

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Verbesserung des linksventrikulären Remodelings durch
Inhibition des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B
(NF- κ B) in Makrophagen und Granulozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Eva-Katharina Witz
aus Heidelberg

Würzburg, Juli 2013

Referent: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Koreferent: Professor Dr. med. Ralf Benndorf

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Vom Myokardinfarkt zur chronischen Herzinsuffizienz	3
1.2 Das angeborene Immunsystem und kardiales Remodeling	7
1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	10
1.3.1 Aktivierung und Deaktivierung.....	10
1.3.2 Bedeutung von NF- κ B am Herzen	13
1.4 Fragestellung dieser Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere	16
2.2 Differentialblutbild	18
2.3 Koronarligatur	18
2.4 Echokardiographie.....	19
2.5 Hämodynamische Messungen	21
2.6 Gewebegewinnung und -aufbereitung	21
2.7 Bestimmung der Infarktgröße	22
2.8 Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes	23
2.9 Immunhistochemische Untersuchungen.....	24
2.9.1 Grundlagen.....	24
2.9.2 Spezifische Färbung neutrophiler Granulozyten	27
2.10 Biochemische Untersuchungen	28
2.10.1 RNA-Gewinnung	29
2.10.2 cDNA-Herstellung.....	30
2.10.3 Quantitative Realtime-PCR	32
2.10.3.1 Prinzip der Realtime-PCR.....	32
2.10.3.2 Vorgehensweise.....	37
2.11 Bestimmung der Kapillardichte	38
2.11.1 Prinzip der Lectinfärbung	38
2.11.2 Vorgehensweise	39
2.12 Identifizierung apoptotischer Zellen	41
2.12.1 Prinzip der TUNEL-Methode	41
2.12.2 Vorgehensweise	41

2.13 Statistische Analyse.....	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Phänotyp der LysM-IKK β -KO-Tiere	44
3.2 Überlebensrate	44
3.3 Organgewichte.....	45
3.4 Morphologie und Hämodynamik	45
3.5 Infarktgröße.....	47
3.6 Kardiale Hypertrophie	48
3.7 Interstitieller Kollagengehalt.....	49
3.8 Zelluläre Immunreaktion	50
3.9 Humorale Immunreaktion.....	50
3.10 Neovaskularisation.....	51
3.11 Apoptoserate.....	53
4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung.....	61
6 Abbildungsverzeichnis	63
7 Literaturverzeichnis	65

1 Einleitung

Die chronische Herzinsuffizienz ist ein komplexes klinisches Syndrom, das ätiologisch durch verschiedenste kardiale Erkrankungen und andere Ursachen der Herzschädigung begründet sein kann. Definiert ist die chronische Herzinsuffizienz als die Unfähigkeit des Herzens, die Organe mit ausreichend Blut und somit genügend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel in Ruhe und unter Belastung sicherzustellen. Neben dem mechanischen Pumpversagen kommt es zu multiplen anatomischen, funktionellen und biochemischen Veränderungen, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken, sodass die chronische Herzinsuffizienz heute als Multisystemerkrankung angesehen wird. Lebenserwartung und Lebensqualität der Betroffenen werden durch die häufig ausgeprägte Symptomatik aus Flüssigkeitsretention, Dyspnoe, Tachykardie und Leistungsminderung deutlich eingeschränkt [1-3].

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Diagnosen in den westlichen Industrienationen und der häufigste Grund für einen Krankenhausaufenthalt bei Menschen über 65 Jahren. Etwa 2% der Bevölkerung sind betroffen, in der Altersgruppe über 70 Jahre sind es sogar mehr als 10%. Alleine in Deutschland wird von jährlich ca. 300 000 Neuerkrankungen ausgegangen. Gerade angesichts der demographischen Entwicklung hat das Krankheitsbild daher nicht nur große medizinische, sondern mit jährlich derzeit über 3 Milliarden Euro Kosten für das deutsche Gesundheitssystem auch immense gesundheitsökonomische Bedeutung [4-5].

Bis heute ist die chronische Herzinsuffizienz nur durch eine Herztransplantation heilbar, medikamentöse Therapien bewirken größtenteils lediglich eine Reduktion der klinischen Symptomatik. Der Fokus der klinischen Forschung liegt daher heute vor allem auf möglichen Therapieansätzen, die der Entstehung der Herzinsuffizienz präventiv entgegenwirken sollen [2, 6].

Die häufigste Ursache der chronischen Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (KHK). Obwohl es sich bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz meist um ein multifaktorielles Geschehen handelt, stellt die akute Herzmuskelschädigung bei einem Myokardinfarkt häufig den klinisch fassbaren Beginn für die Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz dar [1, 4]. Trotz intensiver Primärtherapie des Myokardinfarktes ist die Prognose des Krankheitsbildes gerade durch die Entstehung der Folgeerkrankung Herzinsuffizienz weiterhin schlecht. Daher liegt eine große Herausforderung in der Therapie nach dem Infarkt darin, die Mechanismen, die zur Entstehung und Verstärkung der Herzinsuffizienz führen können, therapeutisch positiv zu beeinflussen. Durch Modulation der Heilungs- und Umbauvorgänge im Myokard („Remodeling“) würden sich nicht nur zusätzliche Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen bieten, sondern auch ein deutlich größeres Zeitfenster im Vergleich zu den bisherigen Optionen der Revaskularisierung und frühen Beeinflussung des neurohumoralen und des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems [1, 6-7].

Der Fokus der modernen Herzinsuffizienzforschung liegt daher auf der genaueren Spezifizierung der Vorgänge, die dem kardialen Remodeling zugrunde liegen. Hierzu zählt unter anderem eine chronische Entzündungsreaktion, die durch das angeborene Immunsystem moduliert und aufrecht erhalten wird. Eine Beeinflussung des komplexen Zusammenspiels der verschiedenen Komponenten dieser Immunantwort könnte daher eine vielversprechende Therapieoption bieten. Ein zentraler Regulator der Immunreaktion ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B [7-10]. Unabhängig von der Ätiologie ließ sich bei Herzinsuffizienz eine erhöhte NF- κ B-Aktivität nachweisen. Die Ausprägung der NF- κ B-Aktivierung scheint dabei mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz zu korrelieren [11]. Zudem konnten tierexperimentelle Studien zeigen, dass eine Inhibition von NF- κ B nach Myokardinfarkt die Mortalität reduziert und das linksventrikuläre Remodeling verbessert. Durch eine kardiomyozytenspezifische Inhibition der NF- κ B-Aktivierung ließen sich diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren. Dies lässt

vermuten, dass die NF- κ B-Aktivierung in anderen Zellen die schädigenden Effekte verursacht [12-13]. Es ergaben sich dagegen in verschiedenen Untersuchungen Hinweise, dass insbesondere die NF- κ B-Aktivität in Leukozyten von entscheidender Bedeutung für die negativen Auswirkungen auf das linksventrikuläre Remodeling sein könnten [14-16].

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Auswirkungen einer gewebsspezifischen Hemmung von NF- κ B in Granulozyten und Makrophagen auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt.

1.1 Vom Myokardinfarkt zur chronischen Herzinsuffizienz

Einer der häufigsten Auslöser für die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz ist der Myokardinfarkt [4, 17]. Durch den akuten Verschluss einer Koronararterie kommt es zu einer Unterversorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen und dadurch zu einer Myokardnekrose im Ischämiegebiet. Schon in den ersten Stunden nach dem Infarkt setzt in diesem Wundgebiet ein komplexer Heilungsprozess aus Immigration, Transformation und Apoptose verschiedener Zelltypen ein. Bereits früh kann eine Entzündungsreaktion beobachtet werden, in deren Verlauf neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in das geschädigte Myokard einwandern. Neben der Phagozytose nekrotischen Gewebes führt die Immigration dieser Zellen zu Strukturveränderungen in der extrazellulären Matrix (EZM) und zur Bildung eines Granulationsgewebes, das innerhalb einiger Wochen nach Auftreten von Myofibroblasten in stabiles Narbengewebe umgewandelt wird [6, 18].

Neben den Heilungsvorgängen im unmittelbaren Ischämiegebiet lassen sich nach großen Infarkten jedoch auch im nicht infarzierten Gewebe strukturelle Veränderungen feststellen. Diese das gesamte Herz betreffenden Umbauvorgänge auf genetischer, molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene werden als kardiales Remodeling bezeichnet [19-22].

Durch den Verlust kontraktiver Kardiomyozyten ist die Pumpfunktion nach dem Myokardinfarkt zunächst stark eingeschränkt. Zusätzlich kann je nach Größe, Lokalisation und transmuraler Ausdehnung des Infarktes, sowie abhängig von lokalen Faktoren das Gewebe weiter auseinanderscheren (Infarktexpansion), was vor allem in den ersten Tagen nach dem Infarkt das Risiko von Ventrikelruptur, Arrhythmien und plötzlichem Herztod birgt [17, 21, 23]. Die resultierende Dilatation und Abnahme der Ventrikeldicke führen zu einem weiteren Kontraktilitätsverlust und einer zusätzlichen Abnahme der Auswurfleistung. Um einen suffizienten peripheren Kreislauf aufrecht zu erhalten werden direkt im Anschluss an die kardiale Schädigung kurzfristig verschiedene Mechanismen aktiviert, durch die das Herz auf gesteigerte Druck- und Volumenbelastung reagiert [19]. Zu diesen adaptativen Vorgängen gehören unter anderem Frank-Starling-Mechanismus, Bowditch-Effekt, eine Aktivierung von sympathischen Nervensystem und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sowie die Bildung von Mediatoren wie ANP (Atrial Natriuretic Peptide), BNP (Brain Natriuretic Peptide), Vasopressin, Endothelin und Zytokinen [21].

Getriggert vor allem durch die aufgrund der erhöhten Druckbelastung, des erhöhten Ventrikeldiameters und der verringerten Ventrikelwanddicke erhöhte Wandspannung kann zusätzlich zu diesen kurzfristigen Kompensationsmechanismen ein dauerhafter struktureller Umbau des Herzmuskelgewebes beobachtet werden [17]. Es kommt zu einer Steigerung der Wanddicke durch Hypertrophie der verbliebenen vitalen Kardiomyozyten, die unter anderem intrazelluläre Signalmoleküle und eine veränderte Genexpression stimuliert wird (vgl. Gesetz von Laplace). Hierdurch wird der erhöhten Belastung und fortschreitenden Dilatation entgegengewirkt und die ventrikuläre Funktion zunächst stabilisiert [20, 24].

Eine chronische Aktivierung dieser zunächst lebensnotwendigen Prozesse des kardialen Remodelings führt langfristig jedoch zu dauerhaften, zum Teil irrever-

siblen ventrikulären Strukturveränderungen, die das Herz weiter schädigen und zu einem fortschreitenden Funktionsverlust führen [3, 21].

Auch im nicht infarzierten Myokard produzieren aktivierte Fibroblasten und Endothelzellen, unter anderem gesteuert durch ins Gewebe eingewanderte Leukozyten, vermehrt Kollagen. Die entstehende interstitielle und perivaskuläre Fibrose bedingt eine Relaxationsstörung und behindert die Kontraktilität [25]. Darüber hinaus wird eine vermehrte Apoptose von Kardiomyozyten beobachtet, die zu einem weiteren Verlust vitalen Herzmuskelgewebes führt [26]. Als intrazelluläre Komponenten des chronischen Remodeling sind außerdem Veränderungen im Zytoskelett der Kardiomyozyten und eine ineffiziente Energieausbeute zu nennen [27-28].

Der aufgrund der Gesamtheit dieser Prozesse fortschreitende Funktionsverlust verstärkt wiederum das kardiale Remodeling. Die Folge dieses Circulus vitiosus sind eine zunehmende kardiale Dysfunktion, fortschreitende Dekompensation und letztendlich die das Vollbild einer chronischen Herzinsuffizienz [3, 20].

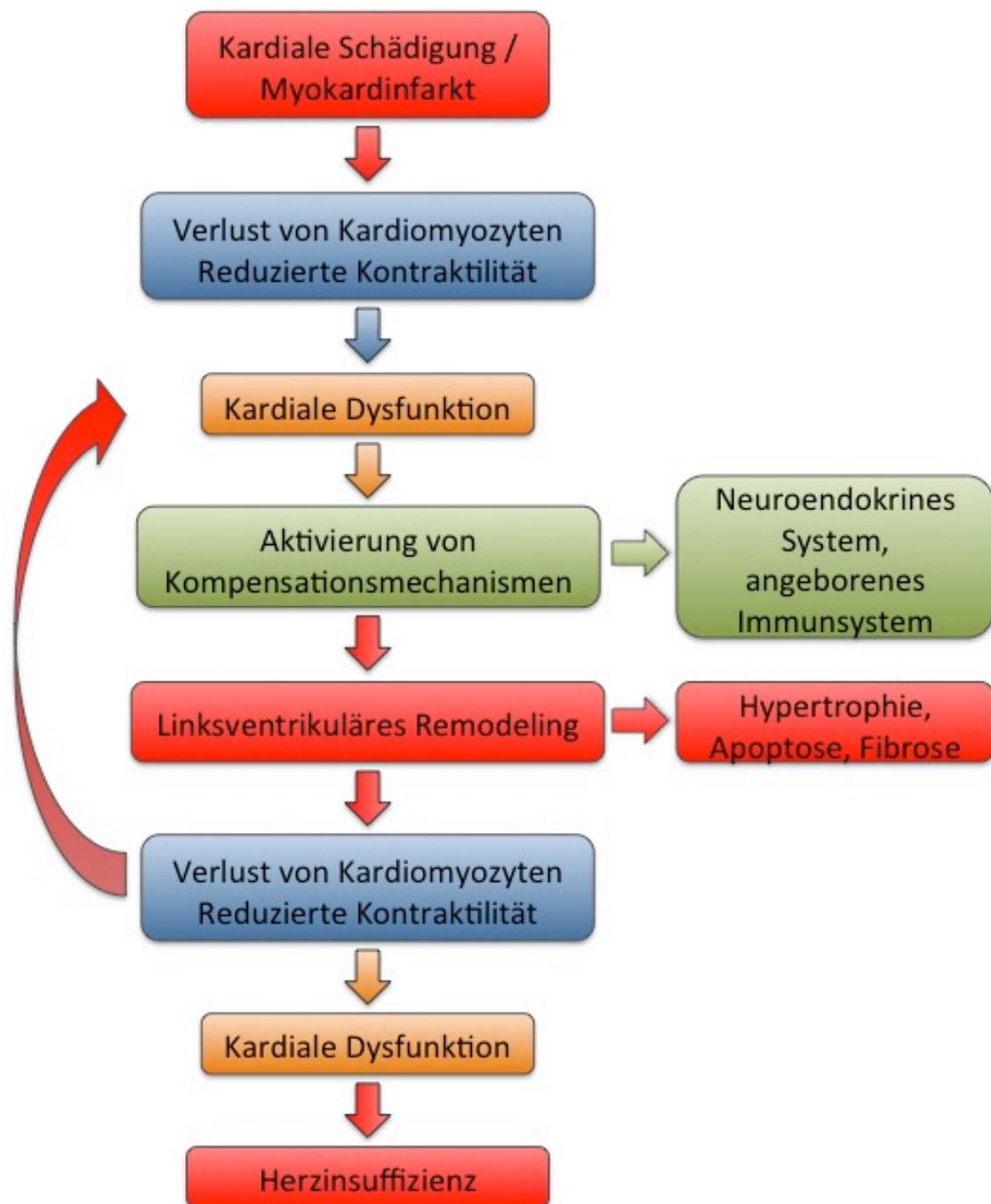


Abb. 1: Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Zunächst kann die durch den Kardiomyozytenverlust eingeschränkte Herzfunktion durch Aktivierung von Kompensationsmechanismen stabilisiert werden. Die chronische Aktivierung dieser Mechanismen bedingt jedoch ein Fortschreiten der kardialen Dysfunktion durch vermehrtes linksventrikuläres Remodeling.

1.2 Das angeborene Immunsystem und kardiales Remodeling

In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass eine Herzschädigung zu einer Immunantwort und Entzündungsreaktion führt. Obwohl die komplexen Vorgänge zunächst der Herzschädigung entgegenwirken und den Heilungsprozess vorantreiben, wird eine dauerhafte Aktivierung mit verstärkten linksventrikulären Remodeling und fortschreitender Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht [19].

Das angeborene Immunsystem gilt als unspezifische erste Abwehrlinie des Körpers gegen verschiedenste schädigende Einflüsse und Krankheitserreger. Es besteht aus zellulären Komponenten wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten sowie humoralen Faktoren wie Zytokinen, Chemokinen und Komplementsystem [19]. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, das erst nach dem ersten Antigenkontakt spezifische Rezeptoren und Antikörper ausbildet, detektiert das angeborene Immunsystem bereits von Geburt bestimmte Muster, die ganze Gruppen von Pathogenen gemeinsam haben und die im gesunden Organismus nicht vorkommen, beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterienmembran oder virale doppelsträngige RNA [6, 29]. Neben diesen „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) können nach der „Danger-Theorie“ eine Reaktion des angeborenen Immunsystems jedoch auch sogenannte „damage associated molecular patterns“ (DAMP), also endogene „Alarm-Signale“, die auf einen Gewebeschaden hinweisen, eine Reaktion des angeborenen Immunsystems auslösen [30]. Hierzu gehören beispielsweise Hitzeschockproteine (HSP), kristalline Harnsäure oder Fragmente von Fibronektin und Hyaluronan. PAMPs und DAMPs aktivieren sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRR), die sowohl zytoplasmatisch als auch membrangebunden vorliegen und von verschiedenen Immunzellen sowie auch einigen primär nicht immunologischen Zellen exprimiert werden [19, 31-32].

Eine wichtige Untergruppe der PRR sind Toll-like-Rezeptoren (TLR), die nach kardialen Schädigungen vermehrt gebildet werden und als wichtige Regulatoren

der pathophysiologischen Prozesse des ventrikulären Remodeling gelten [6, 19, 33]. Über komplexe Signalkaskaden werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems initiieren und steuern und auch das adaptative Immunsystem modulieren [34]. Verschiedene Studien stellten sowohl akut als auch chronisch schädigende Einflüsse der Aktivierung von TLR auf das Herz fest [31, 33, 35].

Die Aktivierung von TLR und anderen PRR führt unter anderem zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Immigration von Leukozyten ermöglichen [19, 33]. Als Zytokine bezeichnet man eine heterogene Gruppe von Signalmolekülen, die von verschiedenen Zellen ausgeschüttet werden und sowohl über direkte Effekte, als auch indirekt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Immunreaktion modulieren. Zu ihnen gehören unter anderem Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Transforming Growth Factors (TGF). Auch Chemokine, die die Migration von Leukozyten steuern, werden meist als Untergruppe der Zytokine bezeichnet. Während des kardialen Remodelings sind im Herzen und im peripheren Blut erhöhte Konzentrationen verschiedener Zytokinen nachweisbar, unter anderem IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Diese haben Auswirkungen auf Kontraktilität, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Apoptose und Hypertrophie [6, 19, 36].

Die Einwanderung von Leukozyten nach einer kardialen Schädigung wird durch eine komplexe Kaskade aus verschiedensten Signalmolekülen gesteuert, unter anderem spielen Chemokine, TGF- β 1 und der Komplementfaktor C5a eine bedeutende Rolle. In der Frühphase wandern zunächst neutrophile Granulozyten, die als wichtigste Mediatoren der lokalen Entzündungsreaktion gelten, vor allem in die Borderzone des Infarktes ein. Es folgen weitere Entzündungszellen wie beispielsweise Makrophagen. Das Entzündungszellinfiltrat ist bedeutsam für einen effektiven Heilungsprozess und phagozytiert nekrotisches Zellmaterial, spielt aber über die Produktion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Matrix-

Metalloproteasen (MMP) auch eine entscheidende Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion und des kardialen Remodeling [6, 17, 37].

Weitere wichtige Trigger der Immunantwort sind die Aktivierung des Komplementsystems sowie lokale Faktoren wie freie Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“, ROS). Das Komplementsystem, das durch die Gewebeschädigung im Ischämiegebiet aktiviert wird, unterstützt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten und unterhält die Immunreaktion. Eine dauerhafte Komplementaktivierung führt nachgewiesen zu verstärktem Remodeling und verschlechtert die Herzfunktion [6, 38]. ROS entstehen durch oxidativen Stress und werden im gesunden Herzgewebe schnell neutralisiert. Im geschädigten Herzen fallen vermehrt ROS an, zudem funktioniert die Neutralisierung nur noch eingeschränkt. Neben ihrer direkten schädigenden Wirkung auf das Myokard führen ROS über die Aktivierung von Signalwegen des angeborenen Immunsystems zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und vermehrten Expression von Zytokinen und Chemokinen. Langfristig führen erhöhte Konzentrationen von ROS so zu kontraktile Dysfunktion, Apoptose, Fibrose, Hypertrophie und Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz [6, 39].

Als einer der wichtigsten Modulatoren des komplexen Zusammenspiels dieser verschiedenen Komponenten gilt der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Er reguliert die Expression von über 400 Genen, von deren Produkten viele in die Prozesse der Immunantwort involviert sind und die Entzündungsreaktion verstärken oder bremsen können. Aktiviert wird der Transkriptionsfaktor über TLR, aber auch zahlreiche weitere Stimuli wie ROS, Hypoxie, proinflammatorische Zytokine und induzierbare Nitrooxidase (iNOS) sind bekannt. Aufgrund dieser Schlüsselrolle ist NF- κ B bereits seit einiger Zeit Objekt intensiver Forschung und gilt als interessantes potentiell Therapieziel für die Regulation des kardialen Remodeling [6, 10, 19, 29].

1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Als „NF- κ B“ wird eine Gruppe dimerischer Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die aus je zwei Proteinen der Rel/NF- κ B-Familie zusammengesetzt sind. Bei Säugetieren werden fünf Vertreter dieser Familie exprimiert: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) und p52 (NF- κ B2). Allen gemeinsam ist das Vorhandensein der „Rel-Homologie-Domäne“, einer hochkonservierten N-terminalen Sequenz, die die Dimerisierung, Translokation in den Zellkern und Bindung an die DNA vermittelt. Die entstehenden Hetero- oder Homodimere binden an verschiedene Ziel-DNA-Sequenzen („ κ B-Sequenzen“) und modulieren so die Genexpression. Die verschiedenen Dimere unterscheiden sich bezüglich ihrer Wirkung auf die Genexpression, in den meisten Zellen liegt NF- κ B jedoch hauptsächlich als p50/RelA-Dimer vor [40-42].

1.3.1 Aktivierung und Deaktivierung

In seiner inaktiven Form liegt NF- κ B gebunden an ein inhibitorisch wirkendes Protein (Inhibitor von NF- κ B, I κ B) im Zytoplasma vor. Vor der Translokation in den Zellkern, die Voraussetzung für die Regulation der Transkription ist, muss der Transkriptionsfaktor von diesem Inhibitor gelöst werden. Der entscheidende Schritt in der Aktivierung von NF- κ B ist daher die Inaktivierung von I κ B. Sie erfolgt stimulus-induziert durch den multimerischen I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex). Dieser Komplex phosphoryliert I κ B und ermöglicht so dessen Ubiquitinierung und den konsekutiven Abbau im Proteasom. Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NF- κ B essential modulator, NEMO) sowie einigen kleineren Proteinen, deren Funktion bisher noch weitestgehend ungeklärt ist. In den meisten Zellen erfolgt die I κ B-Phosphorylierung vorwiegend durch die IKK β -Untereinheit. IKK β gilt daher als der zentrale Regulator der NF κ B-Aktivität [40-43].

Nach Dissoziation von seinem Inhibitor I κ B transloziert NF- κ B in den Zellkern, bindet dort spezifisch an Promotor- oder Enhancer-Regionen der DNA und steuert so die Expression verschiedener Gene des angeborenen und adaptativen Immunsystems. Unter anderem kontrolliert NF- κ B die Transkription von Zytokinen, Prostaglandinen, Antioxidantien, MMP, Regulatoren der Angiogenese, Akute-Phase-Proteinen, Adhäsionsmolekülen für die Leukozytenextravasation, Antigenrezeptoren, sowie von Genen, die Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose steuern [9, 44]. Einige der vermehrt exprimierten Genprodukte führen im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus wiederum zu einer erneuten Aktivierung von NF- κ B über die gemeinsame Endstrecke der IKK-abhängigen I κ B-Phosphorylierung. Diese Signalverstärkung ermöglicht eine schnelle und effektive Immunantwort [11, 29].

Neben dem dargestellten, IKK β -abhängigen „klassischen“ Aktivierungsweg, der nach heutigem Kenntnisstand der primäre Signalweg proinflammatorischer Stimuli ist, existieren noch weitere Mechanismen, die zu einer NF- κ B-Aktivierung führen. Der IKK β -unabhängige „alternative“ Signalweg aktiviert vor allem RelB/p52-Dimere und steuert unter anderem die Organogenese lymphatischen Gewebes sowie die Proliferation, Differenzierung und Reifung von B-Zellen. Über seine Bedeutung am Herzen ist bisher nur wenig bekannt [7, 9, 40].

Um eine dauerhafte Aktivierung von NF- κ B und somit eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden, existieren neben den beschriebenen positiven auch negative Feedbackmechanismen, über die NF- κ B autoregulatorisch seine eigene Inaktivierung ermöglicht. Unter anderem induziert NF- κ B die Transkription von I κ B α . Dieses Protein besitzt zusätzlich zu seiner direkten inhibitorischen Funktion eine Zellkern-Exporter-Sequenz (nuclear export sequence, NES), die NF- κ B von der DNA löst und wieder aus dem Zellkern transportiert. Auch die meisten anderen Inhibitoren von NF- κ B werden durch dessen Aktivität vermehrt gebildet [40-42].

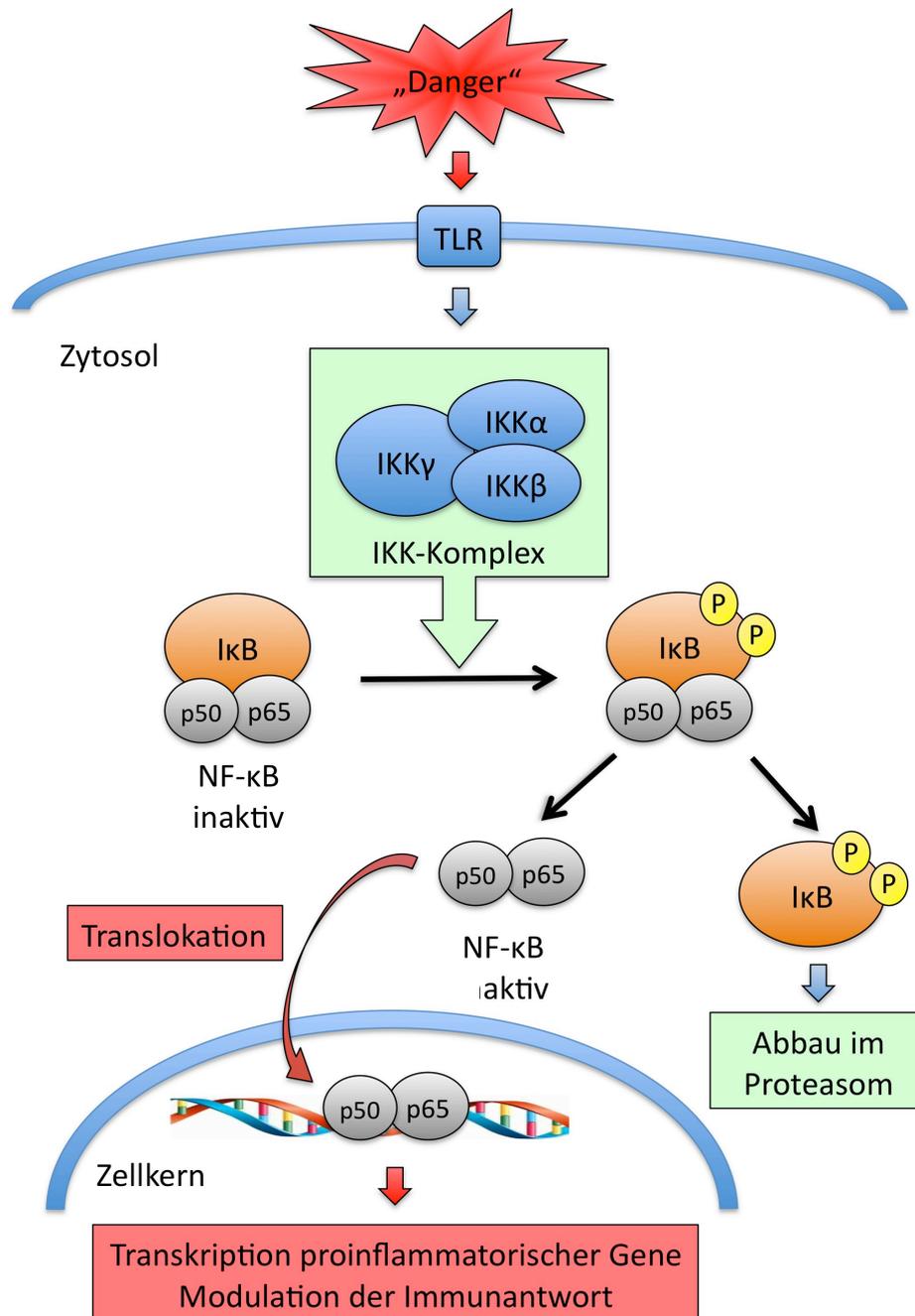


Abb. 2: Schematische Darstellung des klassischen Aktivierungsweges von NF-κB. Der IKK-Komplex katalysiert nach seiner Aktivierung die Phosphorylierung von IκB. Der Inhibitor dissoziiert und NF-κB kann in den Zellkern translozieren. Der Knockout der IKKβ-Untereinheit des IKK-Komplexes verhindert die Phosphorylierung von IκB, NF-κB verbleibt in seiner inaktiven Form im Zytosol.

1.3.2 Bedeutung von NF- κ B am Herzen

Nach Herzschädigungen unterschiedlicher Ursache wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei Versuchstieren wie Mäusen und Ratten aber auch beim Menschen sowohl in peripheren Zellen als auch in verschiedenen Zelltypen im Herzen verstärkt aktiviert. Im Tiermodell führten sowohl der chronische Myokardinfarkt als auch andere Arten der kardialen Schädigung wie Ischämie-Reperfusionsschäden oder chronische Druckbelastungen zu einer nachweisbar erhöhten Aktivität. Auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und ischämischer Kardiomyopathie, als auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz anderer Ursachen konnte eine dauerhaft erhöhte NF- κ B-Aktivität festgestellt werden [45-48].

Die detaillierten Mechanismen dieser Aktivierung sowie ihre pathophysiologische Bedeutung sind bisher jedoch nicht vollständig verstanden. In verschiedenen Studien wurden daher die Effekte einer Hemmung der NF- κ B-Aktivität auf das Remodeling nach kardialer Schädigung untersucht.

In den ersten acht Wochen nach Myokardinfarkt zeigten Mäuse mit globalem p50-Knockout (KO) sowie Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch Verabreichung eines IKK β -Inhibitors erhöhte Überlebensraten, bessere funktionelle Ergebnisse und ein verbessertes Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM) [14-15, 49]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich nach Myokardinfarkt bei Mäusen mit kardiomyozytenspezifischer Suppression der NF- κ B-Aktivität durch I κ B α -Überexpression [50]. Allerdings wurde in den ersten 24 Stunden nach Myokardinfarkt im selben Tiermodell eine Zunahme von Infarktgröße und Apoptoserate beobachtet [51].

Nach Ischämie und Reperfusion führten sowohl die kardiomyozytenspezifische, als auch die globale Hemmung von NF- κ B zu im Vergleich zum Wildtyp verringerten Infarktgrößen und einem verminderten Entzündungszellinfiltrat. Die posi-

tiven Effekte des globalen p50-Knockouts ließen sich jedoch durch eine Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in KO-Tiere aufheben. Dies legt nahe, dass die schädigenden Effekte durch die NF- κ B-Aktivität in Leukozyten vermittelt werden [16, 52-53].

Auch Studien zur kardialen Hypertrophie durch chronische Gabe von Angiotensin II bzw. Isoproterenol ergaben Hinweise auf schädigende Einflüsse von NF- κ B [54-55]. Allerdings verhinderte eine kardiomyozytenspezifische Suppression der NF- κ B-Aktivität auch die adaptative, physiologische Hypertrophie des Herzens nach leichtgradiger Aortenkonstriktion [56]. Dagegen zeigten Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer NF- κ B-Blockade nach höhergradiger transverser Aortenkonstriktion vermehrte kardiale Hypertrophie, eine erhöhte Apoptoserate der Kardiomyozyten, verstärkte kardiale Fibrose und eine fortschreitende Herzinsuffizienz [57-58].

Kardioprotektive NF- κ B-Effekte zeigten sich auch in Studien zur ischämischen Präkonditionierung. Eine Inhibition der NF- κ B-Aktivität verhinderte hier die positiven Effekte der Konditionierung und führte zu größeren Infarktgrößen [59].

Die bisherigen Ergebnisse unterstreichen die zentrale pathophysiologische Bedeutung der NF- κ B-Aktivität am Herzen. Dennoch wird angesichts der teils widersprüchlichen Auswirkungen der NF- κ B-Inaktivierung deutlich, dass der Transkriptionsfaktor neben kardiotoxischen auch kardioprotektive Effekte vermitteln kann. Hierbei scheinen sowohl Zeitpunkt und Dauer der Aktivierung, als auch die Aktivität in verschiedenen Zelltypen für die unterschiedlichen Auswirkungen verantwortlich zu sein. Eine detailliertere Kenntnis des komplexen Systems aus verschiedenen Aktivatoren, Co-Stimulatoren, Regulatoren und Inhibitoren, unterschiedlichen, zum Teil nicht komplett aufgeklärten Signalwegen und nicht zuletzt unterschiedlichen Konfigurationen von NF- κ B selbst ist für eine gezielte therapeutische Modulation der Vorgänge daher unabdingbar [9, 16, 42].

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Die Modulation der NF- κ B-Aktivität zur Verbesserung des Remodeling und Vermeidung der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt stellt möglicherweise ein interessantes Therapieziel dar. Eine genauere Kenntnis der Abläufe und der Bedeutung der verschiedenen beteiligten Zelltypen ist für einen spezifischen Therapieansatz unabdingbar [9].

Frühere Studien wiesen in verschiedenen Zelltypen im Herzen und in peripheren Leukozyten eine erhöhte NF- κ B-Aktivität nach Myokardinfarkt und bei chronischer Herzinsuffizienz nach [45-46, 48]. Eine globale Inaktivierung des klassischen Aktivierungsweges durch Knockout der Untereinheit p50 reduzierte im Tierexperiment die Mortalität und das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt [14-15].

Auch in Ischämie-Reperfusionen-Studien hatte der p50-KO positive Auswirkungen im Sinne einer verminderten Infarktgröße und geringerer Neutrophilenmigration. Der Verdacht, dass die schädigenden NF- κ B-Effekte durch die NF- κ B-Aktivität in Leukozyten bedingt sein könnten, wurde durch Generierung von Knochenmarkschimären erhärtet [16].

Diese Arbeit untersucht daher durch eine gewebespezifische Inhibition des klassischen Aktivierungsweges von NF- κ B in Granulozyten und Makrophagen die Hypothese, dass vor allem die erhöhte NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen für die schädigenden Effekte auf das Remodeling nach Myokardinfarkt verantwortlich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Studie wurden Mäuse mit fehlender NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen und Granulozyten (KO) untersucht und mit einer wildtypischen Kontrollgruppe (WT) verglichen. In den KO-Tieren wurde die Expression von I κ B-Kinase β (IKK β) mit Hilfe des Cre/LoxP-Rekombinationssystems zelltypspezifisch inhibiert. Aufgrund der fehlenden Deaktivierung des Inhibitors von NF- κ B (I κ B) durch den IKK-Komplex bleibt eine NF- κ B-Aktivierung aus.

Das Cre/LoxP-Rekombinationssystem ist eine etablierte Methode, die eine gewebsspezifische Modifizierung oder Entfernung von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Das Genom aller anderen Gewebe bleibt unverändert [60].

Rekombinasen katalysieren die Spaltung und Neuverknüpfung des DNA-Stranges zwischen spezifischen Basensequenzen. Die Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase (cyclization recombination) ist die LoxP-DNA-Sequenz. Zur Inaktivierung des Zielgenes wird daher vor und hinter dieses Gen gezielt je eine LoxP-Sequenz eingefügt. Man bezeichnet diesen Vorgang als „floxed“ (flanked bei LoxP). Sind die beiden LoxP-Sequenzen in die gleiche Richtung orientiert, erfolgt eine Exzision des dazwischen liegenden DNA-Abschnittes durch die Cre-Rekombinase. Soll diese Exzision gewebsspezifisch erfolgen, muss die Expression des Cre-Rekombinase-Gens an einen für dieses Gewebe spezifischen Promotor gekoppelt werden. So wird durch eine Insertion des Cre-Rekombinase-Gens am endogenen M-Lysozym-Lokus der Mäuse hochspezifisch eine Expression ausschließlich in Granulozyten und Makrophagen erreicht [61].

Durch Kreuzung von LysMCre- mit lox-IKK β -Tieren wurden LysMCre-IKK β -KO-Mäuse erzeugt, denen granulozyten- und makrophagenspezifisch I κ B-Kinase β (IKK β) fehlt. In allen anderen Geweben bleiben die Expression von IKK β erhalten und somit auch die NF- κ B-Aktivität unverändert.

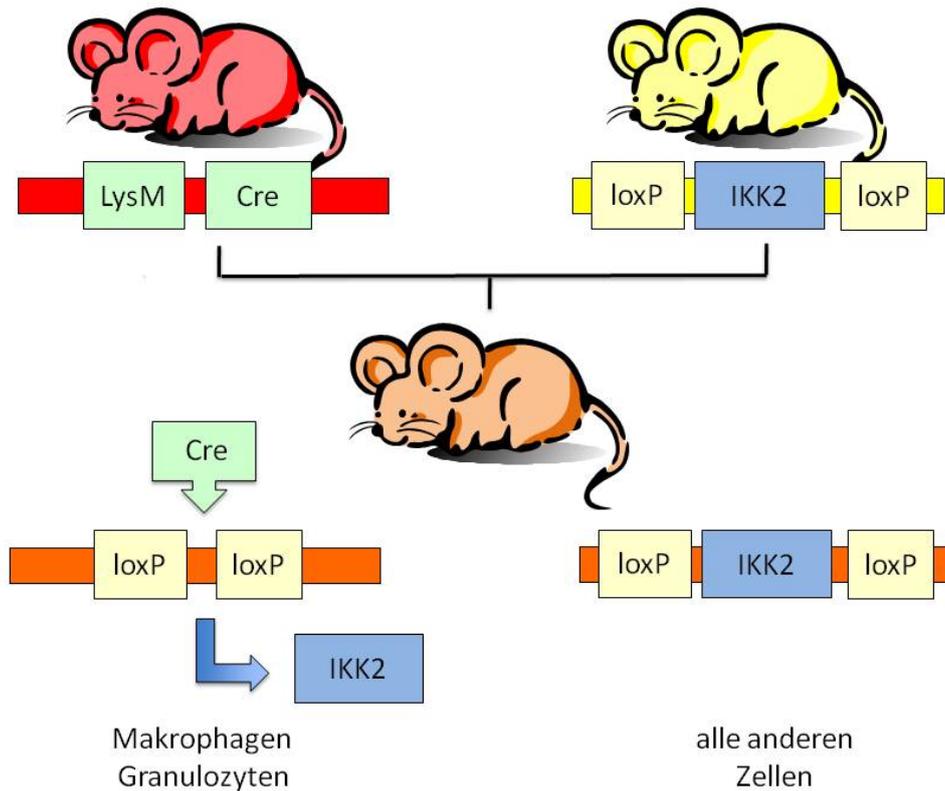


Abb. 3: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-Rekombinationssystems. Durch Kreuzung von LysM-Cre- mit lox-IKK β -Tieren werden Nachkommen erzeugt, deren Genom beide Veränderungen enthält. Bei diesen Tieren ist NF- κ B spezifisch in Granulozyten und Makrophagen inaktiv, in allen anderen Geweben bleiben die IKK β -Expression und somit die NF- κ B-Aktivität unverändert. Modifizierte Darstellung nach Frantz et al. [12].

Die Suffizienz des Knockouts wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten ohne Kenntnis des Genotyps. Die Verblindung wurde erst nach Abschluss der Versuche aufgehoben.

Alle Mäuse wurden unter identischen stabilen Bedingungen gehalten. Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Kommission geprüft und genehmigt.

2.2 Differentialblutbild

Um auszuschließen, dass der KO einen direkten Einfluss auf die Anzahl der Granulozyten und Makrophagen hat, wurde von Tieren beider Gruppen mittels Durchflusszytometrie das Differentialblutbild bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg

2.3 Koronarligatur

Ein etabliertes Modell für die chronische Herzinsuffizienz ist der chronische Myokardinfarkt, der durch eine operative Ligatur der linken Koronararterie nach einem standardisierten Verfahren verursacht wurde [62]. Scheinoperierte KO- und WT-Tiere (SHAM), bei denen auch nach der Operation keine Anzeichen eines Myokardinfarktes nachweisbar waren, dienten als Referenzgruppe.

Nach Betäubung mit Isofluran (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) wurden die Tiere mit einem 22G-Venenkatheter (BD Venflon™ Pro, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) endotracheal intubiert und mit Hilfe eines Kleintierbeatmungsgerätes (Mouse Ventilator, UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien) beatmet. Die Narkose wurde durch Isofluran aufrechterhalten. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgte eine Fixierung der Mäuse in Rückenlage und die Ableitung eines präoperativen Elektrokardiogrammes (cardiofax GEM EKG-Gerät, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H., Deutschland). Anschließend wurde der Thorax median eröffnet und mit Hilfe eines modifizierten Rippenspreizers offen gehalten. Unter Sicht erfolgten eine Fensterung des Perikards und das Aufsuchen des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra (RIVA, LAD), die dann ca. 1mm apikal des linken Vorhofes mit chirurgischem Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) umstoßen und dauerhaft ligiert wurde. Die Entfärbung und Erweiterung

des linken Ventrikels kennzeichnete eine suffiziente Ligatur. Zudem wurde der Erfolg der Infarzierung durch die Ableitung eines weiteren Elektrokardiogrammes kontrolliert, bevor die Wunde schichtweise verschlossen wurde.

Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere jeweils eine Injektion von 0,05-0,10 mg Buprenorphin (Temgesic ®, Essex Pharma, München, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht. Auf eine antibiotische Therapie wurde verzichtet. Bis zum Zeitpunkt der Organentnahme waren keine Anzeichen für Infektionen erkennbar.

2.4 Echokardiographie

Präoperativ sowie postoperativ an den Tagen 1, 21 und 56 wurden transthorakale Echokardiographien durchgeführt [63]. Dieses nicht invasive Verfahren eignet sich besonders für die Verlaufsbeobachtung des Remodelings.

Alle Ultraschalluntersuchungen wurden von einer einzelnen erfahrenen Untersucherin nach einem standardisierten Algorithmus durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde der 15 MHz-Schallkopf eines Maus-Echokardiographie-Gerätes (Toshiba Aplio SSa-700A, Toshiba Medical Systems GmbH, Neuss, Deutschland) verwendet.

Die Tiere wurden thorakal enthaart und anschließend einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch sediert. Bei erhaltener Spontanatmung wurden sie in Rückenlage mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Während der Untersuchung wurde kontinuierlich ein EKG aufgezeichnet. Da geringe Herzfrequenzen bei Mäusen eine scheinbare Ventrikeldilatation vortäuschen können, wurden die Messungen bei einer Herzfrequenz zwischen 500 und 600 Schlägen pro Minute durchgeführt.

Zunächst wurden zweidimensionale Querachsenansichten (B-Mode) des Mauserzens mit Hilfe der bei der echokardiographischen Untersuchung des

Menschen etablierten Standardeinstellungen der kurzen parasternalen Achse dargestellt und apikal (AP) und auf Höhe der Papillarmuskelebene (PA) aufgezeichnet. Zudem erfolgte eine Darstellung der Ventrikelbewegung über die Zeit (M-Mode, 100 mm/s).

Mit Hilfe des Computerprogrammes Image Arena (Tom Tec Imaging Systems, München, Deutschland) wurden die endsystolische (ESA) und enddiastolische (EDA) Kammeröffnungsflächen des linken Ventrikels gemessen. Aus den Durchschnittswerten von jeweils drei Messungen wurde die fraktionelle Verkürzung (fractional shortening, FS) der Ventrikelfläche (FS-A) berechnet:

$$FS-A=(EDA-ESA)/EDA$$

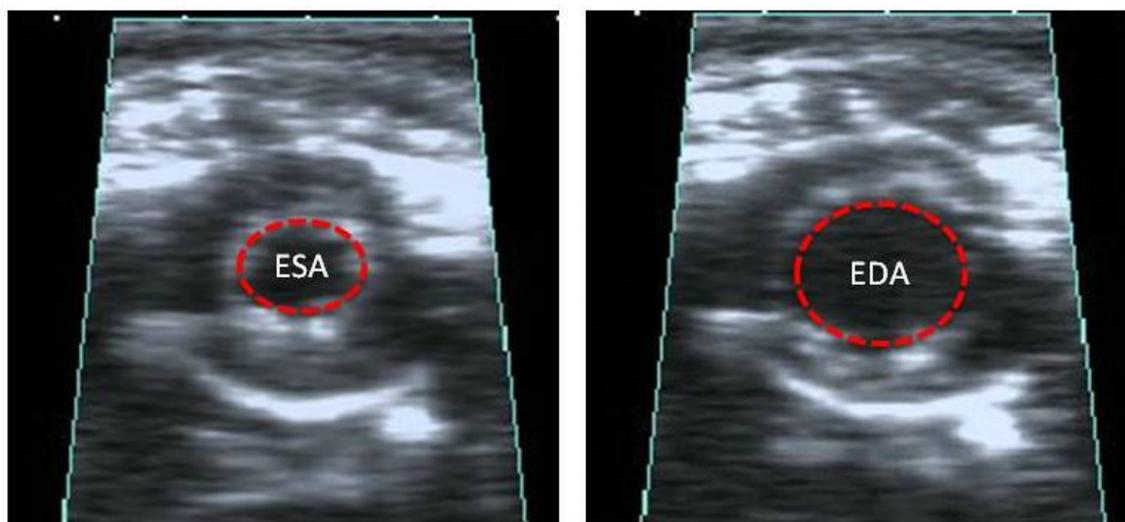


Abb. 4: Echokardiographische Darstellung der Kammeröffnungsfläche im B-Mode.

links: endsystolische Kammeröffnungsfläche

rechts: enddiastolische Kammeröffnungsfläche

Anschließend wurden im M-Mode endsystolischer (ESD) und enddiastolischer Durchmesser (EDD) ermittelt und ebenfalls aus den Durchschnittswerten von je drei Messungen die fraktionelle Verkürzung der Ventrikelwand (FS-D) bestimmt:

$$FS-D=(EDD-ESD)/EDD$$

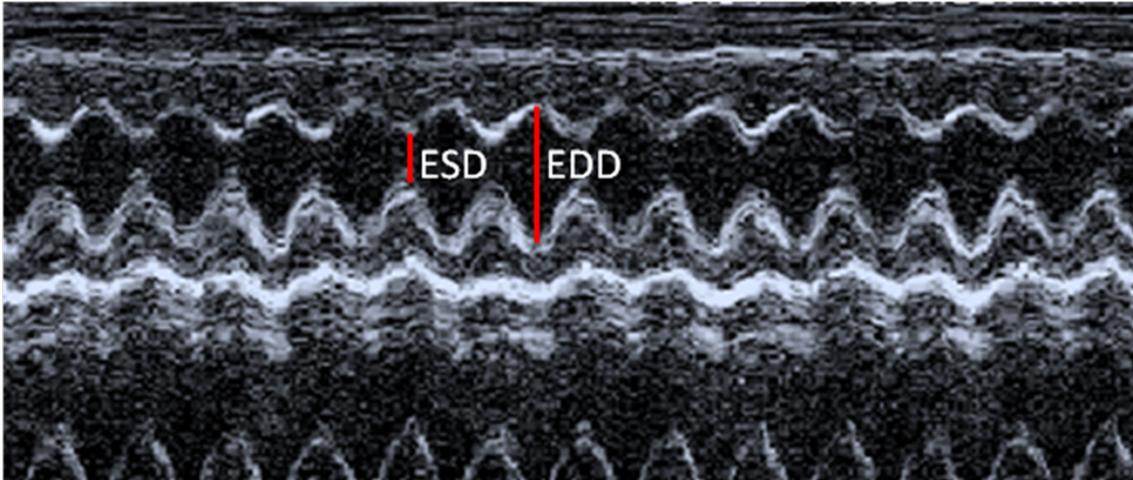


Abb. 5: Echokardiographische Darstellung des Ventrikeldurchmessers im M-Mode.

links: endsystolischer Ventrikeldurchmesser

rechts: enddiastolischer Ventrikeldurchmesser

2.5 Hämodynamische Messungen

Zur weiteren Beurteilung der kardiovaskulären Funktion wurden 8 Wochen nach der Infarktoperation mittels einer Linksherzkatheteruntersuchung hämodynamische Messungen in vivo durchgeführt [64].

Unter Isofluran-Narkose wurde ein flüssigkeitsgefüllter Polyethylenkatheter über die Arteria carotis communis retrograd in die Aorta und den linken Ventrikel vorgeschoben und dabei eine Druckkurve aufgezeichnet, über deren Änderung eine Lagekontrolle erfolgte. So konnten die Herzfrequenz, der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) sowie die maximale Anstiegs- bzw. Abfallgeschwindigkeit des linksventrikulären systolischen Druckes (dP/dt_{\max} bzw. dP/dt_{\min}) bestimmt werden.

2.6 Gewebegewinnung und -aufbereitung

Nach Abschluss der hämodynamischen Untersuchungen wurden den noch narotisierten Tieren durch eine quere Laparotomie unterhalb des Rippenbogens

mit anschließender Thoraxeröffnung jeweils Lunge, Milz und Herz entnommen und sofort nach der Entnahme gewogen. Nach Abtrennung von rechtem Ventrikel und Herzohren wurde der linke Ventrikel transversal in vier gleich große Ringe geschnitten [65]. Herzspitze, Herzbasis und rechter Ventrikel wurden für spätere molekularbiologische Analysen mit Hilfe von flüssigem Stickstoff sofort eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Von den mittleren Herzringen wurde einer in Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, der andere bei -20°C in Isopentan eingefroren. Beide wurden im Verlauf vor allem für histologische Untersuchungen verwendet.

2.7 Bestimmung der Infarktgröße

Zur Bestimmung der Infarktgröße (prozentualer Anteil infarzierten Gewebes am gesamten linken Ventrikel) wurden 5µm dicke Querschnitte aus dem in Paraffin gebetteten Herzring in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert, anschließend in Picrosiriusrotlösung (PSR) gefärbt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit Enthellan (Merck, Darmstadt, BRD) fixiert. So erhält die Infarktnarbe eine rote Farbe, die sie deutlich vom umgebenden, gesunden Herzgewebe (gelb) abgrenzt.

Die gefärbten Präparate wurden bei zehnfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Axio Scope 2 plus, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) betrachtet und fotografiert. Die digitalen Bilder wurden mit der Software Image J (Version 1.40g, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) vermessen und planimetrisch ausgewertet. Aus dem Verhältnis des epi- bzw. endokardialen Umfangs der Infarktnarbe zu dem des gesamten linken Ventrikels erhält man die prozentuale Infarktgröße [65-66].

$$\text{Infarktgröße} = \frac{1}{2} (U_{\text{epi}} \text{ Narbe} / U_{\text{epi}} \text{ Ventrikel} + U_{\text{endo}} \text{ Narbe} / U_{\text{endo}} \text{ Ventrikel})$$



Abb. 6: PSR-gefärbter Gewebeschnitt.

Die Infarkt Narbe (rot) ist deutlich vom nicht infarzierten Gewebe (gelb) abzugrenzen.

In die weiteren Analysen gingen nur Tiere mit einer Infarktgröße über 30% ein. Tiere ohne echokardiographischen und histologischen Nachweis eines Infarktes wurden als SHAM-Tiere klassifiziert.

2.8 Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes

Der interstitielle Kollagengehalt wurde nach der etablierten Methode von Junqueira et al. bestimmt [67-68].

Bei dieser Methode nutzt man die optische Anisotropie des Kollagens, das polarisiertes Licht in zueinander senkrecht stehende Schwingungsebenen bricht. Dieser Effekt wird durch eine Färbung mit Picrosiriusrotlösung (PSR) bis zu siebenfach verstärkt. Der Gehalt an Kollagen I und III kann so anhand seiner spezifischen Wellenlänge detektiert werden.

PSR-gefärbte Paraffinschnitte wurden bei 20-facher Vergrößerung zunächst mit dem Hellfeldmikroskop und derselbe Bildausschnitt anschließend jeweils der-

selben Belichtungszeit im polarisierten Licht mit aufgenommen. Mit Hilfe der Computersoftware Sigma Scan Pro (Version 5.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) wurde das polarisierte Bild in die vier Grundfarben gelb, blau, rot und schwarz aufgeteilt. Durch digitale Subtraktion der Pixel des isoliert schwarzen Bildes von der Originalaufnahme im polarisierten Licht konnte der Kollagenanteil des Gewebes errechnet werden. Anhand der Hellfeldaufnahme wurde das erhaltene Ergebnis um die beim Schneiden des Gewebes entstandenen Gewebelücken bereinigt.

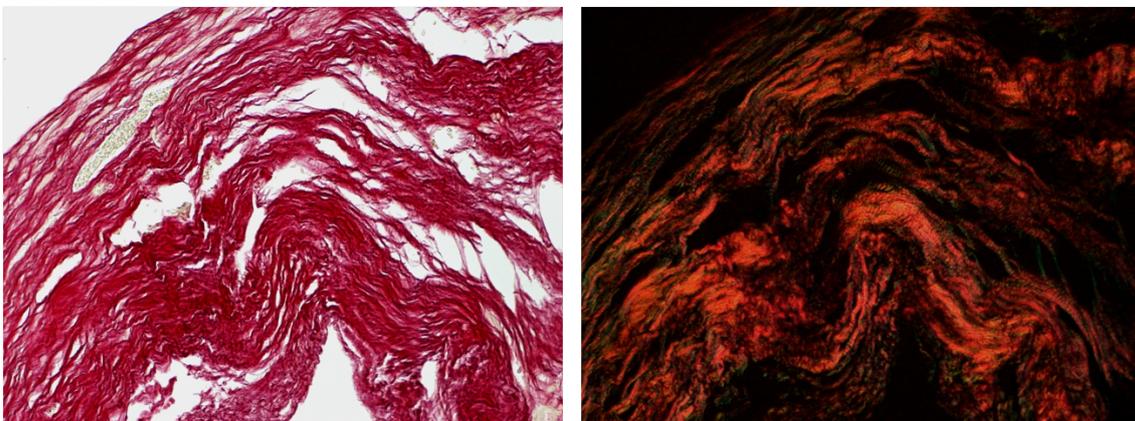


Abb. 7: PSR-gefärbter Gewebeschnitt im Bereich der Narbe.

links: Aufnahme im Hellfeld

rechts: Aufnahme im polarisierten Licht

Aufgrund seiner optischen Anisotropie kann Kollagen anhand seiner spezifischen Wellenlänge detektiert werden.

2.9 Immunhistochemische Untersuchungen

2.9.1 Grundlagen

Immunhistochemische Verfahren beruhen auf dem Prinzip, definierte Strukturen, zum Beispiel einen bestimmten Zelltyp, anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene, der sogenannten Epitope, im Gewebe aufzusuchen und sie spezifisch anzufärben.

Hierzu bedient man sich im Tiermodell hergestellter Antikörper, die spezifisch an das gesuchte Antigen binden. Inkubiert man eine Gewebeprobe mit diesen Antikörpern, verbinden sie sich mit den entsprechenden Antigenen in der Probe. Aus der Anordnung der Antikörper kann man daher auf die Lokalisierung des gesuchten Antigens im Gewebe schließen.

Für die Detektion der Antikörper stehen zwei grundsätzlich verschiedene Vorgehensweisen zur Verfügung:

Bei der sogenannten „direkten“ Methode ist der gegen das gesuchte Antigen gerichtete Antikörper direkt markiert, z. B. durch Koppelung an einen Farbstoff, ein radioaktives Molekül oder ein Enzym, das eine Reaktion mit farbigem Endprodukt katalysiert.

Bei der „indirekten“ Methode ist nicht der direkt gegen die zu untersuchende Struktur gerichtete Primärantikörper markiert, sondern es wird ein weiterer, sogenannter sekundärer markierter Antikörper eingesetzt, der gegen Immunglobuline der Tierart gerichtet ist, aus der der erste Antikörper gewonnen wurde. Hierdurch erfolgt eine erste Signalverstärkung.

In den meisten Fällen ist das so erzeugte Signal jedoch immer noch zu schwach, um sicher detektiert werden zu können, und bedarf daher einer weiteren Verstärkung. Diese kann unter anderem durch die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC) erfolgen. In diesem Fall ist der sekundäre Antikörper mit einem Biotin-Molekül markiert. Dieses kann von einem Avidin-Molekül gebunden werden. Avidin besitzt mehrere Biotin-Bindungsstellen und kann über diese weitere Biotin-tragende Markerproteine binden, beispielsweise eine biotinylierte Meerrettich-Peroxidase. Dieses Enzym bildet aus dem im eigentlichen Färbeschritt zugegebenen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ein braunes Endprodukt [69].

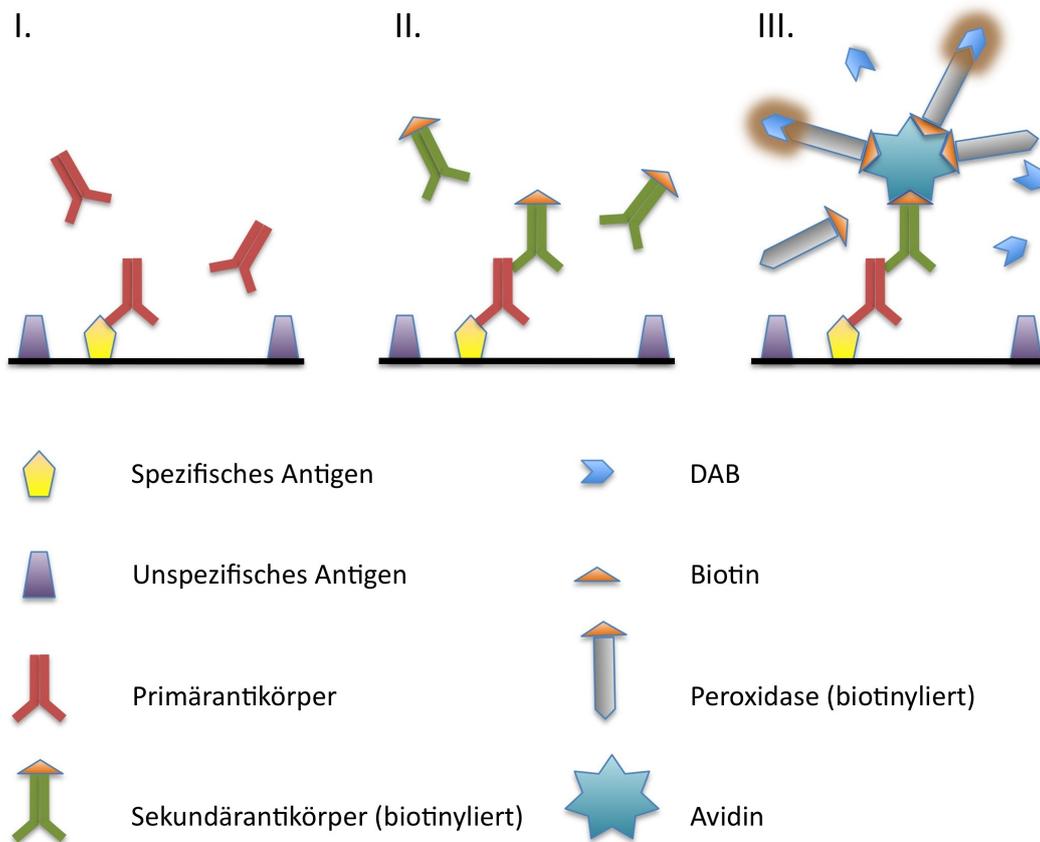


Abb. 8: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC).

Der Primärantikörper bindet spezifisch an das zu detektierende Antigen. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. Durch Bindung an die Biotin-Gruppe des Sekundärantikörpers wird Avidin in räumlicher Nähe zum gesuchten Antigen fixiert. Die übrigen Biotinbindungsstellen des Avidinmoleküls werden durch biotinylierte Meerrettich-Peroxidase besetzt, die die Umsetzung von DAB in ein bräunliches Produkt katalysiert.

Um die Spezifität des Signals sicher zu stellen, werden die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen vor der Färbung mit Wasserstoffperoxid blockiert. Eine unspezifische Bindung der Antikörper wird durch eine Inkubation des Gewebes mit einer Blockierungslösung verhindert. Hierfür kann u.a. das Serum der Spezies verwendet werden, aus der der Zweitantikörper gewonnen wurde.

Unspezifischen Bindungen von Avidin und biotinylierter Peroxidase wird durch Einlegen der Schnitte in Avidin- und Biotinlösung vorgebeugt.

2.9.2 Spezifische Färbung neutrophiler Granulozyten

Nach Entparaffinierung und Hydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe wurden 5µm dicke Gewebeschnitte 10 Minuten in einem ca. 95°C heißen Zitratpuffer (Unmasking Solution, H3300, Vector Laboratories, Burlingame, USA) zur Epitopdemaskierung gekocht und anschließend in frischem Puffer auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten erfolgte der Block der endogenen Peroxidase durch die 30minütige Inkubation mit 0,3% Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂ in Methanol). Anschließend wurden die Schnitte nach drei weiteren Spülungen in PBS-Puffer für 15 Minuten mit 5% Kaninchenserum (Normal Rabbit Serum, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und Avidinlösung (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) als Blockierungslösung bedeckt. Die so vorbereiteten Schnitte wurden dann über Nacht mit dem primären Antikörper (Rat Anti-Mouse Neutrophiles monoclonal, LCU-8993, Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland; Verdünnung 1:100) inkubiert, der spezifisch an ein Oberflächenantigen der neutrophilen Granulozyten bindet. Der Antikörperlösung wurde Biotinlösung (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) zum Block unspezifischer Peroxidasebindungen zugesetzt. Als Kontrolle wurden entsprechende Schnitte mit reiner Blockierungslösung ohne den Zusatz des Antikörpers inkubiert.

Am nächsten Tag folgte nach gründlichem Waschen des Gewebes in PBS-Puffer die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (biotinylierter Rabbit Anti-Rat Antikörper, BA-4001, Vector Laboratories, Burlingame, USA; Verdünnung 1:100) 60 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten mit einer Lösung inkubiert, die einen Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase enthält (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Danach erfolgte der eigentliche Färbeschritt mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Proben wurde die Reaktion nach jeweils exakt derselben Zeitspanne durch mehrfaches Waschen in demineralisiertem Wasser unterbrochen. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Enthellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

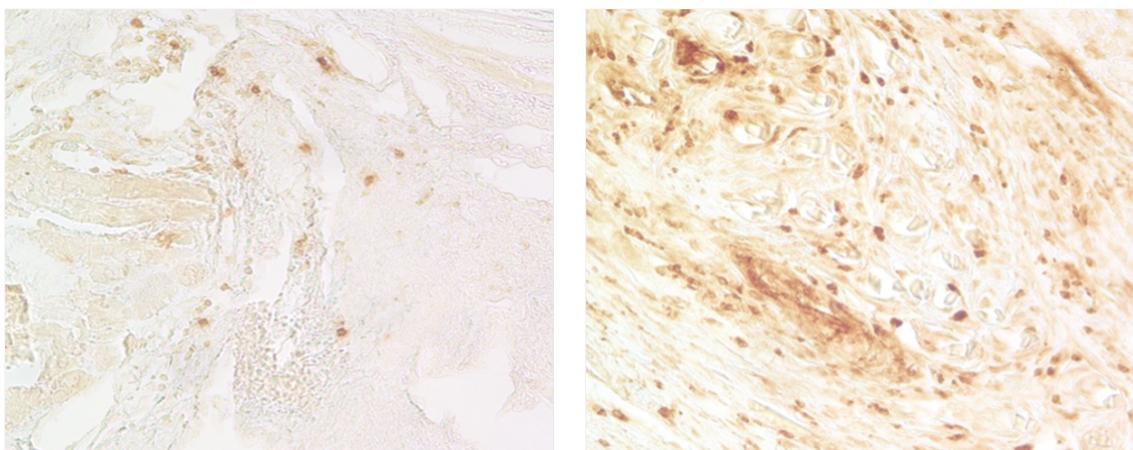


Abb. 9: Immunhistochemische Färbung neutrophiler Granulozyten in Herzgewebe.
linkes Bild: sehr wenige braun gefärbte neutrophile Granulozyten
rechtes Bild: sehr viele braun gefärbte neutrophile Granulozyten

Unter dem Lichtmikroskop (Axio Scope 2 plus, Carl Zeiss AG, Jena Deutschland) konnten nun die im Bereich der Borderzone eingewanderten neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld ausgezählt werden.

2.10 Biochemische Untersuchungen

Zur Beurteilung der humoralen Immunreaktion und der Neovaskularisation des Herzens nach der Infarzierung wurde der Gehalt an mRNA im Herzen bestimmt, die für Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) bzw. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) codiert. Aus dem mRNA-Gehalt kann auf die Expression eines Genes und somit indirekt auf die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle vorhandene Menge des entspre-

chenden Genproduktes schließen. Da in der Regel nur sehr geringe mRNA-Mengen im Gewebe vorhanden sind, wäre eine direkte Quantifizierung sehr ungenau. Daher wird zunächst die gesamte RNA aus dem Gewebe extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben, die dann mittels Real-Time-PCR quantifiziert werden kann. Die entstandene Menge der für die gesuchten Proteine spezifischen cDNA ist ein indirekter Parameter für die ursprünglich vorhandene mRNA [70].

2.10.1 RNA-Gewinnung

Um die im Gewebe vorhandene RNA zu isolieren wurde ein auf der Verwendung von Trizol (TRIzol®Reagent, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) basierendes Single-Step-Verfahren angewandt [71]. Hierbei handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol, die bei der Homogenisierung des Gewebes die Integrität der RNA gewährleistet, während andere zelluläre Strukturen zerstört werden. Um eine Zersetzung der RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen zu verhindern, wurden zudem nur direkt zuvor autoklavierte und mit Wasserstoffperoxid gereinigte Gefäße und Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser verwendet.

Zunächst wurde das Gewebe der Herzspitze kurz in Trizol homogenisiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von je 600 µl Chloroform (Trichlormethan/Chloroform, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Zentrifugation (10 Minuten bei 10000 U/min, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 4°C eine Phasenseparation, wobei RNA in der wässrigen Phase verbleibt, während sich Proteine in der organischen Phenolphase und DNA und zelluläre Bestandteile zwischen den beiden Phasen ansammeln. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde abgetragen und der Trennschritt anschließend wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Nun konnte die erhaltene RNA mit Isopropylalkohol präzipitiert werden. Nach zehnminütiger Inkubation mit Isopropanol (Merck, Darmstadt,

Deutschland) bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation bei 4°C (10 Minuten bei 10000 U/min). Vom so entstandenen RNA-Pellet wurde der Überstand vorsichtig entfernt und verworfen. Danach wurde das Pellet durch Zugabe einer 75%igen Ethanollösung (Ethanol absolute, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland; verdünnt in DEPC-Wasser) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 13000 U/min und 4°C) wurde der Überstand erneut verworfen und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 20µl DEPC-Wasser rekonstituiert und die RNA photometrisch (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare Europe, München, Deutschland) quantifiziert.

2.10.2 cDNA-Herstellung

Aus der so erhaltenen RNA kann mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, ausgehend von Start-Oligonukleotiden (Primer) die zu ihr komplementäre DNA (cDNA) gebildet werden. Je nach Sequenz der zugegebenen Primer wird die RNA eines bestimmten Genes oder - bei Zugabe unspezifischer Primer - die gesamte RNA der Gewebeprobe in cDNA umgeschrieben. Da jedes mRNA-Molekül mehrfach als Vorlage für die cDNA-Herstellung dienen kann, kommt es durch diesen Schritt gleichzeitig zu einer Amplifizierung der Probe.

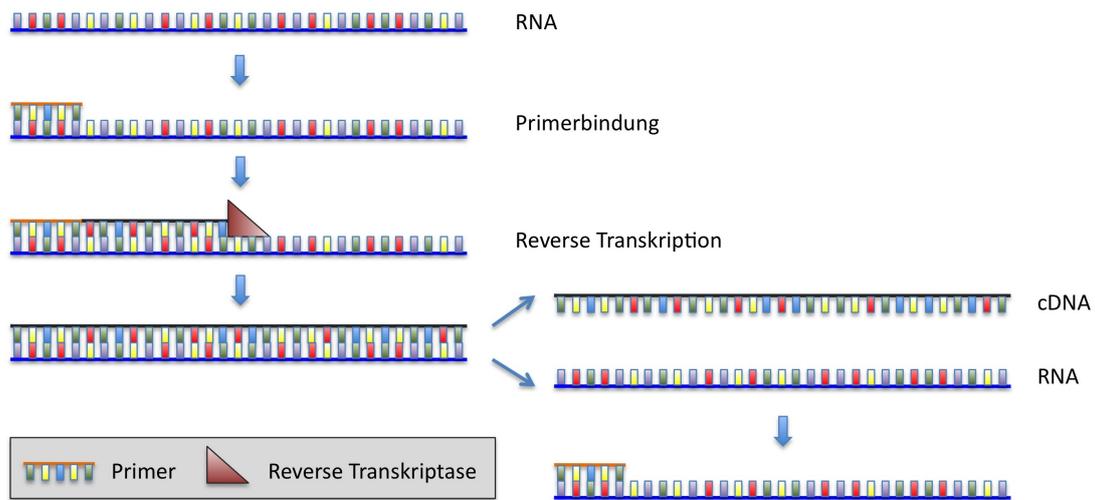


Abb. 10: Prinzip der cDNA-Synthese bei der Realtime-PCR.

Das Enzym Reverse Transkriptase erstellt ausgehend vom zugegebenen Primer einen zur vorhandenen mRNA komplementären DNA-Strang. Dieser Vorgang kann für jedes mRNA-Molekül beliebig oft wiederholt werden. Es kommt daher gleichzeitig zu einer Amplifizierung der Probe.

Um Verunreinigungen des Produkts der späteren Realtime-PCR zu verhindern, wurden vor Beginn der cDNA-Synthese zunächst DNasen zugegeben, die evtl. in der Probe vorhandene DNA abbauen. Zu 1 µg der RNA-Lösung wurden 1 µl 10x Reaktionspufferlösung und 1 µl DNase I (AMP-D1 DNase Kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Zugabe von RNase-freiem Wasser ad 10 µl und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNase-Reaktion mit 1 µl EDTA-haltiger Stop-Solution beendet. Anschließend wurden die DNA-freien Proben für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt.

Die reverse Transkription der DNA-bereinigten Proben erfolgte unter Verwendung des Synthesekits iScript cDNA (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Zu jeweils 11 µl der Proben wurden jeweils 4 µl Nuklease-freies Wasser, 4 µl iScript cDNA-Puffer und 1 µl iScript cDNA-Enzymmix, der die Reverse Transkriptase enthält, gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde in einem

PCR-Gerät (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zunächst 5 Minuten bei 25°C, dann 30 Minuten bei 42°C und anschließend 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Zuletzt wurde die Reaktion durch eine Abkühlung auf 4°C beendet. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.10.3 Quantitative Realtime-PCR

2.10.3.1 Prinzip der Realtime-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz, indem der natürliche Replikationsvorgang mehrfach hintereinander in vitro nachgeahmt wird.

Bei der Realtime-PCR erfolgt zudem eine kontinuierliche Quantifizierung der entstehenden Nukleinsäuren mittels eines Fluoreszenzdetektionssystems. Aus der exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes lässt sich so die Menge des ursprünglich eingesetzten Templates (cDNA) bestimmen.

Zunächst wird die DNA bei 94°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung) und zugleich jeder noch ablaufende enzymatische Prozess unterbrochen. Anschließend wird die Probe schnell abgekühlt, um eine Wiederherstellung der Doppelhelix-Struktur zu vermeiden. Nun binden die zuvor zugegebenen Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge (Matrizen). Die Temperatur, bei der dieser als Annealing bezeichnete Vorgang stattfindet, unterscheidet sich von Primer zu Primer und liegt je nach Länge und Basenfolge meist zwischen 55°C und 65°C. Die Auswahl der Primer richtet sich nach dem zu untersuchenden Gen. Die Sequenzen der Primer sind jeweils komplementär zum 5'- und zum 3'-Ende des Gens. Bei 68°C bis 72°C folgt nun ausgehend von diesen Startsequenzen die Synthese einer Kopie der Matrize durch die Polymerase aus freien Nukleotiden (dNTP) in 3'-5'-Richtung (Elongation). Durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte Denaturierung, Annealing und

Elongation kommt es zu einer exponentiellen Amplifizierung des vorhandenen genetischen Materials.

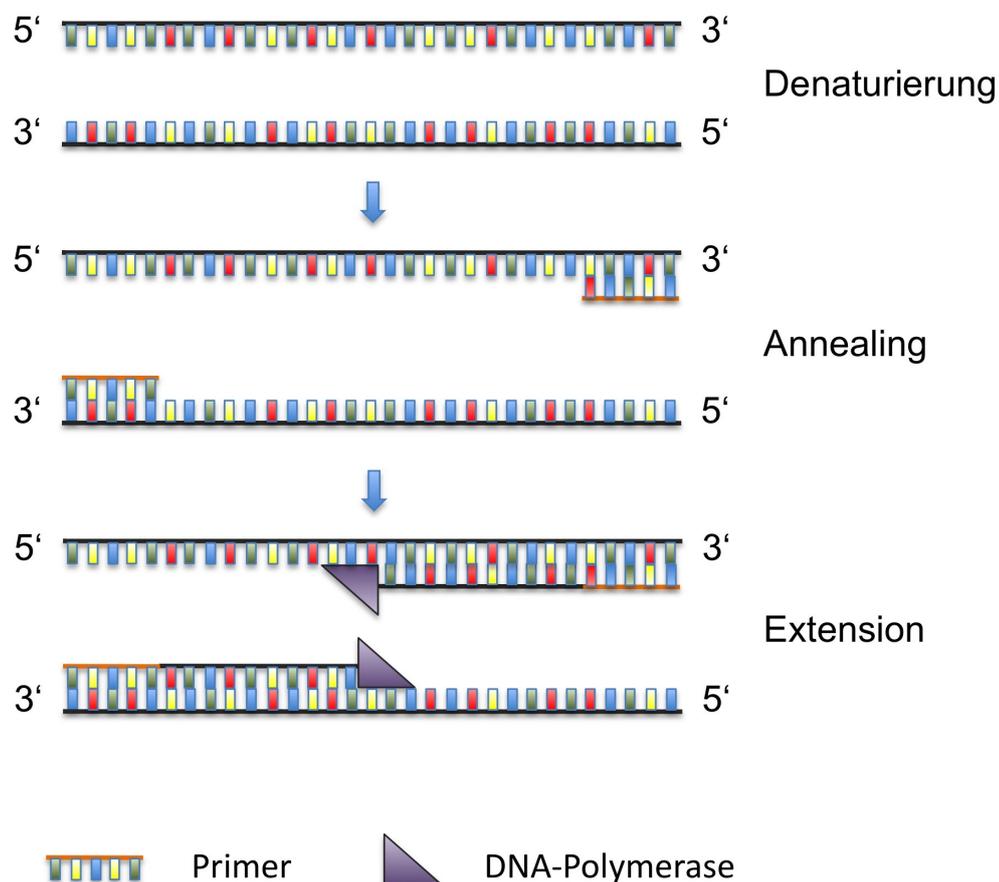


Abb. 11: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgeteilt (Denaturierung). Es folgt die Bindung des Primers an die zu amplifizierende DNA-Sequenz (Annealing). Ausgehend vom Primer bildet die DNA-Polymerase einen komplementären Einzelstrang (Elongation). Durch zyklische Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer spezifischen exponentiellen Amplifizierung der DNA-Zielsequenz.

Um eine kontinuierliche Quantifizierung zu gewährleisten, enthält der Ansatz für die Realtime-PCR zusätzlich zu den Primern weitere Oligonukleotide, die sich

spezifisch an eine komplementäre Zielsequenz zwischen den Primern anlagert und an beiden Enden durch fluoreszierende Moleküle gekennzeichnet sind.

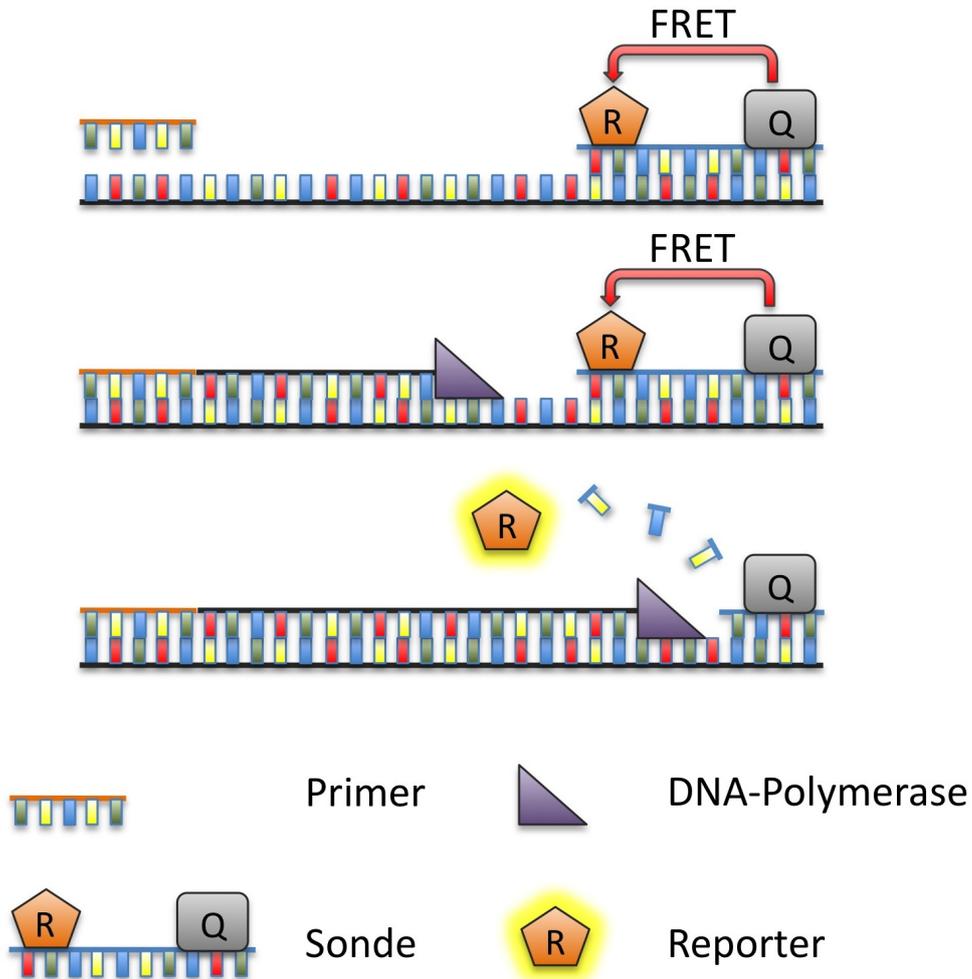


Abb. 12: Schematische Darstellung der quantitativen Realtime-PCR.

Bei intakter Sonde unterdrückt der Quencher (Q) die Fluoreszenzemission des Reporters (R) mittels FRET. Nach Bindung des Primers bildet die DNA-Polymerase einen zur Matrize komplementären Strang. Im Rahmen des Elongationsvorganges wird die Sonde abgebaut. Hierdurch werden Quencher und Reporter räumlich getrennt, die Fluoreszenzemission wird nicht mehr unterdrückt.

An ihrem 5'-Ende tragen diese sogenannten Sonden (TaqMan-Sonde) einen Reporterfarbstoff (z. B. FAM) und an ihrem 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (z. B. TAMRA). Wird eine intakte Oligonukleotidsonde durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, so wird die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencherfarbstoff übertragen. Durch diesen sogenannten Fluoreszenzenergietransfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET) wird eine Fluoreszenzemission zunächst unterdrückt. Durch die Hybridisierung zwischen Sonde und gesuchtem Gen während des PCR-Vorganges wird das Sondenmolekül in der Elongationsphase durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase gespalten. Da sich nun Reporter- und Quencherfarbstoff nicht mehr in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden wird der FRET aufgehoben und es kommt zur Fluoreszenzemission. Mit jedem PCR-Zyklus nimmt das emittierte Fluoreszenzsignal somit exponentiell zu.

Während der exponentiellen Phase der PCR ist die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zum vorhandenen Replikationsprodukt, welches wiederum proportional zur eingesetzten Templatemenge ist. Um diese zu quantifizieren wird daher die Anzahl der Zyklen bestimmt, nach der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Dieser Schwellenwert ist definiert als das Zehnfache der Standardabweichung der Fluoreszenzsignale der Zyklen 3 bis 15. Die Anzahl der benötigten Zyklen wird als C_T -Wert (Threshold Cycle) bezeichnet und stellt die quantitative Einheit der Realtime-PCR dar. Je höher die Templatekonzentration in der Ausgangsprobe ist, desto früher übersteigt das Fluoreszenzrauschen den Schwellenwert und desto niedriger ist dementsprechend der C_T -Wert [70, 72].

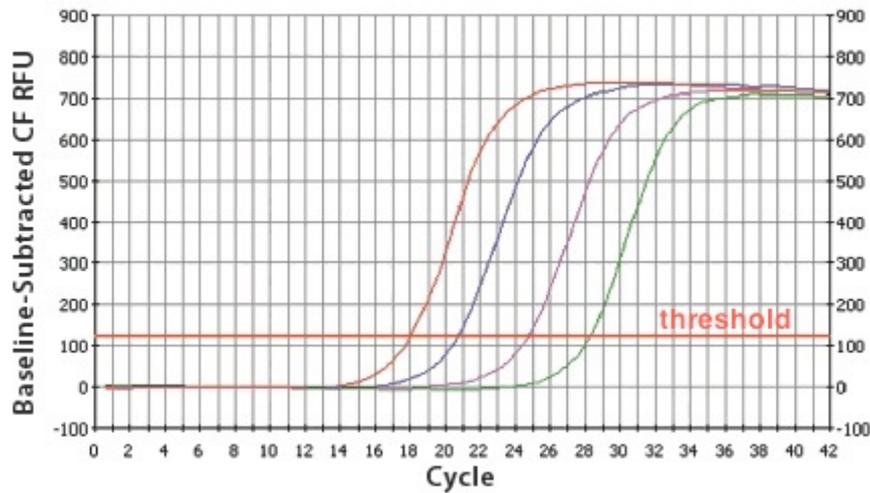


Abb. 13: Bestimmung des C_T -Wertes bei der Realtime-PCR.

Die Fluoreszenzemission steigt proportional zur vorhandenen DNA-Menge exponentiell an. Die Anzahl an Zyklen, die benötigt wird, um einen festgelegten Grenzwert (threshold) zu überschreiten, wird als C_T -Wert bezeichnet. Je größer die DNA-Ausgangsmenge ist, desto früher wird der Grenzwert überschritten und desto kleiner ist dementsprechend der C_T -Wert.

Für eine genauere Quantifizierung wird eine Standardkurve benötigt. Diese wird erstellt, indem neben den zu untersuchenden Proben gleichzeitig auch Standardproben mit bekannter DNA-Konzentration repliziert werden. Aus den C_T -Werten der Standardproben ergibt sich eine Standardkurve, aus der die unbekanntes Templatekonzentrationen der übrigen Proben abgelesen werden können. So erhält man anstatt der relativen Vergleichswerte der C_T -Bestimmung absolute Konzentrationen.

Um Unterschiede in der Gesamtproteinproduktion der untersuchten Gewebeproben auszugleichen, werden die Ergebnisse an der Expression eines sogenannten Housekeeping-Gens normiert. Es handelt sich hierbei um ubiquitär und homogen exprimierte Gene, die unabhängig von Zelltyp, Entwicklungsstadium oder äußeren Bedingungen konstant vorhanden sind und proportional zur gesamten Genexpression der Zelle exprimiert werden. Zumeist sind die von ihnen

kodierten Proteine am grundlegenden Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Ein gut geeignetes Referenzgen ist beispielsweise das für das 18S-Protein kodierende Gen. Da Unterschiede zwischen den einzelnen Proben immer Ziel- und Housekeeping-Gen gleichermaßen betreffen, wird durch dieses Vorgehen die Varianz des Ergebnisses deutlich reduziert. Erst durch Division der DNA-Konzentrationen des Zielgens durch diejenigen des Housekeeping-Gens erhält man somit vergleichbare Werte.



Abb. 14: Standardkurve zur Bestimmung der absoluten DNA-Konzentration.

Aus der Verdünnungsreihe einer Probe mit bekannter DNA-Konzentration wird eine Standardkurve erstellt, anhand derer sich die C_T -Werte der zu untersuchenden Proben absoluten Konzentrationswerten zuordnen lassen.

2.10.3.2 Vorgehensweise

Zur Bestimmung der TNF- α -, HIF- bzw. VEGF-Expression in der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Verdünnungsreihen (von 10^{-4} bis 10^{-9}) aus klonierten Standardproben angelegt und daraus Standardkurven für TNF- α , HIF, VEGF und 18S erstellt.

Anschließend wurden die Proben mit Primern, Sonden und Enzymen zu einem Reaktionsansatz zusammengefügt. Hierfür wurden jeweils 12,5 μ l eines Mastermixes (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Diesem wurden 1,25 μ l Sondenmix zugefügt, der die Sonden für 18S (TaqMan Gene Expression Assay for 18S) sowie entweder für

TNF- α (TaqMan Gene Expression Assay for TNF- α), HIF (TaqMan Gene Expression Assay for HIF-1 α) oder VEGF (TaqMan Gene Expression Assay for VEGF) enthielt (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurden 5 μ l der jeweiligen Probe hinzugefügt und dieser Ansatz mit 6,25 μ l Wasser auf 25 μ l Realtime-PCR-Ansatz aufgefüllt.

Jede der cDNA-Proben aus dem Herzgewebe der Versuchstiere wurde je drei Mal auf die Realtime-PCR-Platte gegeben. Ebenso wurde mit den verdünnten Standardproben verfahren. Anschließend wurde die Platte zur Entfernung evtl. vorhandener Luftblasen 10 Sekunden bei 1500 U/min zentrifugiert.

In einer Realtime-PCR-Maschine (iCycler, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurden die Proben zunächst 2 Minuten bei 50°C und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Dann folgten 40 Zyklen von je 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C. Nach Beendigung der Zyklen wurden die Proben bei 15°C gekühlt.

Die ermittelten C_T -Werte der jeweils drei gleichen Proben wurden arithmetisch gemittelt. Statistische Ausreißer wurden nicht berücksichtigt. Zuletzt wurden die anhand der erstellten Standardkurven ermittelten TNF- α -, HIF- bzw. VEGF-Konzentrationen an den ermittelten 18S-Konzentrationen derselben Probe normalisiert.

2.11 Bestimmung der Kapillardichte

2.11.1 Prinzip der Lectinfärbung

Lectine sind ubiquitär vorkommende Glykoproteine, die spezifische Bindungsstellen für Kohlenhydrate besitzen. So können sie zum Beispiel mit der Glykokalix auf der Oberfläche von Zellmembranen reversible Bindungen eingehen. Diese Eigenschaften werden genutzt, um bestimmte Kohlenhydratstrukturen in Gewebeschnitten zu identifizieren [73].

GS1-Isolectin B4 (GSL-1) bindet spezifisch an α -D-Galaktosyl-Reste auf Endothelzellmembranen. Durch Inkubation eines Gewebeschnittes mit markiertem GSL-1 lassen sich daher besonders gut kleinste Kapillaren darstellen [74].

2.11.2 Vorgehensweise

Zunächst wurden die verwendeten Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend zur Epitopdemaskierung mit einem Zitratpuffer inkubiert. Anschließend folgte ein Peroxidaseblock mit 0,3% Wasserstoffperoxid. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in Kapitel 2.9.2.

Um eine unspezifische Anfärbung zu vermeiden wurden die Schnitte mit unspezifischer und mit Avidin-Biotin-Blockierungslösung behandelt (Carbon Free Blocking Solution, SP-5040 und Avidin/Biotin Blocking Kit, SP-2001, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Nach dreimaligem Waschen in PBS-Puffer und dreimaligem Waschen in einer Lösung aus HEPES, NaCl und CaCl_2 über jeweils 5 Minuten folgte die spezifische Markierung der Gefäße durch Inkubation mit biotinyliertem GSL-1 (Biotinylated Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I, B-1105, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Am nächsten Tag wurde die überschüssige Lectinlösung durch dreimaliges Waschen in PBS wieder entfernt und die Schnitte anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex behandelt (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Die so markierten Kapillaren konnten dann mit 3,3'-Diaminobenzidin angefärbt werden. Auch dieser Schritt ist in Kapitel 2.9.2 ausführlich dargestellt.

Um die Anzahl der detektierten Kapillaren auf die Größe und Anzahl der Kardiomyozyten normieren zu können, erfolgte im Anschluss eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.-Färbung) nach laborinternen Vorschriften. Nach Abschluss der Färbung wurden die Gewebeträger wieder entwässert und

in zur permanenten Fixierung in Enthellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingebettet.

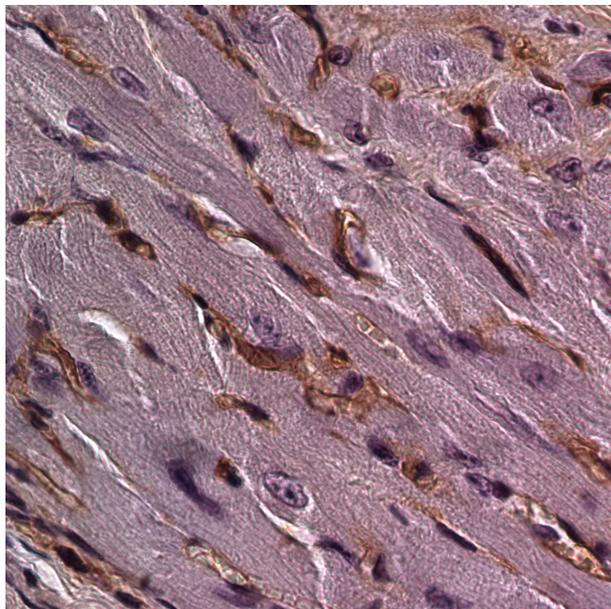


Abb. 15: Kapillarfärbung mit Lectin

Braungefärbte Kapillaren lassen sich gut vom umgebenden Gewebe abgrenzen, das Verhältnis von Kapillaranzahl pro Myozytenzahl bestimmt die Kapillardichte.

Zur Bestimmung der Kapillardichte wurden die Schnitte unter dem Mikroskop (Axio Scope 2 plus, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung betrachtet, digital fotografiert und anschließend mit der Bildverarbeitungssoftware Adobe Photoshop (Version 6.0, Adobe Systems Inc., San Jose, USA) ausgewertet. Hierzu wurden gut abgrenzbare Kardiomyozyten mit sichtbarem Kern digital umrandet und ihre Querschnittsfläche vermessen. Bei 100-facher Vergrößerung wurden dann in mehreren definierten Gesichtsfeldern alle klar abgrenzbaren Myozytenkerne und Kapillaren gezählt und die erhaltenen Werte aus allen Gesichtsfeldern einer Probe gemittelt. Aus diesen Ergebnissen wurde dann die Kapillaranzahl und die Anzahl an Myozytenkernen pro Quadratmillimeter bestimmt. Das Verhältnis von Kapillaranzahl zu Myozytenanzahl definiert die Kapillardichte.

2.12 Identifizierung apoptotischer Zellen

2.12.1 Prinzip der TUNEL-Methode

Bei der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Methode handelt es sich um ein histologisches Verfahren zur Anfärbung der Zellkerne apoptotischer Zellen. Während des programmierten Zelltodes (Apoptose) kommt es zu einer Fragmentierung des DNA-Doppelstranges durch Endonukleasen. Dadurch werden an den Enden der Bruchstücke Hydroxylgruppen frei, an die durch das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) fluoreszenzmarkierte Nukleotide gebunden werden [75].

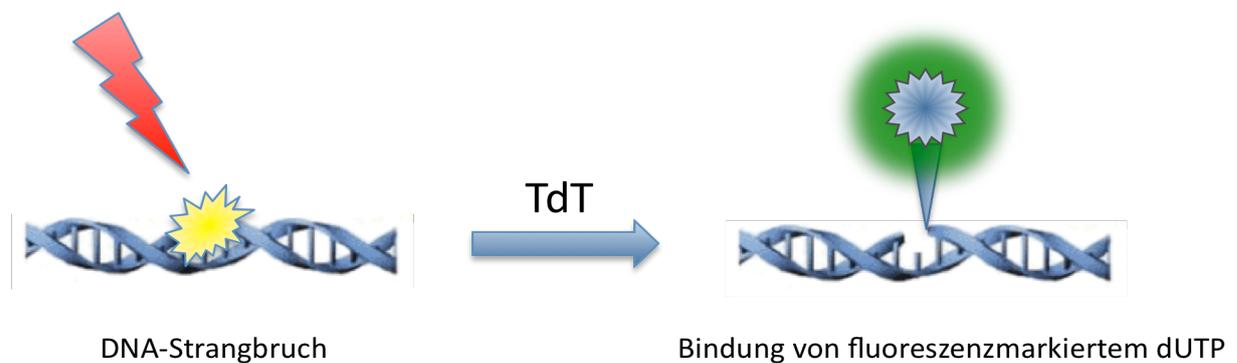


Abb. 16: Prinzip der TUNEL-Methode.

Endonukleasen verursachen während der Vorgänge der Apoptose DNA-Doppelstrangbrüche. Das Enzym terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) bindet fluoreszenzmarkierte dUTP-Nukleotide an die hierdurch freiwerdenden Hydroxylgruppen.

2.12.2 Vorgehensweise

5 µm dicke Gewebeschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und 8 Minuten mit Antigen Unmasking Solution (H-3300, Vectos Laboratories, Burlingame, USA) behandelt. Dann wurden die Schnitte gründlich in

PBS gewaschen (dreimal 5 Minuten) und anschließend eine Stunde lang bei 37°C im Dunkeln mit je 20 µl TUNEL-Reaktionslösung (Labeling Solution Vial I und Labeling Solution Vial II im Verhältnis 1:10) aus dem In situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Diese enthält TdT-Enzym und Fluorescein-markierte Nukleotide. Nach Beendigung des Färbeschrittes durch zweimaliges Waschen in PBS-Puffer erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), der direkt an doppelsträngige DNA bindet. Auch diese Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen in PBS-Puffer unterbrochen. Danach wurden die Gewebeschnitte bei 4°C im Dunkeln getrocknet.

Die Sensitivität und Spezifität der Färbereaktion wurde durch Positiv- und Negativkontrollen sichergestellt. Als Positivkontrollen dienten Proben, die vor der Inkubation mit der TUNEL-Reaktionslösung 10 Minuten mit DNase I behandelt wurden. Die entstehenden DNA-Strangbrüche müssen durch die TUNEL-Reaktion detektiert werden. Negativkontrollen wurden mit einer Reaktionslösung ohne den Zusatz von TdT inkubiert (nur Labeling Solution Vial II), sodass eine Reaktion mit den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden ausgeschlossen war.

Nach dem Trocknen wurden die gefärbten Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) betrachtet und Bildabschnitte im Interventrikularseptum, also abseits des Infarktareales, aufgenommen. Apoptische (TUNEL-positive) Zellkerne sind sowohl Fluorescein (grün)- als auch DAPI (blau)-gefärbt.

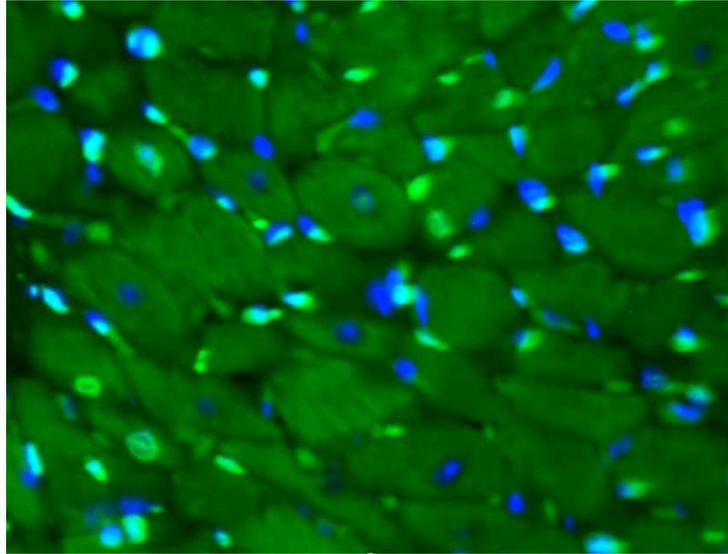


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines TUNEL-gefärbten Gewebeschnittes. Als apoptotisch gelten Zellen, deren Kern sowohl Fluoreszein (grün)- als auch DAPI (blau) gefärbt sind.

2.13 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse der Daten sowie deren graphische Aufbereitung wurde das Computerprogramm StatView for Windows (Version 5.0.1, SAS Institute Inc. Berkeley, USA) verwendet. Die Darstellung erfolgt jeweils unter Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardfehler. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurden ANOVA-Analysen durchgeführt. Als signifikant galten Ergebnisse mit $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotyp der LysM-IKK β -KO-Tiere

Ohne Intervention waren keine spontanen kardiologischen oder hämatologischen Unterschiede zwischen den Phänotypen der Versuchsgruppen zu erkennen. Präoperative Herzgröße und -funktion waren ebenso vergleichbar wie das Differentialblutbild der jeweiligen Tiere.

3.2 Überlebensrate

Im postoperativen Verlauf war ein hochsignifikanter Überlebensvorteil der KO-Gruppe festzustellen ($p < 0,01$). 51% der WT-Tiere verstarben innerhalb von 56 Tagen nach experimentell induziertem Myokardinfarkt, während alle KO-Tiere diesen Zeitraum überlebten.

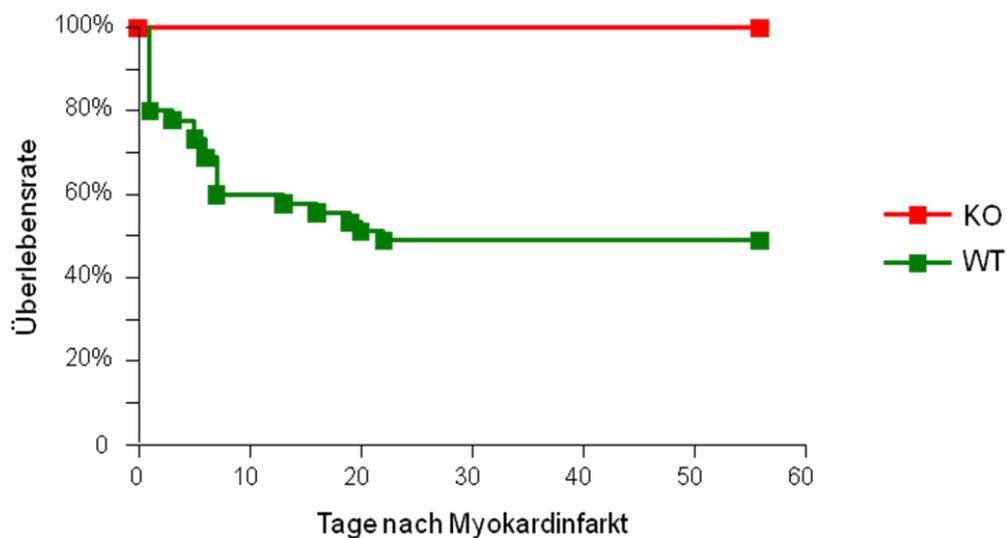


Abb. 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Tagen nach Koronarligatur.

LysM-IKK β -KO vs. WT, Tag 56: 100% vs. 49%, $p < 0,01$.

3.3 Organgewichte

Als grobes Maß für die links- bzw. rechtsventrikuläre Dekompensation kann das Gewicht der Lunge bzw. der Milz des jeweiligen Tieres herangezogen werden. Es waren in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nachweisbar (Lunge: LysM-IKK β -KO vs. WT, 201,84 \pm 19,36 mg vs. 202,40 \pm 27,84 mg, p = 0,99; Milz LysM-IKK β -KO vs. WT, 105,13 \pm 4,92 mg vs. 89,23 \pm 10,77 mg, p = 0,15).

3.4 Morphologie und Hämodynamik

Zur morphologischen und funktionellen Beurteilung des Herzens erfolgten zu definierten Zeitpunkten nach der Koronarligatur echokardiographische Untersuchungen. Auch hier ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Tiere der KO-Gruppe wiesen im Vergleich der WT-Tiere eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation auf.

	Tag 1		Tag 56	
	KO	WT	KO	WT
ESA – papillär [mm ²]	8,00 \pm 0,99 *	11,27 \pm 0,87	14,06 \pm 2,51	23,07 \pm 3,31
EDA – papillär [mm ²]	11,72 \pm 0,70 *	15,12 \pm 0,76	18,61 \pm 2,57	27,55 \pm 3,21
ESA – apikal [mm ²]	8,05 \pm 0,47 **	10,89 \pm 0,65	14,86 \pm 1,67 *	24,28 \pm 2,52
EDA – apikal [mm ²]	10,67 \pm 0,47 *	13,41 \pm 0,71	18,10 \pm 1,80 *	27,64 \pm 2,56
ESD – papillär [cm]	0,35 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01	0,46 \pm 0,04	0,53 \pm 0,04
EDD – papillär [cm]	0,43 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01	0,53 \pm 0,03	0,61 \pm 0,03
ESD – apikal [cm]	0,37 \pm 0,01	0,38 \pm 0,02	0,47 \pm 0,03	0,55 \pm 0,08

EDD – apikal [cm]	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,57 ± 0,07
FS-A – papillär [%]	32,92 ± 4,86	24,26 ± 5,52	27,30 ± 4,94	20,10 ± 3,38
FS-A – apikal [%]	24,50 ± 3,25	15,13 ± 2,33	18,53 ± 3,41	17,15 ± 3,56
FS-D – papillär [%]	19,87 ± 2,61	12,03 ± 3,99	14,21 ± 3,86	8,24 ± 1,93
FS-D – apikal [%]	12,58 ± 0,86	11,49 ± 2,94	13,69 ± 3,49	5,55 ± 2,11

Tab. 1: Errechnete Mittelwerte und Standardfehler der echokardiographisch bestimmten Parameter an den Tagen 1 und 56 nach Myokardinfarkt.

ESA = endsystolische Kammeröffnungsfläche, EDA = enddiastolische Kammeröffnungsfläche, ESD = endsystolischer Durchmesser, EDD = enddiastolischer Durchmesser, FS-A = fraktionelle Verkürzung der Fläche, FS-D = fraktionelle Verkürzung des Durchmessers.

* p < 0,05, ** p < 0,01.

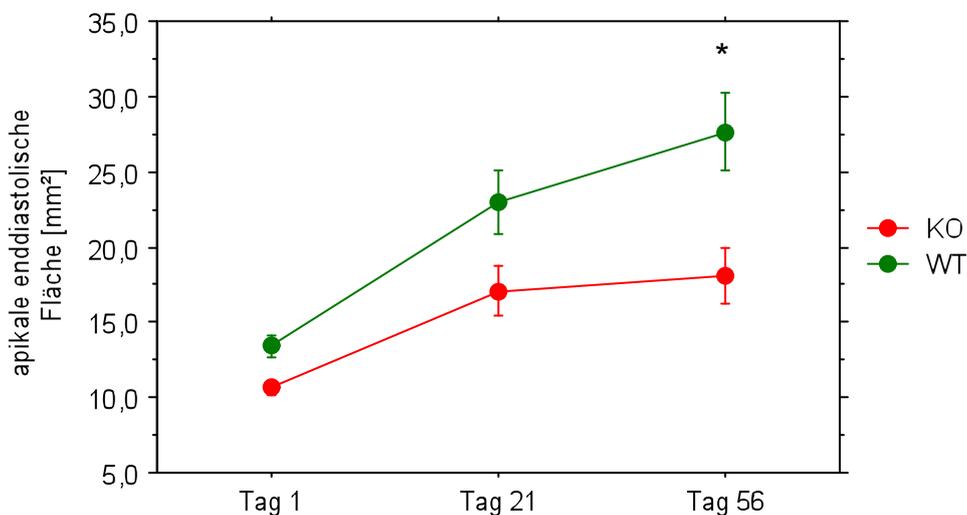


Abb. 19: Echokardiographisch bestimmte apikale enddiastolische Kammeröffnungsfläche (EDA) an den Tagen 1, 21 und 56 nach Myokardinfarkt in mm².

LysM-IKKβ-KO vs. WT, Tag 1: 10,7 ± 0,5 mm² vs. 13,4 ± 0,7 mm², p = 0,02.

LysM-IKKβ-KO vs. WT, Tag 56: 18,1 ± 1,8 mm² vs. 27,6 ± 2,6 mm², p = 0,02.

Bezüglich der hämodynamischen Funktionsparameter waren dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellbar.

	KO	WT
LVSP [mmHg]	84,42 ± 2,91	74,19 ± 7,16
LVEDP [mmHg]	12,07 ± 2,57	11,54 ± 2,75
dP/dt _{max} [mmHg/s]	6489,20 ± 572,48	4788,40 ± 632,11
dP/dt _{min} [mmHg/s]	- 4610,20 ± 432,74	- 3585,20 ± 392,68
Herzfrequenz [bpm]	505 ± 23	459 ± 28
Ejektionsfraktion [%]	51,36 ± 5,86	54,56 ± 2,66

Tab. 2: Errechnete Mittelwerte und Standardfehler der hämodynamischen Funktionsparameter. Für keinen der Parameter ließen sich signifikante Unterschiede nachweisen. LVSP = linksventrikulärer systolischer Druck, LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck, dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = maximale Druckabfallsgeschwindigkeit.

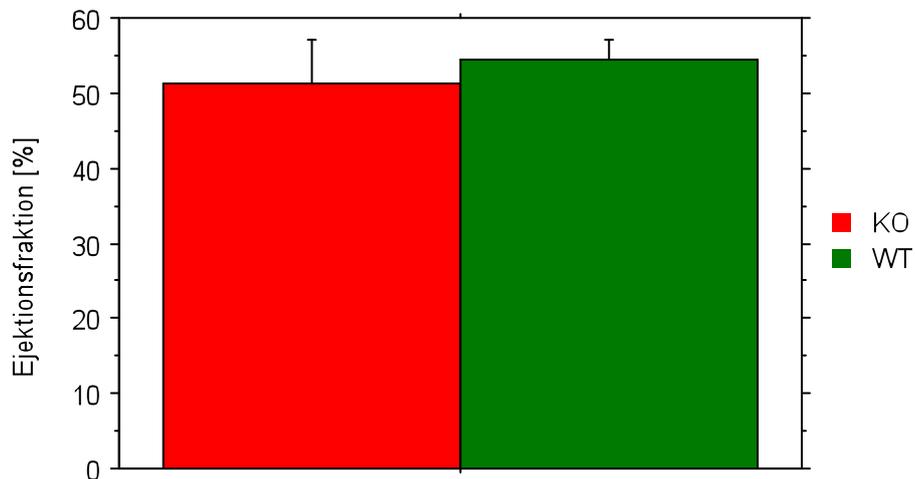


Abb. 20: Ejektionsfraktion an Tag 56 nach Myokardinfarkt.

LysM-IKKβ-KO vs. WT, 51,36 ± 5,86 % vs. 54,56 ± 2,66 %, p = 0,72.

3.5 Infarktgröße

Die Größe des transmuralen Infarktes nach 56 Tagen war in beiden Gruppen vergleichbar.

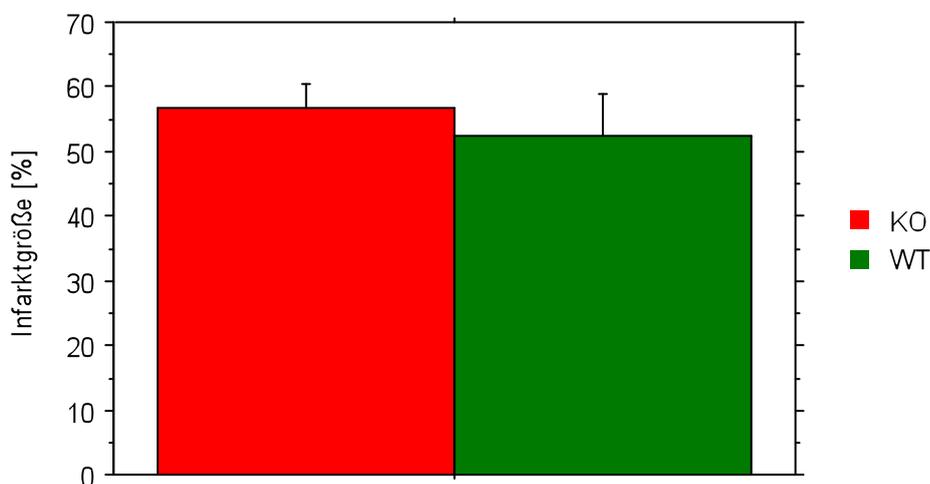


Abb. 21: Prozentuale Infarktgröße.

LysM-IKK β -KO vs. WT, 56,75 \pm 3,66 % vs. 52,33 \pm 6,50 %, p = 0,56.

3.6 Kardiale Hypertrophie

Als grobes Maß für die kardiale Hypertrophie dient das Gewicht des linken Ventrikels. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen nachweisbar.

Ein weiterer Marker, der zur Bewertung der kardialen Hypertrophie herangezogen wird, ist die Größe der Myozyten. Auch diesbezüglich ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellen.

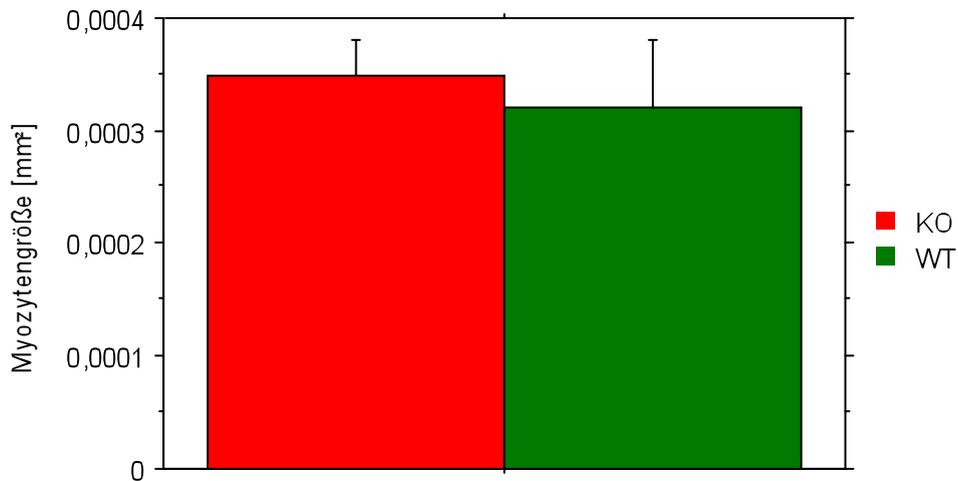


Abb. 22: Kardiomyozytengröße im Querschnitt in mm².

LysM-IKKβ-KO vs. WT, $3,5 \times 10^{-4} \pm 3,2 \times 10^{-5}$ vs. $3,2 \times 10^{-4} \pm 5,9 \times 10^{-5}$, $p = 0,68$.

3.7 Interstitieller Kollagengehalt

Als Hinweis auf Veränderungen des Remodelings der EZM konnten bei der Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes signifikante Unterschiede zwischen WT- und KO-Gruppe festgestellt werden. KO-Tiere zeigten 8 Wochen nach Myokardinfarkt einen deutlich erhöhten septalen Kollagengehalt.

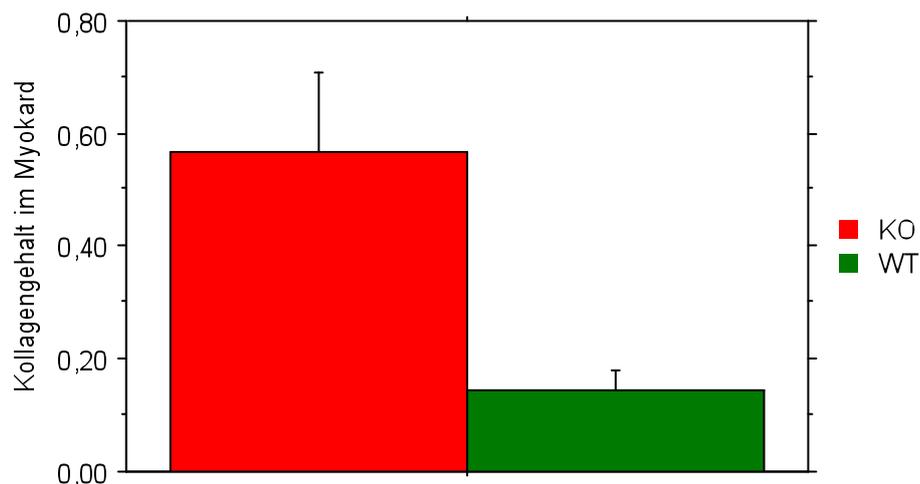


Abb. 23: Gesamtkollagengehalt im Myokard

LysM-IKKβ-KO vs. WT, $0,57 \pm 0,14$ vs. $0,14 \pm 0,04$, $p < 0,01$.

3.8 Zelluläre Immunreaktion

Bezüglich der als Marker für die zelluläre Immunantwort bestimmten Immigration neutrophiler Granulozyten in das geschädigte Myokard waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

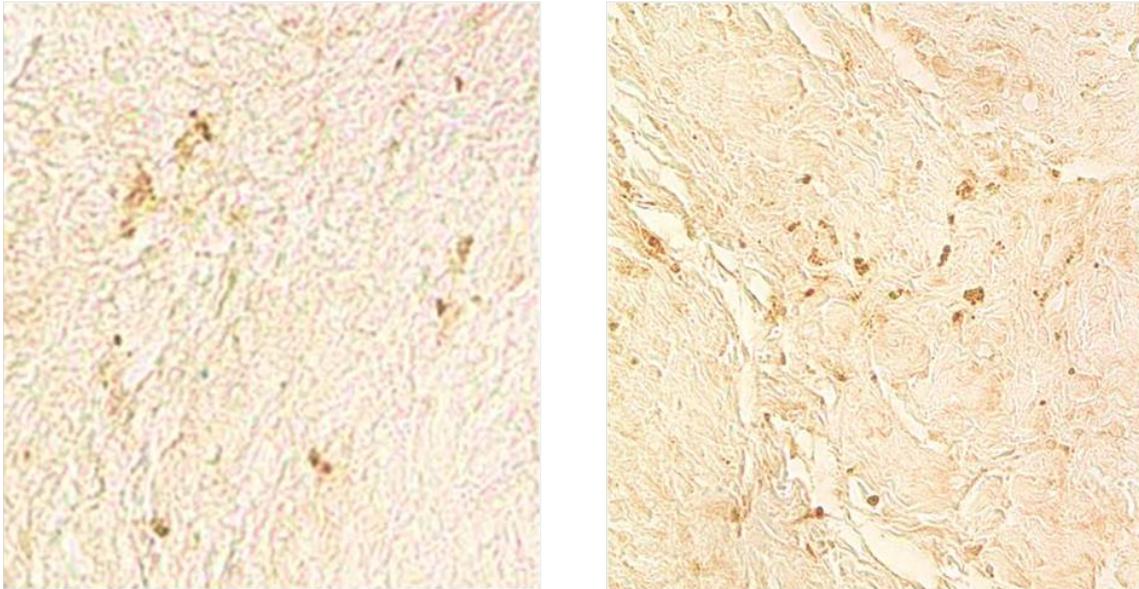


Abb. 24: Eingewanderte neutrophile Granulozyten in der Borderzone.

Zwischen WT (links)- und KO (rechts)-Gruppe waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

3.9 Humorale Immunreaktion

Ein wichtiger Mediator der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion ist das Zytokin TNF- α , dessen Transkription entscheidend durch NF- κ B reguliert wird. Dennoch war bezüglich der TNF- α -Expression zwischen WT- und KO-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

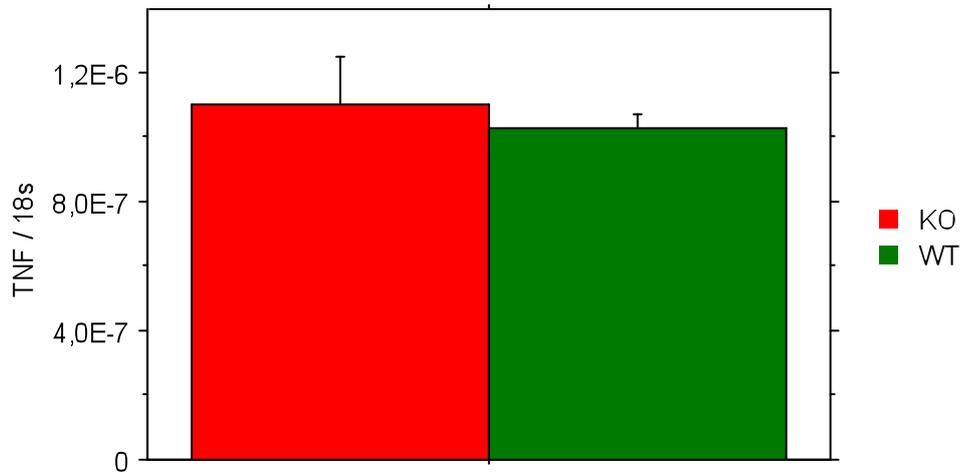


Abb. 25: Expression von Tumornekrosefaktor α (TNF) im Herzgewebe ($C_{T\text{ TNF}} / C_{T\text{ 18S}}$).
LysM-IKK β -KO vs. WT, $1,10 \times 10^{-6} \pm 1,51 \times 10^{-7}$ vs. $1,03 \times 10^{-6} \pm 4,71 \times 10^{-8}$, $p = 0,78$.

3.10 Neovaskularisation

Die VEGF-Expressionsraten im Myokard der KO- und der WT-Tiere unterscheiden sich nicht signifikant.

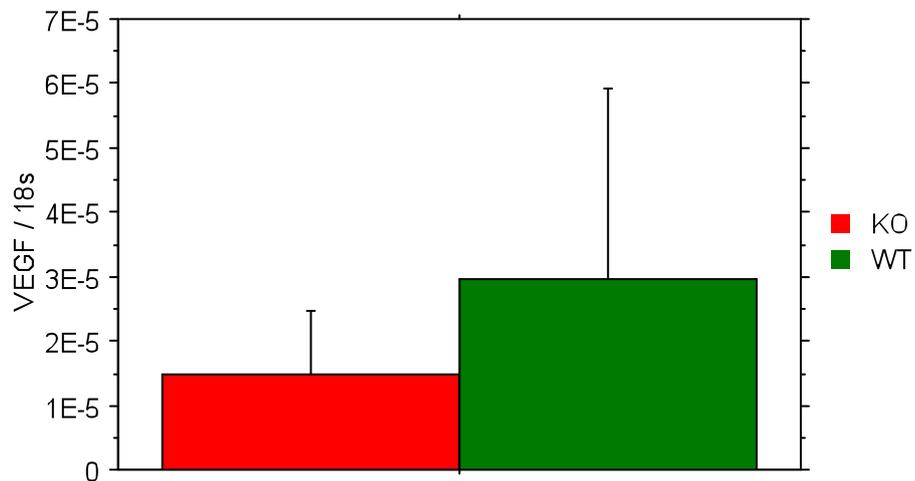


Abb. 26: Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Herzgewebe ($C_{T\text{ VEGF}} / C_{T\text{ 18S}}$).
LysM-IKK β -KO vs. WT, $1,49 \times 10^{-5} \pm 9,62 \times 10^{-6}$ vs. $2,97 \times 10^{-5} \pm 2,96 \times 10^{-5}$, $p = 0,56$.

Auch die Expression des pro-angiogenetisch wirkenden Transkriptionsfaktors HIF blieb unverändert.

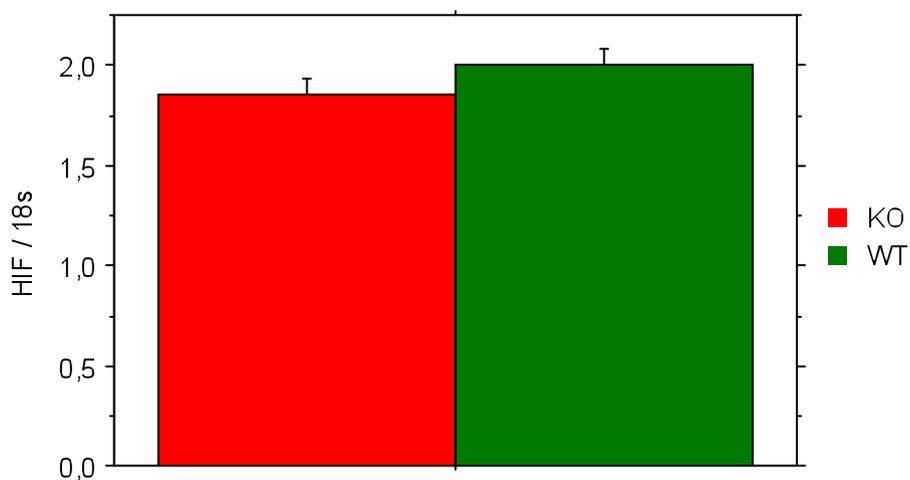


Abb. 27: Expression von Hypoxie-induziertem Faktor (HIF) im Herzgewebe ($C_T^{\text{HIF}} / C_T^{18s}$).
LysM-IKK β -KO vs. WT, $1,86 \pm 0,08$ vs. $2,01 \pm 0,08$, $p = 0,20$.

Bei der Darstellung der Kapillareinsprossung mittels Lectinfärbung konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

In der Lectinfärbung zeigte sich in der KO-Gruppe zwar tendenziell eine erhöhte Kapillareinsprossung, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,06$).

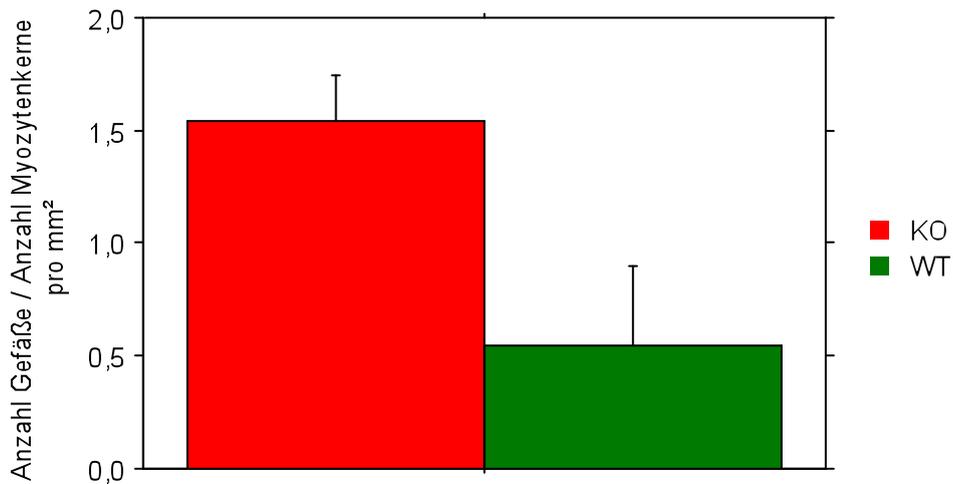


Abb. 28: Anzahl der Gefäße / Anzahl der Kardiomyozytenkerne pro mm².
LysM-IKKβ-KO vs. WT, 1,54 ± 0,20 vs. 0,55 ± 0,35, p = 0,06.

3.11 Apoptoserate

Die Apoptoserate, gemessen als Anteil der TUNEL-positiven Kardiomyozytenkerne an der Gesamtanzahl an Kernen, unterschied sich zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant.

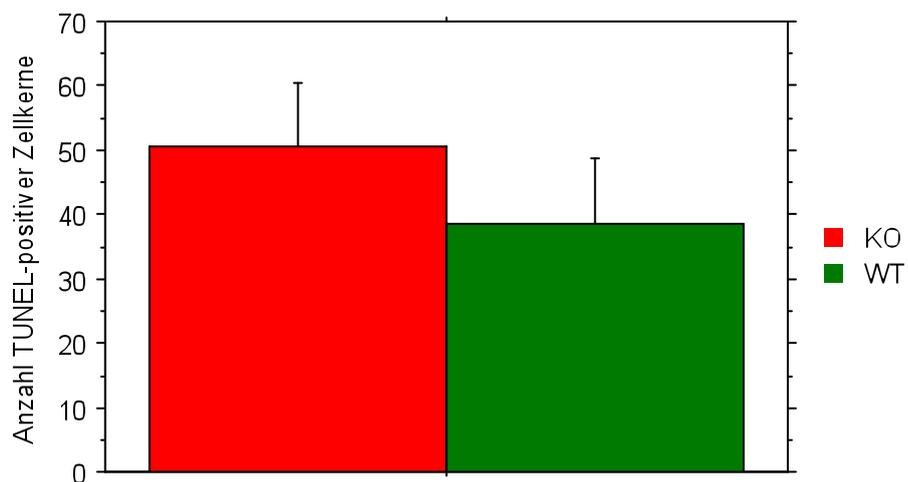


Abb. 29: Anzahl der TUNEL-positiven Kardiomyozytenkerne im Septum (infarktfernes Myokard)
LysM-IKKβ-KO vs. WT, 47,46 ± 9,29 vs. 38,67 ± 10,11, p = 0,65.

4 Diskussion

Vorangegangene Untersuchungen an Tieren, bei denen NF- κ B durch das Fehlen der Untereinheit p50 global inaktiv ist, ergaben einen Überlebensvorteil und einen Schutz vor linksventrikulärem Remodeling für die KO-Tiere [14-15]. Unklar blieb jedoch, welche Zellen die negativen Effekte vermitteln. Obwohl NF- κ B nach Myokardinfarkt in Kardiomyozyten besonders stark aktiviert wird, konnten die Ergebnisse des p50-Knockout (KO) durch eine kardiomyozytenspezifische Hemmung der NF- κ B-Aktivität nicht reproduziert werden [12-13]. Dagegen ergaben sich aus Ischämie-Reperfusionsexperimenten Hinweise, dass vor allem die fehlende Aktivität in Leukozyten für die protektiven Effekte entscheidend ist [16].

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Hypothese, dass die NF- κ B-Aktivität in Entzündungszellen für die schädigenden Effekte des Transkriptionsfaktors auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden LysM-IKK β -KO-Mäuse, bei denen der klassische Aktivierungsweg von NF- κ B spezifisch in Granulozyten und Makrophagen gehemmt ist, mit WT-Mäusen verglichen [61].

Als herausragende Ergebnisse waren ein signifikanter Überlebensvorteil der KO-Tiere gegenüber der wildtypischen Kontrollgruppe sowie ein verbessertes linksventrikuläres Remodeling mit signifikant geringerer Dilatation zu beobachten. Diese protektiven Effekte der Inhibierung der NF- κ B-Aktivität in Entzündungszellen legen nahe, dass die NF- κ B-Aktivität in Entzündungszellen entscheidend zur Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt beiträgt. Durch weitere Untersuchungen sollten nun die Mechanismen näher spezifiziert werden, die die Protektion vermitteln.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B gilt als der zentrale Regulator der Immunantwort. Durch den LysM-IKK β -KO wurde seine Aktivität in den für die Entzün-

dungsvorgänge am Herzen bedeutsamsten Zellen inhibiert. Daher lag die Vermutung nahe, dass eine veränderte Immunreaktion für die beobachteten Verbesserungen des kardialen Remodeling verantwortlich sein könnte. Entgegen der Erwartung ließen sich jedoch weder in der humoralen noch in der zellulären Immunantwort signifikante Unterschiede zwischen KO- und WT-Gruppe feststellen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang vor allem der fehlende Einfluss des KO auf die TNF- α -Expression, da eine IKK β -abhängige Induktion der Zytokinproduktion in Leukozyten durch NF- κ B mehrfach nachgewiesen werden konnte [76-77]. Allerdings ergaben sich auch aus den Ergebnissen früherer Untersuchungen bereits Hinweise, dass die Zytokinproduktion am Herzen auch über NF- κ B-unabhängige Signalwege reguliert werden könnte [78]. So konnten Kawamura et al. zeigen, dass Tiere mit globalem p50-KO einen Schutz vor TNF- α -induzierter Kardiomyopathie aufweisen, ohne dass jedoch die Entzündungsreaktion selbst beeinflusst wird [79]. Kawano et al. wiesen im selben Tiermodell eine Verminderung der kardialen Hypertrophie nach Infusion von Angiotensin II nach, obwohl die TNF- α -Expression in der p50-KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe sogar erhöht war [55]. Auch nach Myokardinfarkt wurde TNF- α in p50-KO-Tieren verglichen mit der WT-Gruppe signifikant stärker exprimiert. Trotz der vermehrten Zytokinausschüttung schützte die p50-Defizienz vor linksventrikulärem Remodeling und reduzierte die frühe Mortalität [14-15]. Eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität scheint also weniger die Zytokinproduktion, sondern vielmehr die Weiterleitung der durch Zytokine vermittelten Signale zu beeinflussen [14]. Die Unterschiede bezüglich der humoralen Immunreaktion nach Myokardinfarkt zwischen der vorliegenden Arbeit und den beschriebenen Untersuchungen von Frantz et al. [14] und Kawano et al. [15] sind am ehesten auf die unterschiedlichen Strategien zurückzuführen, über die NF- κ B im jeweiligen Modell inhibiert wurde. In den meisten Säugetierzellen liegt NF- κ B überwiegend als p50/p65-Heterodimer vor. Bei chronischer Zytokinexposition verschiebt sich jedoch das Gleichgewicht zu einer vermehrten Bildung von p50/p50-Homodimeren. Diese besitzen im Gegensatz zu den p50/p65-

Dimeren keine transkriptionelle Aktivität. Im Sinne eines negativen Feedback wird so die Produktion proinflammatorischer Zytokine vermindert und einer überschießenden Entzündungsreaktion entgegengewirkt [80-81]. Bei p50-KO-Tieren fehlt dieser Mechanismus, bei der Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch IKK β -KO bleibt er dagegen unbeeinflusst. Die protektiven Effekte des LysM-IKK β -KO werden also nicht durch eine veränderte Immunreaktion vermittelt.

In verschiedenen Ischämie-Reperfusionen-Studien führte eine Inhibition der NF- κ B-Aktivität zu geringeren Infarktgrößen [16, 82]. Auch Misra et al. konnten einen Einfluss der NF- κ B-Aktivität auf die Größe des Myokardinfarktes nachweisen. In Tieren mit kardiomyozytenspezifischer Überexpression des NF- κ B-Inhibitors I κ B α wurden 24 Stunden nach Koronarligatur größere Infarkte beobachtet als in der wildtypischen Kontrollgruppe [51]. In der vorliegenden Studie waren die Infarktgrößen von LysM-IKK β -KO- und WT-Tieren dagegen vergleichbar. Die Verbesserungen im kardialen Remodeling sind daher augenscheinlich nicht auf eine Reduktion der Infarktgröße zurückzuführen. Allerdings wurden die Infarktgrößen erst am Endpunkt der Untersuchung 56 Tage nach Myokardinfarkt bestimmt. Eine Beeinflussung der Infarktgröße durch den KO zu einem früheren Zeitpunkt kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde mit der Regulation verschiedenster Vorgänge des linksventrikulären Remodeling in Verbindung gebracht. Unter anderem ergaben sich aus mehreren Studien Hinweise, dass NF- κ B entscheidenden Einfluss auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten hat [54-55]. Auch eine vermehrte Apoptose trägt entscheidend zur Progression der Herzinsuffizienz bei. Durch NF- κ B-abhängige Signalwege werden sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte am Herzen vermittelt [51]. Zudem ist NF- κ B in die Steuerung der Neovaskularisation am Herzen involviert. Unter anderem reguliert der Transkriptionsfaktor die Expression des die Hypoxiereaktion steuernden Transkriptionsfaktors HIF sowie des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors

VEGF [83-84]. Dennoch konnten in dieser Studie keine signifikanten Veränderungen von kardialer Hypertrophie, Apoptoserate der Kardiomyozyten oder Neovaskularisation durch die fehlende NF- κ B-Aktivität in Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen werden.

Deutliche Unterschiede zwischen LysM-IKK β -KO- und WT-Gruppe zeigten sich jedoch in der extrazellulären Matrix (EZM). Der interstitielle Kollagengehalt war in der KO-Gruppe signifikant erhöht. Die EZM ist eine dynamische Struktur, deren ständiger Auf-, Ab- und Umbau der Steuerung durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ihre Inhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) unterliegt. Das Remodeling der EZM nach Myokardinfarkt ist geprägt durch ein Ungleichgewicht zwischen Kollagenproduktion und Matrixabbau sowie Veränderungen in der Kollagenstruktur [17, 85]. EZM und interstitielles Kollagen bestimmen die Form und Anordnung der Kardiomyozyten und ermöglichen die effiziente Umsetzung der kontraktile Kräfte in eine geordnete Ejektionsbewegung [86]. Nach neueren Erkenntnissen geht die Bedeutung von Veränderungen im EZM-Remodeling jedoch weit über rein mechanische Auswirkungen hinaus. Im Gegensatz zur früheren Annahme, dass es sich beim EZM-Remodeling um eine rein passive Reaktion auf die kardiale Schädigung handelt, gilt die EZM heute selbst als wichtiger Modulator der inflammatorischen und reparativen Signalwege. Die bei der Matrixdegradierung entstehenden Kollagenfragmente besitzen eine proinflammatorische Wirkung. Zudem können MMP Zytokine und Chemokine prozessieren und aktivieren. Die dynamischen Veränderungen der EZM-Zusammensetzung beeinflussen somit auch Immigration, Differenzierung, Wirkungszeitraum, Genexpression und Interaktion der Leukozyten im geschädigten Myokard [87-88]. Dem EZM-Remodeling kommt daher eine herausragende Rolle in der Entstehung von diastolischer und systolischer Herzinsuffizienz zu [86].

Die Remodelingvorgänge unterliegen der Regulation durch in das Myokard eingewanderte Leukozyten, insbesondere Makrophagen und neutrophile Granulo-

zyten, die unter anderem durch Synthese und Aktivierung von MMP und TIMP die Struktur des Kollagennetzwerkes bestimmen [17, 88]. Sowohl die Kollagenexpression als auch die Expression von MMP und TIMP werden durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert [19]. Es ist daher nicht überraschend, dass die Inhibition der NF- κ B-Aktivität in Makrophagen und Granulozyten deutliche Veränderungen im EZM-Remodeling hervorruft. Bereits die vorhergehenden Studien an p50-defizienten Tieren hatten die protektiven Effekte der NF- κ B-Inhibition unter anderem auf ein verbessertes EZM-Remodeling zurückgeführt [14-15, 79]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung reduzierte die globale p50-Defizienz jedoch den interstitiellen Kollagengehalt. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell durch die unterschiedlichen Ansätze der NF- κ B-Inhibition erklären. Während MMP und TIMP vorwiegend in den vom LysM-IKK β -KO betroffenen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, wird das Kollagennetzwerk vorwiegend von Myofibroblasten gebildet [10]. Deren Genexpressionmuster wird zwar durch den globalen p50-KO modifiziert, bei dem in dieser Studie verwendeten Ansatz der zelltypspezifischen NF- κ B-Inhibition jedoch nicht direkt beeinflusst. Es ist daher davon auszugehen, dass die beobachteten Veränderungen in der Kollagenproduktion durch Myofibroblasten auf den indirekten Einfluss der genmanipulierten Leukozyten zurückzuführen sind.

Dennoch wirkt die Korrelation von verbesserter Überlebensrate und vermehrter interstitieller Kollagenablagerung auf den ersten Blick eher überraschend, da ein stark erhöhter interstitieller Kollagengehalt von vielen Autoren als Indiz für eine verstärkte Myokardfibrose und somit einer Verschlechterung der Herzfunktion durch Verminderung der Compliance gewertet wird [89]. Der entscheidende Schritt in der Entstehung der Myokardfibrose ist jedoch nicht die reine Ablagerung von Kollagen, sondern vielmehr die strukturelle Organisation und die Bildung eines stabilen Kollagennetzwerkes durch Querverbindungen zwischen den einzelnen Fasern und Fibrillen [90]. Veränderungen der strukturellen Quali-

tät des Kollagennetzwerkes und der Zusammensetzung der EZM können daher die Herzfunktion unabhängig vom Gesamtkollagengehalt entscheidend beeinträchtigen [89, 91]. Ein Missverhältnis von Matrixproduktion und -degradierung kann zudem nicht nur die Entstehung einer Myokardfibrose begünstigen, sondern auch zu einem exzessiven Kollagenverlust führen, der ebenfalls zur Entstehung und Progression einer chronischen Herzinsuffizienz beiträgt [89]. Besonders in den frühen Phasen der Infarktheilung wirkt eine widerstandsfähige Kollagenstruktur entscheidend dem Auseinanderschere der Myozyten und somit der Entstehung von Infarktexpansion, einer raschen Progression der linksventrikulären Dilatation und dem Auftreten von Ventrikelrupturen entgegen [63, 88-89]. Eine besser organisierte Struktur und höhere Qualität der EZM aufgrund des veränderten Expressionsmusters fibrogener und antifibrogener Faktoren wie MMP und TIMP durch Granulozyten und Makrophagen könnte daher eine mögliche Erklärung für den Überlebensvorteil und die verminderte Ventrikeldilatation der LysM-IKK β -KO-Tiere sein. Protektive Effekte einer Inhibition einzelner MMP vor, während und nach Myokardinfarkt mit Verringerung der linksventrikulären Dilatation und der frühen Mortalität durch Ventrikelrupturen konnten bereits in verschiedenen Studien beobachtet werden [17, 68, 92]. Zudem wurde bei globaler Inhibition der NF- κ B-Aktivität wiederholt eine Reduktion der MMP-9-Expression nachgewiesen [14]. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die beobachteten protektiven Effekte der NF- κ B-Inhibition in Granulozyten und Makrophagen auch auf ein verändertes MMP-Expressionsmuster und ein besser strukturiertes Kollagennetzwerk zurückzuführen sein könnte, beobachteten Kawano et al. eine signifikante Reduktion der Inzidenz ventrikulärer Rupturen in der Frühphase nach Myokardinfarkt bei Tieren mit globaler p50-Defizienz [15].

Insgesamt konnte in dieser Studie also eine Reduktion der Mortalität und des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt für Mäuse mit spezifischer Inhibition des klassischen Aktivierungsweges von NF- κ B in Makrophagen und

Granulozyten nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass die NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen schädigende Einflüsse auf das kardiale Remodeling vermittelt. Zurückzuführen sind die Ergebnisse auf Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.

Eine spezifische Hemmung der NF- κ B-Aktivität in Entzündungszellen könnte daher einen vielversprechenden Therapieansatz in der Beeinflussung des kardialen Remodeling nach Myokardinfarkt darstellen, um die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz zu vermeiden und Lebenserwartung und Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Nach einem Myokardinfarkt werden ventrikuläres Remodeling und myokardiale Funktion unter anderem durch die ablaufenden Reaktionen des angeborenen Immunsystems beeinflusst. Von zentraler Bedeutung für die Regulation dieser Immunreaktion ist der Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B. Tiere, bei denen NF- κ B durch das Fehlen seiner Untereinheit p50 global inaktiv ist, weisen einen Schutz vor linksventrikulärem Remodeling auf. Bisher ist jedoch unklar, welche Zellen für diesen protektiven Effekt verantwortlich sind. Vorgegangene Studien konnten zeigen, dass die Protektion nicht auf die fehlende NF- κ B-Aktivierung in Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Aus Ischämie-Reperfusionsexperimenten an NF- κ B-defizienten Tieren ergaben sich Hinweise, dass v.a. die Hemmung von NF- κ B in Entzündungszellen die protektiven Effekte vermittelt.

Durch Kreuzung von LysMCre- mit lox-IKK β -Tieren erzeugten wir Tiere, denen makrophagenspezifisch I κ B-Kinase β (IKK β) fehlt. IKK deaktiviert den Inhibitor von NF- κ B und ist somit essentiell für eine NF- κ B-Aktivierung. Als Modell der Herzinsuffizienz diente der chronische Myokardinfarkt. Die Nachbeobachtung erfolgte über 56 Tage.

Die Knockout-Tiere (KO) hatten im Vergleich zu den Wildtyp-Tiere (WT) eine signifikant bessere Überlebensrate (KO vs. WT, 100% vs. 49%, $p < 0,01$). Präoperativ sowie postoperativ an den Tagen 1, 21 und 56 wurden transthorakale Echokardiographien durchgeführt. Bei gleicher Infarktgröße zeigten die KO-Tiere eine deutlich geringere linksventrikuläre Dilatation. Es konnte molekularbiologisch keine Reduktion der humoralen Entzündungsreaktion nachgewiesen werden, ebenso blieb das Entzündungszellinfiltrat immunhistochemisch unverändert. Auch bezüglich Apoptoserate und Neovaskularisation zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings zeigten die LysM-IKK β -KO-

Tiere 56 Tage nach Myokardinfarkt einen deutlich erhöhten septalen Kollagen-
gehalt als Hinweis auf ein verändertes extrazelluläres Remodeling.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die protektiven Effekte der globalen NF- κ B-Hemmung durch die fehlende NF- κ B-Aktivierung in Makrophagen und Granulozyten, nicht aber in Kardiomyozyten vermittelt wurden. Die durch die makrophagenspezifische NF- κ B-Hemmung vermittelten Veränderungen im Remodeling der extrazellulären Matrix führen zu einer Verbesserung der Überlebensrate, besseren funktionellen Ergebnissen und einem insgesamt verminderten linksventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt....	6
Abb. 2: Schematische Darstellung des klassischen Aktivierungsweges.....	12
Abb. 3: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-Rekombinationssystems...	17
Abb. 4: Echokardiographische Darstellung der Kammeröffnungsfläche.....	20
Abb. 5: Echokardiographische Darstellung des Ventrikeldurchmessers.....	21
Abb. 6: PSR-gefärbter Gewebeschnitt.....	23
Abb. 7: PSR-gefärbter Gewebeschnitt im Hellfeld und im polarisierten Licht .	24
Abb. 8: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.....	26
Abb. 9: Immunhistochemische Färbung neutrophiler Granulozyten.....	28
Abb. 10: Prinzip der cDNA-Synthese bei der Realtime-PCR.....	31
Abb. 11: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
Abb. 12: Schematische Darstellung der quantitativen Realtime-PCR..	34
Abb. 13: Bestimmung des C _T -Wertes bei der Realtime-PCR..	36
Abb. 14: Standardkurve zur Bestimmung der DNA-Konzentration.....	37
Abb. 15: Kapillarfärbung mit Lectin.	40
Abb. 16: Prinzip der TUNEL-Methode.....	41
Abb. 17: Aufnahme eines TUNEL-gefärbten Gewebeschnittes.....	43

Abb. 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Tagen nach Koronarligatur.....	44
Abb. 19: Echokardiographisch bestimmte Kammeröffnungsfläche (EDA).....	46
Abb. 20: Ejektionsfraktion an Tag 56 nach Myokardinfarkt.....	47
Abb. 21: Prozentuale Infarktgröße	48
Abb. 22: Kardiomyozytengröße im Querschnitt	49
Abb. 23: Gesamtkollagengehalt im Myokard	49
Abb. 24: Eingewanderte neutrophile Granulozyten in der Borderzone.....	50
Abb. 25: Expression von Tumornekrosefaktor α (TNF) im Herzgewebe	51
Abb. 26: Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	51
Abb. 27: Expression von Hypoxie-induziertem Faktor (HIF) im Herzgewebe ...	52
Abb. 28: Anzahl der Gefäße / Anzahl der Kardiomyozytenkerne pro mm ²	53
Abb. 29: Anzahl der TUNEL-positiven Kardiomyozytenkerne im Septum	53

7 Literaturverzeichnis

1. McMurray, J.J., et al., "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC". Eur J Heart Fail, 2012. Band 14 (8): Seite 803-69.
2. Hoppe, U.C., "New therapeutic approaches in heart failure". Dtsch Med Wochenschr, 2011. Band 136 (16): Seite 843-6.
3. Mann, D.L., "Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach". Circulation, 1999. Band 100 (9): Seite 999-1008.
4. Zugck, C., et al., "Health economic impact of heart failure: An analysis of the nationwide German database". Dtsch Med Wochenschr, 2010. Band 135 (13): Seite 633-8.
5. Neumann, T., et al., "Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives". Dtsch Arztebl Int, 2009. Band 106 (16): Seite 269-75.
6. Frantz, S., J. Bauersachs, and G. Ertl, "Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation". Cardiovasc Res, 2009. Band 81 (3): Seite 474-81.
7. Gordon, J.W., J.A. Shaw, and L.A. Kirshenbaum, "Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB". Circ Res, 2011. Band 108 (9): Seite 1122-32.
8. Frantz, S., J. Bauersachs, and R.A. Kelly, "Innate immunity and the heart". Curr Pharm Des, 2005. Band 11 (10): Seite 1279-90.
9. Van der Heiden, K., et al., "Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease". Clin Sci (Lond), 2010. Band 118 (10): Seite 593-605.
10. Frangogiannis, N.G., "The immune system and cardiac repair". Pharmacol Res, 2008. Band 58 (2): Seite 88-111.
11. Valen, G., Z.Q. Yan, and G.K. Hansson, "Nuclear factor kappa-B and the heart". J Am Coll Cardiol, 2001. Band 38 (2): Seite 307-14.

12. Frantz, S., et al., "Inhibition des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) in Makrophagen, aber nicht in Myozyten reduziert den kardialen Schaden nach Myokardinfarkt". *Clinical Research in Cardiology*, 2009. Band 98 (Suppl 1, April 2009 + V255).
13. Biesenbaum, J.N., "Effekte der Inhibition des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor kappa B (NF-KappaB) in Kardiomyozyten auf den kardialen Schaden nach Myokardinfarkt". 2011.
14. Frantz, S., et al., "Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction". *FASEB J*, 2006. Band 20 (11): Seite 1918-20.
15. Kawano, S., et al., "Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. Band 291 (3): Seite H1337-44.
16. Frantz, S., et al., "Tissue-specific effects of the nuclear factor kappaB subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury". *Am J Pathol*, 2007. Band 171 (2): Seite 507-12.
17. Ertl, G. and S. Frantz, "Healing after myocardial infarction". *Cardiovasc Res*, 2005. Band 66 (1): Seite 22-32.
18. Blankesteyn, W.M., et al., "Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice". *Acta Physiol Scand*, 2001. Band 173 (1): Seite 75-82.
19. Valen, G., "Innate immunity and remodelling". *Heart Fail Rev*, 2011. Band 16 (1): Seite 71-8.
20. Braunwald, E. and M.R. Bristow, "Congestive heart failure: fifty years of progress". *Circulation*, 2000. Band 102 (20 Suppl 4): Seite IV14-23.
21. Sutton, M.G. and N. Sharpe, "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy". *Circulation*, 2000. Band 101 (25): Seite 2981-8.
22. Pfeffer, J.M., et al., "Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction". *Am J Physiol*, 1991. Band 260 (5 Pt 2): Seite H1406-14.
23. McKay, R.G., et al., "Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion". *Circulation*, 1986. Band 74 (4): Seite 693-702.

24. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications". *Circulation*, 1990. Band 81 (4): Seite 1161-72.
25. Volders, P.G., et al., "Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction". *J Mol Cell Cardiol*, 1993. Band 25 (11): Seite 1317-23.
26. Sabbah, H.N., "Apoptotic cell death in heart failure". *Cardiovasc Res*, 2000. Band 45 (3): Seite 704-12.
27. Hein, S., et al., "The role of the cytoskeleton in heart failure". *Cardiovasc Res*, 2000. Band 45 (2): Seite 273-8.
28. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, "Energy metabolism in heart failure". *J Physiol*, 2004. Band 555 (Pt 1): Seite 1-13.
29. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, "NF-kappaB and the immune response". *Oncogene*, 2006. Band 25 (51): Seite 6758-80.
30. Matzinger, P., "Tolerance, danger, and the extended family". *Annu Rev Immunol*, 1994. Band 12: Seite 991-1045.
31. Frantz, S., G. Ertl, and J. Bauersachs, "Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease". *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. Band 4 (8): Seite 444-54.
32. Shi, Y., J.E. Evans, and K.L. Rock, "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells". *Nature*, 2003. Band 425 (6957): Seite 516-21.
33. Frantz, S., G. Ertl, and J. Bauersachs, "Toll-like receptor signaling in the ischemic heart". *Front Biosci*, 2008. Band 13: Seite 5772-9.
34. Palm, N.W. and R. Medzhitov, "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity". *Immunol Rev*, 2009. Band 227 (1): Seite 221-33.
35. Chao, W., "Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. Band 296 (1): Seite H1-12.
36. Anker, S.D. and S. von Haehling, "Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview". *Heart*, 2004. Band 90 (4): Seite 464-70.

37. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, "The inflammatory response in myocardial infarction". *Cardiovasc Res*, 2002. Band 53 (1): Seite 31-47.
38. Clark, D.J., et al., "Serum complement activation in congestive heart failure". *Am Heart J*, 2001. Band 141 (4): Seite 684-90.
39. Byrne, J.A., et al., "Oxidative stress and heart failure". *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2003. Band 96 (3): Seite 214-21.
40. Xiao, G., et al., "Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease". *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. Band 17 (4): Seite 281-93.
41. Liou, H.C., "Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB". *J Biochem Mol Biol*, 2002. Band 35 (6): Seite 537-46.
42. Hall, G., J.D. Hasday, and T.B. Rogers, "Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart". *J Mol Cell Cardiol*, 2006. Band 41 (4): Seite 580-91.
43. Valen, G., "Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure". *Basic Res Cardiol*, 2004. Band 99 (1): Seite 1-7.
44. Pahl, H.L., "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors". *Oncogene*, 1999. Band 18 (49): Seite 6853-66.
45. Tillmanns, J., et al., "Caught in the act: in vivo molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB after myocardial infarction". *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. Band 342 (3): Seite 773-4.
46. Wong, S.C., et al., "Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure". *Circulation*, 1998. Band 98 (2): Seite 100-3.
47. Frantz, S., et al., "Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure". *Cardiovasc Res*, 2003. Band 57 (3): Seite 749-56.
48. Frantz, S., et al., "Effect of chronic heart failure on nuclear factor kappa B in peripheral leukocytes". *Am J Cardiol*, 2004. Band 94 (5): Seite 671-3.

49. Onai, Y., et al., "Inhibition of NF- κ B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. Band 292 (1): Seite H530-8.
50. Hamid, T., et al., "Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodeling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure". *Cardiovasc Res*, 2011. Band 89 (1): Seite 129-38.
51. Misra, A., et al., "Nuclear factor- κ B protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction". *Circulation*, 2003. Band 108 (25): Seite 3075-8.
52. Brown, M., et al., "Cardiac-specific blockade of NF- κ B in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. Band 289 (1): Seite H466-76.
53. Onai, Y., et al., "Inhibition of κ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury". *Cardiovasc Res*, 2004. Band 63 (1): Seite 51-9.
54. Freund, C., et al., "Requirement of nuclear factor- κ B in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo". *Circulation*, 2005. Band 111 (18): Seite 2319-25.
55. Kawano, S., et al., "Blockade of NF- κ B ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II". *Cardiovasc Res*, 2005. Band 67 (4): Seite 689-98.
56. Zelarayan, L., et al., "NF- κ B activation is required for adaptive cardiac hypertrophy". *Cardiovasc Res*, 2009. Band 84 (3): Seite 416-24.
57. Hikoso, S., et al., "The κ B kinase β /nuclear factor κ B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression". *Circ Res*, 2009. Band 105 (1): Seite 70-9.
58. Kratsios, P., et al., "Antioxidant amelioration of dilated cardiomyopathy caused by conditional deletion of NEMO/IKK γ in cardiomyocytes". *Circ Res*, 2010. Band 106 (1): Seite 133-44.
59. Xuan, Y.T., et al., "Nuclear factor- κ B plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits". *Circ Res*, 1999. Band 84 (9): Seite 1095-109.

60. Sauer, B., "Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system". *Methods*, 1998. Band 14 (4): Seite 381-92.
61. Clausen, B.E., et al., "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice". *Transgenic Res*, 1999. Band 8 (4): Seite 265-77.
62. Michael, L.H., et al., "Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model". *Am J Physiol*, 1995. Band 269 (6 Pt 2): Seite H2147-54.
63. Hofmann, U., et al., "A Collagen alpha2(I) Mutation Impairs Healing after Experimental Myocardial Infarction". *Am J Pathol*, 2012. Band 180 (1): Seite 113-22.
64. Hu, K., et al., "Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1-receptor subtype blockade in rats with myocardial infarction: role of bradykinin". *Cardiovasc Res*, 1998. Band 39 (2): Seite 401-12.
65. Frantz, S., et al., "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac remodelling". *Br J Pharmacol*, 2007. Band 150 (2): Seite 130-5.
66. Takagawa, J., et al., "Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches". *J Appl Physiol*, 2007. Band 102 (6): Seite 2104-11.
67. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, "Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections". *Histochem J*, 1979. Band 11 (4): Seite 447-55.
68. 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. Band 106 (1): Seite 55-62.
69. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics". *Am J Clin Pathol*, 1981. Band 75 (6): Seite 816-21.
70. Wilhelm, J. and A. Pingoud, "Real-time polymerase chain reaction". *Chembiochem*, 2003. Band 4 (11): Seite 1120-8.
71. Chomczynski, P. and N. Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal Biochem*, 1987. Band 162 (1): Seite 156-9.

72. Huggett, J., et al., "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations". *Genes Immun*, 2005. Band 6 (4): Seite 279-84.
73. Roth, J., "Lectins for histochemical demonstration of glycans". *Histochem Cell Biol*, 2011. Band 136 (2): Seite 117-30.
74. Laitinen, L., "Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues". *Histochem J*, 1987. Band 19 (4): Seite 225-34.
75. Gavrieli, Y., Y. Sherman, and S.A. Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *J Cell Biol*, 1992. Band 119 (3): Seite 493-501.
76. Schmid, J.A. and A. Birbach, "IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB". *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. Band 19 (2): Seite 157-65.
77. Lawrence, T., et al., "IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation". *Nature*, 2005. Band 434 (7037): Seite 1138-43.
78. Baldwin, A.S., Jr., "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights". *Annu Rev Immunol*, 1996. Band 14: Seite 649-83.
79. Kawamura, N., et al., "Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy". *Cardiovasc Res*, 2005. Band 66 (3): Seite 520-9.
80. Haudek, S.B., D.D. Bryant, and B.P. Giroir, "Differential regulation of myocardial NF kappa B following acute or chronic TNF-alpha exposure". *J Mol Cell Cardiol*, 2001. Band 33 (6): Seite 1263-71.
81. Lawrence, T., et al., "Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation". *Nat Med*, 2001. Band 7 (12): Seite 1291-7.
82. Morishita, R., et al., "In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction". *Nat Med*, 1997. Band 3 (8): Seite 894-9.
83. Rius, J., et al., "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha". *Nature*, 2008. Band 453 (7196): Seite 807-11.

84. Leychenko, A., et al., "Stretch-induced hypertrophy activates NFkB-mediated VEGF secretion in adult cardiomyocytes". *PLoS One*, 2011. Band 6 (12): Seite e29055.
85. Meiners, S., et al., "Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome". *Hypertension*, 2004. Band 44 (4): Seite 471-7.
86. Vellaichamy, E., et al., "Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A". *J Biol Chem*, 2005. Band 280 (19): Seite 19230-42.
87. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, "The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction". *J Mol Cell Cardiol*, 2010. Band 48 (3): Seite 504-11.
88. Chen, Y.W., et al., "Dynamic molecular and histopathological changes in the extracellular matrix and inflammation in the transition to heart failure in isolated volume overload". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. Band 300 (6): Seite H2251-60.
89. Horn, M.A., et al., "Age-related divergent remodeling of the cardiac extracellular matrix in heart failure: collagen accumulation in the young and loss in the aged". *J Mol Cell Cardiol*, 2012. Band 53 (1): Seite 82-90.
90. Kumar, S., et al., "Inhibition of nuclear factor kappaB regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules". *Free Radic Biol Med*, 2011. Band 50 (1): Seite 206-15.
91. Vanhoutte, D., et al., "Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction". *Circulation*, 2007. Band 115 (4): Seite 475-82.
92. Lee, R.T., "Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure". *Trends Cardiovasc Med*, 2001. Band 11 (5): Seite 202-5.

Danksagung

Zuletzt möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Stefan Frantz, für die Stellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Sowohl während meiner Zeit im Labor, als auch während des Schreibens meiner Dissertation war er immer bereit, mich bei Fragen oder Problemen zu unterstützen und beantwortete meine Emails teilweise innerhalb von Minuten. Er ermöglichte mir die Präsentation meiner Arbeit in Form eines Posters und sorgte für eine nette und familiäre Arbeitsatmosphäre im gesamten Labor-team.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Helga Wagner, Frau Barbara Bayer und Frau Charlotte Dienesch, die mich immer freundlich und geduldig in die Methodik eingeführt haben und auch sonst immer ein offenes Ohr für mich hatten. Sie haben mich offen in die Arbeitsgruppe aufgenommen und mit ihrer liebenswerten Art dafür gesorgt, dass ich mich immer wohl gefühlt habe.

Frau Nadja Blömer danke ich für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, die ich während meines gesamten Studiums erfahren habe und auf die ich auch heute immer bauen kann.

Zum Abschluss möchte ich mich bei Jens bedanken, der immer an meiner Seite ist und immer an mich glaubt.