

Der Makrophage im Myokardinfarkt
- ein transkriptombasierter Ansatz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Franz Masseli
aus Frankfurt am Main

Gießen 28.02.2012

Aus der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

Klinik für Kardiologie

Direktor: Prof. Dr.med. Christian Hamm

Kerckhoff Klinik Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. H. Möllmann

Gutachter: PD Dr. R. Voswinckel

Tag der Disputation: 01.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	- 1 -
1.1 Der Myokardinfarkt	- 1 -
1.1.1 Myokardinfarkt – Definition und Tiermodelle	- 3 -
1.1.2 Zeitprofil des Myokardinfarktes	- 4 -
1.1.2.a Die Akutphase	- 4 -
1.1.2.b Die Inflammationsphase.....	- 5 -
1.1.2.c Die proliferative Phase	- 7 -
1.1.3 Ventrikuläres Remodelling	- 9 -
1.1.4 Spezies-abhängige Unterschiede im Zeitverlauf	- 11 -
1.2 Monozyten, Makrophagen und ihre Subtypen.....	- 12 -
1.2.1 Entwicklung von Monozyten und Makrophagen.....	- 12 -
1.2.2 Priming.....	- 14 -
1.2.3 Der klassisch aktivierte Makrophage.....	- 14 -
1.2.4 Der alternativ aktivierte Makrophage	- 16 -
1.2.5 Deaktivierung, Typ II Aktivierung und Klassifikation der alternativen Aktivierungsformen.	- 17 -
1.2.6 Argininmetabolismus: Inflammation versus Fibrose.....	- 19 -
1.2.7 Heterogenität der Monozyten- und Makrophagenpopulationen	- 23 -
1.3 Das MMS und Narbenheilung	- 26 -
1.4 Zusammenfassung	- 27 -
1.5 Zielsetzung.....	- 27 -
2 Material	- 28 -
2.1 Geräte.....	- 28 -
2.2 Verbrauchsmaterialien	- 30 -
2.3 Software	- 31 -
2.4 Reagentien	- 31 -
2.5 Antikörper.....	- 33 -
2.6 Primer	- 34 -
2.7 TaqMan™ Kits	- 36 -
2.8 Lösungen und Puffer	- 37 -
3 Methoden	- 39 -
3.1 Versuchsbeschreibung.....	- 39 -
3.2 Operative Methoden	- 40 -
3.2.1 Myokardinfarkt-Modell der Maus	- 40 -
3.2.2 Isolation von Herzgewebe	- 41 -
3.3 Zellisolationmethoden.....	- 42 -
3.3.1 Monozytenisolation aus Infarktgewebe.....	- 42 -
3.2.2 Monozytenisolation aus Mausblut.....	- 44 -
3.4 Zell- und Gewebeanalyse	- 45 -
3.4.1 Durchflusszytometrie.....	- 45 -

3.4.2	Cytospin®-Präparation.....	- 47 -
3.4.3	Immunhistochemie und –zytologie	- 48 -
3.5	Molekulargenetische Methoden	- 50 -
3.5.1	RNA-Isolation aus Zellisolat.....	- 50 -
3.5.2	DNA-Verdau	- 52 -
3.5.3	Salzpräzipitation.....	- 53 -
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	- 54 -
3.5.5	Polymerase-Kettenreaktion	- 55 -
3.5.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	- 56 -
3.5.7	Reverse-Transkriptase PCR	- 56 -
3.5.8	Real-Time PCR	- 57 -
3.5.8.a	Versuchsaufbau Real-Time PCR	- 58 -
3.5.8.b	Durchführung der Real-Time PCR	- 58 -
3.5.8.c	Auswertung der Real-Time PCR	- 60 -
3.5.9	Microarray (Affymetrix GeneChip™).....	- 61 -
3.5.9.a	Prinzip der DNA-Microarray-Technologie.....	- 61 -
3.5.9.b	Durchführung der Microarray-Analysen.....	- 62 -
3.5.9.c	Auswertung der Microarrayergebnisse	- 63 -
3.6	Statistik.....	- 67 -
4	Ergebnisse	- 69 -
4.1	Erfolgskontrolle des Infarktmodells und der Zellisolation	- 69 -
4.1.1	Initial über 90% Überleben und charakteristische histologische Veränderungen nach operativem Myokardinfarkt	- 69 -
4.1.2	Aufreinigung des MMS-Isolates auf 90 Prozent.....	- 70 -
4.1.2.a	Verifikation des Isolationserfolges mittels FACS-Analyse	- 70 -
4.1.2.b	Bestätigung der erfolgreichen Anreicherung in Cytospin-Präparaten .. 72 -	- 72 -
4.1.2.c	Definition von Schwellenwerten.....	- 72 -
	nach prädefinierten Markern	- 72 -
4.1.3	Detektion von 619 Infarkt-makrophagen-spezifischen Genen.....	- 73 -
4.2	Transkription von Markergenen der klassischen und alternativen Makrophagenaktivierung	- 74 -
4.2.1	Simultane Expression von Markern der M1 als auch M2- Aktivierung im Array. - 74 -	- 74 -
4.2.2	Bestätigung der Koexpression von M1/M2 Genen mittels qRT-PCR..	- 75 -
4.2.2.a	Induzierte M1-Gene im MMS-Isolat und MI.....	- 75 -
4.2.2.b	Verifikation der M2-Aktivierung im MI mittels rtPCR.....	- 78 -
4.2.3	Zeitverlaufsanalysen der M1/M2-Aktivierung	- 80 -
4.2.3.a	Unterschiedliche Dynamik der M1/M2-Aktivierung in der qRT-PCR. - 81 -	- 81 -
4.2.3.b	Verifikation der entgegengesetzten M1/M2 Dynamik in der Histologie - 83 -	- 83 -
4.3	Koexpression von M1 und M2-Markern während der späten proliferativen Phase - 87 -	- 87 -
4.4	Weitere Interessante Ziele.....	- 90 -
4.4.1	Galectin 3	- 90 -
4.4.2	Matrix-Metalloproteinasen.....	- 91 -
4.5	Unerwartete Resultate	- 94 -
4.5.1	iNOS Expression.....	- 94 -

4.5.2	MMP 9 Expression in Blutmonozyten.....	- 95 -
4.5.3	Monozyten zu Makrophagen-Differenzierung	- 96 -
4.5.4	TIMP-1 aus unbekannter Quelle	- 96 -
4.5.5	Deaktivierung des MMS-Systems im Zeitverlauf	- 97 -
5	Diskussion	- 98 -
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	- 98 -
5.2	Stärken und Schwächen der verwendeten Methode	- 99 -
5.3	Die Resultate im Kontext der aktuellen Studienlage.....	- 102 -
5.3.1	Ursachen der M1/M2-Dynamik nach MI.....	- 103 -
5.3.2	Monozytenpopulationen bei der Infarktheilung.....	- 104 -
5.3.3	Der Einfluss von MCP-1 auf die Inflammation im Infarkt.....	- 106 -
5.3.4	Das Matrix-Metalloproteinasen-System	- 108 -
5.3.4.a	MMP9.....	- 108 -
5.3.5	MMP13	- 111 -
5.3.6	Galectin und die alternative Makrophagenaktivierung.....	- 112 -
5.3.7	Assoziation zwischen Makrophagensubtypen und klinischer Pathologie.....	- 114 -
5.3.8	Einfluss von zellulärem Turnover, Makrophagendeaktivierung und -apoptose auf die Infarktheilung	- 118 -
5.3.9	Klinischer Ausblick: Individuelle Unterschiede in inflammatorischer Prädisposition und Infarktheilung.....	- 119 -
5.4	Bedeutung der Studie.....	- 120 -
5.5	Unbeantwortete Fragestellungen – Weitere Experimente	- 122 -
6	Schlussfolgerung.....	- 123 -
7	Zusammenfassung.....	- 124 -
7.1	Deutsch	- 124 -
7.2	English	- 126 -
8	Abkürzungen, Tabellen, Bilder.....	- 128 -
8.1	Abkürzungen	- 128 -
8.2	Tabellen	- 129 -
8.3	Abbildungen	- 130 -
9	Literaturverzeichnis.....	- 133 -
10	Appendix.....	- 147 -
10.1	Cd11b-Isolationsergebnisse.....	- 147 -
10.2	Markerliste (Überprüfung MMS-Daten)	- 148 -
10.3	MMP9 und Fpr1	- 148 -
10.4	FACS-Ergebnisse mit NG-Depletion im Vergleich	- 149 -
11	Publikationsverzeichnis	- 150 -
12	Ehrenwörtliche Erklärung	- 151 -
	Danksagung	- 152 -
	Curriculum vitae	- 153 -

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt (MI) gehört zu den wichtigsten Todesursachen der industrialisierten Welt. Jährlich versterben in Deutschland knapp 60.000 Menschen an einem akuten Myokardinfarkt, was ihn zur zweithäufigsten Todesursache macht [3]. Neben den Komplikationen der Akutphase wie Ventrikelruptur, Herzrhythmusstörungen und Pumpversagen müssen jedoch ebenso die Spätkomplikationen, welche durch die strukturellen Langzeitveränderungen nach dem Infarkt - dem sogenannten Remodelling – entstehen beachtet werden. Zu den letzteren zählen Herzinsuffizienz, Ventrikeldilatation sowie sekundäre Organschädigung.

In der Therapie des akuten Myokardinfarkts konnte in den vergangenen Jahren durch intensivmedizinische Maßnahmen, medikamentöse Therapie und die interventionelle Gefäßeröffnung die Sterblichkeitsrate um über 50 Prozent gesenkt werden [4, 5].

Therapieansätze, welche die strukturellen Veränderungen des Herzens nach einem abgelaufenen Infarkt beeinflussen - also Einfluss auf die Narbenheilung und das Postinfarkt-Remodeling nehmen - beschränken sich in der klinischen Anwendung momentan auf zwei Ansätze: Die Beta-Rezeptorblockade sowie die Hemmung des Renin-Angiotensinsystems. Experimentell und im Rahmen von Studien wurden diverse Therapieansätze untersucht, teilweise mit kontroversen oder negativen Resultaten (s. Tabelle 1).

Der Hintergrund dieser oft unbefriedigenden Resultate ist ein noch immer unzureichendes Verständnis der Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene im Infarktgebiet [6, 7], welche der Infarktheilung und dem Postinfarkt-Remodeling zugrunde liegen. Zu den in Tabelle 2.1 gelisteten experimentellen Strategien können ebenfalls die zahlreichen präklinischen und klinischen Stammzelltherapie-Ansätze hinzugezählt werden; die Datenlage ist auch hier als kontrovers zu bewerten, wobei mittlerweile als etabliert gilt, dass viele der bisher

publizierten positiven Effekte eher auf Stimulation der Narbenheilung durch Freisetzung von Gewebehormonen als auf Regeneration von Myokardgewebe beruhen [8, 9].

Interventionsprinzip	Stadium	Erfolg	Literatur
Klinisch etablierte Therapie			
β-Blockade	Therapie nach		[4, 5, 10]
Hemmung des RAAS	Leitlinie		
Experimentelle Ansätze			
Steroidbolus	Klinischer Versuch	Schwere Komplikationen	[11]
Komplement- Depletion	Tierversuch	Verkleinerung des Infarktgebietes	[12]
	Klinischer Versuch	Reduktion der Mortalität bei gleicher Infarktgröße	[13]
Anti-Neutrophiler Antikörper (CD-18)	Klinische Studie	Kein Vorteil gegenüber Thrombolyse (in Bezug auf Infarktgröße	[14],
Anti-Neutrophile Antikörper (LeukoArrest / Anti Cd11/Cd18)	Klinische Studie	Kein Vorteil	[15]
MCP-1 Knockout	Tierversuch	Überlebensvorteil, geringere Dilatation und Fibrose, verlängerte Entzündung und Debrisclearance	[16], [17]
Radikal-Inaktivierung mit Catalase	Tierversuch	Reduktion Infarktgröße	[20]
	Klinische Studie	Kein Vorteil	[21,22]

Tabelle 1.1: Zusammenfassung verschiedener Strategien zur Beeinflussung des Postinfarkt-Remodelings

1.1.1 Myokardinfarkt – Definition und Tiermodelle

Der Myokardinfarkt beginnt mit dem Verschluss einer Herzkranzarterie, beim Menschen überwiegend durch die Bildung eines Appositionsthrombus auf dem Boden eines rupturierten, atherosklerotischen Plaques in einer der versorgenden Herzkranzarterien. Das Gefäßbett des Ventrikelmyokards kann als „funktionelles Endstromgebiet“ bezeichnet werden, da trotz hoher Gefäßdichte (ein Kardiomyozyt wird im Mittel von vier Kapillaren umgeben) der Sauerstoffbedarf des Gewebes im Falle eines Gefäßverschlusses nicht über Kollateralflüsse gedeckt werden kann. Um die Pathologie des Myokardinfarktes an Versuchstieren zu erforschen wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt. Experimentelle Myokardinfarkte wurden an zahlreichen Spezies im Groß- und Kleintierbereich durchgeführt. Die am weitesten verbreiteten Techniken zur Erzeugung eines Infarkts sind im Kleintierbereich die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) sowie die Cryoverödung des Gefäßes mittels stickstoffgekühlter Nadel. Ersteres wird allgemein als das bessere Verfahren bewertet, da im Gegensatz zur Cryoverödung lediglich eine ischämische Noxe gesetzt wird, die entstehende Gewebeschädigung also nicht durch thermische Nekrosebildung mitbedingt ist.

Von Myokardinfarktmodellen am Tier abzugrenzen sind Versuche zur Ischämie und Reperfusion, bei denen ein Herzkranzgefäß lediglich temporär unterbunden und nach variablen Zeitpunkten der Ischämie wieder reperfundiert wird. Hier entstehen zwar ebenfalls je nach Ischämiezeitraum und gegebenenfalls vorher durchgeführter ischämischer Präkonditionierung Myokardnekrosen und eine Inflammationsreaktion, es existieren jedoch einige Unterschiede in der Pathophysiologie zum nicht-reperfundierten (transmuralen) Infarkt.

Ischämie-Reperfusionmodelle bilden daher die Pathophysiologie eines akut revaskularisierten Myokardinfarktes (wie nach Ballondilatation) realistischer ab, während die Infarkterzeugung durch Gefäßligatur einen vollständig abgelaufenen Myokardinfarkt besser beschreibt.

1.1.2 Zeitprofil des Myokardinfarktes

Nach Verschluss der Koronararterie ist das versorgte Areal unmittelbar von der Sauerstoffzufuhr abgeschlossen und verliert umgehend an Kontraktionsfähigkeit. Im weiteren Zeitverlauf werden üblicherweise vier Entwicklungsphasen unterschieden: Die akute Phase, gefolgt von der inflammatorischen Phase, der proliferativen und schließlich der Ausreifungsphase [6].

Die einzelnen Phasen sind voneinander sowohl durch unterschiedliche makroskopische und mechanische Eigenschaften, als auch durch mikroskopische und biochemische Veränderungen voneinander abgrenzbar.

Während beim Menschen die Narbenbildung innerhalb von 8 Wochen abgeschlossen ist, so geschieht dies bei der Maus bereits innerhalb von 14 Tagen. Die Bildung von Granulationsgewebe (Proliferationsphase) ist bei der Maus bereits binnen einer Woche abgeschlossen.

1.1.2.a Die Akutphase

Unmittelbar nach dem Gefäßverschluss dauert es etwa 10 Sekunden bis die ATP-Vorräte der betroffenen Kardiomyozyten verbraucht sind. Es entwickelt sich umgehend eine Akinesie des versorgten Areals, welche auch als „Stunned Myocardium“ bezeichnet wird. Mikroskopisch ist eine Schwellung der Kardiomyozyten sowie deren Lysosomen und Mitochondrien zu beobachten, welche auf einen Natriumeinstrom zurückzuführen ist, da die zelluläre Na/K-ATPase das osmotische Gleichgewicht nicht mehr aufrechterhalten kann. Die Glycogenvorräte erschöpfen sich und nach etwa 30 bis 40 Minuten worauf ein nekrotischer Zelluntergang einsetzt, welcher zu einer starken Entzündungsreaktion mit Ödembildung führt. Auf makroskopischer Ebene wird eine zunehmende Steifheit des Infarktareals sichtbar, welche die Inflammationsphase des Myokardinfarktes einleitet. Als wesentliche Mediatoren konnten intramitochondriale Bestandteile [18], eine Aktivierung des Komplementsystems [19] sowie überschießende Produktion von freien Radikalen

(FR) [20] identifiziert werden. Letztere sind nicht nur an der Entzündungsreaktion direkt sondern auch an Leukotaxis [21] sowie der Ausprägung des Stunned Myokardium beteiligt [20]. Interventionsansätze mit dem Ziel der Komplementsystem-Inaktivierung und der Radikalelimination (durch Radikal-inaktivierende Enzyme wie Superoxid-Dismutase oder Catalase) waren im Tierversuch erfolgreich [22], scheiterten in klinischen Studien jedoch; am wahrscheinlichsten ist hierbei das enge Zeitfenster von unter einer Stunde nach MI, da es in einem nicht experimentellen Setting schwierig ist, Patienten in einem derartig frühen Stadium zu therapieren [23, 24].

1.1.2.b Die Inflammationsphase

In der Inflammationsphase, welche makroskopisch durch die aufgrund der Entzündungsreaktion einsetzende Complianceabnahme des Gewebes gekennzeichnet ist, wandern zunehmend Zellen aus dem Blut in das Infarktgebiet ein. Dabei wandern hauptsächlich Neutrophile Granulozyten (NG) und Blutmonozyten (BM), welche sich im Gewebe teilweise zu Makrophagen (MA) ausdifferenzieren (und welche in Ihrer Gesamtheit als Monozyten-Makrophagensystem (MMS), bezeichnet werden) in das ischämische Areal ein. Zeitlich erfolgt zunächst der Einstrom der NG, welche durch Produktion von radikalen Sauerstoffspezies und Freisetzung von proteolytischen Enzymen die extrazelluläre Matrix (EZM) zunehmend degradieren. Etwas später erreicht die Population der Monozyten/Makrophagen sein Maximum im Infarkt; zu diesem Zeitpunkt sinkt die Anzahl der NG bereits ab. Den Makrophagen werden drei wesentliche Aufgaben im heilenden Infarkt zugeschrieben:

1. Die Phagozytose von Zelldebris nekrotischer Kardiozyten und NG [10]
2. Der Umbau der EZM (z.B. durch Proteasen, Matrix-Metalloproteinasen und –inhibitoren) [25]

3. Die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche insbesondere die Fibroblasten in der Proliferativen Phase stimulieren und die Narbenheilung beeinflussen sollen [26]

Diese Aufgaben lassen dem Makrophagen eine Schlüsselstellung im Infarkt zukommen, welche den weiteren Verlauf der Narbenheilung bestimmt. Mehrere Experimente, bei denen die Monozyten/Makrophageneinwanderung unterbunden wurde, demonstrierten eine schlechtere und langsamere Wundheilung, eine höhere Sterblichkeitsrate der Versuchstiere sowie die Abhängigkeit des Narbenheilungsprozesses von den Makrophagen mit Folge von akuten Ventrikelrupturen, Nekroseabtragungsstörungen („Mumifizierte Kardiozyten“) und Ausbildung von dünnerem und strukturell schwächerem Narbengewebe [27, 28]. Aufgrund der wichtigen Rolle der MA bei der Reorganisation des Infarktareals wurde eine flexible Genexpression des MMS postuliert, jedoch ist bislang noch wenig über die genaue Physiologie und Funktion des MMS im Verlauf nach MI bekannt.

Wie genau die Inflammationsreaktion im Kontext des MI zu bewerten ist wird kontrovers diskutiert: Es gilt als gesichert, dass die Inflammation das Gewebe zumindest temporär stabilisiert und durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die weitere Narbenheilung beeinflusst wird [6]. Es ist bekannt, dass eine überschießende Inflammationsreaktion auch vitales Gewebe zerstört und damit das Infarktareal vergrößert. Ferner wird durch fortschreitende Zerstörung der EZM auch die Stabilität des Areals gefährdet. Tiermodelle, in denen die NG Migration durch Selektinblockade gehemmt wurde, konnten hier in manchen präklinischen Versuchen eine Verkleinerung der Infarktgröße zeigen [29, 30]. Im Gegensatz dazu führte die Unterbindung der Inflammation durch Kortikoide beim Menschen oder Makrophagendepletion im Mausmodell katastrophalen Resultaten [11, 27, 31].

1.1.2.c Die proliferative Phase

Die Proliferative (fibrotische) Phase beginnt auf makroskopischer Ebene mit einem Rückgang der Inflammation, welche sich in den elastomechanischen Eigenschaften des Areal durch einen Abnahme der Geweberigidität bemerkbar macht. Die Stabilität des Infarkts ist nach Resorption des Ödems nunmehr abhängig von der zunehmenden Fibrose, d.h. der Kollagenproduktion der Fibroblasten (FB). Auf zellulärer Ebene beginnt in der proliferativen Phase eine Steigerung der FB-Teilungsrates um 500%, die stärkste Proliferation findet im Randgebiet des Infarkts statt [6].

Mikroskopisch verdrängt die rasche Proliferation der Fibroblasten den Makrophagen als häufigsten Zelltyp im Infarkt. Deren Zellzahl geht mit Fortschreiten der Narbenheilung langsam zurück, so dass nun Fibroblasten und Endothelzellen die zahlenmäßig dominierenden Zelltypen im Infarktareal sind [32].

Die FB des MI sind nach neueren Untersuchungen als heterogene Gruppe anzusehen: Der Großteil der Gewebefibroblasten stammt aus dem Myokard, eine kleine Gruppe jedoch besteht aus eingewanderten FB, welche ihren Ursprung im Knochenmark haben [33].

Eine weitere Einteilung der FB, welche im weiter fortgeschrittenen Stadium der Narbenheilung den wesentlichen Anteil des Zellmaterials ausmachen erfolgt aufgrund funktioneller und morphologischer Kriterien. Insbesondere Myofibroblasten, gekennzeichnet durch die Koexpression von kontraktile Elementen (Smooth Muscle Aktin und Myosin) sowie dem fibroblastentypischen Intermediärfilament Vimentin werden hierbei wichtige Aufgaben bei der strukturellen Organisation des Narbengewebes zugeschrieben [34]. Während die Kollagenproduktion und -vernetzung die mechanische Stabilität der Infarktnarbe steigert wird durch Ausschüttung von Enzymen der EZM, insbesondere aus der Familie der Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen (MMPs und TIMPs) die extrazelluläre Matrix neu strukturiert [35]. Im Rahmen der Umbauvorgänge steigt die Kapillarisation der Infarktnarbe, ebenfalls besonders im Grenzareal, zunächst stark an, um im weiteren

Verlauf mit Fortschreiten der Infarktheilung wieder abzunehmen. Schließlich wirken die kontraktilen Elemente der Myofibroblasten im Sinne einer Narbenkontraktion [36]. Die Aktivität der (Myo-)Fibroblasten wird durch zahlreiche Faktoren moduliert; hierzu zählen Gewebehormons aus der Gruppe der Zytokine aber auch physikalische Faktoren wie die mechanische Belastung des Gewebes. Mit dem Fortschreiten der Zeit sinkt die Teilungsrate der Zellen im Granulationsgewebe des Infarkts. Gegen Ende der Proliferativen Phase treten die meisten Zellen, insbesondere Myofibroblasten, in die Apoptose ein [37, 38]; das resultierende Endstadium des Myokardinfarktes ist durch ein kollagenfaserhaltiges Narbengewebe mit geringem Zellanteil und passivem Verhalten während der Ventrikelkontraktion gekennzeichnet.

Mit dem Ende der Proliferationsphase und den mit ihr einsetzenden Umbauvorgängen, welche letztendlich den Übergang von nekrotischem Myokard und Granulationsgewebe in Narbengewebe beschreibt, beginnen die Ausreifung des Narbengewebes und Remodelingprozesse, welche die komplette Ventrikelarchitektur mit einbeziehen und die im weiteren Verlauf kontinuierlich fortschreiten.

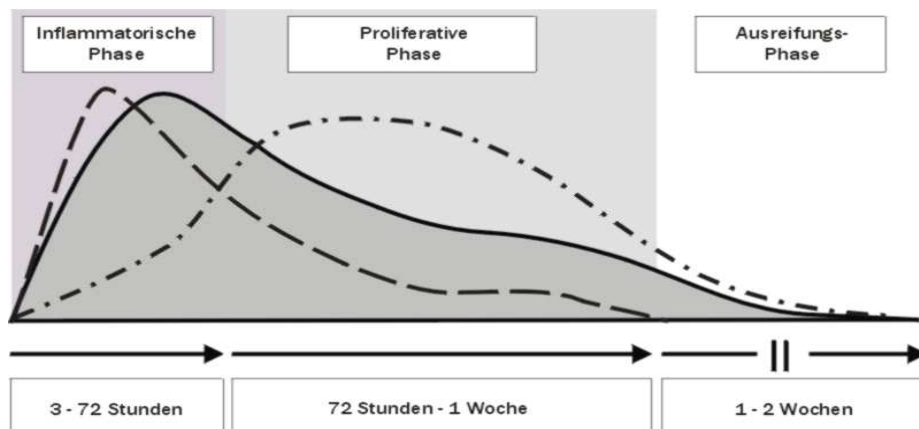


Abb 1.1: Zellpopulationen im Myokardinfarkt, modifiziert nach *Frangogiannis et al*[7]
Darstellung der wichtigsten Zellpopulationen des Infarktareals im Zeitverlauf (Mausmodell):

Neutrophile Granulozyten (NG – unterbrochene Linie): Wandern als erstes in das Infarktareal ein und dominieren in der ersten Hälfte der inflammatorischen Phase

Monozyten/Makrophagen (MMS – durchgezogene Linie): Stellen gegen Ende der Inflammatorischen Phase die meisten Zellen im Infarkt

Fibroblasten (FB – gepunktete Linie): In der Proliferativen Phase steigt die Anzahl der Fibroblasten zunächst exponentiell an, um bis zur Ausreifungsphase in die Apoptose einzugehen.

1.1.2.d Die Ausreifungsphase

Der Übergang von der proliferativen- zur Ausreifungsphase beginnt mit einer verminderten Fibroblastenproliferation und Kollagenproduktion. Im weiteren Verlauf der Ausreifungsphase nehmen der Zellgehalt sowie die Vaskularisierungsdichte des Narbengebietes weiter ab, da Fibroblasten und Endothelzellen in die Apoptose übergehen [38]. Der Rückgang des zellulären Anteils am Narbengewebe führt zu einer Reduktion der Narbendicke, welche im Endzustand weitgehend aus zellfreiem Bindegewebe besteht [32]. Bei der Maus endet die Ausreifungsphase und die mit ihr verbundene Wandverdünnung 14 Tage nach MI welche einen Rückgang um etwa 50 - 75% des Wanddurchmessers umfasst [32, 39]. Während der Ausreifungsphase kommt es zu einer beträchtlichen Dilatation des Ventrikels [40], deren Ausprägungsgrad ein ungünstiges prognostisches Zeichen darstellt. Nach Ende der Ausreifungsphase steht bei optimal verlaufener Infarktheilung eine dünne und weitgehend zellfreie Infarktnarbe, welche flexibel, jedoch gleichzeitig mechanisch stabil ist und folglich keine weitere Dilatation oder Ausbildung von Infarktaneurysmen erlaubt [41]. Obwohl die Infarktheilung damit abgeschlossen ist, wirkt sich die Störung von Biomechanik und Ventrikelarchitektur auf die gesamte Herzkammer aus und führt zu einer Reihe von ungünstigen Langzeitveränderungen, welche als ventrikuläres Remodeling bezeichnet werden, und welche über Jahre nach Ablauf eines MI weiter fortschreiten können.

1.1.3 Ventrikuläres Remodelling

Der Begriff ventrikuläres Remodeling beschreibt Umbauvorgänge des Myokards, welche durch einen MI bedingt sind, jedoch den nicht-infarzierten Anteil des Ventrikels betreffen. Nach dem Infarkt kommt es zu einer Dilatation der Herzhöhle, welche einer Volumenüberlastungs-Hypertrophie ähnelt, d.h. das enddiastolische Füllungsvolumen nimmt zu und mit ihm auch die Wandspannung [41]. Im Zuge dieser ungünstigen biomechanischen Situation kommt es zu einem Auseinandergleiten der Muskelverbände („muscle slippage“), welches zu einem Fortschreiten der Dilatation führt. Durch die Volumenzunahme kann kurzfristig ein

adäquates Herzzeitvolumen bei infarktbedingt erniedrigter Ejektionsfraktion (EF) garantiert werden [42], langfristig ist sie jedoch ein Prädiktor für Mortalität sowie die Komplikationen Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen [43, 44].

Günstige Auswirkungen auf den wesentlichen Faktor Ventrikeldilatation haben drei voneinander unabhängige Faktoren: Die Reperfusion des Infarktes, medikamentöse Therapie mit einem ACE-Hemmer sowie die Beeinflussung der Narbenheilung [42].

Durch Reperfusion, selbst nach Ablauf der Ischämietoleranz (late reperfusion), konnte im Tiermodell [45] sowie in klinischen Studien [46, 47] eine Verbesserung der LV-Funktion sowie der Prognose gezeigt werden.

Der Einsatz von ACE-Hemmern wirkt über die Senkung von Vor- und Nachlast günstig auf die Ventrikelmechanik, greift aber jedoch auch direkt in das Remodeling ein [48]. Durch seinen Einfluss auf Prognose, Ventrikeldilatation und Belastbarkeit der Patienten haben ACE Hemmer heute einen festen Platz in der medikamentösen Therapie nach MI [49, 50].

Über die Beeinflussung der Narbenheilung ist bisher relativ wenig bekannt.

Dokumentiert ist der ungünstige Einfluss von Glucocorticoiden auf die Narbenstabilität mit der Komplikation von Ventrikelrupturen in der Frühphase nach MI sowie NSAR-Einnahme (mit der bemerkenswerten Ausnahme von Aspirin) während der Heilungsphase mit der Folge von Infarktexpansion und Ausdünnung der Infarktnarbe

Im Hinblick auf die schwerwiegenden Langzeitkomplikationen des Remodellings und die Häufigkeit der Erkrankung in der Bevölkerung ist die weitere Forschung wichtig, um mehr über den Prozess der Narbenheilung und dessen Beeinflussung in Erfahrung zu bringen.

1.1.4 Spezies-abhängige Unterschiede im Zeitverlauf

Die Dauer der einzelnen Phasen des Infarktgeschehens ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich, wobei Gesamtdauer der Infarktheilung mit der Körpergröße des Versuchstieres korreliert. Größere Versuchstiere haben zeitlich einen ähnlichen Heilungsablauf wie der Hund [6].

Während beim Menschen die Narbenbildung innerhalb von 8 Wochen abgeschlossen ist, geschieht dies bei der Maus bereits innerhalb von 14 Tagen. Die Bildung von Granulationsgewebe (Proliferationsphase) ist bei der Maus bereits innerhalb von einer Woche abgeschlossen.

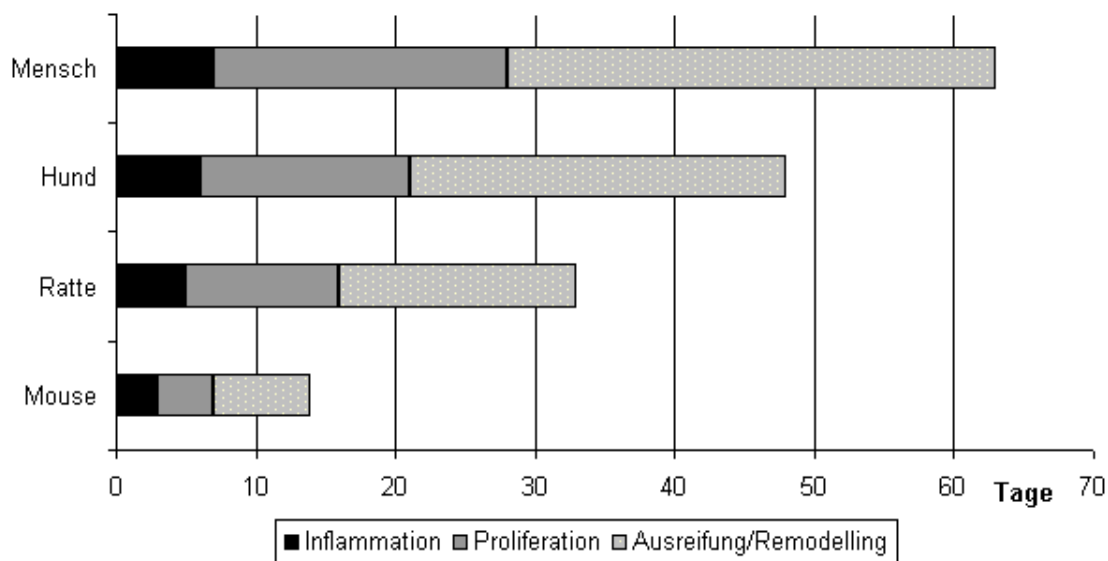


Abb.: 1.2: Narbenheilung nach MI unterschiedlicher Spezies (Modifiziert nach *Holmes et al* [6] und *Frangogiannis et al* [39]).

Auf der zellulären Ebene zeichnet sich die Infarktheilung von Ratten durch geringere Kollagendeposition und schnellere Heilung aus, wobei diese Eigenschaften durch eine bessere Kollateralisierung des Myokardgewebes erklärt wird [51].

Mausmodelle zeichnen sich durch eine extrem schnelle Infarktheilung aus, sowie einer (im Gegensatz zum Hund) nur temporären Präsenz von Makrophagen im Infarktgebiet, wobei Mastzellen keine Rolle bei der Infarktheilung spielen [52].

1.2 Monozyten, Makrophagen und ihre Subtypen

BM und MA, welche sich aus Monozyten entwickeln sind antigenpräsentierende Zellen der myeloischen Reihe. Nach ihrer Entstehung im Knochenmark wandern sie über den Blutstrom in die einzelnen Organe aus und differenzieren zu Gewebemakrophagen. Entsteht in einem Organismus eine Noxe, so infiltrieren im Rahmen der Entzündungsreaktion viele BM das betroffene Gewebe.

Die wichtigsten Aufgaben der BM/MA sind die Phagozytose (mit subsequenter Antigenpräsentation), und die Ausschüttung von Zytokinen, welche den Verlauf der Immunreaktion beeinflussen.

Parallel zur Th1/Th2-Polarisation der Lymphozyten werden bei Makrophagen ebenfalls zwei stereotype Aktivierungszustände beschrieben [53], M1 und M2, welche die „klassische“ Aktivierungsform von der „alternativen“ Aktivierung abgrenzen – beide Subgruppen der Makrophagen unterscheiden sich durch unterschiedliche Genexpression sowie Morphologie und Beeinflussung des Entzündungsgeschehens [54]. Von den „klassisch“ aktivierten Makrophagen (ursprünglich bei Krankheiten mit intrazellulären Erregern wie Tuberkulose beschrieben), deren definierende Eigenschaft die Phagozytose und Radikalbildung ist, grenzte man später den alternativen Aktivierungstyp ab, welcher bei parasitären und allergischen Erkrankungen vorkommt und der vor allem mit einer Fibrosereaktion im Gewebe assoziiert ist.

1.2.1 Entwicklung von Monozyten und Makrophagen

Im menschlichen Knochenmark reifen pro Tag 5×10^9 Monozyten heran und verlassen das Knochenmark. Der Reifeprozess von Stammzelle und den späteren Zwischenformen unterliegt dem stimulierenden Zytokin „Granulozyten/Monozyten-

Kolonie stimulierender Faktor“ (GM-CSF oder Interleukin 3). Nach 2 bis 3 Tagen ist der Monozyt herangereift und betritt die Blutstrombahn, in der er durchschnittlich 18 Stunden verweilt, bevor er ein Gewebe infiltriert und zu sogenannten Gewebemakrophagen differenziert.

Makrophagen sind verhältnismäßig große Leukozyten, welche in der Lage sind, Zelldebris, Bakterien oder Fremdkörper zu phagozytieren und die aufgenommenen Antigene auf der Zelloberfläche mittels HLA-II zu präsentieren. Zur Erkennung von Fremdstoffen stehen dem MA eine mannigfaltige Batterie an Rezeptoren zu Verfügung; unter anderem erfolgt die Bindung von opsonierten Antigenen mittels Fc-Rezeptor [55] und Komplementrezeptoren [56], aber auch das direkte Erkennen fremder Strukturen durch Mannosrezeptoren, Scavenger Rezeptoren, Selektinen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie der Gruppe der „toll-like receptors“ (TLR), welche bestimmte Stoffgruppen als körperfremde Strukturen erkennen [57, 58] und deshalb auch als „pattern recognition receptors“ bezeichnet werden. Aufgrund der besonderen Fähigkeit, fremde Strukturen sowohl antikörperabhängig als auch -unabhängig zu phagozytieren und die aufgenommenen Antigene zu präsentieren werden Makrophagen sowohl zum angeborenen als auch zum adaptiven Immunsystem gezählt.

Neben der Immunabwehr haben Gewebemakrophagen jedoch auch die Aufgabe der Erhaltung der Gewebemöostase, im Wesentlichen durch die Phagozytose nekrotischer Zellen, welche im Gewebe anfallen. Je nach Gewebeumgebung kann der Makrophage sich an sein Umfeld anpassen und dort teilweise auch sehr spezielle Aufgaben übernehmen. So sind die Mikroglia des ZNS, die Kupfer-Sternzellen der Leber, Langerhanszellen in der Haut sowie Osteoklasten Beispiele für differenzierte Gewebezellen aus der MMS-Linie [59].

Neben den genannten Eigenschaften besitzen Makrophagen die Fähigkeit, Zytokine und andere Gewebehormone zu produzieren und durch Ausschüttung von Enzymen wie den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) auf das

umgebende Gewebe einzuwirken und durch die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (RSS) bakterizid auf intra- und extrazelluläre Keime zu wirken.

1.2.2 Priming

Der Großteil der Makrophagen geht nach einer gewissen Zeit in die Apoptose über. Als Überlebenssignal und als Voraussetzung zur weiteren Differenzierung muss ein Makrophage stimuliert werden; dieser Prozess wird als Priming bezeichnet.

Den Primer stellt der Erstkontakt mit Interferon γ (Inf γ). Intrazellulär wird das Priming-Signal über den Jak/STAT Signalweg übertragen. Danach ist der Makrophage in der Lage, sich nach einem Zweitstimulus weiter zum M1 oder M2-Phänotyp zu differenzieren [60].

Relativ neu sind Berichte von einem Primer-unabhängigen, immunsuppressiven Makrophagenphänotyp, welcher als Typ II-Makrophage bezeichnet wird [61].

1.2.3 Der klassisch aktivierte Makrophage

Der klassische Aktivierungstyp der MA wurde zuerst 1964 von *Mackness et al.* nach Versuchen mit experimenteller Infektion von Mäusen mit intrazellulären Keimen (*Brucella*, *Listerien* und *M. Tuberculosis*) beschrieben [62]. Mackness und Kollegen konnten zeigen, dass nach einmaliger Inkubation mit einem der Erreger die MA ein spezifisches Reaktionsmuster annahm und auf wiederholte Inkubation mit dem Keim mit derselben Inflamationsreaktion antworteten.

Der klassische (M1) aktivierte Makrophage ruft im Gewebe eine Inflamationsreaktion mit Gewebszerstörung durch Radikalbildung hervor, intrazelluläre Keime werden durch die RSS wirksam eliminiert, was eine Schlüsselfunktion der M1 darstellt.

Die M1-Aktivierung erfolgt durch Konfrontation des geprimten Makrophagen mit einem zweiten Stimulus.

Diese auch als „Zweitschlag-Hypothese“ (second hit) bekannte Theorie ist ebenfalls charakteristisch für andere Zellen des Immunsystems, wie etwa T-Lymphozyten [63]. Im Falle der Makrophagen besteht der adäquate Stimulus aus einem Zweitkontakt mit IFN γ . Auch Inkubation mit dem pro-inflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) oder Kontakt mit bakteriellen Membranbestandteilen, insbesondere Lipopolysaccharide gramnegativer Keime (LPS) - vermittelt über den LPS-Rezeptor TLR4 – bewirken die Ausbildung des M1-Phänotyps [64].

Die Eigenschaften des M1-Makrophagen bestehen aus Phagozytose, der Produktion radikaler Sauerstoffspezies und der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und anderen Gewebehormonen.

Der M1-Typ MA produziert die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IFN α/β sowie Interleukin 1, 6 und 12. Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) führt zu einer verstärkten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) [65]. NO führt einerseits zur Bildung von freien Radikalen, andererseits steigert NO die Produktion von (pro-inflammatorischen) Eicosanoiden. Die Radikalproduktion führt nicht nur zur Abtötung von Keimen, sondern auch zur Zerstörung des umliegenden Gewebes. Eine Beteiligung des M1-Phänotyps wird so bei vielen Autoimmunprozessen diskutiert [66]. Um eine überschießende Inflammation und Gewebeerstörung zu vermeiden, kann die Aktivität von M1-Makrophagen durch Interleukin 10 (IL-10) und Transforming Growth Factor β (TGF β) moduliert werden [66, 67].

Zu den Unterschieden muriner und humaner Makrophagen scheint zu gehören, dass humane M1-Makrophagen bei gleichem Marker und Zytokinprofil keine gesteigerte NO-Produktion aufweisen [68].

Eine gesteigerte NO-Produktion gilt (zumindest im Mausmodell) als Erkennungsmerkmal der M1-Makrophagen; die M1-Aktivität wird als pro-inflammatorisch und gleichzeitig anti-fibrotisch angesehen.

1.2.4 Der alternativ aktivierte Makrophage

Der alternativ aktivierte MA (M2) ist der zweite Phänotyp welcher 1992 von *Gordon et al* beschrieben wurde [69]. Bei Inkubationsversuchen mit Interleukin 4 erzeugten sie einen Makrophagenphänotyp, welcher ähnlich den klassisch-aktivierten MA zur Phagozytose fähig war, die Steigerung der NO-Produktion jedoch ausblieb. Im weiteren Verlauf wurde der M2 mit Wundheilung [70], Revaskularisations- [71] und Fibroseprozessen sowie in-vitro Fibroblastenstimulation [72], sowie Aufbau der EZM assoziiert – Beispiele sind das Infiltrat bei allergischen Asthma, Leberfibrose bei Schistosomiasis und die Stabilisierung der Fibrotische Kappe im atherosklerotischen Plaque. Ferner wurden die M2 mit Immunsuppression in Verbindung gebracht, da sie die T-Zell Proliferation zu hemmen scheinen [73].

Funktionen des alternativ-aktivierten Makrophagen		
Prozess	Beschreibung	Referenz
Wundheilung	Zunahme während Wundheilungsphase (Gingivitis)	[70]
Revaskularisation		[71]
Fibrose	• Parasitär: Gewebefibrose Schistosomiasis	[74]
	• Fibroblastenstimulation in vitro	[72]
	• Atherosklerot. Plaque: Stabilisierung (durch Fibrose)	[75]
EZM-Remodelling	Produktion von Fibronectin sowie Matrix-assoziiertem Protein	[76]
Granulombildung	Beteiligung an Th2-Granulomen wie Schistosomiasis	[74]
Immunsuppression	Hemmung der T-Zell Proliferation	[73]

Tabelle 1.2: Gewebereaktionen mit M2-Beteiligung

Wie im Erstversuch beschrieben erfolgt die Aktivierung zum M2 durch Kontakt mit IL4 und/oder IL13 nach vorherigem Primärkontakt mit Interferon.

Intrazellulär wird das Signal über eine dem IL4- und IL13-Rezeptor gemeinsame Untereinheit, die „Common side chain IL4alpha“ [77] vermittelt und über einen JAK/STAT abhängigen Signalweg übertragen [78].

Im Unterschied zum M1-Makrophagen besitzt der alternativ aktivierte MA keine gesteigerte NO-Produktion, vielmehr ist im M2 das Enzym Arginase-1 vermehrt induziert, welches der iNOS das Substrat entzieht [79].

Neben der ausbleibenden Radikalproduktion unterscheidet sich der alternativ aktivierte MA vom M1 durch die Suppression der pro-inflammatorischen Zytokinen IL6 und TNF α ; exprimiert werden hingegen das anti-inflammatorische Zytokin IL10. Der M2 sezerniert außerdem mehrere Produkte in das umliegende Gewebe, um entzündliche Prozesse zu stoppen. Hierzu gehören neben IL10 der IL1 decoy Rezeptor, ein löslicher Rezeptor, welcher IL1 bindet und dadurch inaktiviert, sowie der IL1-Rezeptor Antagonist [80]. Neben seinem distinktiven Metabolismus und Präsentation von Oberflächenmarkerstrukturen produziert der M2-Makrophage auch extrazelluläre Proteine wie Fibronectin und Matrix assoziiertes Protein BetaIG-H3 [76] welche Bestandteile der interstitiellen Matrix sind.

Eine Reihe weiterer Oberflächenmarker und exprimierter Proteine wurden als spezifisch für den M2-Makrophagen charakterisiert, was für den Nachweis bei humanen Makrophagen dienlich ist (siehe Tabelle 2.3), da bei humanen Makrophagen der Unterschied in der NO-Produktion nicht zur Unterscheidung der beiden Populationen genutzt werden kann.

1.2.5 Deaktivierung, Typ II Aktivierung und Klassifikation der alternativen Aktivierungsformen.

Die gesteigerte Produktion von IL10 hat der alternativ aktivierte Makrophage mit zwei anderen bislang entdeckten Aktivierungsformen gemeinsam: der Deaktivierung und der Typ II-Aktivierung.

Letztere erfolgt durch TLR4 (LPS)-Stimulation in der Präsenz von Immunkomplexen – die MA produzieren nach der Typ II-Aktivierung einerseits die „M1-Zytokine“ TNF, IL1 und IL6, andererseits kein M1-typisches IL12, dafür allerdings IL10. Durch eine vom T2M ausgehende CCL1 Stimulierung wird eine pro-allergene Immunreaktion initiiert, welche einer M1/Th1 Inflammationsreaktion entgegenwirkt. Die Deaktivierung von M1 und M2 Makrophagen kann in vitro durch Glucocorticoide und IL10 erzielt werden. Die Bezeichnung ist jedoch irreführend, da die „Deaktivierung“ keinen inerten Zustand des Makrophagen bezeichnet. Von den deaktivierten Makrophagen wird anti-inflammatorisch wirksames IL10 und TGFβ freigesetzt, die Rezeptorausstattung wandelt sich von opsonierenden FC-Rezeptoren zu M2-typischen Mannoserezeptoren. Durch eine CXCL13-Stimulation wird die Immunreaktion in Richtung humorale Immunität (B-Zell und Follikelzellstimulation). Im Gegensatz zur M2-Aktivierung werden MHCII-Antigenkomplexe herunter reguliert, es findet keine Produktion von M2-Zytokinen oder Arginaseinduktion statt.

Während in-vitro zur Makrophagendeaktivierung Kortison und IL10 verwendet werden, existieren in vivo zahlreiche Prozesse wie die Phagozytose von Zelldebris oder Matrix- und T-Lymphozyteninteraktion, welche zur Deaktivierung führen. Da die alternative/M2-Aktivierung mehrere Gemeinsamkeiten mit der Deaktivierung sowie dem T2M haben (insbesondere IL10-Produktion, Repression von IL12 und Unterdrücken einer Th1-Immunreaktion), welche sie von den klassisch-aktivierten Makrophagen abgrenzen, wurden sie von *Mantovani et al* unter dem Überbegriff „alternative Aktivierung“ zusammengefasst, wobei der Subtyp M2a dem originären alternativ-aktivierten Makrophagen entspricht, M2b dem T2M und M2c der Deaktivierung [81].

Beide Nomenklatorsysteme sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Im Folgenden beziehen wir uns mit der Bezeichnung „alternativ aktivierter MA“ auf den ursprünglichen (M2a) Subtyp.

	Klassisch	Alternative Aktivierung		
	M1	M2a	M2b	M2c
		Alternativ aktiviert	Typ2	Deaktivierung
Hormone	CXCL9 CXCL16 TNF α IL1, IL6 <u>IL12</u> IFN IP-10	MDC (=CCL22) TARC (=CCL17) IL10 Il1RA [82]/ IL1decoyR AMAC[83]	CCL1 CCL18 TNF IL1, IL6 IL10	CCL 16 CCL 18 CXCL13 TGF β IL10
Rezeptoren		IL1decoyR[80] MHCII Mannose-Rezeptor		Mannose-Rezeptor
Enzyme	iNOS	Arginase-1[79]		
Export-Protein		Fibronektin, Matrix- Proteine[76]		Versican a-Antitrypsin
Sonstige	NO	Ym1/FIZZ[84, 85]		PGE2 Cd150
Herunterreguliert	FC-Rezeptor[86]	NO-Produktion Fc- γ -Rezeptor Il1, Il6, TNF α	Arginase IL12	NO MHCII, TLRs, IL10-R, CD47
Immunmodulation	Th1 + NK	Th2 + Treg.	Th2, Treg + Eos	NTZ, BZ, Follikelzellen

Tabelle 1.3: Auflistung charakteristischer Proteine und Metabolismusprodukte der unterschiedlichen Aktivierungstypen, Nomenklatur (klassisch und modifiziert nach Mantovani et al.) Prostaglandin E2 (PGE2), Natürliche Killerzellen (NK), Naive T-Zellen (NTZ), Eosinophile Granulozyten (Eos).

1.2.6 Argininmetabolismus: Inflammation versus Fibrose

Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal von klassisch- zu alternativ aktivierten Makrophagen, die NO-Bildung, wird durch eine unterschiedliche Verstoffwechslung des iNOS-Substrates L-Arginin reguliert [69].

Schon im Zusammenhang mit einem Standardmodell der M2-Bildung, der Schistosomiasis-Infektion in der Maus, fiel auf, dass durch eine Hemmung der M2-Polarisierung (mittels IL4 Knockout) ein Ausbleiben der Unbeantwortbar erreicht wurde – mit hundertprozentiger Letalität der Schistosomeninfektion [87]. Auch in zahlreichen anderen Pathologien wurde die Assoziation von Makrophagen auf die lokale Gewebeproliferation dokumentiert (siehe Tabelle 2.2). Der Einfluss von M2-Makrophagen auf die Fibrose begründet sich dabei zumindest teilweise ebenfalls auf dem unterschiedlichen Arginin-Metabolismus:

L-Arginin ist neben seiner Funktion als Proteinbestandteil auch ein wichtiger Bestandteil zellulärer Stoffwechselwege, unter ihnen der Harnstoffzyklus, Aminosäurestoffwechsel, die Kreatinsynthese und die Herstellung von Stickstoffmonoxid (NO).

Der Makrophage nimmt 50 Prozent des verstoffwechselten Arginins über die Umgebung auf [88], der Rest wird durch den Abbau von Zellproteinen sowie der Regeneration von Arginin aus Stoffwechselzwischenprodukten, insbesondere Citrullin [89, 90], welches als direktes Produkt der NO-Synthese entsteht, gedeckt. Das freie zytoplasmatische Arginin wird im Makrophagen im Wesentlichen in drei Stoffwechselwege eingespeist [91]:

- Die Arginasereaktion, gleichzeitig auch der letzte Abschnitt des Harnstoffzyklus welche Arginin in Ornithin und Harnstoff spaltet.

Das Produkt Ornithin kann in folgenden Transaminasereaktionen zu den Aminosäuren Glutamat und Prolin umgewandelt werden sowie in diverse Polyamine wie Spermin und Putrescin über die Ornithin-Decarboxylase Reaktion (ODC) [92]. Prolin ist (mit etwa 30% der Aminosäuren) ein essentieller Bestandteil von Kollagenpolymeren und wird mit der bevorzugte Metabolisierung von Arginin über diesen Stoffwechselweg vermehrt bereitgestellt.

Polyamine als zweites wichtiges Endprodukt haben sich als Mediator von Zellteilungs- und Differenzierungsprozessen erwiesen.

Durch die Eigenschaften der Endprodukte dieses Stoffwechselweges wird dieser mit Wundheilungs- und Fibroseprozessen (Förderung der Kollagendeposition und Zellteilung von Fibroblasten) sowie der generellen Zellproliferation (Tumorgenese) [93,94] in Verbindung gebracht.

Der nicht-stimulierte MA sowie der M2 nutzen bevorzugt diesen Stoffwechselweg [95].

- Die NO-Synthese – Stickstoffmonoxid kann von einer Reihe Zellen des Säugers hergestellt werden, insbesondere durch Endothelzellen. Im Gegensatz zu Endothelzellen, welche konstitutiv die membranständige und durch Kalzium regulierte eNOS exprimieren stellt der Makrophage NO mittels der zytosolischen induzierbaren NO-Synthase (iNOS/NOS2) her [96]. In der von den NOS-Enzymen katalysierten Reaktion wird NO von Arginin abgespalten, welche dadurch zur Aminosäure Citrullin umgewandelt wird. Citrullin selbst kann im Rahmen des Citrullin-Zyklus wieder zu Arginin regeneriert werden. NO ist ein zytotoxisches und kurzlebige Molekül welches von Endothelzellen als Botenstoff zur Reduktion des Gefäßtonus synthetisiert wird und welches der MA zur zur Abtötung von Keimen nutzt. Eine überschießende M1 Aktivierung kann zu einer tödlich verlaufenden systemischen Inflammationsreaktion führen [97].

In vivo ist die NO-Induktion meist eine Reaktion auf Infektionen mit zahlreichen (intrazellulären) Pathogenen - die Induktion der iNOS ist ein Hauptunterscheidungskriterium des M1 vom M2, welcher keine gesteigerte NO-Synthese aufweist und dadurch auch Infektionen wie Tuberkulose schlechter bekämpfen kann [62].

- Die Arginin-Decarboxylase Reaktion (ADC) – das Substrat Arginin wird durch Abspaltung von Kohlendioxid in Agmatin umgewandelt, welches einerseits im Sinne einer negativen Rückkopplung die ADC inhibiert, andererseits als schwacher kompetitiver Inhibitor der iNOS wirkt und somit in der Lage ist, die

NO-Synthese zu drosseln und eine überschießende gewebetoxische Produktion zu vermeiden.

Diese drei Stoffwechselwege konkurrieren im MA um das Substrat Arginin, wobei insbesondere Arginase und iNOS häufig gegensinnig reguliert sind: Während im Ruhezustand, aber auch im alternativ aktivierten MA das Arginin bevorzugt zu Ornithin umgesetzt wird, ist der klassisch-aktivierte MA durch seine Expression der iNOS gekennzeichnet [79, 93, 95].

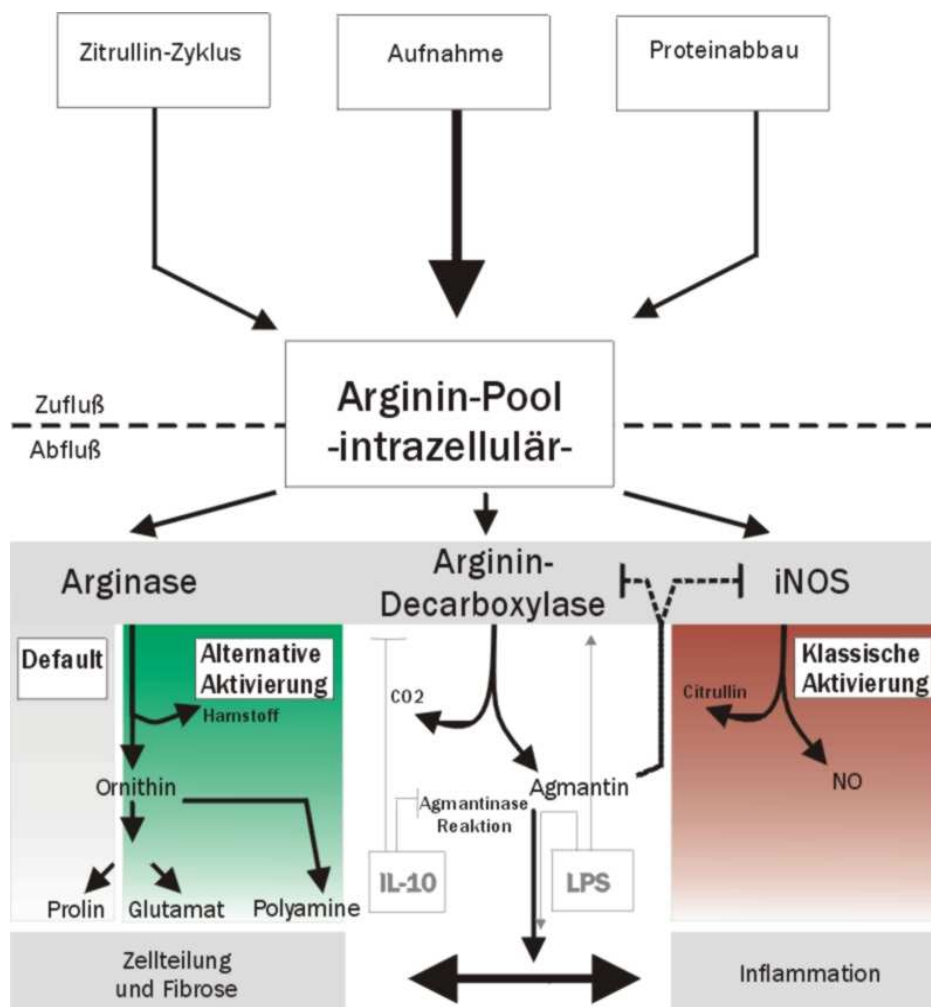


Abb. 1.3: Der Arginin Metabolismus des MA und seine Regulation während der Differenzierung: Während M2 und nicht-aktivierte Makrophagen Arginin mittels der (fibroseassoziierten) Arginasereaktion verstoffwechseln, wird von M1-MA die (inflammatorische) NO-Produktion

betrieben. Agmatin hemmt die iNOS-Reaktion; die ADC-Reaktion selbst wird von LPS und IL10 blockiert.

Insgesamt führt die gegenläufige Regulation beim Arginin Metabolismus zu einer Umverteilung des Arginins in verschiedene Stoffwechselwege beim M1 gegenüber dem M2: der M1 leitet das Arginin in die NO-Synthese indem die iNOS induziert und die Arginase herunter reguliert wird, der M2 reguliert beide Enzyme gegenläufig und schafft dadurch die Basis für Fibrose und Zellwachstum.

1.2.7 Heterogenität der Monozyten- und Makrophagenpopulationen

Nach der Charakterisierung der alternativen Makrophagenaktivierung wurde angenommen, dass M1 und M2-Phänotyp die einzigen stereotypen Aktivierungswege seien [98].

Dieses Dogma gilt mittlerweile als widerlegt. Neue Makrophagensubtypen, wie der von *Mosser et al.* beschriebene „Typ 2 Makrophage“ (T2M), unterscheiden sich nicht nur in der Genexpression von M1/M2 Makrophagen, sondern sind überdies nicht auf das vorhergehende Priming angewiesen.

Für den Typ 2 Phänotyp kann neben einer Aktivierung mittels Priming auch eine einmalige Ökostimulation mittels IFN γ (oder alternativ über den CD40/44 Signalweg) sowie Immunglobulin G erfolgen, welches über den Fc γ -Rezeptor des MA gebunden wird.

Der T2M produziert ähnlich wie der M1 die inflammatorischen Zytokine IL1, IL6 und TNF. Im Unterschied zum M1 erfolgt allerdings keine Produktion von IL12, sondern die Synthese des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 [99]. In einem LPS-Intoxikationsversuch konnte die vorherige T2M-Aktivierung eine letale systemische Inflamationsreaktion verhindern[61]. In einem weiteren Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Infusion von T2-Makrophagen in Verbindung mit einem körperfremden Eiweiß (Ovalbumin) zu einer signifikanten Typ1 Allergisierung des Versuchstieres führte, während in der Kontrollgruppe mit nicht-aktivierten MA kaum

Antikörpertiter zu messen waren [100], weswegen der T2M als Anti-Inflammatorisch und Pro-Allergen bewertet wird.

Wie die Makrophagen, werden auch deren Vorläuferzellen, die Blutmonozyten mittlerweile als heterogene Population wahrgenommen:

Die in der Literatur am häufigsten genannte Unterscheidung basiert auf der Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD16 und CD64. Während der Großteil der zirkulierenden Monozyten beim Menschen CD14 und CD64-positiv (CD16-negativ) ist und den MCP-1 Rezeptor CCR2 exprimiert, zeigt eine kleinere Population von 5 - 10% eine Expression von CD16 (CD14-niedrig, CCR2 negativ), wobei die erste Gruppe während einer Inflammationsreaktion anteilmäßig weiter zunimmt und bevorzugt in entzündetes Gewebe einwandert, die zweite Gruppe zur Differenzierung in Dendritische Zellen (DC) neigt.

Neben dieser klassischen Einteilung sind mittlerweile allerdings ebenfalls bereits Subpopulationen (CD14^{low}, CD16⁺, CD64⁺) und Einteilungen mit gänzlich anderen Markern publiziert worden. Bei der Maus entspricht der CD14⁺/CD16⁻ Phänotyp der Ly6^{high}/CCR⁺-Subpopulation und der CD14^{low}/CD16⁺ der Ly6^{low}/CXCR1⁺-Subpopulation [101]. Entsprechend der Oberflächenrezeptorausstattung erfolgt die Gewebeeinfiltration des Ly6^{high}-Monozyten durch MCP-1, die des Ly6^{low}-Monozyten durch Fractacalin.

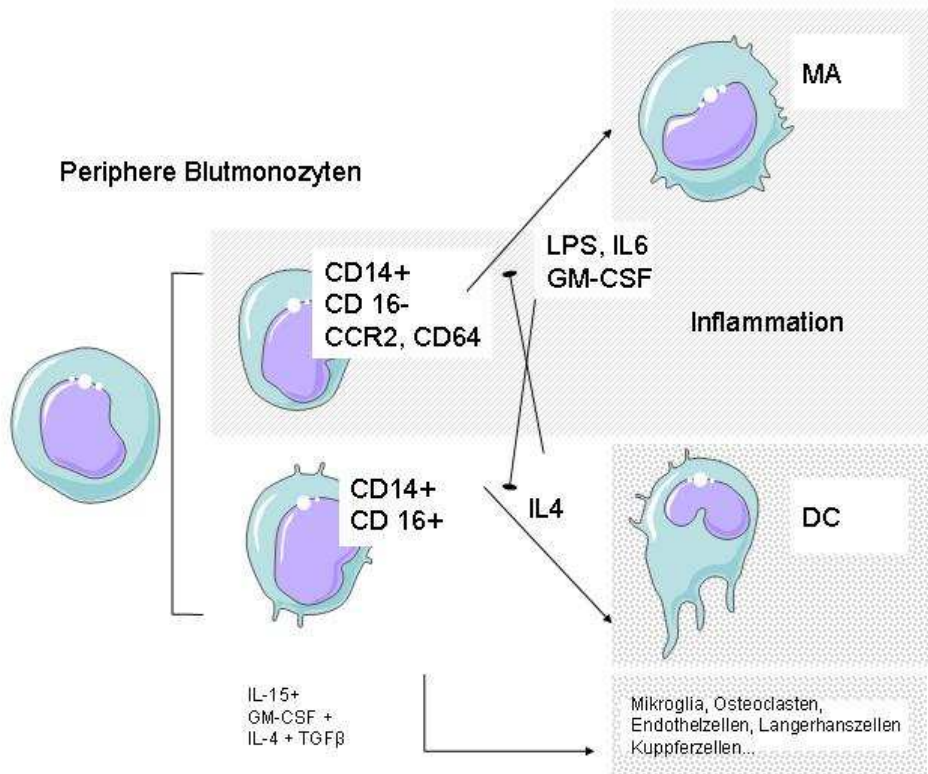


Abb 1.4: Monozytenheterogenität: Die bekannteste Einteilung der Blutmonozyten in Ly6Chigh(CD14+/CD16-) (a) und Ly6Clow(CD14low/CD16+) (b). Ersterer differenziert sich zu Makrophagen, während der letztere zur Ausprägung eines Dentritischen Zell (DC)-Phänotyps neigt. Zusätzlich kann die Differenzierung durch die Zytokinumgebung geprägt werden – hierbei stimulieren IL6 und LPS (d) die Entwicklung zu Makrophagen während IL-4 die DC-Differenzierung fördert, wobei beide Substanzgruppen die Ausprägung des jeweils anderen Phänotyps unterdrücken.

Die Beschreibungen von neuen Aktivierungs- Differenzierungstypen des MMS legen nahe, dass Makrophagen in mehr als nur zwei stereotypen Mustern agieren können. Trotzdem ist das M1/M2 Modell sehr wertvoll, da es zum einen langjährig bei verschiedenen Krankheitsbildern etabliert ist und zum anderen eine Einordnung im Sinne der inflammatorischen Aktivität zulässt.

1.3 Das MMS und Narbenheilung

Obwohl der Makrophage als „Schlüsselregulator“ der Infarktheilung bezeichnet wird, ist über seine genaue Rolle im Infarkt nicht sehr viel bekannt [39]. Das Zeitfenster des Makrophagenmaximums während der Inflammationsphase, also nach Eintreten des Gewebeuntergangs und vor Einsetzen des Fibroseprozesses, sowie die bereits beschriebenen Eigenschaften von M1 und M2 in den Bereichen Phagozytose, Inflammation und Geweberemodeling lassen darauf schließen, dass dem Makrophagen eine Schlüsselfunktion bei der Reorganisation des Infarktgebietes zukommt und dieser einen wichtigen Beitrag zur Narbenheilung und damit auch zum Verlauf des ventrikulären Remodelings liefert.

Wie genau insbesondere die postulierte Beeinflussung der weiteren Narbenheilung abläuft ist bislang kaum erforscht. Die ersten Monozyten beginnen ab etwa einer Stunde nach Beginn des Infarktes mit der Einwanderung aus dem Blut ins Gewebe. Der Stimulus zur Migration verändert sich hierbei während des Zeitverlaufs – während in den ersten drei Stunden aktivierte Komplement-Bestandteile (C5a) und TGF β die Einwanderung antreiben, so wird diese ab 180 Minuten durch das Makrophagen-Chemotaktische Protein (MCP-1) und das Interleukin γ induzierbare Protein (IP-10) getragen [102].

Versuche an einem dem MI verwandten Ischämie-Reperusionsmodell mit TNF α -Knockoutmäusen, bei denen die Infarktgröße und Zytokinausschüttung vermindert war, weisen darauf hin, dass die Monozyten/Makropagen zumindest initial klassisch aktiviert werden und zur Inflammation beitragen [103].

Obwohl die Monozyten und Makrophagen zumindest initial zur Entzündungsreaktion beizutragen scheinen weist die Studienlage darauf hin, dass sie insgesamt einen protektiven Effekt auf das infarzierte Herz haben.

Leibovich et al. konnten 1975 mit einer Kombination von systemischer und lokaler Gabe von Glucocorticoiden und Anti-Makrophagen Serum eine Verzögerung der Resorption von Zelldebris wie auch eine verspätete Narbenentwicklung beobachten

[104]. *Amerongen et al* erhielten ähnliche Resultate bei einer Monozyten-Depletion mittels Clodronat-Liposomen, welche den Versuchstieren in der ersten Woche injiziert wurden: Neben einer stark verzögerten Auflösung der Zelltrümmer waren Neovaskularisation, Myofibroblasteneinwanderung und Kollagenbildung in der Narbe verringert – zudem zeigten die behandelten Versuchstiere eine stark erhöhte Mortalität sowie ausgeprägtere Dilatation und Wandverdünnung des Infarkts [27].

1.4 Zusammenfassung

Der Makrophage im Infarkt scheint nach bisherigen Erkenntnissen eine Schlüsselstellung bei der Reorganisation des Infarktgewebes einzunehmen. Zu den mit der Makrophagenaktivität assoziierten Aspekten der Infarktheilung gehören die Unterstützung der Entzündungsreaktion und Phagozytose aber auch durch Einfluss auf die Narbenbildung (wie Kollagendeposition, Fibroblastenproliferation und Revaskularisationsprozesse). Obgleich damit dem Makrophagen wesentliche Aktivitäten in der Infarktnarbe zugeschrieben werden, ist bislang noch keine nähere Klassifizierung der Makrophagenpopulation im Infarktgewebe erfolgt, wobei die Makrophagenaktivität und der Aktivierungstyp anderer (insbesondere immunologischer) Krankheitsbilder recht gut dokumentiert ist.

Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Möglichkeit von abweichenden Expressionsmustern der Monozyten/Makrophagenpopulation von den bisher beschriebenen etablierten Modellen der klassischen, alternativen und Typ2-Aktivierung möglich ist.

1.5 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der herausragenden Position des Monozyten/Makrophagensystems im Myokardinfarkt und angesichts des unzureichenden Datenlage in Bezug auf den Aktivierungszustand und die Physiologie der MMS-assoziierten Narbenheilung sollte eine Untersuchung des

MMS aus dem Myokardinfarkt dazu beitragen, die Physiologie des Aktivierungszustandes und Phänotyps näher zu beleuchten, als auch potentielle Ansatzpunkte zur Beeinflussung der Narbenheilung aufzufinden. Die Zielsetzung des Projektes ist:

1. Die Isolation von Monozyten und Makrophagen aus Myokardinfarktgewebe
2. Das Erstellen eines zellspezifischen Microarray-Profiles
3. Die Entwicklung eines geeigneten Interpretationsalgorithmus
4. Einordnen des Aktivierungszustandes anhand des M1/M2-Systems
5. Auffinden von Zielstrukturen zur Beeinflussung der Infarktheilung mit zukünftiger therapeutischer Relevanz.

2 Material

2.1 Geräte

Analysewaage <i>Adventurer</i>	Ohaus GmbH, Gießen, D
Beatmungsgerät <i>MiniVent</i> Seeheim-Ober	Föhr Medical Instruments, Beerbach, D
Computer <i>Power Macintosh G3</i>	Apple, Cork, IRL
Computer (Histologie) <i>Octane Workstation</i> USA	Silikon Graphics, Sunnyvale, CA,
Durchflußzytometer <i>FACSCalibur</i> USA	Becton Dickinson, San Jose, CA,
Filterabzug <i>Captair® chem</i>	Erlab, Köln, D
Gewebemühle <i>Mixermill 301</i>	Retsch GmbH, Haan D
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5402</i>	Eppendorf, Hamburg, D

Magnetic Cell Separation Magnet Gladbach, D	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-
Microplate Reader <i>Sunrise</i> TM	Tecan Schweiz AG,
Mikroskop <i>DMIL invers</i>	Leica, Wetzlar, D
Mikroskop (Laser/konfokal) <i>Leica TPS SP</i>	Leica, Wetzlar, D
Neubauer-Zählkammer, verbessert	Brand.Wertheim/Main, D
Operationsmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Operationsbesteck	Föhr Medical Instruments,
Seeheim-	Ober Beerbach, D
PCR-System <i>Gene Amp 7500</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR System <i>7500 Real Time PCR</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PCR Werkbank <i>Captair®bio</i>	Erlab, Köln, D
pH-Meter <i>MultiCal</i>	WTW Wissenschaftlich-
Technische	Werkstätten GmbH, Weilheim, D
Pipetten (10, 50, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage <i>PE 3600 DeltaRange</i>	Mettler Toledo, Gießen, D
Spektralphotometer <i>NanoDrop ND-1000</i>	Peqlab – Biotechnologie GmbH,
Erlangen, D	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Schüttelwasserbad 1083	Föhr Medical Instruments, Ober Beerbach, D
Temperatur-Kontrollmodul	Biometra, Göttingen, D
Seeheim-	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer <i>Ts1 Thermoshaker</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge <i>Centrifuge 5415D</i>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zentrifuge <i>Multifuge 3SR+</i>	
Waltham,	
Zentrifuge <i>Shandon Cytospin2</i>	
Waltham,	

2.2 Verbrauchsmaterialien

Carbogengasgemisch	Messer-Griesheim, Frankfurt am Main, D
<i>Braunüle</i> (1,1x33mm)	B.Braun, Melsungen, D
Cryoröhrchen <i>Cryo.s</i> TM 2 ml D	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen(5ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D
Haftfolie <i>Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Objektträger	Menzel, Braunschweig, D
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich, D
Platten, 96-Well Thermo Fast® Detection Plate UK	Thermo Fisher Scientific, Surrey, UK
Polypropylene Conical Tube 50 ml F	Becton Dickinson, Meylan-Cedex, F
Polystyrene Round-Bottom Tube 15 ml F	Becton Dickinson, Meylan-Cedex, F
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilfilter, 0,2 µm	Whatman/Schleicher & Schuell, Maidstone, Kent, UK
Gewebeeinbettung <i>Tissue-Tek</i> ®	Sakura Finetek, Staufen, D
Nahtmaterial <i>Perma Hand</i> (5-0)	Ethicon, Norderstedt/Glashütte, D
Nahtmaterial <i>Prolene</i> (5-0)	Ethicon, Norderstedt/Glashütte, D
Zellfilter <i>Cell Strainer</i> (30 µm)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA

2.3 Software

Literaturverwaltung <i>EndNote X.1</i>	Thomson ISI
Statistikprogramm <i>Prism v4.03</i>	GraphPad
Auswertungssoftware 7500 Real Time <i>PCR7500 System Software v.1</i>	Applied Biosystems
Textverarbeitung <i>Word 2003</i>	Microsoft
Tabellenkalkulation <i>Excel 2003</i>	Microsoft
FACS-Auswertung <i>Cell QuestPro 3.2.1</i> USA	Becton Dickinson, San Jose, CA,
Fluoreszenzmikroskopie <i>Adobe Photoshop</i>	Adobe Systems, Saggart, Ireland

2.4 Reagentien

Aceton	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG
Agarose	Biozym, Oldendorf
Borsäure	Roth
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Collagenase, Type 2	Worthington Biochemical, Lakewood, USA
DNA-free kit®	Ambion / Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Dispase	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
DNA-Wipeout Puffer	Qiagen, Hilden, D
Ethanol 99,9%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D(+)-Glucose, wasserfrei	Merck, Darmstadt, D
<i>FACSFlowTM</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fibronektin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Steinheim, D
HCL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Kaliumbicarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Ambion/Applied Biosystems, City, CA, USA
Foster	
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
PBS Dulbecco`s	CC pro GmbH, Oberdorla, D
Percoll	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Propidium Iodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Reverse Transkriptase (Quantiscript)	Qiagen, Hilden, D
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, UK
TaqMan® Universal PCR Master Mix NJ,	Applied Biosystems, Branchburg USA
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, D
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Triton</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<i>TRIZOL</i> ® Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>Mowiol</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Wasser, nucleasefrei	Ambion/Applied Biosystems, City, CA, USA
Foster	

2.5 Antikörper

Antikörper MACS & Flowcytometrie				
Antigen	Hersteller	Klon	Gekoppelt mit:	Konzentration
CD3	BC/ Immunotech	H64	PE	1:10
CD3	Immunotech	IM2768	FITC	1:10
Cd11b	Miltenyi		APC	1:10
Granulozyten	Immunotech	IM2891	FITC	1:10
Monozyte Isolation Kit, Mouse	Miltenyi Biotec GmbHGladbach, D		Eisenpartikel	01:10:00

Tabelle 2.1: Antikörper Flowcytometrie

Antikörper/ spezielle Reagenzien Immunhistochemie					
Antigen	Hersteller	Klon	Gekoppelt mit:	Konzentration	Fixierung
Arginase	Santa Cruz	H64	--	1:200	PfA
Cd11b	Caltec	M1/70.15	PE	1:100	PfA
DRAQ-5	Alexis	--	--	1:1000	--
Galectin 3	Abcam		--	1:50	
IL-10	Abcam	JE5-A5 (Ratte)	--	1:400	PfA
IL-1ra	Santa Cruz	Q-19 (Goat)	--	1:300	Aceton/Methanol
IL-1β	Santa Cruz	H-153 (Rabbit)	--	1:200	PfA
F4/80	Caltag/ Invitrogen	A3-1	PE	1:20	PfA
Streptavidin- Cy2	Rockland	-	FITC	1:100	
TNFalpha	Abcam	ab667	--	1:200	PfA
Mrc-1 = Cd 206	Biozol		Alexa Fluor	1:100	PfA

Tabelle 2.2: Antikörper Immunhistochemie

2.6 Primer

Gen	F/R	Sequenz
Arginase 1	F	GGAATCTGCATGGGCAACCTGT GT
	R	AGGGTCTACGTCTCGCAAGCCA
Arginase 2	F	CCCCTTTCTCTCGGGGACAGAA
	R	TCAGCCAGTTCCTGGTTGGCAAG
Ccl2 F	F	AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA
	R	ATGTCTGGACCCATTCTTCT
Chitinase 3 like 3	F	ACTTTGATGGCCTCAACCTG
	R	ACGCATTCCTTCACCAGAA
Csf 1	F	CCCATATTGCGACACCGAA

	R	AAGCAGTAACTGAGCAACGGG
Csf 1-Rezeptor	F	TCCACCGGGACGTAGCA
	R	CCAGTCCAAAGTCCCAATCT
FIZZ 1	F	GGAACTTCTTGCCAATCCAG
	R	CAGTAGCAGTCATCCCAGCA
	F	GAGGAGGATGAGGGTGTCTATA
Flt 1		GGT
	R	GTGATCAGCTCCAGGTTTGACTT
Interferon- γ	F	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAG
		AA
	R	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
Interleukin 1 beta	F	CAACCAACAAGTGATATTCTCC
		ATG
	R	GATCCCACTCTCCAGCTGCA
IL 4 F2	F	CGCCATGCACGGAGATG
	R	CGAGCTCACTCTCTGTGGTGTT
IL 4	F	ACAGGAGAAGGGACGCCAT
	R	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
Interleukin 6	F	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC
	R	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
IL 13	F	GGAGCTGAGCAACATCACACA
	R	GGTCCTGTAGATGGCATTGCA
Interleukin 13	F	AGACCAGACTCCCCTGTGCA
	R	TGGGTCCTGTAGATGGCATTG
iNOS	F	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	R	GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC
Mannose Rezeptor Typ c	F	TAGTACCGGAGGGTGCAGAC
	R	TTTGCATCAGTGAAGGTGGA
Vimentin	F	CGCCCTCATTCCTTGTTG
	R	TCCCGCATCTCCTCCTCGTA
	F	GAGACAGCCGTGACCCAGACTT
Fibronektin		A

	R	CTTCCTTCCAGCGACCCGTAGAG
Cd11b	F	CTCCGGTAGCATCAACAACA
	R	CTCGTCCGAGTACTGCATCA
VEGF a	F	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT
	R	GGCGATTTAGCAGCAGATATAA GAA
VEGF b	F	GAAGAAAGTGGTGCCATGGATA G
	R	CCCATGAGTTCATGCTCAGA

2.7 TaqMan™ Kits

Gen	ID-Nummer
Csf2	Mm00438328_m1
Csf2rb1	Mm00655745_m1
Gng 4	Mm00772342_m1
Galectin 3	Mm00802901_m1
Glycoprotein nmb	Mm00504347_m1
Heme-Oxygenase	Mm00516004_m1
Interleukin 1 Rezeptortyp I	Mm01226961_m1
Interleukin 1 Rezeptor typ II	Mm00439622_m1
Interleukin 1 Rezeptor- Antagonist	Mm00446185_m1
Interleukin 1 Rezeptor- assoziiertes Protein	Mm00492642_m1
Interleukin 4 Rezeptor 2	Mm01253621_m1
Interleukin 10	Mm00439616_m1
Matrix-Metalloproteinase 2	Mm01253621_m1
Matrix-Metalloproteinase 9	Mm00442991_m1
Matrix-Metalloproteinase 13	Mm00439491_m1
Tgfb1	Mm03024053_m1

Thrombospondin 1	Mm01335418_m1
Thrombospondin 2	Mm00449036_m1
TIMP 1	Mm00441818_m1
TIMP 2	Mm00441825_m1
TLR 2	Mm00442346_m1
Tumornekrosefaktor alpha	Mm00443258_m1
SOCS 3	Mm00545913_s1

2.8 Lösungen und Puffer

ADS-Puffer

Zur Verwendung während des Isoliervorgangs und als Lösungsmittel für die Zellisolutionslösung. Bestehend aus:

Substanz	Formel	Molarität [mmol/l]	Menge [g/l]
Natriumchlorid	NaCl	0,11	6,8
Kaliumchlorid	KCl	5	0,4
Dextrose		5	1,0
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	0,8	0,1
Natriumhydroxid	NaH ₂ PO ₄	12,5	1,5
HEPES		20	4,8

Tabelle 2.4: Rezeptur ADS-Puffer

Nach Ansetzen der Lösung in Aqua dest. wurde der pH mittels Natriumhydroxid auf 7,3 kalibriert, der fertige Puffer sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Antikörperverdünnung (Immunhistochemie)

Die Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen in PBS gelöst

Fibronectinbeschichtung von Objektträgern

Für die Beschichtung von Objektträgern mit Fibronectin wurde dieses zunächst in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS gelöst. In dieser Lösung wurden die

Objektträger für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, danach innerhalb von 5 Minuten bei RT luftgetrocknet.

Lysepuffer (Erythrozyten)

Zur osmotischen Lyse von Erythrozyten wurde ein 10fach Konzentrierte Stock-Lösung angesetzt und Anschließend auf Verbrauchskonzentration verdünnt.

Substanz	Formel	Menge [g/l]
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	80,2
Kaliumhydrogencarbonat	KHCO ₃	8,4
EDTA		3,7

Tabelle 2.5: Rezeptur Lysepuffer

Narkoselösung (intraperitoneale Anwendung)

Das Verwendete Narkosegemisch bestehend aus Xylazin, Ketamin und physiologischer Kochsalzlösung wurde im Verhältnis 1 : 3 : 4 auf einer Insulinspritze aufgezogen.

PBS:EDTA

Dulbecco's PBS-Lösung wurde mit EDTA in einer Konzentration von 0,75 g/l versetzt und der pH mittels Natriumhydroxid-Lösung auf 7,3 titriert. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

Rinsepuffer

Der Rinsepuffer zum Eluieren der Monozyten von der Separationssäule wurde aus PBS:EDTA hergestellt, der BSA in einer Konzentration von 5 g/l zugesetzt wurde. Nach Sterilfiltration wurde der Puffer mittels Vakuumpumpe entgast und bei 4°C gelagert.

Die Entgasung stellte sich bei dieser Lösung als sehr wichtig heraus, da sie Luftblasenbildung innerhalb der MACS-Säulen verhindert, welche frühzeitig das Lumen verlegen und die Aufreinigungsqualität verringern können.

Zellisolutionslösung

Substanz	Konzentration [mg/ml]
BSA	0,1
Kollagenase IV	1
Dispase	1
Hyaluronidase	0,5

Tabelle 2.6: Rezeptur Zellisolutionslösung

Die Enzyme sowie das Bovine Serum Albumin (BSA) wurden mittels Präzisionswaage abgewogen und in ADS-Puffer unter vorsichtigem auf- und abpipettieren gelöst. Die fertige Lösung wurde im Wasserbad auf 37°C temperiert. Aufgrund der Temperatursensibilität der Enzyme wurde die Zellisolutionslösung jeweils kurz vor jedem Isolationsvorgang frisch angesetzt.

3 Methoden

3.1 Versuchsbeschreibung

Bei den Versuchen wurden Mäusen der Rasse C57 Black Six gemischten Geschlechtes operativ Myokardinfarkte mittels Gefäßligatur zugefügt. Im Zeitfenster der inflammatorischen und proliferativen Phase, d.h. von 3 - 7 Tagen post Infarkt wurden die Mäuse geopfert, das Gewebe zur Erstellung einer Einzelzellsuspension verdaut und anschließend magnetisch sortiert.

Von den so gewonnenen Monozyten/Makrophagenisolaten wurde RNA-Isoliert, von welcher ein RNA-Microarray (Affymetrix GeneChip™) angefertigt wurde. Der Microarray-Ergebnisse der Infarktmakrophagen wurden mit Microarrays von gesundem Myokard und Infarktgewebe verglichen.

Um Individualunterschiede in der Infarktheilung zu minimieren wurden zum einen bei den Isolationsvorgängen 5 - 10 Mäuse aufgeboten sowie die RNA von mehreren Isolationsvorgängen gepoolt, bevor das Meroarray-Profil erstellt wurde. Nach

Auswertung der Daten wurden die Expression der in Monozyten induzierten Gene mittels RT-PCR verifiziert.

RNA-Pool	Menge	MMS- Isolationen	Mäuse + Alter	Summe Infarkte/Probe
Array-RNA 1	250,94 ng/µl	15.01.2007	7 x 4-6d	21
		05.02.2007	7 x 4-6d	
		21.12.2006	7 x 3-7d	
Array-RNA 2	174,39 ng/µl	12.02.2007	5 x 3-6d	13
		19.02.2007	8 x 4-6d	
Array-RNA 3	140,79 ng/µl	22.01.2007	7 x 3-6d	15

Tabelle 3.1: Pool-RNA für Microarrayanalysen mit Listung der Einzelisolationen, Menge an Infarkttieren und Zeitintervall von Infarkt zu Opferung und Gewebeentnahme.

3.2 Operative Methoden

3.2.1 Myokardinfarkt-Modell der Maus

Zum Erzeugen eines Myokardinfarktes bei der Maus wurde der Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Herzkranzarterie bei geöffnetem Thorax ligiert. Verwendet wurden Tiere der Rasse C57 Black Six gemischten Geschlechtes, deren Körpergewicht am Tag der Intervention zwischen 25 und 30 Gramm betrug. Zu Beginn wurden die Versuchstiere mittels einer intraperitonealen Injektion des Narkosegemisches narkotisiert, die Tiefe der Narkose wurde nach fünf Minuten mittels Applikation von Schmerzreizen kontrolliert und gegebenenfalls nachdosiert (durchschnittliche Menge etwa 4 Internationale Einheiten pro Tier).

Nach erfolgter Narkose wurden die Versuchstiere intubiert und an den das Beatmungsgerät angeschlossen, indem eine Braunüle in die Trachea der Maus geschoben wurde.

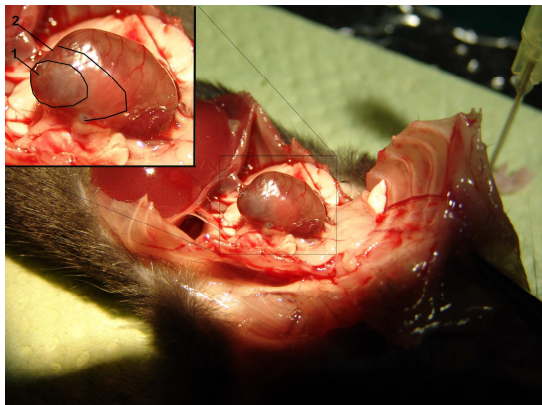
Die Maus war während der gesamten Intervention an ein Elektrokardiogramm angeschlossen. Als Zugang wurde die Haut einen cm oberhalb des processus xyphoideus parallel zum Rippenverlauf inzidiert und so der Thorax freigelegt. Der Brustkorb wurde zwischen zweiter und dritter Rippe gespreizt und der darunter

liegende linke Lungenflügel mit einem Tupfer aus dem Operationssitus verdrängt. Nach Eröffnung des Perikards mittels Pinzette wurde der RIVA im Operationsmikrop eingestellt und unter Verwendung eines Prolene-Fadens (Stärke 6 - 0) vorhofnah umstochen und ligiert.

Nach Ligation wurde sämtliches Tupfermaterial entfernt und die Lunge zwei bis dreimal gebläht, um Atelektasen aufzudehnen. Danach wurde der Thorax wieder verschlossen, die Rippen mit drei Einzelkopfstichen (Prolene 5-0) adaptiert und die Hautnaht mit Perma-Handseide durchgeführt.

Anschließend wurde die Maus weiter noch ca. 20 - 30 Minuten intubiert belassen, bis wieder eigene Atemexkursionen einsetzen. Die Tiere wurden nach erfolgter Intervention einzeln gehalten.

3.2.2 Isolation von Herzgewebe



1: Infarktareal
2: Borderzone

Abb 3.1: Darstellung der Herz- bzw. Gewebeentnahme

Versuchstiere nach Intervention oder Sham-Operation wurden mittels zervikaler Überstreckung getötet, der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Der Ventrikel wurde mit PBS gespült und die Wildtypkontrollen zügig in flüssigem Stickstoff gefroren oder in Tissue-Tec® eingebettet und in stickstoffgekühltem Methylbutan fixiert.

Bei der Infarktgruppe wurde nach Entnahme und Spülung des Herzens der Ventrikel aufgeschnitten und das Infarktareal optisch anhand von Fibrose und/oder entzündlicher Schwellung identifiziert.

Das Infarktareal und der Grenzbereich zwischen Infarkt und vitalem Gewebe (Borderzone; siehe Abbildung 4.1) wurden gesondert ausgeschnitten und entweder für RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff gefroren oder zur Isolation von Monozyten weiter verarbeitet

3.3 Zellisolationmethoden

3.3.1 Monozytenisolation aus Infarktgewebe

Zur Monozytenisolation wurde das Infarktgewebe unmittelbar nach Exzision in Zellisolutionslösung aufgenommen und dort mittels chirurgischem Besteck in Einzelteile kleiner ein Kubikmillimeter zerschnitten. Es folgten drei Isoliervorgänge von jeweils 30 Minuten Länge. Hierbei wurde das zerkleinerte Gewebe in 15 ml Zellisolutionslösung aufgenommen und während des gesamten Extraktionsvorganges bei 37°C im Schüttelwasserbad und mittels Begasungsapparatur kontinuierlich mit Carbogengas inkubiert.

In Abständen von 30 Minuten wurde der Überstand, in welchem die gelösten Zellen nun als Einzelzellsuspension vorlagen, abgenommen und das verbliebene Gewebe mit frischer Isolationslösung weiter inkubiert.

Zu der Einzelzellsuspension wurde PBS:EDTA (Raumtemperatur) bis zu einem Gesamtvolumen von 25 ml addiert, danach die Zellen bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in PBS:EDTA aufgenommen und bis Ende des Extraktionsvorganges bei 4°C dunkel gelagert. Nachdem die Zellsuspensionen aus den jeweiligen Extraktionsdurchläufen gepoolt, gewaschen und in einem Volumen von 25 ml PBS:EDTA aufgenommen wurden, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerkammer.

Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^7 Zellen/90 μ l, jedoch immer in einem Mindestvolumen von 90 μ l in 5ml FACS-Tubes aufgenommen.

Nachdem an dieser Stelle zwei Aliquots à $5 \cdot 10^5$ Zellen für die Kontrollmessungen entnommen wurden, erfolgte die Inkubation mit den Fluoreszenz- und Magnetischgekoppelten Antikörpern zwecks Sortierung und Bestimmung des Reinheitsgrades (s.Tabelle):

Sample	Zellmenge	1. Antikörper	Inkubation (4°C)	2. Antik.	Inkubation 4°C
Kontrolle leer	$5 \cdot 10^5$				
Kontrolle Cd11b	$5 \cdot 10^5$			10 μ l AntiCd11b-APC	10min
Zellpool zum Sortieren	Je nach Isolationserfolg	10 μ l AntiCd11b-BEADS	20min	10 μ l AntiCd11b-APC	10min

Tabelle 3.2: Antikörper-Inkubationsprotokoll Infarktisolat/Blut PMC

Zwischen den Inkubationsvorgängen wurden die Samples bei 400 g/5 Minuten gewaschen um überschüssigen Antikörper zu binden und unspezifische Anfärbung zu minimieren. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellen des Zellpools in 0,5 ml Rinse-Puffer aufgenommen und vorsichtig auf eine mit 1 ml Rinse-Puffer vorgewaschene, sich im Magnetfeld des Zellseparators befindliche Separationssäule (MS-Collumn) gelagert. Um Zellaggregate zu vermeiden wurden die Zellen über den Prä-Separationsfilter auf die Säule pipettiert.

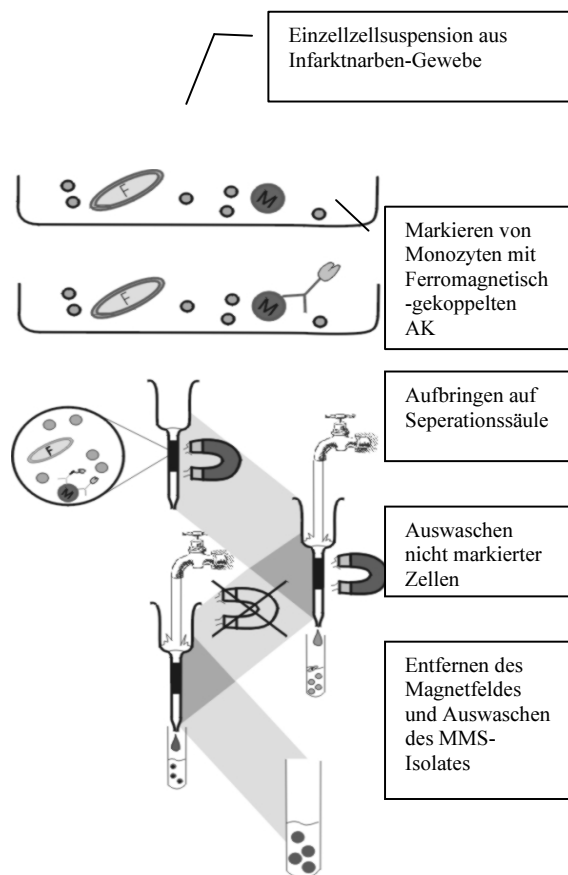


Abb 3.2: Schema MACS-Sortieren von MMS-Zellen: nach Antikörperinkubation wird die Gesamtlösung auf eine MACS-Säule aufgebracht: Waschschritte mit und ohne Magneten lösen zuerst die Restzellen und danach die Zielpopulation von der Säule
F = Fibroblasten, M = Makrophagen/MMS-

Nachdem die Zellsuspension durch die Säule gelaufen war, wurde die Säule jeweils bis zu sechsfach ein Milliliter Rinse Puffer gewaschen.

Der Durchfluss wurde als Restzellen-Fraktion zur Nachanalyse aufbewahrt.

Nach Abschluss des Waschvorganges wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, wieder mit einem Milliliter Rinse-Puffer beladen und mittels im Kit enthaltenen Kolben kräftig durch die Säule gespült.

Die im Durchfluss enthaltenen Zellen wurden sofort im FACS analysiert und danach je nach Verwendungszweck sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder für weitere Immunzytologische Analysen für die Cytospin-Fixierung aliquotiert.

3.2.2 Monozytenisolation aus Mausblut

Zur Isolation von monozytären Vorläuferzellen aus peripheren Blut wurde eine Maus zunächst mittels intraperitonealer Injektion heparinisiert und danach durch zervikale Überstreckung geopfert, nach Eröffnung und Durchtrennung der thorakalen Aorta wurde das Blut entnommen und in Heparin-Röhrchen zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Hierzu wurde das ursprüngliche Sample nach Aufnahme in 15 ml PBS:EDTA (4°C) auf eine Percollsäule mit der Dichte von 1,064 g/ml aufgelagert und zum Abtrennen von Erythrozyten und Granulozyten 20 min bei 600 g ohne Bremse zentrifugiert.

Die als Interphase zwischen PBS:EDTA und Percoll gelegene Schicht von angereicherten Lymphozyten und Monozyten wurde mit einer Pipette abgezogen und zweimal gewaschen, zunächst in einem Totalvolumen von 50 ml, dann 15 ml PBS:EDTA (bei 5 min bei 1500 rpm). Vor dem zweiten Zentrifugationsschritt erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Kammer, nach abgeschlossenem Waschvorgang wurden die Zellen in der Konzentration von 10^8 Zellen/ml aufgenommen, nach dem Schema in Tabelle 2.1 inkubiert und analog zu 2.2.3 magnetisch sortiert, analysiert und verwahrt.

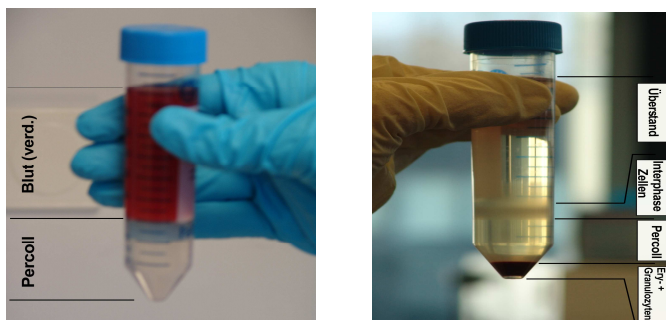


Abb. 3.3: Dichtezentrifugation von Zellsuspensionen zur Elimination von NG und Erythrozyten

3.4 Zell- und Gewebeanalyse

3.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, entwickelt in den 1960er Jahren von *Herzenberg* ist inzwischen eine grundlegende Methode in der Analyse und dem Sortieren von Zellen aus einer Einzelzell-Suspension.

Während des automatisierten Vorganges werden die Zellen mittels einer Kapillare angesaugt und passieren - durch die Flussdynamik im Zentrum der Kapillare fixiert - die Strahlen eines oder mehrerer Laser. Die optischen Eigenschaften der Zelle wie

Oberflächenstruktur oder intrazelluläre Granula zerstreuen die einfallenden Strahlen. Diese Streustrahlung wird optisch abgelenkt und einem Detektor zugeleitet, welcher die individuelle Streufähigkeit der Zelle als sogenannten „Sidescatter“ (SSC) registriert. Die nicht abgelenkte Strahlung wird hinter der Kapillare als „Forwardscatter“ (FSC) detektiert. Da der Forwardscatter nur dort registriert werden kann, wo sich kein Zellmaterial befunden hat, welches die Strahlen ablenkt, ist der FSC ein Indikator für die Zellgröße.

Zusätzlich zu dem SSC als Indikator für die Zellbeschaffenheit und FSC für die Zellgröße können einzelne Zellstrukturen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern opsoniert werden. Diese Farbstoffe werden je nach Absorptionsspektrum entweder vom Hauptlaser oder zusätzlich aktivierten Lasern in den entsprechenden Wellenlängen-Bereichen angeregt.

Das vom Farbstoff emittierte Licht wird durch eine Anordnung von Spiegeln und optischen Filtern geleitet, welche das Emissionsspektrum in seine einzelnen Spektralanteile aufsplittet und zu den entsprechenden Detektoren leitet.

Der zu jedem registrierten Partikel generierte Datensatz kann für die Gesamte Messung in einer Reihe von verschiedenen Graphen wiedergegeben werden.

Da die Messergebnisse durch eine Vielzahl von Variablen, wie Flussgeschwindigkeit, Antikörperkonzentration, gewählte Amplifikation der Einzelnen Detektoren, die eingestellte Spannung des Lasers oder die Höhe des Schwellenwertes beeinflusst werden, müssen die Messungen immer mit den entsprechenden Negativ-Kontrollproben durchgeführt werden.

Von den aufgereinigten Monozyten wurde jeweils eine Probe von 50 μl abgezweigt und zusammen mit den Kontrollproben im FACS analysiert. Hierzu wurden alle Proben in einem Milliliter PBS aufgenommen, die Auswertung erfolgte mit der Software *CellQuest Pro*.

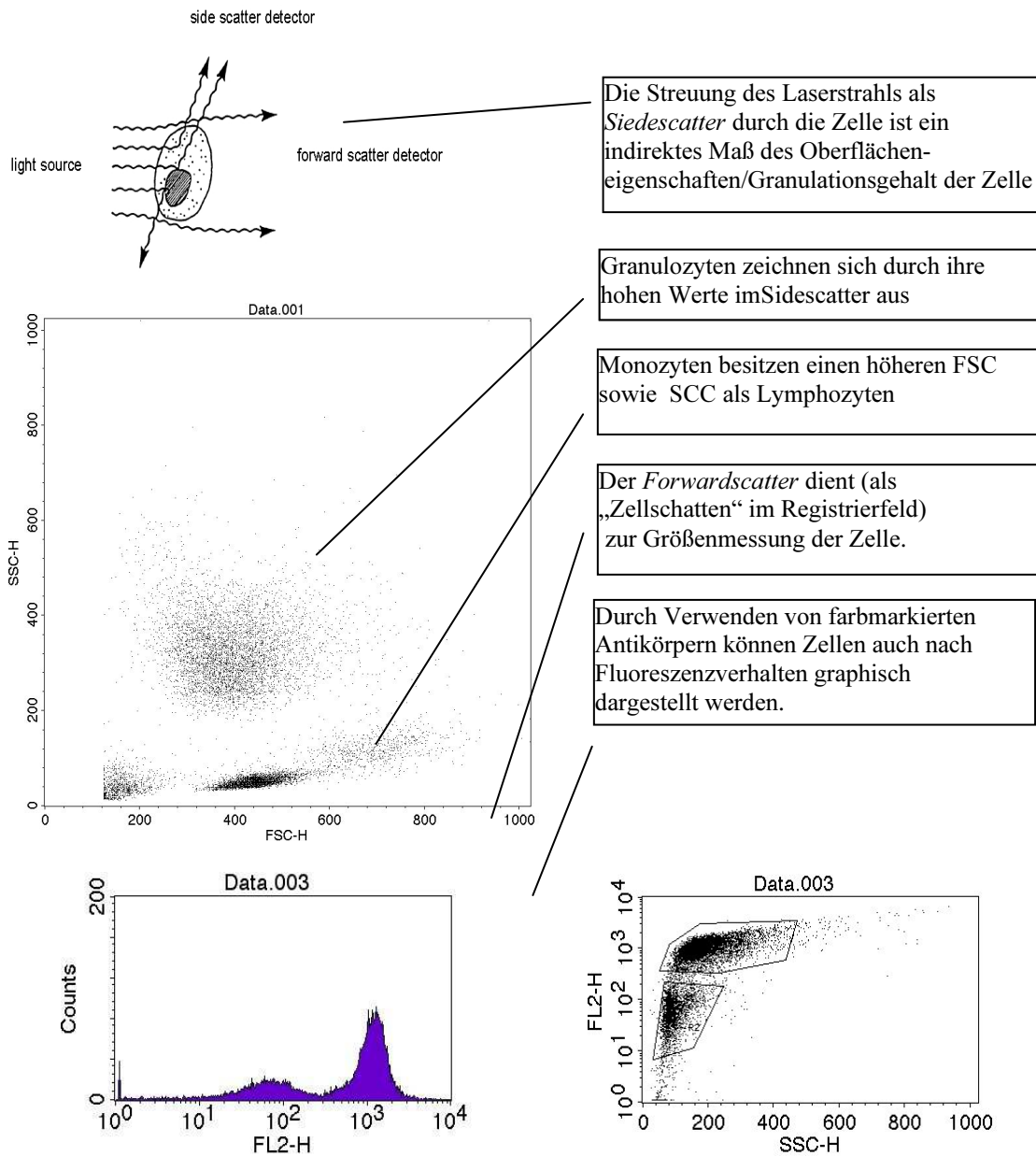


Abb. 3.4: Grundlagen der Fluoreszenz-Zytometrie

3.4.2 Cytospin®-Präparation

Um die FACS-Ergebnisse und damit den Aufreinigungserfolg der MMS-Isolation zu verifizieren wurde bei repräsentativen Isolationsvorgängen ein Teil des MMS-Isolates zur Cytospin-Analyse abgezweigt.

Die Cytospin®-Präparation ermöglicht das Fixieren einer Zellsuspension auf einem Objektträger und damit die immunzytologische Untersuchung unter dem Mikroskop. Hierzu wurden 10^5 Zellen in 0,5 ml PBS:EDTA gelöst und in die Cytospin®-Küvette pipettiert, nachdem diese mit einer Klammer an den beschichteten Objektträgern befestigt worden war. Zwischen Küvette und Objektträger befand sich ein Zellulosestreifen, welcher das überschüssige Lösungsmedium absorbierte. Nach Beladen der Küvette wurde diese in der Cytospin-Zentrifuge 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert.

Danach wurden die Objektträger mit den durch die Zentrifugalkraft an dessen Oberfläche fixierten Zellen entnommen und zur Fixierung für fünf Minuten in zehnprozentigen Paraformaldehyd (PfA) inkubiert. Danach wurden die Objektträger durch dreimaliges Eintauchen in frische PBS-Lösung für jeweils drei Minuten gewaschen und für die Immunzytologie weiterbearbeitet.

Vor Inkubation der Antikörper wurden die Präparate für 5 Minuten in einer 0,01 prozentigen Triton-X Lösung (Lösungsmittel PBS) inkubiert und durch dreimalige Inkubation in PBS für drei Minuten gewaschen.

3.4.3 Immunhistochemie und –zytologie

Die Auswertung der Cytospin-Präparationen als auch die Verifizierung von Zielgenen erfolgte mit immunmikroskopischen Methoden, wobei eine Kofärbung des Makrophagenmarkers F4/80 oder des Monozytenmarkers Cd11b mit einer Zielstruktur angefertigt wurde.

Die Aufbereitung für die Immunhistologie bzw. Immunzytologie unterschied sich nach Herkunft des Gewebes und dem verwendeten Antikörper. Während Cytospin-Präparationen immer mit PfA fixiert wurden und anschließend die Zellen permeabilisiert werden mussten (s.o.), wurden für die histologische Aufbereitung von Geweben drei verschiedene Fixationsmethoden alternativ verwendet, um für ein optimales Bindeverhalten des Antikörpers zu sorgen. Die empirisch ermittelte optimale Fixierungsmethode für Gewebeschnitte ist in Tabelle 3.2 angegeben. Nach der Fixierung erfolgte eine Farbmarkierung von Zellstrukturen mittels Antikörpern,

die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren. Bei der Immunfärbung werden direkt gekoppelte Antikörper, bei denen der Antikörper direkt an einen Farbstoff gebunden ist, von indirekten Verfahren unterschieden: Hier bindet zunächst ein Antikörper an eine Zielstruktur, danach wird ein zweiter Antikörper aufgebracht, der an den ersten Antikörper bindet und entweder selbst farbmarkiert ist oder an Biotin gekoppelt ist – bei der letzten Variante muss in einem dritten Inkubationsschritt ein Farbstoff zugegeben werden, welcher an Streptavidin gekoppelt ist. Durch die spezifische Bindung von Biotin zu Streptavidin wird die Zielstruktur nicht nur farblich markiert, sondern das Signal zusätzlich verstärkt.

Zur Aufbereitung von tiefgefrorenen Gewebeproben für die Immunhistologie wurde das Gewebe zunächst mittels Mikrotom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Dieser wurde anschließend in einer Fixationslösung inkubiert. Je nach verwendetem Antikörper bestand die Lösung entweder aus 4% Paraformaldehyd in PBS, 100% Aceton oder einer Mischung von Aceton und Methanol zu gleichen Teilen, wobei die Dauer der Inkubation bei Paraformaldehyd 5 Minuten betrug (Raumtemperatur) und bei den anderen beiden Methoden 10 Minuten (-30°C). Nach dem Fixationsvorgang wurden die Gewebeschnitte in PBS gewaschen.

Der Waschvorgang bestand aus dreimaligem inkubieren der Objektträger für drei Minuten in frischem PBS. Tendierte ein Antikörper zu einer starken unspezifischen Anfärbung wurden reaktive Gruppen nach Fixierung mit einer einprozentigen BSA-Lösung abgebunden, in welcher der Objektträger für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Die folgende Inkubation der Antikörper (siehe Tabelle) erfolgte stets in einer abgedunkelten feuchten Kammer entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Antikörpertyp	Primär-AK	Zweitantikörper	Streptavidin
Direkt-markiert	Individuelle	---	---
Markierter Sekundär-AK	Konzentration	Cy2: 1:100 Cy3: 1:300	---
Biotin- Streptavidin Bindung	1h/RT°C / üN (4°C)	Biotin 1:100	Cy2: 1:100 Cy3: 1:300
Abkürzungen: AK=Antikörper, üN = über Nacht			

Tabelle 3.3: Inkubationsschema Immunhistochemie

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde der Objektträger wie beschrieben gewaschen um unspezifische Anfärbungen zu minimieren. Nach abgeschlossener Antikörperfärbung erfolgte zuletzt die Kernfärbung mittels Inkubation in DAPI (Konzentration 1:1000 in PBS). Nach einem letzten Waschvorgang wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt. Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, zum Anfertigen von Mehrkanalbildern wurde derselbe Bereich mit unterschiedlichen Bandfiltern photographiert und die einzelnen Bilder mit dem Programm Adobe Photo-Shop™ graphisch überlagert.

3.5 Molekulargenetische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation aus Zellisolat

Zum Isolieren der gesamten zellulären RNA wurde eine modifizierte Biguanid-Methode verwendet. Das Prinzip beruht auf dem Zerstören der Membranintegrität und Denaturieren der Zellproteine der Probe durch ein lipidlösliches Agens auf Phenolbasis (Trizol®). Danach wird durch Zugabe von Chloroform eine Phasentrennung erreicht, wobei sich die RNA in der wässrigen Phase, die DNA in beiden Phasen löst. Schließlich wird die RNA durch Alkohole gefällt und anschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einem auf 4°C vorgekühlten Rotor, Bei allen Schritten wurden nur RNase-freie Pipettenspitzen verwendet.

Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation war entweder Gewebe (Ventrikel bzw. exzidiertes Infarktgewebe) oder ein Zellisolat.

Zum Isolieren der RNA aus Zellisolat wurde auf das frisch isolierte oder tiefgefrorene Zellpellet, welches sich in einem 2 ml Reaktionsgefäß befand zunächst 800 µl Trizol® pipettiert. Das Zellpellet wurde durch ständiges auf- und abpipettieren gelöst. Dieses Homogenisat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei Gewebe als Ausgangsmaterial wurde dieses in noch gefrorenem Zustand mittels Handmörser mechanisch zerkleinert. Hierzu wurde der Mörser mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die noch gefrorenen Gewebeteile wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem sich eine Mörserkugel befand und gleich darauf das Trizol zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit der Mixer-Mill 2 Minuten bei 20000 Hz homogenisiert.

Zu diesem Homogenisat wurde 200 µl Chloroform addiert, die Mischung 15 Sekunden im Vortex durchmischt und danach unter ständigem schwenken 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Trizol®/Chloroform-Gemisch wurde daraufhin 15 Minuten bei 12.000 rpm (Kühlzentrifuge „Centrifuge 5415D“) zentrifugiert, worauf sich im Reaktionsgefäß zwei Phasen bildeten. Die obere, die Nukleinsäuren enthaltende wässrige Phase, wurde mittels 200 µl Pipette abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Belassen wurde die weißliche Intermediärphase, welche zusammen mit der lösungsmittelhaltigen unteren Phase verworfen wurde.

Zum Ausfällen der Nukleinsäuren wurde 400 µl Isopropanol hinzugegeben, durch Invertieren vermischt und bei 12.000 rpm 10 Minuten in der Zentrifuge präzipitiert.

Die während des Zentrifugationsvorgang sichtbar ausgefallenen Nukleinsäuren waren als weißliches Pellet am Boden des Reaktionsbehälters zu sehen. Die darüber

befindliche Isopropanolphase wurde verworfen und mit 800 µl 75-prozentiger Ethanol­lösung gewaschen.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über fünf Minuten bei 9000 rpm wurde der Überstand abermals verworfen und das gewaschene Pellet für 5 Minuten bei Raumtemperatur in der Luft getrocknet.

Um das verbleibende, lösungsmittelfreie Nukleinsäurepellet in Lösung zu bringen, wurde es unter in DEPC-Wasser resuspendiert, wonach das Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 55°C im Thermomixer geschüttelt wurde.

Die Menge an verwendetem DEPC-Wasser Richtete sich nach der angestrebten Endkonzentration und dem verwendeten Ausgangsmaterial (s. Tabelle).

Ausgangsmaterial	Weitere Verwendung	Angezielte Konzentration [ng/µl]	Lösungsvolumen
Gewebe (Myokard/Infarkt)	Microarray	150+	50 µl
Zellisolat	PCR	100-150	40 µl
Zellisolat	Microarray	300+	25 µl

Tabelle 3.4.: Zielkonzentrationen für RNA-Lösungen nach Ursprung und Applikationstyp

Nach Resuspendieren der Nukleinsäuren wurde vor dem Verdau der verbleibenden DNA eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen (siehe 4.5.4), um eine verbleibende Kontamination durch Salze oder Lösungsmittel auszuschließen.

3.5.2 DNA-Verdau

Zum Entfernen von kontaminierender DNA wurde ein DNase Verdau (DNA-free kit) durchgeführt.

Substanz	Menge
DNase Puffer	10% Gesamtvolumen
Inactivation Reagent	10% Gesamtvolumen
DNase	1 µl

Tabelle 4.5.: Einsatzmenge DNA-free kit

Aus dem Kit, bestehend aus zwei Puffern (TURBO DNase Puffer und Inactivation Reagent) und der Enzymlösung, wurden zuerst der DNase Puffer und danach das Enzym in der entsprechenden Menge zur Nukleinsäure-Lösung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 30 Minuten im Thermomixer geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion wurde danach das Inactivation-Reagenz hinzugefügt, durch Schütteln des Reaktionsgefäßes 90 Sekunden vermischt und das Inaktivationsreagenz danach durch Zentrifugation bei 12.500 rpm (Zentrifuge Eppendorf 5402) pelletiert.

3.5.3 Salzpräzipitation

Die Natriumacetatfällung von Ribonukleinsäuren fand Verwendung bei der Aufreinigung von RNA-Proben mit unzureichender Reinheit, dem zusammenführen zweier verschiedener Proben sowie der Konzentrierung einzelner Proben. Bei der letzten Applikation erfolgte die Resuspendierung in einem geringeren Volumen.

Dabei wird die gelöste RNA durch Zugabe von Ethanol und Natriumacetat ausgefällt und mittels Zentrifugation zu pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes und Trocknen der Reinsubstanz erfolgt die Wiederaufnahme in einer beliebigen Menge RNase freien Wassers.

Zur RNA-Lösung wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol sowie 10% des Volumens dreimolare Natriumacetat-Lösung zugegeben. Nach Durchmischung wurde die Lösung für 20 Minuten bei -20°C inkubiert, um eine Fällung zu ermöglichen und danach für fünf Minuten bei 12.500 rpm in der Kühlzentrifuge pelletiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet durch Aufschichtung von 70-prozentigen Ethanol mit anschließender Zentrifugation (12500 rpm für fünf Minuten) gewaschen.

Nach Abnahme des Überstandes und Lufttrocknung für 15 Minuten wurde das Pellet in einer adäquaten Menge RNase freiem Wassers aufgenommen, um die angestrebte Endkonzentration zu erreichen. Zur Erfolgskontrolle wurde anschließend die Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop bestimmt.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf ihrer Absorption von Strahlung mit der Wellenlänge von 260 nm. Mit einem Spektralphotometer kann die Absorptionsdifferenz zwischen einer Küvette mit RNase freiem Wasser und der RNA-Lösung ermittelt werden. Ein Anstieg der Absorption bei 260 nm Wellenlänge ist hierbei proportional zum RNA-Gehalt der Lösung. Die genaue Konzentration kann mit der Lambert-Beer'schen Gleichung errechnet werden; für RNA-Lösungen wird ein Extinktionskoeffizient von 25(mg/ml/cm) benutzt.

Da Verunreinigungen von Lösungsmitteln oder Proteinen ebenfalls eine Absorption bei 260 nm zeigen, wird zur Bestimmung der Reinheit von RNA-Präparationen zusätzlich die Absorption bei 230 und 280 nm gemessen. Während bei reinen Präparationen nur wenig Absorption vorhanden sein sollte, absorbieren kontaminierende Stoffe hier stark.

Den Grad der Reinheit kann man durch die Koeffizienten, die aus dem 260 nm Wert und den Werten bei 230 oder 280 nm gebildet werden abschätzen, wobei die Werte der Koeffizienten für ausreichend reine Proben bei oder über 2 liegen sollten. Liegt eine signifikante Kontamination vor, so muss die Probe verworfen oder ggf. weiter aufgereinigt werden, da die kontaminierenden Substanzen einerseits weitere Reaktionen beeinflussen können, in jedem Fall aber die gemessene Konzentration der RNA (nach oben) verfälschen, was Einfluss auf alle weiteren Verfahren hat, bei denen die exakte Menge der verwendeten RNA wichtig ist.

Das von uns verwendete Gerät lieferte zuverlässige spektralphotometrische Analysen (s. Abbildung) bei einer routinemäßig eingesetzten Menge von 2,5 µl.

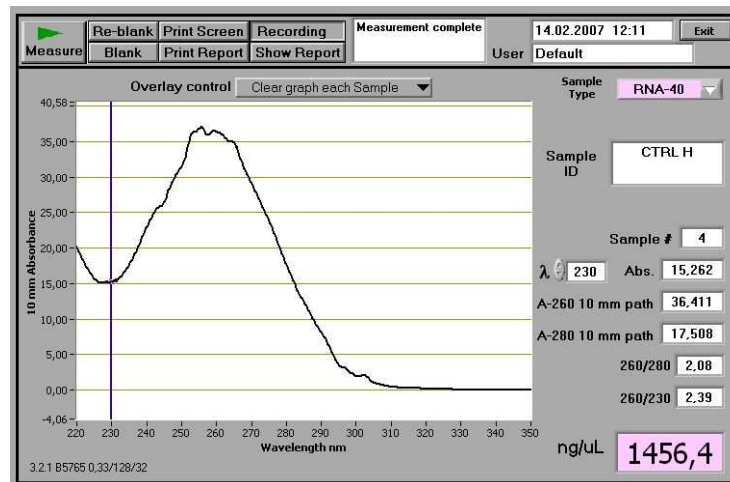


Abb. 3.5: Auswertung einer Probe nach RNA-Isolation. Wie an der Absorptionskurve erkennbar ist handelt es sich um eine gut aufgereinigte RNA-Probe ohne Rückstände von Lösungsmitteln oder Proteinen.

3.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die von *Mullis* 1982 entwickelte Technik zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte [105] nutzt die als DNA-Schmelzpunkt bezeichnete Eigenschaft der DNA-Doppelhelix, ab einer bestimmten Temperatur in seine Einzelstränge zu zerfallen, was eine Amplifikation möglich macht. Da die verwendete hitzestabile DNA Polymerase (taqPolymerase) nur bereits bestehende Nukleinsäure-Ketten verlängert, wird der Reaktion jeweils ein Überschuss an kurzen DNA-Ketten (Primer) zugegeben, die an Sequenzen zu Anfang und Ende des DNA-Abschnittes liegen, welcher amplifiziert werden soll. Nach erstmaligem Denaturieren der DNA wird die Temperatur auf 55°C reduziert. Die Temperatur liegt somit oberhalb des Schmelzpunktes für lange DNA-Ketten, ermöglicht jedoch bereits das binden der Primer. Die taqPolymerase verlängert an den 3'-Enden der Primer die Nukleinsäurekette, bis die Temperatur wieder angehoben wird und die neugeformte Doppelhelix einschmilzt. Danach wird die Temperatur wieder gesenkt, was einen weiteren Amplifikationsschritt ermöglicht. Nach 45 dieser Zyklen liegt der zwischen den Primern gelegene Abschnitt der DNA in einer hohen Kopienanzahl vor und kann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

3.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Substanz	Menge
Agarose	0,35g
TBE	35ml
Ethidiumbromid	1,5 µl
Probe	3 µl DNA-Ladepuffer + 10 µl Probenmaterial
DNA-Marker	6 µl DNA-Marker pro Tasche

Tabelle 3.6: Agarose Gelelektrophorese

Nach Auflösen der Agarose in TBE unter Erhitzung in der Mikrowelle erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid, worauf das Gel in die Kammer gegossen wurde. Nachdem das Gel abgekühlt und der Kamm entfernt worden war, wurden die zurückbleibenden Taschen mit DNA und Ladepuffer bzw. Längenmarker befüllt. Die Elektrophorese wurde durch Anschluss eines Transformators unter einer Spannung von 60 – 80 V in Gang gesetzt

3.5.7 Reverse-Transkriptase PCR

Als Voraussetzung für die Expressionsanalyse in der Realtime-PCR dient das Verfahren zum Umschreiben der Messenger-RNA zurück zur DNA. Verwendet wird als Enzym die Reverse Transkriptase, es wird ein unspezifischer Poly-Thymin Primer verwendet, um das Umschreiben am Poly-A Ende der mRNA zu beginnen. Ferner wird lediglich ein einziger Erhitzungszyklus eingesetzt - am Ende des Vorgangs besitzt man ein 1:1 (Intron-freies) DNA-Transkript der eingesetzten RNA-Probe.

DNA-Entfernung			Inkubation	RT-Ansatz		Inkubation	
	RNA-Probe						
2µl	DNA	Total 14µl	2 min/ 42°C	1 µl	RTase	15min/ 42°C	3min/ 95°C
	Wipeout Puffer			4 µl	RT-Puffer		
H2O (RNase frei)	1µl			Primer Mix			
	14µl	Template- RNA					
Abkürzungen: RTase=Reverse Transkriptase,							

Tabelle 3.7: Inkubationsschema RT-PCR; Reverse Transkriptase (RTase)

3.5.8 Real-Time PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) ist ein auf der konventionellen PCR basierendes Verfahren, bei dem das amplifizierte DNA-Produkt durch einen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht und während der Replikationszyklen in Echtzeit ausgelesen wird. In unseren Experimenten kamen zwei modifizierte Verfahren zum Einsatz: die SYBR Green Real-Time PCR und die TaqMan Real-Time PCR. Das erste Verfahren nutzt den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, welcher sich in der Helixstruktur der DNA einlagert und dann durch Licht mit der Wellenlänge von 497 nm angeregt werden kann – das emittierte und detektierte Spektrum liegt bei 520 nm Wellenlänge.

Der Taq Man Ansatz basiert auf einer vorgefertigten Sonde, welche einen Fluoreszenzfarbstoff sowie einen sog. „Quencher“ enthält, der die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes unterdrückt. Wird im Verlauf der PCR die Kette des Produktes erstellt, lagert sich die Sonde an den wachsenden Strang an, worauf die 5' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase den Farbstoff von Sonde und Quencher entfernt, wodurch dieser seine Fluoreszenzeigenschaft entfaltet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Fluoreszenzaktivität nur mit der Menge des fertigen Produktes zunimmt, was das Verfahren vereinfacht, da man – im Gegensatz zum SYBR Green Ansatz – auf eine Schmelzkurvenanalyse verzichten kann, die das Fluoreszenzverhalten von unfertigem PCR-Produkten herausrechnet.

3.5.8.a Versuchsaufbau Real-Time PCR

Zur Verifizierung der durch die im Microarray gewonnenen Expressionsparameter untersuchten wir die ermittelten Zielgene zusätzlich semiquantitativ in der RT-PCR. In unseren Versuchen verglichen wir die Expression von Zielgenen des MMS-Isolates (MMS/MAC) analog zu den Microarrayversuchen mit Kontrollen aus gesundem Ventrikelgewebe (LV), Infarkt Narbe (MI), wobei sowohl für die Zellisolate als auch für Infarktgewebe eine erneute Serie an Infarktmäusen operiert wurde. Als zusätzliche Kontrollen nutzten wir außerdem monozytäre Vorläuferzellen, welche aus Mausblut isoliert wurden („MonoB“, siehe auch 4.3.2), sowie Gewebeproben aus der Borderzone des Infarkts (BZ). Die Expressionsdifferenzen wurden relativ zueinander ermittelt (relative Quantifizierung, RQ).

3.5.8.b Durchführung der Real-Time PCR

Je nach Zielgen verwendeten wir entweder den SYBR-Green Ansatz zur RT-PCR oder den TaqMan Kit, bei dem bereits ein Satz aus getesteten, jedoch von der Sequenz unveröffentlichten Primern vom Hersteller bereitgestellt wird. Die Primer für den SYBR-Green Ansatz wurden mit dem Internethilfsmittel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) erstellt.

Die Arbeiten beim Ansetzen der Real-Time wurden unter einer PCR-Werkbank durchgeführt, wobei alle Proben bis zur PCR auf Eis gelagert wurden. Für beide PCR-Techniken wurde ein Master-Mix erstellt, welcher die Primer, nicht aber die cDNA enthielt. Diese wurde als letztes zugegeben, nachdem der Master Mix in dreifacher Ausführung auf die Anzahl der Proben in Eppendorf-Tubes aufgeteilt worden war. Nach Durchmischen in einem Kreisschüttler wurden die Ansätze auf 96-Well Platten aufgebracht, mit Haftfolie luftdicht verschlossen und bei 4°C und 1000 rpm abzentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen, welche die Fluoreszenzmessung stören könnten.

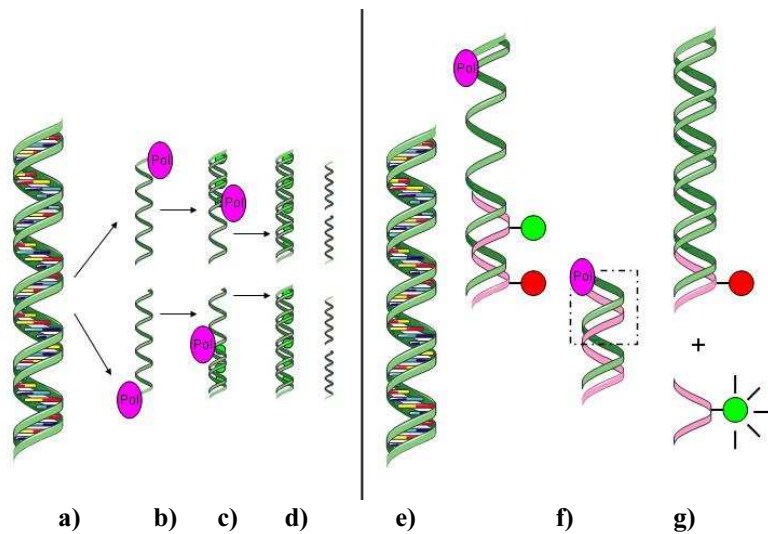


Abb 3.6: SYBR-Green Real-Time PCR; nach dem Schmelzen der original-DNA (a) werden die komplementären Stränge durch die taqPolymerase hergestellt (b). In den entstehenden Doppelstrang lagert sich ein interkalierender Farbstoff ein (grün) (c). Die Leuchtintensität nimmt mit der amplifizierten DNA-Menge zu bis diese zum nächsten Zyklus wieder aufgeschmolzen wird(d).

Abb 3.7: Beim der Taq-Man Real-Time PCR befindet sich im Ansatz eine DNA Sonde, welche mit Farbstoff (grün) und einem Quencher (rot) gekoppelt ist (e) der Quencher verhindert die Fluoreszenzaktivität des Farbstoffes. Trifft die TaqPolymerase bei der Erstellung des Komplementärstranges auf die Sonde (f), so wird durch eine intrinsische Exonuklease-Aktivität, der Farbstoff vom Quencher getrennt (g) – Eine Fluoreszenzzunahme wird registriert.

Ansatz SYBR-Green-Real Time PCR	
0,5 µl	Vorwärts Primer
0,5 µl	Rückwärts Primer
12,5µl	SYBR® Green PCR Master Mix
10,5µl	Aqua B. Braun

Ansatz TaqMan-Real Time PCR	
1,25 µl	TaqMan Kit
10,25µl	Aqua B. Braun
12,5 µl	TaqMan® Universal PCR Master Mix
1 µl	cDNA

Tabelle 3.8: Ansatz für Taq-Man und Sybr-Green qRT-PCR

Bei der Verwendung des SYBR-Green Ansatzes wurde zusätzlich eine Schmelzkurve angelegt, um Verunreinigungen des Amplifikates ausschließen zu können.

Zykluseinstellung der Real-Time PCR			
Amplifikation			
Temperatur	Dauer		
50°C	2 Minuten	Aktivierung der AmpErase® UNG	
95°C	10 Minuten	Aktivierung der DNA-Polymerase	
95°C	15 Sekunden	Denaturierung	x 40 Zyklen
60°C	1 Minute	Annealing	
Schmelzkurvenanalyse			
95°C	15 Sekunden		
60°C	1 Minute		
95°C	15 Sekunden		
60°C	15 Sekunden		

Tabelle 3.9: Zykluseinstellung qRT-PCR

3.5.8.c Auswertung der Real-Time PCR

Die Auswertung der Messungen erfolgte durch die Gerätesoftware des SDS7500 Systems von Applied Biosystems, welche die Parameter für Grundlinie und Schwellenwert selbständig ermittelte, um dann die Quantifizierung der einzelnen Proben relativ zueinander durchzuführen und die Unterschiede als Fold-Change (FC) anzugeben.

Diese als relative Quantifizierung bekannte Berechnungsmethode der RNA-Menge bzw. Genexpression basiert auf dem von *Pfaffl et al. etablierten Berechnungsalgorithmus* [106], wobei Unterschiede in der eingesetzten RNA-Menge durch Normalisierung mit dem Gen Hypoxanthin-Guanin Phosphorybosyltransferase 1 (HPRT1) herausgerechnet wurden. Einem Kontrollgewebe wurde hierbei der Wert FC=1 zugewiesen, in unserem Falle dem Expressionsniveau in der Infarktnarbe

(„MI“), die Expressionswerte aller anderen Gewebeproben wurden folglich als ein Vielfaches bzw. Bruchteil der im Infarkt detektierten Expression eines bestimmten Genes ausgegeben.

Die graphische Darstellung erfolgte durch die Statistiksoftware Graph Pad Prism 4.0. (siehe 4.6)

3.5.9 Microarray (Affymetrix GeneChip™)

3.5.9.a Prinzip der DNA-Microarray-Technologie

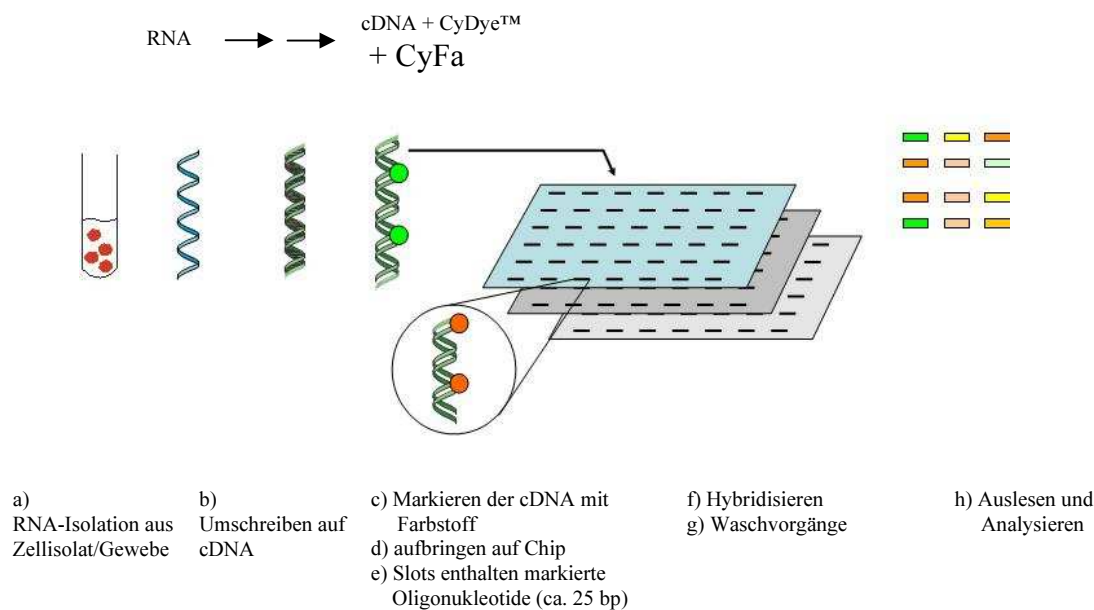


Abb 3.8: Das Microarray-Prinzip

Die Technologie der Expressionsanalyse mittels DNA-Microarray ist eine Weiterentwicklung des Southern-Blot Verfahrens; farbmarkierte DNA wird hybridisiert und das entstehende Farbsignal ausgelesen. Durch die Festphasen-Fixation tausender DNA-Sonden auf mikroskopischen Slots („spottet array“) einer

Glas- oder Silikonplatte kann so die Expression eines ganzen Genoms in einem Arbeitsgang analysiert werden.

Festphasen-Arrays unterscheiden sich untereinander im Wesentlichen in der Detektionsmethode. Bei der Zweikanal-Detektion werden zwei unterschiedliche DNA-Proben (mit unterschiedlicher Farbmarkierung) auf einen Chip aufgetragen – das detektierte Farbsignal gibt an, wie stark sich die Expression eines Genes zwischen den beiden Proben unterscheidet.

Die von unserem System genutzte Einkanal-Detektion analysiert dagegen lediglich eine Probe pro Chip, wobei die detektierte Signalstärke durch die Menge der sich auf dem Chip befindende cDNA standardisiert wird und so mit anderen Chip-Datensätzen verglichen werden kann (sofern diese aus derselben Charge stammen).

Die nach Reverse-Transkriptase-Reaktion gewonnene und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA wird auf den Microarray aufgebracht und hybridisiert mit den dort fixierten DNA-Sonden. Nicht durch Hybridisierung gebundene DNA wird durch Waschvorgänge entfernt und das Fluoreszenzsignal der Slots ausgelesen.

Zur Erstellung eines Microarrays muss zunächst die mRNA einer Gewebeprobe gewonnen werden. Nach Prüfung von deren Integrität mittels elektrophoretischer Analysen (Bioanalyzer) erfolgt das Umschreiben durch Reverse-Transkriptase-Reaktion Intensität der beiden auf dem Slot befindlichen Fluorochrome zusammen, welche proportional zur DNA-Menge ist. Da in der Einkanalmethode die Menge der Sonden-DNA standardisiert ist, können die Expressionsergebnisse unterschiedlicher Proben bzw. Arrays miteinander verglichen werden.

3.5.9.b Durchführung der Microarray-Analysen

Die Microarray-Analyse der von uns gewonnenen Proben wurden durch die Firma MFT Services, Tübingen durchgeführt, wobei das System *Affymetrix GeneChip®*

Mouse Genome 450 2.0 verwendet wurde. Auf dem Microarray wurde die Expression von über 39000 Genen registriert. Durch die redundante Array-Konstruktion, bei der mehrere Array-Slots einem Gen zugeteilt sein können lieferte der Chip letztendlich eine Gesamtmenge von 34000 verschiedenen Genen.

3.5.9.c Auswertung der Microarrayergebnisse

Da wir um Falschergebnisse zu minimieren für jede unserer zu vergleichenden Gewebeproben mehrere Kontrollen auswerteten, erhielten wir eine Summe von insgesamt 8 Microarray-Datensätzen (Siehe Tabelle). Die Datensätze wurden für jede Kategorie gemittelt und anschließend miteinander verglichen, wobei nur signifikant regulierte ($p < 0,05$) Messergebnisse berücksichtigt wurden.

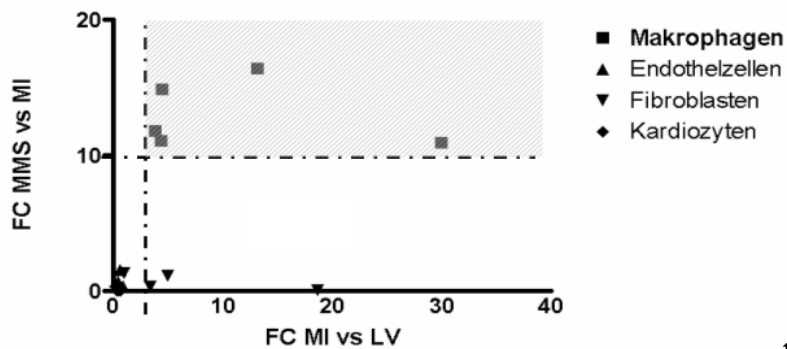
Array-Design		Parameter nach Expressionsabgleich	
LV Maus	3 Arrays linker Ventrikel, Sham-OP (Eine Maus/Array)	MI vs LV	Vergleich der Expression Infarkt Narbe gegen gesunden Ventrikel
MI-Maus	3 Arrays aus dem Infarktgebiet (Eine Maus/Array)	MMS vs LV	Monozyten/Makrophagenisolat gegen gesunder Ventrikel
MMS	2 Proben MMS-Isolat aus dem Infarktgebiet (jeweils 21 bzw. 13 Mäuse/Array)	MMS vs MI	MMS-Isolat gegen
insgesamt	8 Microarray-Datensätze		

Tabelle 3.10: Arraydatensätze und Ausgabeparameter. Bei Bioanalyseruntersuchungen der Firma MFT zeigten sich bei Array-RNA 3 (Siehe Tabelle 4.1) eine mindere Integrität des Materials, weshalb auf eine Microarrayuntersuchung dieser Probe verzichtet wurde.

Bei konventionellen Expressionsanalysen mittels Microarray werden üblicherweise nur identische Gewebetypen miteinander verglichen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Da es sich bei unseren Proben um strukturell völlig unterschiedliche Gewebeproben bzw. im Fall der MMS-Isolate sogar um eine pelletierte Zellsuspension handelte, entwickelten wir zwei Auswertungsalgorithmen, durch die wir die im MMS regulierten Gene im Array entdecken und verifizieren konnten:

Der erste Detektionsalgorithmus orientierte sich an Genen, von welchen bereits bekannt war, dass sie von Makrophagen spezifisch exprimiert werden. Zum Vergleich wurden Gene ermittelt, die von den anderen Zellen im Myokard bzw. Infarkt exprimiert werden (detaillierte Liste und Parameter siehe Appendix 10.2). Als wesentliche Zelltypen wurden die Markerstrukturen von Herzendothelzellen, Fibroblasten, Kardiozyten und Granulozyten verwendet. Anhand dieser Gene wurden Expressions-Schwellenwerte ermittelt, welche ein in Makrophagen exprimiertes Gen überschreiten musste: Das betreffende Gen musste zunächst im Infarkt mindestens um den Faktor 2 stärker exprimiert sein als im gesunden Ventrikel und im MMS-Isolat um den Faktor 10 im Vergleich zum Myokardinfarkt.

Markerpanel – positive Selektion



Bereich	Bewertung
	Exprimiert in Infarkt-Macrophagen
	Expressionsbereich andere Zellen zB Fibroblasten
	Im Infarktbereich nicht signifikant exprimiert
	Fehler

Markerpanel – negative Selektion

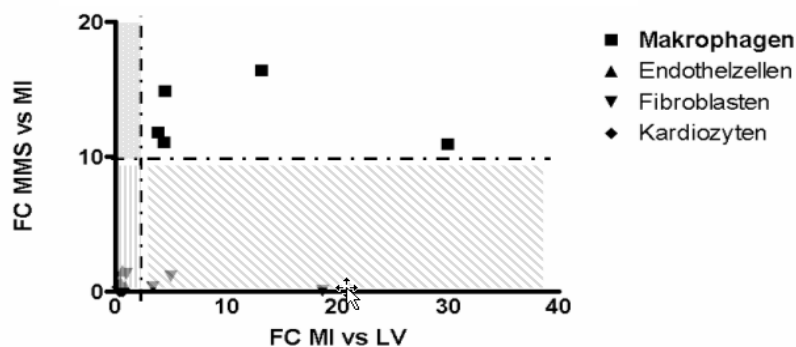
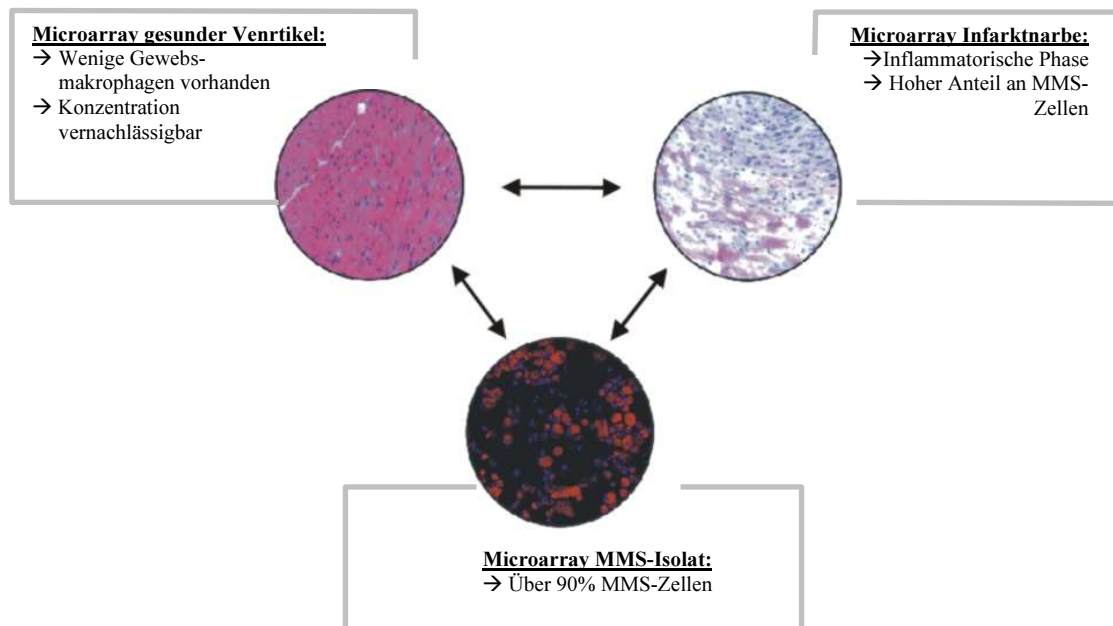


Abb 3.9: Auswertungsalgorithmus zur Bestimmung von MMS-spezifischen Expressionsmustern im Microarray. Die Schwellenwerte wurden durch Beobachtung spezifischer Mustergene ermittelt.

Der zweite Auswertungsalgorithmus behandelte alle Proben bzw. deren Arrayergebnisse wie Gewebe mit unterschiedlich hohem Monozyten-/Makrophagengehalt. Dabei enthält gesunder linker Ventrikel nur vereinzelt Gewebemakrophagen, im Myokardinfarkt während der inflammatorischen Phase stellen die Makrophagen die größte Zellpopulation und das Zellisolat besaß einen MMS-Anteil von über 90%. Folglich wurde nach Algorithmus 2 ein Gen lediglich dann als im MMS-reguliert akzeptiert, wenn seine Expression im Infarkt höher war als im gesunden Ventrikel und im MMS-Isolat höher als im Infarkt. Diese Kontrolle sollte davor schützen, fehlerhafte Arrayergebnisse mit in die Auswahl aufzunehmen, welche im MMS-Isolatarray signifikant heraufreguliert erscheinen, im Infarkt jedoch nicht exprimiert werden (analog zum „Fehler“ – Bereich in Abb. 4.9)



Kontrollalgorithmus für MMS-Zielgene:

Expression

Algorithmus Absolutwerte:

MMS > MI > LV

Algorithmus Foldchange-Differenzen

MMSvsLV > MivsLV > MMSvsMI

Abb 3.10: Der zweite Selektionsalgorithmus. Das MMS-Isolat wird wie ein Gewebe behandelt – es ergibt sich eine absteigende Zelldichte welche sich im Transkriptionsprofil der Makrophagengene widerspiegelt.

Zur Auswertung der Microarray-Ergebnisse nach Genen welche von Makrophagen und Monozyten spezifisch exprimiert wurden wurde schließlich folgender Gesamtalgorithmus angewandt:

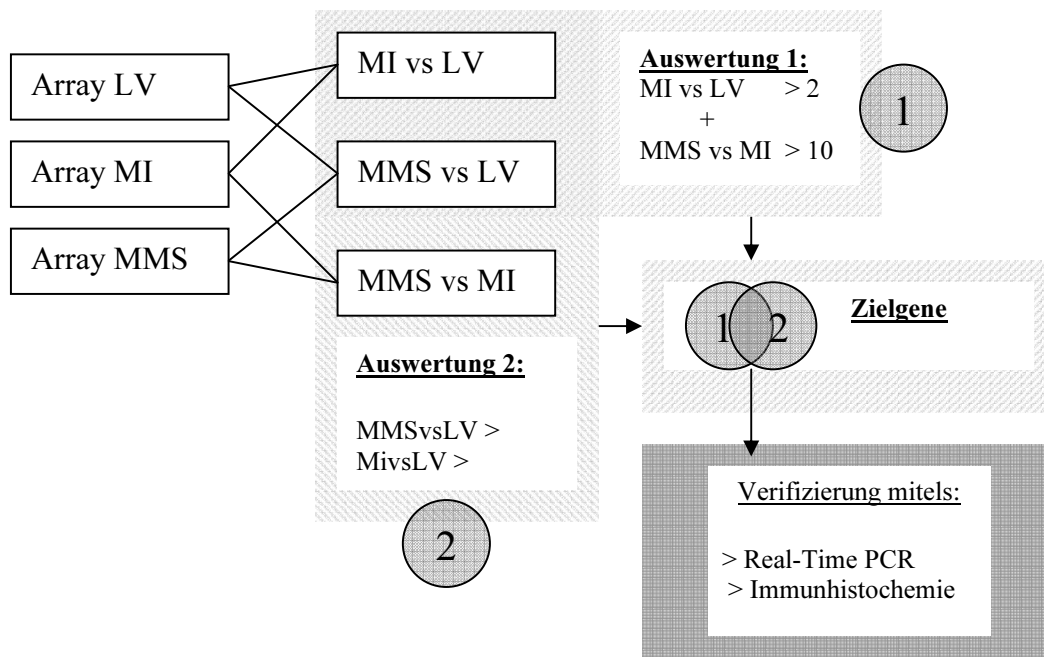


Abb 3.11: Gesamtalgorhytmus MMS-spezifische Expression. Für den Fall daß Kriterien für Punkt 1 jedoch nicht Punkt 2 erfüllt waren wurde das Zielgenen unter Vorbehalt als MMS-spezifisch akzeptiert und gesondert überprüft.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.00. Verglichen wurden jeweils die qRT Ergebnisse von MI (Myokardinfarkt), LV (Kontrolle gesunder Ventrikel), MMS (Makrophagenisolat) sowie BZ (Blutmonozyten) untereinander.

Tests auf das Vorliegen einer statistischen Normalverteilung erfolgten nach D'Agostino und Person. Die Varianzanalyse zwischen den zu untersuchenden Gruppen erfolgte mittels ANOVA (Analysis of Variance). Signifikante Messungen wurden mittels Bonferroni's multiple comparison Test miteinander verglichen, Die Schwelle für statistische Signifikanz lag bei $p < 0.05$. Die die Auswertung der Graphen erfolgte durch Angabe der Mittelwerte sowie Darstellung des Standardfehlers, im Falle von relevanten Diskrepanzen wurden Standartabweichung und -fehler angegeben.

Die Ausgabe der Affymetrix Microarrayergebnisse erfolgte als Signalintensität, die Varianzanalyse und Normalisierung wurde von MFT Services unter Verwendung des Affymetrix microarray Suite Algorithmus (MAS) durchgeführt. Messwerte, welche unter dem vom Algorithmus berechnete Schwellenwert für signifikante Signalintensitäten (Detection p-value) lagen, wurden als nicht signifikant registriert und nicht verwertet. Bei Überschreitung der durch den Algorithmus post-hoc errechneten Signalschwelle wurde die Messung als signifikant gewertet. Die Ausgabe der Signalintensität erfolgte als arithmetisches Mittel der Messergebnisse von den verschiedenen Chipsätzen für das jeweilige Gen unter Angabe der Anzahl an signifikant gewerteten Messungen (maximal acht).

Die Signalintensitäten wurden als Absolutwerte sowie relativ zueinander als Foldchange aufgetragen, wobei lediglich Datensätze mit 3 oder mehr signifikanten Messungen für weitere Auswertungen berücksichtigt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Erfolgskontrolle des Infarktmodells und der Zellisolation

4.1.1 Initial über 90% Überleben und charakteristische histologische Veränderungen nach operativem Myokardinfarkt

Von den Mäusen, denen die LAD ligiert wurde, überlebten initial über 90% (siehe Abbildung 5.1). Unsere HE-Färbungen entsprachen dem aus der Literatur bekannten klassischen Ablauf der Infarktheilung mit Zelldebris und Leukozyteninfiltrat nach zwei Tagen, Granulationsgewebbildung innerhalb von fünf Tagen und Ausdünnung einer zunehmend fibrotischen Narbenplatte nach Ablauf von 10 Tagen (Abbildung 5.2) [39].

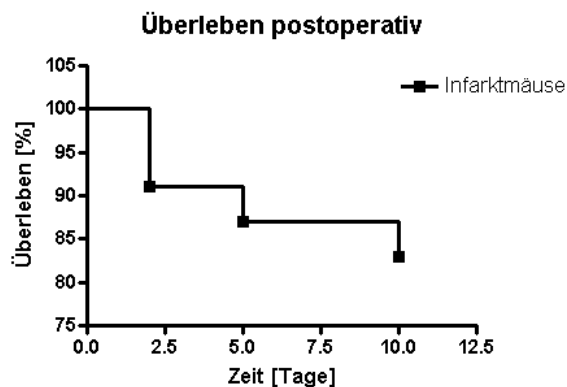


Abb. 4.1: Kaplan-Meyer Kurve Überleben der Mäuse nach Ligatur der LAD. Nach Zwei Tagen waren 9% der Mäuse verstorben.

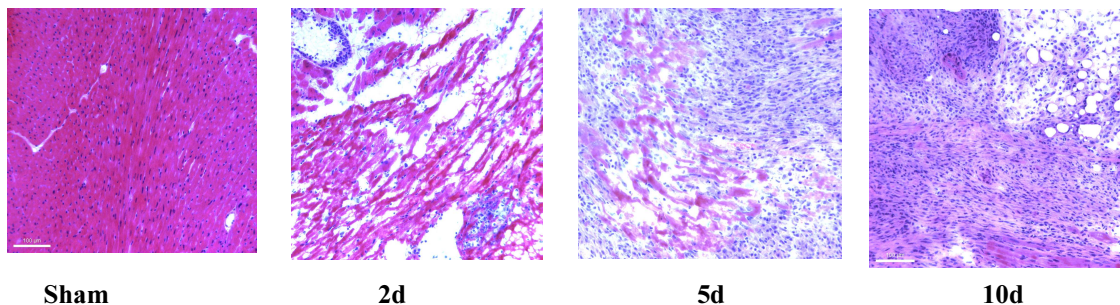


Abb. 4.2: Charakteristischer Verlauf eines operativ induzierten Myokardinfarktes in der Maus (HE-Färbung)

4.1.2 Aufreinigung des MMS-Isolates auf 90 Prozent

Der Erfolg der Monozyten und Makrophagenisolation wurde durch FACS-Analyse des Markers Cd11b, Cytospin-Präparationen und der Expressionsanalyse des erstellten Microarray verifiziert. Hierbei zeigte sich hochgradiger Aufreinigungserfolg in den beiden ersten Methoden und ein charakteristisches Expressionsprofil der Marker in der Datenauswertung der Microarrays

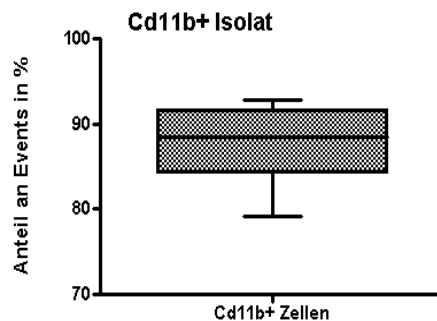


Abb 4.3: Cd11b-Aufreinigung: Anteil der Cd11b+ Events in der Auswertung des MMS-Isolates mit sehr niedriger Detektionsschwelle

4.1.2.a Verifikation des Isolationserfolges mittels FACS-Analyse

Die FACS-Analysen von Proben der Zellsuspension vor der Isolierung, des Isolates und der restlichen Zellen (nach Depletion der MMS-Zellen) zeigt eine durchschnittliche Aufreinigung der Cd11b-positiven Zellen auf 87,49% aller registrierten Events (Abb5.3), wobei unter Berücksichtigung der Events mit der Größe von Erythrozyten und Zelltrümmern (DNA-freie Partikel, welche keine Verunreinigung für folgenden Versuchsablauf darstellen) unter Schwellenkorrektur ein sogar noch höherer Aufreinigungsgrad zustande kommt.

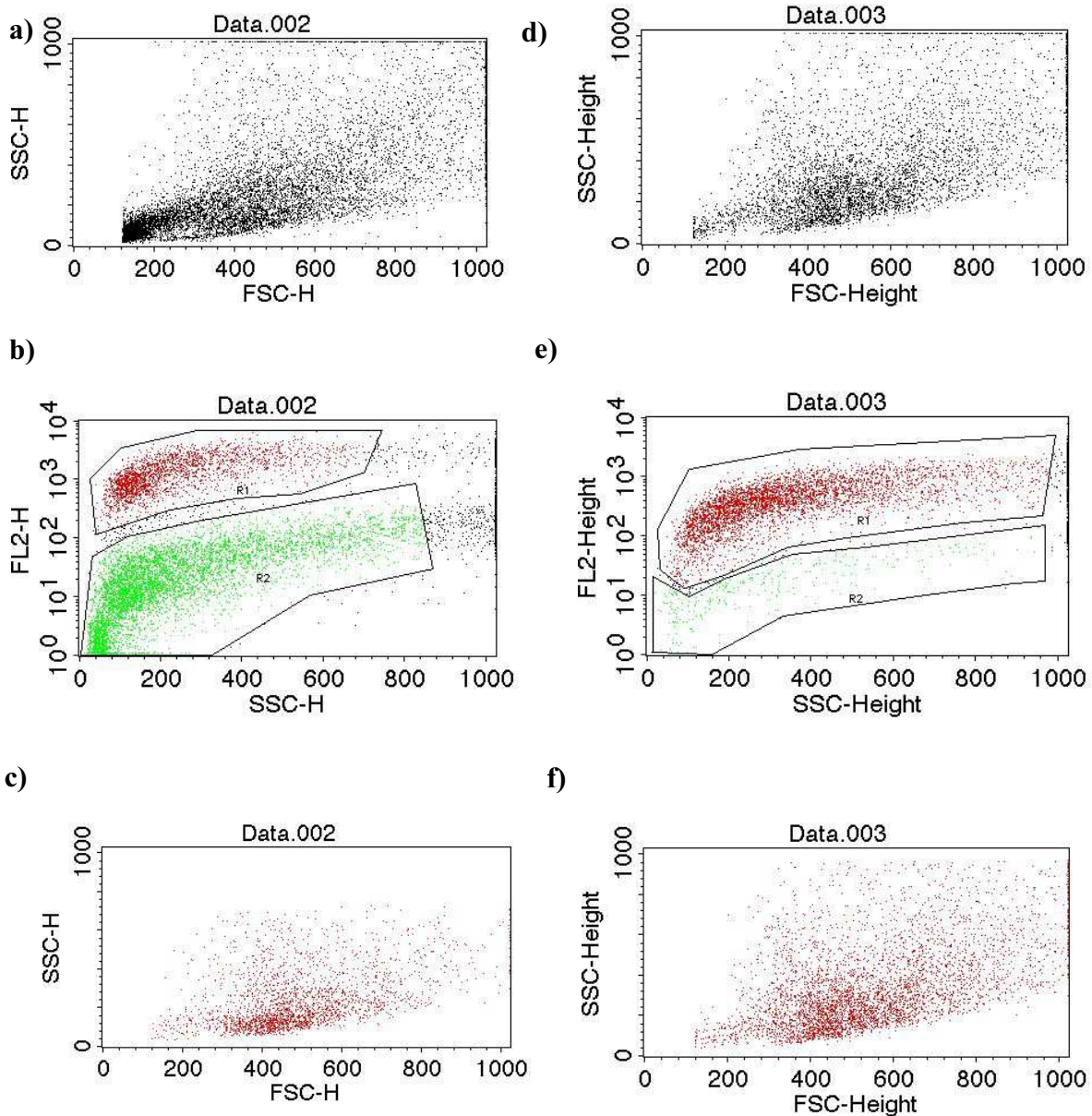


Abb 4.4: FACS-Evaluation der MMS-Isolation. In der linken Reihe die unsortierte Zellsuspension aus verdautem Infarktgewebe als FSC/SSC-Gesamtbild (a), Auftrennung nach Cd11b-Expression (FL2) (b) mit Darstellung der MMS-Population als R1 und Darstellung als isoliertes Gate (c). In der Rechten Reihe die Zellen nach MACS-Isolation (d-f) zeigt sich ein Cd11b⁺-Anteil von über 90%.

4.1.2.b Bestätigung der erfolgreichen Anreicherung in Cytospin-Präparaten

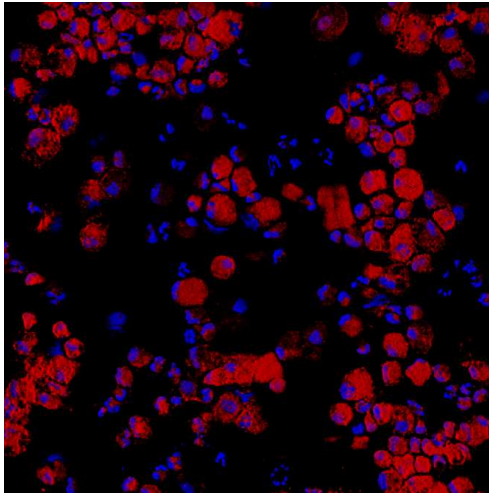


Abb 4.5: Immunzytochemische Färbung einer Cytospin-Präparation des MMS-Isolates mit F4/80 (rot)

Im Cytospin der Cd11b-sortierten Zellen mit dem Makrophagenantigen F4/80 zeigte sich eine Anfärbung von über 90% der Zellen.

4.1.2.c Definition von Schwellenwerten

nach prädefinierten Markern

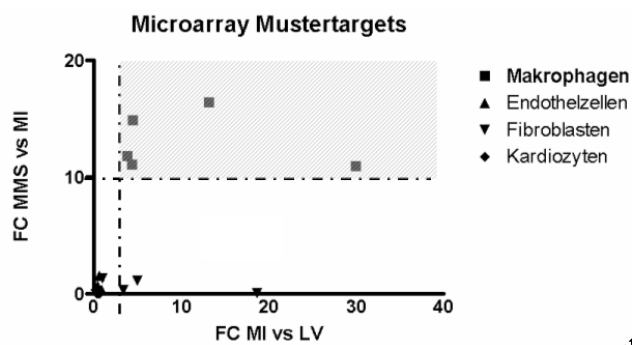


Abb 4.6: Schwellenwert-Festlegung. Die unterbrochenen Linien kennzeichnen den Bereich, der für die Bestimmung der Makrophagen-Expressionsliste gewählt wurde.

Vor der Auswertung der Ergebnisse nach Genen der M1/M2-Polarisation erfolgte eine Überprüfung der Expression von Markergenen. Hierzu wurde eine zuvor definierte Liste von Markerstrukturen benutzt (siehe Appendix, Tafel 10.2), welche spezifisch für bestimmte Zelltypen sind, welche im Myokard und Infarkt vorkommen. Dies diente

zum einem der Erstellung der Expressions-Schwellenwerte, welche für die Definition der Makrophagengene benutzt wurde (siehe Methoden 4.5.9), sondern auch dazu, die Konsistenz der Arrayergebnisse in sich zu überprüfen und ggf. Verunreinigungen durch andere Zellen zu entdecken.

Die Auswertung der Arrayergebnisse nach der Zellmarker-Liste zeigte zum einen, dass die Marker für Kardiomyozyten und Herzendothelzellen <1 , also stark herunter reguliert sind, und Fibroblastenmarker wie Procollagen im Infarkt durchaus herauf reguliert sind, im MMS-Isolat jedoch maximal einen FC von 1,5 erreichen und damit mehrere Dekaden unter der Expression der Monozyten/Makrophagenmarker liegen. Insgesamt erfolgte die Auswahl der Schwellenwerte (FC von 10 bei MMS vs. MI und FC von 2 für MI vs. LV) mit Hinblick auf einen größtmöglichen Sicherheitsabstand von Fehlmessungen, welche nicht durch den Normalisierungsalgorithmus bei der Arrayauswertung eliminiert worden waren.

4.1.3 Detektion von 619 Infarkt-makrophagen-spezifischen Genen

Von den 39.000 zum Teil redundanten Genen, welche auf dem Microarray gemessen wurden, konnten 11.101 Gene signifikant detektiert werden. Nach Anwendung des ersten Algorithmus blieben 621 Gene übrig, welche spezifisch von Makrophagen exprimiert wurden. Von diesen Genen erfüllten lediglich zwei Gene nicht die Kriterien des zweiten Algorithmus, nämlich die Expression von MMP9, einer Matrix-Metalloproteinase, welche von Makrophagen gebildet wird, sowie dem Formyl-Peptide Rezeptor 1, einem Makrophagen-Oberflächenprotein – in beiden Fällen lag die Expression im Infarktgewebe geringfügig höher als die Expression im MMS-Isolat (siehe Appendix 9.2)

Kategorie	Parameter	Anzahl Gene
Signifikant gemessene Genproben	$p < 0,05$	11.101
Im Infarkt herauf reguliert	MI vs. LV > 2	2334
Makrophagen-spezifisch Algorithmus 1	MI vs. LV > 2 MMS vs. MI > 10	621
Makrophagen Beide Algorithmen	Zusätzlich MMS $> MI > LV$	619

Tabelle 4.1: Charakteristiken des Datensatzes nach Anwendung der einzelnen Algorithmen.

4.2 Transkription von Markergenen der klassischen und alternativen Makrophagenaktivierung

4.2.1 Simultane Expression von Markern der M1 als auch M2-Aktivierung im Array.

Die Auswertung der im Microarray regulierten Gene zeigte, dass sowohl Marker der klassisch-aktivierten Makrophagen, als auch solche der alternativ aktivierten im Infarkt hoch reguliert waren. Unter den Zielgenen, die üblicherweise in M1-polarisierten Makrophagen exprimiert werden, befanden sich unter anderem TNF α , IL6 sowie IL1 β . Parallel zu diesen Genen waren allerdings auch zahlreiche Gene herauf reguliert, welche den M2-Phänotyp charakterisieren.

Zusätzlich wurden mit den stark exprimierten Genen SOCS3 und IL10 Signalwege die mit Makrophagendeaktivierung (M2c-Phänotyp) assoziiert sind gefunden:

	Marker	MMS vs. WT	MI vs. WT	MMS vs. MI	Signifikant reguliert
Produkte					
Klassisch-aktiviert	iNOS /NOS2	1,33	2,03	0,65	NEIN
	TNF	129,56	1,17	110,98	+ / Fehler
	IL1	101,93	4,43	23,02	Ja
	IL6	434,30	54,09	8,03	Ja
	IL12	2,41	0,66	5,78	Nein
	IFN	1,30	1,18	1,10	Nein
	IP-10 (=CXCL10)	33,43	8,36	4,00	Ja
Alternative Aktivierung	Ym1(Chi3l3)	198,75	28,28	7,03	Ja
	MDC (=CCL22)	33,74	2,61	12,93	Ja
	Il1RA	180,87	3,58	50,92	Ja
	IL1decoyR	146,37	7,16	20,46	Ja
	MHCII (Cd74/Ia)	8,97	3,55	2,53	grenzwertig
	Mannose-R	10,52	5,82	1,81	grenzwertig

	Arginase 2	233,56	7,80	28,65	Ja
	Arginase 1	170,02	67,95	2,50	Ja
	AMAC	0,63	2,15	0,30	NEIN
	IL10	233,21	2,45	95,20	Ja
	TARC (=CCL17)	44,65	19,00	2,35	grenzwertig
	RENTLA (=Fizz1)	4,08	0,30	13,76	NEIN
	Fibronectin	21,96	14,87	1,75	grenzwertig
Deaktivierung	IL10	233,21	2,45	95,20	Ja
	SOCS 3	64,87	7,76	8,67	grenzwertig

Tabelle 4.2.: Microarrayergebnisse von Markergenen des M1/M2-Phänotypes sowie der Deaktivierung. „JA“: Die Kriterien für makrophagenspezifische Expression werden vollständig erfüllt. „NEIN“: Nichterfüllen der Kriterien. „grenzwertig“: Kriterien beinahe erfüllt.

In den beobachteten Markersets für beide Aktivierungstypen gab es einige Marker, welche sehr stark und grenzwertig stark exprimiert wurden. In den Gruppen für M2 als auch M1 Marker gab es jeweils drei bzw. zwei Zielstrukturen, welche nach den prädefinierten Kriterien nicht ausreichend heraufreguliert waren. Die Arrayergebnisse für TNF α lieferten kontroverse Resultate mit Werten, welche teilweise im Rahmen der anderen M1-Zytokine lagen, beim Arrayergebnis Mi vs. WT jedoch nicht signifikant reguliert waren. Als wahrscheinlichste Ursache gingen wir von einer Fehlmessung aus.

4.2.2 Bestätigung der Koexpression von M1/M2 Genen mittels qRT-PCR

Um die Ergebnisse der Microarray-Analysen zu verifizieren wurde die Expression der einzelnen Zielgene mittels quantitativer PCR gemessen.

4.2.2.a Induzierte M1-Gene im MMS-Isolat und MI

Von den M1-charakterisierenden Genen wurden die in den Arrayergebnissen hoch induzierten Marker Il6 und Il1 β für die Bestätigungsuntersuchung ausgewählt.

Zusätzlich werteten wir die Expression von iNOS und Tnf α mittels qRT-PCR aus – beide M1-typischen Gene waren im Microarray auch nach unserem Algorithmus als nicht signifikant oder fraglich induziert gewertet worden.

Für die bereits im Array stark induzierten Gene IL6 und IL1 β konnten wir in der RT-PCR vergleichbare Resultate wie im Microarray messen. So zeigte IL6 einen FC von 32,59 \pm 4,0 bei einer Induktion im Microarray (MMS vs. MI) von 8,03. IL1 zeigte einen FC von 275,8 \pm 38,75 (MMS vs. MI 23,02).

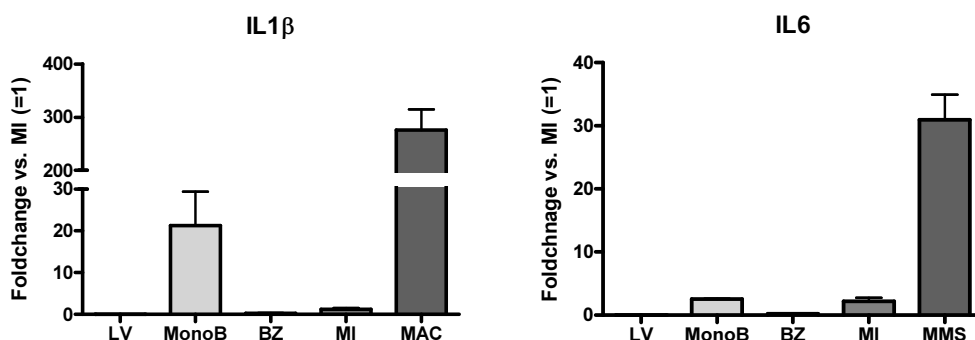


Abb. 4.7: qRT-PCR M1-Markergene. Die Darstellung der qRT-Ergebnisse erfolgt als Foldchange (FC) gegen die Expression in der Myokardinfarktnarbe (MI, Median = 1) als Mittelwert und Standardfehler. IL1 β : Linker Ventrikel (LV) 0,01 \pm 0,00; n=8; p=0,0039, Blutmonozyten (MonoB) 21,28 \pm 8,15; n=4; p=0,0625, Borderzone (BZ) 0,25 \pm 0,08; n=3; p=0,1250, MMS-Isolat (MAC) 275,8 \pm 38,75; n=6; p=0,0156. Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 1,2 \pm 0,30; n=9. IL6: Linker Ventrikel (LV) 0,01 \pm 0,00; n=8; p=0,0039, Blutmonozyten (MonoB) 2,55 \pm 0,04; n=8; p=0,0039, Borderzone (BZ) 0,23 \pm 0,06; n=6; p=0,0156; MMS-Isolat (MMS) 30,94 \pm 4,02; n=6; p=0,156 Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 2,2 \pm 0,05; n=12 (siehe Tabelle 4.3)

Für TNF α , welches aufgrund seiner im MMS ungleich höheren Expression als im Infarktgewebe in den „Fehler-Bereich“ des Microarray-Algorithmus gefallen war, zeigte sich in der qRT-PCR eine vergleichbare Induktion wie für IL6 und IL1 β . iNOS, welche in den Microarrayergebnissen als nicht als MMS-spezifisch gewertet worden war, zeigte in der qRT-PCR eine markante Expression im MMS-Isolat, wobei hier die Expression im Infarkt niedriger als im MMS-Isolat, jedoch höher als bei den nicht aktivierten Monozyten liegt. Aufgrund der starken Variabilität der RT-

Ergebnissen mit hoher Standardabweichung konnte die Induktion im Infarkt makrophagen nicht mit Signifikanz nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

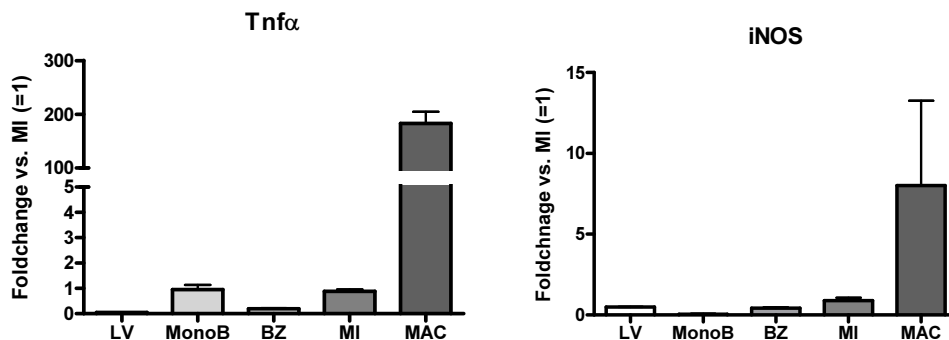


Abb. 4.8: qRT-PCR der in den Microarrayergebnissen nicht eindeutig regulierten Marker Tnfα und iNOS. **Tnfα:** Linker Ventrikel (LV) 0,05 +/- 0,01; n=6; p=0,0156; Blutmonozyten (MonoB) 0,95 +/- 0,19; n=6; p=0,5; Borderzone (BZ) 0,20 +/- 0,21; n=6; p=0,0156; MMS-Isolat (MAC) 199,1 +/- 16,26; n=6; p=0,0156; Narbengewebe Myokardinfarkt (Median 1,0) 0,87 +/- 0,08; n=6. **iNOS:** LV 0,49 +/- 0,00; n=3; p=0,125; Blutmonozyten (MonoB) 0,04 +/- 0,03; n=3; p=0,125; Borderzone (BZ) 0,42 +/- 0,06; n=3; p=0,125; MMS-Isolat (MAC) 8,0 +/- 5,2; n=3; p=0,125. Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 0,89 +/- 0,19; n=3

In der Gesamtheit unterstützen die qRT-PCR Ergebnisse die Microarray-Daten, nach denen im Infarkt Gene der klassisch-aktivierten Regulation verstärkt exprimiert werden. Für die M1-Produkte Il6, Tnfα und Il1β konnte eine starke Expression in Infarkt und Infarkt makrophagen gefunden werden, lediglich iNOS ist obgleich einer positiven Tendenz bei einem FC von 8,0 und einer Standardabweichung von 9,0 nicht signifikant induziert.

Gen	Microarray		qRT-Ergebnis (mittel +/- SF)	
	MMSvsMI	MI vs WT	MMS vs MI	MI vs LV
Il 6	54,09	8,03	30,94 (+/- 4,02)	69,93 (+/- 24,86)
TNFα	110,98	1,17	183,0 (+/- 21,66)	19,10 (+/- 1,69)
Il1β	23,02	4,43	275,8 (+/- 38,75)	75,75 (+/- 14,55)
iNOS	0,65	2,03	8,0 (+/- 5,2)	2,05 (+/- 0,34)

Tabelle 4.3.: Tabellarische Darstellung der M1-Zielgene, Sortierung nach FC in der rtPCR. In der qRT-Versuchsreihe bestätigt sich für alle außer iNOS die Induktion im Infarktmacrophagen. Bei NOS2 MMS vs. MI liegt der Standardfehler im positiven Bereich, nicht jedoch die Standardabweichung.

4.2.2.b Verifikation der M2-Aktivierung im MI mittels rtPCR

Zur Beurteilung der im Microarray regulierten M2-Gene verifizierten wir zunächst die Gene, welche bereits im Array stark induziert waren. Die RT-PCR Ergebnisse der beiden Arginase Isoenzyme sowie Bestandteilen der Interleukin-1 Modulationskette (Il1-Rezeptorassoziiertes Protein, Il1-Rezeptor Typ 2/Il1 decoy Rezeptor, Il1-Rezeptorantagonist) bestätigten die bisherigen Microarrayresultate. Interessanterweise zeigte sich die (typischerweise in hypoxischen Verhältnissen induzierte) Arginase-2 als 2,1-fach gegenüber Arginase-1 herauf reguliert.

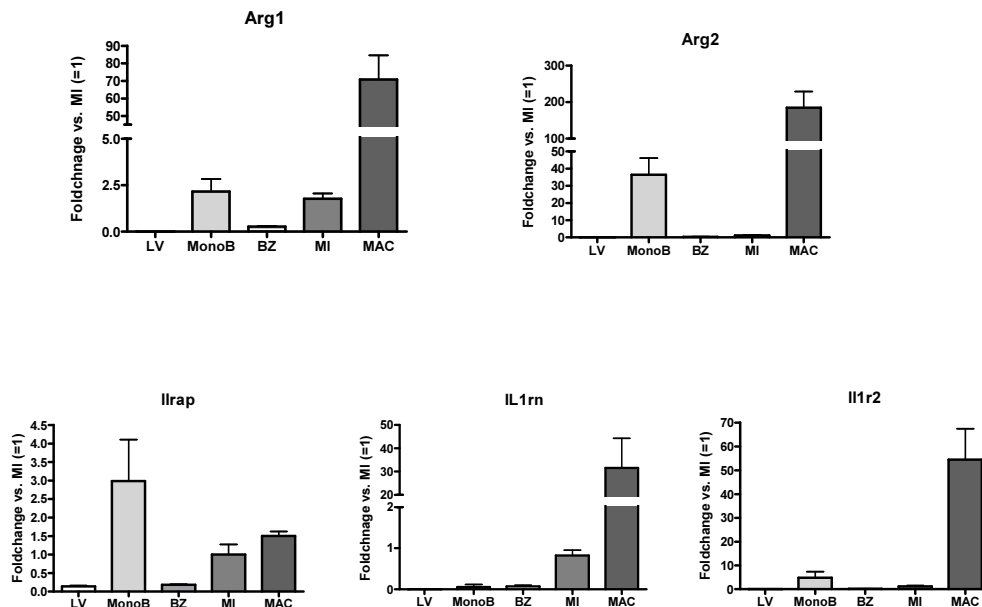


Abb. 4.9: Die RT-PCR Resultate der Arginase-Isoformen, sowie der Il1-Immunmodulationskette bestätigten die Microarrayergebnisse.

Arginase 1 (Arg1): Linker Ventrikel (LV) 0,00 +/-0,00; n=6, Blutmonozyten (MonoB) 2,2 +/- 0,67; n=6; Borderzone (BZ) 0,27 +/-0,04; n=6; MMS-Isolat (MAC) 70,77 +/-13,8; n=6 Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 1,77 +/-0,29; n=6 **Arginase 2 (Arg2):** LV 0,01 +/-0,00; n=8; p=0,125, MonoB 36,43 +/- 9,69; n=4; BZ 0,30 +/-0,16; n=3; p=0,125, MAC 184,6 +/-44,24; n=6; p=0,125 MI (Median 1,0) 1,5 +/-0,30; n=9. **Interleukin-1 rezeptorassoziiertes Protein (Ilrap):** LV 0,14 +/-0,02; n=4, MonoB 2,99 +/- 1,12; n=3; p=3, BZ 0,18 +/-0,01; n=3, MAC 1,5 +/-0,12; n=3, MI (Median 1,0) 1,0 +/-0,30; n=3 0,0625. **Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist (Il1rn):** LV 0,0 +/-0,00; n=4, MonoB 0,06 +/-0,059; n=3; p=3, BZ 0,07 +/-0,03; n=3, MAC 31,5 +/-12,76; n=3, MI (Median 1,0) 0,66 +/-0,18; n=3. **Interleukin-1 Rezeptor Typ 2 (Il1r2):** LV 0,0 +/-0,00; n=3, MonoB 4,85 +/-2,61; n=4; BZ 0,14 +/-0,39; n=3, MAC 54,4 +/-13,00; n=6, MI (Median 1,0) 0,66 +/-0,18; n=9

Nach der Bestätigung der im Array positiv regulierten M2-Gene validierten wir unsere Arrayergebnisse durch RT-Versuche mit charakteristischen M2-Strukturen, welche nach unserem Micorarray-Interpretationsalgorithmus nicht eindeutig induzierten waren.

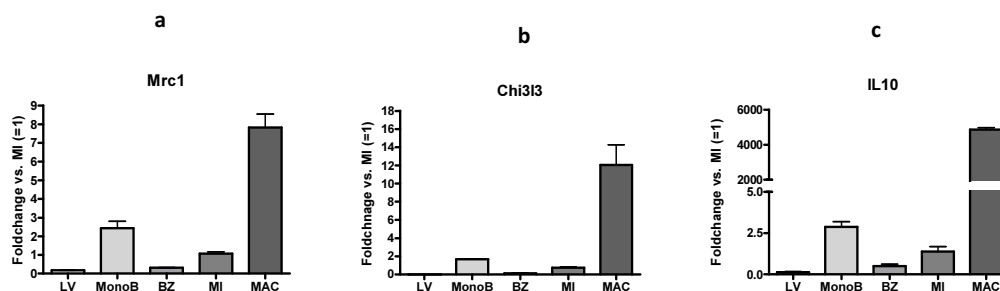


Abb. 4.10: Die RT-PCR Resultate de M2-Gene für den Mannoserezeptor Typ 1 (Mrc1) und Ym1(=Chi313) – beide zeigen eine deutliche Induktion des Gens in Infarktmacrophagen (a+b).

Interleukin 10 (IL10) ist das M2-Gen mit der höchsten Expression im Vergleich zum

Myokardinfarktgewebe (c). **Mannoserezeptor Typ 1 (Mrc1):** Linker Ventrikel (LV) 0,17 +/-0,00;

n=3, Blutmonozyten (MonoB) 2,43 +/-0,37; n=3; Borderzone (BZ) 0,31 +/-0,01; n=3; MMS-Isolat

(MAC) 7,83 +/-0,73; n=3 Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 1,08 +/-0,09; n=3. **Chitinase3/Ym1**

(Chi313): LV 0,00 +/-0,00; n=6, MonoB 1,67 +/-0,021; n=4; BZ 0,13 +/-0,09; n=6, MAC 12,5 +/-

2,21; n=6, MI (Median 1,0) 0,74 +/-0,08; n=6. **Interleukin 10 (IL10):** LV 0,13 +/-0,04; n=6, MonoB

2,89 +/-0,31; n=6; BZ 0,49 +/-0,12; n=6, MAC 4863 +/-106,4; n=6, MI (Median 1,0) 2,26 +/-0,40;

n=6.

Wir wählten den Mannose-Rezeptor sowie das Chitinase3-like Enzym (Chi3l3/Ym1). Die Ergebnisse zeigten eine eindeutig signifikante Heraufregulation der Gene in Infarkt-makrophagen, welche jedoch nicht so stark ausgeprägt waren, wie die der bereits im Microarray-Versuch nach unserem Algorithmus eindeutig heraufregulierten Gene. Die Spannbreite der Expression der unterschiedlichen M2-Strukturen zeigt sich insbesondere im Vergleich mit Il10 (FC 4860 +/- 106,4), dem M2-Gen mit der stärksten Induktion in unseren rtPCR-Versuchen (siehe hierzu auch Abschnitt 5.4.4)

Gen	Microarray		RT-PCR Ergebnis (mittel +/- SF)	
	MMS vs. MI	MI vs. WT	MMS vs. MI	MI vs. LV
IL10	95,20	2,45	4863 (+/-260,70)	7,6 (+/2,42)
Arg2	28,65	7,80	184,6 (+/-44,24)	92,93 (+/- 92,93)
Arg1	67,95	2,50	70,77 (+/-13,79)	N/A
Ilrap	0,65	2,03	1503 (+/-0,12)	7,02 (+/- 0,99)
Il1rn	3,58	50,92	31,57 (+/-12,76)	N/A
Il1r2	7,16	20,46	54,44 (+/-13,00)	302,5 (+/- 78,55)
Mrc1	5,82	1,81	7,829 (+/-0,73)	5,74 (+/- 0,10)
Chi3l3/Ym1	28,28	7,03	12,05 (+/-2,21)	133,8 (+/- 25,8)

Tabelle 4.4.: Tabellarische Darstellung der M2-Zielgene. Auch bei im Array grenzwertig induzierten Genen zeigt sich in der rtPCR eine signifikante Induktion. Zu beachten ist die heraufregulierte Transkription von IL10 im Vergleich zu den restlichen M2-Targets. Für Arginase 1 und den Il1rn konnten keine MI vs. LV-Werte berechnet werden, da die kaum vorhandene Transkription im gesunden Ventrikel zu unrealistisch hohen Werten führte.

4.2.3 Zeitverlaufsanalysen der M1/M2-Aktivierung

Da sowohl die Microarrayergebnisse als auch deren Bestätigung in der qRT-PCR kontroverse Resultate zeigten, nämlich die parallel zueinander stattfindende Induktion von Markern der klassischen sowie der alternativen Makrophagenaktivierung, beschlossen wir, sowohl die histologische Analyse, als auch die qRT-Versuche als Zeitverlaufs-Analysen durchzuführen, um eine mögliche

Dynamik in der Expression von klassischen sowie alternativen Markern festzustellen. Die gewählten Zeitpunkte von 24h, 5 Tagen und 10 bzw. 12 Tagen sollten repräsentativ sein für den Beginn der inflammatorischen Phase, dessen Abschluss sowie für den Verlauf während proliferativen Phase.

4.2.3.a Unterschiedliche Dynamik der M1/M2-Aktivierung in der qRT-PCR

Für die Zeitverlaufsanalyse der M1-typischen Marker wählten wir mit IL1 β und TNF α die in den vorherigen PCR-Versuchen am robustesten exprimierten M1-Marker. Für die M2-typische Aktivierung wählten wir mit dem Mannoserezeptor Typ C (Mrc1) sowie das Enzym Arginase-1 einen Zelloberflächenrezeptor sowie ein klassisches M2-Stoffwechsellzym. Wir erzeugten ebenso eine Zeitverlaufsanalyse der IL10 Expression, da diese extrem stark gemessen worden war und neben der M2a-Aktivierung auch im deaktivierten Zustand (M2c) exprimiert wird. Getestet wurden die Kontrollproben gegen MMS-Isolate, welche diesmal zu festgesetzten Zeitpunkten im Verlauf der Infarktheilung entnommen wurden.

Die Ergebnisse zeigen eine eindeutig unterschiedliche Dynamik:

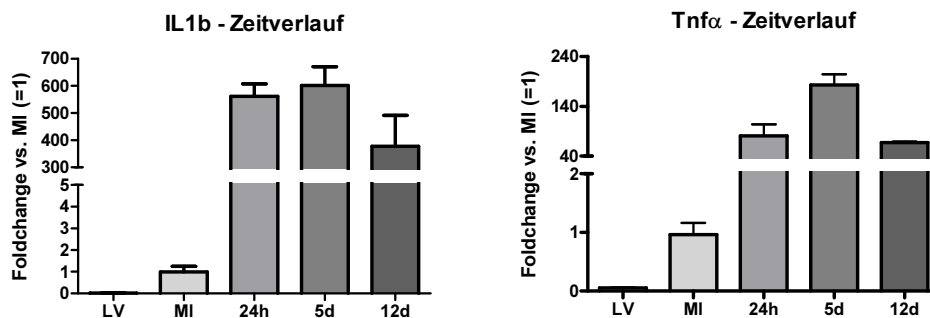


Abb. 4.11: Zeitverlaufsanalysen der M1-Gene. Beide Gene zeigen bereits ab 24h eine starke Induktion welche gegen Ende des Beobachtungszeitraumes abfällt. **IL1b:** MMS-Isolat der Zeitpunkte 24h nach MI 561,2 +/-46,01 n=2; 5 Tagen (5d) 601,7 +/-68,82 n=3, 12 Tagen (12d) 377,7 +/-114,0 n=3. Kontrollgruppen Linker Ventrikel (LV) 0,02 +/-0,01 n=2 und Myokardinfarktgewebe (MI, Median =1) 1,00 +/-0,26 n=3. Tumornekrosefaktor alpha (TNFa): 24h 81,03 +/-22,64 n=2; 5d 183,0 +/-21,66 n=6; 12d 67,45 +/-1,89 n=2. Kontrollgruppen LV 0,05 +/-0,01 n=3 und MI 0,96 +/-0,20 n=5.

Die M1- Gene zeigten bereits zum ersten Beobachtungszeitraum eine markante Induktion, welche im weiteren Verlauf der inflammatorischen Phase nur moderat bzw. nicht signifikant anstieg, um im Verlauf der der proliferativen Phase abzusinken.

Die rtPCR-Ergebnisse der M2-Gene zeigten eine andere Dynamik; hier konnte eine moderate Induktion nach 24h und zwei Tagen beobachtet werden, welche sich bis in die proliferative Phase hinein steigerte bzw. ein Plateau in der späten proliferativen Phase erreichte.

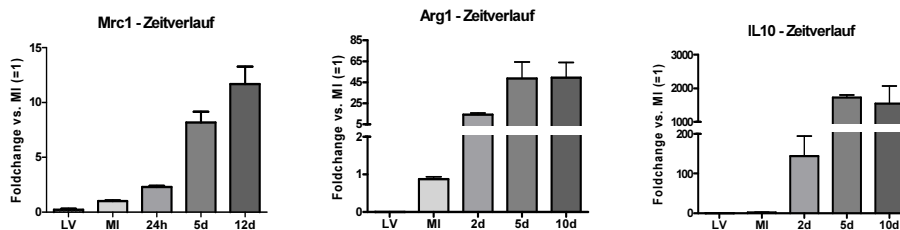


Abb. 4.12: Zeitverlaufsanalysen der M2-Gene. Bei allen drei Analysen fällt das während der inflammatorischen Phase ansteigende Expressionsniveau auf.

Mannoserezeptor Typ 1 (Mrc1): : MMS-Isolat der Zeitpunkte 24h nach MI 2,30 +/-0,10 n=2; 5 Tagen (5d) 8,18 +/-0,99 n=3, 12 Tagen (12d) 11,69 +/-1,57 n=2. Kontrollgruppen Linker Ventrikel (LV) 0,22 +/-0,10 n=2 und Myokardinfarktgewebe (MI, Median =1,0) 1,00 +/-0,07 n=3. **Arginin 1 (Arg1):** 2d 14,25 +/-1,34 n=2; 5d 48,56 +/-15,90 n=3; 10d 49,32 +/-14,65 n=2. Kontrollgruppen LV 0,00 +/-0,00 n=3 und MI (Median = 1,0) 0,87 +/-0,06 n=3. **Interleukin 10 (IL10):** 2d 144 +/-50,45 n=2; 5d 1727 +/-79,22 n=3; 10d 1543 +/-529,0 n=2. Kontrollgruppen LV 0,19 +/-0,02 n=3 und MI (Median = 1,0) 0,68 +/-0,34 n=3

Insgesamt zeigten die Marker der M1 und M2-Aktivität jeweils eine gegenläufige Dynamik. Während die M1-Aktivierung zu Beginn der Inflammatorischen Phase klar dominierte und im Zeitverlauf zur proliferativen Phase hin rückläufig war, zeigten sich die M2-Marker zu Beginn nur moderat induziert, im Verlauf der inflammatorischen Phase steigerte sich die Expression jedoch bis in die proliferative Phase hinein.

4.2.3.b Verifikation der entgegengesetzten M1/M2 Dynamik in der Histologie

Um die durch die seriellen rtPCR Untersuchungen beobachtete Dynamik zu verifizieren, sowie um unsere molekulargenetisch gewonnenen Beobachtungen im Gewebe zu testen, führten wir eine immunhistochemische Verlaufsbeobachtung des MI mit denselben Zeitpunkten wie bei der vorangegangenen rtPCR-Untersuchung durch. Wir wählten repräsentative Marker für M1 und M2 Aktivierung und fertigten eine immunhistologische Kofärbung mit dem Makrophagenmarker F4/80 an, um die Expression der Marker in den Makrophagen darzustellen.

Für den M1-Phänotyp wurde $\text{TNF}\alpha$ ausgewählt, für den alternativen Phänotyp das Enzym Arginase sowie ein neuer Marker für alternativ-aktivierte Makrophagen Galectin3. Zusätzlich wurde IL10 als Marker der alternativen Makrophagen(de)aktivierung im weitesten Sinne ausgesucht, um die in der qRT-PCR gefundene starke Deaktivierungskomponente zu verifizieren.

Die Auswertung der Kofärbung zeigt ähnlich wie bei den qRT-Ergebnissen eine zunächst hohe Anzahl von $> 70\%$ ($75,3\% \pm 9,37$) Makrophagen, welche F4/80 und $\text{TNF}\alpha$ koexprimierten. Zu diesem Zeitpunkt färben unter 10% ($8,5\%, \pm 0,72$) der Makrophagen für das M2-Enzym Arginase. Im Verlauf der inflammatorischen Phase sinkt die Zahl der $\text{TNF}\alpha$ -exprimierenden Makrophagen auf unter 50 Prozent ($68,6 \pm 17,5$ an Tag 5 und $49,9 \pm 16,49$ an Tag 10), während die Zahl der Arginase-exprimierenden Makrophagen auf über 40% ($49,4\% \pm 7,8$ an Tag 10) ansteigt.

Dieser Trend ist bei dem zweiten M2-Marker Gal3 noch ausgeprägter zu beobachten mit $20,8\% \pm 10,3$ nach zwei Tagen und $72,9\% \pm 29,7$ nach bereits 5 Tagen.

Interessanterweise steigt die Zahl der IL10-exprimierenden Makrophagen von ursprünglich über 50% auf beinahe 100% nach der inflammatorischen Phase ($92,5\% \pm 7,9$ an Tag 10)

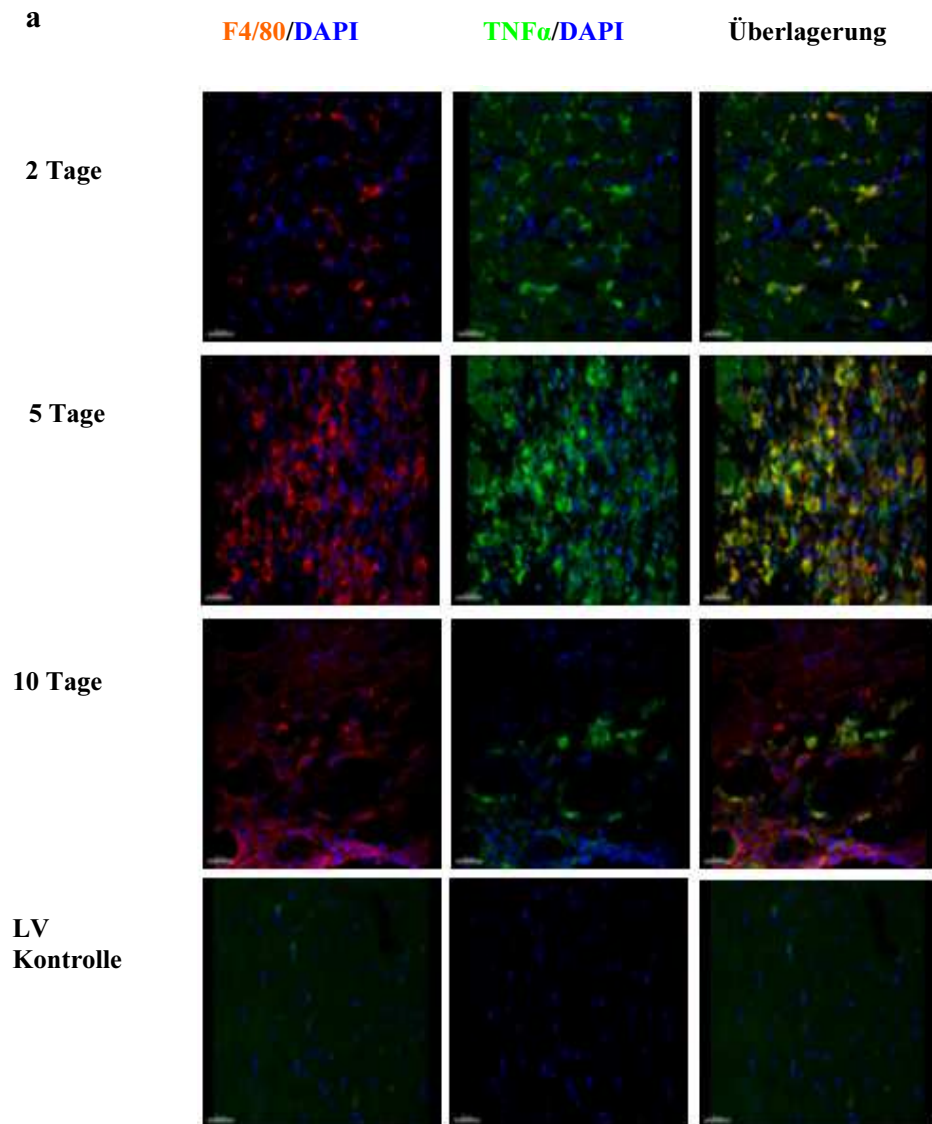
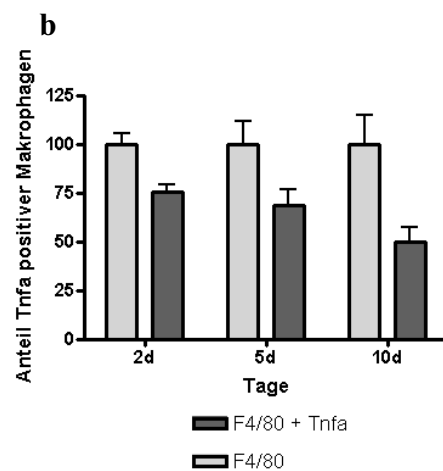


Abb 4.13: Immunhistologische Untersuchung der Koexpression des Makrophagenmarkers F4/80 (rot) mit dem M1-Marker TNF α (grün) (a) sowie die Darstellung der Koexpression (dunkelgrau) als Anteil der Makrophagenpopulation (hellgrau) im Infarkt: Tag 2 (2d) 77,2% \pm 4,32; n= 8; Tag 5 (5d) 68,85 \pm 1,45; n= 8; Tag 10 (10d) 55 \pm 6,40; n= 10 (b)



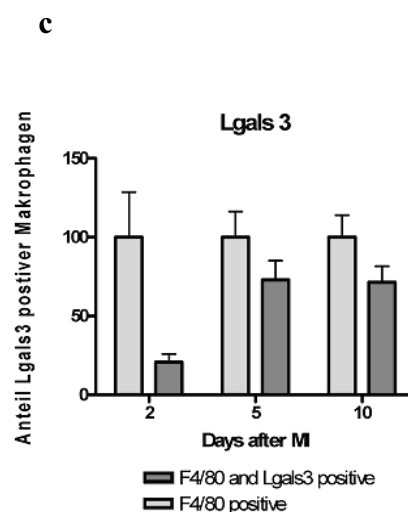
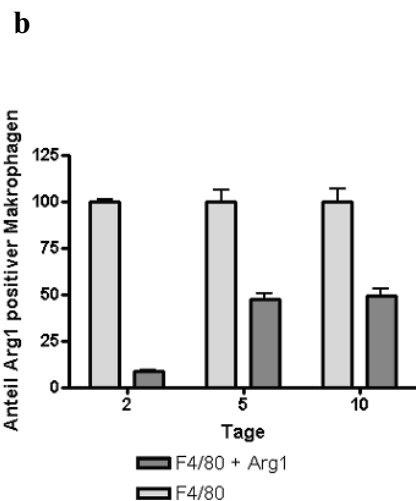
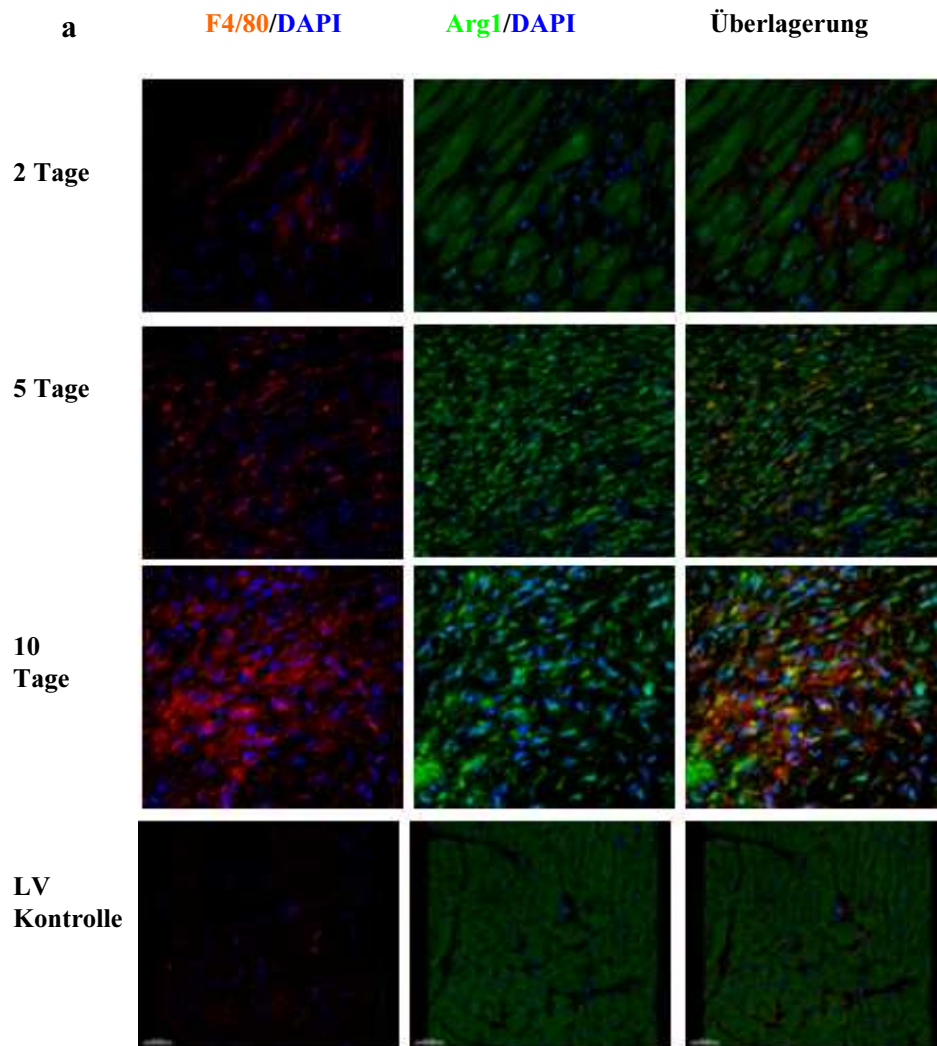


Abb 4.14: Immunhistologische Untersuchung der Koexpression des Makrophagenmarkers F4/80 mit dem M2-Marker Arginase-2 (a) sowie die Darstellung der Koexpression in Prozent der Makrophagenpopulation im Infarkt von Arginase: Tag 2 (2d) 10,68% +/-5,31; n= 8; Tag 5 (5d) 43,66% +/-3,88; n= 8; Tag 10 (10d) 50,74% +/-5,82; n= 6 (b) Koexpression von F4/80 mit dem neuen M2-Aktivationsmarker Galectin 3: Tag 2 (2d) 20,8% +/-5,15; n= 4; Tag 5 (5d) 72,9% +/-12,12; n= 6; Tag 10 (10d) 71,4% +/-10,16; n= 7 (c)

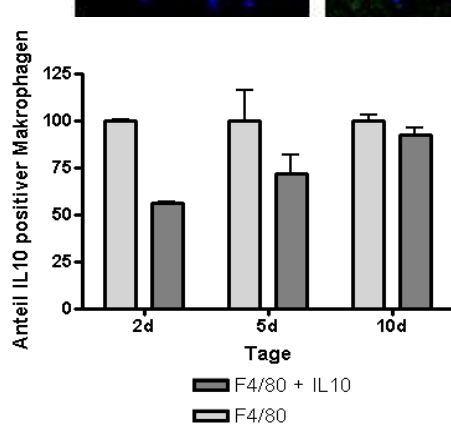
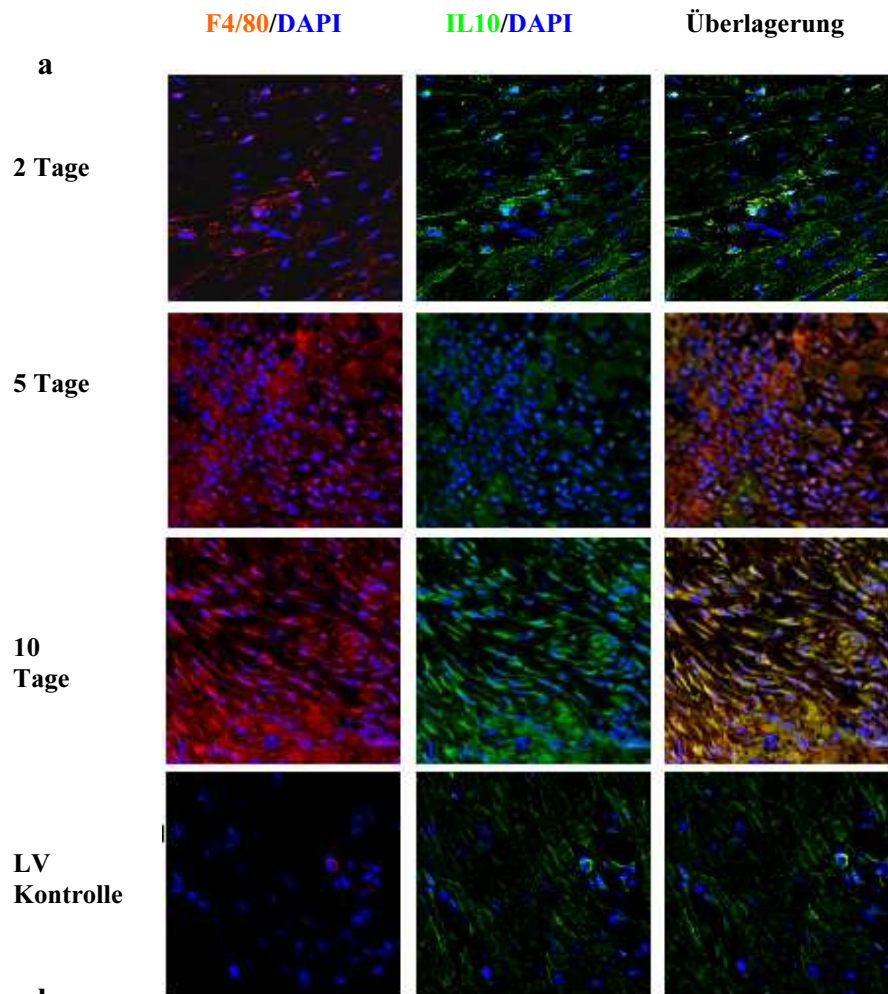


Abb 4.15: Immunhistologische Untersuchung der Koexpression des Makrophagenmarkers F4/80 mit dem M2/Deaktivations-Markern IL10 (a) sowie die Darstellung der Koexpression in Prozent der Makrophagenpopulation im Infarkt: Tag 2 (2d) 55,0 \pm 2,89; n=4; Tag 5 (5d) 70,53 \pm 3,23; n=6; Tag 10 (10d) 91,6 \pm 2,94; n=4 (b)

Vergleicht man den prozentualen Anteil der Zellen, welche TNF α und F4/80 kolokalisieren (M1-Typ) mit dem der Zellen, welche Arginase/Galectin3 mit F4/80 kolokalisieren, bestätigt sich erneut die auch in den rtPCR-Versuchen gefundene reziproke Dynamik: Der Anteil der F4/80 kolokalisierenden M1-Makrophagen sinkt von 75% nach zwei Tagen im Verlauf der inflammatorischen Phase ab, während gleichzeitig die M2-Makrophagen zahlreicher werden. Während der proliferativen

Phase (Tag 10) scheinen die M2-Makrophagen sogar eine diskrete Mehrheit in der Infarkt Narbe zu stellen. Zu beachten ist hierbei ebenfalls die kontinuierliche Zunahme der IL10-positiven Makrophagen, welche ein Zeichen für deren Deaktivierung sind – am Tag 10 sind über 90% der Makrophagen IL10-positiv:

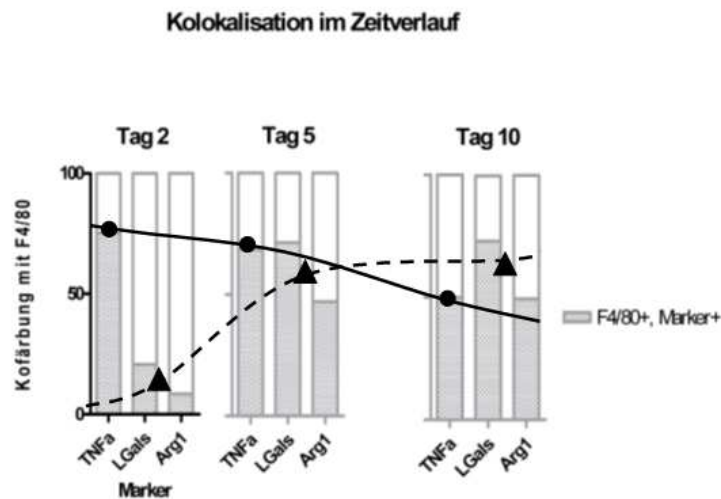


Abb 4.16.: Beim Vergleich der prozentualen Verhältnisse von M1-Makrophagen (F4/80+TNFα, durchgezogene Linie) mit M2-Makrophagen (F4/80+Lgals/Arginase) fällt der reziproke Trend in der Verlaufsbeobachtung auf. Während zu Beginn der inflammatorischen Phase die meisten Zellen zum M1-Phänotyp gehören, steigt der M2-Anteil gegen Ende der inflammatorischen Phase an und überwiegt während der proliferativen Phase

4.3 Koexpression von M1 und M2-Markern während der späten proliferativen Phase

Die bisherigen Ergebnisse unterstützten weitgehend die These, dass sich im Infarkt sowohl Makrophagen des klassisch-aktivierten Typus befanden als auch die des alternativ-aktivierten Typen, wobei eindeutig eine Dynamik zu erkennen war, in welcher der M1-Phänotyp zu Beginn der Inflammatorischen Phase dominierte und sich das Gleichgewicht mit fortschreitender Narbenheilung zum alternativ-aktivierten Phänotyp und der Deaktivierung verschob.

Um der Möglichkeit einer Koexpression von Markern beider Aktivierungsformen – und damit einer individuellen infarktspezifischen Aktivierung der MA nachzugehen, wurde eine vierfach Kofärbung eines klassischen Markers (TNF α und IL1 β) mit dem alternativen Aktivierungsmarker Mrc1 sowie des Monozyten- und Makrophagenmarkers Cd11b und der Kernfärbung durchgeführt. Die Wahl von Cd11b erfolgte, da sich insbesondere bei frühen Beobachtungszeitpunkten (weniger als zwei Tage post-MI) noch viele Monozyten nicht vollständig zu Makrophagen differenziert waren und wir einen aussagekräftigen Vergleichswert eines frühen Zeitpunktes (24 Stunden) zu späteren Zeitpunkten (5 und 12 Tage) erhalten wollten. In der Kofärbung konnten wir tatsächlich eine Koexpression von beiden Markerstrukturen in den Makrophagen nachweisen, wobei die Markerkoexpression sehr gering ausgeprägt war und nur im einstelligen Prozentbereich auftrat. Die Ergebnisse zeigen insgesamt eine heterogene Makrophagenpopulation, welche sich im wesentlichen aus klassisch-aktivierten und alternativ aktivierten Makrophagen zusammensetzt, wobei erstere zu Anfang hin dominieren, nach 5 Tagen jedoch weitgehend ein Gleichgewicht mit dem alternativ-aktivierten Phänotyp herrscht, welcher gegen Ende der inflammatorischen und während der proliferativen Phase dominiert (siehe Abb. 5.13).

Zusätzlich ist ein neuartiger Makrophagenphänotyp zu beobachten, welcher Markerstrukturen beider Aktivierungsformen exprimiert, jedoch nur sehr vereinzelt auftritt, wobei eine tendenzielle Häufung während der Ausreifungsphase des Infarkts zu beobachten war. Ob es sich hierbei um einen dauerhaft bestehenden eigenen Phänotyps eines Infarkt-spezifischen Makrophagen handelt oder um einen Übergangszustand zwischen M1 und M2-Phänotyp ist jedoch weiterhin ungeklärt.

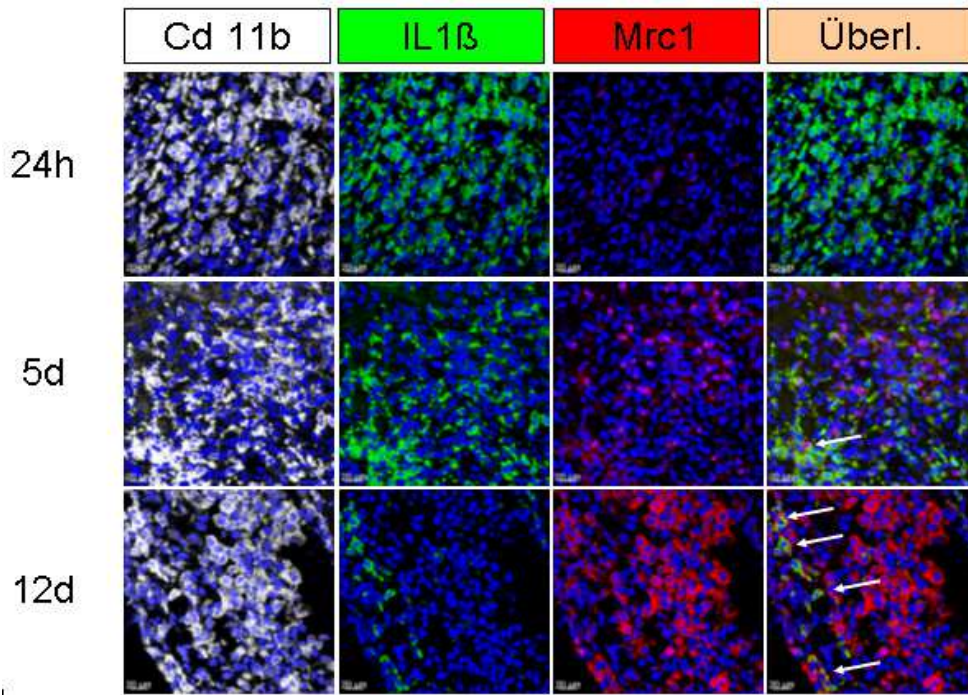


Abb 4.17: Kofärbung des Monozyten/Makrophagenmarkers Cd11b (weiß) mit dem M1-Marker IL1 β (grün) sowie dem M2 Marker Mrc1 (rot). Die weißen Pfeile kennzeichnen Cd11b-positive Zellen, bei denen eine Koexpression von IL1 β und Mrc1 gefunden wurde.

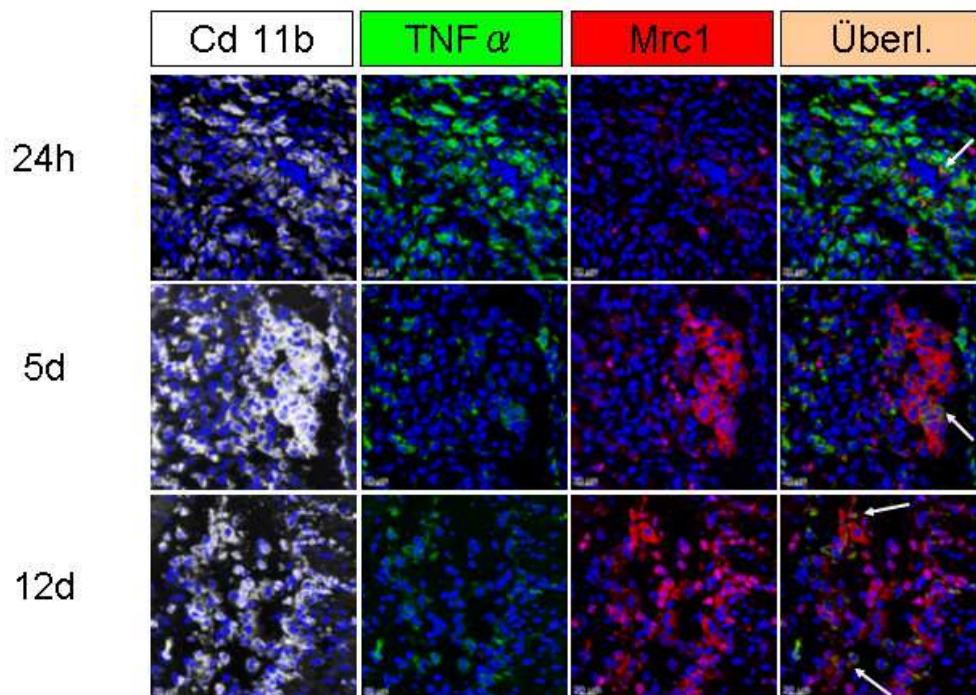


Abb 4.18: Kofärbung des Monozyten/Makrophagenmarkers Cd11b (weiß) mit dem M1-Marker TNF α (grün) sowie dem M2 Marker Mrc1 (rot). Die weißen Pfeile kennzeichnen Cd11b-positive Zellen, bei denen eine Koexpression von IL1 β und Mrc1 gefunden wurde.

4.4 Weitere Interessante Ziele

Bei der Auswertung der Microarrayergebnisse wurde auf eine signifikante Expression von Genen geachtet deren Produkte potentiell in den Prozess der Narbenheilung eingreifen. Unser besonderes Augenmerk bei der Auswahl galt insbesondere Genprodukten mit Bezug zu den Bereichen Gewebehormone/-signalgebung und Matrixmetabolismus, da den Makrophagen hier eine potentielle Schlüsselfunktion zukommt.

4.4.1 Galectin 3

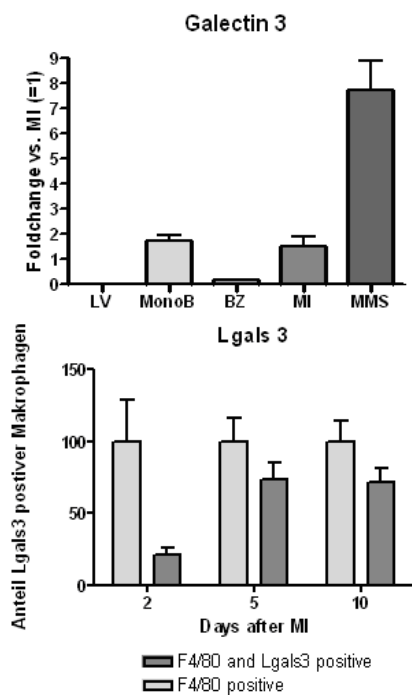
Galectin-3, ein zur Familie der spezifisch Galaktose bindenden Selektine gehörendes Protein [107], erregte unsere Aufmerksamkeit, da es in unseren Array-Daten hoch spezifisch für Infarkt-makrophagen reguliert war, in der Literatur auch als das Makrophagen-Oberflächenprotein Mac-2 bekannt ist [108] und dessen Induktion durch Thioglycolataktivierung in Makrophagen beobachtet wurde [109]. Da Galectin 3 nicht nur intrazellulär und auf der Zelloberfläche vorkommt, sondern auch in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird, und darüber hinaus mit Prozessen der Inflammation, Fibrose, Wachstumsregulation und Metastasenwachstum assoziiert ist, blieb dessen makrophagenspezifische Expression im Infarkt für uns hoch interessant [110-113].

Während der Arbeiten an der Verifikation unserer Expressionsergebnisse publizierte *MacKinnon et al. 2008 eine bahnbrechende Arbeit, in der Galectin 3 als wesentliches Element der M2-Aktivierung identifiziert wurde. Der Arbeitsgruppe gelang es durch Knockout und siRNA-Versuche nachzuweisen, dass Galectin 3 im Sinne eines autokrinen Feedbacks die M2-Polarisation erst ermöglicht und ferner, dass durch Galectin 3 die M1-typische Expression in Makrophagen unterdrückt wird. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Galectin 3 einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor, Cd98 besitzt durch dessen Inhibition die Entwicklung des M2-Phänotyps ebenfalls verhindert werden kann [114].*

a

Marker	MMS vs. WT	MI vs. WT	MMS vs MI	Signifikant reguliert
Galectin 3 (=Lgals3)	153,83	9,95	15,45	JA

c



b

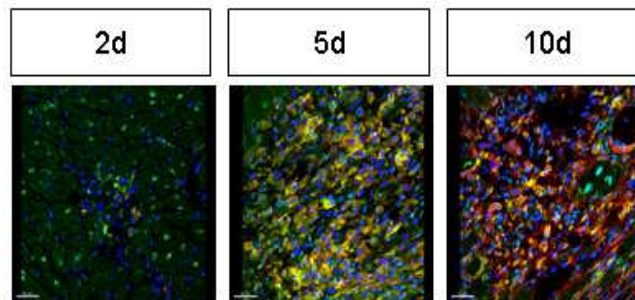


Tabelle 4.5: Microarrayergebnisse Galectin3

Abb 4.19: Expression von Galectin 3 im Microarray (a), Kofärbung mit F74/80 (F4/80 = rot; Gal3 = grün, Koexpression = gelb); Auswertung der Koexpression in der Immunhistochemie und Array-Verifikation in der qRT-PCR: rtPCR Galectin3: Linker Vntrikel (LV) 0,00 +/- 0,00; n=4 Blutmonozyten (MonoB) 1,75 +/-0,23; n=3; Borderzone (BZ) 0,16 +/-0,04; n=3; Myokardinfarkt (MI, Median = 1,0) 1,53 +/-0,38; n=3; Infarktmacrophagen (MMS) 7,75 +/-1,16; n=3 F4/80-LGals Kolokalisation: Tag 2 (2d) 20,8% +/-5,15; n= 4; Tag 5 (5d) 72,9% +/-12,12; n= 6; Tag 10 (10d) 71,4% +/-10,16; n= 7 (c)

Unsere Ergebnisse zeigen, dass dieser entscheidende M2-Differenzierungsregulator in der späten Phase der Inflammationsphase verstärkt von Makrophagen exprimiert wird.

4.4.2 Matrix-Metalloproteinasen

Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen, eine Familie der Zink-Proteasen, deren Mitglieder nach Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt werden (Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine). Die Matrix-Metalloproteinasen haben komplementär eine Familie an Inhibitoren unterschiedlicher Spezifität welche als

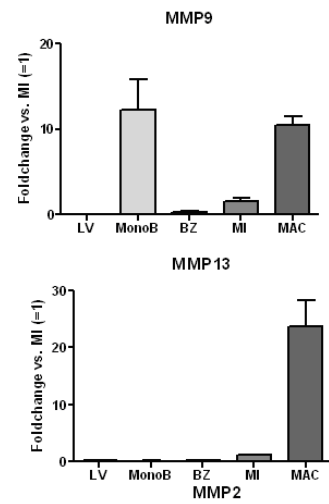
Tissue inhibitor of Metalloproteinases – oder TIMP bekannt sind. Die enzymatische Aktivität hängt somit nicht nur von der Konzentration und Gewebebeschaffenheit sondern auch von der Gewebekonzentration der Inhibitoren ab. Hinzu kommt, dass die meisten MMPs durch limitierte Proteolyse aktiviert werden; da die Gesamtaktivität der Metalloproteinase von vielen Einzelfaktoren abhängt wird diese üblicherweise mittels zymographischen Methoden ermittelt.

Die MMP/TIMP-Familie wurde bereits (auch in Myokardinfarkt-Mausmodellen) intensiv untersucht, da die Familie neben Tumorwachstum und Geweberemodelling und Vaskularisationsprozessen auch mit der Zellsignalgebung in Verbindung gebracht worden ist [115]. .

a

Gen	MI vs. WT	MMS vs. MI	Signifikant reguliert nach Algorithmus 1 + 2
Mmp 9	25,62	11,52	JA
Mmp 13	2,22	31,46	JA
Mmp 8	6,38	4,30	Grenzwertig
Mmp 12	22,47	4,87	Grenzwertig
Mmp 14	9,67	1,53	Grenzwertig
Mmp 19	4,65	6,89	Grenzwertig
Mmp 24	2,06	1,35	Grenzwertig
Mmp 2	2,77	0,07	NEIN
Mmp 3	9,50	0,11	NEIN
Mmp 23	8,03	0,02	NEIN

b



c

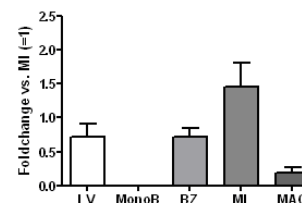


Tabelle 4.6: Expressionsprofil der Matrix-Metalloproteinasen (a) lediglich MMP 9 und 13 sind Makrophagen-spezifisch induziert.

Abb 4.20: Auswertung der MMPs in der qRT-PCR: MMP9 Linker Ventrikel (LV) 0,02 +/- 0,00; n=4; Blutmonozyten (MonoB) 12,29 +/-3,56; n=3; Borderzone (BZ) 0,29 +/-0,11; n=3; Myokardinfarkt (MI, Median = 1,0) 1,59 +/-0,30; n=3; Infarktmacrohagen (MAC) 10,44 +/- 1,01; n=3; MMP13: LV 0,13 +/-0,02; n= 3; MonoB 0,06 +/-0,05; n= 3; BZ 0,26 +/-0,03; n= 3; MI (Median = 1,0) 1,08 +/-0,07; n= 3; MAC 23,67 +/-4,57; n= 3 (b), exemplarisch die qRT-Auswertung der im Infarkt induzierten, aber nicht makrophagenspezifischen Metalloproteinase MMP2: LV 0,72 +/-0,20; n= 4; MonoB 0,0 +/-0,0; n= 3; BZ 0,71 +/-0,13; n= 3; MI (Median = 1,0) 1,08 +/-0,34; n= 3; MAC 0,19 +/-0,06; n= 3 (c)

In unseren Arrayexperimenten zeigten sich lediglich MMP9 und MMP13 als makrophagenspezifisch heraufreguliert, was sich durch rtPCR-Verifikation bestätigen ließ. Nach unseren Kriterien fand keine signifikante TIMP-Expression im Makrophagen statt.

a

Gen	MI vs. WT	MMS vs MI	Signifikant reguliert gem. Algorithmus 1+2
Timp 1	82,99	0,36	NEIN
Timp 2	3,71	1,23	NEIN

b

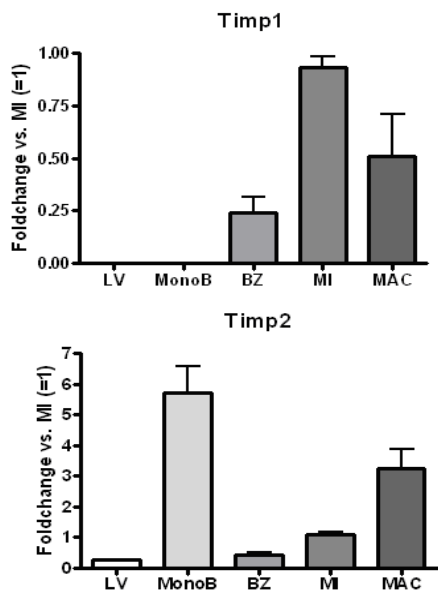


Tabelle 4.7: Auswertung der wichtigsten Inhibitoren des MMP-Systems, der Tissue-Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen im Microarray. Diese sind zwar im Array im Infarkt induziert, die Expression stammt jedoch nicht von den Makrophagen (a)

Abb 4.21: Bestätigung in der qRT(b) mit MMS-FC Werten (Tag 3-7) von < 1 für TIMP1 und geringerer Expression als in der Monozytenkontrolle für TIMP2 . MI = Myokardinfarktgewebe Tag 5. TIMP1: LV 0,00 +/-0,0; n=3; BZ 0,24 +/-0,07; n=3; MI (Kontrolle, Median = 1,0) 0,90 +/-0,05; n=3;MAC 0,51 +/-19; n=3; TIMP2: LV 0,27 +/-0,0; n=3; BZ 0,43 +/-0,07; n=3; MI (Kontrolle, Median = 1,0) 1,10 +/-0,05; n=3; MAC 3,25 +/-0,06; n=3

4.5 Unerwartete Resultate

4.5.1 iNOS Expression

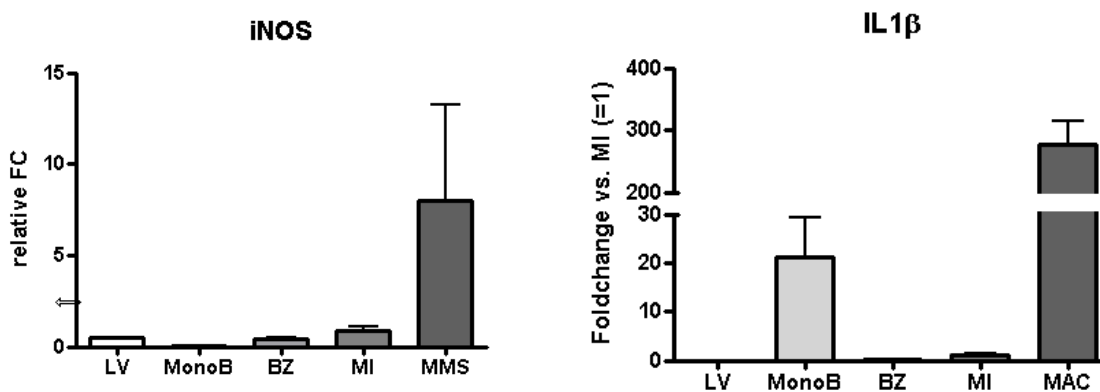
Ogleich im Microarray die Expressionswerte von den M1-Zytokinen IL1 β , Il6 und TNF α makrophagenspezifisch erhöht waren, fiel die Expression iNOS als im Infarkt nur schwach induziert und weit unterhalb des Makrophagen-Schwellenwertes aus dem Rahmen. In der rtPCR-Analyse war die Expression zwar größer als im Infarktgewebe mit einer fünffachen Expression gegenüber Infarktgewebe, zu beachten ist jedoch dass die Resultate hier statistisch nicht signifikant sind (Konfidenzintervall $p < 0,05$: -4,76 - 19,01) und die rtPCR-Ergebnisse von iNOS sich stark von den hochsignifikanten ($p < 0,01$) anderen M1-Markern absetzen (siehe Tabelle 5.8). Obwohl die Ergebnisse auf den ersten Blick diskrepant erscheinen, muss man beachten, dass der Marker für klassisch-aktivierte Makrophagen die NO-Produktion ist. Diese hängt neben der Induktion der NO-Synthase von vielen anderen Faktoren ab, weshalb die Geninduktion von iNOS nicht mit der NO-Syntheseaktivität der Makrophagen gleichgesetzt werden kann, da diese von mehreren Faktoren wie Substratkonzentration und Aktivität konkurrierender Stoffwechselwege sowie speziestypischen Unterschieden abhängt. Interessant ist wiederum dass hierbei die rtPCR sowie Microarrayergebnisse ähnliche Resultate zeigen.

Name	Gensymbol	MMS vs MI	Konfidenzintervall p < 0,05	p-Value
iNOS	Nos2	4,5	-19,01 - 4,76	$p > 0,05$
Interleukin 1 β	Il1b	267,4	205.1 - 344.0	$p < 0,01$
Interleukin 6	Il6	32,59	22.94 - 34.49	$p < 0,01$
Tumornekrosefaktor	TNF α	173,8	140.0 - 224.3	$p < 0,01$

Name	Gensymbol	MI vs WT	Mono vs MI
Makrophagen NO-Synthase, induzierbar	Nos2	2,03	0,65
Endothelzellen NO-Synthase	Nos3	0,59	0,44

Tabelle 4.8: Microarrayergebnisse und rtPCR Resultate von iNOS im Vergleich zu anderen, exemplarisch ausgesuchten M1-Markern. p-Value des Pearson's multiple comparison test (MMS/Infarktmakrophagen gegen MI/Myokardinfarktgewebe Tag 5)

Abb 4.22: Balkendiagramm der rtPCR Ergebnisse iNOS exemplarisch gegenüber IL1 β . **IL1b:** MMS-Isolat der Zeitpunkte 24h nach MI 561,2 +/-46,01 n=2; 5 Tagen (5d) 601,7 +/-68,82 n=3, 12 Tagen (12d) 377,7 +/-114,0 n=3. Kontrollgruppen Linker Ventrikel (LV) 0,02 +/-0,01 n=2 und Myokardinfarktgewebe (MI, Median =1) 1,00 +/-0,26 n=3. **iNOS:** LV 0,49 +/-0,00; n=3; p=0,125; Blutmonozyten (MonoB) 0,04 +/- 0,03; n=3; p=0,125; Borderzone (BZ) 0,42 +/-0,06; n=3; p0,125; MMS-Isolat (MAC) 8,0 +/- 5,2; n=3; p=0,125. Der Myokardinfarkt (Median 1,0) 0,89 +/-0,19; n=3



4.5.2 MMP 9 Expression in Blutmonozyten

In unseren Arrayergebnissen war das Enzym Matrix-Metalloproteinase 9 makrophagenspezifisch exprimiert (siehe Abb. 9.3.2). Bei der rtPCR Nachuntersuchung war dies ebenfalls der Fall – überraschend war jedoch die noch stärkere Expression aus den Blutmonozyten.

Kommunikation mit anderen Arbeitsgruppen legte nahe, dass aus peripherem Blut isolierte Monozyten eine starke intrinsische Expression der MMP9 besitzen. Es bleibt weiterhin unklar, ob diese konstitutiv exprimiert wird (etwa um die Einwanderung ins Gewebe zu erleichtern) oder durch den Isolationsvorgang induziert wird (etwa durch Scherkräfte oder Oberflächeneigenschaften der Behälter) und somit als Artefakt anzusehen ist.

4.5.3 Monozyten zu Makrophagen-Differenzierung

Im Allgemeinen wird zwischen den Monozyten, welche aus dem Blut in Gewebe einwandern und Makrophagen, welche sich dort aus Monozyten differenzieren vor allem durch Nachweis von Membranproteinen wie etwa dem Oberflächenmarker F4/80 unterschieden. Inwiefern sich Monozyten von Makrophagen etwa metabolisch unterscheiden ist kaum geklärt. Bei unseren histologischen Untersuchungen fiel auf, dass sich innerhalb der ersten 2 Tage viele Monozyten in den Infarkt eingewandert waren, von denen die wenigsten schon zu Makrophagen differenziert waren, (Koexpression von Cd11b und F4/80). Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht. Da die Infarktmäuse, welche für die Microarray-Studien verwendet wurden, minimal 3 Tage nach dem Infarkt geopfert wurden, hatte der anfänglich hohe Monozytenanteil kaum Auswirkungen auf die Makrophagen-Isolation (was auch durch die Cytospin-Analyse bestätigt wird). Für die Analysen der selten auftretenden M1/M2-Marker Koexpression wurde auf den sensitiveren MMS-Marker Cd11b zurückgegriffen, um auch eine mögliche Koexpression in der frühen inflammatorischen Phase nachweisen zu können.

4.5.4 TIMP-1 aus unbekannter Quelle

In unseren Array sowie rtPCR-Ergebnissen zeigte sich keine relevante Induktion von TIMP 1 oder 2 in den MMS-Zellen des Infarktes. Während zirkulierende Monozyten eine höhere Transkription vom TIMP-2 zeigten als Infarktgewebe oder MMS-Zellen, zeigte sich im Infarktgewebe eine markante Induktion von TIMP-1, welche jedoch aus anderen Zellen als den Infarktmacrophagen stammen muss (MMS vs. WT < MI vs. WT). Da TIMP-1 eine stark inhibitorische Wirkung auf nahezu die gesamte MMP-Familie besitzt nimmt im Infarkt ein noch nicht identifizierter Zelltyp Einfluss auf die MMP9-Aktivität der Makrophagen.

4.5.5 Deaktivierung des MMS-Systems im Zeitverlauf

Während sich die reziproke Ausprägung der M1/M2-Dynamik sehr gut in die Physiologie der Narbenheilung einordnen lässt (starke Inflammation zu Beginn, zunehmende M2-Aktivierung/Fibrosereaktion im Verlauf) zeigte sich bei den rtPCR sowie immunhistologischen Untersuchungen des Deaktivationsmarkers IL10 unerwartete Ergebnisse: 10 Tage nach Infarkt (während der proliferativen Phase) waren über 90% der Makrophagen IL10-positiv; dies ließe sich mit der Unterdrückung der Inflammationsreaktion und Makrophagenapoptose, welche für die proliferative Phase charakteristisch ist, gut vereinbaren. Auffällig ist jedoch, dass bereits zwei Tage nach MI – während der frühen inflammatorischen Phase – bereits über 50% der Makrophagen ebenfalls IL10 exprimieren und dieser Anteil während der inflammatorischen Phase weiter ansteigt. Unerwartet war hier die hohe Deaktivierung während der frühen inflammatorischen Phase, in welcher der Infarktmacrophage der prominenteste Zelltyp ist.

a

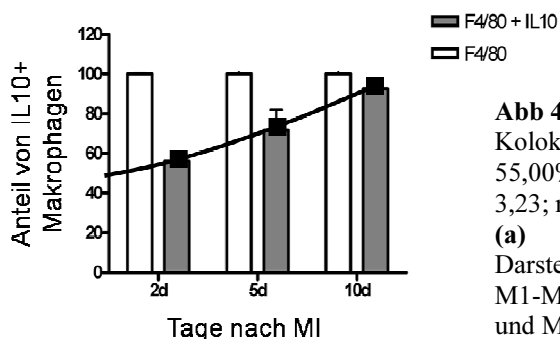
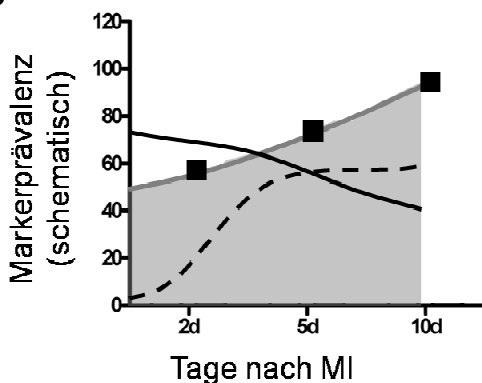


Abb 4.23: Prozentualer Anteil der Kolokalisation IL10 + F4/80: Tag 2 (2d) 55,00% +/-2,89; n= 4; Tag 5 (5d) 70,53% +/- 3,23; n= 6; Tag 10 (10d) 91,60 +/-2,94; n= 4
(a) Darstellung im Kontext zur Dynamik von M1-Makrophagen (durchgezogen, schwarz) und M2-Makrophagen (gestrichelt, schwarz) (b)

b



Zeitpunkt	Kolokalisation [%]	Standartabweichung
2 Tage	56,3	0,4
5 Tage	71,8	22,7
10 Tage	92,5	7,9

Tabelle 4.9: Resultate Kolokalisation IL10 mit F4/80

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unserer deskriptiven Studie konnten wir zum ersten Mal ein Zelltyp-spezifisches Genexpressionsprofil einer Zellpopulation aus dem Infarktgewebe erzeugen. Durch die von uns entwickelte Isolationsmethode und den Interpretationsalgorithmus konnten wir einen Microarrayansatz verwenden, welcher Informationen über die Transkription von 39000 Genen in den Zellen des Monozyten/Makrophagensystems im Zeitfenster der inflammatorischen Phase lieferte. Durch die Untersuchung der Expression der von uns ausgewählten Zielgene an verschiedenen Zeitpunkten der Infarktheilung konnten wir eine Zeitverlaufsanalyse erstellen, welche die Veränderung der Expression von charakteristischen Proteinen während der inflammatorischen und proliferativen Phase verfolgt.

Die Ergebnisse zeigen, dass zu Beginn der Inflammatorischen Phase die M1-Polarisation der Makrophagen dominiert. Im Verlauf der Zeit verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des M2 Typs, ein Trend der sich während der proliferativen Phase weiter fortsetzt. Nach Ablauf von 10 Tagen dominiert der M2 Phänotyp, wobei zu diesem Zeitpunkt eine starke Deaktivations-Komponente besteht, was sich in der von uns beobachteten hohen IL10-Expression widerspiegelt, und welche mit einer drastischen Reduktion der Makrophagenanzahl im Infarkt zum Ende der Proliferationsphase hin einhergeht.

Ferner konnten wir zeigen, dass ein geringer Anteil des MMS eine Koexpression von Markerproteinen des M1 als auch des M2-Phänotyps aufweist, die überwiegende Mehrzahl der Zellen jedoch der klassischen oder alternativen Aktivierungsform folgt.

Neben der Aktivierung im Zeitverlauf konnten wir den Nachweis erbringen, dass mehrere interessante Genprodukte mit Einfluss auf Matrixremodeling, Narbenheilung und interzelluläre Signalgebung exklusiv von den

Infarkt-makrophagen gebildet werden. Insbesondere die makrophagenspezifische Bildung von MMP 13 und Galectin 3 zur Verstärkung der M2-Polarisierung im Sinne einer positiven Rückkopplung wurde nie zuvor beschrieben.

5.2 Stärken und Schwächen der verwendeten Methode

Die Ergebnisse des zelltypspezifischen Genexpressionsprofils haben sich in unserem Setting als sehr robust erwiesen. Die von uns entwickelte Methode besitzt im Wesentlichen drei Schwachpunkte, durch die es potentiell zu experimentellen Artefakten kommen kann:

1. Das Isolieren eines falschen Zelltyps
2. Die Veränderung des Genexpressionsprofils während des Isolationsvorgangs sowie
3. Falsche Resultate durch Messfehler des Microarrays oder Schwächen des Auswertungsalgorithmus (ohne den aus den Rohdaten keine gültigen Aussagen abgeleitet werden können).

Wie wir zeigen konnten isoliert der von uns verwendete Antikörper im Zeitraum der inflammatorischen und proliferativen Phase selektiv Zellen des MMS-Systems. Um dies zu verifizieren nutzten wir die Cytospin-Analyse, die rtPCR Verifizierung und überprüften die Expressionsdaten nach repräsentativen Indikatorgenen für kontaminierende Zelltypen. Das Oberflächenantigen Cd11b wird in der Blutbahn außer von Monozyten/Makrophagen auch von dendritischen Zellen, Neutrophilen Granulozyten sowie Subsets der B-, T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen exprimiert, wobei letztere im Infarkt anteilig an der Zellmasse keine Rolle spielen und neutrophile Granulozyten die Cd11b-Expression verlieren, sobald sie in das Infarktgewebe einwandern, wie *Youker et al* zeigen konnten [116]. Somit besteht im Infarkt lediglich eine Gefahr der Kontamination mit dendritischen Zellen, wobei diese dem MMS zuzurechnen sind und sich tatsächlich aus Monozyten entwickeln.

Um eventuell kontaminierende NG aus dem Isolat zu eliminieren, führten wir Experimente mit einem zusätzlichen Depletionsschritt durch, bei dem wir die Einzelzellsuspension nach dem Verdau durch eine Säule mit Percoll der Dichte 1,074 g/ml zentrifugierten, ein übliches Verfahren um NG von mononukleären Zellen zu trennen. Die Resultate in der FACS-Auswertung unterschieden sich nicht von den Aufreinigungsergebnissen ohne die Gradientenseparation (siehe Abb. 6.1), wobei in den Cytospin-Analysen ebenfalls keine NG (zu erkennen anhand gelappter Kerne in der DAPI-Färbung) entdeckt werden konnten.

In der Auswertung der Arrayergebnisse konnten wir zeigen, dass alle Zielgene, welche sich auf unserer Liste repräsentativer Marker für potentiell kontaminierende Zelltypen befanden, einen FC kleiner 1,5 besaßen (MMS vs. MI). Der von uns gewählte Schwellenwert für Makrophagen-spezifische Transkription von einem $FC \geq 10$ ließ somit einen ausreichenden Sicherheitsabstand, um Kontamination und Fehlmessungen in unseren Zielgenen auszuschließen.

Um das Risiko einer Expressionsveränderung während der Isolation so gering wie möglich zu halten, entschieden wir uns für eine schnelle Isolierung mittels Magnetic Beads. Diese Methode ist zum einen viel schneller (Separation in Minuten) als die FAC-Sortierung (Sortiervorgang länger als eine Stunde), zum anderen werden die Zellen weniger traumatisch behandelt als bei der FAC-Sortierung, bei dessen Separationsvorgang die Zellen mittels Strömung in verschiedene Kapillarsysteme weitergeleitet werden, was mit höheren Scherkräften einhergeht.

Der Nachteil der immunomagnetischen Methode ist, dass lediglich mit einem Parameter – nämlich dem markierten Oberflächenantigen - sortiert werden kann, was weniger präzise ist als flowzytometrische Methoden, bei denen neben mehreren Antikörpern zusätzlich über FCC und SCC die relevante Population selektiert werden kann.

Die Microarrayuntersuchungen selbst haben den Vorteil, dass sie als „Shotgun-Approach“ mit einer einzigen Untersuchung eine maximale Anzahl an Zielen untersuchen können, jedoch den Nachteil der Anfälligkeit für Fehler – einerseits

durch falsche Werte während des Messvorgangs selbst, andererseits durch Fehlinterpretation oder Auswahl der falschen Kontrollproben. Um Fehler in der Isolationsmethode zu minimieren erstellten wir zunächst gepoolte Proben von zwei oder mehr MMS-Isolationen pro Array und erstellten zusätzlich von jedem Probetyp mehrere Microarrays, um Falschresultate ausfindig machen zu können.

Schließlich verifizierten wir jedes der von uns ausgewählten Zielgene mittels RT-PCR und Immunhistochemie, wobei wir die Proben bei der RT-PCR zusätzlich mit Blutmonozyten und Infarkt-Grenzzone verglichen, um die Werte besser einordnen zu können.

Insgesamt zeichneten sich unsere Ergebnisse dadurch aus, dass die im MMS regulierten Gene nicht nur Marker anderer im Infarkt vorkommenden Zelltypen ausschlossen, sondern auch in allen Fällen durch rtPCR und Immunhistochemie verifiziert werden konnten. Die Verifizierung jedes Zielgenes mit zwei unabhängigen Methoden (rtPCR und Immunhistochemie) etablierten die Zuverlässigkeit der Arrayergebnisse bei allen, der von uns untersuchten Zielgenen.

Weitere einschränkende Faktoren sind, dass Monozyten und Makrophagen seit einigen Jahren zunehmend als heterogene Populationen wahrgenommen und immer neue Subtypen beschrieben werden [98, 117, 118], und diese unter Umständen auch nach der Aktivierung und Differenzierung flexibel auf neue Stimuli reagieren und so im Zeitverlauf ihre Expression verändern können [119].

Um auf diese Faktoren einzugehen, entschieden wir uns bei der Entwicklung der Isolationsmethode zum einen für ein Oberflächenantigen mit möglichst breiter Spezifität innerhalb des MMS, um das selektive Anreichern eines Makrophagen-Subtypen zu vermeiden (wie beispielsweise für den Monozyten/Makrophagenmarker CD14 bereits beschrieben [120]), zum anderen für die Verwendung von Mäusen unterschiedlichen Infarktalters (innerhalb des Zeitfensters der proliferativen Phase). Die MMS-Isolation für die Microarray-Auswertung lieferte so gemäß der Studienplanung ein akkurates Übersichtsbild über dessen Genexpression im Infarkt

während der inflammatorischen und proliferativen Phase, die immunhistochemische Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglichte die Aufschlüsselung von Subtypen und deren Prävalenz im Zeitverlauf.

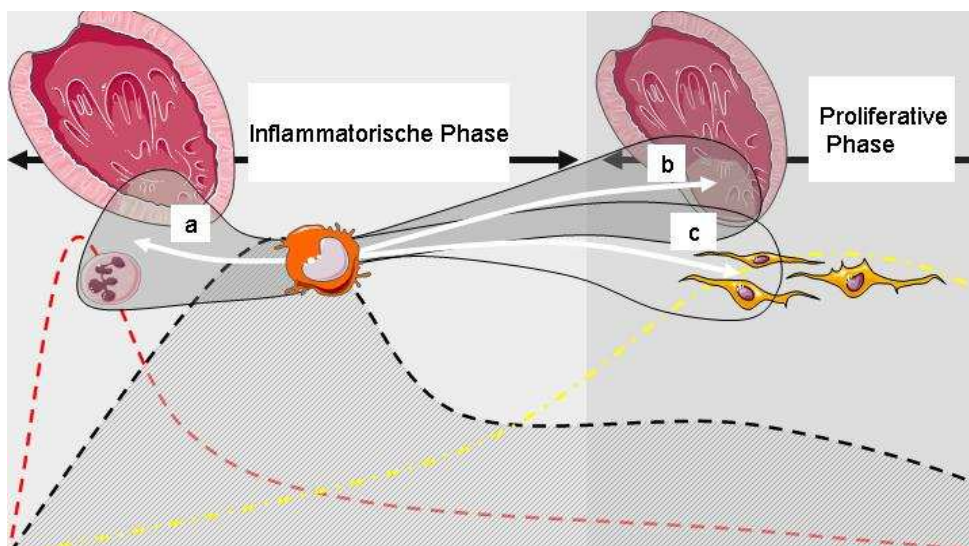
5.3 Die Resultate im Kontext der aktuellen Studienlage

Über den Makrophagen im Myokardinfarkt ist bislang wenig bekannt. Gut beschrieben ist bislang lediglich die Infiltration in das Infarktgebiet durch Blutmonozyten als Vorläuferzellen während der inflammatorischen Phase, sowie die Differenzierung im Gewebe und die Prädominanz des MMS innerhalb dieses Zeitfensters [10, 39].

Abb 5.1:

Gegenwärtiger Konsensus der Makrophagenphysiologie im Infarkt nach Frangogiannis et al[7, 10, 39] und Amerongen et al.[27] und : Der Makrophage wandert zeitlich nach den NG in das Infarktgewebe ein und stellt für die verbleibende Inflammatorische Phase die dominante Zellgruppe. Während dieser Zeit ist der Infarktmacrophage für drei Prozesse in der Infarkttheilung verantwortlich:

Entfernung Zelldebris und apoptotische NG (a), Matrixremodelling u.a. über das MMP-System vor allem während der proliferativen Phase(b) sowie Beeinflussung der Narbenheilung und Stimulation von Fibroblasten über Gewebehormone (c)



Diverse Versuche mit dem Ziel der Makrophagendepletion [27] oder (frühzeitiger) Deaktivierung durch Prednison [11] unterstrichen dessen essentielle Rolle bei der Infarkttheilung, eine experimentelle Untersuchung der Makrophagen betraf bislang

jedoch vielmehr einzelne Expressionsprodukte (MMP/TIMP System, MCP-1) als die Makrophagendifferenzierung an sich. Der bestehende wissenschaftliche Konsensus über die Funktion des Infarktmacrophagen setzt sich aus experimentellen Studien mit Inflammationshemmung und Makrophagendepletion sowie der Beeinflussung einzelner Komponenten der Makrophagenaktivität zusammen.

In unseren Experimenten konnten wir die Infarktmacrophagen zum ersten Mal in die etablierten Modelle der Makrophagenphysiologie einordnen, die Dynamik der Subgruppen definieren und die einzelnen Komponenten der Inflammationsreaktion den entsprechenden Makrophagensubtypen zuordnen. Wir konnten zeigen, dass im Infarkt zu Beginn der inflammatorischen Phase die klassische/M1-Aktivierung dominiert, diese zugunsten des M2-Phänotyps verschoben wird so dass in der späten inflammatorischen Phase bei der Zählung von Makrophagen mit M1 und M2-Phänotyp nur noch eine geringe Prädominanz des M1-Phänotyps festgestellt werden kann und alternativ-aktivierte Makrophagen gegen Ende der proliferativen Phase prozentual überwiegen.

5.3.1 Ursachen der M1/M2-Dynamik nach MI

Bei der von uns gezeigten Verschiebung des M1/M2 Gleichgewichts im Verlauf der Infarktheilung bleibt weiterhin ungeklärt, wie diese Dynamik zustande kommt, wobei grundsätzlich zwei Alternativhypothesen in Frage kommen:

1. Die Konversion von klassisch-aktivierten Makrophagen in den alternativ-aktivierten Phänotyp im Infarktgewebe
2. Keine Umwandlung zwischen den Populationen, die Dynamik kommt durch den Ersatz von Infarktmacrophagen durch Neuinfiltration bei einer geringen Überlebensdauer der Zellen im Gewebe zustande

Unsere Resultate, gemäß denen bereits nach zwei Tagen über 50% der Makrophagen IL-10-positiv in der Immunhistochemie anfärbbar waren, ist ein Indikator für eine ausgeprägte Deaktivierung/Apoptose. Dies ist grundsätzlich eher mit der zweiten Hypothese vereinbar und eine Voraussetzung für einen hohen „Turnover“ im Infarktgebiet.

Bei einer langsamen Konversion der Makrophagen von einem Subtyp in den anderen wäre vielmehr anzunehmen, dass die Überlebenszeit der Makrophagen im Infarkt länger und die Deaktivierung nur gering ausgeprägt wäre, ferner wäre zu erwarten, dass sich ein weit größerer Anteil der Makrophagen in einem Übergangsstadium befindet, in dem Merkmale beider Subtypen exprimiert werden als wir in unseren Kofärbungen beobachten konnten.

Da bekannt ist, dass Makrophagen, welche *in vitro* aus Blutmonozyten differenziert wurden, im Gegensatz zu Gewebemakrophagen im Allgemeinen nur eine kurze Lebensdauer haben, und unfähig sind sich nach Einwanderung im Gewebe zu vermehren [121, 122], lassen sich unsere Beobachtungen mit der Grundlagenforschung gut vereinbaren. Studien anderer Arbeitsgruppen mit markierten Monozyten konnten zeigen, dass die Infiltrationsrate gemessen an der Zelldichte der monozytären Zellen im Infarkt sehr hoch ist [28].

5.3.2 Monozytenpopulationen bei der Infarktheilung

Die Annahme, dass die Dynamik bei der M1/M2-Verschiebung durch eine hohe Infiltrationsrate bei kurzer Lebensdauer entsteht, unterstreicht den Einfluss von Blutmonozyten - den zirkulierenden Vorläuferzellen der Infarktmacrophagen - auf die Infarktheilung.

Eine Arbeit von *Nahrendorff et al* aus dem Jahre 2007 befasst sich mit der Einwanderungsdynamik unterschiedlicher Monozytenpopulationen aus dem Blut in das Infarktgebiet [28]. Die beiden Monozytenpopulationen unterschieden sich durch die Expression von Oberflächenantigenen (Ly6C und Chemokin-/MCP-1 Rezeptor CCR2), wobei im ersten Teil der inflammatorischen Phase (Maximum an Tag 4 post

MI) die CCR2-positiven pro-inflammatorischen Monozyten rekrutiert wurden, danach die Infiltration von CCR-negativen, pro-fibrotischen Monozyten dominierte mit einem Maximum an Tag 7. Nahrendorff konnte zeigen dass MCP-1 (der Ligand von CCR2) die Infiltration in das Infarktgebiet bis Tag 4 kontrolliert, wobei der Mechanismus eine verstärkte Rekrutierung von unreifen Monozyten aus dem Knochenmark zu sein scheint. Der zweite Monozytentyp, welcher in der späten inflammatorischen und frühen proliferativen Phase dominiert wird durch Fraktalkin über den CXCR1-Rezeptor rekrutiert.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe passen gut zu unserem ermittelten Gleichgewicht der Makrophagenpopulationen, insbesondere da bekannt ist, dass MCP-1 nicht nur chemotaktisch wirkt, sondern auch die klassische Aktivierung von Makrophagen begünstigt [59, 123].

Erwähnenswert ist die unterschiedliche Klassifizierungsmethode der Arbeitsgruppe; mononukleäre Zellen im Infarkt wurden als Ly6 positive und negative Monozyten beschrieben, Makrophagen waren während der inflammatorischen und proliferativen Phasen im Gewebe nicht vorhanden. Die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen (ausgeprägte Präsenz von Makrophagen nach Tag 2) kann durch unterschiedliche Definitionskriterien erklärt werden: *Nahrendorff et al* definierten Monozyten als in der Flowzytometrie F4/80-niedrig, Makrophagen dagegen als stark positiv (wobei die Expression von Gewebemakrophagen als Standard diente); nach unserer Definition waren Makrophagen F4/80-positiv mononukleäre Zellen in der Immunhistochemie, während wir Zellsuspensionen in der Flowcytometrie immer als MMS-Isolat bezeichneten.

Ob die Ly6C/CCR2-Populationen unreife Makrophagen oder differenzierte Monozyten darstellen, ist hierbei weniger von Belang als der Einfluss von Entzündungsmediatoren auf zirkulierende Vorläuferzellen des MMS.

5.3.3 Der Einfluss von MCP-1 auf die Inflammation im Infarkt

Neben der chemotaktischen Wirkung, welche für das Monozyte Chemoattractant Protein namensgebend ist, wurde auch dessen Zytokinwirkung mit Beeinflussung zugunsten des klassisch aktivierten Phänotyps (Induktion von IL1 und IL6) bereits beschrieben [123].

Wie *Dewald et al* 2005 im Mausmodell mit MCP-Knockoutmäusen sowie mit MCP-1 Antikörpern zeigen konnten, reduzierte und verlangsamte die Unterbrechung des MCP-1 Signalweges die Infiltration von Makrophagen (nicht jedoch NG) in das Infarktgebiet und reduzierte unter anderem die Expression der M1-typischen Zytokine TNF α und IL1b [17].

Morphologisch zeigt die Störung der MCP-Signalgebung eine gestörte Nekroseauflösung einerseits, andererseits eine Protektion vor dem Postinfarkt-Remodeling:

Im MCP-Knockout zeigte sich eine zeitliche Verzögerung der Nekrosen-Auflösung sowie „mumifizierte Kardiocyten“ (nekrotische Kardiocyten, welche im Zuge der Narbenbildung nicht abgebaut und später in Lamellen fibrotischen Gewebes integriert werden).

Interessanterweise zeigten sich diese Merkmale erstmals bei den katastrophalen Kortisonversuchen mit Infarktpatienten im Jahre 1976 [11], welche mit einer stark erhöhten Ventrikelrupturrate einhergingen.

Ein ähnliches Bild (mit gleichen Komplikationen) zeigten Versuche, bei denen im Mausmodell nach experimentellen Infarkt eine Monozytendepletion mittels Chlodronat-Liposomen erfolgte [27].

Führt man die Chlodronat-Depletion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach MI durch, zeigt sich jedoch, dass nur eine Depletion während der frühen inflammatorischen Phase bis Tag 4 zu dieser charakteristischen Störung der Nekroseauflösung führt. Bei einer Depletion ab Tag 7 sind keine mumifizierten Kardiomyozyten zu beobachten, allerdings eine gestörte Ausbildung der fibrotischen Narbenarchitektur [28].

Der Schutz vor dem Remodeling nach MI zeigte sich durch eine geringere linksventrikuläre Dilatation. Ähnliche Resultate wurden von anderen Arbeitsgruppen erzielt, welche die MCP-1 Signalgebung mittels Gentherapie [16] oder Knockout [124] unterbrachen.

Da die biologischen Effekte von MCP-1 neben der chemotaktische Rolle auch die Beeinflussung des M1/M2-Gleichgewichtes umfassen, können die bisherigen Versuche nicht abschließend klären, ob die Verzögerung der Narbenheilung und der Schutz vor Postinfarkt-Remodeling durch die Unterdrückung der M1-Polarisation oder durch die verminderte Gesamtanzahl an MMS-Zellen im Infarkt zustande kommt.

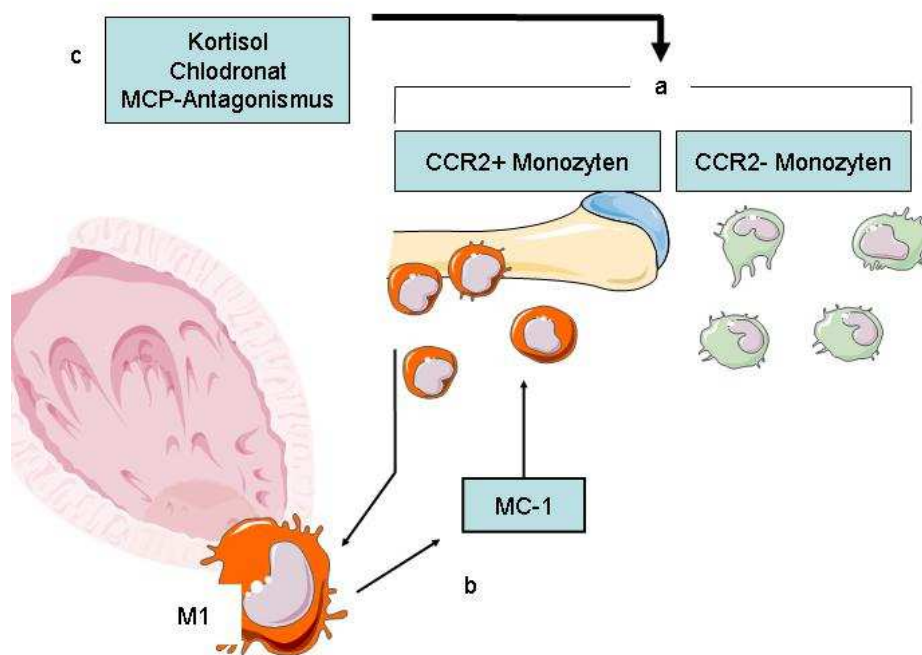


Abb 5.2: MCP-1 und Makrophagenpolarisation:

Nach Nahrendorff et al [28] existieren zwei Monozytenpopulationen, welche in das Infarktgewebe einwandern. In den ersten vier Tagen wandern überwiegend pro-inflammatorische CCR2+ Zellen über den MCP-1 Stimulus in den Infarkt ein, wobei diese Zellen direkt aus dem Knochenmark rekrutiert werden. In der zweiten Phase wandern mehr CCR2-negative Zellen in den Infarkt ein (a). Neben der Rekrutierung proinflammatorischer Monozyten steigert MCP-1 außerdem die TNF α und IL6-Produktion und wirkt somit im Gewebe M1-fördernd (b). Experimentelle Interventionsversuche wie Prednisongabe nach Myokardinfarkt, Postinfarkt-Depletion von Monozyten mittels Chlodronatliposomen oder MCP-Antagonismus erzeugen ähnliche charakteristische morphologische Veränderungen im Infarkt.

5.3.4 Das Matrix-Metalloproteinasen-System

5.3.4.a MMP9

Matrix-Metalloproteinasen sind ein zentraler Bestandteil des Postinfarkt-Stoffwechsels und erreichen im Serum ein Maximum in der inflammatorischen Phase, bevor deren Konzentration und Gewebeaktivität langsam absinkt. In Publikationen mehrerer Arbeitsgruppen, in denen die Serumkonzentration verschiedener MMPs nach Infarkt gemessen wurde, konnten zeigen, dass vor allem MMP9 mit dem Infarktgeschehen sowie dem linksventrikulären Remodeling korreliert. So konnten *Webb et al* zeigen, dass MMP9 in der frühen Phase (inflammatorischen Phase) des MI auf das über hundertfache des Referenzwertes ansteigt um im weiteren Verlauf der Narbenheilung wieder auf moderat erhöhte Werte abzusinken [125]. Ähnliche Resultate konnten von mehreren anderen Arbeitsgruppen erbracht werden – interessanterweise mit dem Ergebnis, dass die MMP9 Spiegel mit Remodeling, LV-Dilatation, dem Brain-Natriuretic Peptide BNP und Herzversagen korrelieren [126-128]. Auffällig ist, dass die maximale MMP9-Plasmakonzentration zeitgleich mit der maximalen M1-Aktivität im Infarktgewebe einhergeht (siehe Abb. 6.3). *Chen et al* konnten ähnliche Aktivitätsprofile in seriellen Zymographieuntersuchungen des Mausinfarktes erbringen [129], hier lag das Maximum der MMP9-Aktivität am vierten Tag post MI.

Bemerkt werden muss jedoch, dass die oben zitierten Studien immer MMP9-Plasmaspiegel oder -aktivität bestimmten – da unsere Ergebnisse jedoch ebenfalls eine erhöhte MMP9-Aktivität in Blutmonozyten nachweisen konnten, scheint es durchaus möglich, dass die gemessenen Konzentrationen durch die nach MI vorkommende Blutmonozytose beeinflusst wurden.

Insgesamt gibt es jedoch zahlreiche Publikationen, welche MMP9 mit (klassischer) Makrophagenaktivierung in Verbindung bringen:

Proteomanalysen von Makrophagenzelllinien, welche in-vitro klassisch aktiviert wurden, zeigten eine Ausschüttung von MMP9 durch Aktivierung mit Infy und LPS

[130], ferner ist bekannt ist dass eine M1-Zytokinumgebung MMP9 induziert, M2-Zytokine jedoch dessen Transkription unterdrücken [131].

In der Zusammenschau der Datenlage erscheint es hoch wahrscheinlich, dass M1-Makrophagen die Quelle von MMP9 im Infarkt sind – hierbei bleibt weiterhin unklar, ob das Remodeling (dessen Ausmaß mit der MMP9-Aktivität korreliert) lediglich auf die proteolytische Enzymaktivität oder die Gesamtaktivität der M1-Makrophagen zurückgeführt werden kann. In letzterem Fall würde eine gesteigerte MMP9-Aktivität vielmehr Ausdruck eines größeren Infarkts mit mehr Makrophagen im Gewebe widerspiegeln.

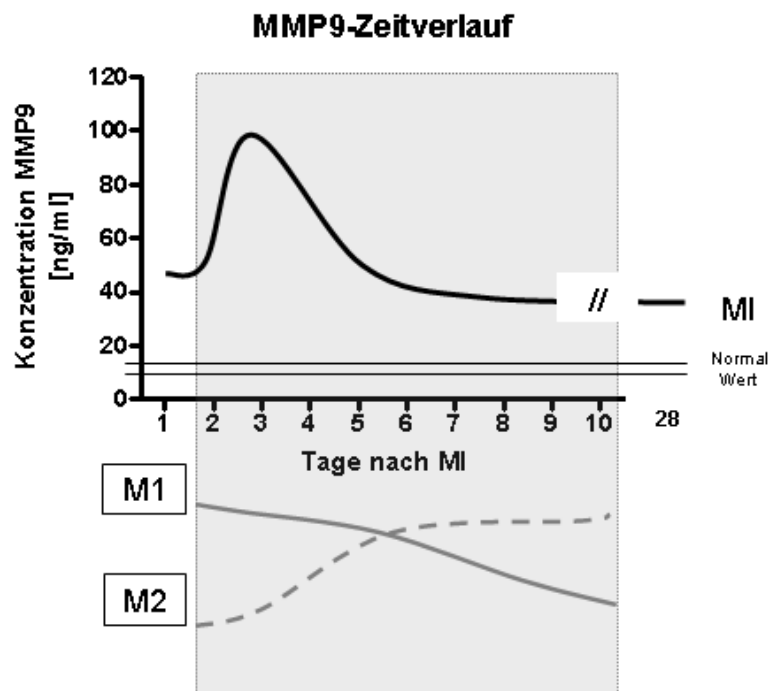


Abb 5.3: Serumkonzentration von MMP9 im Zeitverlauf nach MI, modifiziert nach *Webb et al*[124] (a), darunter die von uns ermittelte M1/M2 Balance (b). Die Maximale MMP9-Konzentration findet in der inflammatorischen Phase statt, zu welcher die meisten Makrophagen M1-polarisiert sind. Je nach Studie findet sich das MMP9-Maximum bis zum 4. Tag post MI – man beachte den Speziesunterschied (a: human, b: murin)

Nach einem MI sind mehrere Subgruppen der MMP-Familie im gesamten Herzen induziert, die von Makrophagen gebildete MMP9 allerdings nur im Infarktgebiet. Mehrere Arbeitsgruppen konnten im Tiermodell und in echokardiographischen Studien an Patienten zeigen, dass die MMP9 Induktion sehr gut mit Zeichen des Postinfarkt-Remodeling (z.B. echokardiographisch nachgewiesene linksventrikuläre Dilatation) korreliert und damit ein negativer Prädiktor für das Outcome der Patienten ist [127, 132, 133].

Kaikita et al [124] beobachteten nach CCR2-Deletion eine geringere Gelatinaseaktivität im Vergleich zu Infarkten vom Wildtyp, was die Pro-M1 Aktivität von MCP-1 erneut unterstreicht.

Bei MMP9-Knockoutmäusen kommt es ähnlich wie bei der MCP-1 Unterbrechung zu einer Reduktion des inflammatorischen Infiltrates, der Kollagendeposition sowie einer Reduktion des Remodelings. Im Gegensatz zu MCP-1, konnte bei MMP9-Knockoutmäusen bei Protektion vor postischämischer Ventrikelruptur festgestellt werden [134], in einer anderen Studie konnten die zu erwartenden gegensinnigen Resultate nach TIMP1-Knockout erreicht werden [135]. Ein paradoxes Resultat ist die Reduktion des Kollagengehaltes im MMP-Knockout, welches noch nicht vollständig geklärt ist – ein durch die entfallene MMP-Aktivität erniedrigte Fibroblastenproliferation könnte dazu beitragen.

Nach Hemmung der MMP-Aktivität wurden von einigen Arbeitsgruppen jedoch auch von einer verzögerten und verlängerten Inflammation mit größerem Nekroseareal berichtet [131, 134].

Ähnlich dem MCP-1/CCR-2 Signalweg scheint mit der Hemmung der MMP/TIMP Achse in ein komplexes Gleichgewicht eingegriffen zu werden.

Bemerken muss man bei all diesen unterschiedlichen Ergebnissen, dass bei der MMP-Inhibition neben einem passenden Zeitfenster auch in Betracht gezogen werden muss, ob lediglich einzelne MMPs oder alle MMPs auf breiter Linie gehemmt werden. Der Prototyp der MMP-Inhibitoren Ilomastat hemmt alle MMP-Familien, betroffen sind in diesem Falle sowohl Infarkt- als auch Remote-Anteile des Ventrikels. Ilomastat-Derivate mit selektiver Spezifität einzelner MMPs sind in der Entwicklung [136]. Zusammenfassung MMP9 im Infarktgewebe:

Allgemein

- Gelatinasen-Familie
- Aktivierung durch die MMPs 2 und 13
- Im Infarkt Makrophagenspezifische Expression
- M1-Enzym
- Im Mensch Maximum während der inflammatorischen Phase

Gelatinaseaktivität und Remodelling

- MMP9-Spiegel bleiben nach dem Infarkt langfristig erhöht
- MMP9-Aktivität korreliert mit Remodelling, LV-Dilatation und Herzversagen

MMP9 Knockout:

- Bild der M1-Hemmung mit Debrisabbaustörung, Hemmung der Infarktinfiltration von Leukozyten
- Verminderte Kollagendeposition, schwächeres Narbengewebe
- Schutz vor Remodelling
- Teilweise kontroverse Resultate unterschiedlicher Arbeitsgruppen

5.3.5 MMP13

Neben MMP9 ist MMP13 das einzige andere Mitglied der Enzymfamilie, welche im MI makrophagenspezifisch exprimiert wird.

MMP13 gehört zur Unterfamilie der Kollagenasen, wobei zu den Substraten des Enzyms auch zahlreiche andere Proteine der ECM wie Fibronectin, Biglycan, Aggrecan und Perlecan gehören [137]. Die Metalloproteinase wird wie auch MMP9 durch die M1-Zytokine IL1 β , IL6 und TNFa induziert, wobei IL1 β die Expression im Vergleich am stärksten heraufreguliert [138]. Neben Assoziation mit Knochen-, Tumor- und Metastasenwachstum ist die Aktivierung von MMP9 durch MMP13 von Interesse: Alle Metalloproteinasen werden zunächst als Proenzyme in die ECM sezerniert und durch limitierte Proteolyse aktiviert. Während MMP13 unabhängig von den meisten anderen MMPs entweder durch eine membranständige Protease oder Plasmin aktiviert werden kann, benötigt MMP9 die limitierte Proteolyse durch entweder MMP13 oder MMP2, um aktiviert zu werden [139].

Da MMP9 ein starker Prädiktor für Remodeling und post-MI Ventrikeldilatation ist, bleibt die MMP13 ein interessantes Ziel, um die MMP9-Aktivität indirekt zu beeinflussen.

5.3.6 Galectin und die alternative Makrophagenaktivierung

Im Gegensatz zu pro-inflammatorischen Proteinen, welche mit dem M1-Phänotyp assoziiert sind, existieren im Kontext des MI keine Versuche, die M2-Polarisation zu modifizieren. Ein vielversprechender Ansatz wäre hierzu der M2-Regulator Galectin3, welcher auch in unseren Microarrayergebnissen stark reguliert ist und in der späten inflammatorischen und proliferativen Phase kontinuierlich stärker exprimiert wird. Wie MacKinnon *et al.* zeigen konnten [114] wird Galectin 3 von M2-Makrophagen produziert, in den Extrazellularraum sezerniert, von wo im Sinne einer positiven Rückkopplung über den Oberflächenrezeptor Cd98 Monozyten in Richtung des M2 Phänotyps differenzieren, die Transkription von M1-Zytokinen hingegen wird unterdrückt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ohne Galectin-Signalgebung die alternative Aktivierung über den IL4/IL13-Aktivierungsweg viel schwächer verläuft als mit intaktem Galectin 3, während exogen eingebrachtes Galectin 3 die M1-Differenzierung erschwerte.

Ähnlich wie die M2-Aktivierung an sich wird Galectin 3 in von vielen Arbeitsgruppen in Zusammenhang mit Gewebefibrose gebracht.

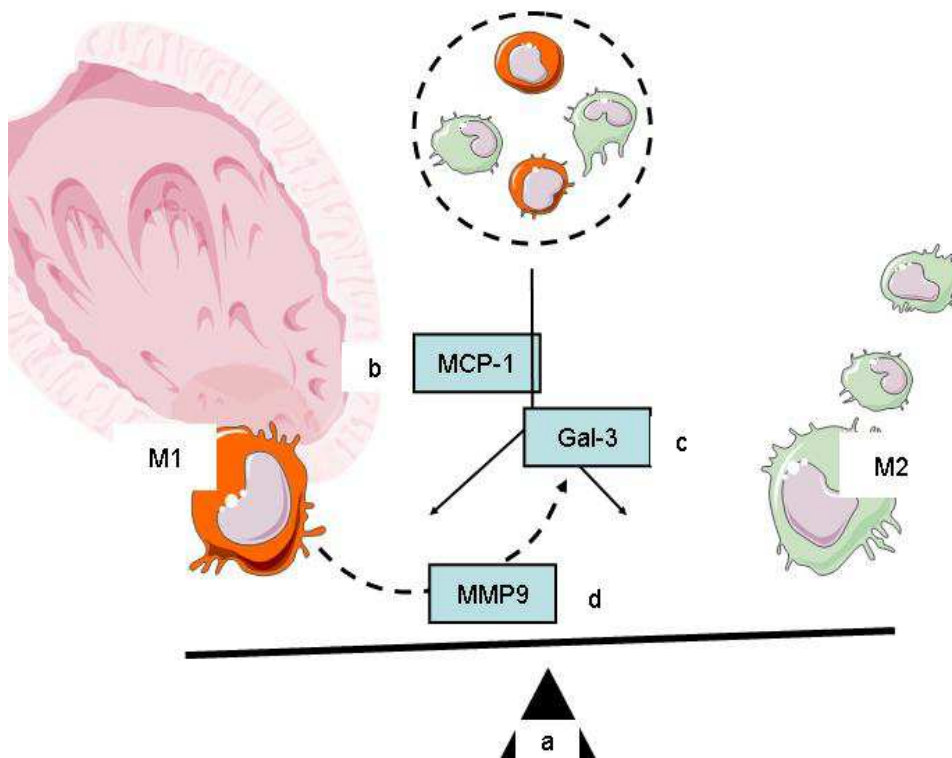
Galectin 3 ist sicherlich als ein vielversprechender Kandidat für zukünftige Studien zu sehen, da durch Galectin nicht die Inflammationsreaktion an sich beendet wird, sondern das Gleichgewicht zwischen M1 und M2-Antwort verschoben wird, und welches daher als wahrscheinlicher Kandidat für den Wechsel von M1 nach M2-Inflammationsreaktion im Infarkt gilt. Hierbei könnten gegebenenfalls die negativen Nebeneffekte der bisher untersuchten anti-inflammatorischen Ansätze (verlängerte Inflammation, Ventrikelruptur und Debris-Abbaustörungen) vermieden werden und gleichzeitig Einfluss auf das Postinfarkt-Remodeling genommen werden. In der für

den Kontext des MI wichtigsten Publikation konnte *Sharma et al* zeigen, dass durch kontinuierliche Infusion von Galectin 3 in den Perikardbeutel von Ratten innerhalb von 4 Wochen ein Herzversagen mit Myokardfibrose erzeugt werden konnte [1]. Da Galectin 3 in vitro und in vivo eine Vielfalt biologischer Funktionen zu haben scheint, folgern manche Autoren, zwischen akuter und chronischer Galectinwirkung zu unterscheiden. In einem experimentellen Setting mit kurzzeitiger Gabe wie dem Mausmodell einer Pneumokokkeninfektion zeigt Galectin 3 chemotaktische Wirkung, erhöht die Phagozytosefähigkeit von NG und die Fähigkeit von Makrophagen, Debris aus apoptotischen NG zu entfernen [140-142], also synergistische Wirkung zu der Makrophagenaktivität in der frühen inflammatorischen Phase. Chronifiziert der M2/Galectin-Stimulus könnte eine überschießend fibrotische Gewebereaktion die Folge sein, welche zum ventrikulären Remodeling mit den Folgen von interstitieller Fibrose, Muskelslippage und linksventrikulärer Dilatation die Folge sein – dem Vollbild des Herzversagens. Die Einflussnahme auf die Galectinexpression konnte in vielen experimentellen Studien deren profibrotische Eigenschaften belegen – unter Verwendung von Mausmodellen der Lungenfibrose, Hydronephrose sowie Chlodronat-induzierter Leberfibrose [2, 111, 143, 144].

Zur experimentellen Manipulation von Galectin bzw. seinem zellulären Rezeptor Cd 98 stehen mittlerweile zahlreiche Substanzen, welche die Lectineigenschaften von Galectin 3 unterstützen sowie Cd98-Antikörper zur Verfügung, auch siRNA-Applikationen wurden bereits erfolgreich umgesetzt [111].

Interessant in diesem Kontext sind auch Publikationen, die Galectin 3 als Substrat von MMP9 identifizieren [145, 146]. Durch die Spaltung in eine 22kD und eine 9kD Domäne wird einerseits die namensgebende Zucker-Affinität erhöht, andererseits die Fähigkeit zur Eigenassoziation mit Bildung von Homodimeren und -oligomeren eingeschränkt [147]. Obwohl diese Beeinflussung durch MMP9 eine interessante Möglichkeit der Interaktion zwischen M1 und M2-Populationen aufzeigt, bleibt zu klären, ob durch die MMP9-Spaltung die biologische Aktivität von Galectin 3 verbessert oder behindert wird.

Abb 5.4: Beeinflussung des Gleichgewichtes von M1/M2-Makrophagen im Myokardinfarkt (a). MCP-1 wirkt chemotaktisch auf die Rekrutierung von Monozytenvorläufern sowie auf die Gestaltung der Inflammationsreaktion (b). Galectin 3, welches von M2-Zellen gebildet und sezerniert wird beeinflusst die Differenzierung von Monozyten zugunsten des M2-Phänotyps (c). M1-Enzymprodukte wie MMP9 interagieren mit Galectin-3 und nehmen so potentiell Einfluss auf die Inflammation im Gewebe (d).



5.3.7 Assoziation zwischen Makrophagensubtypen und klinischer Pathologie

Die Entdeckung von unterschiedlich differenzierten Makrophagensubtypen wirft die Frage auf, wie das M1/M2-Gleichgewicht die Narbenheilung nach MI beeinflusst. Die experimentelle Manipulation dieses Gleichgewichtes erscheint als eine vielversprechende neue Forschungsrichtung.

Durch Auswertung der aktuellen Forschungslage unter Berücksichtigung der Beeinflussung des M1/M2-Gleichgewichtes kann auf einzelne Komponenten der Infarktheilung geschlossen werden, welche durch die Makrophagen-Subgruppen vermittelt werden.

In der Literatur finden sich mehrere experimentelle Studien, in denen die M1-Komponente nach Myokardinfarkt durch unterschiedliche Methoden unterdrückt wurde. Die Hemmung der Makrophagenaktivität in der inflammatorischen Phase durch Cortisongabe, MCP-1 Antagonismus [16, 124] oder durch frühe Makrophagendepletion mit Chlodronatliposomen [11, 27] verhindern die Makrophagenaktivität an sich, während Experimente mit der Antagonisierung von M1-Komponenten wie dem MMP9/TIMP-System Teilaspekte der klassisch aktivierten Makrophagen beeinflussen [134].

Obgleich alle der oben genannten Interventionen im MI vor allem die M1-Aktivität stören, setzen sie doch an unterschiedlichen Mechanismen der Inflammationsphysiologie an. Während Methylprednison, Chlodronat sowie die MCP-Antagonisierung die Einwanderung von Vorläuferzellen in das Myokard unterbricht, haben MCP und Steroidhormone gleichzeitig Einfluss auf die Aktivierung der Makrophagen selbst, während Chlodronat lediglich durch Elimination der zirkulierenden Monozyten wirkt – was in der frühen inflammatorischen Phase anteilmäßig vor allem die mit 80 Prozent dominierenden pro-inflammatorischen Monozyten betrifft [28].

Die Unterbrechung der MMP9-Aktivität greift in die Matrixmetabolismus-Aktivität der Makrophagen ein – da MMP9 ein M1-Produkt ist wird hierbei eine Funktion der klassisch-aktivierten Makrophagen unterdrückt.

Trotz der oben geschilderten unterschiedlichen Interventionsmechanismen können in den Veränderungen der Pathologie der Infarktheilung doch einige Gemeinsamkeiten gefunden werden, welche Hinweise auf die Physiologie der M1-Inflammation liefern. Bei Störung der M1-Komponente wurden in den genannten Studien folgende Veränderungen beobachtet:

1. Verringerter Zelleinstrom sowie Verkleinerung des Infarkt-/Nekroseareals Insgesamt [148].
2. Nekroseabbaustörung mit „Mumifizierten Kardiozyten“, bei manchen Experimenten sogar Ventrikelruptur [27]
3. Länger andauernde Inflammation im Gewebe
4. Weniger Kollagendeposition (auch bei MMP9-Unterdrückung [134]), sowie
5. Schutz vor Remodeling [16, 124]

Bemerkenswert ist hier insbesondere, dass eine Unterdrückung der M1-Komponente einerseits vor ventrikulärem Remodeling schützt, andererseits in der akuten/inflammatorischen Phase bei manchen Studien die Ventrikelrupturrate erhöht. Im Bezug auf die scheinbare Protektion vor dem Postinfarkt-Remodeling bleibt der genaue Mechanismus weiterhin unklar: Möglich wäre etwa die Verkleinerung des Infarktgebietes (möglicherweise weniger Gewebeschädigung durch Radikalbildung) oder die Unterbrechung des fibrotischen Stimulus, welcher die nachfolgende Architekturstörung des Myokards bewirkt.

Trotz der vergleichbaren Resultate können die genannten Experimente keine abschließende Antwort auf die Frage liefern, welche physiologischen Veränderungen die M1-Komponente mit sich bringt, da durch den experimentellen Aufbau häufig mehrere Parameter gleichzeitig manipuliert werden, wie Makrophagenanzahl im Infarkt sowie deren Aktivierungsform (etwa bei Prednisongabe oder MCP-1-Antagonismus).

Zur Komponenten der M2-Reaktion gibt es ungleich weniger experimentelle Daten. In der Literatur fanden sich Experimente, welche Blutmonozyten in der späten inflammatorischen/frühen proliferativen Phase depletierten [28], die M2 Komponente im (zuvor gesunden) Herzen durch Galectin-Infusion in den Herzbeutel manipulierten [149], oder in diversen anderen Mausmodellen die M2-Komponente

aktivierten [2, 111, 143, 144], wobei nur das erste der genannten Experimente wirklich in die Physiologie des Postinfarkt-Stoffwechsels eingriff.

Während die späte Monozytendepletion zu einer verminderten Fibrose und gestörten Narbenarchitektur (ohne Zeichen einer Phagozytosestörung wie mumifizierten Kardiozyten) führt zeigt die (chronische) M2-Aktivierung in verschiedenen Mausmodellen meist zu einer Gewebefibrose mit Organfunktionsstörung – besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die bereits erwähnten Ergebnisse von *Liu et al*, in denen durch chronische Galectingabe Herzversagen erzeugt [149].

Insgesamt werden weitere und spezifischere Experimente benötigt, um den physiologischen Einfluss der M1/M2-Balance auf die Infarktheilung zu zeigen. Die aktuelle Datenlage und unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Schwerpunkt der M1 und M2-Aktivität wie folgt zusammengefasst werden kann:

M1-Phänotyp	<ul style="list-style-type: none"> • Matrixmetabolismus (u.a. über das MMP-System) • Chemotaktischer Stimulus in der inflammatorischen Phase • Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark • Bildung von Sauerstoffradikalen unter Vergrößerung des Zellschadens/Nekroseareals • Insgesamt: Voraussetzung für M2-Aktivität/Infiltration in der späten Phase
M2-Phänotyp	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation der Fibrotischen Reaktion • Aktivierung von Fibroblasten • Assoziation mit Postinfarkt-Remodeling
Beide	Phagozytose, Auflösung der Nekrose

Tabelle 5.1: Charakteristika der Makrophagenpopulationen

5.3.8 Einfluss von zellulärem Turnover, Makrophagendeaktivierung und -apoptose auf die Infarktheilung

Wie unsere Expressionsergebnisse zeigen, ist der Deaktivierungsmarker IL 10 bereits in der frühen inflammatorischen Phase von über 50 Prozent der Makrophagen induziert, was auf einen erhöhten zellulären Turnover hindeutet, in den Gewebemakrophagen nach kurzer Lebenszeit bereits wieder deaktiviert (und durch Neueinwanderung ersetzt) werden.

Während Kortison und Makrophagendepletion deletär auf die Stabilität des Gewebes wirken, ist das für die Verstärkung des IL10-Signals scheinbar nicht der Fall:

Wie Krishnamurty et al. in einem MI-Mausmodell mit exogener IL10-Gabe zeigen konnten, wird durch eine Verstärkung der IL 10 Aktivität nicht nur die Inflammation (gemessen an den M1-Produkten Il6, TNF α , MCP-1 und IP-10) und das Remodeling reduziert, sondern auch die durch das Remodeling beeinflussten funktionellen Parameter (linksventrikulärer früher systolischer und diastolischer Durchmesser; LVESD und LVEDD) [150]. Diese Resultate konnten von einer weiteren Arbeitsgruppe mit ähnlichem Versuchsaufbau bestätigt werden [151].

Interessanterweise existieren vergleichbare Resultate in Modellen der dermalen Wundheilung: Hier führt eine IL10-Überexprimierung zur Wiederherstellung der normalen Hautarchitektur bei verminderter Kollagendeposition und Narbenbildung [152].

Obwohl IL10 als Makrophagendeaktivator sowohl M1 als auch M2-Populationen deaktiviert, erscheint auffällig, dass in den Publikationen immer die Unterdrückung der (M1-typischen) Zytokine und Enzyme Il6, TNF und MMP9 genannt werden, wobei über den Einfluss von IL10 auf den M2-Phänotyp oder dessen Komponenten nichts bekannt ist.

Eine Verstärkung der IL10-Wirkung scheint sich laut einigen Studien günstig auf die Infarktheilung auszuwirken. Allerdings konnte am Herzen kein entgegen gerichteter Effekt durch IL10-Knockout beobachtet werden; *Zymek et al* beobachteten, dass

IL10^{-/-} Mäuse keine erhöhte Mortalität aufwiesen und pro-inflammatorische Zytokine lediglich transient erhöht waren [153].

Insgesamt scheint sich nach bisherigen Erkenntnissen eine Makrophagendeaktivierung durch IL10 günstig auf den Heilungsverlauf auszuwirken, wobei zumindest die Unterdrückung der M1-Komponente gut dokumentiert ist.

Eine mögliche Erklärung für die scheinbar stärkere Unterdrückung der M1-Komponente könnte sein, dass bei hoher Infiltrationsdichte eine Verkürzung der Lebensdauer der MMS-Zellen das Inflammationsgleichgewicht schneller in Richtung der später einsetzenden M2-Inflammation verschoben wird.

5.3.9 Klinischer Ausblick: Individuelle Unterschiede in inflammatorischer Prädisposition und Infarktheilung

In der experimentellen Forschung ist die Minimierung von interindividuellen Abweichungen Ziel und Qualitätsmerkmal. Dies wird unter anderem durch streng kontrollierte Versuchstiere, ein Keim- und noxenarmes Umfeld sowie dem standardisierten Versuchsablauf gewährleistet.

In der klinischen Forschung und Praxis sind die interindividuellen Unterschiede des Inflammations-Gleichgewichts denkbar hoch und umfassen potentiell Aspekte des Patientenverhaltens (wie Diät oder Nikotinkonsum), Genetik und Metabolismus (Insulinresistenz, Obesitas, Blutmonozytose, diastolische Relaxationsstörung) und iatrogene Komponenten (unter anderem Medikamente wie Kortikoide/Steroidhormone oder Antidiabetika wie Rosiglitazon). Idealerweise kann die Berücksichtigung von Faktoren wie den oben genannten dazu beitragen, Risikopopulationen für Komplikationen ausfindig zu machen oder als Einschlusskriterien für klinische Studien zu dienen, um ein Patientenkollektiv zu finden, welches von einem Eingriff in die Inflammationsbalance am meisten profitiert.

Mittlerweile bestehen Hinweise für die Assoziation von Inflammation und Obesitas. Insbesondere die MCP1-Produktion von Adipozyten [154-156], sowie die Entdeckung pro-inflammatorischer Adipositas-assoziierten Makrophagen [156] suggerieren, dass Patienten mit dem Risikoprofil des metabolischen Syndroms eine ausgeprägtere M1-Komponente nach MI haben, wobei die überschießende klassische Aktivierung zu vermehrter Zellzerstörung und größerem Infarktareal führen kann. An dieser Stelle sollen einige klinische Charakteristiken aufgelistet werden, welche in das komplexe Gleichgewicht der Inflammation eingreifen:

	Parameter	Beschreibung	Quelle
M 1	Obesitas/Insulinresistenz „High Fat Diet“	MCP-1 Bildung im Fettgewebe, chronischer M1/Monozytenstimulus	[154- 156]
	Blutmonozytose nach MI	Ausdruck pro-inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark	[28, 157]
M 2	diastolische Relaxationsstörung	Verschlechterung durch weiteren Fibrorestimulus	[1]
	Einnahme von PPAR γ - Agonisten (z.B. Rosiglitazon)	PPAR γ ist ein intrazellulärer Regulator der alternativen Makrophagenaktivierung	[158]

Tabelle 5.2: Potentielle klinische Parameter im Zusammenhang mit der individuellen Inflamationsprädisposition

5.4 Bedeutung der Studie

Die Ergebnisse unserer Studie verändert und vertieft das Verständnis, wie Infarktmacrophagen zur Narbenheilung beitragen, wobei das von uns vorgestellte Modell Erklärungsansätze für zahlreiche Pathologien und Komplikationen liefert, welche nach einem abgelaufen MI entstehen.

Das bisherige Wissen über die Makrophagenaktivität lässt sich wie in der Einleitung beschrieben zusammenfassen: Monozyten/Makrophagen infiltrieren das Gewebe während der inflammatorischen Phase, klären die vorhandenen Nekrosen und wirken

mit zahlreichen Enzymen auf den Matrixmetabolismus ein; schließlich setzt der Infarktmacrophage eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen frei, welche die Bildung von Narbengewebe beeinflussen, u.a. durch Stimulation von Fibroblasten [7].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Infarktmacrophagen eine heterogene Population darstellen, wobei die zwei wesentlichen Subgruppen die klassisch und alternativ-aktivierten Makrophagen sind, welche auf unterschiedliche Weise auf die Infarkttheilung einwirken und deren prozentuale Anteile sich im Zeitverlauf in charakteristischer Weise zueinander verschieben. Unsere Resultate unterstützen die Annahmen anderer Arbeitsgruppen, dass eingewanderte Monozyten/Makrophagen eine kurze Halbwertszeit bei starker Deaktivationskomponente besitzen und beständig aus dem Blut ersetzt werden – dies hebt die Bedeutung der Blutmonozyten als Vorläuferzellen hervor, welche bereits vor Einwanderung in das Gewebe pro- oder anti-inflammatorisch beeinflusst werden können und bringt Studien über Blutmonozytose und klinisches Outcome, chronische Inflammation, Obesitas und Insulinresistenz, aber auch neuartige Interventionsmethoden wie zum Beispiels PPAR γ -Agonisten in Zusammenhang mit der Infarkttheilung [28, 157-159].

Unsere Studie führt zu einer neuen Blickrichtung auf die Infarkttheilung: Bisher wurde die Inflammationsreaktion entweder als Ganzes unterbrochen [11] oder Teilkomponenten der M1-Aktivität manipuliert [1, 17].

Nach Auswertung unserer Resultate, insbesondere der Dynamik der M1 und M2-Populationen finden sich Indizien, dass insbesondere die in der späten Phase dominierenden M2-Makrophagen für die Narbenheilung einerseits, aber bei chronischer Aktivität auch für das nach Abschluss der Narbenheilung auftretende Remodeling mit, Gewebefibrose, Muskelslippage mit folgender Dilatation verantwortlich sind. Nachdem in der Vergangenheit bevorzugt die Reduktion der Inflammation an sich erforscht wurde, erscheint die Manipulation des M1/M2 Gleichgewichtes im Infarkt als neue interessante Forschungsrichtung.

5.5 Unbeantwortete Fragestellungen – Weitere Experimente

Da bislang alle experimentellen und klinischen Studien zeigten, dass eine Unterbrechung der Inflammation sich nachteilig auf die Infarktheilung auswirkt, wurden in den letzten Jahrzehnten zunehmend dazu übergegangen, Teilaspekte der Inflammationsreaktion wie MCP-1, das MMP/TIMP-System oder einzelne Zytokine zu beeinflussen. Da unsere Resultate unterschiedliche Typen der Inflammation im Infarkt nachweisen, die an spezifische Makrophagenpopulationen gebunden sind, erscheint ein Verschieben des M1/M2-Gleichgewichtes als neue interessante Forschungsrichtung. Strategien, die gleichzeitig die Gesamtzahl der infiltrierenden Zellen herabsetzen wie Experimente mit Kortison oder Monozytendepletion [27] sind hierbei weniger geeignet, da sie sowohl die M1 als auch die M2-Komponente beeinflussen, da die letztere zeitlich auf der frühen Phase aufbaut und die Ansätze zum anderen mehrere Parameter (Zellzahl und Zellaktivität) gleichzeitig beeinflussen, werden besser geeignete experimentelle Ansätze benötigt. Vielversprechende Ansätze wären hierbei:

1. Ein experimentelles Verschieben des M1/M2-Gleichgewichtes zugunsten des M2-Phänotyps
 - Reduktion der Infarktexpansion durch M1-inflammatorische Gewebetoxizität
 - Weiterhin erhaltene Narbenheilung
2. Beschleunigung des Zellulären Turnovers
 - Durch Augmentation des IL10 / M2b-Phänotypes schnellere Deaktivierung der M1-Komponente
 - Zeitlich früheres Erreichen der proliferativen Phase
 - Schnellere Stabilisation der Infarktnarbe
3. Beenden der M2-Inflammation nach Abschluss der proliferativen Phase
 - Schutz vor Remodeling durch Unterbrechen der Fibroblastenstimulus

6 Schlussfolgerung

Die im Myokardinfarkt während der inflammatorischen Phase vorkommenden Makrophagen gehören im wesentlichen entweder zur Population der klassisch-aktivierten M1 oder alternativ-aktivierten M2-Makrophagen. Ein von uns erstmalig beobachteter neuartiger Typus mit gleichzeitiger Koexpression von M1 und M2 Markern kommt bevorzugt in der proliferativen Phase vor und bewegt sich im niedrig-einstelligen Prozentbereich – weitere Studien sind notwendig um diesen Subtyp weiter zu definieren und seine Relevanz zu erforschen.

Im Verlauf der inflammatorischen Phase bewegt sich das Gleichgewicht von der Dominanz des M1-Phänotyps gegen Anfang der Inflammatorischen Phase zum Überwiegen des M2-Phänotyps während der proliferativen Phase.

Die von uns nachgewiesene starke Deaktivierung (IL10-Koexpression) legt im Kontext anderer Studien nahe, dass die MMS-Population eine kurze Lebensdauer besitzt und durch permanenten Einstrom von Blutmonozyten aufrecht erhalten wird. Eine experimentelle Beeinflussung der Inflammation im Gewebe kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen:

1. Beeinflussung der Monozyten im Blutstrom vor Infiltration und Differenzierung
2. Beeinflussung des M1/M2 Gleichgewichtes im Infarktareal

Unter Berücksichtigung unserer bisherigen Erkenntnissen wäre von einer Verstärkung der M2-Komponente (wie zum Beispiel durch eine Infusion von Galectin 3 ab Tag 2-3 nach MI) eine geringere Radikalschädigung des Gewebes mit kleinerem Nekroseareal und schnellerer Narbenheilung zu erwarten, potentiell allerdings auch ein verstärktes Remodeling nach Abschluss der Narbenbildung – in zweiter Linie wären Strategien, welche zur Termination der Inflammationsreaktion *nach Beendigung* der Narbenbildung führen erwägenswert, um das Postinfarkt Remodeling zu reduzieren (manche Autoren vermuten, dass dies unter anderem ein

Wirkmechanismus von ACE-Hemmern und Statinen bei der Reduktion des Remodelings sein könnte) [160, 161].

Im Patienten ist bereits vor Einsetzen eines Myokardinfarktes eine Balance zwischen M1 und M2-Komponenten vorhanden. Wie sich eine Prädisposition zu einer bestimmten Inflamationsrichtung auf die Infarktheilung auswirkt, wäre von erheblicher klinischer Relevanz. Als vielversprechende klinische Parameter könnten Blutmonozytose, Adipositas oder Diabetes für die M1-Komponente, das Vorliegen einer diastolischen Herzinsuffizienz für eine Neigung zur M2-Inflammation in Frage kommen.

7 Zusammenfassung

7.1 Deutsch

Das Objekt dieser Forschungsarbeit war die Population des Monozyten und Makrophagensystems im murinen Myokardinfarkt. Gemäß unseres Studienkonzeptes isolierten wir MMS-Zellen aus Myokardinfarktgewebe während der inflammatorischen und proliferativen Phasen, erzeugten ein Microarray-Profil und konnten dank eines neuartigen, von uns entwickelten Auswertungsalgorithmus die in Makrophagen induzierten Gene auffindig machen sowie die Resultate mittels rtPCR, Cytospin und Immunhistochemie verifizieren.

Im Myokardinfarkt infiltrieren Blutmonozyten während der inflammatorischen Phase das Infarktareal, wo sie zu Makrophagen differenzieren und zunehmend die neutrophilen Granulozyten als dominante Zellpopulation ablösen.

Unsere Forschungsergebnisse zeigen, welche der im Infarkt regulierten Gene in Makrophagen induziert sind. Darüber hinaus galt unser Studienfokus dem Aktivierungstyp der Makrophagen. Hier konnten wir zum ersten Mal nachweisen, dass zwei Populationen im Infarkt existieren, deren prozentuale Anteile einer

Dynamik im Zeitverlauf unterliegen: überwiegt gegen Anfang der klassisch-aktivierte (M1) Makrophage, bei geringer Präsenz von alternativ-aktivierten (M2) Makrophagen, so nimmt der M2-Anteil im Verlauf der inflammatorischen Phase zu, bis er während der proliferativen Phase leicht überwiegt.

Unsere Ergebnisse lassen eine neue Einordnung bisheriger experimenteller Studien zu, welche sich mit Beeinflussung der Inflammation und/oder einzelner Produkten von M1 und M2 Makrophagen im Infarkt befassen.

Die Auswertung dieser Daten legt nahe, dass der M1-Makrophage für die mechanische Stabilität des Infarktareals essentiell ist, die Grundlage für weitere Infiltration von Zellen in das Infarktareal herstellt, welche dann für die eigentliche Bildung von Narbengewebe sorgen. Die experimentelle Unterdrückung der M1-Makrophagen oder deren Aktivität resultiert häufig in Komplikationen wie Ventrikelruptur, vermindertem Kollagengehalt und der Störung des Nekroseabbaus, eine überschießende M1-Aktivierung ist mit Expansion des Infarktareals und erhöhter Nekrosebildung assoziiert.

Die Aktivität des M2-Makrophagen, welche gegen Ende der inflammatorischen Phase zunimmt, ist mit Beendigung der Inflammation und Regulationen der Fibroseantwort assoziiert. Die Studienlage deutet darauf hin, dass für die M2-Aktivität eine vorhergehende M1-Reaktion benötigt wird. Da chronische M2-Aktivität mit Myokardversagen assoziiert ist, liegt nahe, dass die prolongierte alternative Aktivierung zum ventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt beiträgt. Weiterhin zu klären ist, welche Rolle ein von uns identifizierter Makrophagensubtyp hat, der Oberflächenmarker von M1 und M2-Makrophagen aufweist und der bevorzugt während der proliferativen Phase beobachtet wurde.

Unsere Resultate ermöglichen neue Einsichten in die Physiologie der Infarkt-makrophagen und der Inflammationsreaktion, welche die Basis weiterer Studien ist, insbesondere der experimentellen Verschiebung des M1/M2-Gleichgewichtes und der späten Termination der Inflammationsreaktion nach Abschluss der Narbenbildung. Bei einer möglichen klinischen Applikation wird in

Zukunft der intrinsische Inflammationsbalance der Patienten eine große Rolle spielen, der bei Patienten interindividuell unterschiedlich ausgeprägt sein kann.

7.2 English

Object of our study was the population of monocytes and macrophages in a murine model of myocardial infarction. According to our study design we isolated MMS-cells from infarcted tissue within the time frame of the inflammatory and proliferative phase. After the creation of a microarray profile and development of a novel interpretation algorithm we were able to detect induced genes of macrophage origin and verify our results with rtPCR, Cytospin preparations and immunohistochemistry.

In the inflammatory phase after myocardial infarction, blood monocytes infiltrate the area of infarction where they differentiate into macrophages which continue to replace the neutrophil granulocytes as the most dominant cell population in the area of ischemia.

Our results show which of the genes upregulated in myocardial infarction originate from macrophages. The analysis of these genes gives us a better understanding of macrophage physiology in myocardial infarction. Our main focus was to study the activation type of the macrophages. We proceeded to show for the first time that two populations of macrophages exist in the infarcted tissue and that the prevalence of each proportion had a distinctive dynamic over time:

The classical activated (M1) macrophage predominating at the beginning of the inflammatory phase and the alternative-activated (M2) macrophage which rises in proportion during the inflammatory phase until it predominates slightly over the M1-type during the Proliferative Phase.

Our results allow for reevaluation of existing studies with the subject of inflammation or manipulation of products of either M1 or M2 macrophages.

The current state of research supports the hypothesis that the M1-macrophage activity is essential for the mechanical stability of the ischaemic myocardium and the

basis for further infiltration of other cells into the area of infarction which in turn are responsible for scar formation. The suppression of M1 macrophages or their activity generally results in complications like ventricular rupture, decreased content of collagen in the scar tissue and disrupted clearance of necrotic debris. An increased M1 activity is associated with expansion of necrosis and area of infarction.

The activity of the M2-macrophage which is enhanced at the end of the inflammatory phase is associated with the termination of inflammation and the regulation of the fibrotic reaction in the scar tissue. Research by other study groups suggest that M2-activity needs to be preceded by at least a certain level of M1 activity. Since chronic M2-activity is associated with tissue fibrosis and specifically cardiac failure the prolonged presence of alternative activated macrophages is a likely candidate to induce postischaemic ventricular remodelling

Our results suggest that the half-life of the macrophages within the ischaemic tissue is rather short and the population needs to be constantly replaced by blood monocytes migrating into the site of infarction. Further research is necessary to elaborate on the role of the new type of macrophage which bears surface markers of both M1 and M2 phenotype macrophages and which was detected most frequently during the proliferative phase of myocardial infarction.

Our results give new insights into the physiology of macrophages and the inflammation-reaction following myocardial infarction which can serve as ground for further studies, including the experimental manipulation of the M1/M2 balance and the late termination of the inflammatory response after scar tissue formation is completed. Regarding the clinical application the intrinsic state of inflammation will have to be brought into focus because of the inter-patient variability and the ability and its affect on clinical outcome.

8 Abkürzungen, Tabellen, Bilder

8.1 Abkürzungen

Abkürzung	Begriff	Erste Nennung auf Seite
ADC	Arginin-Decarboxylase Reaktion	21
BM	Blutmonozyten	5
BNP	Brain Natriuretic Peptide	108
ECM	Extrazelluläre Matrix	5
EF	Ejektionsfraktion	10
FB	Fibroblasten	7
FC	Fold Change	60
FR	Freie Radikale	5
FSC	Forward Scatter	46
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten Koloniestimulierender Faktor	13
IFN- γ	Integerson- γ	15
IL10	Interleukin 10	17
iNOS/NOS2	Indozierbare NO-Synthase	15
IP-10	Interleukin induzierbare Protein	26
LPS	Lipopolysaccharid	15
LVEDD	Left Ventricular Early Diastolic Diameter	118
LVESD	Left Ventricular Early Systolic Diameter	118
M1	Klassische Makrophagenaktivierung	12
M2	Alternative Makrophagenaktivierung	12
MA	Makrophagen	5
MCP-1	Makrophagen-Chemotaktisches Protein	24
MI	Myokardinfarkt	1

MMP	Matrix Metalloproteinase	7
MMS	Monozyten-Makrophagen System	5
NG	Neutrophile Granulozyten	4
NO	Stickstoffmonoxid	14
ODC	Ornithin-Decarboxylase Reaktion	20
RIVA	Ramus interventrikularis anterior	4
RSS	Radikale Sauerstoffspezies	14
siRNA	Silencer RNA	90
SSC	Side Scatter	46
T2M	Typ 2 Makrophage	22
TGFβ	Transforming growth factor beta	15
TIMP	Tissueinhibitor of Matrix Metalloproteinase	13
TLR	Toll-like Receptor	12
TNF	Tumornekrosefaktor	14

8.2 Tabellen

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 1.1	Therapiestrategien Myokardinfarkt	2
Tabelle 1.2	Gewebereaktionen mit M2-Beteiligung	16
Tabelle 1.3:	Charakteristika unterschiedlicher Makrophagenphenotypen	19
Tabelle 2.1:	Antikörper Flowcytometrie	33
Tabelle 2.2:	Antikörper Immunhistochemie	34
Tabelle 2.4:	Rezeptur ADS-Puffer	37
Tabelle 2.5:	Rezeptur Lysepuffer	38
Tabelle 2.6:	Rezeptur Zellisolationslösung	39
Tabelle 3.1:	Pool-RNA für Microarrayanalysen	40

Nummer	Titel	Seite
Tabelle 3.2:	Antikörper-Inkubationsprotokoll	43
Tabelle 3.3:	Inkubationsschema Imunhistochemie	50
Tabelle 3.4	Zielkonzentrationen RNA	52
Tabelle 3.5	Einsatzmenge DNA-free kit	52
Tabelle 3.6	Agarose-Gelelektrophorese	56
Tabelle 3.7:	Inkubationsschema RT-PCR	57
Tabelle 3.8	Ansatz RT-PCR	59
Tabelle 3.9:	Zykluseinstellungen qRT-PCR	60
Tabelle 3.10	Arraydatensätze und Ausgabeparameter	63
Tabelle 4.1	Charakteristiken des Datensatzes	73
Tabelle 4.2.	Microarrayergebnisse Markergene	64/75
Tabelle 4.3	rtPCR Ergebnisse M1	77/78
Tabelle 4.4	rtPCR Ergebnisse M2	80
Tabelle 4.5	Microarrayergebnisse Gal3	91
Tabelle 4.6	Microarrayergebnisse MMPs	92
Tabelle 4.7	Microarrayergebnisse TIMPs	93
Tabelle 4.8	iNOS im Vergleich zu anderen M1-Genen	94/95
Tabelle 4.9	Resulatae Kolokalisation IL10 – F4/80	88
Tabelle 5.1	Charakteristika der Makrophagenpopulationen	117
Tabelle 5.2	Klinische Parameter und Inflammation	120

8.3 Abbildungen

Nummer	Titel	Seite
Abb 1.1	Zellpopulationen des Myokardinfarktes im Zeitverlauf	8

Nummer	Titel	Seite
Abb 1.2	Narbenheilung unterschiedlicher Spezies	11
Abb 1.3	Der Argininmetabolismus des Makrophagen	22
Abb 1.4	Monozytenheterogenität	24
Abb 3.1	Darstellung der Herzentnahme	41
Abb 3.2	Darstellung MAC-Sortiervorgang	44
Abb 3.3	Dichtezentrifugation	45
Abb 3.4	Grundlagen der Fluoreszenz-Zytometrie	47
Abb 3.5	Auswertung Nanodrop	55
Abb 3.6	SYBR-Green RT-PCR	58
Abb 3.7	Taq-Man RT-PCR	58
Abb 3.8.	Das Microarray-Prinzip	61
Abb 3.9	Auswertungsalgorithmus 1- Schwellenwertbestimmung Microarray	64/65
Abb 3.10	Auswertungsalgorithmus 2	66
Abb 3.11	Gesamtalgorhtmus	67
Abb 4.1	Kaplan Mayer Kurve Mauseinfarkte	69
Abb 4.2	HE-Färbung Mauseinfarkt	69
Abb 4.3	Cd11b-Aufreinigung	70
Abb 4.4	FACS-Evaluation der MMS-Isolation	71
Abb 4.5	Cytospin-Immunozytometrie	72
Abb 4.6	Festlegung des Schwellenwerts	72
Abb 4.7	M1-Markergene	76
Abb 4.8	rtPCR: Tnf und iNOS	77
Abb 4.9	M2-Markergene	97
Abb 4.10	M2-Markergene II	79
Abb 4.11	rtPCR: Zeitverlauf M1	81
Abb 4.12	rtPCR: Zeitverlauf M2	82
Abb 4.13	Immunhistochemie – M1	84

Nummer	Titel	Seite
Abb 4.14	Immunhistochemie – M2	85
Abb 4.15	Immunhistochemie – Deaktivierung	86
Abb 4.16	Zeitverlauf M1/M2 Phänotyp	87
Abb 4.17	Kofärbung Cd11b – IL1 β -Mrc1	89
Abb 4.18	Kofärbung Cd11b–TNFa-Mrc1	89
Abb 4.19	Galectin 3 im MI	91
Abb 4.20	Matrix-Metalloproteinasen im Infarkt	92
Abb 4.21	TIMPs im Infarkt	93
Abb 4.22	iNOS im Vergleich	95
Abb 4.23	Deaktivierung der Makrophagen	97
Abb 5.1	Bisheriges Makrophagenmodell	102
Abb 5.2	MCP und Makrophagenpolarisation	107
Abb 5.3	MMP9-Aktivität im Zeitverlauf	109
Abb 5.4	Inflamationsgleichgewicht im MI	114

9 Literaturverzeichnis

1. Sharma, U.C., et al., *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. Circulation, 2004. 110(19): p. 3121-8.
2. Sasaki, S., Q. Bao, and R.C. Hughes, *Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies*. J Pathol, 1999. 187(4): p. 481-9.
3. *Todesursachen in Deutschland*, S. Bundesamt, Editor. 2007, Statistisches Bundesamt Wiesbaden. p. 9.
4. Julian, D.G., J.C. Cowan, and J.M. McLenachan, *Cardiology*. 8th ed. 2005, Edinburgh ; New York: Saunders. p.
5. Dargie, H., *Heart failure post-myocardial infarction: a review of the issues*. Heart, 2005. 91 Suppl 2: p. ii3-6; discussion ii31, ii43-8.
6. Holmes, J.W., T.K. Borg, and J.W. Covell, *Structure and mechanics of healing myocardial infarcts*. Annu Rev Biomed Eng, 2005. 7: p. 223-53.
7. Frangogiannis, N.G., *Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts*. Curr Med Chem, 2006. 13(16): p. 1877-93.
8. George, J.C., *Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials*. Transl Res. 155(1): p. 10-9.
9. Joggerst, S.J. and A.K. Hatzopoulos, *Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers*. Expert Rev Mol Med, 2009. 11: p. e20.
10. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. 53(1): p. 31-47.
11. Roberts, R., V. DeMello, and B.E. Sobel, *Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction*. Circulation, 1976. 53(3 Suppl): p. I204-6.
12. Maroko, P.R., et al., *Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion*. J Clin Invest, 1978. 61(3): p. 661-70.
13. Granger, C.B., et al., *Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMplement inhibition in Myocardial infarction*

- treated with Angioplasty (COMMA) trial. Circulation, 2003. 108(10): p. 1184- 90.*
14. Baran, K.W., et al., *Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. Circulation, 2001. 104(23): p. 2778-83.*
 15. Faxon, D.P., et al., *The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. J Am Coll Cardiol, 2002. 40(7): p. 1199-204.*
 16. Hayashidani, S., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. Circulation, 2003. 108(17): p. 2134-40.*
 17. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. Circ Res, 2005. 96(8): p. 881-9.*
 18. Pinckard, R.N., et al., *Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. J Clin Invest, 1975. 56(3): p. 740-50.*
 19. Hill, J.H. and P.A. Ward, *The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. J Exp Med, 1971. 133(4): p. 885-900.*
 20. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiol Rev, 1999. 79(2): p. 609-34.*
 21. Patel, K.D., et al., *Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. J Cell Biol, 1991. 112(4): p. 749-59.*
 22. Jolly, S.R., et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res, 1984. 54(3): p. 277-85.*
 23. Murohara, Y., et al., *Effects of superoxide dismutase on reperfusion arrhythmias and left ventricular function in patients undergoing*

- thrombolysis for anterior wall acute myocardial infarction. Am J Cardiol*, 1991. 67(8): p. 765-7.
24. Flaherty, J.T., et al., *Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. Circulation*, 1994. 89(5): p. 1982- 91.
 25. Ganz, T., *Macrophage function. New Horiz*, 1993. 1(1): p. 23-7.
 26. Weihrauch, D., et al., *Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecroses in porcine myocardium. Mol Cell Biochem*, 1995. 147(1-2): p. 13-9.
 27. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. Am J Pathol*, 2007. 170(3): p. 818-29.
 28. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J Exp Med*, 2007. 204(12): p. 3037-47.
 29. Walcheck, B., et al., *Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. Nature*, 1996. 380(6576): p. 720-3.
 30. Weyrich, A.S., et al., *In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. J Clin Invest*, 1993. 91(6): p. 2620-9.
 31. Mannisi, J.A., et al., *Steroid administration after myocardial infarction promotes early infarct expansion. A study in the rat. J Clin Invest*, 1987. 79(5): p. 1431-9.
 32. Virag, J.I. and C.E. Murry, *Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. Am J Pathol*, 2003. 163(6): p. 2433-40.
 33. Mollmann, H., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. Cardiovasc Res*, 2006. 71(4): p. 661-71.
 34. Serini, G. and G. Gabbiani, *Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res*, 1999. 250(2): p. 273-83.

35. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. Am J Pathol, 1995. 147(2): p. 325-38.
36. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(5): p. 349-63.
37. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. 146(1): p. 56-66.
38. Takemura, G., et al., *Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction*. Circ Res, 1998. 82(11): p. 1130-8.
39. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. Antioxid Redox Signal, 2006. 8(11-12): p. 1907-39.
40. Palojoki, E., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. 280(6): p. H2726-31.
41. Parmley, W.W., et al., *In vitro length-tension relations of human ventricular aneurysms. Relation of stiffness to mechanical disadvantage*. Am J Cardiol, 1973. 32(7): p. 889-94.
42. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. 81(4): p. 1161-72.
43. White, H.D., et al., *Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction*. Circulation, 1987. 76(1): p. 44-51.
44. St John Sutton, M., et al., *Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction*. Circulation, 2003. 107(20): p. 2577-82.
45. Hochman, J.S. and H. Choo, *Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage*. Circulation, 1987. 75(1): p. 299-306.

46. Schroder, R., et al., *Impact of late coronary artery reperfusion on left ventricular function one month after acute myocardial infarction (results from the ISAM study)*. Am J Cardiol, 1989. 64(14): p. 878-84.
47. Cigarroa, R.G., R.A. Lange, and L.D. Hillis, *Prognosis after acute myocardial infarction in patients with and without residual anterograde coronary blood flow*. Am J Cardiol, 1989. 64(3): p. 155-60.
48. Pfeffer, M.A., et al., *Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril*. Circulation, 1985. 72(2): p. 406-12.
49. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction*. N Engl J Med, 1988. 319(2): p. 80-6.
50. Lamas, G.A., et al., *Effects of left ventricular shape and captopril therapy on exercise capacity after anterior wall acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 1989. 63(17): p. 1167-73.
51. Jugdutt, B.I., M.J. Joljart, and M.I. Khan, *Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models*. Circulation, 1996. 94(1): p. 94-101.
52. Dewald, O., et al., *Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction*. Am J Pathol, 2004. 164(2): p. 665-77.
53. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity. 32(5): p. 593-604.
54. Goerdt, S., et al., *Alternative versus classical activation of macrophages*. Pathobiology, 1999. 67(5-6): p. 222-6.
55. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 275-90.
56. Barrington, R., et al., *The role of complement in inflammation and adaptive immunity*. Immunol Rev, 2001. 180: p. 5-15.
57. Akira, S., *Mammalian Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. 15(1): p 5-11.

58. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 117(5): p. 979-87; quiz 988.
59. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(12): p. 953-64.
60. Nathan, C., *Mechanisms and modulation of macrophage activation*. Behring Inst Mitt, 1991(88): p. 200-7.
61. Gerber, J.S. and D.M. Mosser, *Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors*. J Immunol, 2001. 166(11): p. 6861-8.
62. Mackaness, G.B., *The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance*. J Exp Med, 1964. 120: p. 105-20.
63. Meldrum, D.R., et al., *Adaptive and maladaptive mechanisms of cellular priming*. Ann Surg, 1997. 226(5): p. 587-98.
64. Dalton, D.K., et al., *Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes*. Science, 1993. 259(5102): p. 1739-42.
65. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 323-50.
66. Flavell, R.A., *The relationship of inflammation and initiation of autoimmune disease: role of TNF super family members*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. 266: p. 1-9.
67. Ho, A.S. and K.W. Moore, *Interleukin-10 and its receptor*. Ther Immunol, 1994. 1(3): p. 173-85.
68. Ganttt, K.R., et al., *Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi*. J Immunol, 2001. 167(2): p. 893-901.
69. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. 176(1): p. 287-92.
70. Topoll, H.H., et al., *Phenotypic dynamics of macrophage subpopulations during human experimental gingivitis*. J Periodontal Res, 1989. 24(2): p. 106-12.

71. Kodelja, V., et al., *Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages*. Immunobiology, 1997. 197(5): p. 478-93.
72. Song, E., et al., *Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts*. Cell Immunol, 2000. 204(1): p. 19- 28.
73. Schebesch, C., et al., *Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro*. Immunology, 1997. 92(4): p. 478-86.
74. Wilson, M.S., et al., *Immunopathology of schistosomiasis*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(2): p. 148-54.
75. Mantovani, A., C. Garlanda, and M. Locati, *Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(10): p. 1419-23.
76. Gratchev, A., et al., *Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3*. Scand J Immunol, 2001. 53(4): p. 386-92.
77. Mohrs, M., et al., *Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling*. J Immunol, 1999. 162(12): p. 7302-8.
78. Shimoda, K., et al., *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene*. Nature, 1996. 380(6575): p. 630-3.
79. Hesse, M., et al., *Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism*. J Immunol, 2001. 167(11): p. 6533-44.
80. Mantovani, A., et al., *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. Trends Immunol, 2001. 22(6): p. 328-36.
81. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. 25(12): p. 677-86.

82. Fenton, M.J., J.A. Buras, and R.P. Donnelly, *IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes*. J Immunol, 1992. 149(4): p. 1283-8.
83. Kodolja, V., et al., *Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern*. J Immunol, 1998. 160(3): p. 1411-8.
84. Nair, M.G., et al., *Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells*. Infect Immun, 2005. 73(1): p. 385-94.
85. Raes, G., et al., *FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages*. Dev Immunol, 2002. 9(3): p. 151-9.
86. Ezekowitz, R.A. and S. Gordon, *Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens*. Contemp Top Immunobiol, 1984. 13: p. 33-56.
87. Herbert, D.R., et al., *Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology*. Immunity, 2004. 20(5): p. 623-35.
88. Castillo, L., et al., *Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11460-5.
89. Hecker, M., et al., *The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(21): p. 8612-6.
90. Nussler, A.K., et al., *Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production*. J Biol Chem, 1994. 269(2): p. 1257-61.

91. Wu, G. and S.M. Morris, Jr., *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Biochem J, 1998. 336 (Pt 1): p. 1-17.
92. Pegg, A.E., *Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes*. Biochem J, 1986. 234(2): p. 249-62.
93. Mills, C.D., et al., *Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer*. J Immunol, 1992. 149(8): p. 2709-14.
94. Shearer, J.D., et al., *Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing*. Am J Physiol, 1997. 272(2 Pt 1): p. E181-90.
95. Granger, D.L., et al., *Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages*. J Clin Invest, 1990. 85(1): p. 264-73.
96. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. 298 (Pt 2): p. 249-58.
97. Bartholeyns, J., M. Freudenberg, and C. Galanos, *Growing tumors induce hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor*. Infect Immun, 1987. 55(9): p. 2230-3.
98. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. 73(2): p. 209-12.
99. Sutterwala, F.S., et al., *Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation*. J Exp Med, 1997. 185(11): p. 1977-85.
100. Anderson, C.F. and D.M. Mosser, *A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage*. J Leukoc Biol, 2002. 72(1): p. 101-6.
101. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. 19(1): p. 71-82.
102. Kumar, A.G., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium*. Circulation, 1997. 95(3): p. 693-700.

103. Maekawa, N., et al., *Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha*. J Am Coll Cardiol, 2002. 39(7): p. 1229- 35.
104. Leibovich, S.J. and R. Ross, *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol, 1975. 78(1): p. 71-100.
105. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. 230(4732): p. 1350-4.
106. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.
107. Barondes, S.H., et al., *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. Cell, 1994. 76(4): p. 597-8.
108. Cherayil, B.J., S.J. Weiner, and S. Pillai, *The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE*. J Exp Med, 1989. 170(6): p. 1959-72.
109. Sato, S. and R.C. Hughes, *Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages*. J Biol Chem, 1994. 269(6): p. 4424-30.
110. Wells, V. and L. Mallucci, *Identification of an autocrine negative growth factor: mouse beta-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator*. Cell, 1991. 64(1): p. 91-7.
111. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(13): p. 5060-5.
112. Raz, A. and R. Lotan, *Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1987. 6(3): p. 433-52.
113. Raz, A., et al., *Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis*. Int J Cancer, 1990. 46(5): p. 871-7.
114. MacKinnon, A.C., et al., *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2650-8.

115. Ravanti, L., et al., *Expression of human collagenase-3 (MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor beta via p38 mitogen-activated protein kinase*. *Faseb J*, 2001. 15(6): p. 1098-100.
116. Youker, K.A., et al., *Phagocytes in ischemia injury*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 832: p. 243-65.
117. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets*. *Immunobiology*, 2006. 211(6-8): p. 609-18.
118. Goldmann, O., et al., *Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with Streptococcus pyogenes reveals an unusual activation program*. *Infect Immun*, 2007. 75(8): p. 4148-57.
119. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(1): p. 23-35.
120. Wintergerst, E.S., J. Jelk, and R. Asmis, *Differential expression of CD14, CD36 and the LDL receptor on human monocyte-derived macrophages. A novel cell culture system to study macrophage differentiation and heterogeneity*. *Histochem Cell Biol*, 1998. 110(3): p. 231-41.
121. Takahashi, K., M. Naito, and M. Takeya, *Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways*. *Pathol Int*, 1996. 46(7): p. 473-85.
122. Naito, M., *Macrophage heterogeneity in development and differentiation*. *Arch Histol Cytol*, 1993. 56(4): p. 331-51.
123. Jiang, Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes*. *J Immunol*, 1992. 148(8): p. 2423-8.
124. Kaikita, K., et al., *Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction*. *Am J Pathol*, 2004. 165(2): p. 439-47.
125. Webb, C.S., et al., *Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling*. *Circulation*, 2006. 114(10): p. 1020-7.

126. Orn, S., et al., *Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to cardiac magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function.* J Card Fail, 2007. 13(10): p. 843-9.
127. Squire, I.B., et al., *Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction.* J Card Fail, 2004. 10(4): p. 328-33.
128. Kaden, J.J., et al., *Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction.* Cardiology, 2003. 99(3): p. 140-4.
129. Chen, J., et al., *Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction.* Circulation, 2005. 111(14): p. 1800-5.
130. Brown, J.N., et al., *Proteome bioprofiles distinguish between M1 priming and activation states in human macrophages.* J Leukoc Biol, 2009.
131. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. 89(3): p. 201-10.
132. Wagner, D.R., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction.* J Card Fail, 2006. 12(1): p. 66-72.
133. Matsunaga, T., et al., *Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2005. 105(2): p. 203-8.
134. Ducharme, A., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction.* J Clin Invest, 2000. 106(1): p. 55-62.
135. Creemers, E.E., et al., *Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(1): p. H364-71.
136. Ledour, G., et al., *Introduction of the 4-(4-bromophenyl)benzenesulfonyl group to hydrazide analogs of Ilomostat leads to potent gelatinase B (MMP-*

- 9) inhibitors with improved selectivity. *Bioorg Med Chem*, 2008. 16(18): p. 8745- 59.
137. Deng, S.J., et al., *Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library*. *J Biol Chem*, 2000. 275(40): p. 31422-7.
138. Kusano, K., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption*. *Endocrinology*, 1998. 139(3): p. 1338-45.
139. Cowell, S., et al., *Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3*. *Biochem J*, 1998. 331 (Pt 2): p. 453-8.
140. Kuwabara, I. and F.T. Liu, *Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin*. *J Immunol*, 1996. 156(10): p. 3939-44.
141. Sano, H., et al., *Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages*. *J Immunol*, 2000. 165(4): p. 2156-64.
142. Yoo, J. and J.M. Fukuto, *Oxidation of N-hydroxyguanidine by nitric oxide and the possible generation of vasoactive species*. *Biochem Pharmacol*, 1995. 50(12): p. 1995-2000.
143. Kasper, M. and R.C. Hughes, *Immunocytochemical evidence for a modulation of galectin 3 (Mac-2), a carbohydrate binding protein, in pulmonary fibrosis*. *J Pathol*, 1996. 179(3): p. 309-16.
144. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. *Am J Pathol*, 2008. 172(2): p. 288-98.
145. Ochieng, J., et al., *Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9*. *Biochemistry*, 1994. 33(47): p. 14109-14.
146. Nangia-Makker, P., et al., *Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers*. *Cancer Res*, 2007. 67(24): p. 11760-8.

147. Ochieng, J., et al., *Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1379(1): p. 97-106.
148. Heymans, S., et al., *Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure*. *Nat Med*, 1999. 5(10): p. 1135-42.
149. Liu, Y.H., et al., *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 296(2): p. H404-12.
150. Krishnamurthy, P., et al., *IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR*. *Circ Res*, 2009. 104(2): p. e9-18.
151. Stumpf, C., et al., *Interleukin-10 improves left ventricular function in rats with heart failure subsequent to myocardial infarction*. *Eur J Heart Fail*, 2008. 10(8): p. 733-9.
152. Peranteau, W.H., et al., *IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation*. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(7): p. 1852-60.
153. Zymek, P., et al., *Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2007. 74(2): p. 313-22.
154. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. *J Clin Invest*, 2006. 116(6): p. 1494-505.
155. Tateya, S., et al., *An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice*. *Endocrinology*. 151(3): p. 971-9.
156. Zeyda, M., et al., *Newly identified adipose tissue macrophage populations in obesity with distinct chemokine and chemokine receptor expression*. *Int J Obes (Lond)*.

157. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2002. 39(2): p. 241-6.
158. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance*. Nature, 2007. 447(7148): p. 1116-20.
159. Mariani, M., et al., *Significance of total and differential leucocyte count in patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty*. Eur Heart J, 2006. 27(21): p. 2511-5.
160. Schieffer, B. and H. Drexler, *Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclooxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases*. Am J Cardiol, 2003. 91(12A): p. 12H-18H.
161. Yang, Y., et al., *Beneficial effect of rosvastatin on cardiac dysfunction is associated with alterations in calcium-regulatory proteins*. Eur J Heart Fail, 2009. 11(1): p. 6-13.

10 Appendix

10.1 Cd11b-Isolationsergebnisse

Isolationsdatum	Cd11b+ Anteil registrierter Events
01.12.2006	79,2
12.12.2006	83,22
21.12.2006	86,58
15.01.2007	92,86
22.01.2007	90,28
05.02.2007	88,42
12.02.2007	85,2
27.02.2007	85,5
10.04.2007	91,46
16.05.2007	92

25.05.2007	88,63
21.06.2007	82,38
25.06.2007	91,66
Durchschnitt	87,49

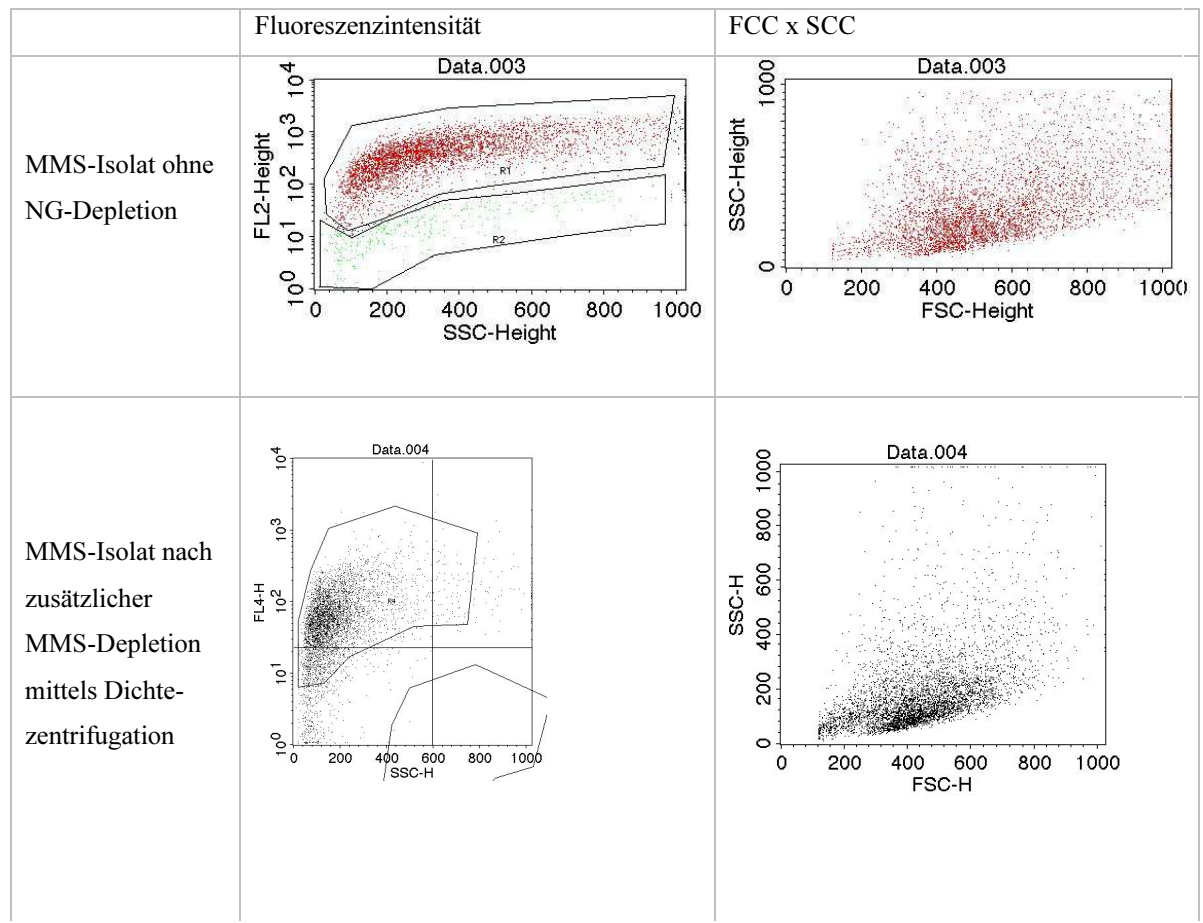
10.2 Markerliste (Überprüfung MMS-Daten)

Zelltyp	Marker	Mono vs WT	MI vs WT	Mono vs MI
Monozyten	Cd14	44,79	3,78	11,84
	Cd69	41,98	2,56	16,43
	Cd11b	47,88	4,32	11,09
	Tlr2	65,32	4,40	14,86
	Cd80/861	52,74	4,83	10,92
Endothelzellen	VWF	0,27	0,86	0,32
	PECAM-1	0,46	0,58	1,53
	Cd36	0,30	0,43	0,67
Fibroblasten	Vimentin	5,81	4,94	1,16
	Procollagen I	1,03	18,66	0,07
	Procollagen II	1,25	3,37	0,37
	Smooth muscle actin	0,64	0,96	1,32
Herzmuskel	Myosin	0,00	0,35	0,01
	Titin	0,09	0,19	0,34
	TroponinI, cardiac	0,00	0,60	0,01

10.3 MMP9 und Fpr1

Marker	Mono vs WT	MI vs WT	Mono vs MI
Mmp9	295,15	25,62	11,52
Fpr1	150,26	13,51	11,12

10.4 FACS-Ergebnisse mit NG-Depletion im Vergleich



11 Publikationsverzeichnis

Teile der Forschungsarbeit wurden in folgenden Formaten publiziert:

Artikel

1. Journal of Cellular and molecular medicine 2009: *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. [Troidl C](#), [Möllmann H](#), [Nef H](#), [Masseli F](#), [Voss S](#), [Szardien S](#), [Willmer M](#), [Rolf A](#), [Rixe J](#), [Troidl K](#), [Kostin S](#), [Hamm C](#), [Elsässer A](#).

Poster

2. Deutscher Kardiologenkongress Mannheim 2008: *Identifizierung eines neuen myokardspezifischen Aktivierungstyps von Makrophagen nach Herzinfarkt im Mausmodell* C. Troidl, H. Möllmann, H. M. Nef, F. **Masseli**, S. Voss, S. Sass, M. Rieschel, K. Troidl, C. W. Hamm, A. Elsässer;
3. ESC Kongress München 2008: *Identification of different activation types of macrophages during cardiac remodelling after myocardial infarction* Troidl C., Möllmann H., Nef H., **Masseli F.**, Voss S., Kostin S., Troidl K., Hamm C.W., Elsässer A.
4. AHA New Orleans 2008: *Classical activation switches to alternative activation in macrophages during scar formation after myocardial infarction in mice*; Troidl C., Möllmann H., Nef H., **Masseli F.**, Voss S. Kostin S., Troidl K., Hamm C.W., Elsässer A.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

26.02.2012

Franz Masseli

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der AG molekulare Kardiologie der Kerckhoff-Klinik, welche mich immer mit Rat und Tat unterstützt haben, insbesondere mein Betreuer und Laborleiter Dr. C. Troidel sowie den Doktores Helge Möllmann und Holger Nef, welche auch für die etwas gewagteren Experimentalkonzepte meinerseits (welche keinen Einfluss in die hier vorliegende Arbeit gefunden haben) jederzeit ein offenes Ohr hatten. Ich danke für die jederzeit geduldige Anleitung in Sachen Laborkunde und tierexperimenteller Grundlagen unserer TA Frau Sigrun Sass und für die geteilte Begeisterung in Sachen Zellsortierung und FACS-Analyse bei unserer TA Frau Monika Rischel.

Ich Danke auch Freunden und Familie, welche mich insbesondere während der intensiven Forschungsphase 2007 - 2008 moralisch unterstützten und mit großer Toleranz meine Begeisterung für die Experimentalforschung hinnahmen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**