

**Die Rolle des CC-Chemokins Monozyten-Chemoattraktor-
Protein-1 in einem Mausmodell
der ischämischen Kardiomyopathie**

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

**Daniela Katharina Krämer
aus Prüm**

2009

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Welz**
- 2. Gutachter: PD Dr. med. Georg Baumgarten**

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.09.2009

**Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
der Universitätsklinik Bonn
Direktor Univ. Professor Dr. med. Armin Welz**

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
2. EINLEITUNG	8
2.1 KORONARE HERZKRANKHEIT.....	8
2.2 ANGINA PECTORIS	8
2.3 HIBERNIERENDES MYOKARD	9
2.4 INFLAMMATORISCHE PROZESSE NACH ISCHÄMIE UND REPERFUSION	11
2.5 CHEMOKINE BEI INFLAMMATORISCHEN PROZESSEN.....	13
2.5.1 Struktur und Genlokalisierung der Chemokine.....	13
2.5.2 Funktion der Chemokine.....	13
2.6 MONOZYTEN-CHEMOATTRAKTOR-PROTEIN-1 ALS WICHTIGER FAKTOR BEI ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN	14
2.7 REPETITIVE MYOKARDIALE ISCHÄMIE UND REPERFUSION IM MAUSMODELL	17
2.8 ZIELSETZUNG.....	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 MODELL DER MYOKARDIALEN ISCHÄMIE UND REPERFUSION BEI MÄUSEN	20
3.1.1 Initialeingriff.....	20
3.1.2 Ischämie und Reperfusion	21
3.1.3 Versuchstiere	23
3.1.3.1 C57/BL6-Wildtypmäuse	23
3.1.3.2 Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1-defiziente Mäuse	23
3.1.4 Versuchsgruppen.....	24
3.2 ECHOKARDIOGRAFISCHE MESSUNG DER VENTRIKULÄREN PUMPFUNKTION.....	24
3.3 ENTNAHME DER HERZEN.....	25
3.4 HISTOLOGIE.....	26
3.4.1 Gewebeproben	26
3.4.2 Auswahl der Präparate	26
3.4.3 Allgemeine Histologie	27
3.4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	27
3.4.3.2 Kollagenfärbung.....	28
3.4.4 Immunhistochemie.....	28
3.4.4.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode	28
3.4.4.2 Makrophagenfärbung.....	29
3.4.4.3 Färbung von Myofibroblasten und Gefäßendothel.....	30

3.4.5	Quantitative Auswertung.....	31
3.4.5.1	Kollagenauswertung.....	32
3.4.5.2	Makrophagenauswertung.....	32
3.5	MOLEKULARBIOLOGIE.....	33
3.5.1	Genotypisierung.....	33
3.5.2	RNA-Isolation.....	34
3.5.3	RNA-Protection-Assay.....	35
3.5.3.1	Prinzip.....	35
3.5.3.2	Protokoll.....	35
3.5.3.3	Auswertung.....	39
3.6	STATISTIK.....	40
4.	ERGEBNISSE.....	41
4.1	REPETITIVE ISCHÄMIE UND REPERFUSION.....	41
4.2	EINFLUSS DER MCP-1-NEUTRALISATION AUF DAS ISCHÄMISCHE MYOKARD.....	41
4.2.1	Echokardiografie.....	41
4.2.2	Kollagenanteil.....	43
4.3	AUSWIRKUNGEN EINER MCP-1-DEFIZIENZ AUF DIE PUMPFUNKTION DES.....	44
	ISCHÄMISCHEN HERZENS.....	44
4.4	FIBROSE IN MCP-1-DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	45
4.5	MYOFIBROBLASTENEINWANDERUNG NACH 5 TAGEN I/R.....	48
4.6	EINFLUSS DER MCP-1-DEFIZIENZ AUF DIE MAKROPHAGENREKRUTIERUNG.....	49
4.7	EINFLUSS DER MCP-1-DEFIZIENZ AUF DIE ZYTKIN- UND CHEMOKININDUKTION NACH I/R.....	51
4.7.1	Tumornekrosefaktor- α	51
4.7.2	Interleukine.....	52
4.7.3	Transforming Growth Factor.....	53
4.7.4	Osteopontin-1.....	54
4.7.5	Macrophage Inhibitory Protein-1 β	55
4.7.6	Weitere Chemokine.....	55
5.	DISKUSSION.....	57
6.	AUSBLICK.....	65
7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
8.	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN, DIAGRAMME UND TABELLEN.....	69
9.	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
10.	DANKSAGUNG.....	81

1. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode:	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
α -SMAc :	α -Aktin-der-glatten-Muskelzellen
APS:	Ammoniumpersulfat
ATP:	Adenosintriphosphat
C5a:	aktiviertes Komplement 5
CCR2:	CC-Chemokinrezeptor 2
DAB:	Diaminobenzol
DEPC-ddH ₂ O:	Diethylpyrocarbonat - doppelt deionisiertes Wasser
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT:	Dithiothreitol
EC-SOD:	extrazelluläre Superoxid-Dismutase
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG:	Elektrokardiogramm
F4/80:	Makrophagen-Antigen F4/80
FV:	Fraktionsverkürzung
GACU:	die Nukleoside Guanosin, Adenosin, Cytidin, Uridin
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTC:	Guanidin Thiocyanat
HE:	Hämatoxylin-Eosin
I/R:	Ischämie und Reperfusion
IgG:	Immunglobulin G
IL:	Interleukin
IP-10:	Interferon- γ -induziertes-Protein-10
KHK:	koronare Herzkrankheit
L32:	Housekeeping Gen L32
LAD:	left anterior descending (dt. RIVA)
LV _{diast} :	diastolischer linksventrikulärer Durchmesser
LV _{syst} :	systolischer linksventrikulärer Durchmesser

MAC387:	Macrophage antibody 387
MCP-1:	Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1
MCP-1 ^{-/-} :	MCP-1 defiziente Mäuse
MIP:	Macrophage Inhibitory Protein
mRNA:	mitochondriale Ribonukleinsäure
NIH:	National Institute of Health
OPN-1:	Osteopontin-1
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE:	Polyethylen
RIVA:	Ramus interventricularis anterior (engl. LAD)
RNA:	Ribonukleinsäure
RPA:	RNA-Protection-Assay
SCYA2-Gen:	small inducible cytokine A2-Gen (MCP-1 kodierendes Gen)
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
TBE:	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β :	Transforming Growth Factor- β
TNF- α :	Tumornekrosefaktor- α
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA:	transfer-Ribonukleinsäure
UTP:	Uridintriphosphat
VW _{diast} :	diastolische Vorderwanddicke
VW _{syst} :	systolische Vorderwanddicke
VWV:	Vorderwandverdickung
WT:	Wildtypmäuse
WT+MCP-1AK:	WT mit intraperitonealer Injektion MCP-1-neutralisierender Antikörper

2. Einleitung

2.1 Koronare Herzkrankheit

Unter dem Begriff der koronaren Herzkrankheit (KHK) fasst man alle morphologischen und funktionellen Veränderungen der Koronargefäße zusammen, die zu unzureichender Blutversorgung des Herzmuskels beziehungsweise zu einer Myokardischämie führen.

Die KHK gehört mit 22% aller Todesfälle, vor allem in den Ländern mit hohem Lebensstandard, zu den häufigsten Todesursachen, wobei Männer deutlich stärker betroffen sind als Frauen.

Ätiologisch kommen mehrere Ursachen für die Erkrankung in Betracht. Während bei 90% aller KHK-Patienten eine Arteriosklerose der großen extramuralen Koronararterien vorliegt, sind verschleppte Embolien, Gefäßdissektionen, Vaskulitiden oder Koronarspasmen (Prinzmetal-Angina) eher selten. Risikofaktoren für diese krankhafte Veränderung der Arterienintima und -media sind vor allem arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Nikotinabusus.

Durch die Stenose in mindestens einem der drei wichtigsten Äste der Koronararterien kommt es bei einem zu mehr als 75% verschlossenen Lumen unter Belastung, bei 90% stenosiertem Lumen auch schon in Ruhe zur Unterversorgung des Myokards.

Diese unzureichende Durchblutung manifestiert sich klinisch meistens als Angina pectoris, aber auch als Myokardinfarkt oder Herzrhythmusstörung, woraus eine Herzinsuffizienz oder ein plötzlicher Herztod resultieren können (Bültmann et al., 2001).

2.2 Angina pectoris

Die Angina pectoris ist ein Symptomenkomplex der KHK, der durch ein Missverhältnis zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf entsteht, wobei die Ischämiedauer nicht ausreicht, um einen Myokardinfarkt hervorzurufen. Die Ischämiezeichen äußern sich klinisch als Engegefühl in der Brust, linksseitiger retro- und pa-

rasternal brennender Schmerz mit Ausstrahlung in den linken Arm, Luftnot oder Angstgefühl. Man unterscheidet stabile Angina pectoris, die nur bei körperlicher Anstrengung auftritt, von instabiler Angina pectoris, die auch schon in Ruhe zu Beschwerden führt. Sinkender Sauerstoffpartialdruck (pO_2) wirkt als Dilatationsreiz für die Koronargefäße; es wird physiologischerweise die Koronarreserve aktiviert, das heißt, die Durchblutung der Koronararterien wird bis auf das Drei- bis Fünffache gesteigert. Bei der KHK können die stenotisch veränderten Gefäße diesen Ausgleich nicht mehr leisten, es liegt daher eine relative Koronarinsuffizienz vor, die zu einer akuten Hypoxie führt. Infolge des Sistierens der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien kommt es zu einem erniedrigten ATP-Spiegel. Nach Umstellung der Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse werden Laktat und andere Metaboliten zunehmend akkumuliert, so dass die Glykolyse gehemmt wird und die ATP-Ausbeute nicht mehr zur Aufrechterhaltung der Arbeit der Ionenpumpen und damit der Zellhomöostase ausreicht (Bültmann et al., 2001).

2.3 Hibernierendes Myokard

Die pathophysiologischen Reaktionen des Myokards auf die Ischämie stellen ein breites Spektrum dar. Sie reichen von kurzen Episoden der linksventrikulären Dysfunktion beim „myocardial stunning“ über ischämische Kardiomyopathie mit anhaltender linksventrikulärer Dysfunktion bis zur irreversiblen Herzinsuffizienz nach ausgedehntem Myokardinfarkt.

Eine wichtige Entität zum Verständnis der Entstehung und des Verlaufs der ischämischen Kardiomyopathie ist das Bild des hibernierenden Myokards. Es ist gekennzeichnet durch eine linksventrikuläre Dysfunktion in Ruhe, die nach inotroper Stimulation kurzfristig aufgehoben werden kann und erst nach Revaskularisierung langfristig reversibel ist (Heusch, 1998; Rahimtoola, 1985; Rahimtoola, 1999; Wijns et al., 1998).

Diese vorübergehende Dysfunktion dient möglicherweise als Schutzmechanismus für das mit Sauerstoff unterversorgte Herz, indem der Sauerstoffbedarf reduziert und damit das Ausmaß der Ischämie-induzierten Schädigung begrenzt werden kann (Braunwald und Rutherford, 1986).

Zum hibernierenden Myokard kommt es entweder durch chronische, das bedeutet monate- oder gar jahrelange Hypoperfusion (Rahimtoola, 1985), oder durch den kumulativen Effekt von wiederholten ischämischen Episoden (Bolli et al., 1995).

Morphologisch zeigen sich eine Dezimierung der kontraktile Elemente, ein Verlust an Myofilamenten und eine verminderte Organisation der Proteine des Zytoskeletts (Borgers et al., 1993; Borgers und Ausma, 1995; Frangogiannis et al., 2002a; Heling et al., 2000; Maes et al., 1994; Schaper et al., 1991; Vanoverschelde et al., 1993; Vanoverschelde et al., 1997). Man findet außerdem Veränderungen von Mitochondrien und Zellkern, eine Anreicherung von Glykogen im Zytoplasma (Pagano et al., 2000; Vanoverschelde et al., 1993;) und eine Umverteilung der adrenergen Rezeptoren zugunsten der α -Form, was möglicherweise einen Mechanismus der eingeschränkten Kontraktilität darstellt (Shan et al., 2000).

Extrazellulär beobachtet man ein erweitertes Interstitium und vermehrte Kollagenablagerung (Elsasser et al., 1998; Frangogiannis et al., 2002; Frangogiannis et al., 2002; Nagueh et al., 1999), verbunden mit einer Anreicherung des matrizellulären Proteins Tenascin, welches auf einen aktiv fortschreitenden Gewebeumbau der Matrix hinweist (Frangogiannis et al., 2002a). Der Gewebeumbau beinhaltet eine entzündliche Reaktion, die sich in erhöhter Expression von Zytokinen und Chemokinen, wie zum Beispiel Monozyten-Chemoattraktor-Protein (MCP)-1 (Frangogiannis et al., 2002) und Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 (Elsasser et al., 2000), zeigt. Dies führt zum aktiven Rekrutieren von Leukozyten und Fibroblasten und zur interstitiellen Fibrose des von der Ischämie betroffenen Areals (Frangogiannis et al., 2002).

Je geringer die Fibrose und die Schädigung der Myozyten sind, desto eher kann es zu einer vollständigen Regeneration kommen (Depre et al., 1995; Hennessy et al., 1998; Nagueh et al., 1999; Schaper et al., 1991). Gleichzeitig haben aber auch hohe Konzentrationen an neu rekrutierten Leukozyten sowie Tenascin in frühen Stadien des Schadens einen positiven Einfluss auf die Wiederherstellung der Funktion (Frangogiannis et al., 2002). Auch die Mikrogefäß- und Kapillardichte kann die Chancen auf Regeneration verbessern, da es bei einer höheren Gefäßdichte eher zur Erholung der geschädigten Gebiete kommt (Elsasser et al., 2000; Frangogiannis et al., 2000; Ren et al., 2002).

Auch wenn die pathologischen Veränderungen des Myokards lange Zeit durch Revaskularisation reversibel bleiben, sind nach anhaltender Entzündungsreaktion in späteren Stadien des hibernierenden Myokards, mit geringerer Zelldichte und stärkerer Fibrose der extrazellulären Matrix, irreversible Gewebeschäden nicht mehr zu vermeiden. Dabei stellen vitales, hibernierendes Myokard und irreversibel geschädigtes Myokard lediglich verschiedene Aspekte des Spektrums der ischämischen Kardiomyopathie dar (Frangogiannis et al., 2002).

Die genauen Pathomechanismen, die zur Schwächung der Kontraktilität und damit assoziiert zu ventrikulärer Dysfunktion führen, sind noch weitgehend unklar.

Anhaltspunkte zur Entstehung der inflammatorischen Reaktion und deren Folgen gibt es im Mausmodell, wobei freie Sauerstoffradikale und Chemokine eine Schlüsselfunktion einzunehmen scheinen (Dewald et al., 2003; Frangogiannis et al., 1998; Frangogiannis et al., 1998a, b; Frangogiannis et al., 2002).

2.4 Inflammatorische Prozesse nach Ischämie und Reperfusion

In verschiedenen Studien wurden bei Patienten während einer Bypass-Operation Biopsien aus den Arealen mit hibernierendem Myokard entnommen. Elsasser et al. (1997) konnten in den betroffenen Gebieten eine vermehrte Dichte an extrazellulären Matrixproteinen und eine reaktive Fibrose nachweisen. Eine Narbenbildung war verbunden mit einer größeren Anzahl an Makrophagen und Fibroblasten sowie mit einem Anstieg der mRNA für Laminin, Fibronectin und Kollagen (Elsasser et al., 1998). Je geringer die Fibrose ausfiel, desto besser waren die Chancen auf eine funktionelle Wiederherstellung (Nagueh et al., 1999). Auch Frangogiannis et al. (2002) fanden in Biopsien von Bypass-Patienten eine Infiltration des geschädigten Myokards mit Makrophagen sowie eine gesteigerte Fibrose. Sie konnten aber außerdem zeigen, dass in Segmenten mit postoperativer funktioneller Wiederherstellung die Zahl an neu rekrutierten MAC387-positiven Leukozyten signifikant höher lag als in denen, die weiterhin eine Dysfunktion aufwiesen. Daneben zeigte sich in den normalisierten Myokardsegmenten eine Induktion von MCP-1, was zur besagten Leukozyteninfiltration beiträgt (Frangogiannis et al., 2002). Erhöhte Werte von MCP-1 konnten schon Aukrust et al. (1998) bei Patienten mit Herzin-

suffizienz nachweisen, begleitet von einer erhöhten Monozytenaktivität. Auch bei Studien an Hunden bestätigte sich der Zusammenhang zwischen Reperfusion als Bedingung für eine Freisetzung von MCP-1 (Kumar et al., 1997) und einer darauf folgenden Rekrutierung von Monozyten (Birdsall et al., 1997).

Neben MCP-1 spielen auch andere Chemokine eine Rolle bei entzündlichen Prozessen. Die Macrophage Inhibitory Proteins (MIPs) modulieren die Makrophagenfunktion, indem sie deren Aktivierung, Migration und Adhäsion sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α regulieren. Interferon- γ -induziertes-Protein (IP)-10 hat chemotaktisches Potential für Monozyten und T-Zellen und spielt eine Rolle bei der Angiogenese.

Weitere für die inflammatorische Reaktion wichtige Mediatoren sind die Zytokine Transforming Growth Factor (TGF)- β , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Osteopontin (OPN)-1 und die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-10. TNF- α ist ein Akute-Phase-Protein, welches wiederum andere Zytokine wie IL-1 und IL-6 induziert und eine Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und Neutrophilen hervorruft. Außerdem fördert es über eine Stimulation von Fibroblasten den Gewebeumbau. TGF- β hat, abhängig davon, welche Isoform vorliegt, unterschiedliche Funktionen. TGF- β 1 hat einen suppressiven Effekt auf Makrophagen, indem es deren Proliferation hemmt. Je nachdem, welche Zellen und anderen Mediatoren beteiligt sind, kann es jedoch auch den entgegengesetzten Effekt haben. TGF- β 1 induziert außerdem andere Zytokine wie IL-1 und TNF- α . Während die Funktion von TGF- β 2 nicht eindeutig geklärt ist, wird TGF- β 3 ein antiinflammatorisches Wirkspektrum zugesprochen. OPN-1 dient der Chemotaxis von Makrophagen und dendritischen Zellen, es stimuliert Zelladhäsion und -migration und weist auf einen aktiven Gewebeumbau hin. Ebenso wie IL-1, welches die Migration von Leukozyten ins Gewebe sowie die Produktion anderer Interleukine induziert, wirkt auch IL-6 proinflammatorisch. Dagegen hat IL-10 durch die Inhibition proinflammatorischer Zytokine einen antientzündlichen Effekt.

2.5 Chemokine bei inflammatorischen Prozessen

2.5.1 Struktur und Genlokalisierung der Chemokine

Chemokine sind basische, niedermolekulare Proteine mit einem Gewicht von 8 bis 10 kD (Neote und McColl, 1999) und einer Länge von 60 bis 90 Aminosäuren (Schweickart et al., 1999). In der monomeren Struktur gibt es typische Gemeinsamkeiten aller Mitglieder. Dazu gehören eine kurze, flexible Aminodomäne gefolgt von drei antiparallelen, durch Schleifen verbundenen β -Faltblättern, eine α -Helix am C-Terminus, eine hydrophobe Signalsequenz, die bei Sekretion abgespalten wird, und hochkonservierte Cysteinreste.

Die wichtigsten Subfamilien, die CC- und CXC-Chemokine, enthalten alle vier Cysteinreste mit Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten beziehungsweise dem zweiten und vierten Rest. Der Unterschied liegt darin, dass im Gegensatz zu den CC- oder α -Chemokinen, deren Reste direkt benachbart liegen, bei der CXC- oder β -Familie eine weitere Aminosäure die am Aminoterminus gelegenen Cysteinreste trennt (Schweickart et al., 1999).

Die heute bekannten menschlichen Chemokine sind auf sieben Chromosomen kodiert. Dabei sind die Codes für Proteine mit hoher Sequenzhomologie und Ähnlichkeiten in der biologischen Aktivität auf gleichen Chromosomen innerhalb weniger Kilobasen angeordnet. Die Moleküle scheinen während der Evolution aus gleichen Vorläuferproteinen entstanden zu sein, beziehungsweise sich immer wieder in verschiedene Proteine differenziert zu haben. Die meisten CC-Chemokine, wie zum Beispiel MCPs und MIPs, liegen auf Chromosom 17 (entspricht bei der Maus Chromosom 11), viele der CXC-Chemokine auf Chromosom 4 (Schweickart et al., 1999).

2.5.2 Funktion der Chemokine

Die am längsten und besten bekannte Funktion der Chemokine ist ihr chemotaktisches Potential, Leukozyten aus dem Blutkreislauf in entzündetes Gewebe zu locken. Dabei wirken CXC-Chemokine generell bevorzugt auf neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, während CC-Chemokine verschiedene Leukozytenuntergruppen an-

locken, wie Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Natural Killer (NK)-Zellen (Mantovani, 1999) und Mastzellen (Lukacs et al., 1999). Seit einiger Zeit weiß man allerdings, dass sich die Chemotaxis auch auf eine Vielzahl anderer Zelltypen auswirkt, darunter fast alle Typen der Lymphoid- und Myeloidzelllinie, Endothelzellen, Neurone, Fibroblasten und Epithelzellen (Gerard, 1999). Auffällig ist die Redundanz, mit der Chemokine *in vitro* wirken. Jedes Protein wirkt auf mehrere Zelltypen und jeder Zelltyp besitzt wiederum Rezeptoren für mehrere Liganden (Mantovani, 1999).

Die Mehrheit der CXC- und CC-Chemokine wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen sowie von Endothelzellen produziert (Furie and Randolph, 1995). Grundsätzlich kann aber jede Zelle unter geeigneten Bedingungen Chemokine exprimieren. Die Produktion kann konstitutiv erfolgen; für die meisten Chemokine, einschließlich MCPs, wird jedoch durch verschiedenste Stimuli eine *de novo* Synthese induziert. Dabei kann eine Zelle auf Stimuli wie bakterielle Lipopolysaccharide oder proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α) mit der Produktion verschiedener Proteine reagieren (Mantovani, 1999).

Trotz der *in vitro* beschriebenen Redundanz bindet MCP-1 *in vivo* wahrscheinlich ausschließlich an den CC-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) (Boring et al., 1997). Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor wird vor allem an Monozyten exprimiert und kommt in Herz, Niere, Knochenmark, Lunge, Leber und Pankreas vor (Vaddi et al., 1997). Auf Bindung der Liganden reagiert die Zielzelle mit Inhibition der Adenylatzyklase und Kalziummobilisation (Vaddi, 1997).

2.6 Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 als wichtiger Faktor bei entzündlichen Erkrankungen

Aukrust et al. (1998) konnten bei der Untersuchung der CC-Chemokinexpression bei Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen, dass die CC-Chemokine unabhängig vom Grund des Herzversagens erhöht waren. Die höchste Expression zeigte dabei MCP-1 in Patienten mit KHK. Die erhöhte MCP-1-Expression in Patienten mit Herzinsuffizienz wirkte verstärkend auf die Produktion von Sauerstoffradikalen in Monozyten. Diese Sauerstoff-

radikale könnten wiederum die Synthese von MCP-1 in den gleichen Zellen begünstigen (Satriano et al., 1993) und somit zu einer Art „Teufelskreis“ der Herzinsuffizienz führen (Aukrust et al., 1998).

Eine Studie von Kolattukudy et al. (1998) zeigte, dass transgene Überexpression von MCP-1 im Myokard der Maus in Myokarditis mit folgendem Herzversagen resultiert.

Untersuchungen an Hunden mit ischämischem Myokard legen nahe, dass sich MCP-1 als dritter Faktor auf die Monozyteninfiltration drei Stunden nach der Ischämie auswirkt, nachdem C5a und TGF- β 1 die Rekrutierung von Monozyten in der Frühphase übernehmen (Birdsall et al., 1997).

Kumar et al. (1997) konnten ebenfalls am Myokard des Hundes zeigen, dass die Reperfusion eine unerlässliche Bedingung für die Freisetzung von MCP-1 ist, da ohne diese keine nennenswerte Induktion von MCP-1 stattfindet. Dies wird unterstützt von Kakio et al. (2000), die am ischämischen Herzen der Ratte durch Reperfusion eine erhebliche Beschleunigung der MCP-1-Produktion beobachteten. Die Produktion der MCP-1 mRNA ist nach Kumar et al. (1997) im reperfundierten Herzen des Hundes unmittelbar im Anschluss an die Reperfusion in den kleinen Venen lokalisiert. Dagegen postulierten Takahashi et al. (1995) *in vitro* den Zellkontakt zwischen Endothelzellen und Monozyten bei der Transmigration als auslösenden Stimulus für eine *de novo* Synthese von MCP-1 in beiden Zelltypen. Kumar et al. (1997) legten daraufhin einen inhibitorischen Einfluss einiger Zytokine nahe, die *in vivo* die Induktion des Chemokins in bestimmten Zellpopulationen supprimieren.

Shioi et al. (1997) zeigten, dass durch Hypertension verursachtes Herzversagen bei der Ratte zur Induktion von MCP-1 führt, wobei die Expression weitgehend auf Endothelzellen und infiltrierende Zellen beschränkt ist.

In Versuchen von Behr et al. (2000) an Ratten mit aortocavaler Fistel und dadurch bedingter volumenüberlasteter Kardiomyopathie war eine Induktion auch in adulten Kardiomyozyten zu beobachten, wobei diskutiert wird, ob MCP-1 die mononukleären Zellen zur Phagozytose der exprimierenden Kardiomyozyten anlocken könnte.

Eine wesentliche Aufgabe von MCP-1 ist daher die Rekrutierung von Monozyten in geschädigtes Gewebe. Diese Schlussfolgerung lassen unter anderem Untersuchungen von Lu et al. (1998) an MCP-1-defizienten Mäusen zu. Nach intraperitonealer Injektion von Thioglykol zeigte sich in den MCP-1-defizienten Tieren nach drei Tagen im Gegen-

satz zu den Wildtypmäusen keine nennenswerte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen. Bei Hypersensitivitätsversuchen war in Wildtyptieren die dreifache Menge an F4/80-positiven Zellen nachzuweisen wie in den MCP-1-defizienten Tieren. MCP-1 wirkt also als entscheidender Faktor für die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen.

Andere Arbeitsgruppen (Lloyd et al., 1997; Wada et al., 1996) erzielten durch MCP-1-Antikörperneutralisation bei Ratten beziehungsweise Mäusen eine Reduzierung der Makrophagenzahl in einem Glomerulonephritismodell. Letztere Gruppe konnte außerdem zeigen, dass in den antikörperbehandelten Mäusen die Ablagerung von Kollagen I wesentlich geringer war als in nichtbehandelten Tieren. MCP-1 scheint demnach auch ein wichtiger Mediator der Makrophagenrekrutierung und der fortschreitenden Fibrose in der Niere zu sein. Ähnliche Ergebnisse zeigen weitere Untersuchungen an antikörperbehandelten Ratten und Mäusen in Modellen der rheumatischen Arthritis (Gong et al., 1997) und der granulomatösen Lungenkrankheit (Jones et al., 1992). Hayashidani et al. (2003) fanden in einem Mausmodell des Myokardinfarkts, dass durch Anti-MCP-1-Gentherapie die Überlebensrate stieg und die Dilatation des linken Ventrikels sowie die kontraktile Dysfunktion verbessert wurden. Dies war verbunden mit einer Verringerung der interstitiellen Fibrose, der Makrophageninfiltration und der myokardialen Expression von TNF- α und TGF- β .

Neben der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen ist MCP-1 aber auch imstande, diese zu stimulieren und die Freisetzung lysosomaler Enzyme sowie die Produktion von aktivem Sauerstoff zu induzieren (Furie and Randolph, 1995). Durch chemokinvermittelte Freisetzung von Enzymen und zytotoxischen Stoffen aus Leukozyten wird einerseits eine Entzündungsreaktion mit dem Ziel der Elimination eines schädigenden Agens hervorgerufen, andererseits kann aber auch gesundes Gewebe geschädigt werden. Neben diesem direkten Einfluss können Chemokine auch durch Stimulation der Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren zur Gewebeschädigung beitragen, so zum Beispiel IL-1 und IL-6 (Furie and Randolph, 1995).

Bei CCR2-defizienten Mäusen konnten Heil et al. (2004) nach Okklusion der Femoralarterie eine Aktivierung des Endothels nachweisen. Diese führte über Scherkräfte zur Hochregulation von MCP-1 und Adhäsionsmolekülen mit anschließender Infiltration von Monozyten sowie Induktion von Wachstumsfaktoren (Scholz et al., 2000). Ito et al.

(1997) gelang es in einem Femoralarterienokklusionsmodell beim Hasen, die Proliferation von Kollateralen und Kapillaren durch Infusion von MCP-1 zu erhöhen. Auch Salcedo et al. (2000) beobachteten bei der Ratte eine direkte Induktion der Angiogenese durch MCP-1 mit Migration und Aussprossung von Endothelzellen. Bei Versuchen mit CCR2-defizienten Mäusen in einem Modell des Kollateralenwachstums nach Femoralarterienokklusion zeigten sich eine geringere Wiederherstellung des Blutflusses, weniger Vergrößerung der Kollateralen und eine stark reduzierte Zahl an Monozyten und Makrophagen (Heil et al., 2004). Diese Resultate weisen auf eine wichtige Funktion des CCR2-Signalweges bei der Arteriogenese hin.

2.7 Repetitive myokardiale Ischämie und Reperfusion im Mausmodell

Um die morphologischen und molekularen Grundlagen der Reperfusion eines ischämischen Myokards besser verstehen zu können, entwickelten Nossuli et al. (2000) ein Mausmodell, das es erlaubt, bei geschlossenem Thorax eine Okklusion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) vorzunehmen. Der Vorteil dieses Modells gegenüber einer Okklusion bei eröffnetem Thorax ist, dass in nachfolgenden Experimenten gemessene Veränderungen eindeutig der myokardialen Ischämie und Reperfusion zugeordnet werden, und nicht aufgrund des Operationstraumas entstanden sein können.

Dewald et al. (2003) entwickelten dieses Modell weiter, um durch kurzzeitige repetitive Episoden von Ischämie und Reperfusion (I/R) den Zustand beim Menschen mit hibernierendem Myokard zu simulieren. Es zeigte sich, dass repetitive kurze Episoden von Ischämie und Reperfusion eine vorübergehende inflammatorische Reaktion und einen interstitiellen Gewebeumbau hervorrufen. Nach 7 Tagen I/R waren erhöhte Zellularität und eine Erweiterung der Extrazellularräume zu beobachten. Hier bildete sich - vor allem im Peri- und Endomysium - eine reaktive interstitielle Fibrose aus, die morphologisch klar von einer Ersatzfibrose nach Myokardinfarkt zu unterscheiden ist. Zeitgleich mit der Fibrose kam es zu einer vermehrten Einwanderung von α -Aktin-der-glatten-Muskelzellen-positiven Myofibroblasten sowie zur Infiltration des Myokards mit F4/80-positiven Makrophagen. Weitere Hinweise auf einen aktiven Gewebeumbau lieferte die Expression von Tenascin und Osteopontin-1.

Folge des fibrotischen Umbaus war eine ventrikuläre Dysfunktion, die sich durch erniedrigte Werte für Vorderwandverdickung und Fraktionsverkürzung zeigte.

Bei Untersuchungen auf mRNA-Ebene wurde eine Induktion von Zytokinen und Chemokinen nach I/R beobachtet. Während die Expression von Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 und Interleukin (IL)-1 β nicht signifikant anstieg, wurden Macrophage Inhibitory Protein (MIP)-1 α , MIP-1 β und vor allem das Monozyten-Chemoattraktor-Protein (MCP)-1 vermehrt exprimiert (Diagramm 1) (Dewald et al., 2003).

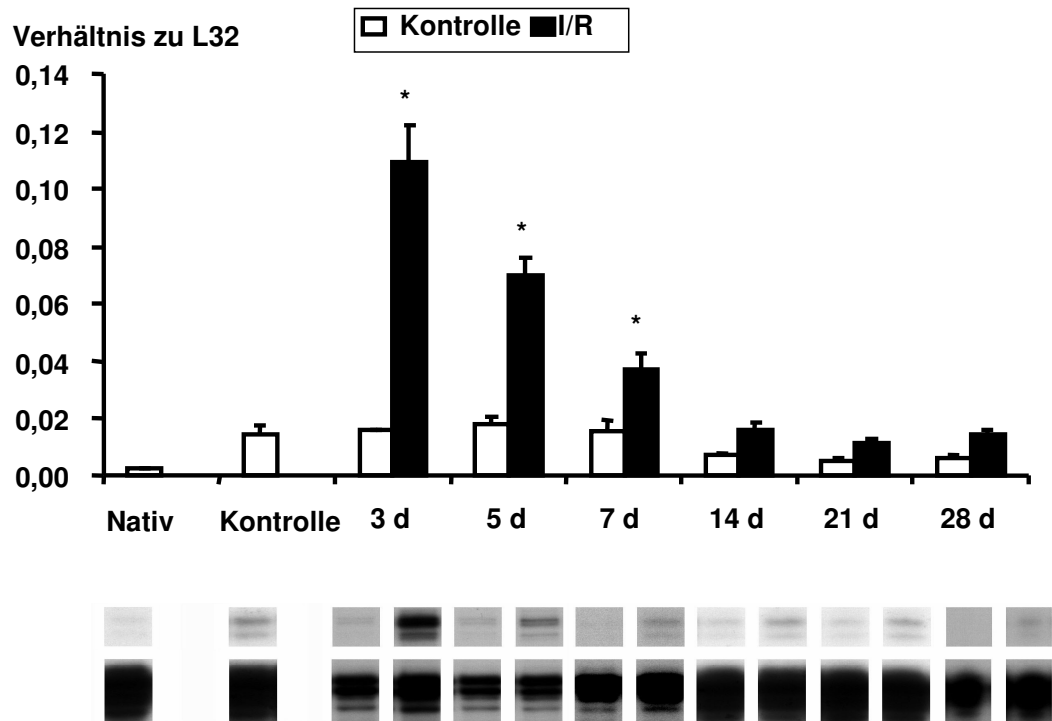


Diagramm 1: Induktion von MCP-1 nach 3 bis 28 Tagen repetitiver I/R.

* $p < 0,05$ (aus: Dewald et al., 2003)

Bei der Durchführung des gleichen I/R-Protokolls an gentechnisch veränderten Mäusen, die extrazelluläre Superoxid-Dismutase (EC-SOD) überexprimieren, zeigten sich eine geringere Chemokinexpression mit weniger interstitieller Fibrose und keine ventrikuläre Dysfunktion. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass freie Sauerstoffradikale an der Induktion von Chemokinen und der zur ischämischen Kardiomyopathie führenden Inflammation beteiligt sein könnten (Dewald et al., 2003).

2.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Untersuchung der Rolle des Monozyten-Chemoattraktor-Proteins-1 in der Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie im Mausmodell der repetitiven kurzzeitigen Ischämie und Reperfusion.

3. Material und Methoden

3.1 Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen

3.1.1 Initialeingriff

Für die Initialoperation wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Natrium-Pentobarbital anästhesiert ($1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) und in Rückenlage auf einem mit einem Elektrokardiogramm (EKG) ausgestatteten Operationstisch fixiert. Durch eine an den oberen Nagezähnen befestigte 3-0-Seidenfadenschlinge (Surgical Silk, Ethicon, Somerville, NJ, USA) wurde der Nacken leicht überstreckt, um die Intubation zu erleichtern. Nach einem Hautschnitt vom Submentum bis zum Xiphoid wurde durch Verschieben der Halsmuskulatur und des peritrachealen Bindegewebes der Blick auf die Trachea frei, um unter Sichtkontrolle zu intubieren. Der aus Polyethylen (PE) bestehende PE-90-Tubus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) wurde im Abstand von 5-8 mm vom Larynx fixiert und über einen Verbindungsschlauch mit einem Kleintierventilator (Mini Vent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) verbunden. Beatmet wurde mit 100%-igem Sauerstoff und einem Atemvolumen von $200\ \mu\text{l}$ bei einer Atemfrequenz von circa 110 Atemzügen pro Minute.

Nach Verödung der suprasternalen Blutgefäße mit einem Mikrokoagulator (Codman, Randolph, MA, USA) erfolgte die Thorakotomie unter Sichthilfe eines Mikroskops (Stemi 2000-CS, Zeiss, Jena, D) links parasternal unter Durchtrennung der dritten bis fünften Rippen. Mit 6-0 Prolene[®]-Nähten (Ethicon, Somerville, NJ, USA) wurde die Brustwand zurückgehalten, um nach stumpfer Präparation des Perikards die Sicht auf den Ramus interventricularis anterior (RIVA) freizugeben. 1 bis 3 mm unterhalb des linken Atriums wurde mit einer 8-0 Prolene[®]-Naht und einer zur Erleichterung der Passage U-förmig gebogenen Nadel die Ligatur um den RIVA gelegt. Beide Fadenenden wurden durch ein $0,5\ \text{mm}$ langes Stück PE-10-Tubus, das zuvor für 24 Stunden in 100%-igem Ethanol desinfiziert worden war, gezogen und mithilfe einer Kalt-Nadel der Größe 3 (Unimed, Lausanne, CH) transthorakal ausgeführt, um anschließend in einer Hauttasche verstaut zu werden. Der Thorax wurde danach mit vier 6-0 Prolene[®]-Nähten verschlossen und

die Wunde prophylaktisch mit dem Antibiotikum Cefazolin (Apothecon, Princeton, NJ, USA) behandelt. Der Hautschnitt wurde ebenso mit einer 6-0 Prolene[®]-Naht wieder verschlossen. Als Volumenersatz wurden 0,5 ml isotonische NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach der Extubation setzte die Spontanatmung unter Gabe von 100%-igem Sauerstoff innerhalb einer Minute wieder ein, und die Tiere wurden bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins unter einer Wärmelampe beobachtet.

3.1.2 Ischämie und Reperfusion

Nach einer Erholungsphase von sieben bis zehn Tagen wurden die initialoperierten Mäuse täglich einer 15-minütigen Ischämieepisode unterzogen.

Die Narkose wurde mit Isofluran initiiert und die Tiere wurden wieder in Rückenlage auf den Operationstisch gelegt. Die Extremitäten wurden zur Ableitung des EKG mit Klebeband und EKG-Creme (Signa Electrode Cream, Parker Laboratories, NJ, USA) auf den Ableitungselektroden fixiert. Die Mäuse atmeten spontan über eine Nasenmaske ein Gemisch mit 1,5%-igem Isofluran (Isoflo, Abbott) bei 2 Liter Sauerstofffluss pro Minute.

Die Haut über der dritten und vierten Rippe wurde erneut eröffnet und die darunterliegenden Fadenenden vorsichtig freigelegt. Nach Befestigung der Ligaturen an Metallzylindern wurden diese auseinander gezogen, bis eine ST-Streckenhebung im EKG zu beobachten war, die während des gesamten Ischämieintervalls aufrechterhalten wurde (Abbildungen 1 A und 1 B). Nach 15 Minuten wurde die Ligatur wieder gelöst, und eine Reperfusion war im EKG durch eine Normalisierung der ST-Strecke erkennbar. Die Fadenenden wurden wieder in den Hauttaschen verstaut und die Haut nach infektionsprophylaktischer topischer Cefazolingabe durch eine 6-0 Prolene[®]-Naht verschlossen. Anschließend wurde den Tieren 2,5 µg Buprenorphin pro Gramm Körpergewicht als Analgetikum intraperitoneal injiziert.

Das EKG wurde nach der zweiten Ableitung nach Einthoven vor, zu Beginn und am Ende der Ischämie sowie nach erfolgreicher Reperfusion nach Hautverschluss aufgezeichnet (Abbildung 1 B).

Den Tieren der Gruppe WT+MCP-1AK wurde während des I/R-Protokolls intraperitoneal ein MCP-1-neutralisierender Antikörper (20 µg i.p. täglich; Klon#AF-479-NA anti-mouse JE antibody, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) injiziert.

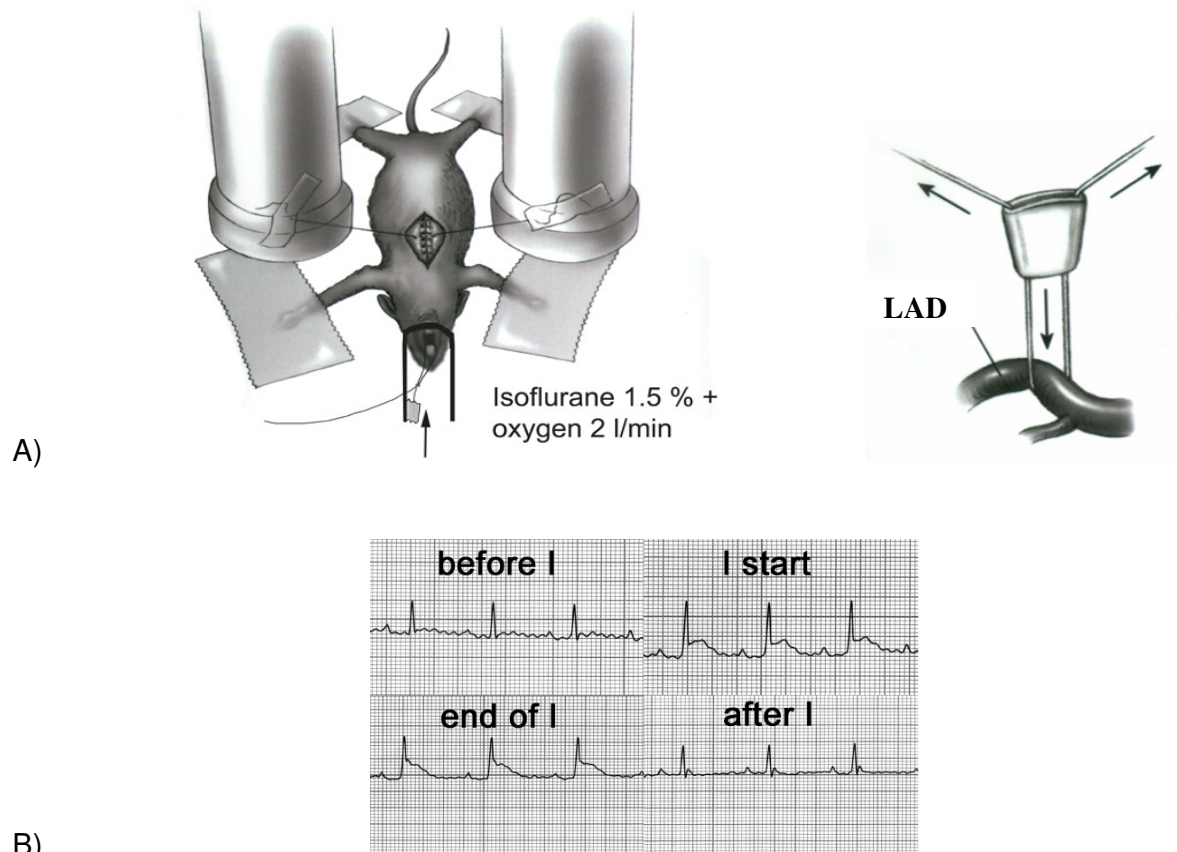


Abbildung 1: Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion.

A) Anordnung des Initiäleingriffs und

B) EKG vor, zu Beginn und am Ende der Ischämie sowie nach dem Eingriff (I = Ischämie)

3.1.3 Versuchstiere

3.1.3.1 C57/BL6-Wildtypmäuse

Als Vergleichsgruppe wurden C57/BL6-Wildtypmäuse (WT) männlichen und weiblichen Geschlechts von Harlan Sprague-Dawley, Houston, TX, USA verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Experiments 8 bis 12 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 18 bis 20 g. Für die Antikörperinjektionen wurden ebenfalls C57/BL6-Wildtypmäuse gleichen Alters verwendet.

3.1.3.2 Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1-defiziente Mäuse

Die MCP-1^{-/-}-Mäuse gehörten einem von Lu et al. (1998) entwickelten Stamm an. Zusammenfassend wurden in einem 6.600 bp großen DNA-Fragment, das das MCP-1-kodierende Gen SCYA2 enthält, ein Stück DNA in das zweite Exon eingefügt und das 3'-Ende des Gens geklont. Um eine Deletion und ein Stopcodon zu kreieren, wurde das DNA-Fragment am 5'-Ende mit einem dritten DNA-Fragment verknüpft.

Mäuse dieses Stammes wurden von Prof. Barrett Rollins (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt und im Tierstall des Baylor College of Medicine Houston, TX, USA weitergezüchtet.

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese.

Alter und Gewicht entsprachen zum Zeitpunkt der Versuche dem der Wildtyp-Gruppen, es wurden ebenfalls Tiere beider Geschlechter verwendet.

Alle Tiere waren nahe den Laboren in klimatisierten Tierställen des Methodist Hospitals untergebracht, welche den Tierstalleinrichtungen des Baylor College of Medicine angeschlossen und von den amerikanischen Bundesbehörden genehmigt waren. Der Tierversuch erfüllte die Auflagen des National Institute of Health (NIH, 1985) und wurde vom Baylor Animal Care Committee genehmigt.

3.1.4 Versuchsgruppen

Die Versuche wurden an drei Gruppen vorgenommen:

1. WT: C57/BL6-Wildtypen als Vergleichsgruppe
2. WT+MCP-1AK: C57/BL6-Wildtypen, denen zur Neutralisation von MCP-1 auf Proteinebene ein Antikörper gegen MCP-1 injiziert worden war.
3. MCP-1^{-/-}: Genetisch veränderte MCP-1-defiziente Tiere.

In den Gruppen 1 und 3 wurden einige Tiere zur Kontrolle behandelt, das heißt, sie wurden nur der Initialoperation, nicht jedoch dem I/R Protokoll unterzogen.

3.2 Echokardiografische Messung der ventrikulären Pumpfunktion

Fünf Stunden nach der letzten Ischämieepisode, beziehungsweise bei den Kontrollen eine Woche nach dem Initialeingriff, erfolgten transthorakal echokardiografische Messungen mittels eines 8 MHz Schallkopfes (Sequoia C256, Acuson, Mountain View, CA, USA). Sowohl systolische als auch diastolische Durchmesser des linken Ventrikels sowie die Vorderwanddicke wurden anhand von jeweils drei M-Mode-Aufnahmen gemessen, woraus die Fraktionsverkürzung und die Vorderwandverdickung berechnet werden konnten.

Die aus systolischen (LV_{syst}) und diastolischen (LV_{diast}) Ventrikeldurchmessern berechnete Fraktionsverkürzung (FV) beschreibt die Verkürzung des linken Ventrikels während der Systole im Vergleich zur Diastole und reflektiert die globale linksventrikuläre Pumpfunktion.

$$FV(\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

Mittels der aus systolischer (VW_{syst}) und diastolischer (VW_{diast}) Vorderwanddicke berechneten Vorderwandverdickung (VWV) wurde die regionale Funktion der Vorderwand bewertet.

$$VWV(\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

3.3 Entnahme der Herzen

Den Mäusen wurde fünf Stunden nach der letzten ischämischen Phase des Experiments intraperitoneal eine letale Dosis eines Natrium-Pentobarbital-Gemischs (200 µg/g Körpergewicht) verabreicht. Auf einen V-förmigen Hautschnitt vom Manubrium sterni bis zu den Rippenbögen folgte die Thorakotomie durch einen U-förmigen Rippenschnitt von medioklavikulär auf Höhe der sechsten Rippe über das proximale Manubrium sterni auf die kontralaterale Seite. Nach Beseitigung der Perikardreste und Abtrennung der großen Gefäße wurde das Herz in einer auf 8 °C gekühlten kardioplegischen Lösung ausgewaschen und danach entweder zur histologischen Verarbeitung für 12 bis 15 Stunden in 3,7%-igem Zink-Formalin (Z-fix, Anatech, LTD, Battle Creek, MI, USA) fixiert und anschließend bis zur Paraffineinbettung in 75%-iger Ethanollösung gelagert, oder bis zur RNA-Isolation für die molekularbiologischen Experimente in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung:

- 4 g NaCl (EM Science, Gibbstown, NJ, USA)
- 1 g NaHCO₃ (Sigma, St.Louis, MO, USA)
- 2 g Glukose (Sigma)
- 3 g 2,3-Butandion Monoxim (Sigma)
- 3,8 g Ethylenglykol Tetraessigsäure (Sigma)
- 0,2 mg Nifedipin

10 ml Heparin (1000 IE/ml) (American Pharmaceutical Partners, Los Angeles, CA, USA)

3,73 g KCl (EM Science)

alles in 1 l NaCl-Lösung (Baxter) gemischt.

3.4 Histologie

3.4.1 Gewebeproben

Im Anschluss an die Fixierung in 3,7%-igem Zink-Formalin erfolgte maschinell die Dehydrierung (Citadel 2000, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) und die Einbettung in Paraffin (AP-280-1, Microm GmbH, Walldorf, D).

Von den Paraffinblöcken wurden im Mikrotom (HM 310, Microm, Walldorf, D) von der Herzbasis zur Herzspitze alle 200 µm zehn 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (Anapath Microscope Slides, StatLab, Lewisville, TX, USA) aufgebracht.

Jedes erste Präparat einer Zehnerschnittserie wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt (Protokoll siehe 2.4.3.1.).

3.4.2 Auswahl der Präparate

Anhand der HE-Präparate wurden die Herzen von der Basis bis zum Apex begutachtet und die Lage der RIVA-Ligatur bestimmt.

Zur weiteren histologischen Untersuchung wurden nur die gesichert ischämischen Ebenen verwendet, das heißt nur diejenigen Präparate, die unterhalb der Ligatur lagen und nach erfolgtem I/R Protokoll morphologisch Zeichen einer Ischämie, aber keines Infarktes zeigten.

Bei der weiteren Verarbeitung fiel auf, dass Schnittserien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt worden waren, trotz der Verwendung der gleichen Arbeitsprotokolle und trotz höchster Sorgfalt im Färbeverhalten teilweise voneinander abwichen. Schon bei geringen Veränderungen im Verarbeitungsprozess, wie Fixierung oder Paraffinein-

bettung, reagierten die Gewebsschnitte mehr oder weniger stark auf Färbungen, vor allem auf Sirius Rot und die Eosin gegenfärbung.

Auf die quantitative Auswertung hat diese Tatsache allerdings keine Auswirkung, da stets der gesamte Schnitt die gleichen Eigenschaften aufweist und demzufolge das Bildauswertungsprogramm immer den Unterschied zwischen verschiedenen Helligkeitsstufen oder Farben, die unterschiedliche Gewebstypen darstellen, erkennen und quantitativ vergleichen kann.

3.4.3 Allgemeine Histologie

3.4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente als histologische Basisfärbung zur orientierenden Begutachtung der Schnittserien und ermöglichte die Lagebestimmung der durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Areale zur weiteren gezielten Färbung.

Die Zellkerne stellen sich bei dieser Färbung blau dar, das Zellplasma färbt sich rot.

1. Deparaffinisieren und Rehydrieren:
 - 3 x 3 Minuten Xylol (Dimethylbenzol)
 - 2 x 15 Dips 100% Ethanol
 - 2 x 15 Dips 95% Ethanol
 - 1 x 15 Dips 75% Ethanol
 - 1 x 15 Dips diH₂O
2. Hämatoxylinfärbung für 10 Minuten
3. 1 x 15 Dips diH₂O
 - 1 x 1 Dip Salzsäure-Ethanol-Gemisch
 - 1 x 15 Dips diH₂O
 - 1 x 15 Dips Ammoniumhydroxid (NaH₄OH)
4. Eosin gegenfärbung und Dehydrieren:
 - 1 x 15 Dips diH₂O
 - 1 x 15 Dips 95% Ethanol
 - 1 x 15 Dips Eosin

- 1 x 15 Dips 95% Ethanol
- 3 x 15 Dips 100% Ethanol
- 3 x 15 Dips Xylol
- 5. Aufkleben eines Deckglases (Anapath, StatLab Medical Products, Lewisville, TX, USA) mit Klebstoff auf Xylolbasis (Cytoseal, Richard Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA)

3.4.3.2 Kollagenfärbung

Zur Darstellung des interstitiellen und perivaskulären Kollagens wurden bis zu drei Präparate pro Versuchstier wie folgt mit Sirius Rot gefärbt. Das Kollagen stellt sich rot dar, das Myokard gelb.

1. Deparaffinisieren und Rehydrieren (siehe 2.4.3.1)
2. Sirius Rot Färbung in 0,05%-iger Lösung für 30 Minuten
 - 0,1 g Direct Red 80 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA)
 - 200 ml gesättigte Pikrinsäure (Sigma Diagnostics, St.Louis, MO, USA)
3. Dehydrieren:
 - 1 x 15 Dips in diH₂O
 - 2 x 15 Dips in 95% Ethanol
 - 2 x 15 Dips in 100% Ethanol
 - 2 x 15 Dips in Xylol
4. Eindeckeln

3.4.4 Immunhistochemie

3.4.4.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode

Diese von Hsu et al. (1981) entwickelte indirekte immunhistochemische Methode beruht auf der außerordentlich hohen Bindungsaffinität (10^{15} M^{-1}) von Avidin, einem 68.000 Dalton großen Glykoprotein, zum niedermolekularen Biotin (Vitamin H).

Aufgrund seiner vier Bindungsstellen kann Avidin mehrere Biotinmoleküle irreversibel binden, was zur Bildung makromolekularer Komplexe führt, in denen Avidin als Brückenmolekül zwischen mehreren biotinmarkierten Peroxidasemolekülen dient.

An einen Primärantikörper gegen das zu untersuchende Antigen bindet ein biotiniertes Sekundärantikörper. An diesen wiederum knüpft sich im nächsten Schritt der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex mit seiner verbleibenden freien Bindungsstelle an, was zu einer Signalverstärkung führt.

Die Peroxidase wird letztlich durch den Farbstoff Diaminobenzol (DAB) und Nickel braun gefärbt. Anschließend wird mit Eosin gegengefärbt.

Um unspezifische Färbungen zu verhindern, werden vor der Inkubation mit dem Primärantikörper endogene Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid abgetötet und unspezifische Bindungsstellen im Gewebe durch ein Normalserum geblockt.

3.4.4.2 Makrophagenfärbung

Zur Darstellung der Makrophagen im Myokardium wurde ein Antikörper gegen das Glykoprotein F4/80 verwendet. F4/80 wird an der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiert und gehört zur Familie der Hormonrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Als Positivkontrolle wurden Schnitte aus der Milz verwendet.

Die Färbung folgte nachstehendem Protokoll nach der ABC-Methode.

1. Deparaffinisieren und Rehydrieren (siehe 2.4.3.1)
2. Waschen in H₂O für 5 Minuten
3. Umkreisen des Gewebes mit einem Paraffinstift und Inkubation mit 3%-igem Wasserstoffperoxid für 15 Minuten (H₂O₂-Block)
4. Waschen in phosphatgepuffertes NaCl-Lösung (PBS, pH 7,1 - 7,4) für 4 Minuten
5. Inkubation mit Ratten-IgG-Block-Lösung (Vectorstain ABC Elite-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 30 Minuten (300 µl Stammlösung auf 15 ml PBS)
6. Abtropfen der Blocklösung und Inkubation mit dem F4/80-Antikörper (Klon Cl:A3-1, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA) in einer Verdünnung von 1:150 (33 µl Antikörper (Konzentration 1 mg/ml) auf 5 ml PBS) für 2 Stunden

7. Waschen in PBS für 4 Minuten
8. Inkubation mit biotiniertem Antikörper (Vectorstain ABC Elite-Kit, Vector, 25 µl auf 5 ml IgG-Blocklösung) für 30 Minuten
9. Waschen in PBS für 4 Minuten
10. Inkubation mit ABC-Peroxidase-Lösung (Vectorstain ABC Elite-Kit, Vector, 100 µl Reagenz A und 100 µl Reagenz B auf 5 ml PBS) für 30 Minuten
11. Waschen in PBS für 4 Minuten
12. Färbung mit Diaminobenzol (DAB, Peroxidase Substrate Kit, Vector) für 2 bis 5 Minuten unter Kontrolle im Mikroskop
DAB-Lösung: 100 µl Pufferlösung, 100 µl Wasserstoffperoxid, 100 µl Nickellösung und 200 µl DAB-Lösung auf 5 ml diH₂O, maximal 10 Minuten vor Gebrauch herstellen
13. Stoppen der DAB-Färbung durch Waschen in diH₂O für 5 Minuten
14. Eosin Gegenfärbung und Dehydrieren
15. Eindeckeln und Trocknen

3.4.4.3 Färbung von Myofibroblasten und Gefäßendothel

Ein Antikörper gegen α -Aktin der glatten Muskelzellen (α -SMAc) diente zur Darstellung von Myofibroblasten. Als Positivkontrolle galt eine erfolgreiche Arteriolenfärbung, da auch glatte Muskelzellen der Media durch α -SMAc angefärbt werden.

1. Deparaffinisieren und Rehydrieren (siehe 2.4.3.1)
2. Waschen in diH₂O für 5 Minuten
3. Umkreisen des Gewebes mit einem Paraffinstift und Inkubation mit 3%-igem Wasserstoffperoxid für 15 Minuten (H₂O₂-Block)
4. Waschen in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS, pH 7,1-7,4) für 4 Minuten
5. Inkubation mit Maus-IgG-Block-Lösung (M.O.M.-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 60 Minuten (100 µl Lösung auf 5 ml PBS)
6. Waschen in PBS für 4 Minuten
7. Inkubation mit M.O.M.-Proteinlösung (1.200 µl Proteinkonzentrat auf 15 ml PBS) für 5 Minuten

8. Abtropfen der Proteinlösung und Inkubation mit dem α -smooth-muscle-actin Antikörper (Klon 1A4, Sigma, St.Louis, MO, USA) in einer Verdünnung von 1:250 (20 μ l auf 5 ml PBS) für 30 Minuten
9. Waschen in PBS für 4 Minuten
10. Inkubation mit biotiniertem Antikörper (M.O.M.-Kit, Vector, 20 μ l auf 5 ml M.O.M.-Proteinlösung) für 10 Minuten
11. Waschen in PBS für 4 Minuten
12. Inkubation mit ABC-Peroxidase-Lösung (M.O.M.-Kit, Vector, 200 μ l Reagenz A und 200 μ l Reagenz B auf 5 ml PBS) für 5 Minuten
13. Waschen in PBS für 4 Minuten
14. Färbung mit Diaminobenzol (DAB, Peroxidase Substrate Kit, Vector) für 2 bis 5 Minuten unter Kontrolle im Mikroskop
DAB-Lösung: 100 μ l Pufferlösung, 100 μ l Wasserstoffperoxid, 100 μ l Nickellösung und 200 μ l DAB-Lösung auf 5 ml diH₂O, maximal 10 Minuten vor Gebrauch herstellen
15. Stoppen der DAB-Färbung durch Waschen in diH₂O für 5 Minuten
16. Eosin Gegenfärbung und Dehydrieren
17. Eindeckeln und Trocknen

3.4.5 Quantitative Auswertung

Bei der Auswertung der Kollagen- und Makrophagenfärbungen wurde zunächst nach dem gleichen Protokoll vorgegangen.

Von jedem der zwei bis drei Präparate pro Tier aus dem Bereich des mittleren Herzens wurden drei Bilder in der Herzvorderwand, drei in der Seitenwand und drei in der Hinterwand gescannt, wobei je ein Bild den subepikardialen Teil, eins den mittleren myokardialen und ein Bild den subendothelialen Bereich des Herzmuskels zeigte.

Als Kontrolle dienten zum einen je ein Foto aus dem vorderen beziehungsweise dem hinteren Septum, und zum anderen Bilder aus der Herzbasis, einem gesichert nicht ischämischen Bereich.

Alle Bilder wurden bei 200-facher Vergrößerung mit einer Auflösung von 3.900 x 3.090 Pixel mithilfe einer am Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Jena, D) montierten Kamera (AxioCam HRc, Zeiss, Jena, D) gescannt und mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Image Pro[®] Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) ausgewertet.

3.4.5.1 Kollagenauswertung

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils des Kollagens im Herzen wurde das durch Picosiriusrot angefärbte Kollagen manuell markiert, wobei das Perikard nicht in die Messung einbezogen wurde. Nachdem das Bild in eine Maske überführt worden war, wurden markierte und unmarkierte Bereiche berechnet, woraus die Kalkulation der Gesamtfläche und des prozentualen Kollagenanteils (Gesamtfläche dividiert durch Fläche der markierten Areale) erfolgte.

3.4.5.2 Makrophagenauswertung

Zur Bestimmung der Makrophagendichte im Myokard wurde zunächst die Gesamtfläche des Präparats ermittelt, danach wurden die Makrophagen manuell gezählt.

3.5 Molekularbiologie

3.5.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der MCP-1^{-/-}-Mäuse wurde unter aseptischen Bedingungen ein 0,5 bis 1 cm langes Schwanzstück der Tiere gewonnen, woraus die DNA mithilfe eines DNA-Isolationskits (DNeasy Tissue Kit, Quiagen, Hilden, D) extrahiert wurde.

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

PCR-Pipettierprotokoll

29 µl H₂O
 5 µl 10X PCR Puffer
 1,5 µl MgCl₂
 1 µl dNTP Gemisch
 1 µl je Primer
 10 µl DNA
 0,5 µl Taq Polymerase

PCR-Zyklen

1. 93 °C für 2 Minuten
2. 93 °C für 30 Sekunden
3. 63 °C für 30 Sekunden
4. 72 °C für 2,5 Minuten
5. 39 Mal Schritt 2 bis 4
6. 72 °C für 8 Minuten
7. 4 °C bis zur Elektrophorese

Primersequenzen:

Forward-Primer (MCP-1-F1): GGA GCA TCC ACG TGT TGG C

Reverse-Primer für den Wildtyp (MCP-1-R2): ACA GCT TCT TTG GGA CAC C

Reverse-Primer für MCP-1^{-/-} (1MRO60): AGG ATC TCG TCG TGA CCC ATG GCG A

Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid geladen und unter einer UV-Kamera beurteilt.

Für eine Wildtyp-Kontrolle wurde ein Genprodukt von 888 bp erwartet, für die MCP-1^{-/-}-Mäuse eine Bande von 1.382 bp (Abbildung 2).

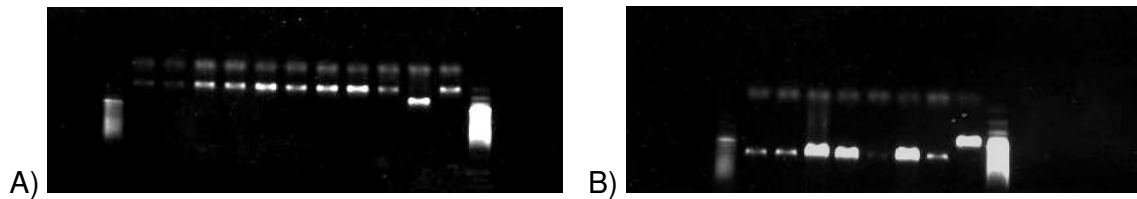


Abbildung 2: Genotypisierung der MCP-1^{-/-}-Mäuse.

A) MCP-1^{-/-} auf Bande 10

B) MCP-1^{-/-} auf Bande 1 bis Bande 7

3.5.2 RNA-Isolation

Aus den seit der Entnahme bei -80 °C gefrorenen Herzen erfolgte die Isolation der RNA nach der Phenol-Chloroform-Methode.

Die Herzen wurden in 2 ml kalter RNAsat-60-Lösung (Tel-Test, INC., Friendswood, TX, USA) mittels eines Gewebehomogenisators (Tissue Tearor TM Modell 398, Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) auf höchster Stufe zerkleinert. Die Klinge des Homogenisators wurde dabei nach der Verarbeitung eines jeden Herzens sowohl in 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS, Sigma) als auch in Diethylpyrocarbonat - doppelt deionisiertes Wasser (DEPC-ddH₂O) - gereinigt. Dann wurde das homogenisierte Gewebe in sterile 25 ml Röhrchen überführt und zur Phasentrennung 200 µl R-Chloroform (99% R-Chloroform, Sigma) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert (Beckman-Coulter, Avanti J 25, Rotor JA, Palo Alto, CA, USA). Danach waren drei voneinander getrennte Phasen zu erkennen: Ein wässriger RNA-haltiger Überstand, eine DNA und Zellmembranreste enthaltende Zwischenschicht und die proteinreiche Bodenschicht. Der RNA-haltige wässrige Überstand wurde in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Zur Ausfällung der RNA wurde ein gleiches Volumen an 99%-igem Isopropanol (Sigma) hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde die ausgefallene RNA bei 12.000 g und 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml 75%-igem Ethanol (Aaper) gewaschen. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde der Überstand entfernt, das Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 80 µl RNase-freiem 0,1%-igem DEPC-ddH₂O resuspendiert. Um die Konzentration der RNA zu messen, wurden 5 µl RNA in jeweils 495 µl

DEPC-ddH₂O verdünnt (1:100). Die Extinktion der RNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm spektrophotometrisch (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) gemessen.

Die RNA-Konzentration wurde aus der 260 nm Extinktion mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet. Die Qualität der RNA wurde durch das 260 nm / 280 nm-Verhältnis errechnet. Die Proben mit einem Verhältnis > 1,6 wurden für weitere Untersuchungen verwendet. 10 µg RNA wurden in 1 ml Aufbewahrungslösung überführt [700 µl eiskalter 100%-iger Ethanol (Aaper), 270 µl DEPC-dd H₂O (Sigma), 30 µl 3 M Na-Acetat (Sigma)] und bei -80 °C gelagert.

3.5.3 RNA-Protection-Assay

3.5.3.1 Prinzip

Mithilfe von RNA-Protection-Assay (RPA) können in einer Mixtur von zellulärer RNA spezifische RNAs detektiert und quantifiziert werden.

RNA-Proben werden mit radioaktiv markierten antiparallelen Sonden gekoppelt und nicht hybridisierte RNA anschließend durch Nukleasen verdaut. Im nächsten Schritt werden gleichzeitig die Nukleasen inaktiviert und die RNA-Hybride ausgefällt. Diese Produkte werden auf ein Polyacrylamidgel geladen, durch Autoradiografie visualisiert und anschließend analysiert.

3.5.3.2 Protokoll

Tag 1:

Synthese der Sonden:

1. [α -³²P]UTP, GACU Nukleotid Pool, DTT, 5 x Transkriptionspuffer und RPA-Schablonen (Templates)-Set wurden auf Raumtemperatur gebracht. Für jede Sonden-Synthese wurden folgende Reagenzien der Reihe nach in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen pipettiert:

- 1,0 µl RNasin
 - 1,0 µl GACU Pool
 - 2,0 µl DTT
 - 4,0 µl 5 x Transkriptionspuffer
 - 1,0 µl RPA-Template-Set
 - 10,0 µl [α -³²P]UTP
 - 1,0 µl T7 RNA-Polymerase (vor und nach Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt)
2. Durch Pipettieren und kurzes Zentrifugieren wurde die Lösung gemischt und bei 37 °C 1 Stunde lang inkubiert.
 3. Durch Hinzufügen von 2 µl DNase wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde gemischt und bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert.
 4. Folgende Reagenzien wurden in jedes 1,5 ml Röhrchen pipettiert:
 - 4,0 µl 100 mM EDTA
 - 4,0 µl Hefe tRNA der Konzentration 2 µg/µl
 5. Durch Pipettieren wurde gemischt und anschließend kurz zentrifugiert.
 6. Inkubation bei 65 °C über 5 Minuten.
 7. Die neu transkribierte Sonde wurde in einer Sephadex G-50[®]-Säule (NucAway Spin Column, Ambion) gereinigt.
 - a. Säule aufgetippt, um das trockene Gel auf den Säulenboden zu bringen.
 - b. Säule mit 650 µl RNase-freiem Wasser hydratisiert. Verschlossen, gevortext, Luftblasen entfernt und bei Raumtemperatur 5 bis 15 Minuten lang hydratisiert. Die hydratisierten Säulen konnten bei 4 °C bis zu 3 Tage gelagert werden.
 - c. Säulen bei 750 x g (2.700 rpm) zentrifugiert, um überschüssige interstitielle Flüssigkeit zu entfernen. Dabei auf die Ausrichtung der Säule in der Zentrifuge geachtet. Schritt 7c zweimal wiederholt.
 - d. Waschröhrchen verworfen und sofort die Probe (30 µl aus Schritt 6) auf die Mitte des Gels in der Säule gegeben, ohne das Gel zu verletzen oder die Säulenränder mit der Pipettenspitze oder den Reagenzien zu berühren.
 - e. Die Säule in das Proben-Sammelröhrchen gesetzt, in der Zentrifuge platziert und auf die Ausrichtung in derselben geachtet.
 - f. Bei 750 x g 2 Minuten lang zentrifugiert. Die Probe befand sich danach im Sammelröhrchen.

- g. Säule verworfen und mit der Prozedur fortgefahren.
8. 1 μl Proben wurden im Szintillationszähler quantifiziert. Es war ein Maximum von $\sim 3 \times 10^6$ Cherenkov Counts/ μl zu erwarten (Messung von cpm/ μl ohne Vorhandensein von Szintillationsflüssigkeit) mit einer zu tolerierenden unteren Grenze von $\sim 3 \times 10^5$ Cherenkov Counts/ μl . Die Sonde wurde bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Normalerweise konnte die Sonde nur für zwei aufeinander folgende Hybridisierungen genutzt werden (bei Markierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$).

RNA-Vorbereitung und -Hybridisierung:

1. Für beste Ergebnisse wurden Verfahren genutzt, die Gesamt-RNA von hoher Qualität und Reinheit erzeugen. Die RNA sollte in RNase-freiem Wasser bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. 10 μg Ziel-RNA wurden in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gegeben und ein Röhrchen mit 2 μl Hefe tRNA der Konzentration 2 mg/ml als Background-Kontrolle einbezogen. Generell waren insgesamt 20 bis 24 Proben möglich. Als positive Kontrolle wurde ein Röhrchen mit 2 μl (μg) der entsprechenden BD RiboQuant Kontroll-RNA einbezogen.
2. Falls die RNA in Wasser gelagert wurde, wurden die Proben bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 15 Minuten lang gefroren. Anschließend erfolgte die vollständige Trocknung in einem Vakuumverdunster (keine Hitze). Alternativ konnte die RNA vor dem Zugeben von Hybridisierungspuffer mit Ethanol ausgefällt werden.
3. Zu jeder Probe wurde 8 μl Hybridisierungspuffer gegeben. Durch leichtes Vortexen für 3-4 Minuten und kurzes Zentrifugieren wurde die RNA aufgelöst.
4. Die Sonde aus Schritt 8 der Sonden-Synthese wurde mit Hybridisierungspuffer auf die richtige Konzentration verdünnt. Die optimale Konzentration war in der Beschreibung jedes standardisierten Multi-Sonden-Template-Sets angegeben. 2 μl der verdünnten Sonde wurden zu jeder RNA Probe pipettiert und gemischt. Es wurden je 2 Tropfen Mineralöl zugegeben und kurz zentrifugiert.
5. Die Proben wurden in einen auf $90\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Heizblock gesetzt, die Temperatur sofort auf $56\text{ }^\circ\text{C}$ reduziert, um ein langsames Abkühlen zu erlauben, und 12-16 Stunden lang inkubiert.

Die Proben wurden 15 Minuten vor der RNase Behandlung aus dem Heizblock genommen und bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Die Inkubationen konnten auch im Wasserbad durchgeführt werden.

Tag 2:

RNase-Behandlung:

1. Der RNase-Mix wurde vorbereitet (für 20 Proben):
 - 2,5 ml RNase-Puffer
 - 6 µl RNase A + T1 Mix
2. Die RNA-Proben wurden aus dem Heizblock genommen und 100 µl RNase-Mix in die wässrige Schicht unter das Öl pipettiert. Es wurde 10 Sekunden lang zentrifugiert und bei 30 °C 45 Minuten inkubiert.
3. Die RNase-Digestionsprodukte wurden mit einer Pipette unter dem Öl extrahiert und in ein frisches, gekennzeichnetes Röhrchen transferiert.
4. Folgender Mix wurde vorbereitet:
 - 980 µl GTC-Lösung (4 M Guanidin Thiocyanat, 0,5% N-Lauroyl-Sarkosin, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0)
 - 10 µl β-Mercaptoethanol (14,3 M)
 - 10 µl Hefe tRNA (2 µg/µl)
5. Zu jeder Probe wurden 110 µl des GTC-Gemischs und 220 µl Isopropanol (Raumtemperatur) gegeben und gevortext.
6. Inkubation bei -80 °C über mindestens 30 Minuten.
7. Zentrifugation bei 4 °C über 30 Minuten.
8. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und 200 µl eiskalter 90%-iger Ethanol zugegeben. Zentrifugation bei 4 °C über 10 Minuten.
9. Schritt 8 wurde zweimal wiederholt.
10. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet vollständig luftgetrocknet (nicht im Vakuumverdunster).
11. 5 µl 1 x Ladepuffer wurden zugegeben, 2-3 Minuten gevortext und kurz zentrifugiert. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 3 Minuten lang auf 90 °C erhitzt und sofort in ein Eisbad gegeben.

Herstellung des Gels:

Gewünschte Konzentration: 5% Acrylamid

80 ml Sequagel 6 (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA)

20 ml Sequagel Complete (National Diagnostics, Atlanta, Georgia, USA)

800 µl 10% APS (900 µl MiliQ H₂O oder DEPC H₂O + 0,1 g Ammoniumpersulfat)

Die Bestandteile wurden gemischt und in die Form gegossen. Nach 1 bis 1,5 Stunden konnten sie bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert werden.

Nach der Polymerisierung des Gels wurde der Kamm entfernt und 2.000 ml 0,5 x TBE zugegeben (100 ml 10 x TBE, 1.900 ml diH₂O). Vorlauf des Gels für 1 Stunde bei 70 V. Die Temperatur des Gels sollte 50 °C betragen.

5 µl der Proben und Kontrollen aus der RNA-Behandlung Schritt 11 wurden in die Taschen des Gels geladen und das Gel 10 Minuten bei 20 V und 3 Stunden 35 Minuten bei 60 V laufen gelassen, bis die erste Farbstoffbande (Bromophenol Blau) am Ende des Gels ankam.

3.5.3.3 Auswertung

Das fertige Gel wurde auf Filterpapier gelegt und die Laufrichtung der Banden markiert. Anschließend wurde es in Plastikfolie eingeschlagen und im Geltrockner im Vakuum 1 Stunde lang bei 80 °C getrocknet.

Das getrocknete Gel wurde zusammen mit einem Verstärkerschirm auf einen Film (Low Energy Storage Phosphor Screen, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) gegeben und über Nacht bei -80 °C entwickelt.

Der „Low Energy Storage Phosphor Screen“ besteht aus seltenen Erdmetallen, die die von dem Gel ausgehenden γ -Strahlen aufnehmen. Die densitometrische Analyse des Films erfolgte mit Hilfe eines speziellen Scanners (Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Der Scanner zeigte nach 42 Minuten bei einer Auflösung von 50 µ die Menge der absorbierten Strahlung in Counts pro Fläche an und erzeugte ein digitales Negativ des Gels, wobei die Counts als Schwarze Banden sichtbar wurden. Das Negativ wurde mit dem Programm Image Quant (Version 5.2, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) ausgewertet. Das Programm wandelte die Banden in einen Grafen um, wobei das Integral unter den „Peaks“ der Anzahl der Counts pro Bande ent-

spricht. Die genaue Zuordnung der einzelnen „Peaks“ zu den untersuchten Genen erfolgte mit Hilfe der Sondenlösung, die als Längenstandard benutzt wurde.

Neben dem digitalen Negativ wurde durch Entwicklung des Gels auf einem Röntgenfilm (Biomax Film, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) für zwei Tage bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ auch eine Röntgenaufnahme des Gels angefertigt.

Aufgrund der Anzahl der einzelnen Tiere in den verschiedenen Gruppen war es nicht möglich, gleiche Zeitintervalle verschiedener Mäusegruppen im selben RPA zu untersuchen. Die quantitative Messung der einzelnen Banden hängt jedoch sehr von der Qualität eines jeden RPA ab, die auf unterschiedlichen Bedingungen wie Reinheit der RNA, Degradierung durch RNasen, unterschiedlicher Aktivität der Enzyme, schwankenden Inkubationstemperaturen oder Pipettiergenauigkeiten beruht. Die Messungen der einzelnen Gene auf unterschiedlichen Gelen sind somit nicht direkt vergleichbar, sondern es muss eine Normalisierung der Daten aus den Messungen vorgenommen werden. Die bei der densitometrischen Messung für die einzelnen Banden gewonnenen Daten wurden in Excel (Microsoft, Redmond, CA, USA) ins Verhältnis zum Housekeeping Gen L32 gesetzt, welches wie GAPDH in unterschiedlichen Zellen des Organismus relativ konstant exprimiert wird. Damit eignen sich das ribosomale Protein L32 und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard (Muller et al., 2001), und die Quantifizierung der Banden wird bei Annahme einer konstanten Expression von L32 zwischen verschiedenen RPAs vergleichbar.

3.6 Statistik

Die Daten wurden statistisch als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) zusammengefasst.

Die P-Werte wurden anhand einer Varianzanalyse, gefolgt von einem t-Test und einer *posthoc*-Analyse nach Student-Newman-Keuls ermittelt.

Ein p-Wert von $p < 0,05$ galt als signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Repetitive Ischämie und Reperfusion

Insgesamt wurden 136 Tiere initialoperiert, davon verblieben 23 als Kontrolltiere, die restlichen 113 wurden I/R-Episoden unterzogen. 8 Tiere wurden aufgrund von Myokardinfarkten aus den Untersuchungen ausgeschlossen, so dass letztlich 105 Mäuse für weiterführende Experimente zur Verfügung standen.

65 Tiere gehörten der Wildtypgruppe an, 25 Mäuse der WT+MCP-1AK-Gruppe und 38 Tiere standen in der MCP-1^{-/-}-Gruppe zur Verfügung. Für die unterschiedlichen Zeitintervalle wurden für Histologie und Molekularbiologie jeweils 7 bis 9 Tiere verwendet.

4.2 Einfluss der MCP-1-Neutralisation auf das ischämische Myokard

Um die Auswirkungen des nach Ischämie und Reperfusion deutlich erhöhten Chemokins MCP-1 zu untersuchen, wurden zunächst echokardiografische Messungen und Kollagenfärbungen an antikörperbehandelten Herzen ausgewertet.

4.2.1 Echokardiografie

Die Wildtypmäuse zeigten im Verlauf der I/R eine zunehmende ventrikuläre Dysfunktion mit signifikant niedrigeren Werten für Fraktionsverkürzung und Vorderwandverdickung. Die WT+MCP-1-AK-Tiere wiesen nach 7 Tagen I/R dagegen keine ventrikuläre Dysfunktion auf. Die Vorderwandverdickung war mit $61\% \pm 3\%$ im Vergleich zu $36\% \pm 2\%$ bei den Wildtypmäusen signifikant ($p < 0,001$) besser, während die Fraktionsverkürzung mit $43\% \pm 2\%$ über dem Wert der Wildtypherzen von $35\% \pm 1\%$ ($p < 0,001$) lag (Diagramme 2 und 3).

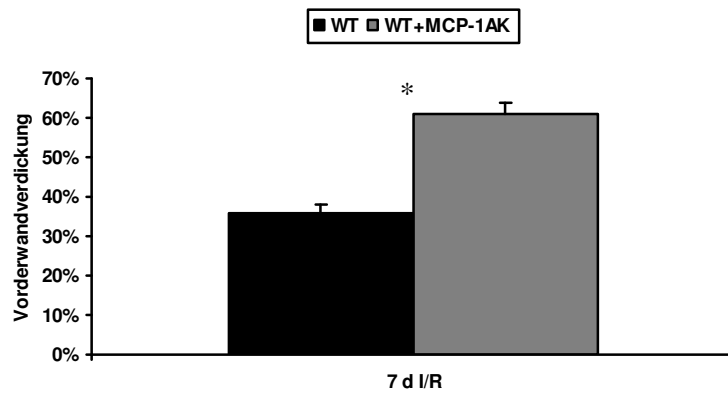


Diagramm 2: Vorderwandverdickung in WT und WT+MCP-1AK. Die Werte für die Vorderwandverdickung als Ausdruck der regionalen Funktion der Vorderwand lagen beim WT+MCP-1AK nach 7 Tagen I/R signifikant höher als die Werte der Wildtypmäuse, und zeigten keine ventrikuläre Dysfunktion. * $p < 0,001$.

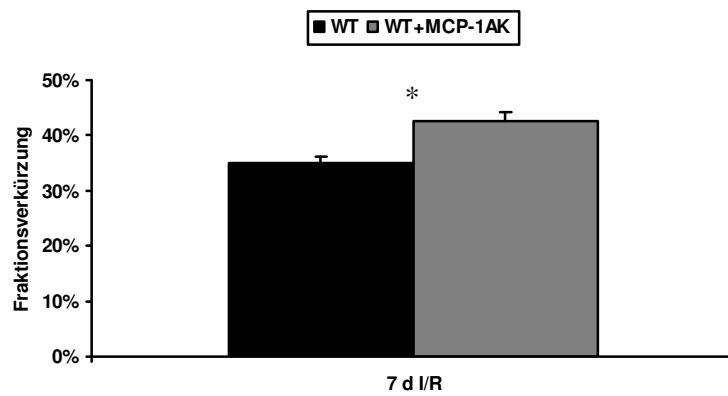


Diagramm 3: Fraktionsverkürzung in WT und WT+MCP-1AK. Die globale linksventrikuläre Pumpfunktion, beschrieben durch die Fraktionsverkürzung, war nach 7 Tagen I/R beim WT+MCP-1AK erhalten und signifikant besser als beim WT. * $p < 0,001$.

4.2.2 Kollagenanteil

Das picrosiriusrot gefärbte Kollagen zeigte nach Ischämie und Reperfusion eine perimysiale Fibrose, wobei im Gegensatz zum Myokardinfarkt keine Ersatzfibrose erkennbar war. Bei der Quantifizierung des interstitiellen Kollagenanteils der WT+MCP-1AK-Gruppe zeigte sich im Vergleich zu den Wildtypieren nach 7 Tagen I/R eine deutlich geringer ausgeprägte Fibrose (Abbildung 3 und Diagramm 4).

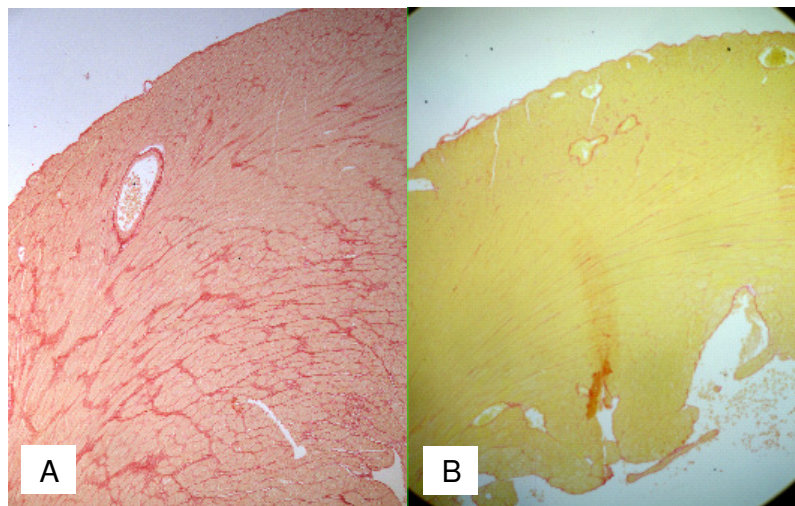


Abbildung 3: Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand in WT und WT+MCP-1AK nach 7 Tagen I/R mittels Picrosiriusrot-Färbung.

A) Interstitielle Fibrose in Wildtyp-Herzen nach 7 Tagen I/R, Vergr. 100x

B) Deutlich geringere Fibrosebildung bei WT+MCP-1AK nach 7 Tagen I/R, Vergr. 100x

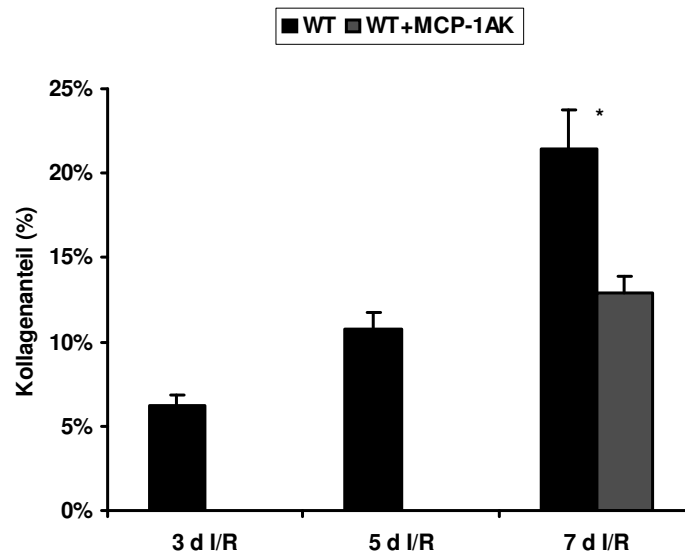


Diagramm 4: Kollagenanteil in WT und WT+MCP-1AK. Während der Kollagenanteil der linksventrikulären Vorderwand beim WT bis zum 7. Tag I/R anstieg, war die Fibrose beim WT+MCP-1AK nach 7 Tagen I/R signifikant geringer. * $p < 0,01$.

4.3 Auswirkungen einer MCP-1-Defizienz auf die Pumpfunktion des ischämischen Herzens

Nachdem die Experimente an den WT+MCP-1AK-Mäusen die Vermutungen zum Einfluss von MCP-1 auf das ischämische Herz bekräftigt hatten, ging man zu Versuchen an MCP-1^{-/-}-Tieren über.

In der Echokardiografie zeigte sich bei den MCP-1^{-/-}-Tieren nach 7 Tagen I/R im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine Vorderwandverdickung von $55\% \pm 3\%$ und eine Fraktionsverkürzung von $43\% \pm 3\%$ ($p < 0,001$). Damit blieb die ventrikuläre Pumpfunktion bei MCP-1^{-/-}-Mäusen erhalten (Diagramme 5 und 6).

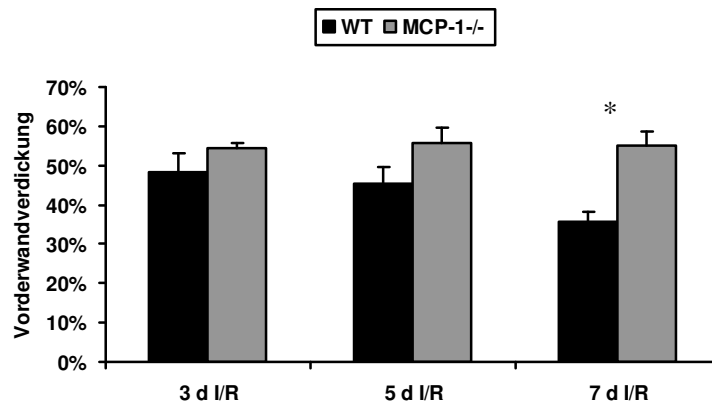


Diagramm 5: Vorderwandverdickung in WT und MCP-1^{-/-}. Während die Werte bei den Wildtypmäusen als Ausdruck einer fortschreitenden ventrikulären Dysfunktion bis zum 7. Tag I/R immer weiter sanken, blieben sie bei den MCP-1^{-/-}-Tieren trotz I/R auch nach 7 Tagen unverändert, und deren Pumpfunktion blieb erhalten. * $p < 0,001$.

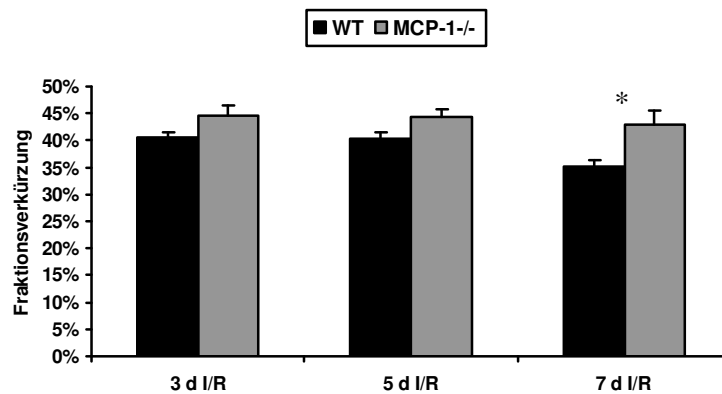


Diagramm 6: Fraktionsverkürzung in WT und MCP-1^{-/-}. Auch nach 7 Tagen repetitiver I/R blieb die Pumpfunktion bei den MCP-1^{-/-}-Tieren erhalten, während die Fraktionsverkürzung bei den Wildtypmäusen als Ausdruck einer fortschreitenden ventrikulären Dysfunktion bis zum 7. Tag I/R immer weiter absank. * $p < 0,001$.

4.4 Fibrose in MCP-1-defizienten Mäusen

Die Auswertung des Kollagenanteils bei MCP-1-defizienten Mäusen ergab ähnliche Ergebnisse wie in der WT+MCP-1AK-Gruppe (Abbildungen 4 A und 4 B und Diagramm 7).

In ischämischen Gebieten der Wildtyp Herzen wiesen $19,42\% \pm 0,0102\%$ des Areal, vor allem das Perimysium, fibrotische Veränderungen auf, während die MCP-1^{-/-}-Tiere im Mittel mit $10,1\% \pm 0,0042\%$ ($p < 0,001$) signifikant weniger Kollagen um Gefäße und Myozyten zeigten.

Um sicherzustellen, dass diese signifikanten Unterschiede erst infolge der Ischämie und Reperfusion entstanden waren und nicht auch schon in gesunden Abschnitten ein unterschiedliches kollagenes Verteilungsmuster existierte, wurden auch Schnitte aus der gesichert nichtischämischen Herzbasis oberhalb der Ligatur ausgewertet. Für beide Gruppen, WT und MCP-1^{-/-}, ergab sich jeweils ein Kollagenanteil um 6% (WT: $6,94\% \pm 0,0063\%$; MCP-1^{-/-}: $6,14\% \pm 0,0017\%$, n.s.) (Abbildungen 4 C und 4 D und Diagramm 7).

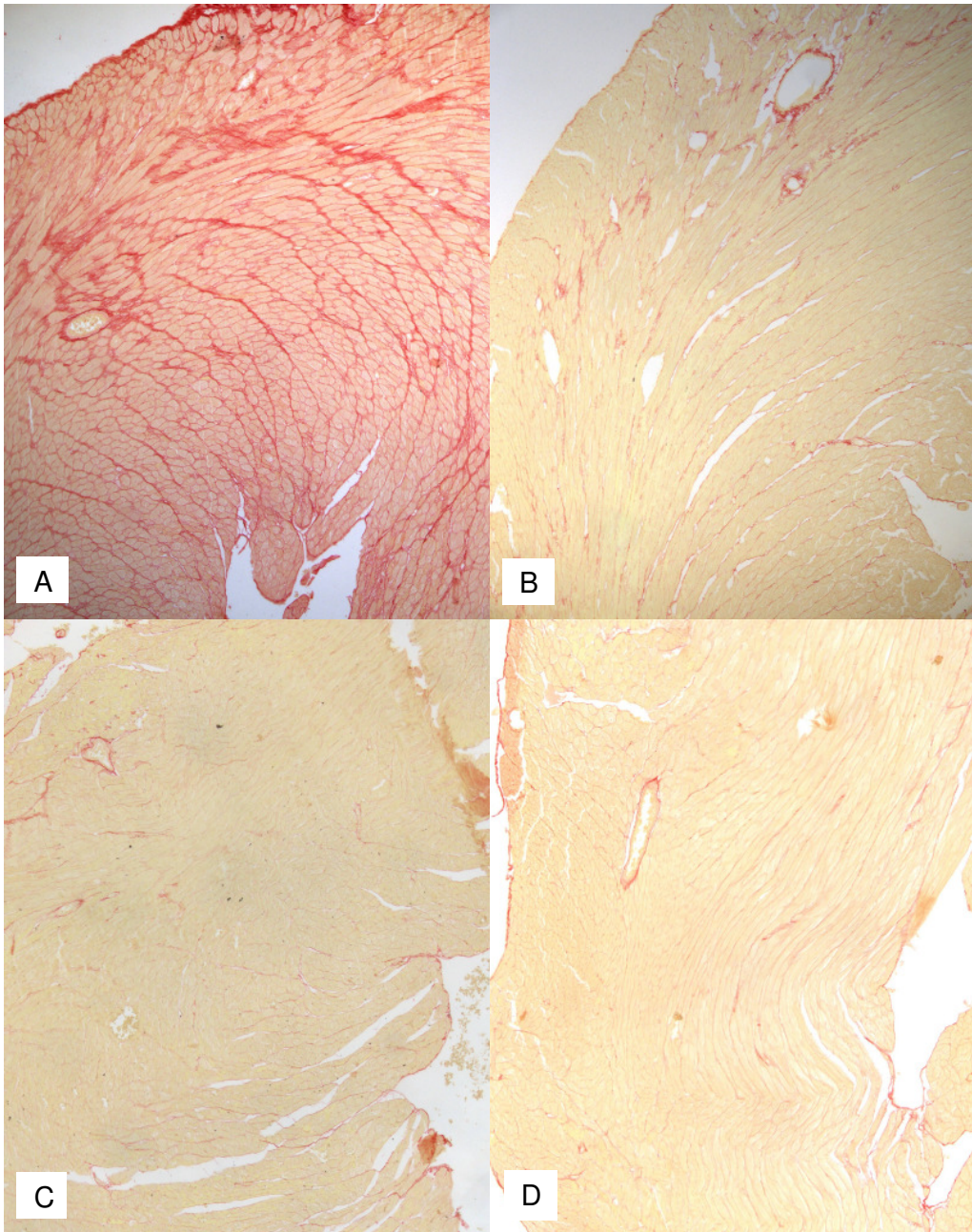


Abbildung 4: Vergleich der Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand der WT und MCP-1^{-/-} nach 7 Tagen I/R.

- A) Interstitielle Fibrose in Wildtypmäusen nach 7 Tagen I/R, Vergr. 100x
- B) Deutlich geringere Fibrose bei den MCP-1^{-/-}-Herzen nach 7 Tagen I/R, Vergr. 100x
- C) Keine Fibrose bei Wildtypmäusen nach 7 Tagen I/R im nichtischämischen Kontrollgebiet der Herzbasis, Vergr. 100x
- D) Keine Fibrose der MCP-1^{-/-}-Herzen nach 7 Tagen I/R im nichtischämischen Kontrollgebiet der Herzbasis, Vergr. 100x

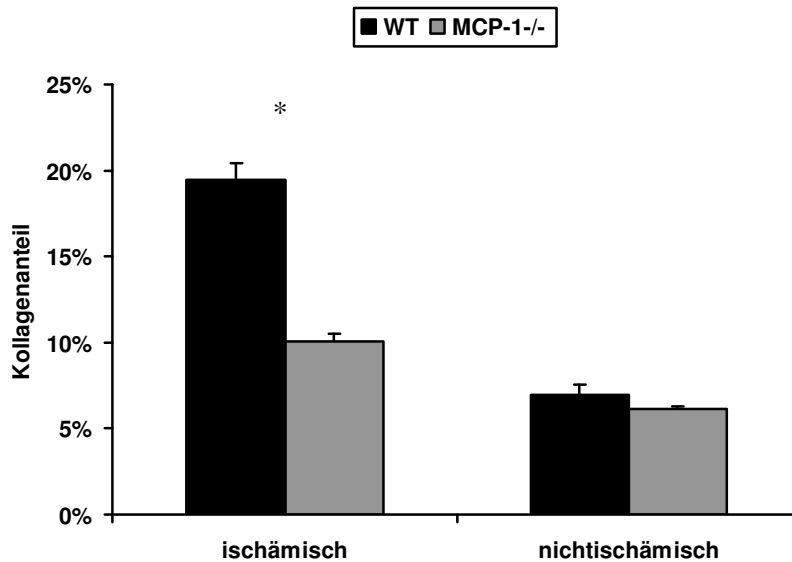


Diagramm 7: Kollagen in ischämischen und nichtischämischen Bereichen von WT und MCP-1^{-/-} nach 7 Tagen I/R. In ischämischen Gebieten zeigte sich in den Wildtypherzen eine gegenüber den MCP-1^{-/-}-Herzen signifikant stärkere Fibrose, während in nichtischämischen Gebieten kein Unterschied im Kollagenanteil der linksventrikulären Vorderwand nachzuweisen war. *p<0,001.

4.5 Myofibroblasteneinwanderung nach 5 Tagen I/R

In Färbungen mit einem Antikörper gegen α -Aktin-der-glatten-Muskelzellen zeigte sich, dass in den MCP-1^{-/-}-Tieren weniger Myofibroblasten zu finden waren als in Wildtypmäusen. Auf eine Quantifizierung wurde aufgrund der vor allem in den Wildtypherzen kaum klar voneinander abzugrenzenden Zellen verzichtet (Abbildungen 5 A und 5 B).

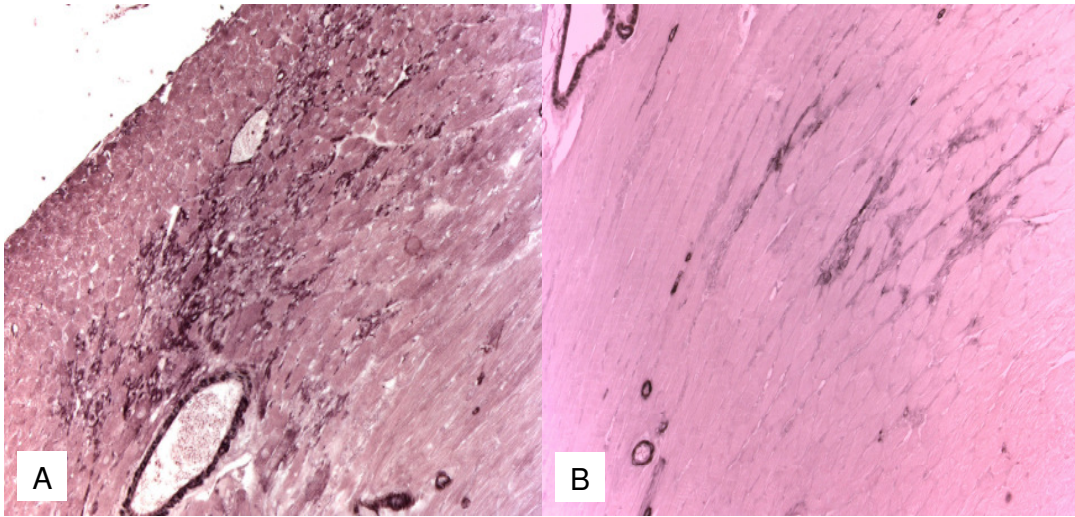


Abbildung 5: Vergleich der Myofibroblastenfärbung der linksventrikulären Vorderwand der WT und MCP-1^{-/-} nach 5 Tagen I/R.

- A) In den Wildtypmäusen kommt es nach 5 Tagen I/R zu einer starken Myofibroblasteninfiltration, Vergr. 200x
 B) Deutlich geringer ausgeprägte Myofibroblasteninfiltration in MCP-1^{-/-}-Herzen nach 5 Tagen I/R, Vergr. 200x

4.6 Einfluss der MCP-1-Defizienz auf die Makrophagenrekrutierung

Da MCP-1 als einer der bedeutendsten Mediatoren für die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in geschädigtes Gewebe gilt, lag die Vermutung nahe, dass in den MCP-1-defizienten Mäusen nach Ischämie und Reperfusion nur eine reduzierte Anzahl an F4/80-positiven Zellen nachzuweisen ist.

Die Makrophagendichte betrug in der MCP-1^{-/-}-Gruppe $112 \pm 16,33$ Zellen/mm², während in den Wildtyptieren $210,58 \pm 52,97$ Zellen/mm² F4/80 positiv waren ($p < 0,05$) (Abbildungen 6 A und 6 B und Diagramm 8). Als Kontrolle wurden nichtischämische Gebiete der Herzbasis oberhalb der Ligatur untersucht. Für die Wildtypherzen ergab sich hier eine Dichte von $9,75 \pm 2,89$ Zellen/mm², während die MCP-1^{-/-}-Gruppe im Mittel $28,03 \pm 9,79$ Zellen/mm² aufwies ($p > 0,05$) (Abbildungen 6 C und 6 D und Diagramm 8). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

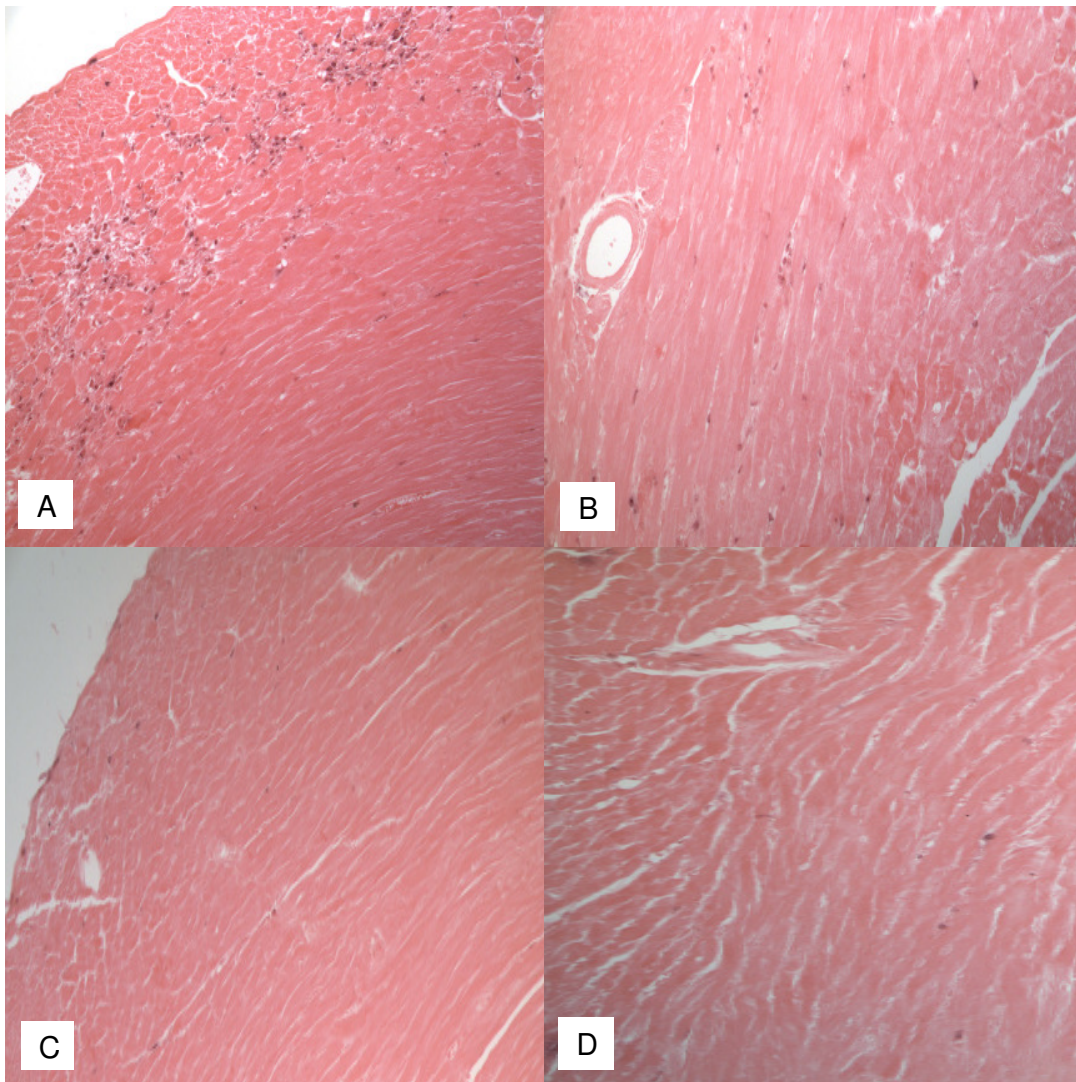


Abbildung 6: Vergleich der Makrophagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand der WT und MCP-1^{-/-} nach 5 Tagen I/R.

- A) Makrophageninfiltration der Wildtypherzen nach 5 Tagen I/R, Vergr. 200x
- B) Deutlich geringer ausgeprägte Makrophageninfiltration der MCP-1^{-/-}-Herzen nach 5 Tagen I/R, Vergr. 200x
- C) Kaum Makrophageninfiltration im nichtischämischen Kontrollgebiet der Herzbasis der Wildtypmäuse nach 5 Tagen I/R, Vergr. 200x
- D) Kaum Makrophageninfiltration im nichtischämischen Kontrollgebiet der Herzbasis der MCP-1^{-/-}-Mäuse nach 5 Tagen I/R, Vergr. 200x

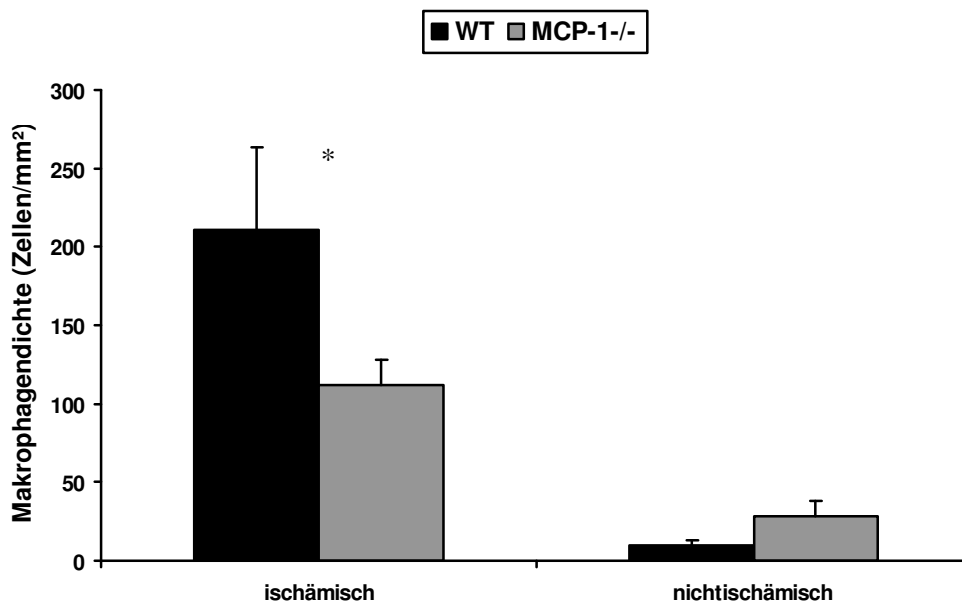


Diagramm 8: Makrophagendichte (F4/80-positive Zellen/mm²) in WT und MCP-1^{-/-} nach 5 Tagen I/R. Anders als in der nichtischämischen Herzbasis ist im ischämischen Bereich des Herzens in den MCP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine signifikant niedrigere Makrophagendichte nachzuweisen. *p<0,05.

4.7 Einfluss der MCP-1-Defizienz auf die Zytokin- und Chemokininduktion nach I/R

Weiterführende Experimente gingen der Frage nach, ob nach erfolgter Ischämie und Reperfusion in den MCP-1^{-/-}-Tieren ein anderes Muster der Zytokin- und Chemokinexpression ausgeprägt ist als in den Wildtypmäusen.

4.7.1 Tumornekrosefaktor- α

Die Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Expression war bei den Wildtyptieren nach 5 Tagen I/R im Vergleich zur MCP-1^{-/-}-Gruppe signifikant erhöht (WT: 0,88% \pm 0,111%, MCP-1^{-/-}: 0,32% \pm 0,051%, p<0,01) (Diagramm 9).

Es war also bei MCP-1-Defizienz keine kompensatorische Induktion von TNF- α auf mRNA-Ebene zu beobachten, sondern eher eine verminderte Expression, die mit einer geringeren Makrophagendichte vereinbar ist.

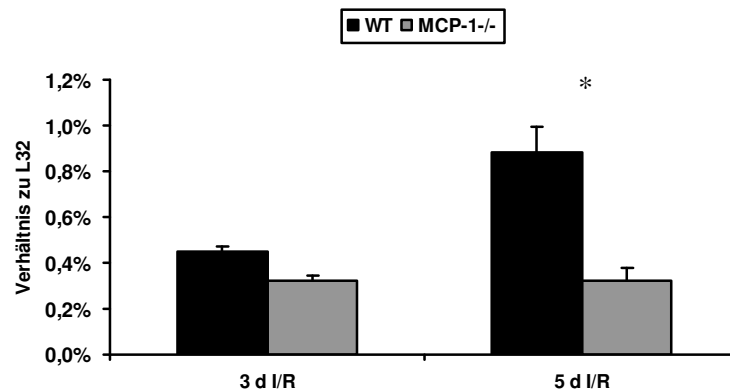


Diagramm 9: TNF- α -mRNA-Expression im WT und MCP-1^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R. Während die Wildtypherzen nach 5 Tagen I/R eine Erhöhung der TNF- α -Expression aufwiesen, blieb die mRNA-Expression in der MCP-1^{-/-}-Gruppe nach 3 und 5 Tagen I/R signifikant niedriger. *p<0,01.

4.7.2 Interleukine

Für Interleukin (IL)-1 β zeigte sich in der MCP-1^{-/-}-Gruppe an allen Tagen eine geringere Expression als im Wildtyp (5 Tage: WT 1,60% \pm 0,35%, MCP-1^{-/-} 0,28% \pm 0,06%, p<0,01) (Diagramm 10). Für die Interleukine 6 und 10 konnte kein signifikanter Unterschied in der Genexpression nachgewiesen werden (IL-6 3 Tage: WT 1,56% \pm 0,11%, MCP-1^{-/-} 1,77% \pm 0,26%, n.s.; IL-10 3 Tage: WT 2,65% \pm 0,20%, MCP-1^{-/-} 2,23% \pm 0,38%, n.s.).

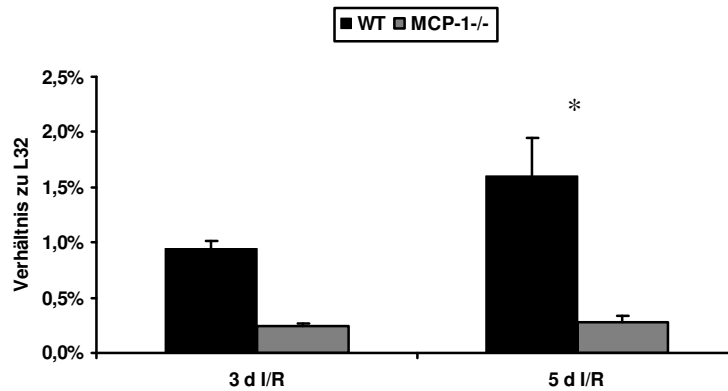


Diagramm 10: IL-1 β -mRNA-Expression im WT und MCP-1 $^{-/-}$ nach 3 und 5 Tagen I/R. Während die Wildtyp Herzen besonders nach 5 Tagen I/R eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression für IL-1 β aufwiesen, blieb diese in der MCP-1 $^{-/-}$ -Gruppe signifikant niedriger. * $p < 0,01$.

4.7.3 Transforming Growth Factor

Die Expression von Transforming Growth Factor (TGF)- β 2, welches die Kollagensynthese stimuliert, wird wie andere Zytokine über einen auto- beziehungsweise parakrinen Mechanismus induziert. In den MCP-1 $^{-/-}$ -Tieren fiel die Expression verglichen mit der Wildtypgruppe signifikant reduziert aus (Diagramm 11). Nach 3 Tagen I/R fand bei den Wildtypmäusen eine Induktion von $2,24\% \pm 0,083\%$ statt, während in der MCP-1 $^{-/-}$ -Gruppe nur Werte von $1,78\% \pm 0,46\%$ zu verzeichnen waren ($p < 0,01$). Nach 5 Tagen I/R ging die Genexpression wieder zurück. Die verminderte Expression von TGF- β 2 in den MCP-1-defizienten Tieren kann als ein weiterer Hinweis auf einen geringeren Gewebeumbau gewertet werden. Für TGF- β 1 und TGF- β 3 konnten keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen nachgewiesen werden (TGF- β 1 3 Tage: WT $12,07\% \pm 0,79\%$, MCP-1 $^{-/-}$ $13,34\% \pm 1,24\%$, n.s.; TGF- β 3 3 Tage: WT $9,38\% \pm 0,65\%$, MCP-1 $^{-/-}$ $10,67\% \pm 0,73\%$, n.s.).

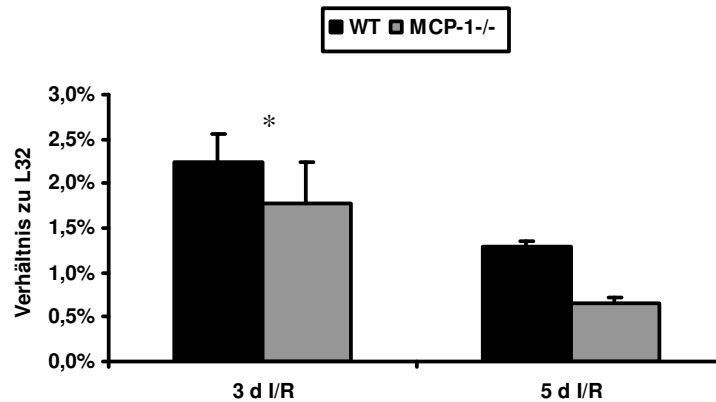


Diagramm 11: TGF- β 2-mRNA-Expression in WT und MCP-1^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R. Während in den Wildtypmice vor allem nach 3 Tagen I/R eine Induktion der mRNA stattfand, blieb die Erhöhung der mRNA bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen an beiden Tagen signifikant hinter dem Wert des Wildtyps zurück. * $p < 0,01$.

4.7.4 Osteopontin-1

Für Osteopontin (OPN)-1 lag nach 3 Tagen I/R in den Wildtypmäusen mit $88,6\% \pm 7,2\%$ eine starke Induktion vor, die nach 5 Tagen nicht mehr erkennbar war. Hingegen lag die Expression von OPN-1 in der MCP-1^{-/-}-Gruppe nach 3 Tagen I/R mit $17\% \pm 1,7\%$ signifikant unter der der Wildtypgruppe ($p < 0,01$) (Diagramm 12).

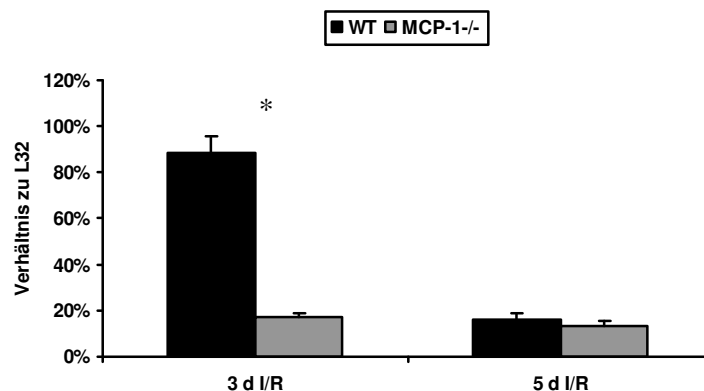


Diagramm 12: OPN-1-mRNA-Expression in WT und MCP-1^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R. Die Wildtypmice zeigten nach 3 Tagen I/R eine im Vergleich zur MCP-1^{-/-}-Gruppe signifikante Induktion der OPN-1-mRNA-Expression. * $p < 0,01$.

4.7.5 Macrophage Inhibitory Protein-1 β

Das Chemokin Macrophage Inhibitory Protein (MIP)-1 β hat wie MCP-1 chemotaktisches Potential für Monozyten. Bei Ausfall von MCP-1 könnte man eine kompensatorische Überexpression von MIP-1 β erwarten.

Es zeigte sich jedoch, dass der Anstieg der mRNA-Expression von MIP-1 β nach 3 und 5 Tagen I/R in den MCP-1 $^{-/-}$ -Tieren signifikant niedriger ausfiel als in den Wildtypmäusen (3 Tage: WT 0,84% \pm 0,11%, MCP-1 $^{-/-}$ 0,60% \pm 0,05%, 5 Tage: WT 0,96% \pm 0,08%, MCP-1 $^{-/-}$ 0,49% \pm 0,06% ($p < 0,01$)) (Diagramm 13).

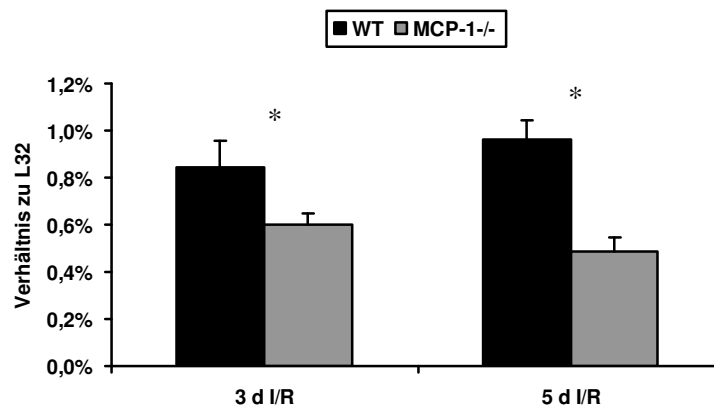


Diagramm 13: MIP-1 β -mRNA-Expression in WT und MCP-1 $^{-/-}$ nach 3 und 5 Tagen I/R. Die mRNA-Expression von MIP-1 β stieg bei den MCP-1 $^{-/-}$ -Mäusen nach I/R signifikant weniger an als bei den Wildtypmäusen. * $p < 0,01$.

4.7.6 Weitere Chemokine

Für andere Chemokine, wie MIP-1 α , MIP-2 und IP-10, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und MCP-1 $^{-/-}$ -Mäusen gefunden werden (Tabelle 1).

	3 d WT	3 d MCP-1 ^{-/-}	5 d WT	5 d MCP-1 ^{-/-}
MIP-1α	0,39% \pm 0,046%	0,48% \pm 0,035%	0,50% \pm 0,097%	0,42% \pm 0,039%
MIP-2	0,28% \pm 0,028%	0,27% \pm 0,027%	0,55% \pm 0,094%	0,31% \pm 0,046%
IP-10	0,97% \pm 0,130%	0,67% \pm 0,210%	1,43% \pm 0,186%	1,31% \pm 0,190%

Tabella 1: mRNA-Expression der Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und IP-10. Die Expression dieser drei Chemokine war zwischen den Wildtyptieren und der MCP-1^{-/-}-Gruppe nach 3 und 5 Tagen I/R vergleichbar.

5. Diskussion

Die koronare Herzkrankheit (KHK) gehört in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. In 90% der Fälle liegt der Erkrankung eine Arteriosklerose der großen extramuralen Koronararterien zugrunde. Durch Gefäßstenosen kommt es zunächst nur unter Belastung, später auch in Ruhe zu einer mangelnden Oxygenierung des Myokards. Die myokardiale Minderperfusion manifestiert sich klinisch als Angina pectoris, Herzrhythmusstörung, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder plötzlicher Herztod (Bültmann et al., 2001). Die chronische Hypoperfusion oder wiederholte ischämische Episoden führen zum Gewebeumbau und zur Ausbildung des sogenannten hibernierenden Myokards (Bolli et al. 1995; Rahimtoola, 1985). Dieses ist durch eine linksventrikuläre Dysfunktion gekennzeichnet, die durch inotrope Stimulation kurzfristig aufgehoben werden kann und nach Revaskularisierung auch langfristig reversibel ist (Heusch, 1998; Rahimtoola, 1985; Rahimtoola, 1999; Wijns et al., 1998). Bei dem ischämisch bedingten Gewebeumbau spielen Zytokine und Chemokine, darunter auch MCP-1, eine entscheidende Rolle (Frangogiannis et al, 2002). Untersuchungen an Myokardbiopsien, die bei Patienten während einer Bypass-Operation entnommen wurden, zeigten im hibernierenden Myokard eine erhöhte Dichte an extrazellulären Matrixproteinen und eine reaktive Fibrose (Elsasser et al., 1997). Eine gesteigerte interstitielle Fibrose und eine Infiltration des Myokards mit Makrophagen bei Bypasspatienten beschreiben auch Frangogiannis et al. (2002). Mittels Echokardiografie sechs Monate nach der Operation konnten sie außerdem zeigen, dass Segmente mit funktioneller Verbesserung der Pumpfunktion eine signifikant höhere Anzahl an neu rekrutierten Leukozyten zum Zeitpunkt der Operation aufweisen als die Segmente mit weiter bestehender Dysfunktion. Dies war verbunden mit einer Induktion von MCP-1 (Frangogiannis et al, 2002). Auch in Studien von Aukrust et al. (1998) an Patienten mit Herzinsuffizienz zeigten sich erhöhte Chemokinwerte, insbesondere von MCP-1. Die MCP-1-Induktion wirkt verstärkend auf die Produktion von Sauerstoffradikalen und wird begleitet von einer erhöhten Monozytenaktivität (Aukrust et al., 1998).

Im Hundemodell des ischämischen Myokards zeigte sich, dass eine Reperfusion die Voraussetzung für die Freisetzung von MCP-1 ist (Kumar et al., 1997). Unterstützung

findet dies durch Studien an Ratten, wo nach Reperfusion des ischämischen Myokards eine erhöhte Expression von MCP-1 gemessen wird (Kakio et al., 2000). Eine Induktion von MCP-1 zeigt sich ebenfalls im Rattenmodell eines Hypertonie-induzierten Herzversagens (Shioi et al., 1997) und bei einer durch Volumenbelastung verursachten Kardiomyopathie nach Anlage einer aortocavalen Fistel (Behr et al., 2000). Dass MCP-1 ein wichtiger Faktor bei der Entstehung einer inflammatorischen Reaktion im Myokard ist, wird unterstrichen durch die Auslösung einer Myokarditis bei Mäusen mit transgener Überexpression von MCP-1 im Myokard (Kolattukudy et al., 1998). Im Mausmodell eines Myokardinfarktes verbessert sich durch MCP-1-Defizienz die kontraktile Dysfunktion, und die Überlebensrate steigt (Hayashidani et al., 2003). Allerdings ist anzumerken, dass in dieser Studie zum einen die MCP-1-Defizienz durch Gentherapie herbeigeführt wurde, welche lediglich eine Effizienz von 60% aufweist. Zum anderen wurde hier eine Koronarokklusion durchgeführt, so dass die Vergleichbarkeit mit Studien des reperfundierten Myokardinfarktes eingeschränkt ist.

Alle diese Studien unterstützen die Annahme, dass MCP-1 ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Entzündung und Fibrose in der ischämischen Kardiomyopathie sein könnte. Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich daher mit der Rolle des MCP-1 bei der Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie im Mausmodell der repetitiven Ischämie und Reperfusion.

Es wurde ein von Dewald et al. (2003) auf der Grundlage einer Arbeit von Nossuli et al. (2000) entwickeltes Operationsmodell verwendet. Dabei werden zehn Tage nach einer Initialoperation durch wiederholte Okklusionen des RIVA repetitive Episoden von Ischämie und Reperfusion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die durch das Trauma der initialen Operation erhöhten Zytokin- und Chemokinwerte wieder normalisiert, so dass die gefundenen Unterschiede im Genexpressionsmuster der verschiedenen Versuchsgruppen nicht auf das chirurgische Trauma, sondern auf die repetitiven Episoden von Ischämie und Reperfusion zurückzuführen sind.

Das Ausschalten der MCP-1-Signaltransduktion erfolgte einerseits durch Antikörperneutralisation und andererseits durch Verwendung von MCP-1-defizienten Mäusen. Nach der letzten Ischämieepisode wurden in der Echokardiografie Fraktionsverkürzung und Vorderwandverdickung gemessen, um die ventrikuläre Pumpfunktion beurteilen zu können. Bei Wildtypmäusen ist eine mit der Häufigkeit der ischämischen Intervalle zu-

nehmende Dysfunktion des linken Ventrikels zu beobachten, die funktionell einer ischämischen Kardiomyopathie entspricht. Sowohl in den antikörperbehandelten als auch in den MCP-1-defizienten Tieren kommt es nicht zur Ausbildung einer Dysfunktion.

Morphologisches Korrelat der ventrikulären Dysfunktion in Wildtypmäusen ist eine durch Ischämie und Reperfusion induzierte Fibrose. Im Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie konnten Dewald et al. (2003) nach 5 Tagen I/R eine verstärkte Einwanderung von Myofibroblasten und anschließend eine interstitielle Fibrose nachweisen. In Studien von Hayashidani et al. (2003) am Mausmodell des Myokardinfarktes zeigte sich nach Blockade des MCP-1-Signaltransduktionsweges eine signifikant reduzierte interstitielle Fibrose und eine niedrigere Expression von TNF- α und TGF- β . Allerdings ist wiederum darauf hinzuweisen, dass eine durch Genterapie herbeigeführte MCP-1-Defizienz wegen der geringeren Effizienz nicht direkt vergleichbar ist mit MCP-1^{-/-}-Tieren. Außerdem bestehen große Unterschiede zwischen der einmaligen Koronarligatur der japanischen Studie und dem reperfundierten Myokardinfarkt (Dewald et al., 2005) beziehungsweise der repetitiven Ischämie und Reperfusion in den Studien von Dewald et al. (2003) und Frangogiannis et al. (2007). Dennoch liefern die Ergebnisse Hinweise auf zwei mögliche Mechanismen, die bei MCP-1-Antikörperneutralisation oder -Defizienz eine Reduktion der Fibrose im Vergleich zum Wildtyp bewirken und somit zu weniger ausgeprägten Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion beitragen könnten. Zum einen hat TNF- α über die Hypertrophie der Myozyten und die Apoptose Auswirkungen auf den Gewebumbau des infarzierten Areals. Bei einer geringeren Expression des Zytokins werden weniger Myofibroblasten induziert, so dass weniger Fibrose entsteht (Hayashidani et al., 2003). Zum anderen ist MCP-1 in der Lage, durch die Hochregulierung der TGF- β -Expression über einen parakrinen Mechanismus in Fibroblasten des Herzens die Kollagensynthese zu stimulieren (Gharaee-Kermani et al., 1996). Liegt eine MCP-1-Defizienz vor, ist auch die Produktion von TGF- β beeinträchtigt, was die Fibrosierung mindert. In der vorliegenden Arbeit konnte nach 7 Tagen I/R sowohl in der WT+MCP-1AK-Gruppe als auch in der MCP-1^{-/-}-Gruppe eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte interstitielle Fibrose nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich bei den MCP-1^{-/-}-Tieren nach 5 Tagen I/R eine deutlich verminderte Myofibroblasteneinwanderung.

Die Reaktion des Gewebes auf einen wiederholten Verletzungsstimulus besteht aber nicht nur in der Ausbildung einer Fibrose. Dewald et al. (2003) beobachteten im Maus-

modell nach repetitiver Ischämie und Reperfusion eine vermehrte Infiltration des Myokards mit Makrophagen. Kumar et al. (1997) konnten bei Hunden nach einstündiger Okklusion der Koronararterie mit anschließender Reperfusion eine Induktion von MCP-1 nachweisen, die ohne Reperfusion nahezu ausblieb. Nach Reperfusion ist im Vergleich mit nicht reperfundiertem Gewebe eine erhöhte Makrophageninfiltration nachzuweisen (Morita et al., 1993). Durch Wiederherstellung des Blutflusses wird eine entzündliche Reaktion initiiert, die die Rekrutierung von Monozyten beschleunigt und so zu Heilung und Gewebeumbau beiträgt (Kumar et al., 1997). Birdsall et al. (1997) zeigten an einem Hundemodell des Myokardinfarktes, dass C5a, TGF- β und MCP-1 aufeinander folgend für die Rekrutierung von Monozyten in ischämisches und reperfundiertes Myokard von Bedeutung sind. MCP-1 stimuliert zusätzlich die Differenzierung der Monozyten in Gewebemakrophagen, die unter anderem die Proliferation der Fibroblasten und die Kollagensynthese stimulieren (Birdsall et al., 1997). Auch Kakio et al. (2000) zeigten an infarzierten und reperfundierten Herzen der Ratte, dass MCP-1 neben seiner Funktion als chemotaktischem Faktor vor allem durch die Aktivierung von Monozyten und seinen parakrinen Einfluss auf andere Zellen, insbesondere T-Lymphozyten, Bedeutung für die Vorgänge nach Ischämie und Reperfusion gewinnt. In den Experimenten dieser Gruppe stellten sich zwei Drittel aller MCP-1-positiven Zellen als aktivierte Makrophagen heraus, die durch autokrine und parakrine Mechanismen die MCP-1-Produktion der Umgebung wiederum beeinflussen können (Kakio et al., 2000). Ebenfalls in einem Modell zum Myokardinfarkt konnten Dewald et al. (2005) bei MCP-1-defizienten Mäusen eine verminderte Makrophageninfiltration nachweisen.

Hinweise auf die Funktion von MCP-1 als Faktor für die Rekrutierung von Makrophagen geben auch Studien von Lu et al. (1998) und Hayashidani et al. (2003), die in MCP-1-defizienten Mäusen beziehungsweise bei Blockade des MCP-1-Signaltransduktionsweges eine verminderte Makrophageninfiltration nachweisen konnten. Gosling et al. (1999) stellten in einem Modell mit MCP-1-defizienten und Apolipoprotein B-überexprimierenden Mäusen fest, dass die MCP-1-Defizienz die Rekrutierung von Makrophagen und anschließend die Bildung von atherosklerotischen Läsionen reduziert. Andere Arbeitsgruppen erzielten durch MCP-1-Antikörperneutralisation bei Ratte (Lloyd et al., 1997) beziehungsweise Maus (Wada et al., 1996) eine Reduzierung der Makrophagenzahl in Modellen zur Glomerulonephritis. Ebenfalls durch Antikörperneutra-

lisation zeigte sich im Mausmodell der rheumatischen Arthritis (Gong et al., 1997) und im Rattenmodell der granulomatösen Lungenkrankheit (Jones et al., 1992) ein Zusammenhang zwischen MCP-1-Expression und Makrophagenrekrutierung.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach 5 Tagen Ischämie und Reperfusion in der MCP-1^{-/-}-Gruppe eine signifikant niedrigere Makrophagendichte als in den Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Das legt die Vermutung nahe, dass durch die MCP-1-Defizienz einer der wichtigsten Faktoren für die Chemotaxis und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen fehlt. Aktivierte Makrophagen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die für die Proliferation der Fibroblasten - und folglich für die Fibrogenese - sowie auch für die Neubildung von Gefäßen essentiell sind. Dementsprechend war auch in der vorliegenden Arbeit das fibrotische Areal nach repetitiver Ischämie und Reperfusion bei MCP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant reduziert.

Nachdem die Histologie signifikante Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und MCP-1-defizienten Tieren in Bezug auf Fibrose und Makrophageninfiltration gezeigt hatte, wurden molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen.

Im Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie kommt es in Wildtypmäusen nach repetitiver Ischämie und Reperfusion zur Anreicherung der zum Gewebeumbau benötigten Matrixproteine Tenascin und Osteopontin. Außerdem zeigt sich nach I/R eine Induktion von Chemokinen wie MIP-1 α , und MIP-1 β , vor allem aber von MCP-1. Die Zytokine TNF- α , IL-1 β und TGF- β werden dagegen nicht signifikant induziert (Dewald et al., 2003). In einer Studie zum Myokardinfarkt von Dewald et al. (2005) zeigte sich bei MCP-1-defizienten Mäusen in den Infarktgebieten eine im Vergleich zum Wildtyp schwächere Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , TGF- β 2, TGF- β 3 und IL-10 sowie eine verzögerte Induktion von OPN-1 als Ausdruck einer defekten Makrophagendifferenzierung.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit nun untersucht, ob in den MCP-1^{-/-}-Tieren auch nach erfolgter Ischämie und Reperfusion ein im Vergleich zu den Wildtypmäusen verändertes Zytokin- und Chemokinmuster zu finden ist. Bei MCP-1-Defizienz könnte es kompensatorisch zu gesteigerter Induktion anderer proinflammatorischer Mediatoren kommen, oder umgekehrt zu reduzierter Expression von Faktoren, die

über den MCP-1-Signaltransduktionsweg aktiviert werden. Die Induktion wurde jeweils nach 3 und 5 Tagen repetitiver Ischämie und Reperfusion gemessen.

Die Produktion der proinflammatorischen Interleukine IL-1 und IL-6 wird unter anderem durch MCP-1 induziert (Furie and Randolph, 1995). Man könnte also annehmen, dass bei MCP-1-Defizienz diese Faktoren weniger stark exprimiert werden. Für IL-1 β war auf RNA-Ebene tatsächlich eine im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant verminderte Expression nachweisbar. Für IL-6 sowie IL-10 waren keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen nachzuweisen. Das könnte bedeuten, dass für die Induktion dieser Zytokine andere Mediatoren eine ebenso große Rolle spielen wie MCP-1 beziehungsweise diese die Aufgaben von MCP-1 teilweise übernehmen können, so dass eine MCP-1-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Interleukine hat.

Nach einem Myokardinfarkt wird TNF- α vermehrt exprimiert, welches über eine Hypertrophie der Myozyten und über die Apoptose Auswirkungen auf den Gewebeumbau des betroffenen Areals hat. Im Mausmodell des reperfundierten Myokardinfarktes hat die MCP-1-Defizienz eine reduzierte Expression von TNF- α zur Folge (Dewald et al., 2005) und könnte über diesen Mechanismus zu einer geringeren Dysfunktion nach Myokardinfarkt beitragen. Auch im vorliegenden Modell der ischämischen Kardiomyopathie ist in den Wildtyptieren nach 5 Tagen Ischämie und Reperfusion eine vermehrte Expression von TNF- α zu beobachten, während diese Erhöhung in der MCP-1 $^{-/-}$ -Gruppe ausbleibt. Die reduzierte Expression von TNF- α beeinflusst die Fibrosierung des geschädigten Gewebes. TNF- α induziert in Myozyten und Fibroblasten eine sekundäre MCP-1-Produktion und führt damit zu einer positiven Rückkopplung. Je mehr MCP-1 nach einer Schädigung freigesetzt wird, desto mehr TNF- α wird exprimiert, welches wiederum die sekundäre Produktion von MCP-1 induziert. Im Falle einer MCP-1-Defizienz ist diese positive Rückkopplung gestört.

Thompson et al. (1988) haben nachgewiesen, dass gespeichertes TGF- β nach myokardialer Ischämie in aktivierter Form freigesetzt wird. Birdsall et al. (1997) ordneten diesem Zytokin eine Funktion als chemotaktischer Mediator für Monozyten zwei bis drei Stunden nach Reperfusion zu. Für die Hochregulierung von TGF- β sorgt unter anderem MCP-1 und ist so in der Lage, über einen parakrinen Mechanismus in Fibroblasten des Herzens die Kollagensynthese zu stimulieren (Gharaee-Kermani et al., 1996). Liegt eine MCP-1-

Defizienz vor, ist auch die Produktion von TGF- β beeinträchtigt; es kommt zu weniger Fibrose und Monozyteninfiltration. Diese Annahme wird unterstützt durch Versuche von Dewald et al. (2005) an einem Mausmodell zum Myokardinfarkt. MCP-1-Defizienz führt hier durch verminderte interstitielle Fibrose, durch geringere Makrophageninfiltration und durch reduzierte Expression von TNF- α und TGF- β zu einer erhaltenen linksventrikulären Funktion.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den MCP-1^{-/-}-Tieren eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Expression von TGF- β 2 nachgewiesen werden. Daraus resultieren eine geringere Stimulation der Kollagensynthese und damit eine verminderte Fibrosierung des ischämischen Areals, was letztlich weniger linksventrikuläre Dysfunktion bedeutet. TGF- β 1 und TGF- β 3 zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen. Da die Werte für RNA und die nach der Translation verarbeiteten und aktivierten Proteine nicht hundertprozentig korrelieren, könnte auf Proteinebene bei den MCP-1-defizienten Tieren durchaus eine reduzierte Aktivität von TGF- β 1 und TGF- β 3 vorliegen, die sich auf RNA-Ebene nicht widerspiegelt. Hinzu kommt, dass die verschiedenen Isoformen von TGF- β in Abhängigkeit von Zelltypen und beteiligten Mediatoren, sowohl pro- als auch antifibrotische Eigenschaften haben, deren Wirkung im Gewebe nur schwer zu differenzieren ist. TGF- β 1 hemmt die Makrophagenproliferation, induziert aber proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α , während TGF- β 3 eher antiinflammatorisch wirkt.

Das an Zelladhäsion und Migration beteiligte Glykoprotein OPN-1 zeigte in den Wildtyp-tieren nach 3 Tagen Ischämie und Reperfusion eine signifikant stärkere Induktion als in der MCP-1^{-/-}-Gruppe. OPN-1 als Marker reifer, differenzierter Makrophagen kommt auch in gesundem Gewebe in geringer Menge vor, seine Produktion wird aber als Reaktion auf eine Verletzung stark erhöht. So kann man OPN-1 ein bis zwei Tage nach Myokardinfarkt sowohl im primär geschädigten Myokard, als auch als Zeichen einer generalisierten Antwort in anderen Geweben wie Lunge, Haut und Skelettmuskel nachweisen. OPN-1 wird von den infiltrierenden Makrophagen gebildet, verschwindet aber bei fortschreitender Heilung, auch wenn die Makrophagen noch im Gewebe verweilen (Murry et al., 1994). Da in den MCP-1-defizienten Tieren weniger inflammatorische Reaktion mit weniger Makrophageninfiltration auf den ischämischen Stimulus hin stattfindet, ist auch weniger durch Makrophagen produziertes OPN-1 zu beobachten.

Die Expression von Chemokinen hängt unter anderem von reaktiven Sauerstoffradikalen ab. Dies konnten Dewald et al. (2003) bei I/R-Versuchen an Mäusen, die die extrazelluläre Superoxid-Dismutase (EC-SOD) überexprimieren, zeigen. Eine verminderte Aktivität von reaktiven Sauerstoffradikalen geht mit einer geringeren Induktion von Chemokinen, insbesondere von MCP-1, einher. Nach Ischämie und Reperfusion werden über reaktive Sauerstoffradikale auch MIPs im venösen Endothel induziert (Nossuli et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für MIP-1 β bei den Wildtypmäusen eine im Vergleich zur MCP-1 $^{-/-}$ -Gruppe signifikant stärkere Induktion. Eine durch die MCP-1-Defizienz bedingte kompensatorische Überexpression des ebenfalls für die Chemotaxis von Makrophagen zuständigen Chemokins MIP-1 β ist nicht eingetreten. Bei anderen MIPs wie MIP-1 α und MIP-2 waren keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Auch für das antiinflammatorisch wirkende Chemokin IP-10 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und MCP-1 $^{-/-}$ -Tieren; in beiden Gruppen war nach 5 Tagen eine Induktion der RNA nachweisbar. Anders als bei Zytokinen besteht bei Chemokinen eine hohe Korrelation zwischen RNA und Proteinen, da sie eine kurze Halbwertszeit haben und hauptsächlich über die Transkription reguliert werden.

Zusammenfassend ist bei MCP-1-Defizienz die Infiltration der Monozyten ins ischämische Myokard stark eingeschränkt. Weniger Gewebsmakrophagen bewirken eine reduzierte Produktion von verschiedensten Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die eine inflammatorische Reaktion und durch Stimulierung von Fibroblasten eine Fibrose des geschädigten Areals fördern. Makrophagen werden nicht nur durch MCP-1 rekrutiert und aktiviert, sie produzieren das Chemokin auch selbst, so dass eine verminderte Dichte dieses Zelltyps eine weitere Reduktion der Proteinkonzentration bedeutet, wodurch ein wichtiger Faktor, über den Makrophagen ihre Effekte erzielen, weiter abgeschwächt wird. Die verminderte Makrophagendichte und die daraus über verschiedene Mechanismen, vor allem durch niedrigere Konzentrationen von TNF- α und TGF- β , resultierende reduzierte Fibrose bei MCP-1-Defizienz haben eine verbesserte Funktion des Herzens nach Ischämie und Reperfusion zur Folge. Die in den Wildtyptieren zu beobachtende, mit der Häufigkeit der ischämischen Intervalle zunehmende Dysfunktion des linken Ventrikels, die einer ischämischen Kardiomyopathie entspricht, ist sowohl in den

antikörperbehandelten als auch in den MCP-1-defizienten Tieren deutlich schwächer ausgeprägt (Frangogiannis et al., 2007).

Die Hypothese, dass MCP-1 wie beim Myokardinfarkt auch bei der Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie eine tragende Rolle spielt, hat sich in den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, bestätigt. Sowohl die histologischen als auch die molekularbiologischen Ergebnisse machen einen Zusammenhang zwischen der Expression des Chemokins und einer inflammatorischen Reaktion mit Fibrose und daraus resultierender ventrikulärer Dysfunktion wahrscheinlich.

6. Ausblick

Die groben Rahmenbedingungen der Wirkweise von MCP-1 im Zusammenhang mit kardialen Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Kardiomyopathie scheinen bekannt, doch sind noch weitere Forschungen notwendig, um die komplexen Wechselwirkungen der zahlreichen beteiligten Zelltypen und Proteine zu entschlüsseln. Denn neben der sich negativ auf die ventrikuläre Funktion auswirkenden Fibrose hat die Entzündung auch die wichtige Aufgabe, im geschädigten Gewebe einen Umbau zu initiieren, der für die Aufrechterhaltung der Funktion unabdingbar ist. Es gilt also, die funktionsfördernden Mechanismen von den funktionsmindernden unterscheiden zu lernen, um an der richtigen Stelle zum richtigen Zeitpunkt intervenieren zu können.

Inzwischen gibt es Studien zum Myokardinfarkt an transgenen MCP-1-überexprimierenden Mäusen (Morimoto et al., 2006). Hier zeigt sich ein reduziertes Infarktareal mit geringerer Narbenbildung und daraus resultierend weniger stark beeinträchtigt linksventrikulärer Funktion. Histologisch kommt es zu verstärkter Makrophageninfiltration, Neovaskularisation und erhöhter Myofibroblastendichte (Morimoto et al., 2006). MCP-1 hat demnach in Abhängigkeit von beteiligten Zellen und vom Zeitpunkt nach der Ischämie gegensätzliche Funktionen. Sowohl vermehrte Infiltration durch Monozyten und Myofibroblasten durch Überexpression von MCP-1 als auch eine verminderte Dichte dieser Zellen in MCP-1-defizienten Tieren führen letztlich zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion. Dies verdeutlicht nochmals das enge Zeitfenster einer möglichen Anti-MCP-1-Therapie in der Pathogenese der ischämischen Kardiomyo-

pathie. Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, bevor eine therapeutische Regulation von MCP-1 unternommen werden kann.

7. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit und die damit assoziierten Erkrankungen gehören besonders in den Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen. Meist führen arteriosklerotische Plaques zu einer Stenosierung der großen extramuralen Koronararterien mit konsekutiv verminderter Sauerstoffversorgung des Myokards. Die Minderperfusion führt zur linksventrikulären Dysfunktion und zur Ausbildung einer ischämischen Kardiomyopathie. Dabei spielen inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle, die unter anderem durch Chemokine vermittelt werden. Das Chemokin Makrophagen-Chemoattraktor-Protein (MCP)-1 zeigte in vielen Studien eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen und bei der Fibrosebildung.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle von MCP-1 in einem Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie. Dazu wurde ein Operationsmodell verwendet, das repetitive Episoden von Ischämie und Reperfusion (I/R) bei geschlossenem Thorax erlaubt. Es wurden drei Gruppen histologisch und molekularbiologisch untersucht: C57/BL6-Wildtypmäuse, mit neutralisierenden Antikörpern gegen MCP-1 behandelte Wildtypmäuse sowie MCP-1^{-/-}-Tiere.

Die Echokardiografie zeigte in den mit MCP-1-Antikörper behandelten Wildtypmäusen sowie in den MCP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen nach 7 Tagen repetitiver I/R keine Ausbildung einer linksventrikulären Dysfunktion. Das histologische Korrelat bestand aus signifikant geringerer Kollagenablagerung im Sinne einer interstitiellen Fibrose in der linksventrikulären Vorderwand sowie einer verminderten Infiltration mit Makrophagen und Myofibroblasten. Molekularbiologisch wurde in den MCP-1-defizienten Tieren eine im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant niedrigere mRNA-Induktion für TNF- α , IL-1 β , TGF- β 2 und OPN-1 sowie keine kompensatorische Chemokininduktion nachgewiesen.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass MCP-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der ischämischen Kardiomyopathie spielt. Histologische und molekularbiologische Ergebnisse zeigen einen Einfluss von MCP-1 auf die Intensität der Entzündungsreaktion sowie die Funktion der Makrophagen und somit auf die Differenzierung

der kollagenproduzierenden Myofibroblasten mit daraus resultierender ventrikulärer Dysfunktion.

8. Verzeichnis der Abbildungen, Diagramme und Tabellen

Abbildungen:

Abbildung 1: Modell der myokardialen Ischämie und Reperfusion.....	22
Abbildung 2: Genotypisierung der MCP-1 ^{-/-} -Mäuse.	34
Abbildung 3: Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand in WT und WT+MCP-1AK nach 7 Tagen I/R mittels Picrosiriusrot-Färbung.....	43
Abbildung 4: Vergleich der Kollagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand der WT und MCP-1 ^{-/-} nach 7 Tagen I/R.....	47
Abbildung 5: Vergleich der Myofibroblastenfärbung der linksventrikulären Vorder- wand der WT und MCP-1 ^{-/-} nach 5 Tagen I/R.....	49
Abbildung 6: Vergleich der Makrophagenfärbung der linksventrikulären Vorderwand der WT und MCP-1 ^{-/-} nach 5 Tagen I/R.....	50

Diagramme:

Diagramm 1: Induktion von MCP-1 nach 3 bis 28 Tagen repetitiver I/R.	18
Diagramm 2: Vorderwandverdickung in WT und WT+MCP-1AK.	42
Diagramm 3: Fraktionsverkürzung in WT und WT+MCP-1AK.	42
Diagramm 4: Kollagenanteil in WT und WT+MCP-1AK.	44
Diagramm 5: Vorderwandverdickung in WT und MCP-1 ^{-/-}	45
Diagramm 6: Fraktionsverkürzung in WT und MCP-1 ^{-/-}	45
Diagramm 7: Kollagen in ischämischen und nichtischämischen Bereichen von WT und MCP-1 ^{-/-} nach 7 Tagen I/R.....	48
Diagramm 8: Makrophagendichte (F4/80 positive Zellen/mm ²) in WT und MCP-1 ^{-/-} nach 5 Tagen I/R.....	51
Diagramm 9: TNF- α mRNA Expression im WT und MCP-1 ^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R.....	52
Diagramm 10: IL-1 β mRNA Expression im WT und MCP-1 ^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R.....	53

Diagramm 11: TGF- β 2 mRNA Expression in WT und MCP-1 ^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R.....	54
Diagramm 12: OPN-1 mRNA Expression in WT und MCP-1 ^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R.....	54
Diagramm 13: MIP-1 β mRNA Expression in WT und MCP-1 ^{-/-} nach 3 und 5 Tagen I/R.....	55
 <u>Tabelle:</u>	
Tabelle 1: mRNA-Expression der Chemokine MIP-1 α , MIP-2 und IP-10.	56

9. Literaturverzeichnis

Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen A K, Nordøy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Frøland S S, Gullestad L. Elevated circulating levels of CC chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1136-1143

Behr T M, Wang X, Aiyar N, Coatney R W, Li X, Koster P, Angermann C E, Ohlstein E, Feuerstein G Z, Winaver J. Monocyte Chemoattractant Protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure. *Circulation* 2000; 102: 1315-1322

Birdsall H H, Green D M, Trial J A, Youker K A, Burns A R, MacKay C R, LaRosa G J, Hawkins H K, Smith C W, Michael L H, Entman M L, Rossen R D. Complement C5a, TGF-beta1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997; 95: 684-692

Bolli R, Zughuib M, Li X Y, Tang X L, Sun J Z, Triana J F, McCay P B. Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial „stunning“. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 1066-1084

Borgers M and Ausma J. Structural aspects of the chronic hibernating myocardium in man. *Basis Res. Cardiol.* 1995; 90: 44-46

Borgers M, De Nollin S, Thone F, Wouters L, Van Vaeck L, Flameng W. Distribution of calcium in a subset of chronic hibernating myocardium in man. *Histochem. J.* 1993; 25: 312-318

- Boring L, Gosling J, Chensue S W, Kunkel S L, Farese Jr. R V, Broxmeyer H E, Charo I F. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in CC-chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2552-2561
- Braunwald E, Rutherford J D. Reversible ischemic left ventricular dysfunction: evidence for the „hibernating myocardium“. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1986; 8: 1467-1470
- Bültmann B D, Kirkpatrick C J, Roessner A, Schneider J. Angina pectoris und relative Koronarinsuffizienz. In: Böcker W, Denk H, Heitz P, Hrsg. *Pathologie*. München - Jena: Urban & Fischer, 2001: 450-451
- Bültmann B D, Kirkpatrick C J, Roessner A, Schneider J. Koronare Herzkrankheit. In: Böcker W, Denk H, Heitz P, Hrsg. *Pathologie*. München - Jena: Urban & Fischer, 2001: 449-450
- Bültmann B D, Kirkpatrick C J, Roessner A, Schneider J. Angina pectoris und relative Koronarinsuffizienz. In: Böcker W, Denk H, Heitz P, Hrsg. *Pathologie*. München - Jena: Urban & Fischer, 2001: 450-451
- Depre C, Vanoverschelde J L, Melin J A, Borgers M, Bol A, Ausma J, Dion R, Wijns W. Structural and metabolic correlates of the reversibility of chronic left ventricular ischemic dysfunction in humans. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: H1265-H1275
- Dewald O, Frangogiannis N G, Zoerlein M, Duerr G D, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael L H, Crapo J D, Welz A, Entman M L. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 2700-2705
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* 2005; 96: 812-814

- Elsasser A, Decker E, Kostin S, Hein S, Skwara W, Mueller K D, Greiber S, Schaper W, Klovekorn W P, Schaper J. A self-perpetuating vicious cycle of tissue damage in human hibernating myocardium. *Mol. Cell Biochem.* 2000; 213: 17-28
- Elsasser A, Schlepper M, Klovekorn W P, Cai W J, Zimmermann R, Mueller K D, Strasser R, Kostin S, Gagel C, Munkel B, Schaper W, Schaper J. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation* 1997; 96: 2920-2931
- Elsasser A, Schlepper M, Zimmermann R, Mueller K D, Strasser R, Klovekorn W P, Schaper J. The extracellular matrix in hibernating myocardium – a significant factor causing structural defects and cardiac dysfunction. *Mol. Cell Biochem.* 1998; 186: 147-158
- Frangogiannis N G, Michael L H, Entman M L. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc. Res.* 2000; 48: 89-100
- Frangogiannis N G, Perrard J L, Mendoza L H, Burns A R, Lindsey M H, Ballantyne C M, Michael L H, Smith C W, Entman M L. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1998b; 98: 687-698
- Frangogiannis N G, Shimoni S, Chang S M, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou G V, Espada R, Ramchandani M, Entman M L, Zoghbi W A. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39: 1468-1474
- Frangogiannis N G, Shimoni S, Chang S M, Ren G, Shan K, Aggeli C J, Reardon M J, Letsou G V, Espada R, Ramchandani M, Entman M L, Zoghbi W A. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1425-1433

- Frangogiannis N G, Youker K A, Rossen R D, Gwechenberger M, Lindsey M H, Mendoza LH, Michael L H, Ballantyne C M, Smith C W, Entman M L. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1998; 30: 2567-2576
- Frangogiannis NG, Dewald O, Xia Y, Ren G, Haudek S, Leucker T, Kraemer D, Taffet G, Rollins BJ, Entman ML. Critical role of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2007; 115: 584-592
- Furie M B, Randolph G J. Review: Chemokines and Tissue Injury. *Am. J. of Pathol.* 1995; 146: 1287-1301
- Gerard C. Understanding Chemokine Biology Through Mouse Genetics. In: Hébert C A, Hrsg. *Chemokines in Disease: Biology and Clinical Research*. Totowa: Humana Press, 1999: 41-51
- Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 17779-17784
- Gong J H, Ratkay L G, Waterfield J D, Clark-Lewis I. An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 131-137
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* 1999; 103(6): 773-778
- Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K, Takeshita A. Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 gene therapy at-

tenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 2134-2140

Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernández B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ. Res.* 2004; 94: 671-677

Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Klovekorn W P, Schlepper M, Schaper W, Schaper J. Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium. *Circ. Res.* 2000; 86: 846-853

Hennessy T, Diamond P, Holligan B, O'Keane C, Hurley J, Codd M, McCarthy C, McCann H, Sugrue D. Correlation of myocardial histologic changes in hibernating myocardium with dobutamine stress echocardiographic findings. *Am. Heart J.* 1998; 135: 952-959

Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 1055-1085

Ito W D, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte Chemoattractant Protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ. Res.* 1997; 80: 829-837

Jones M L, Mulligan M S, Flory C M, Ward P A, Warren J S. Potential role of monocyte chemoattractant protein-1/JE in monocyte/macrophage-dependent IgA immune complex alveolitis in the rat. *J. Immunol.* 1992; 149: 2147-2154

Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab. Invest.* 2000; 80: 1127-1136

- Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am. J. Pathol.* 1998; 152: 101-111
- Kumar A G, Ballantyne C M, Michael L H, Kukielka G L, Youker K A, Lindsey M L, Hawkins H K, Birdsall H H, MacKay C R, LaRosa G J, Rossen R D, Smith C W, Entman M L. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; 95: 693-700
- Lloyd C M, Minto A W, Dorf M E, Proudfoot A, Wells T N C, Salant D J, Gutierrez-Ramos J C. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 1371-1380
- Lu B, Rutledge B J, Gu L, Fiorillo J, Lukacs N W, Kunkel S L, North R, Gerard C, Rollins B J. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in Monocyte Chemoattractant Protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 601-608
- Lukacs N W, Hogaboam C, Campbell E, Kunkel S L. Chemokines: Function, Regulation and Alteration of Inflammatory Responses. In: Mantovani A, Hrsg. *Chemokines*. Basel: Karger, 1999: 102-120
- Maes A, Flameng W, Nuyts J, Borgers M, Shivalkar B, Ausma J, Bormans G, Schiepers C, De Roo M, Mortelmans L. Histological alterations in chronically hypoperfused myocardium. Correlation with PET findings. *Circulation* 1994; 90: 735-745
- Mantovani A. Introduction and Overview. In: Mantovani A, Hrsg. *Chemokines*. Basel: Karger, 1999: 1-6

- Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ. Res.* 2006; 99: 891-899
- Morita M, Kawashima S, Ueno M, Kubota A, Iwasaki T. Effects of late reperfusion on infarct expansion and infarct healing in conscious rats. *Am. J. Pathol.* 1993; 143: 419-430
- Muller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J. Immunol. Methods* 2001; 249: 155-165
- Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1450-1462
- Nagueh S F, Mikati I, Weilbaecher D, Reardon M J, Al Zaghrini G J, Cacela D, He Z X, Letsou G, Noon G, Howell J F, Espada R, Verani M S, Zoghbi W A. Relation of the contractile reserve of hibernating myocardium to myocardial structure in humans. *Circulation* 1999; 100: 490-496
- Neote K S, McColl S R. Novel Chemokines Identified In Expressed Sequence Tag Databases Via Bioinformatics. In: Hébert C A, Hrsg. *Chemokines in Disease: Biology and Clinical Research*. Totowa: Humana Press, 1999: 19
- Nossuli T O, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet G E, Ballantyne C M, Michael L H, Entman M L. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278: H1049-H1055
- Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, Peschon J, Mann DL, Michael LH, Entman ML. Brief murine myocardial

I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: H2549-H2558

Pagano D, Townend J N, Parums D V, Bonser R S, Camici P G. Hibernating myocardium: morphological correlates of inotropic stimulation and glucose uptake. *Heart* 2000; 83: 456-461

Rahimtoola S H. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: 123-135

Rahimtoola S H. Concept and evaluation of hibernating myocardium. *Annu. Rev. Med.* 1999; 50: 75-86

Ren G, Michael L H, Entman M L, Frangogiannis N G. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 71-79

Salcedo R, Ponce M L, Young H A, Wasserman K, Ward J M, Kleinman H K, Oppenheim J J, Murphy W J. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96: 34-40

Salcedo R, Ponce M L, Young H A, Wasserman K, Ward J M, Kleinman H K, Oppenheim J J, Murphy W J. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96: 34-40

Satriano J A, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor- α and immunoglobulin G. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1564-1571

- Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1991; 83: 504-514
- Schweickart V L, Raport C J, Chantry D, Gray P W. The Chemokine Gene Family: similar structures, diverse functions. In: Hébert C A, Hrsg. *Chemokines in Disease: Biology and Clinical Research*. Totowa: Humana Press, 1999: 3-17
- Shan K, Bick R J, Poindexter B J, Nagueh S F, Shimoni S, Verani M S, Keng F, Reardon M J, Letsou G V, Howell J F, Zoghbi W A. Altered adrenergic receptor density in myocardial hibernation in humans: A possible mechanism of depressed myocardial function. *Circulation* 2000; 102: 2599-2606
- Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, Inoko M, Ono K, Iwanaga Y, Yamada T, Iwasaki A, Matsushima K, Sasayama S. Increased expression of interleukin-1 β and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ. Res.* 1997; 81: 664-671
- Takahashi M, Masuyama J, Ikeda U, Kasahara T, Kitagawa S, Takahashi Y, Shimada K, Kano S. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ. Res.* 1995; 76: 750-757
- Thompson et al., *Growth Factors*, 1988; 30: 129-133
- Vaddi K, Keller M, Newton R C, Hrsg. *The Chemokine Factsbook*. San Diego: Academic Press, 1997
- Vanoverschelde J L, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx G R, Borgers M, Bol A, Melin J A. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1513-1523

Vanoverschelde J L, Wijns W, Borgers M, Heyndrickx G, Depre C, Flameng W, Melin J A. Chronic myocardial hibernation in humans. From bedside to bench. *Circulation* 1997; 95: 1961-1971

Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi K I, Harada K, Naruto M, Su S B, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J.* 1996; 10: 1418-1425

Wijns W, Vatner S F, Camici P G. Hibernating myocardium. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 173-181

10. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei Prof. Dr. Armin Welz und Dr. Oliver Dewald für die Betreuung der Promotionsarbeit herzlich bedanken. Dank auch an Prof. Dr. Mark L. Entman vom Baylor College of Medicine in Houston, TX, USA, der meinen Forschungsaufenthalt in den USA ermöglicht hat, und an Prof. Dr. Nikolaos G. Frangogiannis und das ganze Laborteam für die Unterstützung während der Experimente.

Nicht vergessen möchte ich die fleißigen Korrekturleser und alle, die mich während der Höhen und Tiefen, die mit der Fertigstellung der Arbeit verbunden waren, begleitet haben.