechanismen, welche zu der Kardioprotektion führen, sind bislang nicht bekannt. Aus diesem Grund dient diese Arbeit der weiteren Analyse möglicher Unterschiede in den erwähnten Mausphänotypen, um zugrundeliegende Mechanismen zu erörtern.

Basierend auf früheren Untersuchungen, die die verschiedenen Makrophagentypen als zentralen Unterschied in der Regulation der beiden Mausphänotypen herausgestellt haben, wurden Faktoren untersucht, die das Immunsystem, insbesondere die Makrophagen, modulieren.

Da in unserer Arbeitsgruppe eine unterschiedlich starke Hypertrophie der Kardiomyozyten zwischen den Mausphänotypen beobachtet wurde, liegt der Fokus dieser Arbeit zunächst auf der Sauerstoffversorgung der Kardiomyozyten selbst. Es gibt Hinweise auf eine enge Verbindung zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Hypoxie der Zellen (Bartels et al., 2013). Frühere Studien haben gezeigt, dass HIF-1 α in den Kardiomyozyten notwendig sein könnte, um die Herzfunktion in Reaktion auf erhöhte kardiale Druckbelastung aufrechtzuerhalten (Silter et al., 2010). Darüber hinaus wurde HIF-2 α mit der Motilität von Makrophagen in Verbindung gebracht, weshalb diese Transkriptionsfaktoren als Indikatoren für die Sauerstoffversorgung der Zellen in dieser Arbeit untersucht werden (Imtiyaz et al., 2010).

Ein weiterer bedeutender Faktor, der von den Makrophagen beeinflusst wird, ist die Fibrosierung des Herzens (Nahrendorf et al., 2010). Die erhöhte Ablagerung von Kollagen I im Herzen bei der LVH ist mit einer erhöhten Mortalität und einem generell schlechteren Outcome assoziiert (s. Kap. 1.3.1). Daher stellt dies einen vielversprechenden Ansatz dar, um einen wesentlichen Unterschied im experimentell beobachteten kardioprotektiven Phänotyp der $Cx3cr1^{-/-}$ -Mäuse zu untersuchen.

1.8 Fragestellung

Die Fragestellung, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ist, ob die Hypoxie des Myokards und die Fibrosierung des linken Ventrikels eine zentrale Rolle einnehmen in der Entwicklung des kardioprotektiven Phänotyps von $Cx3cr1^{-/-}$ -Mäusen.

Aus den vorangegangenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und der aktuellen Literatur lässt sich die Hypothese ableiten, dass der kardioprotektive Effekt der $Cx3cr1$ -Defizienz auf einer veränderten Regulation der Hypoxie-Transkriptionsfaktoren und einer unterschiedlichen Kollagenablagerung, insbesondere von Kollagen I, beruht, welches über die Makrophagen als zentrale Schnittstelle mediiert wird.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Substanzen und Materialien

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kamen die folgenden Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Puffer und Lösungen zum Einsatz.

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Spezifisch verwendetes Produkt	Firmenname	Firmensitz
Antigen Retrieval Solution	Target Retrieval (10x Concentrate)	Dako North America, Inc.	Carpinteria, CA, USA
Einbettmedium	TissueTek® O.C.T.™ Compound	Sakura	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Ethanol	Ethanol 99.8 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst	PanReac Appli-Chem	Darmstadt, Deutschland
Eosin	Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Eukitt	Entellan® Neu	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	2-Propanol (Reag. Ph. Eur.) for analysis, ACS, ISO	PanReac Appli-Chem	Darmstadt, Deutschland
Lyse Puffer	RNAeasy Lyse Puffer	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Montagekleber	Fixogum	Marabu GmbH & Co. KG	Bietigheim-Bissingen, Deutschland
Mounting Medium	Invitrogen ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pikrinsäure	Picric acid solution 0.9-1.1 %	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, USA
qPCR Probe	TaqMan Real-Time PCR Assay	Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Quenching Kit	Vector® TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kit	Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, CA, USA
Reduktionsmittel	2-b-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, USA
Salzsäure	TitriPUR® Salzsäure	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Siriusrot	Direct Red 80	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, USA

Xylol	Xylene, mixture of isomers (Reag. Ph. Eur.) for analysis, ACS, ISO	PanReac Appli-Chem	Darmstadt, Deutschland
Ziegen Serum	Normal Goat Serum (10 %)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Spezifisch verwendetes Produkt	Firmenname	Firmensitz
Deckplatte	Deckgläser 24x50mm	IDL GmbH	Nidderau, Deutschland
Kanülen	BD Microlance™ 3 20G	Becton Dickinson GmbH	Fraga, Huesca, Spanien
Küvette	Scienceware® Coplin staining jar with screw cap	SIGMA-ALDRICH	St. Louis, USA
Pipette 25mL	costar® Stripette® 25mL	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
Pipetten	Research 1000µl, 100µl, 10µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	1000µl, 100µl, 10µl RNase/DNase frei	Maxymum Recovery™, Axygen®	Corning, NY, USA
Spritze	Omnifix®-F 1ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Notwendige Bestandteile	Spezifisch verwendetes Produkt	Firmenname	Firmensitz
PBS	Phosphate Buffered Saline	PBS Tablets	Gibco™	Paisley, Vereinigtes Königreich
	> 1 PBS Tablette in 500ml destilliertes Wasser geben			
TBST (0.1 %)	NaCl	Natriumchlorid 99,9 %	PanReac AppliChem	Darmstadt, Deutschland
	Tris-Base	Tris ultrapure	PanReac AppliChem	Darmstadt, Deutschland
	Tween	Tween 20® für die Molekularbiologie	PanReac AppliChem	Darmstadt, Deutschland
	> auf 1000ml auffüllen mit destilliertem Wasser, und mit HCl auf 7.6 titrieren			

2.1.4 Geräte

Geräteart	Spezifisch verwendetes Produkt	Firmenname	Firmensitz
Gefrierschrank -20° C		Bosch	Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80° C		Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank +8° C		Bosch	Gerlingen, Deutschland
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutsch- land
Pipettierhelfer	accu-jet® <i>pro</i>	BRAND GmbH + CO KG	Wertheim, Deutschland
Spektrophoto- meter	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Vortex	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
Waage	CP225D-0CE	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Wasserbad		GFL	Burgwedel, Deutschland

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Antigen	Konzentration	Klonalität	Wirt	Hersteller	Sitz des Herstellers	Katalognummer
Collagen III alpha 1	1:50	Polyclonal	Hase	Novus Bi- ologicals	Centennial, CO, USA	NB600-594
Hif 1α	1:50	Polyclonal	Hase	Novus Bi- ologicals	Centennial, CO, USA	NB100-449
Hif 2α	1:50	Polyclonal	Hase	Novus Bi- ologicals	Centennial, CO, USA	NB100-122

2.1.5.2 Sekundärer Antikörper

Flu- orochrome	Konzentration	Wirt	Reakti- vität	Hersteller	Sitz des Herstellers	Katalognummer
Alexa Fluor™ 555	1:1000	Ziege	Hase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	A32732

2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet, die sowohl von Charles River bezogen als auch im Tierhaus der Universitätsklinik, Haus für experimentelle Therapie (HET) Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, gezüchtet wurden. Die Cx3cr1^{-/-}-Mäuse wurden ursprünglich vom Jackson Laboratory (Jackson Laboratory Stamm Beschreibung B6.129P2(Cg)-Cx3cr1tm1Litt/J; Bestand Nr: 005582) erworben und anschließend im HET gezüchtet, wobei sie vor ihrer Einbeziehung in den Versuch achtmal mit C57BL/6 Mäusen rückgekreuzt wurden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 63 Mäuse für die verschiedenen Untersuchungen herangezogen. Die Operationen an den in dieser Arbeit verwendeten Tieren wurden von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Lars Eichhorn, M.Sc., durchgeführt.

Alle Experimente erfolgten mit der Genehmigung des LANUV - Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, Germany (LANUV Recklinghausen Genehmigung Nummern: 84-02.04.2011.A313, 84-02.04.2016.A374), welches das zuständige Amt ist.

2.3 Gruppendifinition

Es erfolgte die Einteilung der Versuchstiere in unterschiedliche Gruppen. Auf der einen Seite wurden die Mäuse nach Ihrem Phänotyp unterteilt: C57BL/6 Mäuse (Wildtyp) und Cx3cr1^{-/-}-Mäuse (Cx3cr1 knock-out).

Des Weiteren wurden die Versuchstiere je nach Behandlung in zwei weitere verschiedene Gruppen unterteilt. Die Mäuse, welche der TAC-Operation unterzogen werden, wurden als TAC-Tiere bezeichnet (s. Kap. 1.4). Die mit Schein-Operation behandelten Mäuse wurden Sham-Tiere genannt (s. Kap. 1.4).

Es wurden 12 Mäuse (3 pro Gruppe) für die Untersuchung der HIF-Expression im Gewebe (s. Kap. 3.1.1 und 3.1.2), 48 (davon 6-14 pro Gruppe) für die Kollagenexpression auf mRNA-Ebene (s. Kap. 3.2.1), 28 (jeweils 6-8 pro Gruppe) für die Kollagen-III-Expression auf Gewebeebene (s. Kap. 3.2.4) sowie 51 (jeweils 6-24 pro Gruppe) für die Kollagen-I-Expression auf Gewebeebene (s. Kap. 3.2.3) verwendet. Einige Versuchstiere konnten dabei für mehrere Untersuchungen eingesetzt werden.

2.4 Aufbereitung und Fixierung der Schnitte

Nach der Entnahme der Herzen 21 Tage nach der TAC- bzw. Sham-OP und der Bestimmung des Gewichts erfolgte die Fixierung der Herzen in 4 % Zink-Paraformaldehyd-Lösung. Anschließend wurden die Herzen entweder in Paraffin oder in TissueTek® O.C.T.™ Compound (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und letztere zusätzlich kryokonserviert. Die Herzen wurden danach in 5 µm dicke Abschnitte geschnitten. Für die Paraffinschnitte wurde nach Anfertigung einer Übersichtsfärbung (s. Kap. 2.6.1) die Ebene zur weiteren histologischen Auswertung gewählt, bei der die Insertion der Papillarmuskeln in die Herzmuskelwand sichtbar war. Bei den kryokonservierten Präparaten war die Herzstruktur weniger gut erhalten. Deshalb wurde das am besten erhaltene Objekt ausgewählt, um es weiter für die Auswertung zu verwenden.

2.5 Quantitative Real Time PCR

Die Gewebeproben des linken Ventrikels wurden bei -80° C aufbewahrt. Für die Extraktion der RNA und Reinigung der Proben wurden diese mit RNAeasy Lyse Puffer (QIAGEN, Hilden, Deutschland) homogenisiert, der zusätzlich mit 1 % 2-b-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) versetzt war. Daraufhin wurde mithilfe des RNAeasy mini kit (QIAGEN) die gesamte RNA gereinigt.

Für die quantitative Analyse der mRNA-Expression von Kollagen I und III sowie des Referenzgens 18s wurde ein TaqMan Real-Time PCR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgte anhand der Messung des Absorptionsspektrums (Nanodrop Products, Waltham, MA, USA) und der Anwendung der $\Delta\Delta\text{ct}$ Methode. Hierbei diente 18s ribosomale DNA als Referenzgen, und die Ergebnisse wurden auf die Standardprobe (Wt Sham) der jeweilig untersuchten Ziel-mRNA bezogen.

Die $\Delta\Delta\text{ct}$ Methode ermöglichte es, die relativen Veränderungen in der mRNA-Expression zwischen verschiedenen Gruppen zu quantifizieren. Die Ergebnisse wurden als $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ Werte dargestellt, die das n-fache der Expression der untersuchten mRNA zur Kontrolle (Sham-Mäuse) widerspiegeln.

2.6 Histologie

2.6.1 Übersichtsfärbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient klassischerweise einer ersten Übersicht über das Präparat. Bei dieser Färbung werden basophile Strukturen, wie beispielsweise die Nukleinsäure im Zellkern, blau angefärbt, während azidophile Strukturen, wie beispielsweise das Zytoplasma der Zelle, rot erscheinen (Chan, 2014).

Bevor die in Paraffin eingebetteten Schnitte angefärbt werden konnten, mussten diese zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Schnitte dreimal je 5 Minuten in Xylol eingetaucht, um das Paraffin zu lösen und zu entfernen. Es folgte eine absteigende Ethanolreihe zur Rehydratisierung der Schnitte (100 %, 100 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %) für jeweils 3 Minuten. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 2 Minuten mit Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bedeckt, um die Zellkerne anzufärben. Danach wurden die Schnitte in eine Küvette mit fließendem Leitungswasser gestellt und für 5 Minuten gespült, um überschüssiges Hämalaun zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte 7 Minuten lang mit Eosin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt, um das Zytoplasma und die EZM anzufärben. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült und dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (70 %, 80 %, 90 %, 100 %), jeweils für 1 Minute. Daraufhin wurden die Schnitte kurz (3 Sekunden) in Isopropanol gelegt und anschließend dreimal für je 5 Minuten in Xylol eingelegt, um Ethanolrückstände zu beseitigen. Abschließend wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und mit dem Eindeckmedium (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einer Deckplatte bedeckt.

2.6.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung dient der Darstellung von Kollagen im histologischen Präparat. Unter polarisiertem Licht erscheinen die Kollagen-I-Fasern rot/ orange und Kollagen-III-Fasern grün.

Die Pikro-Siriusrot Färbung wurde in Anlehnung an das Protokoll von Hadi et al. (2011) durchgeführt.

Die in TissueTek® (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebetteten, bei -20° C konservierten Präparate wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in Xylol gebadet. Danach erfolgte die Hydratation sowie die Fixierung der Schnitte jeweils für etwa 30 Sekunden in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %). Nach Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,1 % Siriusrot (Direct Red 80, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) und Pikrinsäure (Picric acid solution 0.9-1.1 %, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) gefärbt. Diese wurden dann in 0.01N HCl (TitriPUR® Salzsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gespült, kurz in destilliertes Wasser getaucht und anschließend in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) für jeweils etwa 30 Sekunden dehydriert. Zum Abschluss wurden die Schnitte zweimal für 10 Minuten in Xylol gelegt und schließlich mit Eukitt (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einer Deckplatte bedeckt.

2.6.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung, ein Teil der Immunhistochemie, nutzt Antikörper, die spezifisch an die Zielstruktur binden. Es gibt zwei verschiedene Arten von Antikörpern: direkte und indirekte. Die direkten Antikörper sind spezifisch für das jeweilige Zielprotein und bereits mit Fluorochrom gekoppelt (Im et al., 2019). Dadurch sind sie unter dem Lichtmikroskop direkt sichtbar. Indirekte Antikörper binden ebenfalls an die Zielstruktur, sind aber nicht mit Fluorochrom versehen. Sie benötigen deswegen einen sekundären Antikörper, der das Fluorochrom trägt und an den primären Antikörper bindet, um sichtbar zu werden (Im et al., 2019). Der primäre Antikörper richtet sich hierbei gegen die Spezies des Gewebes (hier Maus), während der sekundäre Antikörper gegen den Wirt des primären Antikörpers gerichtet ist (hier Hase).

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden Positivkontrollen mit hypoxischem Nierengewebe durchgeführt, um die Reaktion der Antikörper zu bestätigen, sowie Negativkontrollen ohne Zugabe des primären Antikörpers, um unspezifische Hintergrundfärbungen auszuschließen.

2.6.3.1 HIF-1 α und HIF-2 α

Bevor das Färben dieser Schnitte erfolgen konnte, mussten diese, wie in Kap. 2.6.1 beschrieben, entparaffiniert werden. Daraufhin wurden die Schnitte in Küvetten mit Antigen Retrieval Solution (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) in einer Konzentration von 1:10 in destilliertem Wasser platziert und im Wasserbad auf 95° C erhitzt. Die Küvetten wurden für 10 Minuten in das Wasserbad gestellt, darauffolgend bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 2 Minuten in TBS- T (0.1 %) gewaschen. Anschließend wurden die Präparate auf den Objektträgern mit Fixogum (Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Deutschland) umrandet, 50 μ l des Blocking-Puffers (5 % Goat Serum in TBS-T (0.1 %)) pro Objekt appliziert und nach 1 Stunde wieder abgekippt. Nun wurde der primäre Antikörper (HIF-1 α , Novus Biologicals, Centennial, CO, USA bzw. HIF-2 α , Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) in einer Konzentration von 1:50 (gelöst in Blocking-Puffer) appliziert und über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgekippt und die Schnitte anschließend dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T (0.1 %) gewaschen. Danach wurde der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor™ Plus 555, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) appliziert und eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte ein letztes Mal mit TBS-T (0.1 %) zweimal für je 5 Minuten gewaschen. Zur Unterdrückung der Autofluoreszenz des Herzgewebes wurden diese mit dem Vector® TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) behandelt.

Abschließend wurden die Objekte mit Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) und einer Deckplatte eingedeckt.

2.6.3.2 Kollagen III

Die in TissueTek® (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebetteten Präparate, die bei -20° C konserviert wurden, wurden nun für 30 Minuten bei Raum Temperatur gelagert, bevor sie für 2 Minuten in TBS-T (0.1 %) gewaschen wurden. Anschließend wurden die zu färbenden Präparate auf dem Objektträger mit Fixogum umrandet, und 50 μ l des

Blocking-Puffers (5 % Goat Serum in TBS-T (0.1 %)) pro Objekt appliziert. Nach 1 Stunde wurde der Blocking-Puffer abgekippt. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper (Col3A1, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) in einer Konzentration von 1:50 appliziert und über Nacht bei 4° C im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal je 5 Minuten in TBS-T (0.1 %) gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor™ Plus 555, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) in einer Konzentration von 1:1000 Stunde appliziert und 1 Stunde lang inkubiert wurde.

Abschließend wurden die Präparate dreimal je 5 Minuten mit TBS-T (0.1 %) gewaschen und mit Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) und einer Deckplatte versehen.

2.7 Mikroskopie

Die histologischen Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axio Observer. Für die HE- und Siriusrot-gefärbten Präparate wurde ein Bild des Herzens unter Verwendung eines 20-fach Objektivs erstellt, indem mehrere Kacheln zusammengesetzt wurden. Bei der HIF-1 α -Färbung wurden Bilder des Septums an der Mitte und am Zusammenfluss mit dem rechten Ventrikel ebenfalls mit einem 20-fach Objektiv und Kacheltechnik aufgenommen. Zusätzlich wurden bei den HIF-2 α und den Kollagen III-gefärbten Präparaten pro Maus 5 nicht überlappende Aufnahmen mit einem 40-fach Objektiv von der Myokardschicht in der Mitte des Septums gemacht.

2.8 Auswertung

Zur Auswertung der Aufnahmen der histologischen Präparate wurde ImageJ verwendet. Zur grafischen Darstellung und statistischen Auswertung der Ergebnisse diente Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA).

Sofern nicht anders angegeben, werden die Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney t-Tests (ungepaarte t-Tests) evaluiert, wobei eine Signifikanz bei einem p-Wert kleiner als 0,05 angenommen wurde.

2.8.1 MATLAB-basierter Algorithmus

Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit von histologisch ausgewerteten Präparaten wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein MATLAB-basierter Algorithmus entwickelt, der Pikro-Siri-usrot-gefärbte histologische Präparate unter polarisiertem Licht analysiert und die Verteilung der Gewebsstrukturen in einzelne Farbgruppen vornimmt. Zunächst wurde eine *Background Subtraction* durchgeführt. Anschließend wurden die Bilder in HSV-Bilder umgewandelt. Basierend auf einer Methodik von Faulk et al. (2014) wurden die Farbwerte der einzelnen Pixel den Farbgruppen Rot1, Rot2, Orange, Gelb und Grün zugeordnet. Der Anteil der positiven Pixel einer Farbgruppe wurde dann durch die Gesamtpixelzahl des Gewebes geteilt und grafisch dargestellt (s. Abb. 14).

2.8.2 Auswertung der Immunfluoreszenz gefärbten Präparate

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mittels ImageJ.

2.8.2.1 HIF-1 α

Zur Bestimmung des relativen Anteils von HIF-1 α wurde die Fläche von HIF-1 α -positivem Gewebe gemessen und ins Verhältnis zur Gesamt-Gewebefläche gesetzt.

Die Auswahl der deckungsgleichen Ausschnitte des Herzgewebes erfolgte sowohl in dem EGFP-Kanal für die Darstellung des gesamten sichtbaren Gewebes als auch im DsRed-Kanal für die spezifische Detektion des Signals des sekundären Antikörpers (hier Alexa Fluor 555™). Der DsRed-Kanal wurde auf einen festgelegten Schwellenwert eingestellt (hier 10-255), der verblindet und mithilfe der Negativkontrolle (s. Kap. 2.6.3) festgelegt wurde, um das positive Signal genau zu definieren. Die Berechnung der HIF-1 α -positiven Fläche erfolgte nun durch Division der Flächenwerte des DsRed-Kanals mit positivem Signal durch die Gesamtfläche des Gewebes.

2.8.2.2 HIF-2 α

Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Autofluoreszenz wurden die histologischen Präparate in Hinblick auf HIF-2 α mithilfe von zahlreichen fokussierten Ausschnitten und der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet. Die MFI ist Ausdruck für die Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff pro Partikel. Dementsprechend bedeutete eine erhöhte MFI eine erhöhte Expression des gesuchten Transkriptionsfaktors. Aufnahmen erfolgten von dem mittleren Bereich des Septums bei der querverlaufenden Muskulatur mit einem 40-fach Objektiv. Es wurden im EGFP-Kanal 5 Ausschnitte gewählt, welche deckungsgleich im DsRed-Kanal ausgewertet werden. Dadurch wurde für jede Maus ein Durchschnittswert der MFI ermittelt.

2.8.2.3 Kollagen III

Die Auswertung von Kollagen III erfolgte analog zu der von HIF-1 α (s. Kap. 2.8.2.1). Ziel war die Bestimmung der Fläche von Kollagen III-positivem Signal in Relation zur Gesamtfläche des Gewebes.

Pro Maus wurden 3 Aufnahmen verwendet, die mit dem 40-fachen Objektiv des Mikroskops aufgenommen wurden. Der DsRed-Kanal wurde auch bei dieser Auswertung auf einen festgelegten Schwellenwert eingestellt (hier 13-255), der verblindet und mithilfe der Negativkontrolle (s. Kap. 2.6.3) festgelegt wurde, um das positive Signal zu definieren. Anschließend erfolgte die Messung der Fläche des Kollagen III-positiven Signals. Dieses wurde durch die Gesamtfläche des ausgewählten Bereichs geteilt. Dadurch wurde der Anteil an Kollagen III am Gesamtgewebe berechnet.

3. Ergebnisse

Die für diese Arbeit zugrunde gelegte Hypothese ist, dass der kardioprotektive Effekt der Cx3cr1-Defizienz im murinen Modell der LVH durch eine gestörte Cx3cr1 abhängige Makrophagenrekrutierung und damit eine abweichende Regulation der Hypoxie-Transkriptionsfaktoren sowie der Kollagenablagerung verursacht wird. Folgend wurde zunächst die Expression Hypoxie-induzierbarer Faktoren im Myokard untersucht.

3.1 Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff

Um die Frage zu klären, welchen Einfluss die Entwicklung der Hypertrophie und das Fehlen der Cx3cr1-abhängig rekrutierten Makrophagen auf die Expression der Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren hat, wurden histologische Schnitte der Herzen von Tieren nach TAC- oder Sham-OP immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Färbungen erfolgten sowohl für den Transkriptionsfaktor HIF-1 α als auch für den eher bei chronischer Hypoxie regulierten Faktor HIF-2 α .

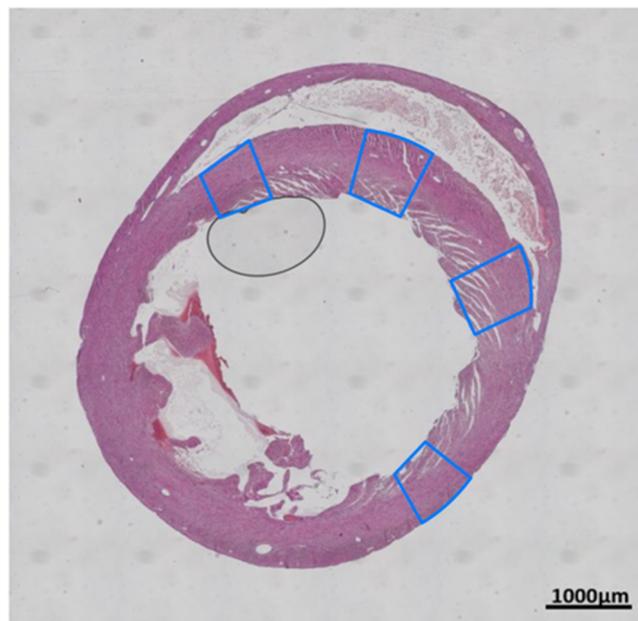


Abb. 7: Exemplarisches Foto eines Mauserzens. Blau markiert sind die für die Analysen berücksichtigten Areale. Die histologische Färbung erfolgte mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung, welche eine Übersichtsfärbung des Gewebes darstellt. Das histologische Präparat ist dargestellt in 20-facher Vergrößerung.

Der Fokus wurde bei den analysierten Schnitten auf das Kammerseptum und hier vor allem auf die endokardnahen Anteile gelegt (s. Abb. 7), da die Durchblutung des Herzens nicht in allen Bereichen gleich gut gewährleistet ist. Als Prinzip „der letzten Wiese“ werden vor allem endokardnahe Anteile weniger gut durchblutet, da die Durchblutung des Herzens von außen nach innen gerichtet ist (Schünke et al., 2015). Zudem reagiert das Septum interventriculare, welches die beiden Kammern des Herzens voneinander trennt, verstärkt und frühzeitig auf die erhöhte Druckbelastung mit einer Hypertrophie (s. Kap. 1.2).

3.1.1 HIF-1 α Expression im Herzgewebe der Maus mittels Immunfluoreszenz

Histologische Schnitte von Mauserzen 21 Tage nach TAC- oder Sham-OP wurden immunfluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Expression von HIF-1 α analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse im Bereich des Septum interventriculare ergab eine deutliche Abnahme des HIF-1 α Anteils an der Gesamtfläche (s. Abb. 9), sowohl bei den Wildtyp als auch den Cx3cr1^{-/-}-Tieren nach TAC im Vergleich zu Sham (s. Abb. 8). Der Unterschied erwies sich jedoch in beiden Fällen als nicht signifikant, auch nicht zwischen den beiden Genotypen. Zudem zeigte sich kein signifikanter Unterschied der basalen relativen HIF-1 α Expression im Vergleich der beiden Mauslinien.

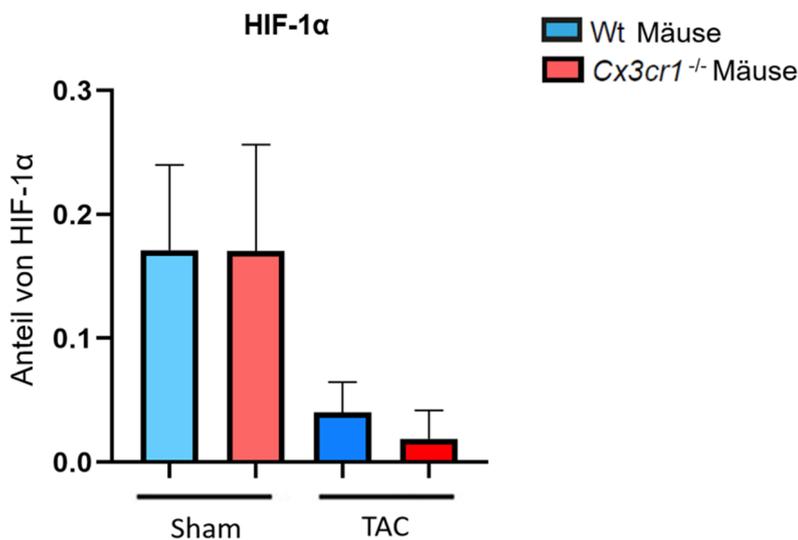


Abb. 8: Darstellung des Anteils der HIF-1 α positiven Flächen an der Gesamtfläche. Mäuse wurden nach der jeweiligen Mauslinie (Wildtyp oder Cx3cr1^{-/-}) und TAC- bzw. Sham-Operation gruppiert. Die Auswertung erfolgte 21 Tage nach TAC- bzw. Sham-OP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, pro Gruppe wurden 5 Schnitte von 3 Mäusen ausgewertet. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

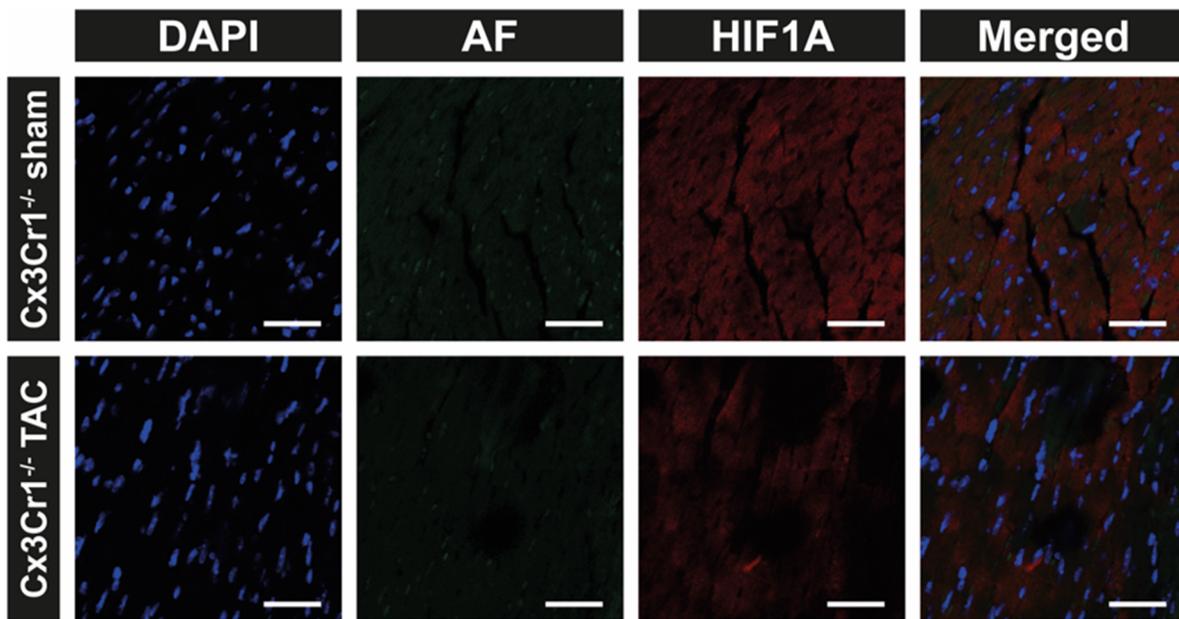


Abb. 9: Exemplarische Fotos der HIF-1 α gefärbten Herzschnitte. Dargestellt sind histologische Fotos in 20-facher Vergrößerung von Cx3cr1-defizienten Mäusen. Die Messbalken entsprechen jeweils 50 μ m. Die Färbung und Auswertung erfolgte zum Zeitpunkt 21 Tage nach TAC- bzw. Sham-OP. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) stellt die Färbung der Zellkerne dar, AF (Autofluoreszenz) zeigt das Herzgewebe. HIF-1A entspricht dem DsRed-Kanal, der das HIF-1 α positive Signal widerspiegelt. Merged stellt den Zusammenschluss der 3 Kanäle DAPI, AF und HIF-1 α dar. Auf der linken Seite ist die Mauslinie (Cx3cr1^{-/-}) nach TAC- bzw. Sham-Operation gruppiert.

Für den Transkriptionsfaktor HIF-1 α wurde eine Herabregulation 21 Tage nach der TAC-OP in beiden Mauslinien festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die akute Reaktion des Gewebes auf die Hypertrophie induzierte Hypoxie zu diesem Zeitpunkt möglicherweise bereits abgeschlossen und in eine chronische Phase übergegangen war.

3.1.2 HIF-2 α Expression im Herzgewebe der Maus mittels Immunfluoreszenz

Die Hypothese, dass 21 Tage nach TAC-OP möglicherweise Unterschiede in der chronischen Reaktion des Gewebes auf erhöhte Belastung ersichtlich werden, wurde überprüft, indem Herzschnitte der Mäuse auf die Expression von HIF-2 α untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Cx3cr1^{-/-}-Mäuse nicht nur basal mehr HIF-2 α produzierten, sondern dieses auch nach der TAC-Behandlung abnahm (s. Abb. 10). Bei den Wt-Mäusen zeigte sich eine gegensätzliche Reaktion. Hier wurde eine Hochregulation von HIF-2 α bei den TAC-Tieren im Vergleich zu den Sham-operierten Wt-Mäusen beobachtet (s. Abb. 10).

Obwohl diese Unterschiede keine Signifikanz erreichten, waren Tendenzen sichtbar (s. Abb. 11).

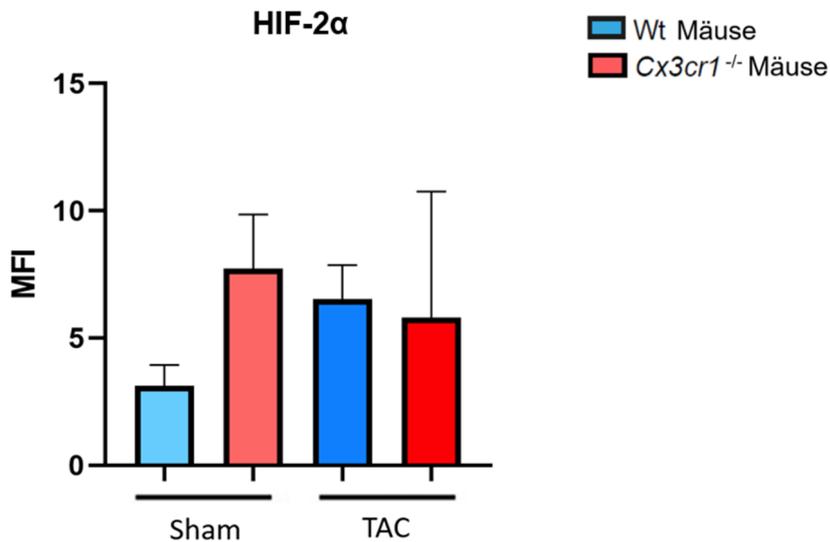


Abb. 10: Darstellung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von HIF-2 α . Die Messung erfolgt anhand der MFI im DsRed-Kanal, welcher das Signal des verwendeten Antikörpers darstellt. Mäuse wurden nach der jeweiligen Mauslinie (Wildtyp oder Cx3cr1^{-/-}) und TAC- bzw. Sham-OP gruppiert. Die Auswertung erfolgte 21 Tage nach TAC-bzw. Sham-OP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, pro Gruppe wurden 5 Schnitte von 3 Mäusen ausgewertet. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

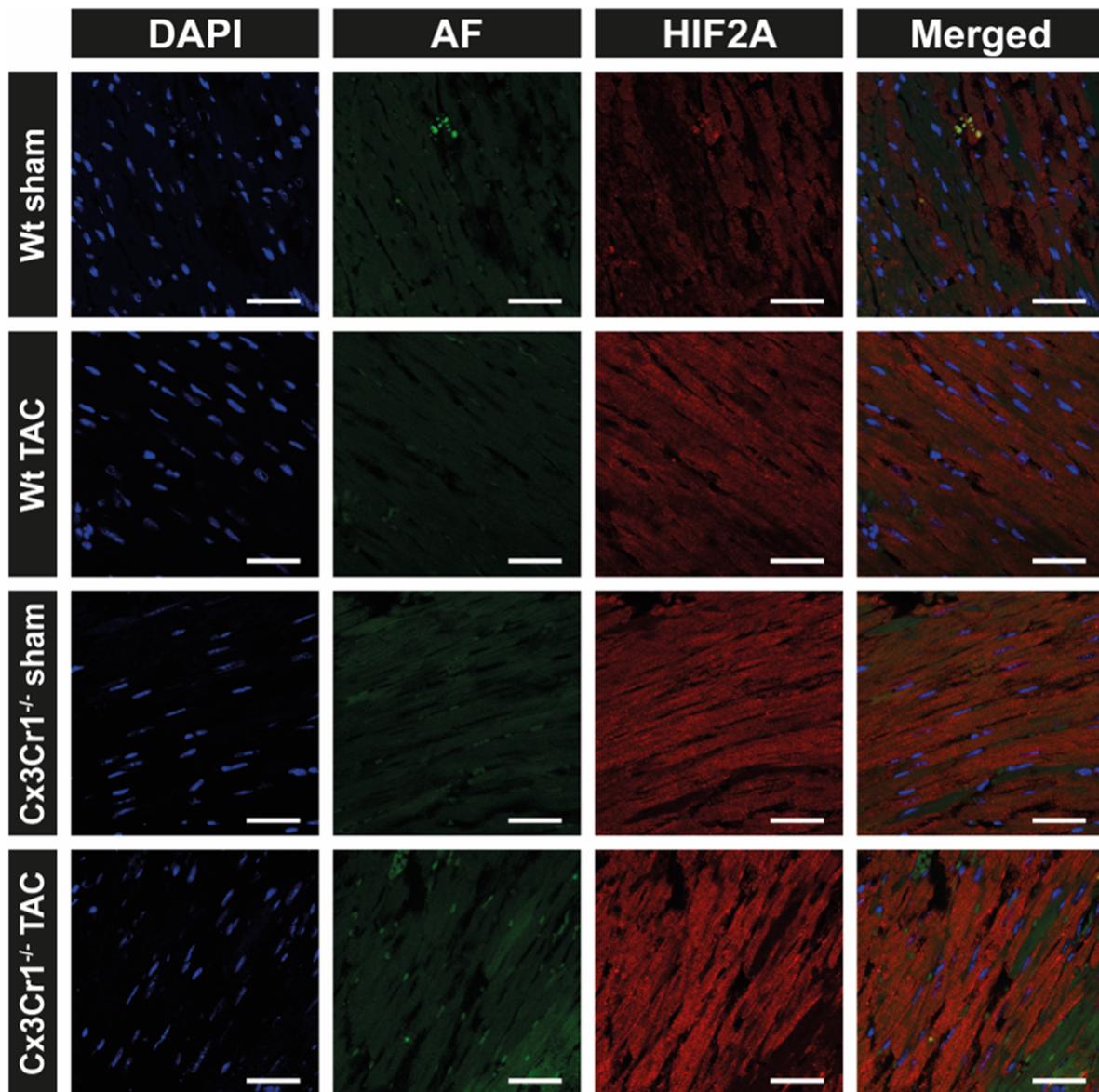


Abb. 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Expression von HIF-2 α . Dargestellt sind histologische Fotos in 40-facher Vergrößerung von Wt bzw. Cx3cr1-defizienten Mäusen. Die Messbalken entsprechen jeweils 50 μ m. Die Färbung und Auswertung erfolgte zum Zeitpunkt 21 Tage nach TAC-bzw. Sham-Operation. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) stellt die Färbung der Zellkerne dar, AF (Autofluoreszenz) zeigt das Herzgewebe. HIF-2A entspricht dem DsRed-Kanal, der das HIF-2 α positive Signal widerspiegelt. Merged stellt den Zusammenschluss der 3 Kanäle DAPI, AF und HIF-2 α dar. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Mäuse anhand der Mauslinie (Wildtyp oder Cx3cr1^{-/-}) und TAC- bzw. Sham-Operation gruppiert.

Das Expressionsprofil von HIF-2 α im Myokard der Mäuse 21 Tage nach TAC deutet darauf hin, dass das Fehlen von Cx3cr1 zu einer Modulation von HIF-2 α führt.

3.2 Kollagen I und III

Die Fibrosierung des Herzens im Rahmen erhöhter kardialer Belastung ist ein bekannter Faktor, der aufgrund des erhöhten Kollagengehaltes im Verhältnis zu den Kardiomyozyten mit einer reduzierten Pumpleistung des Herzens einhergeht und maßgeblich von Makrophagen beeinflusst wird (Baicu et al., 2003; Ismahil und Prabhu, 2021; Jalil et al., 1989). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der kardioprotektive Effekt des Cx3cr1^{-/-}-Phänotyps auf einer veränderten Kollagenablagerung beruhen könnte. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften und ihrer Rolle im Remodeling des Herzgewebes wurden in dieser Studie speziell Kollagen I und Kollagen III untersucht. Bekannt ist insbesondere, dass Kollagen-I-Fasern besonders dick und unelastisch sind, während Kollagen-III-Fasern dünner und elastischer sind (Gelse et al., 2003; Jugdutt, 2003).

3.2.1 Die mRNA-Expression von Kollagen I und III (q-RT-PCR)

Zunächst wurden mittels quantitativer RT-PCR-Analyse die Expressionsprofile von Kollagen I und III im Herzgewebe von Wt und Cx3cr1-defizienten Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der operativen Intervention gemessen.

Zwischen den Sham-Gruppen und an Tag 3 nach TAC-OP zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wt und Cx3cr1-defizienten Mäusen in der mRNA-Expression von Kollagen I. An Tag 6 nach TAC-OP war die mRNA-Expression von Kollagen I allerdings bei Wt- und Cx3cr1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant hochreguliert (s. Abb. 12A).

In Bezug auf die basale Kollagen-III-Expression wurde ersichtlich, dass die Sham-operierten Cx3cr1^{-/-}-Mäuse keine Unterschiede aufwiesen im Vergleich zu den Wt-Tieren (s. Abb. 12B). An Tag 3 nach der TAC-OP zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Kollagen III mRNA-Expression bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Sham-Tieren. Während die Kollagen-III-Expression in den Wt-Tieren zu keinem gemessenen Zeitpunkt nach TAC-OP signifikante Unterschiede aufwies, stieg sie bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen an Tag 6 weiterhin deutlich an und erreichte eine hohe Signifikanz im Vergleich zur Sham-Gruppe und den Wt-Tieren (s. Abb. 12B).

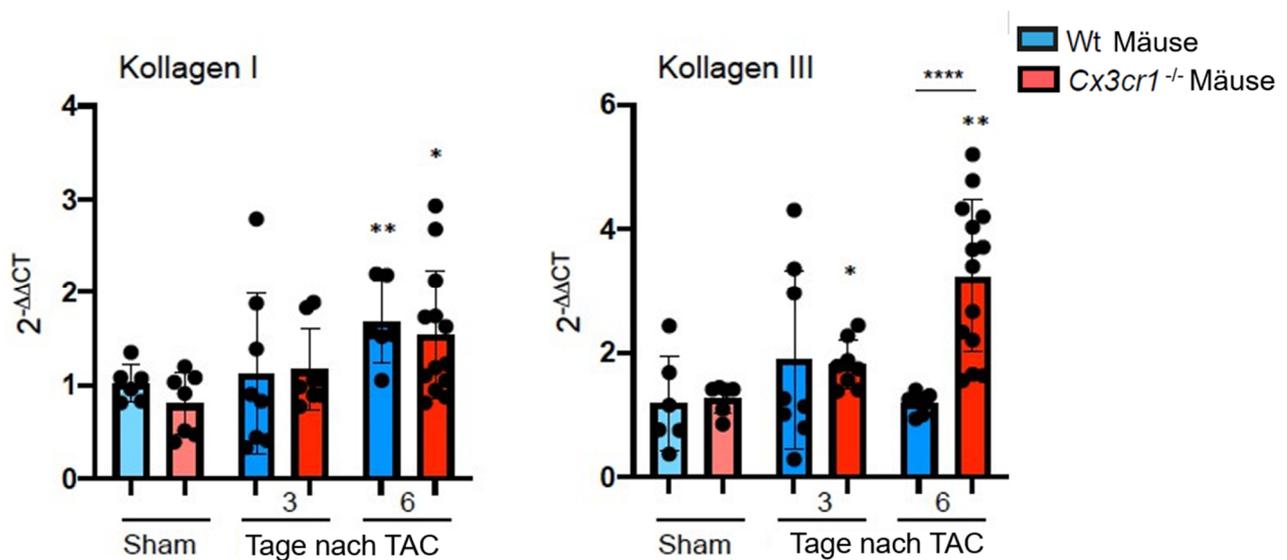


Abb. 12: Darstellung der relativen Menge an mRNA von (A) Kollagen I und (B) Kollagen III im linken Ventrikel. Bestimmung der mRNA-Expression von Kollagen I und III mittels qRT-PCR-Analyse. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 6-14$ Tiere pro Gruppe. * über einzelnen Balken entspricht der Angabe von signifikanten Unterschieden zwischen TAC- und der jeweiligen Sham-Gruppe; *= $p < 0,05$ **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$.

3.2.2 Der Kollagenquotient

Um den vorherrschenden Kollagentyp der einzelnen Mauslinien darstellen zu können, wurde das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III gebildet, welches als Kollagenquotient bezeichnet wird (s. Abb. 13). Ein erhöhter Kollagenquotient, der ein Überwiegen von Kollagen I anzeigt, ist mit einer erhöhten Steifheit und einer reduzierten diastolischen Funktion des Herzens assoziiert (Wei et al., 1999).

Die Sham-Gruppen wiesen keine deutlichen Unterschiede im Kollagenquotienten auf (s. Abb. 13). Auch an Tag 3 nach TAC ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. An Tag 6 nach TAC-OP hingegen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Kollagenquotienten bei den Wt-Mäusen im Vergleich zu Sham- und Cx3cr1^{-/-}-Tieren. Dies deutete darauf hin, dass die Expression von Kollagen I bei den Wt-Mäusen 6 Tage nach TAC-OP vorherrschend war. Bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen zeigte sich das Gegenteil. Der Kollagenquotient war erniedrigt und somit in Richtung des elastischeren Kollagen III verschoben.

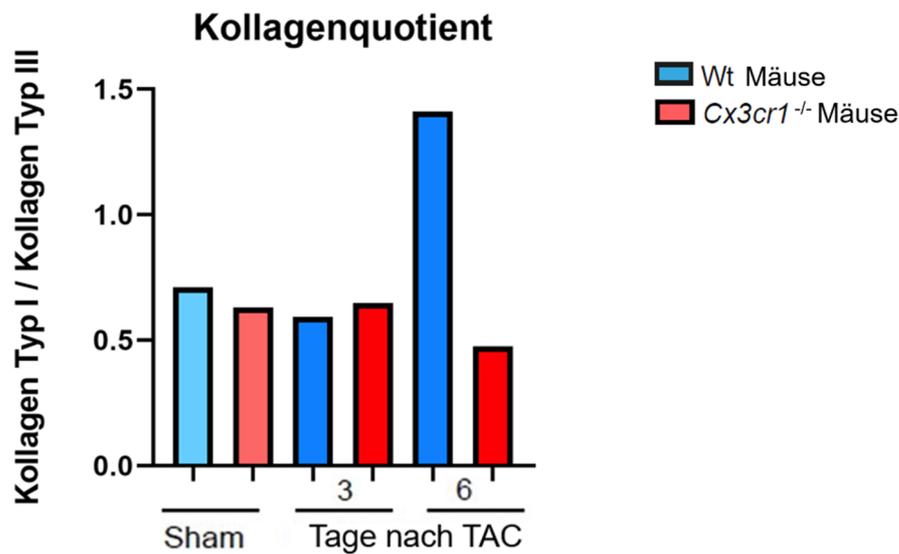


Abb. 13: Darstellung des vorherrschenden Kollagentypen anhand des Kollagenquotienten. Der Kollagenquotient bildet das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Kollagen Typ III anhand der qRT-PCR Daten, die in Abbildung 12 dargestellt sind. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

Die erhobenen PCR-Daten und der daraus errechnete Kollagenquotient zeigten somit bereits 6 Tage nach TAC-OP eine deutliche Dominanz des Kollagen I bei Wildtyp-Mäusen und des Kollagen III bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen.

3.2.3 Kollagen I im Gewebe (Pikro-Siriusrot-Färbung)

Basierend auf den mRNA-Expressionsdaten wurde im nächsten Schritt eine Überprüfung der Ergebnisse auf Proteinebene angestrebt. Hierfür wurden verschiedene histologische und immunfluoreszenzmikroskopische Techniken angewendet. Zunächst wurde mittels einer Pikro-Siriusrot-Färbung die Kollagenablagerung visualisiert. Mithilfe von polarisiertem Licht konnten zudem die unterschiedlichen Kollagenfasern differenziert werden. Zur Auswertung der histologischen Daten wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe ein MATLAB-basiertes Programm entwickelt, das eine objektive Analyse der histologischen Bilder ermöglichte (s. Kap. 2.8.1).

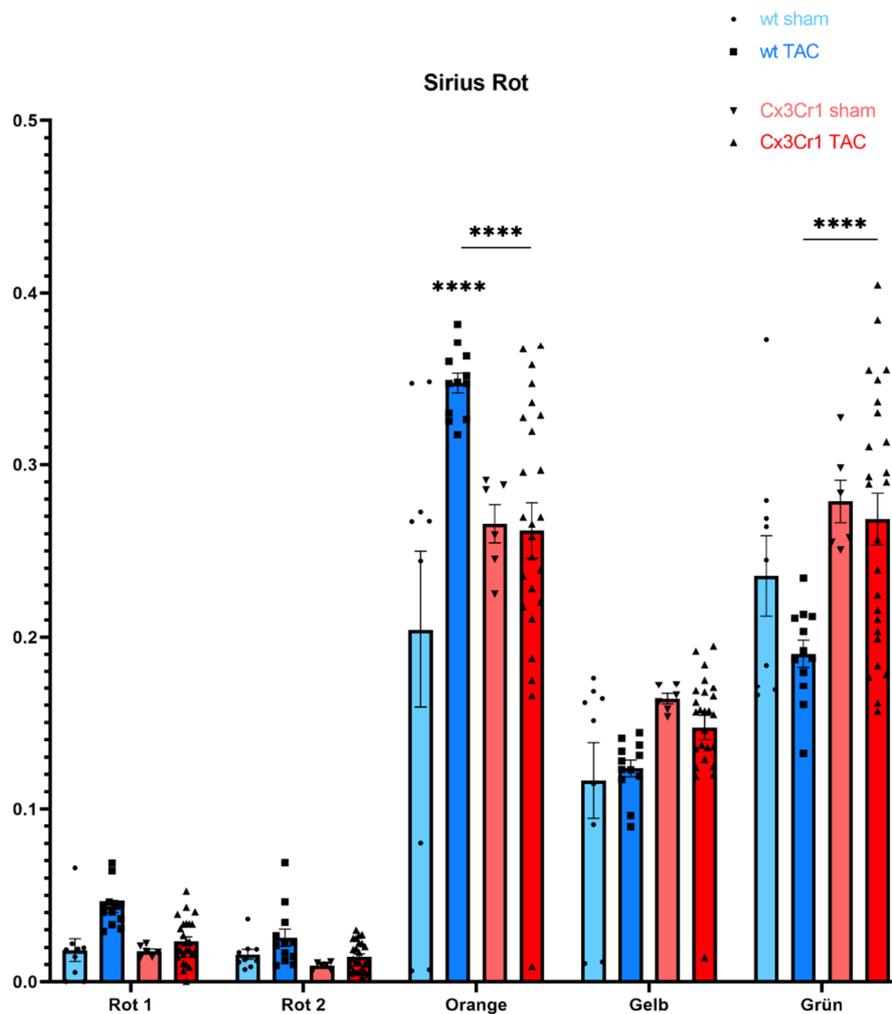


Abb. 14: Kollagen Deposition im Gewebe 21 Tage nach TAC. Auswertung der Piko-Siriusrot-gefärbten Gewebeschnitte unter polarisiertem Licht. Anhand eines MATLAB-basierten Algorithmus wurden die Aufnahmen in HSV-Bilder konvertiert und die einzelnen Pixel anhand der Farbwerte in die zugehörige Farbe gruppiert. Rot und Orange spiegeln den Gehalt an Kollagen I wider. Es wurde eine 2-way ANOVA durchgeführt zur Ermittlung der Signifikanzlevel. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 6-24$ Tiere pro Gruppe. * über einzelnen Balken entspricht der Angabe von signifikanten Unterschieden zwischen TAC- und der jeweiligen Sham-Gruppe; **** = $p < 0,0001$

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse der histologischen Auswertung bestätigten die qRT-PCR-Befunde. Mithilfe von polarisierendem Licht wurden die Kollagenanteile der Piko-Siriusrot gefärbten Herzschnitte in 5 verschiedene Gruppen eingeteilt, je nachdem welche Farbe im Rot-Orange-Grün-Spektrum sich zeigte. Rote und orange Kollagenfasern wurden als Kollagen I definiert, da die dicken Kollagen-I-Fasern unter polarisiertem Licht eine rot-orangene Farbe aufweisen. Grüne und gelbe Kollagenfasern wurden hingegen als Kollagen III definiert (Faulk et al., 2014; Junqueira et al., 1982). In den Wildtyp-

Mäusen war ein signifikanter Anstieg an Kollagen I 21 Tage nach TAC-OP sichtbar (s. Abb. 14). Im Gegensatz hierzu zeigte sich an den Herzschnitten der *Cx3cr1*^{-/-}-Mäuse keine erhöhte Ablagerung von Kollagen I im Gewebe. In Bezug auf Kollagen III waren innerhalb der Mauslinien zwischen TAC- und Sham-OP keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die *Cx3cr1*-defizienten Mäuse zeigten jedoch eine signifikant höhere Ablagerung von Kollagen III als die Wildtyp-Mäuse nach der TAC-OP.

Um Problemen bei der Auswertung durch eine erhöhte myokardiale Autofluoreszenz im Grünbereich entgegenzuwirken, wurden zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen für Kollagen III angefertigt. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Kollagen-III-Antikörper etabliert.

3.2.4 Kollagen III im Gewebe (Immunfluoreszenz-Färbung)

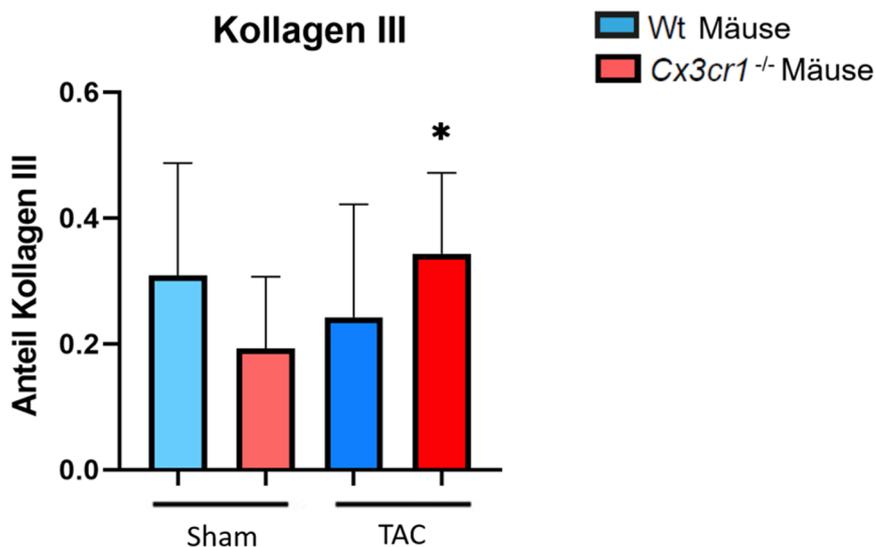


Abb. 15: Darstellung des Anteils der Kollagen-III-positiven Flächen an der Gesamtfläche. Die Mäuse wurden nach der jeweiligen Mauslinie (Wildtyp oder *Cx3cr1*^{-/-}) und TAC- bzw. Sham-Operation gruppiert. Die Auswertung erfolgte 21 Tage nach TAC-bzw. Sham-OP. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 6-8 Mäuse/Gruppe. * über einzelnen Balken entspricht der Angabe von signifikanten Unterschieden zwischen TAC- und der jeweiligen Sham-Gruppe; * = $p < 0,05$

Die Immunfluoreszenzfärbung der Herzschnitte mit anti-Kollagen-III-Antikörper zeigte einen signifikant höheren Anteil an Kollagen III in den *Cx3cr1*-defizienten Tieren im

Vergleich zur Sham-Gruppe (s. Abb. 15). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen des Kollagen-III-Anteils in der Wt-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe (s. Abb. 15). Wie in Abbildung 16 bereits deutlich erkennbar ist, bestätigte die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung somit die unterschiedliche Kollagen-III-Ablagerung im Gewebe der beiden Mausphänotypen in Reaktion auf die TAC-OP.

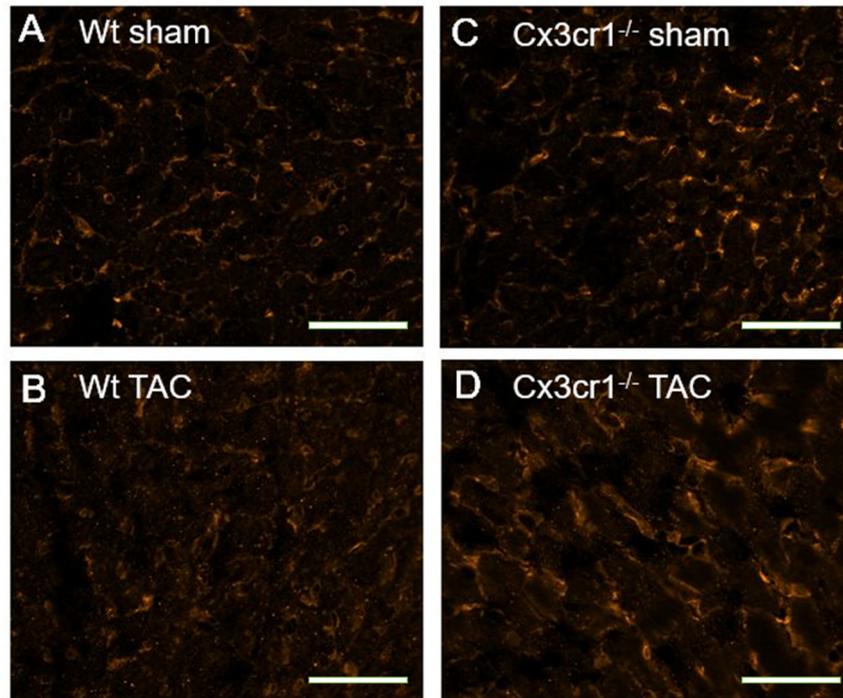


Abb. 16: Exemplarische Fotos der Kollagen-III-Färbung im Herzgewebe von Wildtyp und Cx3cr1^{-/-}-Mäusen. Die Färbung erfolgte zum Zeitpunkt 21 Tage nach TAC-bzw. Sham-OP. Mithilfe eines anti-Kollagen-III-Antikörpers wurden die Kollagenfasern im Herzgewebe der Mäuse angefärbt. A) Sham Wt-Mäuse B) Sham Cx3cr1^{-/-}-Mäuse C) TAC Wt-Mäuse D) TAC Cx3cr1^{-/-}-Mäuse. Die histologischen Bilder sind in 40-facher Vergrößerung dargestellt und die Messbalken entsprechen jeweils 50 µm.

Zusammenfassend lässt sich aus den erhobenen Daten zur Fibrosierung des Herzens festhalten, dass die Wildtyp-Mäuse als Reaktion auf die TAC-Behandlung mehr dickes und unflexibles Kollagen I bilden, während bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen das Verhältnis zugunsten einer Ablagerung des elastischeren Kollagen III verschoben ist.

4. Diskussion

Vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur und den Ergebnissen der Arbeitsgruppe untersucht diese Arbeit die Ursachen des kardioprotektiven Effekts in TAC-operierten *Cx3cr1*^{-/-}-Mäusen im Bereich des Gewebe-Remodelings. Insbesondere werden die Fibrosierungsprozesse des Myokards durch spezifische Kollagen I und III Analysen beleuchtet. Zudem wird die Rolle der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α anhand der durchgeführten Experimente untersucht.

4.1 Hypoxiemarker als Ausdruck der myokardialen Sauerstoffversorgung

Die Sauerstofftransportkapazität des Blutes und der Fluss durch die Koronararterien regulieren die Sauerstoffversorgung des Myokards. Als Reaktion auf eine akute oder chronische Hypoxie werden Gene wie HIF-1 und HIF-2 aktiviert, die mit Enzymen und anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, um die Vaskularisierung und das Gewebewachstum zu kontrollieren. Als Transkriptionsfaktor beeinflusst und reguliert HIF-1 die Expression zahlreicher Gene, die an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt sind, wenn sich die Sauerstoffkonzentration ändert (Ziello et al., 2007). Akute Hypoxie des Gewebes führt zu einer Erhöhung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , während dieser bei chronischer Hypoxie degradiert wird (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Takeda et al., 2010). In unserem Modell zeigte sich eine Herabregulierung der HIF-1 α Expression in Wt- und *Cx3cr1*^{-/-}-Tieren als Reaktion auf eine TAC-OP in den untersuchten Arealen des Herzens.

Diese Herabregulation war 21 Tage nach der TAC-Behandlung zu beobachten und deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die Phase der akuten Inflammation und akuten Hypoxie bereits abgeschlossen und in einen chronischen Prozess übergegangen war.

Die basale Expression von HIF-1 α in Wt- und *Cx3cr1*^{-/-}-Mäusen (s. Abb. 8) liegt wahrscheinlich in der Tatsache begründet, dass eine basale Expression von HIF-1 α auch ohne Hypoxie vorliegt, um die Energiebedürfnisse der Zelle abdecken (Stroka et al., 2001). Auf Basis unserer Daten (s. Abb. 8), die eine nahezu identische Regulation von HIF-1 α in Wt und *Cx3cr1*^{-/-}-Mäusen 21 Tage nach der chirurgischen Intervention zeigen, sowie dem aktuellen Stand der Wissenschaft, lässt sich festhalten, dass die erhaltene Pumpfunktion

in Cx3cr1^{-/-}-Mäusen eher nicht auf eine unterschiedliche Regulation von HIF-1 α zurückzuführen ist.

Untersuchungen von Hölscher et al. (2012) zeigen, dass eine Überexpression von HIF-1 α im TAC-Modell zu Herzversagen führen kann. Eine erhöhte Expression war in unseren Versuchen nicht zu beobachten.

4.1.1 HIF-2 α und die chronische Hypoxie

Vor dem Hintergrund, dass die Phase der akuten Inflammation zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits in die Phase des chronischen Gewebe-Remodelings übergegangen war, wurde die Expression des Hypoxiemarkers HIF-2 α genauer untersucht. HIF-2 α akkumuliert bei chronischer Hypoxie im Herzgewebe (Holmquist-Mengelbier et al., 2006).

Unsere Daten zeigen, dass tendenziell vermehrt HIF-2 α bei den TAC-operierten Mäusen im Vergleich zu den Sham-operierten Mäusen gebildet wird, was für die Entwicklung einer chronischen Hypoxie bei Druckbelastung des Herzens spricht. Der Anstieg von HIF-2 α im Rahmen der TAC-Behandlung in Wt-Mäusen steht im Einklang mit der aktuellen Literatur (Abe et al., 2019).

Pathophysiologisch gibt es ein enges Zusammenspiel von Hypoxie und Inflammation (Bartels et al., 2013). Studien zeigen, dass ein Fehlen von HIF-2 α in Makrophagen zu einer gestörten Zytokin-/Chemokin-Expression führt (Imtiyaz et al., 2010). Somit trägt der Transkriptionsfaktor HIF-2 α in Makrophagen zum Erhalt eines inflammatorischen Milieus bei (Imtiyaz et al., 2010). Der Verlust von HIF-2 α in myeloiden Zellen führt umgekehrt zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der Makrophagen (Imtiyaz et al., 2010). Wie bereits zuvor beschrieben, exprimieren insbesondere Monozyten und Makrophagen den Fraktalkinrezeptor. Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass genau diese Cx3cr1-positiven Makrophagen eine dominante Rolle in der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie spielen und im Herzgewebe nach TAC-OP akkumulieren (Weisheit et al., 2014). Somit lag anfangs die Vermutung nahe, dass die Funktion insbesondere der Makrophagen in Cx3cr1^{-/-}-Mäusen nach TAC-OP durch die Expression von HIF-2 α moduliert wird und damit die Unterschiede im kardialen Remodeling der

beiden untersuchten Mauslinien erklären könnte. Die Daten dieser Arbeit implizieren, dass es eine basal erhöhte Expression von HIF-2 α in den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen gibt.

Dass die Makrophagen-Migration durch HIF-2 α beeinflusst wird, ist eine interessante Beobachtung. Wichtig wäre allerdings vor allem die Spezifizierung des Einflusses auf die unterschiedlichen Makrophagentypen zu ergründen, was bisher noch nicht im Krankheitsbild der linksventrikulären Hypertrophie untersucht wurde. Diese Differenzierung zwischen den Makrophagengruppen ist im Rahmen meines Forschungsprojektes besonders interessant, da die regulatorischen Ly6C^{low}-Makrophagen eine zentrale Rolle im pathologischen kardialen Remodeling spielen (s. Kap. 4.2.3). Einen Anhaltspunkt für die unterschiedliche Reaktion von Makrophagen auf eine hypoxische Umgebung gibt die Studie von Abe et al. (2019), welche eine erhöhte Anzahl an Ly6C^{high}-Makrophagen in hypoxischen Arealen beobachteten, während die Konzentration von Ly6C^{low}-Makrophagen unverändert blieb.

Für weitere Forschungsarbeiten wäre es von großem Interesse, den Einfluss von HIF-2 α auf verschiedene Makrophagensubtypen zu untersuchen, um festzustellen, ob HIF-2 α eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung bestimmter Makrophagen ins Herzgewebe im Rahmen einer erhöhten Druckbelastung spielt. Zudem sind weitere Untersuchungen notwendig, um die hier erfassten Ergebnisse zu untermauern, da die Ergebnisse aus Abb. 8 und Abb. 10 nicht statistisch signifikant sind. Außerdem sind Details zur Regulation der Hypoxie-abhängigen Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie noch unbekannt.

Die Frage, die bei der Interpretation unserer Ergebnisse aufkommt, ist, weshalb basal von der Tendenz her bei den Wildtyp-Mäusen weniger HIF-2 α von den Kardiomyozyten produziert wird als bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen. Es liegt die Vermutung nahe, dass nicht allein hypoxische Bedingungen zu einer erhöhten Expression von HIF-1 α und HIF-2 α führen, sondern dass auch eine Induktion von HIF-1 α und HIF-2 α durch eine inflammatorische Reaktion erfolgen kann. Während HIF-1 α über Th1-Zytokine (z. B. INF- γ) induziert wird, wird die HIF-2 α Expression über Th2-Zytokine (z. B. IL-4) gefördert (Prabhakar und Semenza, 2012; Takeda et al., 2010). Vorstellbar wäre, dass es durch das Fehlen von Cx3cr1 in den Mäusen zu einer höheren inflammatorischen Aktivität des Immunsystems kommt, was auch bei den Sham-Tieren die basal erhöhte HIF-Expression erklären würde.

4.2 Die Fibrosierung des linken Ventrikels als Folge der Druckbelastung

Unsere Ergebnisse zur Fibrosierung des Herzens nach TAC liefern wichtige Hinweise, dass die veränderte Kollagenablagerung im Herzgewebe der Mäuse, insbesondere durch eine verminderte Kollagen-I-Ablagerung und eine erhöhten Kollagen-III-Ablagerung im Gewebe des linken Ventrikels, wesentlich den kardioprotektiven Faktor der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse bedingt. Hierbei übernehmen die Ly6C^{low}-Makrophagen möglicherweise die zentrale bzw. initiale Rolle, indem sie den Signalweg aktivieren, der letztendlich zu der verstärkten Fibrosierung führt.

4.2.1 Verminderte Kollagen-I-Expression im Gewebe der Cx3cr1^{-/-}-Mäusen als bestimmender Faktor der Kardioprotektion

Die erhöhte Kollagen-I-Expression im Herzgewebe der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse ließ sich nur auf mRNA-Ebene, nicht aber histologisch nachweisen (s. Abb. 12A und 14).

Die Auswertungen unserer histologischen Färbungen zeigen, dass das Herzgewebe von Wildtyp-Mäusen nach TAC mehr Kollagen I bei unverändertem Kollagen-III-Gehalt aufweist, während bei Cx3cr1^{-/-}-Mäusen mehr Kollagen III bei unverändertem Kollagen-I-Gehalt nachgewiesen wurde (s. Abb. 14 und 15). Somit wurde in der unveränderten Kollagen-I-Ablagerung in Reaktion auf die TAC-Operation bei Fehlen des Fraktalkinrezeptors ein entscheidender Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt. Kollagen I, welches etwa 85 % der Gesamt-Kollagenmenge im Herzen unter physiologischen Umständen ausmacht, ist vor allem für die Zugfestigkeit des Gewebes zuständig, während Kollagen III, welches etwa 11 % des Gesamt-Kollagens ausmacht, durch dünnere Fasern mit einer erhöhten Widerstandsfähigkeit einhergeht (Jugdutt, 2003).

Untersuchungen an Patienten mit LVH heben hervor, dass eine erhöhte Kollagen-I-Ablagerung im Herzgewebe, wie bei den Wildtyp-Mäusen in unserem Modell, zu einer erhöhten Rate an Hospitalisierungen, einer schlechteren kardialen Leistung und einer erhöhten Mortalität führt. Dies lässt sich laut Studien auf die erhöhte Steifheit des Herzens durch die vermehrte Anzahl an dicken Kollagen-I-Fasern zurückführen (Baicu et al., 2003; Echeagaray et al., 2017; Querejeta et al., 2004). Der fehlende Anstieg der Kollagen-I-Produktion

bei Cx3cr1-defizienten Mäusen könnte zu einem Erhalt der diastolischen Funktion des Herzens beitragen, da die passive Steifheit, welche durch die vermehrten dicken Kollagen-I-Fasern bei den Wildtyp-Mäusen vermittelt wird, wegfällt (Echegaray et al., 2017). Somit ist durch die Implikation der erhöhten Kollagen-I-Ablagerung mit einem schlechteren kardialen Outcome (s.o.) und der bekannten erhöhten passiven Steifheit des Herzgewebes ein wesentlicher Faktor gefunden worden, der die erhaltene Pumpfunktion in den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen erklärt.

Die Daten, welche aus der Auswertung der Pikro-Siriusrot-gefärbten Präparate gewonnen wurden, und die vermehrte Kollagen-I-Ablagerung bei erhöhter kardialer Druckbelastung belegen, sind von der steigenden Tendenz in Reaktion auf TAC her mit der Literatur vergleichbar (Matsusaka et al., 2006; Namba et al., 1997; Nemska et al., 2021). Auf mRNA-Ebene führt ein vergleichbares Modell von Nemska et al. (2021) bei den Wildtyp-Mäusen zu einer erhöhten Bildung von Kollagen I, wie in unseren Daten auch (s. Abb. 12A). Diverse Studien berichten von der Rolle der Fibrosierung im Rahmen der Linksherzhypertrophie als einen der Hauptfaktoren der langfristig pathologischen Anpassung des Herzens auf erhöhte kardiale Belastung, welches im Einklang mit den Daten dieser Arbeit steht (Berk et al., 2007; Díez, 2007; Díez et al., 1996).

Eine kürzlich publizierte Studie von Nemska et al. (2021) hat den Effekt eines Cx3cr1-Inhibitors bei TAC-Behandlung im Mausmodell untersucht. Die Wildtyp-Mäuse erhielten täglich ab dem Tag der TAC- oder Sham-Operation AZD8797, einen selektiven Cx3cr1-Antagonisten. Es zeigte sich, dass in Bezug auf Kollagen I auf mRNA-Ebene sowie im Herzgewebe eine nicht signifikant veränderte Fibrosierung bei den Mäusen, welche den selektiven Cx3cr1-Antagonisten erhielten, vorlag (Nemska et al., 2021). Die Autoren schlussfolgern somit, dass die Abwesenheit oder Blockade des Fraktalkinrezeptors einen Einfluss auf die Fibrosierung und somit die Pumpfunktion des Herzens hat. Die Pikro-Siriusrot-gefärbten Präparate wurden bei dieser Untersuchung lichtmikroskopisch analysiert, was keinen genauen Aufschluss über die Unterscheidung der Kollagenfasern zulässt. Es ist somit möglich, dass die unveränderte Fibrosierung, die bei den mit AZD8797 therapierten Mäusen zwischen den TAC- und Sham-operierten sichtbar war, zum größten Teil auf einer unveränderten Kollagen-I-Deposition beruht, da Kollagen I bezogen auf das Volumen einen größeren Anteil ausmacht als Kollagen III (s. Kap. 1.3.1). Unter dieser

Annahme stehen die Daten im Einklang mit den Daten dieser Arbeit, jedoch wäre zukünftig eine Aufschlüsselung der einzelnen Kollagentypen von Interesse.

Die Erkenntnisse der veränderten Fibrosierung bei Cx3cr1-Defizienz werden durch Untersuchungen an anderen Organen validiert (Helmke et al., 2019; Ishida et al., 2017; Li et al., 2008; Peng et al., 2015; Y et al., 2008). Helmke et al. (2019) haben im Rahmen der Peritonealdialyse Cx3cr1 als den Haupttreiber der Fibrose, vermittelt über die Zytokine IL-1 β und TGF- β , identifiziert. Obwohl die Daten zur Fibrosierung des Herzens nur begrenzt mit denen anderer Organe vergleichbar sind, können Untersuchungen an anderen Organen wichtige Hinweise auf die Rolle von Cx3cr1 bei der Kollagendeposition liefern. Bei den bisher untersuchten Organen wurde das Augenmerk auf die Fibrosierung allgemein gelegt, ohne verschiedene Kollagentypen zu unterscheiden.

In der Literatur werden stark voneinander abweichende Zahlen für den Kollagengehalt im Herzgewebe von Mäusen nach TAC- oder Sham-OP beschrieben. Die Daten dieser Arbeit liegen größtenteils in diesem Bereich (2 - 28 %) (Ge et al., 2020; Matsusaka et al., 2006; Nemska et al., 2021). Die deutlichen Unterschiede, welche in den unterschiedlichen Färbe- und Auswertemethoden auftreten, wurden von Sahu et al. (2020) exemplarisch an der Fibrosierung nach Myokardinfarkt dargelegt. Diese Unterschiede beruhen vor allem auf den unterschiedlich gewählten Auswertemethoden und der Fehleranfälligkeit von Färbemethoden. Um diese Problematik in dieser Arbeit zu adressieren, wurden individuelle Auswertemethoden herausgearbeitet und in der Methodik genau beschrieben, mit dem Ziel, die zukünftige Vergleichbarkeit zu erhöhen. Außerdem wurde in der Arbeitsgruppe ein Algorithmus mithilfe des MATLAB-Programms zur Quantifizierung von Pikro-Siriusrot-Färbungen erarbeitet, welcher zukünftig weitere Schnitte auf dieselbe Weise und ohne Bias auswerten kann (s. Kap. 2.8.1). Zusätzlich sind weitere Analysen des Kollagen-I- und III-Gehalts im linken Ventrikel von Mäusen mit verschiedenen Methoden nötig, um die Daten zukünftig genauer validieren zu können.

4.2.2 Die erhöhte Kollagen-III-Deposition könnte zu einem Erhalt der Pumpfunktion beitragen

Neben der verminderten Kollagen-I-Ablagerung im Gewebe der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse wurde eine vermehrte Kollagen-III-Deposition beobachtet (s. Abb. 15).

Da viele Untersuchungen zu der Fibrosierung des Herzens (oben näher beschrieben) nicht zwischen den unterschiedlichen Kollagentypen unterscheiden, gibt es weniger vergleichbare Daten. Im Jahr 1997 wurde bei spontan hypertensiven Ratten der Kollagen-III-Gehalt auf Proteinebene bestimmt, welcher analog zu den Daten dieser Arbeit bei den Wildtyp-TAC-Mäusen unverändert geblieben ist, während der Kollagenquotient in Richtung von Kollagen I verschoben wurde (Yang et al., 1997). Interessanterweise wurde in dieser Studie der Effekt von ACE-Hemmern im Rattenversuch untersucht und unter Anwendung von Captopril eine Hochregulation des Kollagen III bei unverändertem Kollagen-I-Gehalt, ähnlich zu den Daten der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse dieser Arbeit, beobachtet (Yang et al., 1997). Da Angiotensin II, welches durch ACE-Hemmer vermindert gebildet wird, eine zentrale Rolle in der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten einnimmt und im Rahmen der aktuellen Forschung (s. Kap. 1.3.1) die verminderte Bildung von Kollagen I in den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen wesentlich auf der verminderten Myofibroblastenbildung beruht, unterstützen die Daten von Yang et al. (1997) die Daten zur Rolle von Kollagen III in dieser Arbeit. Der Autor der Studie beschreibt das limitierte Wissen über die genauen Effekte, über die ein verändertes Kollagen-I-zu-III-Verhältnis zu dem verbesserten kardialen Outcome mit Captopril beiträgt. Die Limitation der Vergleichbarkeit liegen in den unterschiedlichen Tieren sowie Hypertoniemodellen, weshalb vergleichbare Studien bei Mäusen im TAC-Modell von besonderem Interesse wären.

In einigen vergleichbaren Studien zum TAC-Modell wird Kollagen III analog zu Kollagen I auf Proteinebene hochreguliert (Namba et al., 1997; Villarreal und Dillmann, 1992). Neben der Menge an Kollagen spielt auch die Vernetzung der Kollagenfasern eine erhebliche Rolle in der Ausführung der Funktion des Herzens (González et al., 2018b). Bis heute ist die genaue Rolle des Kollagen-III-Gehalts im Herzen nicht vollständig bekannt, da postuliert wurde, dass eine vermehrte Ablagerung von Kollagen III zu einer verminderten Übertragbarkeit der Kraft der Kardiomyozyten auf die Herzkammer führen kann (López et al., 2014). Dieses wurde jedoch bis heute nicht durch Forschungsergebnisse untermauert.

Die Daten dieser Arbeit und auch die von Yang et al. (1997) geben Hinweise darauf, dass eine (zumindest in einem gewissen Rahmen) erhöhte Kollagen-III-Produktion keine negativen Auswirkungen auf das Herz hat, sondern dass die dünneren und elastischeren Fasern möglicherweise wesentlich zu dem Erhalt der Pumpfunktion beitragen.

4.2.3 Die Rolle der Makrophagen und Cx3cr1 bei der Fibrosierung

Durch die chronisch überhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels, wie sie im TAC-Modell simuliert wird, wird eine inflammatorische Immunantwort hervorgerufen, die durch proinflammatorische Zytokine im kardialen Gewebe charakterisiert ist (Baumgarten et al., 2002). Diese Immunantwort wird vor allem durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten angeführt (Ismahil und Prabhu, 2021). Es ist wichtig, die verschiedenen Makrophagenpopulationen zu unterscheiden. Ly6C^{high}-Makrophagen (Cx3cr1^{low}) induzieren eine phagozytische, proteolytische und inflammatorische Reaktion. Dagegen zielen Ly6C^{low}-Makrophagen (Cx3cr1^{high}) auf die Akkumulation von Myofibroblasten, die Ablagerung von Kollagen und eine erhöhte Angiogenese ab, um die Heilung zu fördern (Nahrendorf et al., 2010). Insbesondere stimulieren sie Fibroblasten zur Differenzierung in Myofibroblasten, die als Haupttreiber der Fibrosierung gelten, vor allem durch die erhöhte Kollagen-I-Ablagerung (Kong et al., 2014; Weber, 2000).

In den Herzen von Wildtyp-Mäusen nimmt die Anzahl an Ly6C^{low} Makrophagen als Reaktion auf die erhöhte Druckbelastung stärker zu als bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen (Weisheit et al., 2014). Die Ly6C^{low}-Makrophagen sind mit einem langsameren und längeren Umbauprozess verbunden, wie er bei chronischer Druckbelastung auftritt, im Vergleich zu den Ly6C^{high}-Makrophagen, die vor allem bei akuter Ischämie präsent sind (Li et al., 2016; Weisheit et al., 2014). Analog zu den verschiedenen Aufgaben der Makrophagen ist auch die Zytokin-Expression der beiden Makrophagenpopulationen unterschiedlich. Die Ly6C^{low}-Makrophagen im Wildtyp sezernieren als Reaktion auf die erhöhte kardiale Druckbelastung vermehrt IL-10, um die Inflammation zu unterdrücken und profibrotische Prozesse zu aktivieren (Jung et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 und IL-1 β bei Cx3cr1-Defizienz stärker hochreguliert wurden als im Wildtyp (Weisheit et al., 2014).

Zusammenfassend führt die chronische Drucküberlastung bei den Wildtyp-Tieren am ehesten durch die Rekrutierung der Ly6C^{low}-Makrophagen zu einer prolongierten Stimulation der Kollagenproduktion über die Myofibroblasten, die normalerweise nur transient bei Schaden vorhanden sind. Dies stellt eine generelle Fehlregulation der eigentlich intendierten kurzfristigen Anpassung dar. Diese Vermutung wird durch andere Autoren unterstützt, die die erhöhte Fibrosierung auf eine kontinuierliche Schädigung zurückführen, bei der die Apoptose der kardialen Myofibroblasten ausbleibt (Porter und Turner, 2009).

Bei der Cx3cr1-Defizienz hingegen kommt es zu einer frühen proinflammatorischen Reaktion im Herzgewebe, welche eine verbesserte Anpassung des Herzens auf den erhöhten kardialen Stress zur Folge hat (Weisheit et al., 2021). In Abwesenheit des Fraktalkinrezeptors wird die Migration der Makrophagen hauptsächlich über CCL2 vermittelt, dessen potenzielle Rolle in der Fibrosierung noch geklärt werden muss.

Zusammenfassend lässt sich für die Fibrosierung festhalten, dass die Unterschiede zwischen den Mauslinien, welche in den Daten dieser Arbeit sichtbar werden, aus einer veränderten Immunantwort resultieren, die durch einen überwiegenden frühen proinflammatorischen Phänotyp gekennzeichnet ist. Dieses löst eine Signalkaskade aus, die zu einer verminderten Kollagen-I-Ablagerung im Gewebe der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse führt, was wesentlich für den Erhalt der Pumpfunktion verantwortlich ist. Es gibt Hinweise darauf, dass auch die erhöhte Kollagen-III-Ablagerung, welche ebenfalls bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen beobachtet wurde, zu einem Erhalt der Pumpfunktion und somit zum kardioprotektiven Effekt führt. Dieser Unterschied in der Kollagenablagerung im kardioprotektiven Mausphänotyp basiert am ehesten auf einer verminderten Rekrutierung von Ly6C^{low}-Makrophagen und einer daraus resultierenden veränderten Modulation der Fibroblasten, einschließlich einer verringerten Differenzierung zu Myofibroblasten.

4.3 Hypoxie und Fibrosierung – gibt es eine Verbindung?

Die Versorgung der Kardiomyozyten mit Sauerstoff wurde bislang in dieser Arbeit getrennt von der Fibrosierung betrachtet. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Hypoxie über die unterschiedliche Regulation von Makrophagen einen Einfluss auf die Fibrosierung hat.

Wie bereits geschildert, besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Hypoxie und dem Immunsystem sowie zwischen dem Immunsystem und der Fibrosierung (Nahrendorf et al., 2010; Prabhakar und Semenza, 2012). Zusammen mit den bereits erhobenen Daten der Arbeitsgruppe und der Tatsache, dass der Fraktalkinrezeptor vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, scheint das angeborene Immunsystem eine Schlüsselrolle im pathologischen kardialen Remodeling zu spielen.

Experimentell wurde diese Hypothese von Abe et al. (2019) untersucht, die gezeigt haben, dass HIF-1 α knock-out Mäuse eine erhöhte Fibrosierung als Reaktion auf die erhöhte kardiale Druckbelastung aufweisen, verbunden mit einer erhöhten Anzahl an Myofibroblasten. Im Rahmen der Untersuchung eines AV-Implantats für die Dialyse wurde festgestellt, dass HIF-1 α einen direkten Einfluss auf die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten hat (Misra et al., 2010). Da die Daten dieser Arbeit jedoch keine unterschiedliche Regulation dieses Transkriptionsfaktors in der chronischen Phase zeigen konnte, wird vermutet, dass ein anderer Mechanismus über die verschiedenen Makrophagenpopulationen vermittelt wird.

Abe et al. (2019) haben in hypoxischen Arealen eine erhöhte Menge von Ly6C^{high}-Makrophagen beobachtet, während die Konzentration von Ly6C^{low}-Makrophagen unverändert blieb. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen der Hypoxie-Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Fibrosierung führt, möglicherweise durch eine verminderte Rekrutierung der Ly6C^{high}-Makrophagen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem kardioprotektiven Effekt der frühen proinflammatorischen Antwort, welcher unter anderem durch die verstärkte Rekrutierung von Ly6C^{high}-Makrophagen bei Cx3cr1^{-/-}-Mäusen zustande kommt (Weisheit et al., 2021).

Es gibt somit auch in unseren Ergebnissen deutliche Hinweise darauf, dass die Hypoxie über die Immunantwort gesteuert einen bedeutenden Einfluss auf die Fibrosierung des Herzens hat. Dennoch sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den genauen Zusammenhang der einzelnen Faktoren und ihr Zusammenspiel zu verstehen.

4.4 Bedeutung für zukünftige Forschung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es im Rahmen des kardialen Remodelings als Reaktion auf die erhöhte kardiale Druckbelastung wichtige Unterschiede zwischen den untersuchten Mauslinien gibt, welche den kardioprotektiven Effekt begründen. Insbesondere die verminderte Kollagen-I-Ablagerung bei Cx3cr1-Defizienz ist mit einer Kardioprotektion assoziiert (Echegaray et al., 2017; Querejeta et al., 2004).

Angesichts der Erkenntnis, dass eine erhöhte Fibrosierung des Herzens mit einer deutlich erhöhten Mortalität einhergeht, gibt es viele Bemühungen, neue medikamentöse Ziele zur Regulation der Kollagenakkumulation zu identifizieren. Der Fraktalkinrezeptor könnte hierbei ein wichtiger neuer Ansatz sein, der über die unterschiedliche Rekrutierung von Makrophagen zu einer veränderten Immunantwort mit einer modulierten Fibrosierung führt.

Es gibt seit längerem Bemühungen, effektive Cx3cr1-Inhibitoren zu entwickeln, aufgrund der Rolle dieses Rezeptors in verschiedenen Erkrankungen wie Atherosklerose und Diabetes (Chen et al., 2020; Karlström et al., 2013). AZD8797, ein selektiver Cx3cr1-Inhibitor, wurde von Nemska et al. (2021) im TAC-Modell an Mäusen untersucht. Die Mäuse erhielten ab dem Tag der TAC-OP den Cx3cr1-Inhibitor, und ähnlich wie den Daten dieser Arbeit wurde bei Cx3cr1-Defizienz (durch Blockade des Rezeptors) ein kardioprotektiver Effekt beobachtet. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieser Daten sowie zur Untersuchung potenzieller Nebenwirkungen sind nötig, um den umfassenden Effekt der Cx3cr1-Blockade zu verstehen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob der kardioprotektive Effekt auch dann beobachtet wird, wenn der Inhibitor erst einige Tage nach der TAC-OP eingeführt wird, da Bluthochdruck oder die Aortenstenose oft schon lange vor der Diagnose bestehen.

Die erhöhte Konzentration von HIF-2 α im Herzen der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse erfordert weitere genaue Untersuchungen, da eine systemisch erhöhte HIF-2 α Konzentration aufgrund der Assoziation des VEGF mit verstärkter Tumorprogression potenziell negative Effekte auf das Überleben haben könnte. In der Behandlung von Tumorerkrankungen werden derzeit HIF-2 α -Inhibitoren entwickelt und getestet, jedoch ist noch keiner klinisch zugelassen (Albadari et al., 2019). Daher wären weitere Untersuchungen zu den Auswirkungen der

Blockade des Transkriptionsfaktors HIF-2 α auf die Entwicklung einer LVH bzw. der Einfluss auf eine bereits bestehende LVH von besonderem Interesse, da die Daten dieser Arbeit nahelegen, dass die erhöhte Expression von HIF-2 α bei Cx3cr1^{-/-}-Mäusen mit deren kardioprotektiven Effekt in Verbindung stehen könnte.

Das Ziel dieser Forschung ist es, den kardioprotektiven Effekt, der bei Mäusen beobachtet wurde, auch bei Menschen durch pharmakologische Ansätze zu erreichen. Die Makrophagen, die eine Schlüsselrolle in der unterschiedlichen Immunantwort der beiden Mauslinien dieser Arbeit begründen, können auch mit großen Gemeinsamkeiten in Menschen identifiziert werden (Nahrendorf et al., 2010). Nach aktuellem Wissen stellen die Ly6C^{high}-Makrophagen die CD14⁺ CD16⁻-Makrophagen im Menschen dar, während die Ly6C^{low}-Makrophagen die CD14^{low} CD16⁺-Makrophagen repräsentieren (Geissmann et al., 2003; Nahrendorf und Swirski, 2013). Es wurden jedoch auch gewisse Unterschiede beobachtet, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Rolle von Makrophagen und dem Fraktalkinrezeptor im menschlichen Herzgewebe zu untersuchen und dadurch die Übertragbarkeit der Daten dieser Arbeit auf den Menschen weiter zu erörtern (Nahrendorf et al., 2010).

Eine wichtige Limitation hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen liegt darin, dass sich die Immunreaktion im Rahmen des pathologischen kardialen Remodelings je nach zugrunde liegender Erkrankung (s. Kap. 1.1) unterscheiden kann. Daher sind weitere Untersuchungen zum kardialen Remodeling bei verschiedenen Grunderkrankungen und der Korrelation zur Immunantwort notwendig.

Zusammenfassend gibt es Hinweise darauf, dass eine Blockade des Cx3cr1-Rezeptors einen kardioprotektiven Effekt hat. Es ist möglich, dass ähnliche kardioprotektive Effekte durch vergleichbare Makrophagensubtypen auch beim Menschen beobachtet werden könnten. Hierzu sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

4.5 Modell-Limitationen

HIF wird konstitutiv exprimiert und unter ausreichender Sauerstoffversorgung schnell abgebaut. In dieser Arbeit wurde eine höhere Menge an HIF-1 α und HIF-2 α gemessen im Vergleich zu Studien, die sich ausschließlich auf die Konzentration im Zellkern konzentriert haben (Stroka et al., 2001). Da jedoch das Interesse hier nicht der absolute Gehalt, sondern vielmehr die Unterschiede nach TAC-Behandlung waren, wurde das grundlegend produzierte HIF als konstant gesehen. Zudem wird eine erhöhte zytoplasmatische Stabilisierung von HIF-1 α mit erhöhter Hypoxie in Verbindung gebracht, da dieses im Zytoplasma stabilisiert wird, bevor es in den Zellkern transportiert wird (Stroka et al., 2001).

5. Zusammenfassung

Die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) als Resultat der chronisch erhöhten linksventrikulären Druckbelastung ist ein häufiges Krankheitsbild mit einer hohen Übergangsrate in eine Herzinsuffizienz. Vor diesem Hintergrund ist die Erkenntnis der Kardioprotektion der Cx3cr1-defizienten Mäuse von besonderem Interesse. Cx3cr1, auch Fraktalkinrezeptor genannt, ist ein Chemokinrezeptor, der vor allem auf Makrophagen exprimiert wird und dem eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird. Um die Mechanismen zu untersuchen, die der Kardioprotektion im Cx3cr1-knock-out Modell zugrunde liegen, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die Hypoxie der Kardiomyozyten als auch die Fibrosierung anhand von Kollagen I und III analysiert.

Bei 12 Wochen alten Wildtyp- und Cx3cr1^{-/-}-Mäusen (n = 63) wurde eine transaortale Konstriktion (TAC) bzw. eine Sham-OP durchgeführt. In vorausgegangenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass die Immunantwort im Herzen der Mäuse bei dem TAC-Modell vor allem durch Makrophagen geprägt ist (Weisheit et al., 2014). Den Reparatur Makrophagen (Ly6C^{low}, Cx3cr1^{high}) wurde hierbei eine zentrale Rolle im pathologischen Remodeling zugesprochen (Weisheit et al., 2014). Durch die Verknüpfung von Hypoxie und der Immunantwort, insbesondere der Makrophagenreaktion, wurde in dieser Arbeit zunächst anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen (n = 3 Mäuse pro Gruppe: Sham Wt-Mäuse, Sham Cx3cr1^{-/-}-Mäuse, TAC Wt-Mäuse, TAC Cx3cr1^{-/-}-Mäuse) die Hypoxie im Herzgewebe nach TAC untersucht. Dies erfolgte durch die Analyse des Transkriptionsfaktors der akuten Hypoxie (HIF-1 α) und der chronischen Hypoxie (HIF-2 α). Die Ergebnisse dieser Färbungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausphänotypen, jedoch konnten Tendenzen erkannt werden. HIF-1 α wurde in beiden Mausphänotypen nach der TAC-OP herunterreguliert, was auf einen bereits stattgefundenen Übergang von einer akuten zu einer chronischen Hypoxie-Reaktion zu diesem Zeitpunkt hinweist. HIF-2 α hingegen wurde basal bei den Cx3cr1^{-/-}-Mäusen vermehrt exprimiert und zeigte keine wesentliche Veränderung bei erhöhter kardialer Druckbelastung, während die Kardiomyozyten des Wildtyps in Reaktion auf die TAC-OP tendenziell vermehrt HIF-2 α exprimierten.

Die Fibrosierung des Herzens wurde zunächst anhand der Bestimmung der mRNA mittels quantitativen Real-Time PCR (n = 6-14 Mäusen pro Gruppe) untersucht. Diese Analysen

ergaben eine signifikante Zunahme des Kollagen I nach TAC-OP bei beiden Mausphänotypen und des Kollagen III bei Fehlen des Fraktalkinrezeptors. Für die Analyse der Kollagenablagerung im Gewebe wurden verschiedene histologische Färbungsmethoden eingesetzt. Kollagen I wurde anhand von Piko-Siriusrot-gefärbten Präparaten (n = 6-24 Mäuse pro Gruppe) unter polarisiertem Licht mithilfe eines MATLAB-basierten Algorithmus analysiert und quantifiziert. Die Auswertungen zeigten eine signifikant erhöhte Kollagen-I-Akkumulation nur bei den Wildtyp-Mäusen. Mittels Immunfluoreszenz-Färbung wurde der Gehalt an Kollagen III im Herzwewebe Mäuse (n = 6-8 Mäuse pro Gruppe) bestimmt. Dabei zeigten nur die Cx3cr1^{-/-}-Mäuse eine signifikant erhöhte Kollagen-III-Ablagerung im Herzwewebe als Reaktion auf die erhöhte Druckbelastung.

Zusammenfassend lässt sich der beobachtete kardioprotektive Phänotyp der Cx3cr1^{-/-}-Mäuse am ehesten auf eine veränderte Kollagenablagerung zurückführen. Diese zeichnet sich durch eine verminderte Ablagerung des unflexibleren Kollagen I und einer vermehrten Akkumulation des elastischeren Kollagen III aus. Zusätzlich scheint die veränderte Regulation der Transkriptionsfaktoren für chronische Hypoxie einen Einfluss auf die Makrophagen-Motilität zu haben, welche wiederum die Fibrosierung beeinflussen. Die Inhibition des Fraktalkinrezeptors stellt somit ein vielversprechendes zukünftiges Therapieziel in der Behandlung der LVH und der häufig daraus resultierenden Herzinsuffizienz dar.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Linksventrikuläre Hypertrophie.....	8
Abbildung 2: Grafische Darstellung der Durchblutung des Herzens durch die Koronararterien.....	10
Abbildung 3: Darstellung des Entstehungsmechanismus des pathologischen myokardialen Remodelings.....	13
Abbildung 4: Die Entstehung der myokardialen interstitiellen Fibrose.....	15
Abbildung 5: Grafische Darstellung der Auswirkung der TAC-OP auf den linken Ventrikel der Mäuse	17
Abbildung 6: Der kardioprotektive Effekt der Cx3cr1 ^{-/-} -Mäuse bei chronisch überhöhter Druckbelastung	19
Abbildung 7: Exemplarisches Foto eines Mauserzens.....	33
Abbildung 8: Darstellung des Anteils der HIF-1 α positiven Flächen an der Gesamtfläche.	34
Abbildung 9: Exemplarische Fotos der HIF-1 α gefärbten Herzschnitte.....	35
Abbildung 10: Darstellung der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von HIF-2 α	36
Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Expression von HIF-2 α	37
Abbildung 12: Darstellung der relativen Menge an mRNA von (A) Kollagen I und (B) Kollagen III im linken Ventrikel.	39
Abbildung 13: Darstellung des vorherrschenden Kollagentypen anhand des Kollagenquotienten	40
Abbildung 14: Kollagen Deposition im Gewebe 21 Tage nach TAC	41
Abbildung 15: Darstellung des Anteils der Kollagen-III-positiven Flächen an der Gesamtfläche.....	42
Abbildung 16: Exemplarische Fotos der Kollagen-III-Färbung im Herzgewebe von Wildtyp und Cx3cr1 ^{-/-} -Mäusen.....	43

7. Literaturverzeichnis

Abe H, Takeda N, Isagawa T, Semba H, Nishimura S, Morioka MS, Nakagama Y, Sato T, Soma K, Koyama K, Wake M, Katoh M, Asagiri M, Neugent ML, Kim J-W, Stockmann C, Yonezawa T, Inuzuka R, Hirota Y, Maemura K, Yamashita T, Otsu K, Manabe I, Nagai R, Komuro I. Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nat Commun* 2019; 10: 2824

Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2020; 17: 269–285

Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Drug Discov* 2019; 14: 667–682

Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2019: Epidemiologie, Risiko- und Prognosefaktoren. <https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/version-4/kapitel-2> (Zugriffsdatum: 30.01.2024)

Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2023: Medikamentöse Therapie. <https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz/version-4/kapitel-6> (Zugriffsdatum: 30.01.2024)

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Luvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; 317: 666–670

Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, Zile MR. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 122-132

Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, Mohan J, Ivey B, Hsiao HM, Weinheimer C, Kovacs A, Epelman S, Artyomov M, Kreisel D, Lavine KJ. Tissue Resident CCR2⁻ and CCR2⁺ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res* 2019; 124: 263–278

Bartels K, Grenz A, Eltzschig HK. Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 18351–18352

Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-Dependent and -Independent Regulation of Proinflammatory Cytokine and Cytokine Receptor Gene Expression in the Adult Mammalian Heart. *Circulation* 2002; 105: 2192–2197

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 568–575

Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, Straus SMJM, Hofman A, Deckers JW, Witteman JCM, Stricker BHC. Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2004; 25: 1614–1619

Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 671–677

Chan JKC. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int J Surg Pathol* 2014; 22: 12–32

Chen G, Zhou Z, Sha W, Wang L, Yan F, Yang X, Qin X, Wu M, Li D, Tian S, Chen G. A novel CX3CR1 inhibitor AZD8797 facilitates early recovery of rat acute spinal cord injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Mol Med* 2020; 45: 1373–1384

Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, Bahonar A, Chifamba J, Dagenais G, Diaz R, Kazmi K, Lanan F, Wei L, Lopez-Jaramillo P, Fanghong L, Ismail NH, Puoane T, Rosengren A, Szuba A, Temizhan A, Wielgosz A, Yusuf R, Yusufali A, McKee M, Liu L, Mony P, Yusuf S. Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Rural and Urban Communities in High-, Middle-, and Low-Income Countries. *JAMA* 2013; 310: 959–968

Cormican S, Griffin MD. Fractalkine (CX3CL1) and Its Receptor CX3CR1: A Promising Therapeutic Target in Chronic Kidney Disease? *Front Immunol* 2021; 12: 664202

Cuspidi C, Sala C, Negri F, Mancia G, Morganti. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies. *J Hum Hypertens* 2012; 26: 343–349

de Simone G, Gottdiener JS, Chinali M, Maurer MS. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *Eur Heart J* 2008; 29: 741–747

deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp* 2010; 38: 1729

Díez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2007; 9: 546–550

Díez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernández M, Pardo Mindán J. Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 1996; 93: 1026–1032

Echegaray K, Andreu I, Lazkano A, Villanueva I, Sáenz A, Elizalde MR, Echeverría T, López B, Garro A, González A, Zubillaga E, Solla I, Sanz I, González J, Elósegui-Artola A, Roca-Cusachs P, Díez J, Ravassa S, Querejeta R. Role of Myocardial Collagen in Severe Aortic Stenosis With Preserved Ejection Fraction and Symptoms of Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2017; 70: 832–840

Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seiffter S, Blumenfeld OO. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 267–276

Eichhorn L, Weisheit CK, Gestrich C, Peukert K, Duerr GD, Ayub MA, Erdfelder F, Stöckigt F. A Closed-chest Model to Induce Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Vis Exp* 2018; 134: 57397

EKG & ECHO, 2021: Die Koronararterien. <https://ekgecho.de/thema/koronararterien-anatomie-physiologie-ekg/> (Zugriffsdatum: 28.01.2024)

Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, Brija T, Gautier EL, Ivanov S, Satpathy AT, Schilling JD, Schwendener R, Sergin I, Razani B, Forsberg EC, Yokoyama WM, Unanue ER, Colonna M, Randolph GJ, Mann DL. Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity* 2014; 40: 91–104

Faulk DM, Londono R, Wolf MT, Ranallo CA, Carruthers CA, Wildemann JD, Dearth CL, Badylak SF. ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh. *Biomaterials* 2014; 35: 8585–8595

Garcia-Menendez L, Karamanlidis G, Kolwicz S, Tian R. Substrain specific response to cardiac pressure overload in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305: 397-402

Ge Q, Zhao L, Liu C, Ren X, Yu YH, Pan C, Hu Z. LCZ696, an Angiotensin Receptor-Nepilysin Inhibitor, Improves Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Cardiac Lymphatic Remodeling in Transverse Aortic Constriction Model Mice. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 7256862

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19: 71–82

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1531–1546

González A, Ravassa S, López B, Moreno MU, Beaumont J, San José G, Querejeta R, Bayés-Genís A, Díez J. Myocardial Remodeling in Hypertension. *Hypertension* 2018a; 72: 549–558

González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2018b; 71: 1696–1706

Hadi AM, Mouchaers KTB, Schaliij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, van der Laarse WJ, Beliën JAM. Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. *Cell Oncol (Dordr)* 2011; 34: 343–354

Hellawell JL, Margulies KB. Myocardial reverse remodeling. *Cardiovasc Ther* 2012; 30: 172–181

Helmke A, Nordlohne J, Balzer MS, Dong L, Rong S, Hiss M, Shushakova N, Haller H, von Vietinghoff S. CX3CL1–CX3CR1 interaction mediates macrophage-mesothelial cross talk and promotes peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 2019; 95: 1405–1417

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L, Pählman S. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10: 413–423

Hölscher M, Schäfer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, Lin Y, Pichler BJ, Thistlethwaite P, El-Armouche A, Maier LS, Katschinski DM, Ziesenis A. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 77–86

Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* 2019; 1897: 299–311

Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 2010; 120: 2699–2714

Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Hemmi H, Sasaki I, Kaisho T, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. *Sci Rep* 2017; 7: 16833

Ismahil MA, Prabhu SD. Resident Macrophages in the Heart: Cardioprotective Under Pressure. *Circ Res* 2021; 129: 1102–1104

Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989; 64: 1041–1050

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003; 108: 1395–1403

Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, Lindsey ML. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 2017; 112: 33

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4106–4114

Junqueira LCU, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry* 1982; 74: 153–156

Kalbfleisch H, Hort W. Die Verteilungsmuster der Koronararterien (Versorgungstypen) des menschlichen Herzens. *Dtsch Med Wochenschr* 1976; 101: 1092–1097

Karlström S, Nordvall G, Sohn D, Hettman A, Turek D, Åhlin K, Kers A, Claesson M, Slivo C, Lo-Alfredsson Y, Petersson C, Bessidskaia G, Svensson PH, Rein T, Jerning E,

Malmberg Å, Ahlgen C, Ray C, Vares L, Ivanov V, Johansson R. Substituted 7-amino-5-thio-thiazolo[4,5-d]pyrimidines as potent and selective antagonists of the fractalkine receptor (CX3CR1). *J Med Chem* 2013; 56: 3177–319

Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 549–574

Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherosclerosis by promoting cell survival. *Blood* 2009; 113: 963–972

Li JKJ. Comparative cardiac mechanics: Laplace's law. *J Theor Biol* 1986; 118: 339–343

Li L, Guo X, Chen Y, Yin H, Li J, Doan J, Liu Q. Assessment of Cardiac Morphological and Functional Changes in Mouse Model of Transverse Aortic Constriction by Echocardiographic Imaging. *J Vis Exp* 2016; 112: 54101

Li L, Huang L, Sung SSJ, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int* 2008; 74: 1526–1537

López B, González A, Querejeta R, Larman M, Rábago G, Díez J. Association of cardiotrophin-1 with myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. *Hypertension* 2014; 63: 483–489

Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5: 378–389

Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted Deletion of Matrix Metalloproteinase 2 Ameliorates Myocardial Remodeling in Mice With Chronic Pressure Overload. *Hypertension* 2006; 47: 711–717

Misra S, Fu AA, Misra KD, Shergill UM, Leof EB, Mukhopadhyay D. Hypoxia-induced phenotypic switch of fibroblasts to myofibroblasts through a matrix metalloproteinase 2/tissue inhibitor of metalloproteinase-mediated pathway: implications for venous neointimal hyperplasia in hemodialysis access. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21: 896–902

Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010; 121: 2437–244

Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circ Res* 2013; 112: 1624–1633

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 387–407

Namba T, Tsutsui H, Tagawa H, Takahashi M, Saito K, Kozai T, Usui M, Imanaka-Yoshida K, Imaizumi T, Takeshita A. Regulation of Fibrillar Collagen Gene Expression and Protein Accumulation in Volume-Overloaded Cardiac Hypertrophy. *Circulation* 1997; 95: 2448–2454

Nemška S, Gassmann M, Bang ML, Frossard N, Tavakoli R. Antagonizing the CX3CR1 Receptor Markedly Reduces Development of Cardiac Hypertrophy After Transverse Aortic Constriction in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2021; 78: 792–801

Neuhauser H, Kuhnert R, Born S. 12-Monats-Prävalenz von Bluthochdruck in Deutschland. *J Health Monit* 2017; 1: 57-63

Paudel P, Chalise S, Neupane DR, Adhikari N, Paudel S, Dangi NB. Prevalence of Hypertension in a Community. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2020; 58: 1011–1017

Peng X, Zhang J, Xiao Z, Dong Y, Du J. CX3CL1-CX3CR1 Interaction Increases the Population of Ly6C(-)CX3CR1(hi) Macrophages Contributing to Unilateral Ureteral Obstruction-Induced Fibrosis. *J Immunol* 2015; 195: 2797–2805

Pflaumbaum A. Chronische Herzinsuffizienz: Strukturierte Versorgung auf verschiedenen Stufen. *Dtsch Arztebl* 2018; 115: 13-16

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 2009; 123: 255–278

Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* 2012; 92: 967–1003

Querejeta R, López B, González A, Sánchez E, Larman M, Martínez Ubago JL, Díez J. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 2004; 110: 1263–1266

Ravi, 2024: Left Ventricular Hypertrophy (LVH) – Symptoms, Causes and Treatment. <https://vims.ac.in/vims-hospital/left-ventricular-hypertrophy-lvh-symptoms-causes-and-treatment/> (Zugriffsdatum: 28.01.2024)

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor

transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8277–8281

Sahu SP, Liu Q, Prasad A, Hasan SMA, Liu Q, Rodriguez MXB, Mukhopadhyay O, Burk D, Francis J, Mukhopadhyay S, Fu X, Gartia MR. Characterization of fibrillar collagen isoforms in infarcted mouse hearts using second harmonic generation imaging. *Biomed Opt Express* 2020; 12: 604–618

Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *PROMETHEUS Innere Organe*. Stuttgart: Thieme 2015; 108-124

Shinagawa H, Frantz S. Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages. *Curr Heart Fail Rep* 2015; 12: 247–254

Siliter M, Kögler H, Zieseniss A, Wilting J, Schäfer K, Toischer K, Rokita AG, Breves G, Maier LS, Katschinski DM. Impaired Ca²⁺-handling in HIF-1alpha(+/-) mice as a consequence of pressure overload. *Pflugers Arch* 2010; 459: 569–577

Simmonds SJ, Cuijpers I, Heymans S, Jones EAV. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. *Cells* 2020; 9: 242

Slivnick J, Lampert BC. Hypertension and Heart Failure. *Heart Fail Clin* 2019; 15: 531–541

Stanchev S, Stamenov N, Kirkov V, Dzhambazova E, Nikolov D, Paloff A. Differential collagen expression in kidney and heart during hypertension. *Bratisl Lek Listy* 2020; 121: 73–78

Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DAH, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001; 15: 2445–2453

Takeda N, O’Dea EL, Doedens A, Kim J, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS. Differential activation and antagonistic function of HIF- $\{\alpha\}$ isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev* 2010; 24: 491–501

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349–363

Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 1992; 262: 1861-1866

Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15: 264–272

Wei S, Chow LTC, Shum IOL, Qin L, Sanderson JE. Left and right ventricular collagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction. *J Card Fail* 1999; 5: 117–126

Weisheit C, Zhang Y, Faron A, Köpke O, Weisheit G, Steinsträsser A, Frede S, Meyer R, Boehm O, Hoeft A, Kurts C, Baumgarten G. Ly6C(low) and not Ly6C(high) macrophages accumulate first in the heart in a model of murine pressure-overload. *PLoS One* 2014; 9: 112710

Weisheit CK, Kleiner JL, Rodrigo MB, Niepmann ST, Zimmer S, Duerr GD, Coburn M, Kurts C, Frede S, Eichhorn L. CX3CR1 is a prerequisite for the development of cardiac

hypertrophy and left ventricular dysfunction in mice upon transverse aortic constriction. *PLoS One* 2021; 16: 0243788

Y I, Ji G, Pm M. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol* 2008; 180: 569-579

Yang CM, Kandaswamy V, Young D, Sen S. Changes in collagen phenotypes during progression and regression of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 236–245

Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51–60

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation und der Forschungsarbeiten unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Doktormutter, Frau PD Dr. med. Christina K. Weisheit, für die enorme Unterstützung sowohl bei der Datenerhebung als auch bei der wissenschaftlichen Ausarbeitung. Zudem danke ich ihr für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit, die Erkenntnisse dieser Forschung auf dem Hauptstadtkongress für Anästhesiologie und Intensivmedizin (HAI) 2022 in Berlin vorzustellen.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stilla Frede, die sich immer Zeit genommen hat und mir bei Fragen oder Problemen stets zur Seite stand und immer einen guten Lösungsvorschlag bereit hatte.

Die Arbeit vor Ort im Labor wurde mir sehr erleichtert durch alle Mitarbeiter des anästhesiologischen Forschungslabors, vor allem durch den Biologielaboranten Jan Kleiner, weshalb ich mich bei dem gesamten Team und Herrn Kleiner speziell sehr bedanken möchte.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung sowohl im Studium als auch bei der Anfertigung der Dissertation danken.