

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

Einfluss des Komplementfaktors C1q auf das Remodelling nach Myokardinfarkt

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hanna Mareike Siebert

aus Wiesbaden

Würzburg, September 2018

Referent/Referentin: Prof. Dr. Stefan Frantz

Koreferent/Koreferentin: Priv.-Doz. Dr. Niklas Beyersdorf

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2019

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1.	Grundlagen	1
1.1	Myokardinfarkt	1
1.1.1	Ursachen und Risikofaktoren.....	1
1.1.2	Pathophysiologie	1
1.1.3	Derzeitige Therapie.....	6
1.1.4	Folgen und Prognose	7
1.2	Herzinsuffizienz.....	7
1.2.1	Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	8
1.3	Rolle des angeborenen Immunsystems in ischämischen Herzerkrankungen	9
1.3.1	Das Komplementsystem	9
1.3.2	Rolle des Komplementsystems bei Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz.....	14
1.4	Fragestellung der Arbeit	16
2.	Material und Methoden	18
2.1	Versuchstiere	18
2.2	Infarktmodell	19
2.3	Echokardiographie.....	20
2.4	Hämodynamische Messungen.....	21
2.5	Organentnahme.....	22
2.6	Immunologische Nachweismethoden	25
2.6.1	Nachweis neutrophiler Granulozyten mittels Immunhistochemie.....	26
2.6.2	Auszählung neutrophiler Granulozyten	29
2.6.3	Nachweis von Makrophagen mittels Immunfluoreszenz.....	29
2.6.4	Bestimmung der Makrophagenanzahl im linken Ventrikel.....	31
2.7	Bestimmung der Apoptoserate	31
2.7.1	Allgemeines zur Apoptose	31
2.7.2	TUNEL-Assay	32
2.7.3	Caspase-Activity-Assay.....	33
2.7.4	Auszählung apoptotischer Zellen.....	37
2.8	C3-Nachweis mittels Immunfluoreszenz	37
2.8.1	Allgemeines zum Komplementnachweis	37
2.8.2	Nachweis von löslichem C3.....	38
2.8.3	Nachweis von C3-Spaltprodukten.....	40

2.9	SDS-Page und Westernblot.....	41
2.9.1	Elektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-Page)	43
2.9.2	Westernblot.....	44
2.10	Infarktgrößenbestimmung.....	46
2.10.1	PSR-Färbung.....	46
2.10.2	Computergestützte Infarktgrößenbestimmung.....	46
2.11	Kollagenbestimmung	49
2.12	Statistische Auswertung	50
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Mortalität.....	51
3.2	Organgewichte.....	52
3.2.1	Organgewichte vor Myokardinfarkt.....	52
3.2.2	Organgewichte nach Myokardinfarkt	53
3.3	Infarktgrößen	54
3.4	Echokardiographie	54
3.4.1	Echokardiographische Untersuchung vor Myokardinfarkt	54
3.4.2	Echokardiographische Untersuchung nach Myokardinfarkt.....	55
3.5	Hämodynamik.....	56
3.5.1	Hämodynamische Untersuchung vor Myokardinfarkt.....	56
3.5.2	Hämodynamische Untersuchung nach Myokardinfarkt	59
3.6	Neutrophileninfiltration.....	60
3.7	Makrophageninfiltration	61
3.8	Apoptoserate	62
3.9	Nachweis von Komplementfaktor C3	64
3.10	Kollagengehalt	69
4.	Diskussion	70
4.1	Rolle des klassischen Komplementaktivierungswegs beim chronischen Myokardinfarkt.....	70
4.2	Inflammatorische Phase	71
4.2.1	Neutrophile Granulozyten	71
4.2.2	Makrophagen.....	72
4.3	Apoptose.....	72
4.4	Linksventrikuläre Funktion	75
4.5	Kollagensynthese	76

4.6	C3-Nachweis	77
4.7	Einfluss des Komplementsystems auf das Remodelling nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz	79
4.8	Komplementsystem und antiinflammatorische Therapie	81
4.9	Einfluss der einzelnen Komplementaktivierungswege nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz	83
4.10	Ausblick.....	85
5.	Zusammenfassung	86
6.	Abkürzungsverzeichnis	87
7.	Literaturverzeichnis	90
8.	Abbildungsverzeichnis	99
9.	Tabellenverzeichnis	100

1. Grundlagen

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Ursachen und Risikofaktoren

Akuter Myokardinfarkt ist eine relevante und häufige Erkrankung. Obwohl die Mortalität am akuten Myokardinfarkt in den letzten Jahren deutlich gesenkt werden konnte, waren im Jahr 2015 5,3% der Todesfälle in Deutschland auf einen akuten Myokardinfarkt zurückzuführen. Damit stellte der Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit dar [1].

Ein Myokardinfarkt entsteht infolge einer lokalen Durchblutungsstörung im Herzmuskelgewebe, meist auf dem Boden einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Bei bestehender KHK liegt die Ursache eines Myokardinfarktes meist in der Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques. Dies kann zur Bildung eines Thrombus und zum Verschluss des betroffenen Herzkranzgefäßes führen. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Sauerstoffversorgung der angrenzenden Herzmuskelschichten, was in einem akuten Koronarsyndrom beziehungsweise einem Myokardinfarkt resultiert. Die Größe des entstehenden Infarktes ist dabei unter anderem abhängig von der Größe des ischämischen Areals, der Dauer der koronaren Okklusion, dem Ausmaß des verbliebenen koronaren Blutflusses und dem Ausmaß der mikrovaskulären koronaren Dysfunktion [2].

Es existieren zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung einer KHK. Zu den klassischen beeinflussbaren Risikofaktoren zählen Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und pathologisch veränderte Cholesterinwerte. Weitere beeinflussbare Risikofaktoren sind Diabetes mellitus, Adipositas, körperliche Inaktivität, Hypertriglyceridämie, Depression, Störungen im Homocysteinstoffwechsel sowie hohe Serum-CRP-Spiegel (C-reaktives Protein). Zusätzlich existieren nicht beeinflussbare Risikofaktoren, wie ein hohes Lebensalter, männliches Geschlecht sowie eine familiäre Prädisposition [3].

1.1.2 Pathophysiologie

Bei großen Infarkten kommt es zu Umbauprozessen (sog. Remodelling) im Herzmuskel, die zellmorphologische, molekulare und histologische Veränderungen umfassen. Das

Remodelling findet sowohl im infarzierten, als auch im nicht-infarzierten Gewebe statt und stellt einen wichtigen Prognosefaktor nach Myokardinfarkt dar [4]. Ungünstiges linksventrikuläres Remodelling trägt maßgeblich zur Entwicklung einer ischämischen Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt bei [5].

Immunprozesse spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion reparativer und proliferativer Prozesse und sind somit essentiell für eine adäquate Wundheilung nach Myokardinfarkt [6]. Gleichzeitig hat eine übermäßig verlängerte oder extrem starke Entzündungsreaktion einen negativen Einfluss auf die Heilungsprozesse nach Myokardinfarkt. Überschießende Entzündungsreaktionen führen zu stärkeren Gewebeschäden, defekter Narbenbildung, größeren Infarkten sowie Kontraktilitätsverlust [7].

Die Herzmuskelzellen von Säugetieren besitzen nur eine begrenzte Regenerationsfähigkeit. Diese reicht nicht aus, um den beim Myokardinfarkt stattfindenden Zelltod erfolgreich zu kompensieren. Der infarzierte Bereich wird daher durch kollagenreiches Narbengewebe ersetzt [8]. Hierzu finden nach Myokardinfarkt verschiedene, teilweise ineinander übergreifende Prozesse statt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die pathophysiologischen Abläufe nach einem Myokardinfarkt gegeben (vgl. Abbildung 1).

Untergang der Kardiomyozyten

In den ersten dreißig Minuten der Ischämie kommt es zu strukturellen Veränderungen der Kardiomyozyten sowie zu einer Ödembildung. Beides trägt zum Zelltod der Kardiomyozyten in den ersten drei Stunden nach Myokardinfarkt bei [9]. Des Weiteren kommt es durch oxidativen Stress und Calciumüberladung zu einer akuten kontraktilen Dysfunktion. Im Falle einer Reperfusion ist diese Dysfunktion teilweise reversibel. Durch abrupte Reoxygenierung, Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und einer Aktivierung des Komplementsystems kann eine Reperfusion jedoch zu einer weiteren myokardialen Schädigung führen [7].

Frühe inflammatorische Phase

Die frühe inflammatorische Phase beginnt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Myokardinfarkt.

Nekrotische und geschädigte Zellen sowie geschädigte extrazelluläre Matrix setzen Gefahrensignale, sogenannte DAMPs (danger associated molecular patterns), frei. DAMPs binden an korrespondierende Rezeptoren PRRs (pattern recognition receptors) und lösen so eine Entzündungsreaktion aus. PRRs befinden sich auf Zellen des angeborenen Immunsystems, überlebenden Parenchymzellen und infiltrierenden Leukozyten. Außerdem führen DAMPs zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Hierdurch kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen [10–15].

Bereits in den ersten Stunden nach einem Myokardinfarkt bewirkt das Komplementsystem durch die gebildeten Anaphylatoxine C3a und C5a (aktivierte Komplementfaktoren) eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe. Im Anschluss an die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten, kommt es zu einer Migration von Monozyten und Lymphozyten [16, 17].

Die Entzündungsreaktion wird durch verschiedene Chemokine und Zytokine entscheidend vorangetrieben. Chemokine wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) und TGF β 1 (Transforming growth factor β 1) bewirken eine zusätzliche Attraktion neutrophiler Granulozyten. Die Einwanderung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe wird außerdem durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität erleichtert. Durch Hypoxie im Gewebe kommt es zur Schädigung der zellulären Integrität des Gefäßendothels. Dies führt zur Störung von dessen Barrierefunktion [18]. Die Leukozyteninfiltration erreicht zwei bis vier Tage nach Myokardinfarkt ihren Höhepunkt [19].

Das Komplementsystem sowie die Aktivierung von TLR/IL-1 führen zu einer Aktivierung von MAPKs (mitogen activated protein kinases) und NF κ B (nuclear factor kappa B). Hierdurch kommt es unter anderem zu einer Veränderung des Phänotyps von Endothelzellen und Fibroblasten, die vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren. Besonders NF κ B steuert die Expression einer großen Gruppe von Genen, die für

proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-18) codieren. Außerdem führt NF κ B zu einer vermehrten Expression von Chemokinen, die zur Attraktion von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, T-Lymphozyten und Komplementfaktor B führen [15, 20, 21]. Die Leukozyteninfiltration führt über eine weitere Produktion von DAMPs zu einer Steigerung der Entzündungsreaktion und treibt zusätzlich die Beseitigung toter Zellen und geschädigter extrazellulärer Matrix voran [22].

Bildung von Granulationsgewebe

Zwei bis drei Tage nach Myokardinfarkt kommt es, ausgehend von der Borderzone, zur Bildung von Granulationsgewebe im infarzierten Bereich. Bei der Borderzone handelt es sich um die Grenzzone zwischen vitalem und ischämischem Myokard. Das gebildete Granulationsgewebe ist stark vaskularisiert und enthält viele Entzündungszellen sowie Myofibroblasten [23]. Myofibroblasten differenzieren aus den in der extrazellulären Matrix vorkommenden Fibroblasten. Sie sind am Metabolismus der extrazellulären Matrix beteiligt und wichtig für eine gute Gewebereparatur. Durch ihre kontraktilen Eigenschaften tragen sie zur Zugfestigkeit des Granulationsgewebes bei. Eine mangelhafte Einwanderung von Myofibroblasten bewirkt eine exzessive Dilatation des infarzierten Bereiches und kann maßgeblich zur Entwicklung von Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt beitragen [24].

Wichtig für die adäquate Heilung nach einem Myokardinfarkt ist die zeitgerechte Suppression der inflammatorischen Reaktion. Gleichzeitig kommt es zu einer Aktivierung reparativer Vorgänge [22]. Unter anderem spielen an dieser Stelle TGF β , Angiotensin II, IL-10 sowie einige intrazelluläre Mediatoren eine Rolle.

Angiotensin II und TGF β tragen zur Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten bei und stimulieren die Kollagenbiosynthese. TGF β hemmt außerdem die Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine sowie die Synthese von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen. Gleichzeitig hat es einen hemmenden Einfluss auf Makrophagen und induziert die Expression inhibitorischer T-Zell-Populationen [25].

Der Stoffwechsel der extrazellulären Matrix wird von MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) und TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) gesteuert. MMPs sind Enzyme, die Peptidbindungen in Kollagenmolekülen spalten. Somit kann geschädigtes Kollagengewebe abgebaut werden. Gleichzeitig wird durch TIMPs gewährleistet, dass eine zugfeste Narbe aus kollagenem Bindegewebe gebildet wird. IL-10 kann die Produktion von TIMPs durch mononukleäre Zellen induzieren und trägt so zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix bei. Leukozyten sind durch Synthese von MMPs und TIMPs am Metabolismus der extrazellulären Matrix nach Myokardinfarkt beteiligt. Außerdem tragen von den Entzündungszellen freigesetzte Proteasen zur Beseitigung nekrotischer Zellen bei [26].

Im nichtinfarzierten Bereich kommt es zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten, zu Kapillareinsprossungen sowie zu einer Zunahme des kollagenen Bindegewebes [24].

Remodelling des Granulationsgewebes und Narbenbildung

Durch Apoptose und Nekrose der eingewanderten Entzündungszellen kommt es zu einer Verminderung der Zellzahl im Granulationsgewebe und zur Quervernetzung der gebildeten Kollagenfibrillen. Das Resultat ist eine Narbe aus dichtem, kollagenreichen Bindegewebe [25].

Die Größe der ausgebildeten Infarktnarbe korreliert mit der Zerstörung der extrazellulären Matrix [27]. Im Tierexperiment konnten bereits in den ersten 40 Minuten nach experimentellem Verschluss der Koronararterien Veränderungen im bestehenden kollagenen Bindegewebe nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden lässt sich bereits eine signifikante Zerstörung im kollagenen Bindegewebe erkennen, die eine Woche nach Myokardinfarkt vollständig sichtbar ist [4]. Außerdem hat die Körpertemperatur des Tieres einen wesentlichen Einfluss auf die Größe der resultierenden Infarktnarbe [28].

Der Kollagengehalt der Infarktnarbe ist abhängig vom Gleichgewicht der Prokollagenproduktion der Myofibroblasten und der Produktion von MMPs und TIMPs durch Entzündungszellen. Eine starke Fibrosierung kann zu einer verminderten Dehnbarkeit und damit zu einer diastolischen Dysfunktion führen. Durch mangelnde Kontraktionsfähigkeit kann es ebenso zu einer systolischen Dysfunktion kommen. Ein

stark fibrosierter linker Ventrikel führt zu einer erhöhten Mortalität herzinsuffizienter Patienten [29, 30].

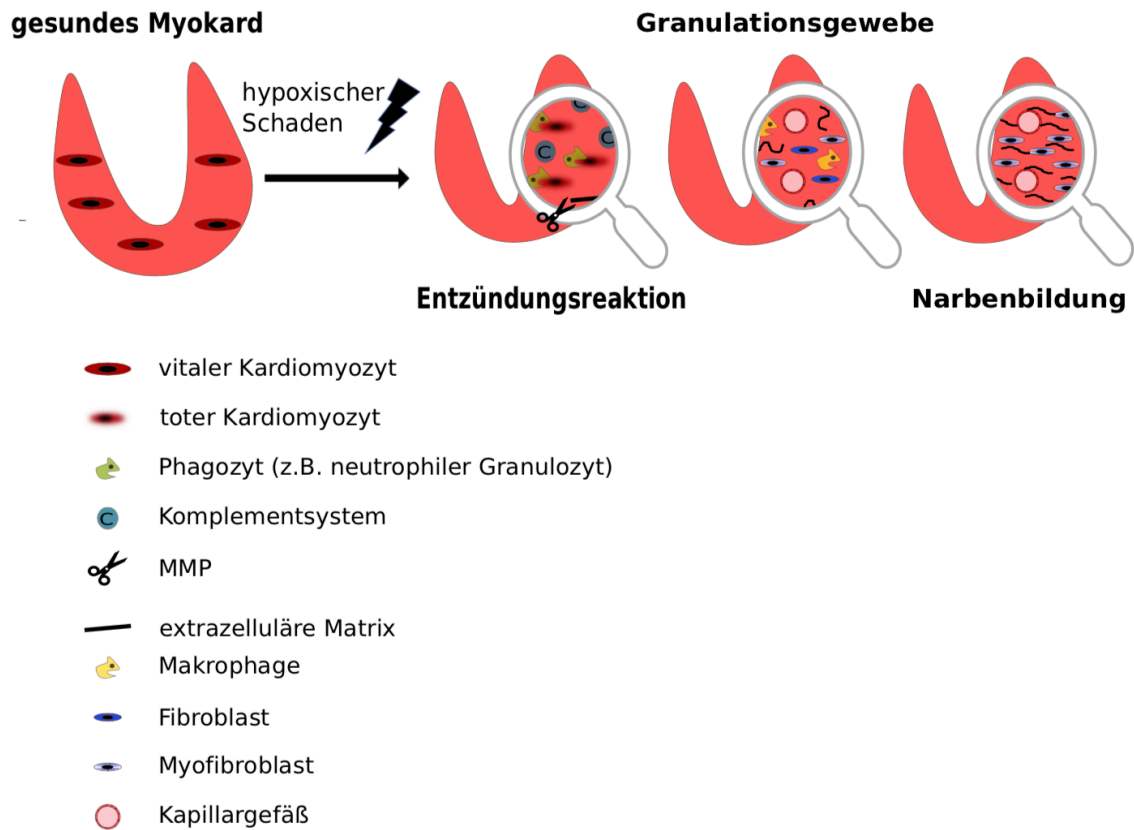


Abbildung 1: Pathophysiologische Vorgänge nach Myokardinfarkt

Durch die Gewebehypoxie nach Myokardinfarkt kommt es zum Untergang der Kardiomyozyten und zu einer sterilen Entzündungsreaktion. Dies führt zur Einwanderung von Entzündungszellen und zunächst zur Bildung von Granulationsgewebe. Durch Umbauvorgänge des Granulationsgewebes kommt es schließlich zur Bildung einer kollagenreichen Narbe. Abbildung modifiziert nach Blankesteyn et al. [24]

1.1.3 Derzeitige Therapie

Mit der Dauer der Ischämie steigt die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Herzmuskelzellen. Ziel der Therapie beim akuten Myokardinfarkt ist es daher, die Dauer der Ischämie möglichst kurz zu halten. Nach dem Prinzip „Zeit ist Muskel“ wird versucht, durch eine zeitnahe Reperfusion, ein weiteres Absterben des Herzmuskels zu verhindern [2]. In den letzten Jahren konnten enorme Fortschritte bei der Therapie des akuten Myokardinfarktes erzielt werden. Die Durchführung der perkutanen koronaren

Intervention in den ersten Stunden nach Symptombeginn sowie medikamentöse Therapieverfahren konnten die Mortalität am akuten Myokardinfarkt entscheidend reduzieren. So sank die Krankenhausmortalität des akuten Myokardinfarktes von 20% in den späten 1980er Jahren auf aktuell ungefähr 5-7%. [9].

1.1.4 Folgen und Prognose

Nach Myokardinfarkt steigen sowohl das Kurzzeit- als auch das Langzeitrisiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse, daher sind nach Myokardinfarkt Präventionsmaßnahmen von großer Bedeutung. Einem erneuten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sollte durch Ausschalten bzw. Behandeln von Risikofaktoren entgegengewirkt werden. Außerdem gilt es einer weiteren myokardialen Schädigung durch Schutz vor negativem Remodelling vorzubeugen. Bisher konnte nur für β -Blocker, ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Blocker ein positiver Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden [31].

Wie oben beschrieben haben bessere Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren zu einer höheren Überlebensrate nach Myokardinfarkt beigetragen. Hierdurch steigt die Inzidenz der ischämischen Herzinsuffizienz als Folge des Myokardinfarktes und den stattfindenden Remodelling-Vorgängen [32].

1.2 Herzinsuffizienz

Bei einer Herzinsuffizienz handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Systemerkrankung. Es resultiert ein klinisches Syndrom, das durch typische Symptome gekennzeichnet ist, die von bestimmten Zeichen begleitet werden können. Ursächlich hierfür sind kardiale Strukturdefekte und/oder Funktionsstörungen, die zu einer verringerten Auswurfleistung des Herzens und/oder zu erhöhten intrakardialen Drücken in Ruhe oder unter Belastung führen [33].

Verschiedene nebeneinander stattfindende Mechanismen tragen zur Entstehung einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt bei.

Häufig kann die linksventrikuläre Ejektionsfraktion durch den Frank-Starling-Mechanismus kurzfristig erhalten werden. Hierdurch ist das Herz in der Lage, seine

Auswurfleistungen an Druck- und Volumenschwankungen anzupassen. Durch Fortschreiten der linksventrikulären Remodellingprozesse kann es allerdings zu einer Ausdehnung und Ausdünnung der Narbe kommen. Weiterhin können die Kardiomyozyten im nicht-infarzierten Bereich hypertrophieren, was zu einer kurzfristigen Zunahme der Kontraktionskraft führt. Dieser Prozess wird vor allem durch neurohumorale Faktoren getriggert. Hypotension nach Myokardinfarkt führt zu Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und regt die Katecholaminproduktion im Nebennierenmark an. Es resultieren höhere Angiotensin II-Konzentrationen. Angiotensin II wirkt über korrespondierende Rezeptoren als Hypertrophiestimulus auf Kardiomyozyten im nicht-infarzierten Myokard [34]. Längerfristig führen linksventrikuläre Remodellingprozesse jedoch zu einer Wandausdünnung. Es kommt zu einem Kontraktilitätsverlust und einer linksventrikulären Dilatation. Dies kann zu einer verminderten Ejektionsfraktion und damit einer systolischen Herzinsuffizienz führen [35].

Letztlich stellt die Herzinsuffizienz eine Konsequenz aus Zelltod, Narbenbildung und parallel stattfindenden Remodellingprozessen dar.

1.2.1 Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Geschätzt leiden ca. 38 Millionen Menschen weltweit unter einer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Art und Ursache [36].

Die Zahl der herzinsuffizienten Patienten steigt mit zunehmendem Altersdurchschnitt in der Bevölkerung. In Deutschland ist die Herzinsuffizienz eine führende Todesursache und die häufigste Ursache für Hospitalisierung [37]. Herzinsuffizienz ist für einen großen Anteil der Krankheitskosten verantwortlich und stellt damit eine der kostenintensivsten chronischen Erkrankungen dar. Der Krankheitsverlauf der Herzinsuffizienz ist durch häufig wiederkehrende Krankenhausaufenthalte und eine eingeschränkte Lebenserwartung gekennzeichnet. Die demographische Entwicklung sowie der medizinische Fortschritt, welcher die Letalität ischämischer Herzereignisse deutlich senken konnte, werden auch in Zukunft zu einer Zunahme von Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz führen [38–40].

Der Myokardinfarkt stellt nach wie vor die häufigste Ursache für Herzinsuffizienz dar. Gleichzeitig ist die Herzinsuffizienz eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität nach Myokardinfarkt [9].

1.3 Rolle des angeborenen Immunsystems in ischämischen Herzerkrankungen

Das angeborene Immunsystem dient vor allem der Abwehr pathogener Keime. Aber auch bei Gewebeerkrankungen kommt es zu einer starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Dies löst eine Entzündungsreaktion aus, die entscheidend für eine adäquate Gewebereparatur nach Myokardinfarkt ist. Gleichzeitig hat eine überschießende Immunantwort einen negativen Einfluss auf das Remodelling und die linksventrikuläre Funktion. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Aktivität des Komplementsystems mit einem höheren Reperfusion-Schaden nach Myokardinfarkt korreliert [41].

1.3.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt einen Teil des angeborenen Immunsystems dar. Es besteht aus mehr als 30 im Plasma gelösten Komplementfaktoren, die bei einer Entzündungsreaktion ins Gewebe einwandern und dort aktiviert werden. Bei den Komplementfaktoren handelt es sich um Serinproteasen. Im Falle einer Komplementaktivierung kommt es zu einer kaskadenartigen proteolytischen Kettenreaktion, bei der die Komplementfaktoren von ihrer inaktiven in ihre aktive Form überführt werden [42]. Aktiviert werden kann das Komplementsystem über die Erkennung von PAMPs (pathogen-associated-molecular-patterns), Antigen-Antikörper-Komplexe oder sogenannter „Danger Signals“, welche von geschädigten Zellen freigesetzt werden [43]. Vor allem TLR (Toll-like-Rezeptoren), die zu den sog. PRRs zählen, spielen eine zentrale Rolle im kardialen Remodelling [44]. TLR befinden sich beispielsweise auf der Oberfläche von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, deren Migration unter anderem durch die Anaphylatoxine C3a und C5a des Komplementsystems gesteuert wird.

Durch Attraktion dieser phagozytotisch aktiven Zellen ist das Komplementsystem in der Lage, die Beseitigung pathogener Erreger, aber auch apoptotischer und nekrotischer Zellen zu induzieren. Außerdem ist es maßgeblich an der Angiogenese beteiligt und trägt so zu einer Revaskularisierung des infarzierten Bereiches bei. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Komplementaktivierung einen entscheidenden Einfluss auf die Migration von Stammzellen in geschädigtes Gewebe besitzt [45].

Bereits in den ersten Stunden nach Myokardinfarkt kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems. Bezüglich der Komplementaktivierung unterscheidet man im Wesentlichen drei verschiedene Aktivierungswege (vgl. Abbildung 2).

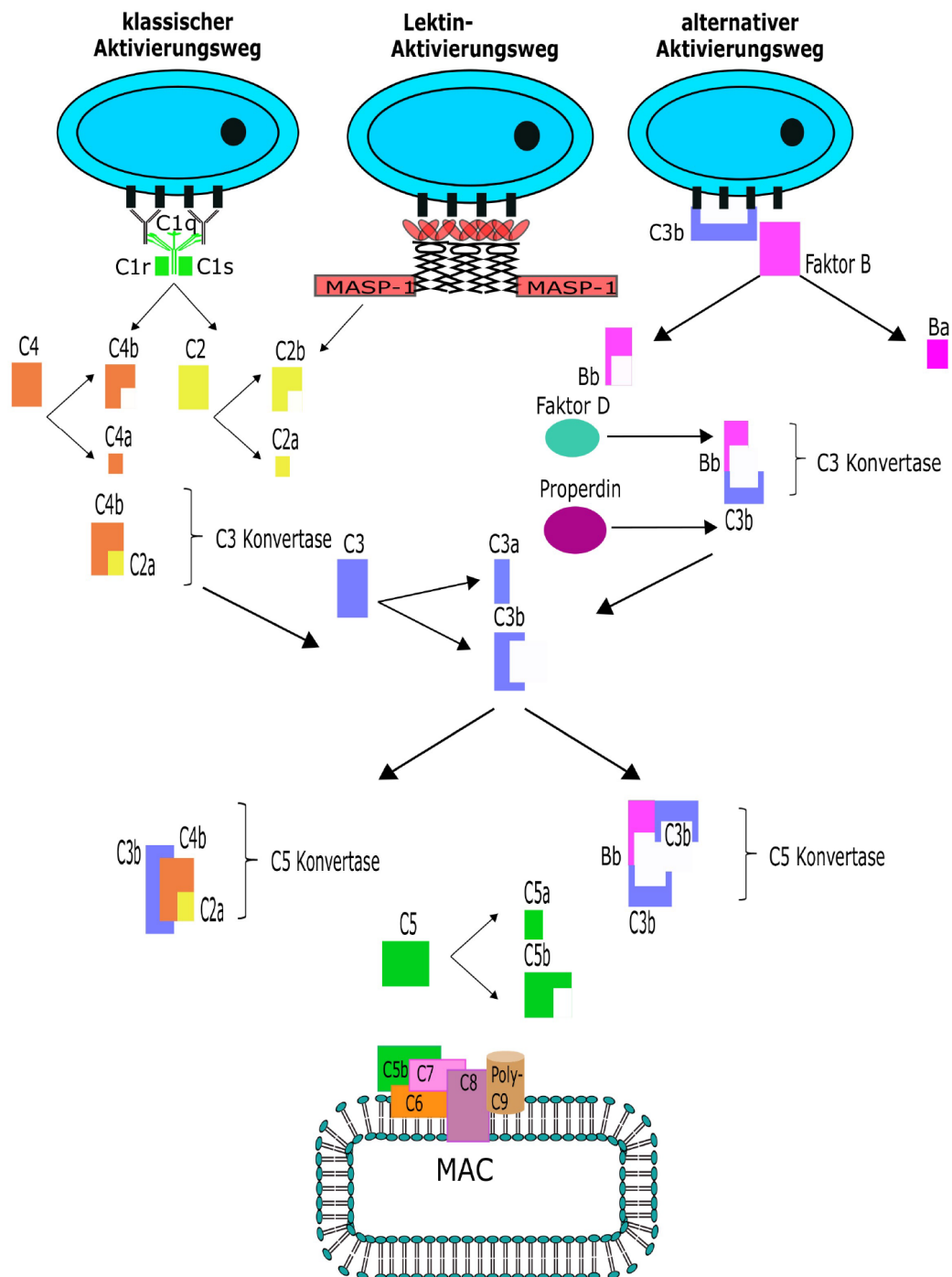


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der drei Komplementaktivierungswege

- (1) Aktivierung des klassischen Komplementaktivierungsweges (hier durch Antigen-Antikörper Komplexe). Es kommt zu einer Aktivierung des C1-Komplexes. Hierdurch werden die Faktoren C2 und C4 aktiviert und die C3-Konvertase, bestehend aus den Faktoren C4b und C2a, gebildet.
- (2) Der Lektin-Aktivierungsweg wird durch die Bindung von MBL an kohlenhydratreiche Oberflächen ausgelöst. Dies führt zur Bildung einer C3-Konvertase analog zu der des klassischen Aktivierungsweges.
- (3) Beim alternativen Aktivierungsweg kommt es zu einer spontanen Hydrolyse von C3. Das

gebildete C3b aktiviert den Faktor B. Faktor Bb und C3b bilden dann die C3-Konvertase. (4) Die C3-Konvertasen aller drei Aktivierungswege spalten C3 in C3a und C3b. Beim klassischen und beim Lektin-Aktivierungsweg kommt es zur Bildung einer C5-Konvertase bestehend aus den Faktoren C4b, C2a und C3b. Die C5-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges besteht aus den Faktoren C3bBbC3b. Die C5-Konvertasen aller drei Komplementaktivierungswege spalten nun C5 in C5a und C5b. Das gebildete C5b bildet zusammen mit den Faktoren C6-9 den Membranangriffskomplex. Abbildung modifiziert nach Beltrame et al. [46].

Der klassische Aktivierungsweg wird durch das Komplementprotein C1q ausgelöst. Hierbei assoziiert der C1-Komplex, bestehend aus je zwei Molekülen C1s und C1r sowie einem C1q-Molekül mit dem Fc-Teil von Antikörpermolekülen. In der Regel handelt es sich um an Proteinoberflächen gebundene IgM oder IgG Antikörper. Der Kontakt mit Antikörpern führt zu einer Veränderung innerhalb der Proteinketten von C1q, wodurch es zu einer autoproteolytischen Aktivierung der Serinprotease C1r kommt. Diese aktiviert daraufhin die Serinprotease C1s, welche eine Spaltung von C4 in C4a und C4b bewirkt. Kommt es zu einer Bindung von C2 an die Zelloberfläche bewirkt C4b dessen proteolytische Spaltung in die aktiven Faktoren C2a und C2b. C4b und C2a bilden zusammen einen Proteasekomplex, die sogenannte C3-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges. Die C3-Konvertase bindet kovalent an Zelloberflächen und spaltet den Komplementfaktor C3 in seine aktiven Produkte C3a und C3b. Der Faktor C3a liegt gelöst im Plasma vor und besitzt die Funktion eines Anaphylatoxins - das heißt, es ist in der Lage durch Attraktion von Immunzellen eine Entzündungsreaktion auszulösen. C3b bindet kovalent an die Zelloberfläche und fungiert dort als Opsonin, indem es Komplementrezeptoren auf phagozytierenden Zellen aktiviert. Durch Anlagerung von C3b an die C3-Konvertase (C4b und C2a) entsteht die C5-Konvertase (C4b, C2a und C3b). Diese katalysiert die Spaltung von C5 in C5a und C5b und ist die Voraussetzung für die Bildung des zytotoxischen Membranangriffskomplexes. Dieser besteht aus den Faktoren C5b-9. C5a fungiert, genau wie C3a, als starkes Anaphylatoxin und Leukotoxin [47].

Weiterhin kann eine Komplementaktivierung über den Lektin-Aktivierungsweg erfolgen. Bei Lektinen handelt es sich um Glykoproteine, die spezifisch an bestimmte Zucker binden können. Die Komplementaktivierung erfolgt hierbei über das MBL (mannanbindendes Lektin), welches zur Gruppe der PRR gehört und Mannose bzw.

mannoseähnliche Zucker auf Zelloberflächen erkennt. MBL interagiert bei der Komplementaktivierung mit im Serum gelösten Proteasen, den MASP (MBL-assoziierte Serin Proteasen). Durch Interaktion des MBL-MASP-Komplexes mit Mannose kommt es zu einer Aktivierung der Proteasen. Dies führt zu einer Spaltung des Komplementfaktors C4 in C4a und C4b sowie einer anschließenden Spaltung von C2 in C2a und C2b. Daraufhin kommt es wie beim klassischen Aktivierungsweg zur Bildung der C3-Konvertase bestehend aus C4b und C2a. Analog zum klassischen Aktivierungsweg erfolgt über Zwischenschritte die Bildung des zytotoxischen Membranangriffskomplexes [43].

Beim alternativen Aktivierungsweg kommt es zur spontanen Hydrolyse von C3, wobei C3b entsteht. C3b kann an den zellgebundenen Komplementfaktor B binden. Diese Bindung bewirkt, dass der Faktor B durch die Plasmaprotease Faktor D in die Faktoren Ba und Bb überführt werden kann. Dieser Komplex aus Faktor D, Faktor B und C3b kann durch Properdin (Faktor P) weiter stabilisiert werden. So wird die Bildung der C3 Konvertase des alternativen Komplementaktivierungswegs weiter vorangetrieben. Diese C3-Konvertase setzt sich aus den Faktoren C3b und Bb zusammen und spaltet C3 in C3a und C3b. Somit entsteht weiteres C3b, welches sich an die C3-Konvertase anlagert und so zur Bildung der C5-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges führt (C3bBbC3b) [47].

Alle Komplementaktivierungswege führen über eine gemeinsame Endstrecke zur Bildung des Membranangriffskomplexes bestehend aus den Faktoren C5b-9. Ausgehend von der C3-Konvertase kommt es zur Bildung einer C5-Konvertase, die C5 in C5a und C5b spaltet. Die C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges und des Lektin-Aktivierungsweges setzt sich aus den Komponenten C4bC2aC3b zusammen, die C5-Konvertase des alternativen Aktivierungswegs aus den Komponenten C3bBbC3b. Das von der C5-Konvertase gebildete C5b besitzt eine Bindungsstelle für C6. Zusammen mit C6 ist es in der Lage an Zelloberflächen zu binden und bildet so die Grundlage für die Entstehung des Membranangriffskomplexes. Durch Anlagerung von C7 kommt es zur Einlagerung des Komplexes in die Lipiddoppelschicht der Zelle. Die zusätzliche Anlagerung von C8 Molekülen bewirkt die Bildung instabiler Poren in der

Lipiddoppelschicht, an die sich C9 Moleküle anlagern. Dadurch kommt es zu einer Stabilisierung der Poren, was zu einer effektiven Zellyse führt.

Neben der durch den Membranangriffskomplex bewirkten Zellyse kann das Komplementsystem die Immunantwort durch weitere Mechanismen effektiv steuern. Durch die zellgebundenen Komplementkomponenten C3b, C4b und C3bi bewirkt das Komplementsystem die Opsonierung einer Zelle. Hierbei führt die Aktivierung von Komplementrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur Phagozytose der betroffenen Zelle. Außerdem induziert das Komplementsystem über die gebildeten Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a die Einwanderung weiterer Entzündungszellen in das Gewebe [43].

Zusätzlich zu den drei Komplementaktivierungswegen sind in den vergangenen Jahren weitere Mechanismen der Komplementaktivierung beschrieben worden. Zum einen kann das Komplementsystem unspezifisch durch Proteasen aktiviert werden, die von nekrotischen Zellen freigesetzt werden. Zum anderen sind verschiedene, in der Gerinnungskaskade involvierte Proteasen (wie zum Beispiel Kallikrein oder Thrombin) in der Lage, die Komplementfaktoren C3 und C5 in ihre Aktivierungsprodukte zu spalten [48, 49]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Properdin, welches maßgeblich an der Stabilisierung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungswegs beteiligt ist, auch in der Lage ist die Neubildung einer C3-Konvertase zu induzieren [50, 51].

Auch neurohumorale Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Komplementaktivierung. Dies wird durch den Nachweis erhöhter C5a Werte im Blut von Patienten mit Bluthochdruck untermauert. In Mausmodellen konnte außerdem eine Aktivierung des Komplementsystems durch Angiotensin-Infusion beschrieben werden [52].

1.3.2 Rolle des Komplementsystems bei Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz

Entzündungsprozesse besitzen einen entscheidenden Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt. Aus diesem Grund wurden in den vergangenen drei Jahrzehnten die inflammatorischen Vorgänge nach Myokardinfarkt intensiv untersucht. Bereits in den frühen 1970er Jahren konnten Hill und Ward nachweisen, dass es in infarzierten Rattenherzen zu einer Aktivierung des Komplementsystems kommt [53]. Durch Pinckard

et al. konnte gezeigt werden, dass Veränderungen auf der Zellmembran nekrotischer Kardiomyozyten zu einer Aktivierung der Komplementfaktoren C1, C4, C2 und C3 führen [54].

Im Myokard können verschiedene Reize eine Aktivierung des Komplementsystems herbeiführen. Unter anderem können Ischämie und ein erhöhter intraventrikulärer Druck die Synthese von Komplementfaktoren durch Kardiomyozyten, Endothelzellen und Makrophagen auslösen. Dies konnte bereits 1998 von Yasojima et al. in Ischämie-Reperfusion-Versuchen am Rattenherz dokumentiert werden, die eine lokale Aktivierung der Komplementkaskade und Ablagerung von Komplementfaktoren im Myokard bei Ischämie nachweisen konnten [55]. Yasojima et al. konnten weiterhin zeigen, dass nach Myokardinfarkt eine verstärkte endogene Komplementproduktion durch das Herz stattfindet [56].

Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Komplementsystems bei der Pathogenese der myokardialen Schädigung, indem es die Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt maßgeblich verstärkt. Zum einen kann es, wie oben beschrieben, über die Anaphylatoxine C3a und C5a zur Attraktion neutrophiler Granulozyten und Monozyten führen sowie deren Einwanderung in das geschädigte Gewebe erleichtern. Zum anderen stellt das Komplementsystem eine Verbindung des angeborenen Immunsystems zum adaptiven Immunsystem her. Das C1q-Protein des klassischen Komplementaktivierungsweges beeinflusst über C1q/C1q-Rezeptorinteraktionen die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen [57].

In murinen Ischämie-Reperfusion-Modellen ließ sich durch Komplementhemmung der Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt reduzieren [58]. Aber auch beim chronischen (nicht reperfundierten) Myokardinfarkt hat eine Komplementhemmung einen entscheidenden Einfluss auf das kardiale Remodelling und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz. In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe Frantz wurde der Einfluss des Komplementfaktors C3 als zentrales Element aller drei Komplementaktivierungswege nach Induktion chronischer Myokardischämie untersucht. Hierzu wurden C3KO-Tiere nach Myokardinfarkt mit WT-Tieren verglichen. Obwohl die Mortalität in der C3KO-Gruppe im Vergleich zu der WT-Gruppe unverändert blieb, zeigte sich bei den C3KO-Tieren eine deutlich geringere Apoptoserate, eine deutlich

geringere Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe sowie eine geringere linksventrikuläre Dilatation. Demnach hätte das Fehlen von Komplementfaktor C3 in Mäusen einen positiven Einfluss auf das kardiale Remodelling nach Myokardinfarkt [59].

Daher ist es von großer Bedeutung den Einfluss einzelner Komplementaktivierungswege auf das Remodelling nach Myokardinfarkt zu untersuchen.

In einer anderen Arbeit wurde bereits das Outcome von MBL-KO-Tieren mit WT-Tieren verglichen. In MBL-KO-Tieren kann keine Komplementaktivierung über den Lektin-Aktivierungsweg stattfinden, da das hierfür notwendige Mannose-bindende-Lektin fehlt. Nach Myokardinfarkt zeigte sich zwischen MBL-KO-Gruppe und WT-Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße, der Neutrophilen-Migration oder dem Kollagengehalt. Allerdings wiesen die MBL-KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren eine signifikant stärkere chronische ventrikuläre Dilatation auf. Die positiven Effekte der C3KO-Studie ließen sich also in den MBL-KO-Tieren nicht reproduzieren. Der Lektin-Aktivierungsweg ist also nicht alleinig für negative Remodellingprozesse nach Myokardinfarkt verantwortlich [60].

1.4 Fragestellung der Arbeit

1998 konnte durch Väkevä et al. [61] und Yasojima et al. [55] in Tiermodellen demonstriert werden, dass der klassische Komplementaktivierungsweg nach Myokardinfarkt aktiv ist. Nach Reperfusion ließen sich im Bereich des Myokardinfarktes vermehrt mRNA und korrespondierende Proteine aller Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges nachweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges auf das Remodelling nach Myokardinfarkt zu untersuchen. Zum einen sollte untersucht werden, wie sich ein Ausschalten des klassischen Komplementaktivierungsweges auf die linksventrikuläre Funktion, die Entzündungsreaktion sowie die Narbenbildung nach Myokardinfarkt auswirkt. Zum anderen sollten Rückschlüsse über die Einflussstärke des klassischen Komplementaktivierungsweges im Vergleich zu den anderen Komplementaktivierungswegen nach Myokardinfarkt gezogen werden. Für die Studie wurden C1qKO-Tiere mit WT-Tieren verglichen. C1qKO-Tiere können das

Komplementspaltprodukt C1q nicht bilden, sodass keine Aktivierung des klassischen Komplementaktivierungswegs stattfinden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

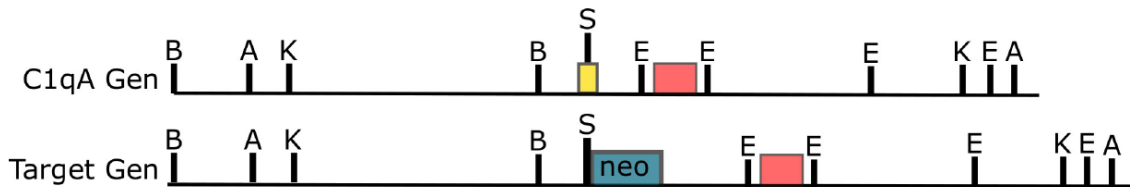


Abbildung 3: Generierung des *C1qa*KO Target Gens

Schematische Darstellung des *C1qa* Gens und des Target Gens, welches mit Hilfe eines Target Vektors (nicht gezeigt) generiert wurde. K, S, B, E und A stellen Restriktionsstellen dar. Die Exons des Gens sind durch rote Boxen dargestellt. Ein Neomycinresistenzgen wurde hinter der Restriktionsstelle S eingefügt und so das erste kodierende Exon im *C1qa* Gen unterbrochen (modifiziert nach Botto et al. [62]).

Zur Durchführung des Versuches wurden *C1q*-Knockout-Mäuse (KO) verwendet, die von Botto et al. [62] bezogen wurden. Die *C1q*KO-Mäuse besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund (129/Ola x C57BL/6), entwickelten sich normal und waren fruchtbar. Beschrieben war lediglich eine Neigung zur Glomerulonephritis, die sich bei ca. 25% der *C1q*KO-Mäuse entwickelte. Hierbei zeigten sich in der *C1q*KO-Gruppe höhere Autoantikörpertiter im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Botto et al. generierten die *C1q*KO mittels homologer Rekombination. Hierzu wurde ein Targetvektor konstruiert, bei dem das erste codierende Exon des *C1qa*-Gens durch eine an einer *Sma*I Restriktionsstelle eingebauten Neomycinresistenzkassette (pMC1Neopoly(A)⁺, Stratagene) unterbrochen war. Der Targetvektor wurde anschließend auf zwei unterschiedliche embryonale Stammzelllinien mittels Elektroporation übertragen. Die Stammzellen wurden in Blastozysten überführt. Nun wurden mittels homologer Rekombination *C1q*KO gezüchtet, die homozygot für das veränderte *C1qa*-Allel waren. Im Serum der *C1q*KO-Tiere ließ sich im Westernblot und mittels ELISA kein Komplementfaktor *C1q* nachweisen [62] (vgl. Abbildung 3). Für diese Studie wurden als Vergleichsgruppe C57B6/J Tiere gewählt. Zum Versuchszeitpunkt waren alle Tiere 6-8 Wochen alt und wogen 20-28g. Die Haltung der Tiere erfolgte bei Raumtemperatur (20°C), die Luftfeuchtigkeit betrug 55%. Die Tiere wurden in Kleingruppen von 4 bis maximal 6 Mäusen gehalten. Die Käfige besaßen ausreichend Rückzugsraum und

Deckung. Um einen artgerechten Hell-Dunkel-Zyklus zu erzeugen, wurde für 14 Stunden täglich künstliches Licht in den Ställen eingeschaltet. Eine Genehmigung der Studie durch die Regierung von Unterfranken lag vor (Nummer des Tierversuchsantrages 55.2-2531.01-10/11).

2.2 Infarktmodell

Operationsmaterial:

- OP-Besteck (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Vicrylfäden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)

Narkose:

- Endotracheal-Tubus (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Beatmungsgerät „Mouse Ventilator“ (UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien)
- Medizinischer Sauerstoff
- Narkosemittelverdampfer Dräger Vapor 2000 (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland)
- Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Sonstige Materialien:

- Beheizbare Platte 20x20cm
- Wärmelampe
- Temgesic® (Essex Pharma, München, Deutschland)

Die Infarktinduktion erfolgte operativ durch Unterbindung des RIVA am schlagenden Herzen.

Zur Einleitung der präoperativen Narkose wurde das Tier zunächst in einem mit Isofluran gefüllten Behälter betäubt. Anschließend wurde das Tier intubiert und an ein

Kleintierbeatmungsgerät angeschlossen. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch inhalative Verabreichung eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches.

Für die Durchführung des Eingriffs wurden die Tiere in Rückenlage auf eine beheizbare Platte gelegt und die Extremitäten mit einem Klebestreifen auf der Heizplatte fixiert.

Zunächst wurde ein Hautschnitt auf Höhe des vierten Interkostalraumes durchgeführt. Der Thorax des Tieres wurde eröffnet und das Herz dargestellt. Zur Herbeiführung der Ischämie wurde das Perikard gefenstert und die linke Herzkranzarterie dargestellt. Diese wurde mit einem Vicrylfaden umstochen und ca. 1mm oberhalb des linken Vorhofs unterbunden. Bei erfolgreicher Infarktinduktion erblasste das Myokard distal der Ligatur [63]. Anschließend wurde der Thorax des Tieres wieder verschlossen, das Tier unter einer Wärmelampe platziert und bis zu seinem Erwachen mit 100% Sauerstoff beatmet. Zur postoperativen Analgesie erhielt das Tier 0,1mg/kg KG Buprenophin (Temgesic®).

Eine Subgruppe von jeweils zwei Tieren wurde einer Sham-Operation unterzogen. Hier erfolgte zwar eine operative Darstellung der linken Herzkranzarterie, jedoch wurde diese nicht unterbunden. Somit bestand nach erfolgter Operation kein Myokardinfarkt.

2.3 Echokardiographie

Nach Myokardinfarkt können sich durch Remodellingvorgänge Größe und Form des Ventrikels verändern. Im Zusammenhang mit der Narbenbildung kann es auch zu Wandbewegungsstörungen kommen. Mit der Echokardiographie lassen sich Ventrikel, Herzklappen und Pumpfunktion des Herzens sehr gut beurteilen. Sie stellt daher eine geeignete Methode zur Verlaufsbeobachtung und Erkennung von Strukturveränderungen nach Myokardinfarkt dar [64].

Material:

- Ultraschallgerät (Toshiba Aplio Systems, Neuss)
- Wärmeplatte
- EKG-Gerät (cardiofax GEM, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H., Deutschland)
- Kleintieratemmaske (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland)
- Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)

- Medizinischer Sauerstoff
- Narkosemittelverdampfer Dräger Vapor 2000 (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland)

Präoperativ sowie an Tag 1, 7 und 56 nach Myokardinfarkt erfolgte eine transthorakale, echokardiographische Untersuchung der C1qKO-Tiere und der WT-Gruppe durch eine erfahrene technische Assistentin. Zur Narkotisierung wurde ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch verwendet, welches den Tieren über eine Atemmaske appliziert wurde. Die Tiere atmeten während der gesamten Untersuchung spontan. Für die Bestimmung der Herzfrequenz wurde die Maus auf eine Wärmeplatte gelegt, auf der sich EKG-Elektroden befanden. Die Extremitäten des Tieres wurden auf den Elektroden fixiert. Die Brust des Tieres wurde rasiert und mit Ultraschallgel bedeckt. Die echokardiographischen Daten wurden sowohl im B-Mode, als auch im M-Mode erhoben, jeweils apex-nah (AP) und auf Höhe des mittleren Papillarmuskels (PA).

Im B-Mode wurden die Strukturen des Herzens zweidimensional dargestellt, sodass sich die ESA (endsystolische Fläche) und die EDA (enddiastolische Fläche) ermitteln ließen. Aus jeweils drei Messungen von EDA und ESA wurde der Mittelwert gebildet. Mit der Formel: $FS-A = (EDA - ESA) / EDA$ wurde die fraktionelle Verkürzung der Ventrikelfläche (FS-A) errechnet [65].

Im M-Mode erfolgte eine eindimensionale Darstellung des Ventrikels, bei der Bewegungsabläufe in Bezug auf die Zeit dargestellt wurden. Hierbei ließen sich der ESD (endsystolischer Durchmesser) sowie der EDD (enddiastolischer Durchmesser) des Ventrikels bestimmen. Von ESD und EDD wurde anschließend ebenfalls der Mittelwert aus drei verschiedenen Messwerten gebildet. Hieraus ließ sich die fraktionelle Verkürzung des Ventrikeldurchmessers im M-Mode mit Hilfe der Formel: $FS-D = (EDD - ESD) / EDD$ errechnen [65].

2.4 Hämodynamische Messungen

Für den Versuch wurden hämodynamische Messungen bei einer Tiergruppe vor Myokardinfarkt sowie bei einer Tiergruppe 56 Tage nach Myokardinfarkt mittels Linksherzkatheteruntersuchung durchgeführt. Hierzu wurde das Tier zunächst mit einem

Isofluran-Sauerstoff-Gemisch betäubt und auf einer Wärmeplatte fixiert. Anschließend wurde die Arteria carotis punktiert und von hier aus ein Katheter retrograd über die Aorta in den linken Ventrikel vorgeschoben. Zur Lagekontrolle des Katheters wurde während des Vorschiebens eine Druckkurve aufgezeichnet. Nachdem sich die Herzfrequenz stabilisiert hatte, wurden unter anderem das Herzzeitvolumen, endsystolische und enddiastolische Druck- und Volumenwerte, sowie die Geschwindigkeiten von Druckanstieg (dP/dt) und Druckabfall ($-dP/dt$) im linken Ventrikel ermittelt. Nach jeder Messung erfolgte eine erneute Kalibrierung des Katheters. Die hier beschriebene Methode wurde unter anderem von Urayama et al. publiziert [66].

2.5 Organentnahme

Material:

- Isotonische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Deutschland)
- Isofluran (Essex Pharma, München)
- Gepuffertes Formalin
- Flüssiger Stickstoff
- Tissue-Tek, O.C.T™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande)
- 2-Methylbutan (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- RNAlater® Solution (Ambion®, ThermoFisher Scientific, Deutschland)
- Trockeneis
- Eppendorf Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)
- Wärmeschrank (Thermo Scientific, Waltham, USA)

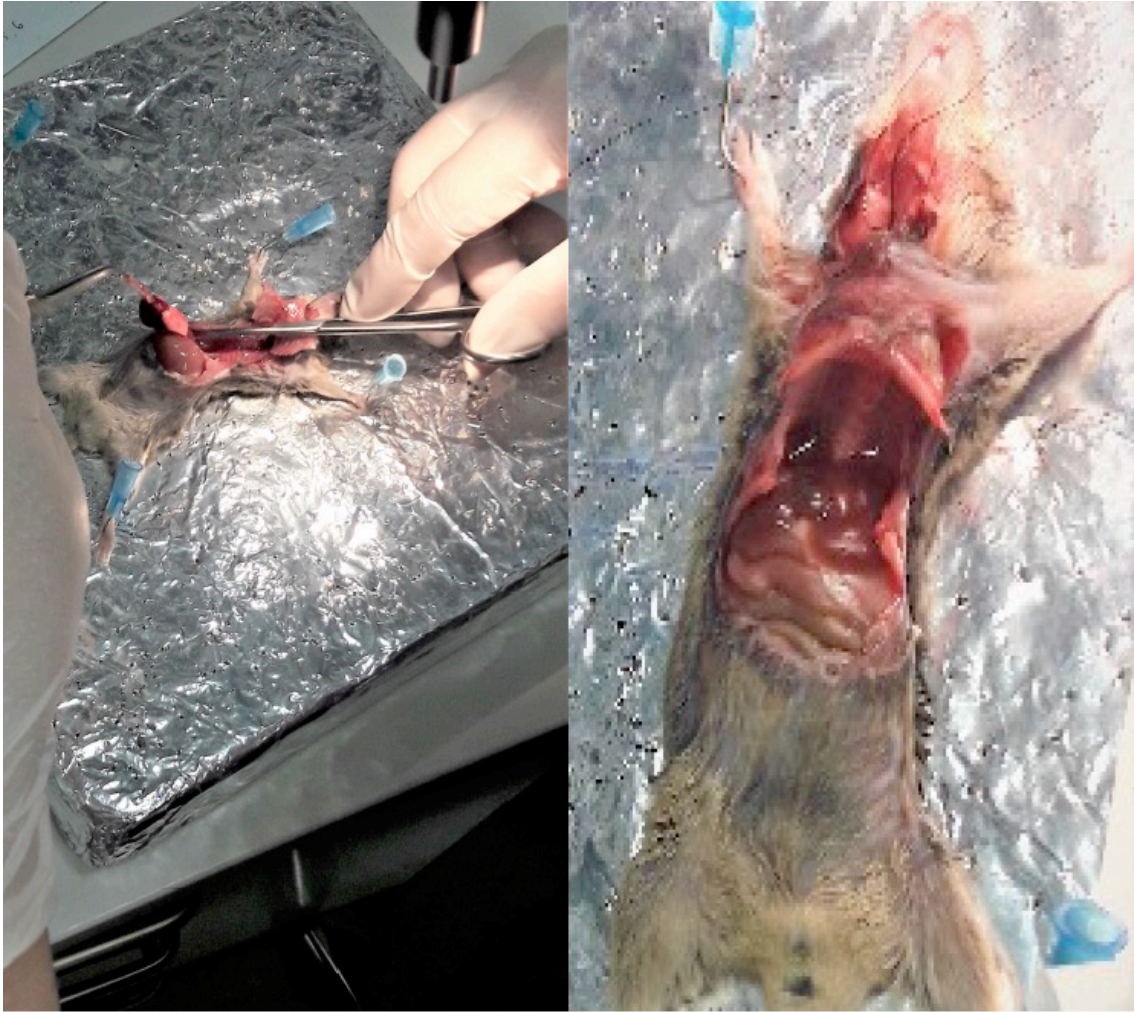


Abbildung 4: Organentnahme

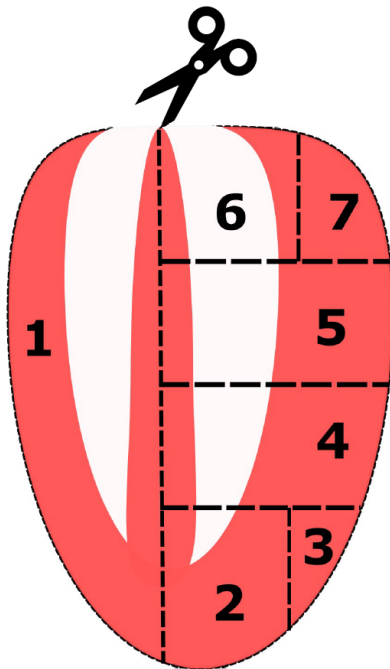
Herauspräparieren des Herzens nach Schnitt unterhalb des Rippenbogens und anschließender Präparation entlang der Axillarlinien bis in die Axilla nach oben.

Die Organentnahme wurde durch eine technische Assistentin am 56. postoperativen Tag durchgeführt. Den Tieren wurden hierbei das Herz, die Lunge und die Milz entnommen und für weitere Versuche konserviert.

Zunächst wurde das Tier in einer Isoflurankammer narkotisiert und anschließend gewogen. Zur Eröffnung des Thorax wurde ein Schnitt unterhalb des Rippenbogens durchgeführt und anschließend entlang der Axillarlinien bis in die Axilla nach oben geschnitten. Nun ließ sich der knöcherne Thorax nach kranial klappen und man erhielt Einsicht auf das Herz und alle weiteren Thoraxorgane (vgl. Abbildung 4).

Zur Entnahme des Herzens durchtrennte man zunächst die tiefe Bauchaorta. Das austretende Blut wurde mit einer Spritze entnommen. Nachdem das Herz freipräpariert war, wurde es zusammen mit der Lunge und dem Thymus aus dem Thorax entnommen und in Kochsalzlösung gegeben. Da das Herz danach noch für eine kurze Zeit weiterschlug, wurde noch im Organ enthaltenes Blut herausgepumpt. Nun wurde die Milz aus dem Abdomen entnommen und in Kochsalzlösung gegeben. Anschließend wurden alle entnommenen Organe gewogen.

Zur Konservierung des Herzens wurden zunächst Vorhöfe und Herzohren entfernt. Das Herz wurde entlang des Septum interventriculare aufgeschnitten und die beiden Ventrikel getrennt voneinander gewogen. Der rechte Ventrikel wurde in mehrere Teile geschnitten und zur Konservierung in flüssigen Stickstoff gegeben. Der linke Ventrikel wurde horizontal in vier Ringe geschnitten, wobei die Herzspitze erneut geteilt wurde. Der erste Teil der Herzspitze wurde in flüssigen Stickstoff gegeben, der zweite Teil kam in RNAlater. Beides wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Der zweite Ring (Histologiering) wurde zusammen mit einer Milzhälfte in gepuffertes Formalin gegeben und ca. 24 Stunden später nach interner Vorschrift in Paraffin eingebettet. Der dritte Ring (Kryoring) wurde in einen Tropfen TissueTec[®] gelegt und auf Trockeneis eingefroren. Die Herzbasis wurde in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte gab man in flüssigen Stickstoff, die andere Hälfte in RNAlater (vgl. Abbildung 5).



- 1** rechter Ventrikel: Konservierung in flüssigem Stickstoff
- 2** Herzspitze: Konservierung in RNAlater
- 3** Herzspitze: Einfrieren in flüssigen Stickstoff
- 4** Historing: Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin
- 5** Kryoring: Tissue Tec und Einfrieren auf Trockeneis
- 6** Herzbasis: Konservierung in RNAlater
- 7** Herzbasis: Einfrieren in flüssigem Stickstoff

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Organentnahme

Nach Organentnahme wurden zunächst Vorhöfe und Herzohren entfernt. Das Herz wurde entlang dem Septum interventriculare aufgeschnitten. Anschließend erfolgte die Konservierung des rechten Ventrikels in flüssigem Stickstoff (1). Der linke Ventrikel wurde horizontal in vier Ringe geschnitten und nach oben gezeigtem Schema konserviert (2-7)

2.6 Immunologische Nachweismethoden

In der Immunhistochemie wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um die Verteilung von Antigenen auf histologischen Schnitten sichtbar zu machen. Hierbei kommt es zu Antigen-Antikörperbindungen durch spezifische Reaktion des Primärantikörpers mit dem Epitop eines Antigens. Bei direkten Färbungen ist der Primärantikörper direkt mit einem Farbstoff gekoppelt. Bei der in unserem Fall angewandten indirekten Färbung setzt man

einen farbstoffgekoppelten Sekundärantikörper ein, der sich gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers richtet [67].

In der Immunfluoreszenz sind die zur Detektion genutzten Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Dieser erzeugt im Fluoreszenzmikroskop ein positives Signal.

2.6.1 Nachweis neutrophiler Granulozyten mittels Immunhistochemie

Materialien:

- 10µm Paraffinschnitte (entparaffiniert)
- Unmasking Solution Vector H 3300 (15µl Puffer + 1600 ml 2fach demineralisiertes H₂O)
- PBS: NaCl (pH 7.4) 137mM
Na₂HPO₄ 10mM
KCl 2,6mM
KH₂PO₄ 1,8mM
- 0,3% H₂O₂ in Methanol
- 99% Methanol (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- Normal Rabbit Serum S-5000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- Avidin/Biotin Blocking Kit SP-2001 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- Primärantikörper: Rat anti mouse monoclonal, Cat. LCU 8993 (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland) (Monoclonal antibody to 7/4 to Neutrophil, Ly6b, and lymphocyte antigen 6 complex, locus B)
- Sekundärantikörper: Biotinylierter anti-Rat IgG (H+L) BA-4001 (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)
- Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)
- DAB Reagenz Vector SK-4100, Peroxidase Substrate, Cat. No. SK-4100 (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)
- Feuchte Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Deutschland)
- Entellan (Merck, Deutschland)
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

Drei Tage nach Myokardinfarkt wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im linken Ventrikel ermittelt. Hierzu erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis in Paraffinschnitten. Um ein ausreichendes Signal zu erzeugen wurde die ABC-Methode angewandt.

Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, der an ein Avidinmolekül bindet. Dieses kann seinerseits mehrere Biotinmoleküle und damit auch eine biotinylierte Meerrettichperoxidase binden. Bei der Meerrettichperoxidase handelt es sich um ein Enzym, das in der Lage ist, das Reagenz DAB in einen braunen Farbstoff zu spalten [67]. So lassen sich die braun gefärbten neutrophilen Granulozyten im Lichtmikroskop detektieren (vgl. Abbildung 6).

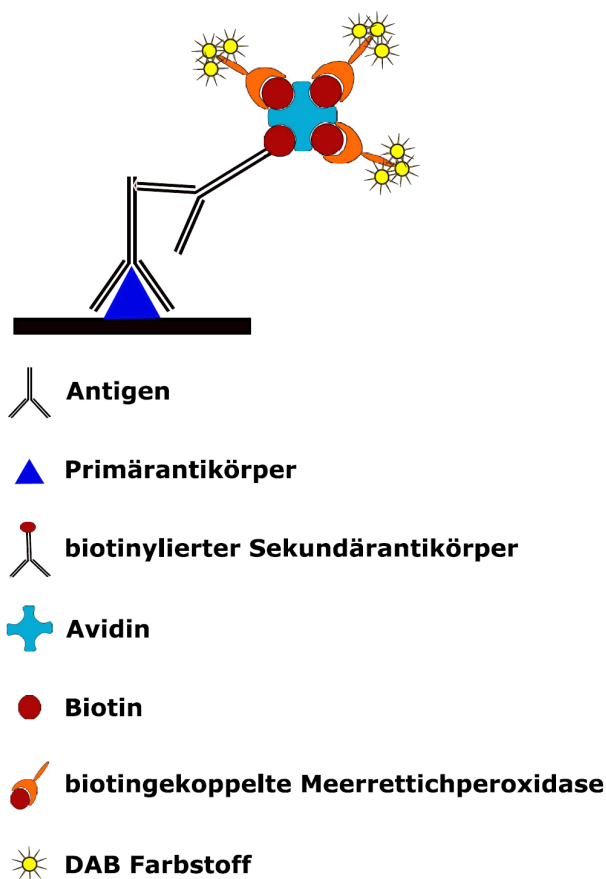


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode

Der Primärantikörper bindet einen biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser wiederum kann an ein Avidinmolekül binden. Die Farbreaktion wird durch eine biotinylierte Meerrettichperoxidase

katalysiert, die an das Avidinmolekül bindet und den Farbstoff DAB spaltet (nach www.histologietechnik.ch).

Für den Versuch wurden die Schnitte zunächst nach interner Laborvorschrift entparaffiniert. Nach einer kurzen Hydrierung in demineralisiertem Wasser wurden die Schnitte mit 0,3% H₂O₂ in Methanol behandelt. Hierdurch wurden im Gewebe enthaltene endogene Peroxidasen irreversibel gehemmt, um unspezifische Färbungen zu vermeiden. Zur Entfernung des verbleibenden Wasserstoffperoxids wurden die Schnitte anschließend in reines Methanol eingetaucht und 3x5 Minuten in PBS gewaschen.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen verwendete man eine Blockinglösung aus 5% Kaninchenserum in PBS, wobei pro 1ml Blockinglösung 4 Tropfen Avidin aus dem Avidin/Biotin-Blocking-Kit hinzugefügt wurden. Hierdurch wurden endogenes Biotin, Biotin-Rezeptoren und Avidin-Bindungsstellen blockiert. Die Schnitte wurden mit der Blockinglösung (ca. 50µl Lösung pro Schnitt) für 15 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3x5 Minuten in PBS gewaschen.

Zur spezifischen Anfärbung wurde der Primärantikörper (Linaris rat anti mouse monoclonal) in einem Verhältnis von 1:100 in 5% Kaninchenserum in PBS verdünnt und pro Milliliter 4 Tropfen Biotin aus dem Avidin/Biotin-Blocking-Kit hinzugefügt. Die Schnitte wurden mit je 50 µl dieser Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden sie 3x5 Minuten in PBS gewaschen.

Der Sekundärantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:100 in 5% Kaninchenserum in PBS verdünnt und die Schnitte damit für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden abermals für 3x5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend das Vectastatin-ABC-Kit nach Anleitung angewandt. Hierzu wurden jeweils zwei Tropfen Lösung A (enthält Avidin) und Lösung B (enthält biotinylierte Peroxidase H mit gesteigerter Enzymaktivität) vermischt und die Schnitte damit für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde das DAB-Reagenz nach Anleitung angesetzt und 1-2 Tropfen auf jeden Schnitt gegeben. Aus 3,3'-Diaminobenzidin entstand in Gegenwart von Peroxidase ein braunes Reaktionsprodukt, welches auf den Schnitten nach einer 1- bis 10-minütigen Inkubationszeit in einer feuchten Kammer sichtbar wurde. Daraufhin

wurden die Schnitte zweimal in demineralisiertem Wasser gewaschen und mit einem Tropfen Entellan sowie einem Deckgläschen bedeckt.

2.6.2 Auszählung neutrophiler Granulozyten

Die Bestimmung der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Gewebe erfolgte am Lichtmikroskop (Axioskop 2 plus; Leica Microsystems). Hierzu wurde jeder Schnitt gemäß seiner Neutrophilendichte auf einer Skala von 0 (keine neutrophilen Granulozyten) bis 4 (sehr große Dichte neutrophiler Granulozyten) eingestuft.

2.6.3 Nachweis von Makrophagen mittels Immunfluoreszenz

Die Makrophageninfiltration des linken Ventrikels wurde in Kryoschnitten 3 Tage nach Myokardinfarkt bestimmt.

Makrophagen besitzen unter anderem CD 68 (Cluster of differentiation 68) als charakteristisches Oberflächenantigen. Zum Nachweis von Makrophagen im Mäuseherz wurde deshalb ein aus Ratten isolierter Antikörper verwendet, der sich gegen das Oberflächenantigen CD 68 der Maus richtet (MCA 1957 anti CD 68 rat anti mouse).

Materialien:

- Kryotom CM 150 (Leica, Wetzlar)
- Objektträger, SuperFrost Ultra plus (R. Langenbrinck, Deutschland)
- Feuchte Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Deutschland)
- PBS
- 4% Formaldehyd in PBS
- Normal Goat Serum S-1000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- Primärantikörper: MCA 1957 anti-CD 68 rat anti mouse (Bio-Rad Laboratories, California, USA)
- Sekundärantikörper: A21434 Alexa Fluor 555 Goat Anti-Rat IgG (H+L) (Life Technologies Corporation)
- 49409 Atto Phalloidin 488 (Sigma Aldrich®)
- 861405 Hoechst 33258 (Sigma Aldrich®)

- Mowiol (Sigma Aldrich®)
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

Die gefrierkonservierten Präparate wurden am Kryotom (Leica CM 1850) 7µm dick geschnitten. Die entstandenen Schnitte wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer belassen und anschließend mit 4% Formaldehyd in PBS für 10 Minuten fixiert. Hierdurch wurde eine enzymatische Autolyse des Gewebes verhindert.

Um unspezifische Kreuzreaktionen des Primärantikörpers mit im Gewebe enthaltenen Proteinen zu verhindern, wurden die Schnitte vor Inkubation mit dem Primärantikörper mit einer Blockinglösung behandelt. Da der verwendete Sekundärantikörper aus Ziegen isoliert wurde, verwendete man für den Serumblock Normalserum der Ziege (Normal Goat Serum).

Die Schnitte wurden für 10 Minuten mit 5% Ziegenserum in PBS bedeckt. Danach wurden Formaldehyd und Blockinglösung durch Waschen der Schnitte für 3x5 Minuten in PBS entfernt und die Präparate mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde hierzu in einem Verhältnis von 1:100 in 5% Ziegenserum in PBS verdünnt. Die mit dem Primärantikörper bedeckten Schnitte wurden für eine Stunde in der feuchten Kammer belassen. Um ungebundenen Primärantikörper aus dem Gewebe zu entfernen, wurden die Schnitte anschließend 3x5 Minuten in PBS gewaschen.

Danach erfolgte die Detektion des Primärantikörpers durch den Sekundärantikörper, der sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtete. Hierzu wurde der Sekundärantikörper 1:100 in 5% Ziegenserum in PBS verdünnt. Der verwendete Sekundärantikörper (Alexa Fluor 555 Goat Anti-Rat IgG) ist mit einem Farbstoff gekoppelt, der im Rotkanal des Fluoreszenzmikroskops ein positives Signal zeigt. Zur Darstellung der vitalen Kardiomyozyten wurde Phalloidin 488 in einer Verdünnung von 1:100 hinzugefügt. Phalloidin 488 bindet an vitale Kardiomyozyten und fluoresziert im Grünkanal des Fluoreszenzmikroskops.

Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten, gab man zur Darstellung der Zellkerne zusätzlich noch einen Tropfen Hoechst auf jeden Schnitt und beließ die Schnitte für weitere 10 Minuten in der feuchten Kammer. Bei Hoechst handelt es sich um einen

zellgängigen, fluoreszierenden DNA-Farbstoff, der in der Lage ist an die kleine Furche der DNA zu binden.

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut 3x5 Minuten in PBS gewaschen, mit Mowiol betropft und mit Deckgläschen bedeckt.

2.6.4 Bestimmung der Makrophagenanzahl im linken Ventrikel

Die Anzahl der CD 68 positiven Zellen im Schnitt wurde im Fluoreszenzmikroskop (Axio imager Z1m; Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) beurteilt. Jedem Schnitt wurde, analog zu der bei der Neutrophileninfiltration angewandten Skala, ein Zahlenwert von 0 (keine Makrophageninfiltration) bis 4 (höchste bestimmte Makrophageninfiltration) zugeordnet.

2.7 Bestimmung der Apoptoserate

2.7.1 Allgemeines zur Apoptose

Durch die Ischämie kommt es im infarzierten Herzen zur Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten sowie zur Apoptose eingewanderter Entzündungszellen. Hierbei kann die Apoptose durch verschiedene Signale eingeleitet werden. Im Rahmen der Apoptose kommt es unter anderem zur Fragmentierung der im Zellkern enthaltenen DNA und zur Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind Cysteinproteasen und spalten Proteine hinter Aspartatresten. Es werden mehrere Mechanismen der Apoptose unterschieden [68].

Der extrinsische Apoptosevorgang wird über Todesrezeptoren auf der Zellemembran vermittelt (z.B. TNF-Rezeptor oder Fas). Bei Bindung eines Liganden kommt es zur Aktivierung der Caspase 8. Caspase 8 ist in der Lage, durch proteolytische Spaltung weitere Caspasen zu aktivieren. In Folge kommt es zur Aktivierung der Caspase 3, welche daraufhin das Zielprotein zerstört und so den Zelltod herbeiführt [68].

Beim intrinsischen Apoptosevorgang führen DNA-Schäden, osmotischer Stress oder der Entzug von Wachstumsfaktoren zur vermehrten Expression apoptotischer Proteine und zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Hierdurch kommt es, wie auch im extrinsischen Signalweg, zur Aktivierung von Caspasen und zur Zerstörung der Zelle [68].

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurden in dieser Studie ein TUNEL-Assay (Roche, in situ cell death detection kit fluorescein) sowie ein Caspase-Activity-Assay durchgeführt.

2.7.2 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay detektiert Zellkerne, die fragmentierte DNA enthalten. Hierbei werden freie OH-Gruppen am dritten Kohlenstoffatom der Desoxyribose des DNA-Stranges nachgewiesen. Freie OH-Gruppen entstehen durch Strangbrüche im Rahmen der Kernfragmentierung. Sie werden durch das Enzym Terminal Desoxynucleotidyltransferase mit Fluorescein-dUTP (Desoxyuridintriphosphat) verknüpft und lassen sich so im Fluoreszenzmikroskop detektieren (vgl. Abbildung 7).

Da es jedoch auch im Rahmen anderer Formen des Zelltods zu einer DNA-Fragmentierung kommen kann, ist der TUNEL-Assay nicht spezifisch für Apoptose. Grasl-Kraupp et al. [69] konnten mittels TUNEL-Assay auch auf nekrotischen Zellen ein positives Signal nachweisen.

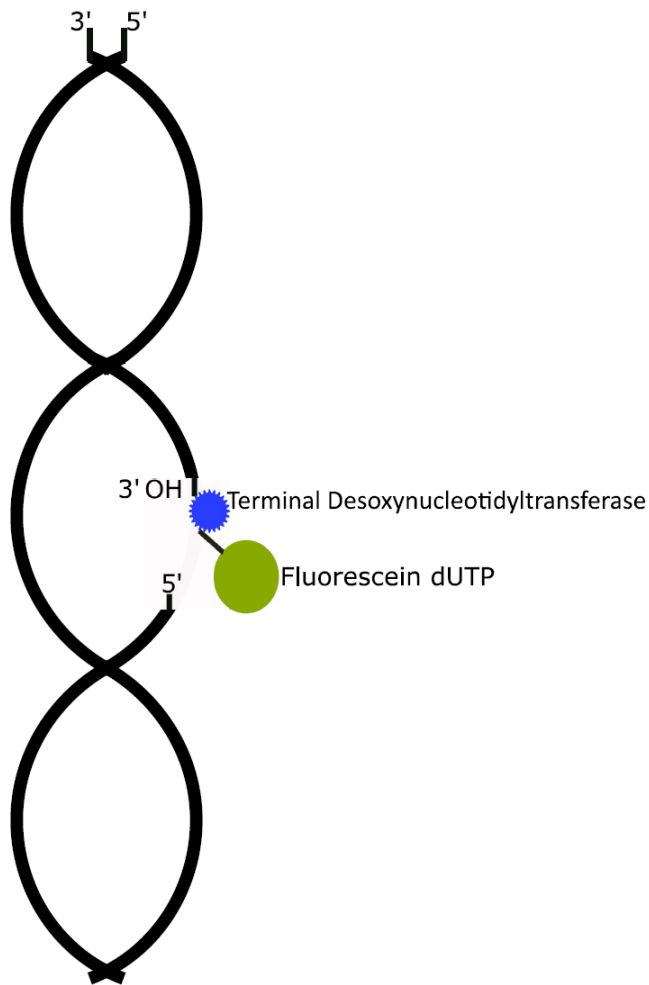


Abbildung 7: TUNEL-Assay

Fluorescein-dUTP (Fluorescein-Desoxyuridintriphosphat) wird über das Enzym Terminal Deoxynucleotidyltransferase an die 3'-OH-Gruppe des gebrochenen DNA-Stranges gebunden. Modifiziert nach Produktkatalog www.sigmaaldrich.com

2.7.3 Caspase-Activity-Assay

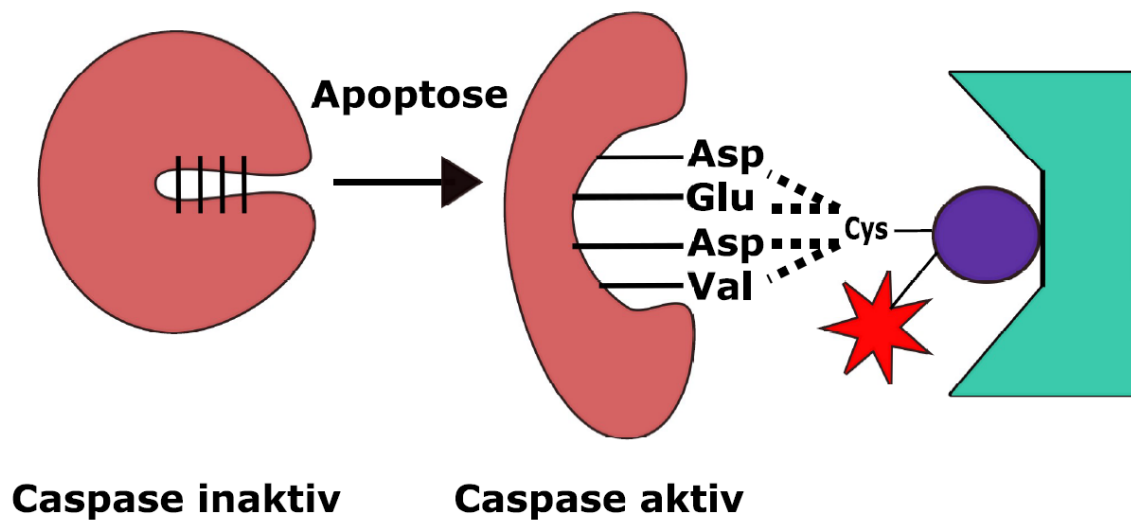
Um die Spezifität des Versuches für apoptotische Zellen zu erhöhen, erfolgte vor Durchführung des TUNEL-Assays ein Caspase-Activity-Assay.

Wie oben erwähnt, sind Caspasen Cysteinproteasen und spalten Proteine hinter Aspartatresten. Sie sind sowohl Element des intrinsischen, als auch des extrinsischen Apoptoseweges. Die aktivierten Caspasen bewirken zusammen mit weiteren Endonukleasen eine Fragmentierung der im Zellkern enthaltenen DNA. Caspase 3 und

Caspase 7 stellen Effektorcaspasen dar. Sie spalten Zielproteine und führen so zum Tod der betroffenen Zelle [70].

Das in diesem Fall verwendete Image-iT™ LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit (I35102) ist in der Lage, aktivierte Caspase 3 und Caspase 7 zu erkennen. Dies geschieht mittels eines fluoreszierenden Caspaseinhibitors (FLICA™).

FLICA besitzt eine FMK-Einheit (Fluormethyl-Keton-Einheit), die mit einem Cysteinrest kovalent an eine für aktivierte Caspasen spezifische Aminosäuresequenz binden kann. Für Caspase 3 und 7 ist diese Erkennungssequenz Asparaginsäure-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin. Zur Detektion ist eine Sulforhodamin Gruppe (SR) an die FMK-Einheit befestigt [71] (vgl. Abbildung 8).



 **FLICA**

 **Sulforhodamingruppe**

 **kovalente Bindungen**

 **FMK-Einheit**

Abbildung 8: Caspase-Activity-Assay

Aktivierte Caspase 3 und Caspase 7 lassen sich durch den Caspaseinhibitor FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspases) nachweisen. FLICA bindet über eine FMK-Einheit (Fluormethylketoneinheit) kovalent an das aktive Zentrum der aktivierten Caspase. Eine Sulforhodamingruppe dient der farblichen Detektion.

Materialien:

- Kryoschnitte 7µm
- PBS
- Feuchte Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Deutschland)

- Image-iT™ LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kit (I35102) (Inhalt: SR-DEVD-FMK caspase-3 and -7 Reagent, Hoechst 33342 stain, SYTOX Green nucleid acid stain, DMSO (Dimethylsulfoxide), Apoptosis fixative solution, 10x Apoptosis wash puffer)
- 4% Formaldehyd in PBS
- Normal Goat Serum S-1000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- TUNEL-Assay (Roche, in situ cell death detection kit fluorescein) (Inhalt: Enzyme Solution (TdT), Label Solution (fluorescein-dUTP))
- 65906 Atto 647-Phalloidin (Sigma Aldrich®)
- 861405 Hoechst 33258 (Sigma Aldrich®)
- Mowiol (Sigma Aldrich®)
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

Die Kryoschnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufgetaut. Nun erfolgte die Anwendung des Image-iT™ LIVE Red Caspase-3 and -7 Detection Kits. Um den enthaltenen Farbstoff nicht zu zerstören, erfolgte der gesamte Versuch in einer dunklen feuchten Kammer. Damit die enzymatische Aktivität der Caspasen erhalten blieb, wurde der Caspase-Activity-Assay vor Fixierung durchgeführt.

Zunächst wurde das im Kit enthaltene FLICA Pulver in DMSO gelöst, sodass eine 150x FLICA Lösung entstand. Diese wurde anschließend mit 5% Ziegenserum in PBS verdünnt bis eine 30fach FLICA Lösung entstand. Die Schnitte wurden mit dieser Lösung für eine Stunde bei 37 °C in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Um ungebundenes FLICA Reagenz aus dem Gewebe zu entfernen wurden die Schnitte nach abgelaufener Inkubationszeit mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer 3 Mal gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung des Gewebes mit 5% Formaldehyd in PBS.

Nach Fixierung des Gewebes wurde der oben beschriebene TUNEL-Assay durchgeführt.

Hierzu wurden pro Schnitt 22,5µl Label Solution und 2,5µl Enzym benötigt. Das Enzym wurde in die Label-Solution pipettiert und anschließend auf den Schnitt gegeben. Parallel wurde als Negativkontrolle ein Schnitt ausschließlich mit der Label-Solution bedeckt. Die

Schnitte wurden nun abermals für eine Stunde bei 37 °C in einer dunklen feuchten Kammer belassen.

Zur Darstellung der Kardiomyozyten wurde Phalloidin 647 in einer Verdünnung von 1:100 in 5% Ziegen Serum in PBS auf die Schnitte gegeben. Phalloidin 647 fluoresziert im Dunkelrotkanal des Mikroskops. Hierdurch konnte zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Bereich unterschieden werden. Nach 20 Minuten Inkubationszeit in der feuchten Kammer, wurde zusätzlich ein Tropfen Hoechst auf die Schnitte getropft. Die Schnitte verblieben daraufhin für weitere 10 Minuten in der feuchten Kammer. Danach wurden sie 3x5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit einem Tropfen Mowiol eingedeckelt.

2.7.4 Auszählung apoptotischer Zellen

Die Auszählung apoptotischer Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (Axio imager Z1m Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) in fünf Gesichtsfeldern pro Präparat. Hierzu wurden die Zellen ausgezählt, die sowohl im Rot- als auch im Grünkanal fluoreszierten. Anschließend wurde für beide Gruppen die mittlere Anzahl doppeltpositiver Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt und die Werte verglichen.

2.8 C3-Nachweis mittels Immunfluoreszenz

2.8.1 Allgemeines zum Komplementnachweis

Der Komplementfaktor C3 stellt das zentrale Element aller drei Komplementaktivierungswege dar. C3 ist ein lösliches Protein, welches bei seiner Aktivierung proteolytisch in C3a und C3b aufgespalten wird. C3a fungiert als Anaphylatoxin, C3b bildet zusammen mit weiteren, nachgeschalteten Komplementfaktoren die C5-Konvertase und ist in der Lage an Zelloberflächen zu binden [43]. Der Nachweis von zellgebundenem C3 in C1qKO-Tieren würde bedeuten, dass trotz dem ausgeschalteten klassischen Aktivierungsweg weiterhin eine Komplementaktivierung stattfindet.

Zum Nachweis von Komplementfaktor C3 in Kryoschnitten wurden zunächst die bisher angewandten Protokolle zum Komplementnachweis genutzt [55, 59, 60].

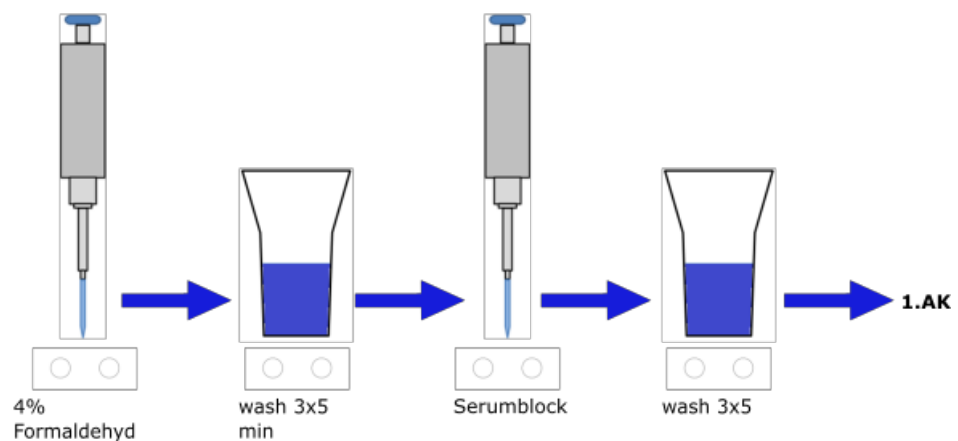
2.8.2 Nachweis von löslichem C3

Material:

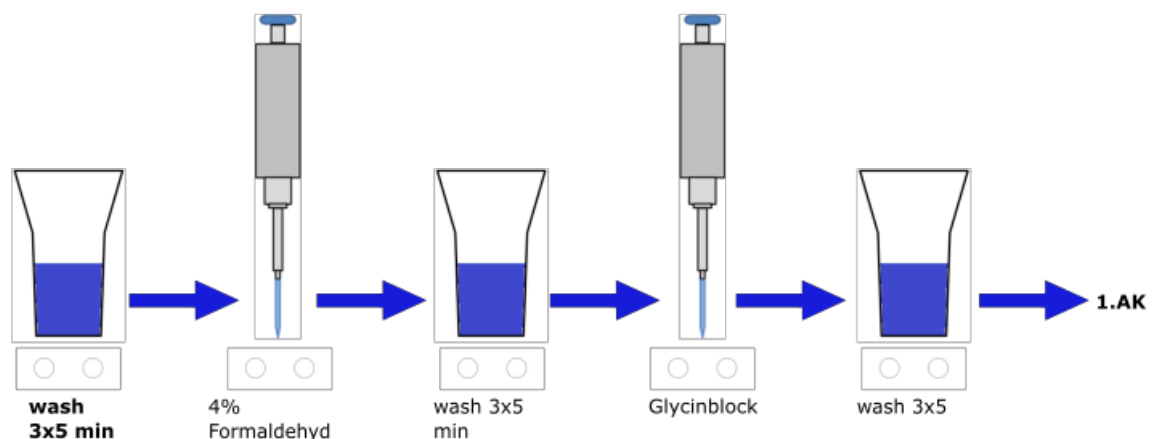
- Kryoschnitte 7µm
- PBS
- Feuchte Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Deutschland)
- Primärantikörper: Cappel Goat F (AB ‘) 2 Fragment to mouse complement C3 #55474 (MP Biomedicals)
- 4% Formaldehyd in PBS
- Normal Rabbit Serum S-5000 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- Sekundärantikörper: Alexa Fluor® 594 donkey anti-goat (Invitrogen™ Molecular Probes®)
- 49409 Atto 488 Phalloidin (Sigma-Aldrich®)
- 861405 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich®)
- Mowiol (Sigma-Aldrich®)
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Axio imager Z1m (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)

Die Schnitte wurden mit 4% Formaldehyd in PBS in einer feuchten Kammer für 10 Minuten fixiert und anschließend 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte für 15 Minuten mit 5% Kaninchenserum in PBS inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang (3x5 Minuten in PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper wurde hierzu in einer Konzentration von 1:100 in 5% Kaninchenserum in PBS verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit dem Sekundärantikörper und Phalloidin 488 für 20 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Hierzu wurde der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:200 und Phalloidin 488 in einer Konzentration von 1:100 in 5% Kaninchenserum in PBS verdünnt. Nach 20 Minuten wurde zusätzlich noch einen Tropfen Hoechst auf die Schnitte pipettiert. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Schnitte 3x5 Minuten in PBS gewaschen, mit Mowiol betropft und mit Deckgläschen bedeckt.

Mit dem verwendeten Primärantikörper ließ sich sowohl lösliches, als auch unlösliches C3 detektieren. Um lösliches (inaktives Komplement) zu entfernen, wurde in einem zweiten, optimierten Versuch der Schnitt vor Fixierung 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Außerdem wurde statt eines Serumblocks ein Glycinblock verwendet. Hierdurch sollte eine Kontamination des Schnittes mit im Blockingserum enthaltenen Komplementfaktoren verhindert werden. Ebenso wurde bei der Verdünnung der verwendeten Antikörper dem PBS kein Serum mehr hinzugefügt (vgl. Abbildung 9).



bisheriges Protokoll



optimiertes Versuchsprotokoll

Abbildung 9: Optimierung der C3-Detektion mittels Immunfluoreszenz

Durch einen vorherigen Waschvorgang werden im Gewebe gelöste Komplementfaktoren entfernt. Ein Glycinblock anstelle eines Serumblocks verhindert eine Kontamination des Präparates mit Komplementfaktoren.

2.8.3 Nachweis von C3-Spaltprodukten

Der Antikörper Mouse C3b/iC3b/C3c richtet sich gegen die C3 Spaltprodukte iC3b, C3b und C3c, das heißt es wird vor allem zellgebundenes und damit aktives Komplement erkannt.

Material:

- Kryoschnitte 7µm
- PBS
- Feuchte Inkubationskammer (Weckert Labortechnik, Deutschland)
- 4% Formaldehyd in PBS
- Glycin 0,1Molar
- M.O.M.TM Kit, FLUORESCHEIN FMK-2201 (Vector Laboratories Inc., Burlingame)
- Primärantikörper: Mouse C3b/iC3b/C3c monoclonal antibody (Hycult[®] biotech, Beutelsbach, Deutschland)
- 49409 Atto 488 Phalloidin (Sigma-Aldrich[®])
- Sekundärantikörper: Alexa Flour[®] 555 goat anti-mouse IgG (H+L) (Sigma-Aldrich[®])
- 861405 Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich[®])
- Mowiol (Sigma-Aldrich[®])
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

Die Schnitte wurden zunächst 3x5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd in PBS in einer feuchten Kammer für 10 Minuten fixiert. Die Fixierlösung wurde durch 3x5 Minuten Waschen von den Schnitten entfernt und diese zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 0,1M Glycin für 10 Minuten inkubiert. Zwei Tropfen des im M.O.M.TM Kit FLUORESCHEIN enthaltenen Mouse Ig-Blocking-Reagent wurden in 2,5ml PBS verdünnt und die Schnitte damit für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte gemäß dem oben beschriebenen optimierten Versuchsprotokoll des C3-Nachweises.

2.9 SDS-Page und Westernblot

Zunächst wurde die C3 Konzentration in den bei der Immunfluoreszenz verwendeten Blockingsera (Normal Goat Serum, Normal Rabbit Serum), in Mausserum sowie in einer humanen Serumprobe gemessen. Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen gegen C3 gerichteten Antikörpern durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurde die C3 Konzentration im Serum von RAG-KO-Tieren, C3KO-Tieren, MBL-KO-Tieren und WT-Tieren gemessen.

Die Proteinproben wurden auf Gele aufgetragen. Das in den Gelen enthaltene SDS (Sodiumdodecylsulfat) führte zu einer Denaturierung der Proteine und maskierte durch seine Negativladung deren Eigenladung. So ließen sich die Proteine nach ihrer Molekülmasse auftrennen. Um die Proteine später lokalisieren zu können, wurde seitlich der Proben ein Marker aufgetragen. Durch einen Westernblot wurden die Proteinbanden anschließend durch ein senkrecht zum Gel stehendes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Negativ geladene Proteine wanderten hierbei zur Anode. Da Proteine mit einem niedrigeren Molekulargewicht schneller wanderten als Proteine mit einem hohen Molekulargewicht, erfolgte so eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Anschließend konnte mittels spezifischer Antikörper ein Nachweis einzelner Proteine erfolgen.

Chemikalien:

- 2-β-Mercaptoethanol (Gibco Invitrogen[®], Life technologies[™], Deutschland)
- SDS-Ladepuffer:

Tris-HCl (PH 8.5)	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,1% (w/v)
- TBS-T:

Tris-HCl (pH 7,6)	50mM
NaCl	150mM
Tween 20	0,05% (v/v)

(Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Deutschland)

- Blockpuffer: Milchpulver fettfrei 5% (Cell Signaling, Cambridge, UK)
 TBS-T
- Transferpuffer: 10mM CAPS (PH11),
 10% (v/v) Methanol
 Destilliertes Wasser
- Demineralisiertes Wasser
- Ponceau S (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)

Für das Trenngel (10%):

- 2,5ml Lösung A (30% Acrylamid 4K;37,5:1 Mix, Appllichem)
- 5ml Lösung B (1,5 M Tris/HCl (PH 8,6))
- 2,3ml destilliertes H₂O
- 100µl 10% SDS (w/v) in H₂O (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)
- 150µl 10% APS (w/v) in H₂O (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)
- 15µl TEMED (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)

Für das Sammelgel (6%):

- 1,5ml Lösung A (30% Acrylamid 4K;37,5:1 Mix, Appllichem)
- 2,55ml Lösung D (0,5 M Tris/HCl (PH 6,8))
- 5,8ml destilliertes H₂O
- 100µl 10% SDS (w/v) in H₂O (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)
- 150µl 10% APS (w/v) in H₂O (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)
- 15µl TEMED (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland)

Für die ECL-Reaktion:

- Lösung A (200ml 0,1 M Tris-HCl pH8,6, 50mg Luminol)
- Lösung B (11mg Parahydroxycoumarinsäure in 10ml DMSO)
- H₂O₂ (30% Lösung)

Antikörper/Proben:

- Proteinprobe
- Primärantikörper: Cappel Goat F (AB') 2 Fragment to mouse complement C3 (MP Biomedicals)
- Primärantikörper: Mouse C3b/iC3b/C3c monoclonal antibody (Hycult® biotech, Beutelsbach, Deutschland)
- Sekundärantikörper: Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology)
- Marker: Color Protein Standard, Broad Range (11-245 KDa) (New England, BioLabs Inc.)

Geräte und weitere Materialien:

- Schüttler (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)
- Whatman Nitrozellulose Transfermembran (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- Whatman Filterpapier (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- Vortex Minishaker MS2 (IKA, Staufen)
- Westernblotkammer (Bio-Rad)
- Westernblot-Scanner C-DiGit (LI-COR)
- Nanotrop (Thermo Scientific)
- Westernblot-Kassetten (Bio-Rad)

Software:

- Image Studio Lite Ver 5.2

2.9.1 Elektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-Page)

Probenvorbereitung:

Zunächst wurde mittels Nanotrop für jede Probe die Menge Serum ermittelt, in der 50µg Protein enthalten waren. Die Probe wurde im Ladepuffer angesetzt und mit 2-β-

Mercaptoethanol auf ein Volumen von 28µl aufgefüllt. Die fertigen Proben wurden auf Eis gelegt.

Versuchsablauf:

Trenngel und ein Sammelgel wurden nach obenstehender Zusammensetzung in einer Mini-Gel-Kammer angefertigt. Für den Versuch wurde ein 10% Trenngel angefertigt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde es mit demineralisiertem Wasser bedeckt. Das Gel wurde ca. 20-30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, bis es auspolymerisiert war. Dann wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. In das Trenngel wurde ein Kamm mit 10 Taschen gesteckt. Nach ungefähr einer Stunde ließen sich Trenngel und Sammelgel optisch klar voneinander abgrenzen. Die Kämmen wurden entfernt und die Gele in ein Laufkammersystem gegeben, das mit SDS-Ladepuffer gefüllt war. Die Gele wurden mit den Proben beladen und neben den Proben ein Marker aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 110V und einer Stromstärke von ca. 20mA bis ca. 0,5cm vor Ende des Gels. Das Gel wurde aus den Glasplatten ausgebaut und das Sammelgel entfernt.

2.9.2 Westernblot

Für die Durchführung des Westernblots wurde das Gel zunächst in Transferpuffer gelegt. Eine Nitrozellulosemembran wurde in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und ebenfalls in Blot-Puffer gegeben. Anschließend wurde der Blot in den Beladungsträger eingebaut. Nach Verschluss wurde der Beladungsträger in die Transferkammer gegeben, die mit gekühltem Blot-Puffer gefüllt war. In die Transferkammer wurde ein Kühlakku gegeben und die Kammer auf Eis gelagert. Der Transfer erfolgte eine Stunde lang bei einer konstanten Spannung von 50V und einer Stromstärke von 130 mA. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran aus dem Trägersystem ausgebaut und in destilliertes Wasser gegeben. Zur unspezifischen Proteindetektion wurde die Membran in einem Färbetrog mit Ponceau S gefärbt und eingescannt. Anschließend erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungen in einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS-T.

Die beiden Primärantikörper wurden je 1:1000 in 1ml 5% Milchpulver in TBS-T verdünnt und zusammen mit der Membran eingeschweißt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten auf einem Drehtisch bei Raumtemperatur wurden die Membranen 3x7 Minuten in einer Glasküvette in TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:5000 in pro Membran 10ml 5% Milchpulver in TBS-T angesetzt. Die Membranen wurden für 20 Minuten in einer Glasküvette mit der Lösung inkubiert und anschließend erneut 3x7 Minuten in TBS-T gewaschen.

Der Nachweis des gebundenen Sekundärantikörpers erfolgte mittels ECL-Reaktion (Enhanced Chemoluminescence). Für die Entwicklung verwendete man 2 ml ECL Lösung A, 200µl Lösung B, sowie 6µl H₂O₂, wobei alle verwendeten Lösungen lichtgeschützt gelagert und verpackt waren. Die Lösungen wurden gemischt und auf die Membran pipettiert. Die Proteinbanden wurden anschließend mit dem Westernblot-Scanner detektiert.

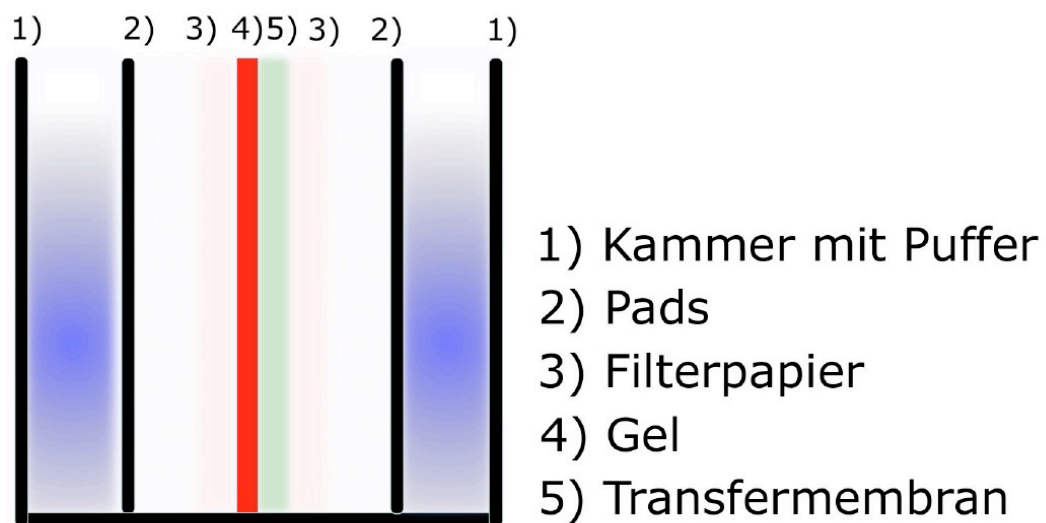


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Westernblots

2.10 Infarktgrößenbestimmung

2.10.1 PSR-Färbung

Material:

- Paraffinschnitte 7 μ m
- Färbetröge
- Färberahmen mit Glashalterung
- PSR-Lösung (Poliscience Inc., Warren, USA)
- Rothistol (Roth, Karlsruhe)
- Xylol (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- 1:1 Xylol-Ethanolgemisch
- Ethanol 96% (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf)
- Aqua dest.
- Entellan (Merck, Deutschland)
- Deckgläschen (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden 7 μ m dicke Paraffinschnitte des linken Ventrikels angefertigt und für mindestens 2 Stunden in einem Glasständer im Ofen getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Färbetrögen in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (1. Rothistol, 2. Xylol, 3. 1:1 Xylol-Ethanolgemisch, 4. Ethanol 96%, 5. Ethanol 75%, 6. Ethanol 50% für jeweils 5 Minuten). Daraufhin wurden die Schnitte drei Mal mit destilliertem Wasser gespült und für 20 Minuten mit Pikrosiriusrotlösung gefärbt. Nach einer erneuten Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entfärbt und unter Hinzugabe von Entellan mit einem Deckgläschen verschlossen.

2.10.2 Computergestützte Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden am Computer zunächst mit Hilfe der SPOT-Software Bilder der PSR gefärbten Schnitte aufgenommen. Pikrosiriusrot bindet spezifisch an Kollagenfasern. So lässt sich die kollagenreiche Infarktnarbe vom vitalen

Myokard abgrenzen. Kollagen stellt sich im Lichtmikroskop rot dar, lebende Kardiomyozyten gelb.

Am Lichtmikroskop wurde mit dem 2,5x Objektiv ein Bild des PSR gefärbten Präparates aufgenommen und in das Programm Image J eingelesen. Ausgewertet wurden nur Bilder, auf denen eine kontinuierlich ausgebildete Infarkt Narbe zu erkennen war.

Zunächst wurde mittels eines im 2,5x Objektiv aufgenommenen Eichdias ein Maßstab definiert. Anschließend wurden der infarzierte Bereich und das Septum je einmal endokardial und einmal epikardial umfahren. Die ermittelten Längen des infarzierten Bereichs wurden in eine Exceltabelle übertragen und der prozentuale Infarktanteil des Schnittes errechnet (vgl. Abbildung 11).

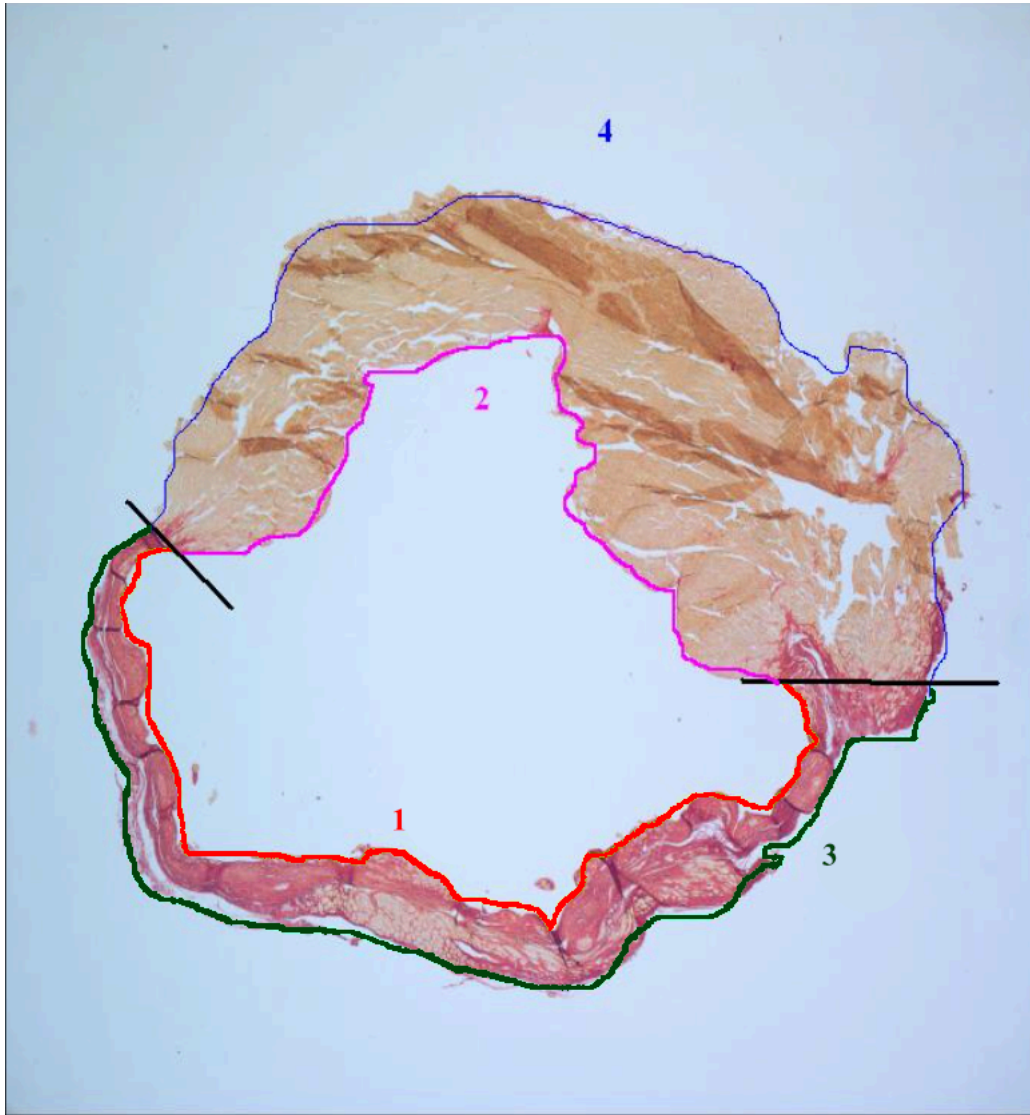


Abbildung 11: Computergestützte Infarktgrößenbestimmung

*Darstellung der computergestützten Infarktgrößenbestimmung an einem PSR gefärbten Paraffinschnitt des linken Ventrikels. Der infarzierte Bereich und das Septum wurden je einmal endokardial und einmal epikardial umfahren. Die ermittelten Längen des infarzierten Bereichs wurden in eine Exceltabelle übertragen und der prozentuale Infarktanteil des Schnittes errechnet (1) Narbe endokardial, 2) Septum endokardial, 3) Narbe epikardial, 4) Septum epikardial).
Abbildung übernommen aus interner Laboranleitung*

2.11 Kollagenbestimmung

Material:

- Fluoreszenzmikroskop Axio imager Z1m (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)
- Adobe Photoshop 7.0
- ZEN lite 2011 (Zeiss)
- Microsoft Excel

PSR gefärbte Paraffinschnitte zeigen eine spezifische Grün- und Rotfluoreszenz, wobei Kollagen im Rotkanal und vitale Kardiomyozyten im Grünkanal fluoreszieren. Die Methode zur Kollagenbestimmung mittels PSR Fluoreszenz wurde 2015 von Vogel et al. [72] beschrieben und im Rahmen dieser Dissertation mitgeteilt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Methode gegeben.

Zur Bestimmung des Kollagengehaltes eines PSR Schnittes wurde eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Rot- und Grün-Kanales durchgeführt. Das Bild wurde an einer Stelle des Präparates aufgenommen, an der weder Artefakte noch Gefäße vorkamen. Die aufgenommenen Bilder wurden zunächst als „zvi“-Dateien abgespeichert. Anschließend wurden die Bilder mittels ZEN lite 2011 in ihre Einzelkanäle aufgeteilt und in „jpg“-Format umgewandelt. Die Einzelkanalbilder wurden in Adobe Photoshop 7.0 eingelesen und eine automatisierte Graustufenumwandlung durchgeführt. Anschließend wurden die auf dem Bild abgebildeten Löcher im Präparat markiert und die Pixel vom Rest des Bildes subtrahiert. Schließlich wurde der Grünkanal vom Rotkanal subtrahiert, sodass man die Fläche des reinen Kollagens in Pixel erhielt. Die Flächen von reinem Kollagen, Löchern und vitalen Kardiomyozyten in Pixel wurden in eine Exceltabelle eingetragen und der relative Anteil von vitalen Kardiomyozyten und Kollagen errechnet (vgl. Abbildung 12).

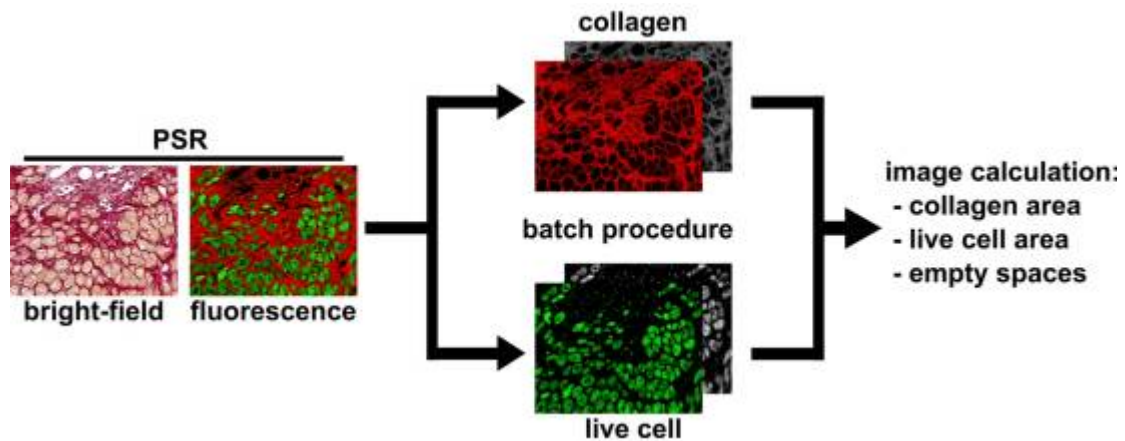


Abbildung 12: Kollagennachweis mit PSR-Fluoreszenz

In PSR-gefärbten Schnitten zeigen vitale Kardiomyozyten im Grünkanal und kollagene Fasern im Rotkanal ein positives Signal. Subtrahiert man den Grünkanal sowie beide die im Präparat vorhandenen Löcher vom Rotkanal, erhält man die Fläche des Kollagens [72].

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels „GraphPad Prism 4“. Für jeden gemessenen Parameter wurde für die C1qKO-Gruppe und die WT-Gruppe der Mittelwert berechnet und jeweils die Standardabweichung und der Standardfehler angegeben. Um die Gruppen untereinander zu vergleichen wurde ein T-Test durchgeführt. Zur Bestimmung der Unterschiede im zeitlichen Verlauf erfolgte ein Two-way ANOVA. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ betrachtet.

In die Auswertung nach Myokardinfarkt wurden nur Tiere mit einer Infarktgröße über 30% einbezogen. Ebenso galten Herzfrequenzen kleiner 450bpm (Schläge/Minute) während der Echokardiographie als Ausschlusskriterium.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden C1qKO-Tiere und Wildtypiere (WT) nach einem operativ herbeigeführten Myokardinfarkt verglichen. 8 Wochen nach Myokardinfarkt wurden 27 C1qKO-Tiere und 26 WT-Tiere in die Analyse eingeschlossen. Zusätzlich wurde 3 Tage nach Myokardinfarkt das Gewebe von 5 C1qKO-Tieren und 5 WT-Tieren untersucht. Für die basale echokardiographische und hämodynamische Charakterisierung wurden 12 C1qKO-Tiere und 13 WT-Tiere miteinander verglichen.

3.1 Mortalität

Von den 27 operierten C1qKO-Tieren und den 26 WT-Tieren verstarben 3 Tiere aus der C1qKO-Gruppe und 6 Tiere aus der WT-Gruppe während oder kurz nach der Operation. 2 WT-Tiere und 3 C1qKO-Tiere waren Sham operiert bzw. hatten eine Infarktgröße kleiner 30% und wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen. Insgesamt wurden 18 C1qKO-Tiere und 19 WT-Tiere in die Auswertung einbezogen.

Im Verlauf der Studie ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen der WT-Gruppe und der C1qKO-Gruppe feststellen (vgl. Abbildung 13).

Überleben C1qKO vs. WT (n=18 vs. 19; p=ns)

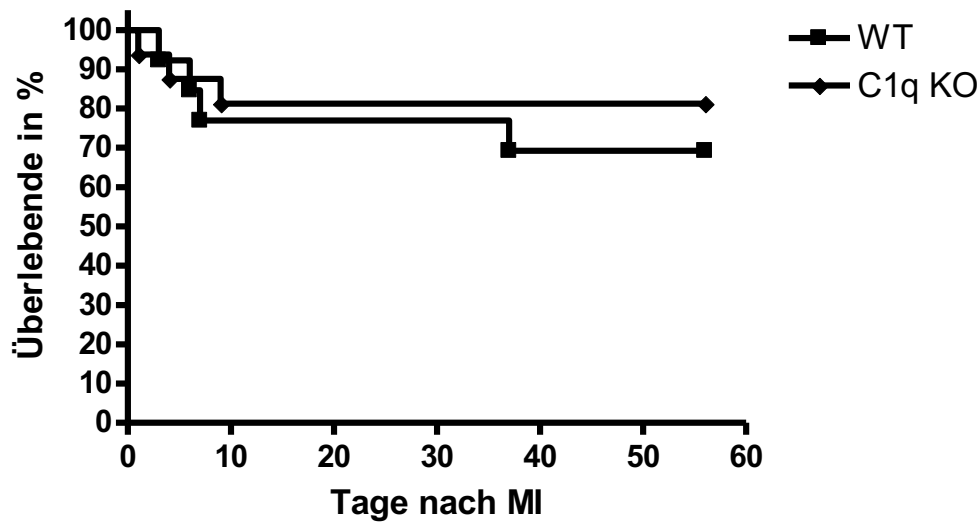


Abbildung 13: Überlebenszeiten

Vergleich der Mortalität von C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe nach Myokardinfarkt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

3.2 Organgewichte

3.2.1 Organgewichte vor Myokardinfarkt

In der basalen Charakterisierung zeigten die C1qKO-Tiere signifikant geringere Unterschiede beim LV-Gewicht zu Körpergewicht-Verhältnis im Vergleich zur WT-Gruppe. Es fanden sich allerdings keine signifikanten Unterschiede beim Gewicht des linken Ventrikels sowie dem Tiergewicht zwischen den beiden Gruppen. Auch bei dem rechten Ventrikel (RV) Gewicht zu Körpergewicht-Verhältnis und das RV-Gewicht zeigten sich keine Unterschiede zwischen der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe (vgl. Tabelle 1).

Organ	C1qKO	WT	p-Wert
Tiergewicht (g)	23,26 ± 1,65	23,60 ± 1,99	>0,05; ns
Linker Ventrikel (mg)	88,77 ± 5,95	91,71 ± 7,47	>0,05; ns

LV/Tiergewicht	3,65 ± 0,20	3,89 ± 0,17	P=0,03
Rechter Ventrikel (mg)	21,06 ± 3,45	22,17 ± 2,46	>0,05; ns
RV/Tiergewicht	0,90 ± 0,11	0,95 ± 0,14	>0,05; ns
Lunge (mg)	165,70 ± 11,24	159,50 ± 16,59	>0,05; ns
Lunge/Tiergewicht	7,16 ± 0,69	6,78 ± 0,75	>0,05; ns

Tabelle 1: Organgewichte vor Myokardinfarkt

Das Verhältnis linker Ventrikel/Tiergewicht zeigte sich in der C1qKO-Gruppe signifikant geringer im Vergleich zur Wildtypgruppe. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Tiergewichten sowie in den Organgewichten. C1qKO vs. WT jeweils n=7.

3.2.2 Organgewichte nach Myokardinfarkt

56 Tage nach Myokardinfarkt wurde das Organgewicht sowie das Verhältnis Organ-Gewicht zu Tiergewicht zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 2).

Organ	C1qKO	WT	p-Wert
Tiergewicht (g)	28,92 ± 1,92	28,42 ± 2,18	>0,05; ns
Linker Ventrikel (mg)	139,0 ± 19,01	134,7 ± 19,89	>0,05; ns
LV/Tiergewicht	4,756 ± 0,5391	4,872 ± 0,7088	>0,05; ns
Rechter Ventrikel (mg)	32,85 ± 9,117	31,86 ± 8,284	>0,05; ns
RV/Tiergewicht	1,121 ± 0,2830	1,148 ± 0,270	>0,05; ns
Lunge (mg)	229,7 ± 85,64	210,2 ± 39,31	>0,05; ns
Lunge/Tiergewicht	7,808 ± 2,611	7,617 ± 1,542	>0,05; ns

Tabelle 2: Organgewichte 8 Wochen nach Myokardinfarkt

8 Wochen nach Myokardinfarkt zeigten sich keine Unterschiede in den Tier- und Organgewichten. C1qKO vs. WT: n=11 vs. n=9

3.3 Infarktgrößen

Die Infarktgröße wurde in einem Querschnitt durch den linken Ventrikel 56 Tage nach Myokardinfarkt bestimmt. Hierbei ergab sich kein signifikanter Infarktgrößenunterschied zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe (vgl. Abbildung 14).

Infarktgröße C1qKO vs. WT (n=11vs. n=8; p=ns)

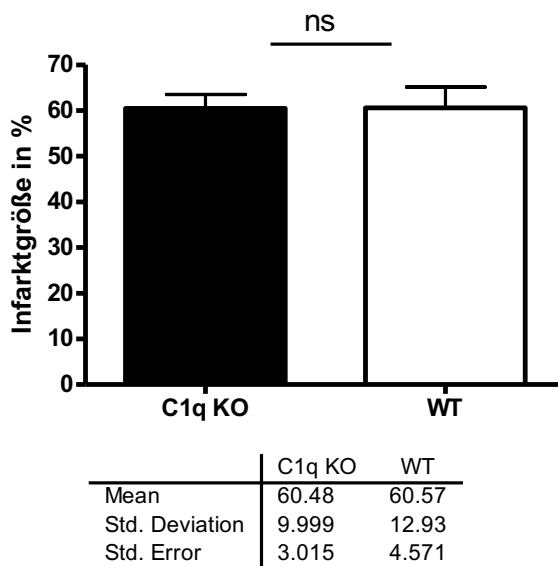


Abbildung 14: Infarktgrößen

Prozentualer Infarktanteil des linken Ventrikels C1qKO vs. WT: $60,48 \pm 9,999$ vs. $60,57 \pm 12,93$ (n=11 vs. n=8; p=ns (nicht signifikant))

3.4 Echokardiographie

3.4.1 Echokardiographische Untersuchung vor Myokardinfarkt

In der Basischarakterisierung, das heißt vor Myokardinfarkt, wiesen die C1qKO-Tiere signifikant niedrigere apikale endsystolische Ventrikeldurchmesser auf. Die papillären endsystolischen Ventrikeldurchmesser zeigten sich jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Auch bei den übrigen echokardiographischen Parametern zeigte sich

kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Allerdings zeigten sich Tendenzen zu schnelleren Herzfrequenzen in der C1qKO-Gruppe (vgl. Tabelle 3).

	C1qKO	WT	p-Wert
AP HR	571,40 ± 44,67	542,30 ± 32,50	=0,05; ns
PA HR	542,20 ± 40,43	545 ± 23,47	>0,05; ns
AP ESD	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,04	=0,05; ns
PA ESD	0,20 ± 0,02	0,23 ± 0,05	>0,05; ns
AP EDD	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,03	>0,05; ns
PA EDD	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,04	>0,05; ns
AP ESA	3,38 ± 1,50	3,61 ± 1,05	>0,05; ns
PA ESA	3,36 ± 1,85	3,99 ± 0,98	>0,05; ns
AP EDA	6,49 ± 1,55	7,70 ± 1,75	>0,05; ns
PA EDA	6,78 ± 1,94	8,25 ± 2,00	>0,05; ns
AP 2D FS	56,09 ± 10,52	52,90 ± 9,03	>0,05; ns
PA 2D FS	59,33 ± 13,38	50,50 ± 10,14	>0,05; ns

Tabelle 3: Echokardiographische Parameter vor Myokardinfarkt

Vor Myokardinfarkt zeigten sich keine Unterschiede in den echokardiographischen Parametern zwischen C1qKO- und WT-Gruppe. C1qKO vs. WT: n=12 vs. n=13

3.4.2 Echokardiographische Untersuchung nach Myokardinfarkt

1, 7 und 56 Tage nach Myokardinfarkt wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. 56 Tage nach Myokardinfarkt zeigten sich in der C1qKO-Gruppe signifikant höhere Herzfrequenzen im Vergleich zur WT-Gruppe. Für die übrigen echokardiographischen Parameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden (vgl. Abbildung 15).

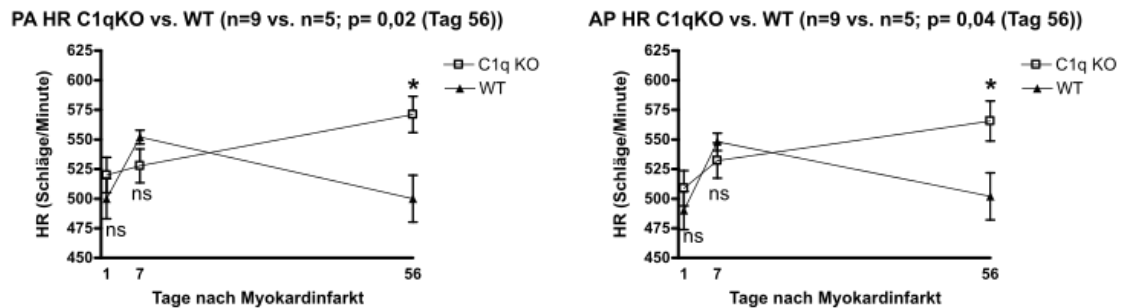


Abbildung 15: Herzfrequenzen 56 Tage nach Myokardinfarkt

In der echokardiographischen Untersuchung 56 Tage nach Myokardinfarkt zeigten sich in der C1qKO-Gruppe signifikant höhere Herzfrequenzen im Vergleich zur WT-Gruppe. C1qKO vs. WT (Herzfrequenz in Schläge/Minute 56 Tage nach MI: $571,1 \pm 45,95$ vs. $500,0 \pm 44,16$ (n=9 vs. n=5; p=0,02))

3.5 Hämodynamik

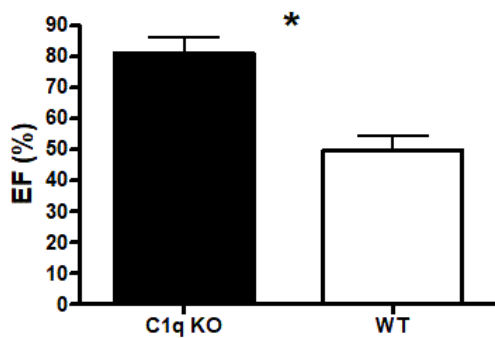
3.5.1 Hämodynamische Untersuchung vor Myokardinfarkt

In der basalen Charakterisierung wiesen die C1qKO-Tiere signifikant bessere hämodynamische Werte im Vergleich zur WT-Gruppe auf. So zeigte sich in der Basischarakterisierung eine signifikant höhere Ejektionsfraktion (C1qKO vs. WT (%): $80,87 \pm 12,97$ vs. $49,55 \pm 12,32$), ein signifikant niedrigerer endsystolischer Druck (C1qKO vs. WT (mmHg): $90,04 \pm 12,90$ vs. $105,30 \pm 8,44$) sowie signifikant niedrigere endsystolische (C1qKO vs. WT (μ l): $8,95 \pm 7,078$ vs. $26,48 \pm 9,01$) und enddiastolische (C1qKO vs. WT (μ l): $29,68 \pm 11,91$ vs. $45,04 \pm 10,13$) Volumina. Die Kontraktilitätsparameter VdP/dt min (C1qKO vs. WT: $9,81 \pm 7,79$ vs. $26,91 \pm 9,15$) und VdP/dt max (C1qKO vs. WT: $31,43 \pm 11,98$ vs. $45,73 \pm 9,59$) zeigten sich in der C1qKO-Gruppe signifikant geringer als in der WT-Gruppe. Auch die minimale Flussgeschwindigkeit zeigte sich in der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant geringer (C1qKO vs. WT (μ l): $8,43 \pm 7,14$ vs. $25,57 \pm 8,88$). Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede in den Herzfrequenzen (C1qKO vs. WT: $566,50 \pm 29,87$ vs. $587,20 \pm 43,71$) (vgl. Tabelle 4 und Abbildung 16).

	C1qKO	WT	p-Wert
EF (%)	80,87 ± 12,97	49,55 ± 12,32	< 0,05
Ved (µl)	29,68 ± 11,91	45,04 ± 10,13	< 0,05
Ves (µl)	8,95 ± 7,078	26,48 ± 9,01	< 0,05
Vmin (µl)	8,43 ± 7,14	25,57 ± 8,88	< 0,05
Pes (mmHg)	90,04 ± 12,90	105,30 ± 8,44	< 0,05
VdP/dt max (µl)	31,43 ± 11,98	45,73 ± 9,59	< 0,05
VdP/dt min (µl)	9,81 ± 7,79	26,91 ± 9,15	< 0,05
HR/ min (Bpm)	566,50 ± 29,87	587,20 ± 43,71	< 0,05

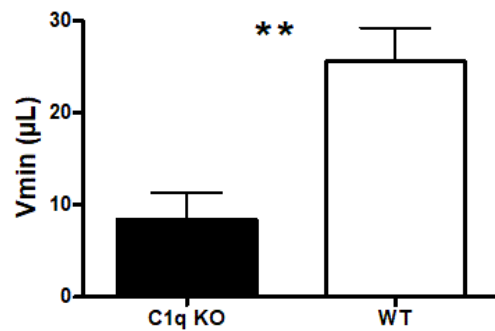
Tabelle 4: Hämodynamische Parameter basal (vor Myokardinfarkt)

Hämo EF (%) C1qKO vs. WT
(jeweils n=6; p=0,02)



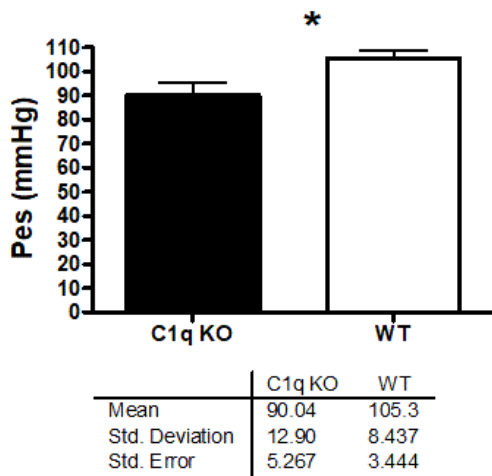
	C1q KO	WT
Mean	80.87	49.55
Std. Deviation	12.97	12.32
Std. Error	5.294	5.029

Hämo Vmin (µL) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,004)

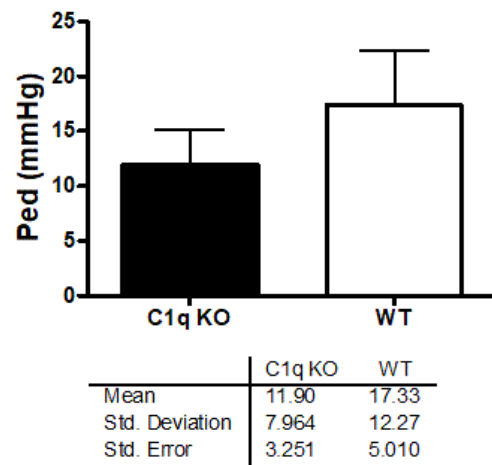


	C1q KO	WT
Mean	8.429	25.57
Std. Deviation	7.144	8.878
Std. Error	2.917	3.625

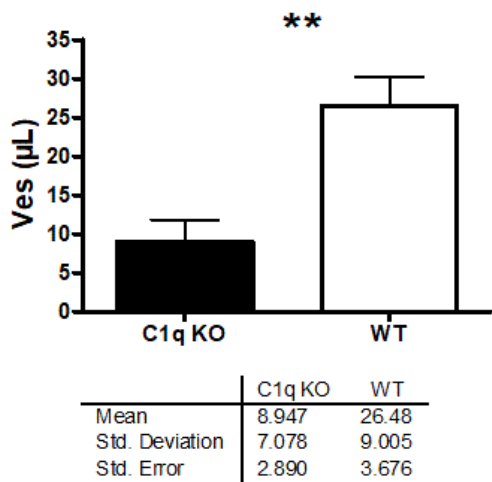
Hämo Pes (mmHg) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,04)



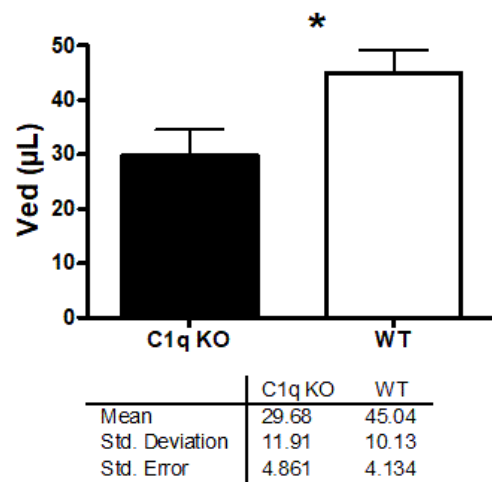
Hämo Ped (mmHg) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=ns)



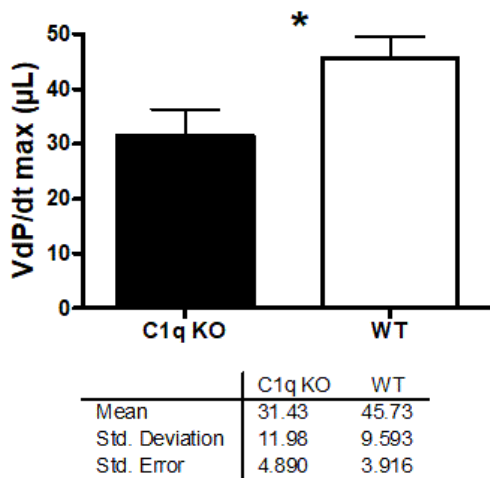
Hämo Ves (µL) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,004)



Hämo Ved (µL) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,04)



Hämo VdP/dt max (µL) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,05)



Hämo VdP/dt min (µL) C1q KO vs WT
(jeweils n=6; p=0,006)

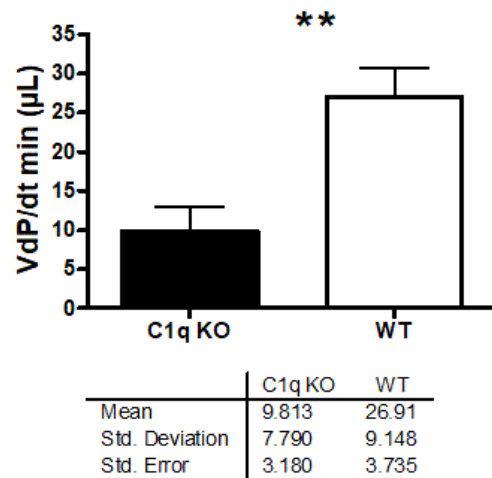


Abbildung 16: Hämodynamische Messungen vor Myokardinfarkt

In der C1qKO-Gruppe zeigte sich eine signifikant höhere Ejektionsfraktion, ein signifikant niedrigerer endsystolischer Druck, sowie signifikant niedrigere endsystolische und enddiastolische Volumina. Die Kontraktilitätsparameter VdP/dt max und VdP/dt min zeigten sich in der C1qKO-Gruppe signifikant geringer als in der WT-Gruppe. Die minimale Flussgeschwindigkeit war in der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe signifikant geringer. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Herzfrequenzen.

3.5.2 Hämodynamische Untersuchung nach Myokardinfarkt

8 Wochen nach Myokardinfarkt ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei den hämodynamischen Parametern ermitteln.

	C1qKO	WT	p-Wert
EF (%)	22,44 ± 8,17	22,90 ± 9,72	=0,05; ns
Ved (µl)	94,85 ± 24,44	87,61 ± 49,29	>0,05; ns
Ves (µl)	78,30 ± 24,10	72,09 ± 40,41	=0,05; ns
Pes (mmHg)	86,30 ± 11,58	85,79 ± 11,94	>0,05; ns
Ped (mmHg)	15,75 ± 6,03	17,72 ± 6,91	>0,05; ns
VdP/dt (µl)	93,00 ± 25,09	85,20 ± 47,19	>0,05; ns

VdP/dt min (µl)	79,58 ± 23,41	74,51 ± 43,57	>0,05; ns
-----------------	---------------	---------------	-----------

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter nach Myokardinfarkt

8 Wochen nach Myokardinfarkt zeigten sich keine Unterschiede in den hämodynamischen Parametern. C1qKO vs. WT: n=10 vs. n=5.

3.6 Neutrophileninfiltration

3 Tage nach Myokardinfarkt wurde die Anzahl der eingewanderten neutrophilen Granulozyten in der C1qKO-Gruppe und der WT-Gruppe verglichen. Hierfür wurde jedem Präparat am Mikroskop ein Zahlenwert von 0 bis 4 zugeordnet (0= keine Neutrophileninfiltration, 4= maximale Neutrophileninfiltration). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Neutrophileninfiltration des Gewebes zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe feststellen (vgl. Abbildung 17).

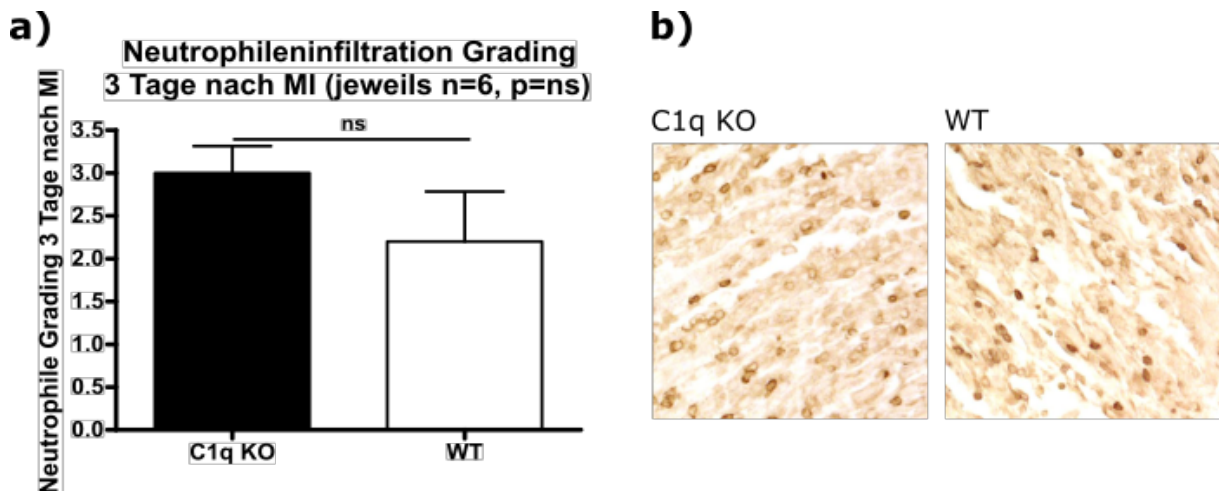


Abbildung 17: Neutrophileninfiltration

a) statistische Darstellung der Neutrophileninfiltration 3 Tage nach Myokardinfarkt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe. Hierfür wurde jedem Schnitt ein Gradingfaktor von 0= keine neutrophilen Granulozyten bis 4= sehr hohe Anzahl neutrophiler Granulozyten zugeordnet. C1qKO vs. WT: 3,0 ± 0,7 vs. 2,2 ± 1,3 (n=5 jeweils; p=ns) b) Lichtmikroskopische Aufnahme zweier Gewebeschnitte nach immunhistochemischer Färbung der neutrophilen Granulozyten. 3 Tage nach Myokardinfarkt ließen sich keine Unterschiede der Neutrophileninfiltration zwischen den beiden Gruppen ermitteln

3.7 Makrophageninfiltration

Drei Tage nach Myokardinfarkt wurde die Makrophageninfiltration (Infarkt/Borderzone) der C1qKO-Gruppe mit der WT-Gruppe verglichen. Hierzu wurde eine semiquantitative Auswertung durchgeführt, bei der jedem Präparat ein Zahlenwert von 1 bis 4 zugeordnet wurde (0= keine CD 68 positiven Zellen, 4= maximale Zahl CD 68 positiver Zellen). Anschließend wurde für jede Gruppe der Mittelwert gebildet und diese miteinander verglichen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl CD 68 positiver Zellen zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe (vgl. Abbildungen 18 und 19).

Makrophagengrading Immunfluoreszenz C1qKO vs. WT (jeweils n=5; p=ns)

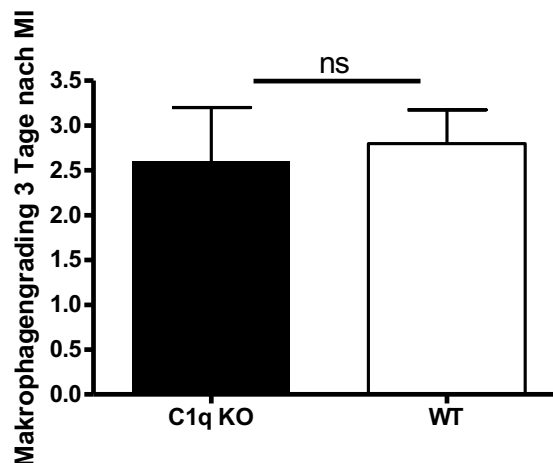


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Makrophageninfiltration

Makrophagengrading 3 Tage nach Myokardinfarkt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Makrophagenanzahl pro Gesichtsfeld. C1qKO vs. WT $2,6 \pm 1,34$ vs. $2,8 \pm 0,84$ ($n=5$ jeweils; $p=ns$)

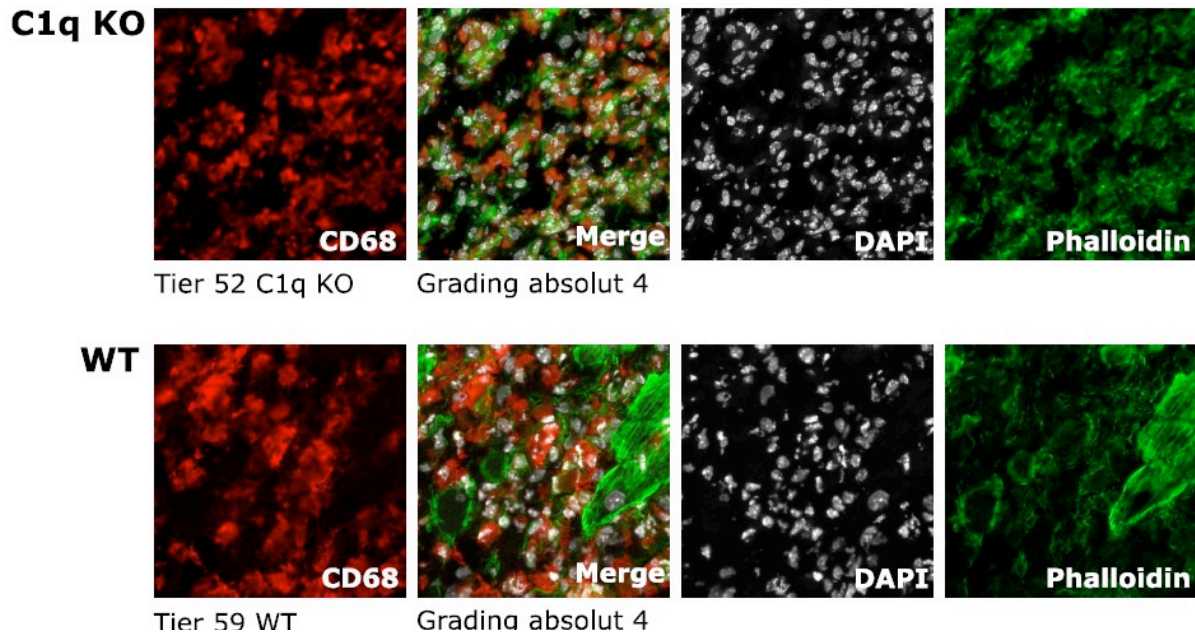


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Makrophageninfiltration

3 Tage nach Myokardinfarkt ließ sich kein Unterschied in Bezug auf die Makrophagenanzahl zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe feststellen.

3.8 Apoptoserate

Drei Tage nach Myokardinfarkt wurde die Apoptoserate in der C1qKO-Gruppe mit der WT-Gruppe verglichen. Hierzu wurden in fünf Gesichtsfeldern pro Präparat die Zellen ausgezählt, die sowohl im Rot- als auch im Grünkanal fluoreszierten (doppelpositive Zellen). Anschließend wurde für beide Gruppen die mittlere Anzahl doppelpositiver Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt und die Werte verglichen. Die C1qKO-Gruppe wies hierbei eine signifikant geringere Zahl doppelpositiver, also apoptotischer Zellen, pro Gesichtsfeld auf als die WT-Gruppe (vgl. Abbildungen 20 und 21).

Apoptose C1qKO vs. WT 3Tage MI (n=4 vs. n=5; p=0,04)

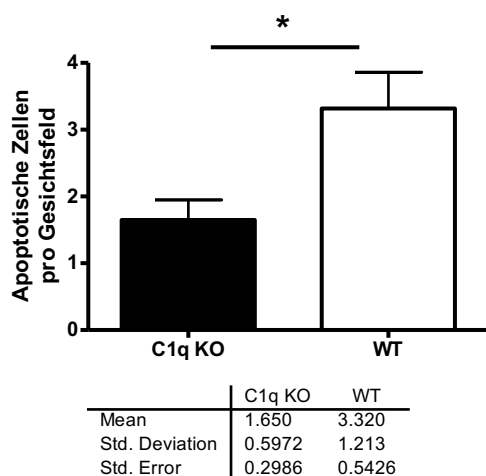


Abbildung 20: Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld

Graphische Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld. 3 Tage nach Myokardinfarkt zeigte sich in der C1qKO-Gruppe eine signifikant geringere Zahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld im Vergleich zur WT-Gruppe. C1qKO vs. WT: $1,65 \pm 0,597$ vs. $3,32 \pm 1,213$ (n=4 vs. n=5; $p < 0,05$)

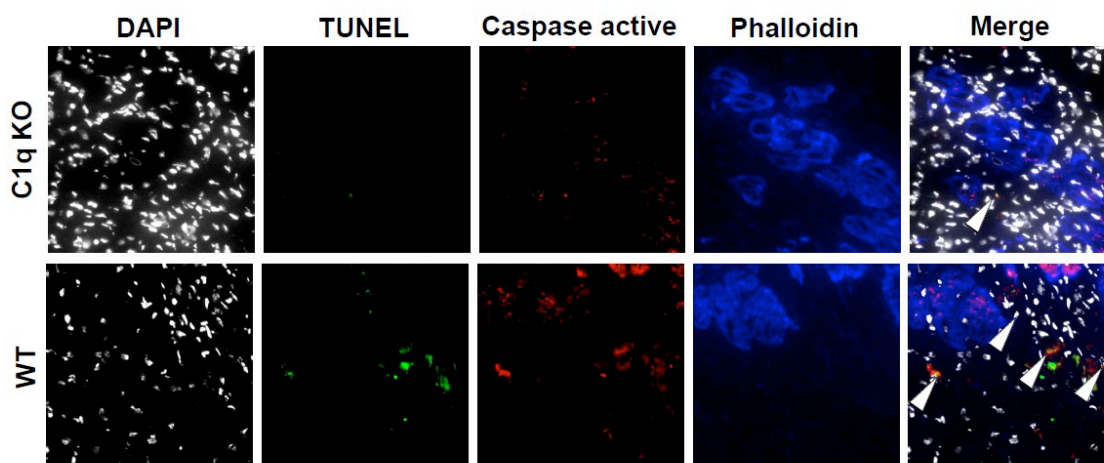


Abbildung 21: TUNEL-Assay und Caspase-Activity-Assay

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach TUNEL-Assay und Caspase-Activity-Assay. In den Schnitten der C1qKO-Tiere zeigten sich signifikant weniger TUNEL/active-Caspase positive Zellen als in der WT-Gruppe.

3.9 Nachweis von Komplementfaktor C3

Der Nachweis von Komplementfaktor C3 erfolgte in Kryoschnitten des linken Ventrikels 1 Tag, 3 Tage und 7 Tage nach Myokardinfarkt mittels Immunfluoreszenz. Zur Kontrolle diente das Präparat eines nicht infarzierten Tieres.

In bisherigen Protokollen zum C3 Nachweis wurde ein gegen lösliches C3 gerichteter Primärantikörper verwendet. Als Blocking-Lösung diente Serum [60]. Hier ließ sich fluoreszenzmikroskopisch auch im nicht infarzierten Herz (C1qS0) ein deutlich positives Signal erkennen (vgl. Abbildung 22).

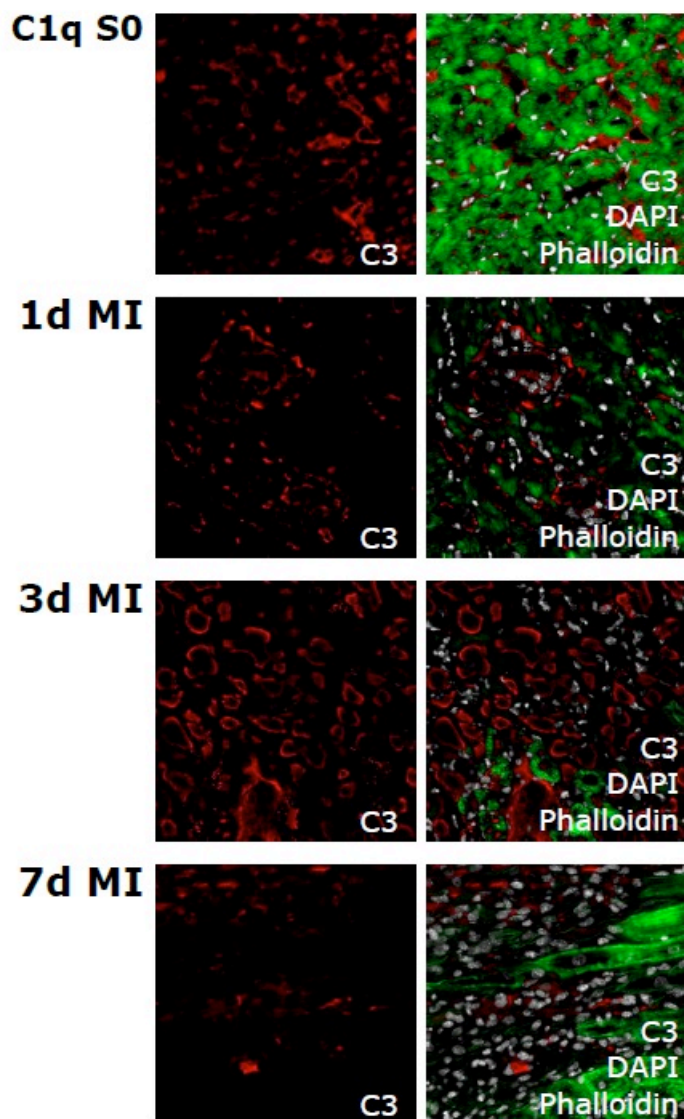


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach C3-Färbung.

Komplementfaktor C3: rot; Phalloidin 488: grün; DAPI: weiß.

Vor Myokardinfarkt sowie einen, drei und sieben Tage nach Myokardinfarkt ließ sich ein positives Signal nachweisen (Schnitte des linken Ventrikels von C1qKO-Tieren).

In einem Westernblot mit verschiedenen Blocking-Sera ließ sich in allen in den bisherigen Protokollen verwendeten Proben gelöstes Komplement C3 nachweisen (vgl. Abbildung 23). Im Folgenden wurde daraufhin ein Glycinblock anstelle des Serumblocks verwendet.

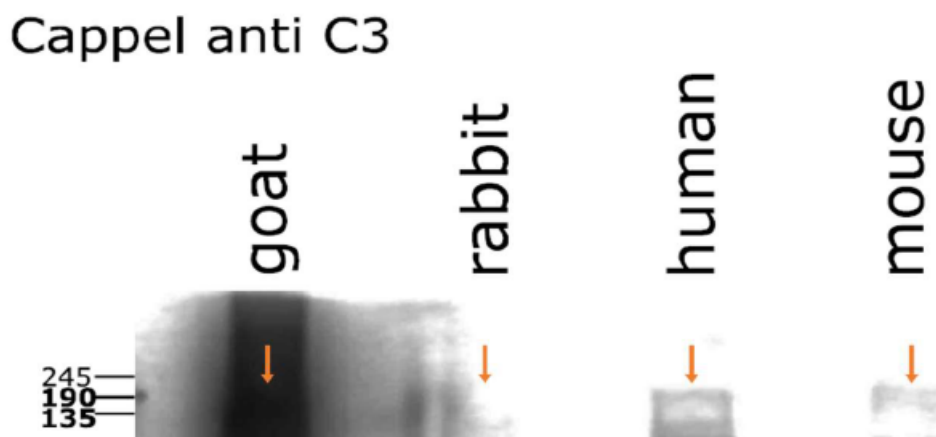


Abbildung 23: Westernblot mit Serumproben und einem gegen C3 gerichteten Antikörper

Ausschnitt einer Westernblot-Membran mit Serumproben verschiedener Spezies und einem gegen C3 gerichteten Antikörper. In allen vier Serumproben lässt sich C3 nachweisen. Serumproben: Ziegen Serum (goat), Kaninchenserum (rabbit), menschliches Serum (human), Mausserum (mouse)

In einem weiteren Westernblot wurde der Primärantikörper (Cappel Goat F (AB⁺) 2 Fragment to mouse complement C3) im Serum verschiedener Tiere getestet. Hierbei sollte ermittelt werden, inwieweit der angewandte Antikörper spezifisch für Komplementfaktor C3 ist. Unter anderem wurde das Serum von C3KO-Tieren untersucht, welche nachweislich kein C3 produzieren können. Es ließ sich kein C3 im Serum der C3KO-Mäuse nachweisen. Im Serum der RAG-KO-Tiere, WT-Tiere und MBL-KO-Tiere ließ sich C3 hingegen nachweisen (vgl. Abbildung 24).

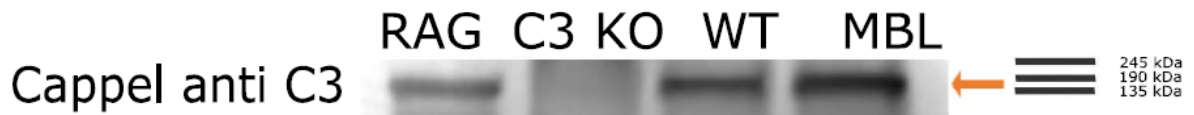


Abbildung 24: C3-Detektion im Westernblot mit Serumproben verschiedener Tiere

Ausschnitt einer Westernblot-Membran mit Serumproben verschiedener Tiere. Im Serum von RAG-KO-Tieren, MBL-KO-Tieren und WT-Tieren lässt sich C3 nachweisen. Im Serum der C3KO-Tiere lässt sich, wie erwartet, kein C3 nachweisen.

Das bisherige Versuchsprotokoll wurde durch das Waschen des Präparates vor dem Versuch weiter optimiert. Hierdurch sollte lösliches Komplement, welches sich möglicherweise noch im Präparat befindet eliminiert werden. Das Präparat wurde vor dem Blocken 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Statt eines Serumblockes wurde ein Glycinblock verwendet. Daraufhin ließ sich deutlich weniger Signal detektieren. Nichtsdestotrotz ließ sich auch unter Verwendung des Glycinblocks ein positives Signal beobachten. Das Signal war vor allem um Kapillaren und im Infarktbereich lokalisiert.

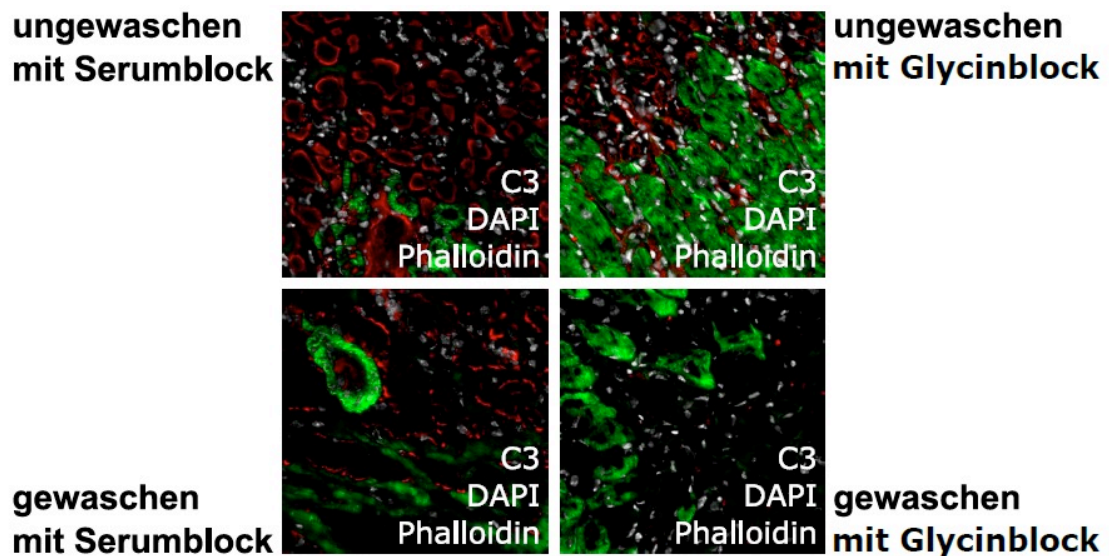


Abbildung 25: Nachweis von C3 im linken Ventrikel

Nachweis von C3 im linken Ventrikel (Fluoreszenzmikroskopische Darstellung). Komplementfaktor C3: rot; Phalloidin 488: grün; DAPI: weiß.

Werden die Schnitte vor dem Versuch in PBS gewaschen und anstelle eines Serumblockes ein Glycinblock verwendet, zeigt sich eine deutliche Signalreduktion. (3 Tage nach Myokardinfarkt, Schnitte des linken Ventrikels von C1qKO-Tieren)

Daraufhin wurde ein Primärantikörper verwendet, der sich gegen Komplementspaltprodukte richtet (Mouse C3b/iC3b/C3c monoclonal antibody).

Im Westernblot wurde der Antikörper zunächst im Serum verschiedener Spezies getestet, die alle wie oben gezeigt inaktives Komplement enthalten. In keiner der Proben ließ sich eine Proteinbande an der für C3 typischen Stelle nachweisen (vgl. Abbildung 26).

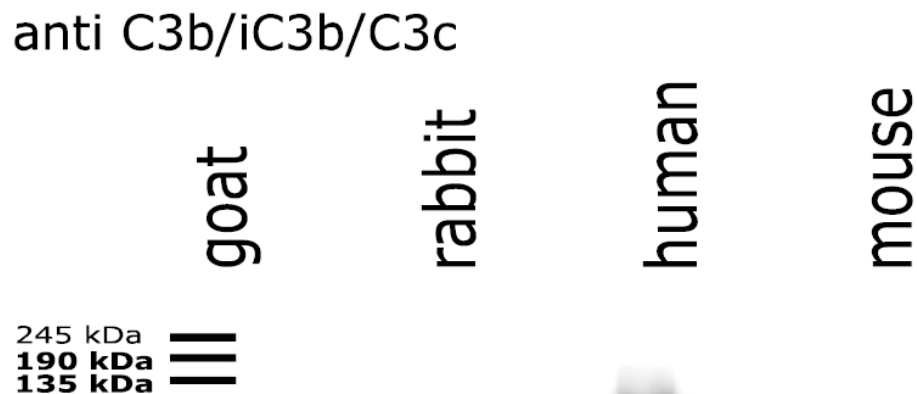


Abbildung 26: Detektion von zellgebundenem und inaktivem C3 im Westernblot

Westernblot auf zellgebundenes und inaktives C3 in verschiedenen Serumproben. Ungespaltenes murines C3 hat ein Molekulargewicht von ca. 166kDa. Für keine der hier verwendeten Serumproben zeigt sich an dieser Stelle im Westernblot eine Bande. Dies spricht dafür, dass sich der hier verwendete Antikörper tatsächlich nur gegen Komplementspaltprodukte richtet.

In der Immunfluoreszenz wurde der Antikörper zunächst auf Schnitten von C3KO-Tieren getestet, die nachgewiesenermaßen kein C3 enthalten [62]. Hier ließ sich im Fluoreszenzmikroskop ein positives Signal im Rotkanal detektieren. Da es sich bei dem verwendeten Primärantikörper um einen aus der Maus isolierten Antikörper handelt, musste zusätzlich noch die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mittels MOM-Block erfolgen (M.O.M.TM Kit, FLUORESCHEIN FMK-2201, Vector Laboratories). Ein probeweise durchgeführter Versuch in Abwesenheit des MOM-Blocks brachte eine deutliche Signalverstärkung. Bei Durchführung des Versuchs in Schnitten eines nicht

infarzierten Rattenherzens ohne MOM-Block zeigte sich hingegen kein Signal (vgl. Abbildung 27). Dies deutet darauf hin, dass auch im M.O.M.TM Kit Serum enthalten ist und darin gelöstes Komplement durch den Antikörper detektiert wird. Die genaue Zusammensetzung des M.O.M.TM Kits ist allerdings Herstellergeheimnis.

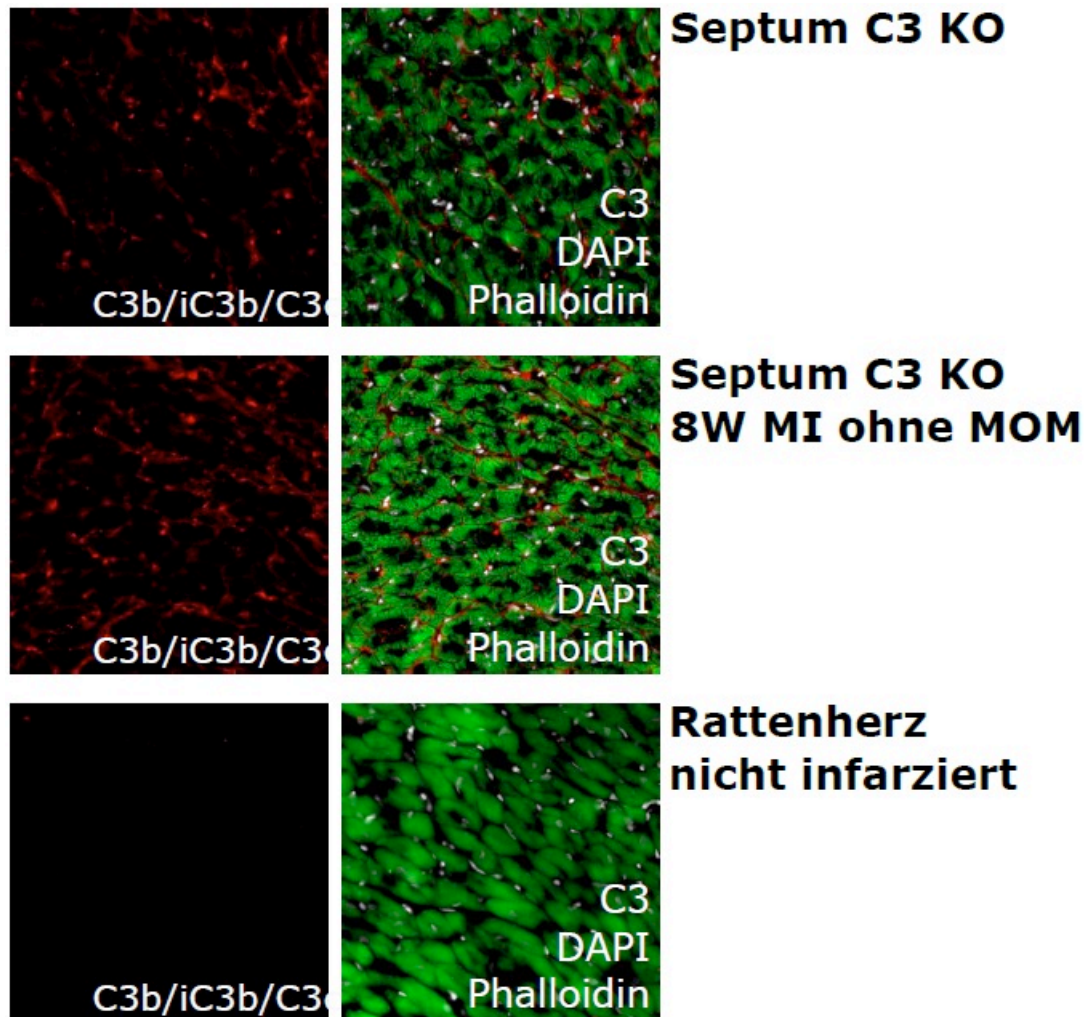


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von zellgebundenem und inaktivem C3

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Schnitten des linken Ventrikels mit gegen C3-Spaltprodukte gerichteten Antikörper. Schnitte des linken Ventrikels einer C3KO-Maus sowie eines nicht infarzierten Rattenherzens.

Komplementfaktor C3: rot; Phalloidin 488: grün; DAPI: weiß.

Zum Blocken der C3KO-Schnitte wurde ein M.O.M-Block verwendet. In den Schnitten der C3KO-Tiere zeigt sich ein positives Signal. Im nicht infarzierten Rattenherz ließ sich hingegen kein Signal detektieren.

3.10 Kollagengehalt

56 Tage nach Myokardinfarkt wurde in Kryoschnitten mittels PSR-Fluoreszenz der prozentuale Kollagengehalt im Septum und in der Infarktnarbe bestimmt. Hierbei ließ sich weder im Septum, noch in der Narbe ein signifikanter Unterschied im Kollagengehalt zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe feststellen (vgl. Abbildung 28).

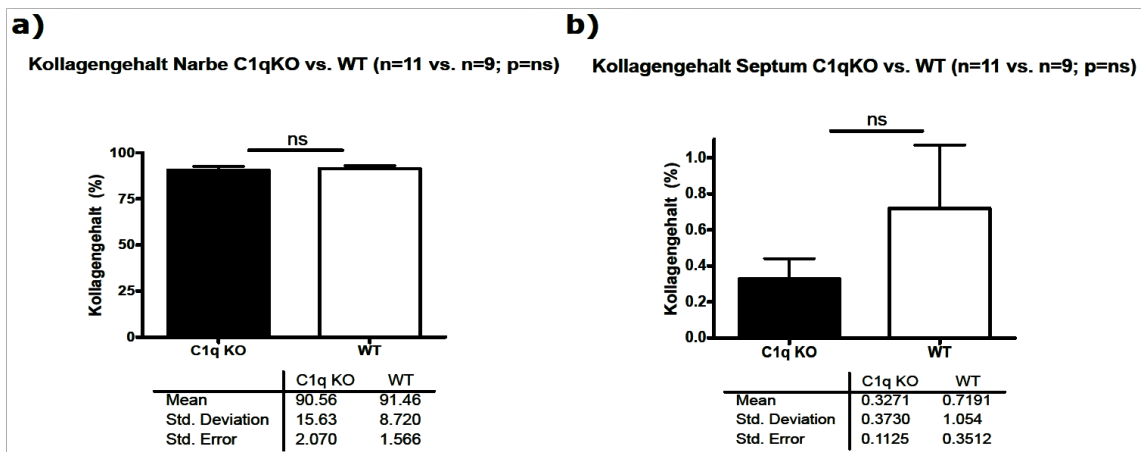


Abbildung 28: Kollagengehalt

Kollagengehalt des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt graphisch dargestellt. In PSR gefärbten Schnitten wurde anhand von fluoreszenzmikroskopischen Bildern der prozentuale Kollagenanteil errechnet. 56 Tage nach Myokardinfarkt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe feststellen a) Prozentualer Kollagenanteil der Narbe C1qKO vs. WT: $90,56 \pm 15,63$ vs. $91,46 \pm 8,720$ (n=11 vs. n=9; p=ns) b) Prozentualer Kollagengehalt des Septums C1qKO vs. WT: $0,33 \pm 0,37$ vs. $0,72 \pm 1,05$ (n=11 vs. n=9; p=ns)

4. Diskussion

4.1 Rolle des klassischen Komplementaktivierungswegs beim chronischen Myokardinfarkt

In der vorliegenden Arbeit wurden C1qKO-Mäuse mit WT-Mäusen nach einem operativ herbeigeführten Myokardinfarkt verglichen. Bei den C1qKO-Tieren war der klassische Komplementaktivierungsweg, durch Fehlen des Aktivatorproteins C1q, komplett ausgeschaltet. Hierdurch sollte ermittelt werden, welche Rolle der klassische Komplementaktivierungsweg beim Remodelling nach Myokardinfarkt besitzt. Außerdem wurde untersucht, wie groß der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges im Vergleich zu den anderen beiden Komplementaktivierungswegen ist (Lektin-Aktivierungsweg und alternativer Aktivierungsweg).

Die Mortalität der C1qKO-Tiere war im Vergleich zu den WT-Tieren nicht signifikant verändert. Ebenso wiesen die C1qKO-Tiere 56 Tage nach Myokardinfarkt keine signifikant veränderten hämodynamischen Parameter auf. Echokardiographisch zeigten sich 8 Wochen nach Myokardinfarkt signifikant höhere Herzfrequenzen in der C1qKO Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Die übrigen echokardiographischen Parameter ergaben keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Bei den Organgewichten ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe ermitteln.

In der basalen Charakterisierung zeigten sich in der C1qKO-Gruppe signifikant geringere Verhältnisse des linken Ventrikels/Körpergewicht im Vergleich zur WT-Gruppe. Da sich allerdings keine Unterschiede in den Tiergewichten oder im Gewicht der linken Ventrikel zeigten, ist an dieser Stelle von einem neutralen Effekt des Knockouts auszugehen. Allerdings wiesen die C1qKO-Tiere in der basalen Charakterisierung (vor Infarktinduktion) signifikant bessere hämodynamische Parameter auf. Das Fehlen von C1q hat offenbar bereits vor Induktion eines Myokardinfarktes einen Einfluss auf die Herzleistung. Unter diesem Gesichtspunkt sind daher auch die ermittelten echokardiographischen und hämodynamischen Parameter 8 Wochen nach Myokardinfarkt zu betrachten.

4.2 Inflammatorische Phase

4.2.1 Neutrophile Granulozyten

Bei chronischem Myokardinfarkt konnte eine verminderte Infiltration durch neutrophile Granulozyten in Zusammenhang mit einer besseren linksventrikulären Funktion gebracht werden. In einer Studie an C3KO-Tieren zeigte sich drei Tage nach Myokardinfarkt eine signifikant geringere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur WT-Gruppe [59].

Die für die Neutrophilenmigration verantwortlichen Anaphylatoxine C3a und C5a werden vor allem in der frühen inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt produziert. Diese bewirken zusammen mit bestimmten Interleukinen (z.B. IL-8) eine starke Einwanderung von Entzündungszellen in das geschädigte Myokard. Durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und proteolytischer Enzyme können neutrophile Granulozyten die Gewebeschädigung nach Myokardinfarkt weiter vorantreiben. Mittels Antineutrophilen-Antikörpern, Antimetaboliten oder Neutrophilenfiltern konnte in verschiedenen Tiermodellen die Neutrophileninfiltration im Myokardinfarkt reduziert werden. Hier zeigte sich, dass eine geringere Neutrophileninfiltration mit einem geringeren Reperfusionsschaden einhergeht [73–75].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges auf die Neutrophilenmigration im chronischen Myokardinfarkt untersucht. Drei Tage nach Myokardinfarkt ließ sich immunhistochemisch kein signifikanter Unterschied bei der Neutrophileninfiltration zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe nachweisen. Es scheint also weiterhin eine ausreichende Produktion der für die Neutrophileninfiltration verantwortlichen Anaphylatoxine C3a und C5a zu erfolgen. Dies könnte zum einen durch Komplementaktivierung über die beiden anderen Komplementaktivierungswege erfolgen, zum anderen könnte eine Komplementaktivierung über unspezifische Proteasen an dieser Stelle eine Rolle spielen. Der Einfluss einer C3-Defizienz auf die Neutrophileninfiltration nach Myokardinfarkt lässt sich also in den C1qKO-Tieren nicht reproduzieren.

4.2.2 Makrophagen

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Heilung nach Myokardinfarkt. C1q scheint einen inhibitorischen Einfluss auf die Makrophagenaktivierung zu besitzen [76]. Demnach wäre bei den C1qKO-Tieren gegebenenfalls eine vermehrte Makrophageninfiltration im Myokard zu erwarten. Nichtsdestotrotz konnte in dieser Arbeit 3 Tage nach Myokardinfarkt kein signifikanter Unterschied in der Makrophageninfiltration zwischen der C1qKO-Gruppe und der WT-Gruppe festgestellt werden. Andererseits konnte in einer Studie von Pulanco et al. gezeigt werden, dass sich Komplementfaktor C1q positiv auf das Überleben von Makrophagen sowie deren Phagozytose von Cholesterol in artherosklerotischen Plaques auswirkt [77]. In den C1qKO Tieren fehlt also einerseits der positive Effekt von C1q auf das Überleben von Makrophagen, andererseits aber auch der inhibitorische Einfluss auf die Makrophageninfiltration, was eine mögliche Erklärung für den neutralen Effekt in der C1qKO-Gruppe sein könnte.

4.3 Apoptose

In vorherigen Studien wurde zur Detektion apoptotischer Zellen ausschließlich ein TUNEL-Assay verwendet [59]. Dieser ist jedoch nicht spezifisch für Apoptose [69]. Somit war fraglich, ob es sich bei den in diesen Studien detektierten Zellen um apoptotische Zellen handelte, oder ob auch nekrotische Zellen zu erkennen waren.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit an C1qKO-Tieren zur Detektion apoptotischer Zellen sowohl ein Caspase-Aktivitäts-Assay, als auch ein TUNEL-Assay durchgeführt. In die Auswertung einbezogen wurden an dieser Stelle nur die Zellen, die sowohl TUNEL, als auch Caspase-positiv waren. 3 Tage nach Myokardinfarkt zeigte sich bei der C1qKO-Gruppe eine deutlich niedrigere Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur WT-Gruppe.

Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Im Jahr 2004 konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Apoptosevorgänge auf pharmakologischem Weg oder durch genetische Modifikationen zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt führt [78, 79]. Eine erhöhte Apoptoserate konnte mit größeren Infarkten, ausgeprägtem

linksventrikulärem Remodelling und der Entwicklung symptomatischer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht werden [80]. Demnach müsste die niedrigere Anzahl apoptotischer Zellen der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur Wildtypgruppe mit einer besseren linksventrikulären Funktion korrelieren. Dies ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht zeigen.

Die Rolle von C1q bei der Beseitigung apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Hierbei konnte ein hereditärer C1q-Mangel als starker Risikofaktor für die Entwicklung eines systemischen Lupus erythematoses identifiziert werden [81]. Eine mögliche Erklärung für den engen Zusammenhang zwischen C1q-Mangel und der Entwicklung dieser Erkrankung stellen Autoimmunprozesse dar, die durch mangelnde Beseitigung nekrotischer und apoptotischer Zellen ausgelöst werden. C1q ist in der Lage, an der Oberfläche apoptotischer Zellen zu binden und so eine Komplementaktivierung zu bewirken. Die dadurch gebildeten Anaphylatoxine führen zu einer Attraktion phagozytisch aktiver Zellen, die die geschädigten Zellen beseitigen. Außerdem kann C1q direkt an korrespondierende Rezeptoren auf Phagozyten binden und so eine erhöhte Phagozytoseaktivität bewirken [82]. In der C1qKO-Gruppe fehlt der Einfluss von C1q auf die Beseitigung apoptotischer Zellen. Umso erstaunlicher ist es, dass die C1qKO-Gruppe nach Myokardinfarkt signifikant weniger apoptotische Zellen aufwies als die WT-Gruppe.

Allerdings wurde die Anzahl apoptotischer Zellen im Gewebe ausschließlich drei Tage nach Myokardinfarkt gemessen. Daher bleibt offen, welchen Einfluss das Fehlen von C1q zu einem späteren Zeitpunkt besitzt. Apoptose von Kardiomyozyten spielt auch in der subakuten Phase nach Myokardinfarkt eine Rolle und korreliert mit dem Ausmaß des linksventrikulären Remodellings. Im Myokard von Patienten, welche nach Infarkt eine Herzinsuffizienz entwickelten, ließ sich eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu nicht herzinsuffizienten Patienten nachweisen [79].

Beim systemischen Lupus erythematoses handelt es sich, wie auch bei der Herzinsuffizienz, um eine chronische Erkrankung [81]. Daher ist es möglich, dass ein Fehlen von C1q sich nicht nur unmittelbar nach Myokardinfarkt auf die Apoptose im Herzen auswirkt. Vielmehr könnte C1q auch im insuffizienten Herzen einen

entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsprogredienz besitzen. Über die genaue Rolle von C1q bei der Apoptose in der chronischen Herzinsuffizienz ist bisher allerdings wenig bekannt. Nicht zuletzt könnte C1q wichtige Funktionen bei der Entwicklung des Herzens haben. Hierauf deuten die deutlich besseren hämodynamischen Parameter der C1qKO-Tiere in der basalen Charakterisierung im Vergleich zu WT-Gruppe hin. Über die Rolle von C1q bei Apoptosevorgängen im nicht infarzierten Herzen ist bislang jedoch ebenfalls wenig bekannt.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die geringere Anzahl apoptotischer Zellen in der C1qKO-Gruppe wäre eine verminderte Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen bedingt durch Ausschalten des klassischen Komplementaktivierungswegs. Wie Park et al. 2009 im Tiermodell herausfanden, handelt es sich bei der Mehrzahl der apoptotischen Zellen nach Myokardinfarkt nicht um Kardiomyozyten, sondern um Entzündungszellen. Der größte Teil der apoptotischen Entzündungszellen sind Makrophagen [80]. Eine geringere Migration von Entzündungszellen wäre somit eine mögliche Erklärung für die geringere Anzahl apoptotischer Zellen in der C1qKO-Gruppe.

Allerdings ließen sich immunhistochemisch keine signifikanten Unterschiede bei der Neutrophilen- und Makrophageninfiltration zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe feststellen. C1q ist jedoch nicht nur für die Attraktion neutrophiler Granulozyten und Makrophagen verantwortlich, sondern bewirkt auch die Attraktion von Monozyten und dendritischen Zellen, deren Vorhandensein im infarzierten Myokard im Rahmen unserer Arbeit nicht miteinander verglichen wurde [83].

Ein weiterer möglicher Grund für die geringere Anzahl apoptotischer Zellen bei den C1qKO-Tieren wäre ein direkter Einfluss von C1q und damit des klassischen Komplementaktivierungswegs auf den Apoptosevorgang. Für einige Komplementregulatorproteine konnte bereits ein Einfluss auf Apoptosevorgänge nachgewiesen werden. Fu et al. konnten zeigen, dass das Komplementregulatorprotein C1-Esterase-Inhibitor einen anti-apoptotischen Effekt besitzt. Dieser Effekt bestand auch unabhängig von der Proteaseaktivität des Enzyms [84]. Möglicherweise besitzt der Komplementfaktor C1q einen pro-apoptotischen Effekt, der den C1qKO-Tieren fehlt.

4.4 Linksventrikuläre Funktion

Bisherige Studien, die den Einfluss des Komplementsystems auf die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt untersuchten, lieferten teilweise kontroverse Ergebnisse. In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie an C3KO-Tieren zeigte sich 6 Wochen nach Myokardinfarkt eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation, sowie ein geringerer Kollagengehalt der Infarktnarbe der C3KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren. Des Weiteren fanden sich bei den C3KO-Tieren 3 Tage nach Infarkt signifikant weniger neutrophile Granulozyten sowie eine signifikant geringere Apoptoserate [59]. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in einer Studie von Wysoczynski et al. ein gegenteiliger Effekt mit einem schlechteren Outcome der C3KO-Tiere im Vergleich zur WT-Gruppe. Hier wiesen die C3KO-Tiere trotz identischer Infarktgrößen 28 Tage nach Myokardinfarkt eine stärkere linksventrikuläre Dilatation sowie schlechtere systolische Funktionsparameter auf. Auch konnten im linken Ventrikel der C3KO-Tiere signifikant mehr apoptotische Zellen detektiert werden [85]. Da in beiden Studien eine basale Charakterisierung fehlt, bleibt unklar, inwieweit eventuell vorhandene basale Unterschiede Einfluss auf die Ergebnisse hatten. Aus diesem Grund sind auch die zum Teil stark kontroversen Daten kritisch zu sehen.

Die widersprüchlichen Daten zeigen jedoch, dass der Einfluss des Komplementsystems im chronischen Myokardinfarkt sehr komplex ist. Bislang liegt ein unzureichendes Verständnis über die genauen pathophysiologischen Vorgänge vor. Auch ist der Einfluss der einzelnen Komplementaktivierungswege auf das Remodelling nach Myokardinfarkt nicht ausreichend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges auf das Remodelling nach Myokardinfarkt untersucht. Die C1qKO-Tiere wiesen in der basalen Charakterisierung signifikant bessere hämodynamische Parameter auf. Dies ließ sich jedoch nach Infarktinduktion nicht mehr beobachten. Bei den echokardiographischen Messungen zeigten sich in der C1qKO-Gruppe in der basalen Charakterisierung bis auf Tendenzen zu höheren Herzfrequenzen keine signifikanten Unterschiede. Ein signifikant geringerer apikaler endsystolischer Durchmesser in der C1qKO-Gruppe ließ sich auf papillärer Ebene nicht reproduzieren.

8 Wochen nach Myokardinfarkt wiesen die C1qKO-Tiere signifikant größere Herzfrequenzen als die WT-Gruppe auf. Die signifikant besseren basalen hämodynamischen Parameter der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe ließen sich nach Myokardinfarkt nicht mehr aufzeigen.

Eine Inaktivierung des klassischen Komplementaktivierungsweges hat also keinen positiven Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass sich die Inaktivierung des klassischen Komplementaktivierungswegs negativ auf die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt auswirkt, da die basal signifikant besseren hämodynamischen Parameter der C1qKO-Gruppe nach Myokardinfarkt nicht mehr bestehen. Nichtsdestotrotz zeigen sich keine unterschiedlichen Überlebenszahlen sowie keine Unterschiede in den Infarktgrößen zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe. Weiterhin sind die echokardiographischen Parameter 8 Wochen nach Myokardinfarkt aufgrund der unterschiedlichen Herzfrequenzen in den beiden Gruppen nur bedingt vergleichbar.

Nichtsdestotrotz deutet die bessere linksventrikuläre Funktion der C1qKO-Tiere in der basalen Charakterisierung darauf hin, dass das Komplementsystem und speziell der klassische Aktivierungsweg auch unabhängig vom Myokardinfarkt einen Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion besitzen könnte. Daher wäre es wichtig in weiteren Studien, ein genaueres Verständnis über den Einfluss des Komplementsystems im gesunden Herzen zu gewinnen, um Veränderungen nach Myokardinfarkt besser interpretieren zu können.

4.5 Kollagensynthese

In einer Studie an C3KO-Tieren zeigte sich 56 Tage nach Myokardinfarkt ein signifikant geringerer Kollagenanteil im linken Ventrikel im Vergleich zur WT-Gruppe [59].

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung des Kollagengehaltes von Infarktnarbe und Septum mittels PSR Fluoreszenz. Die zugrunde liegende Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mitgeteilt [72]. Hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der C1qKO-Gruppe und der WT-Gruppe ermitteln. C1q, und damit der klassische Komplementaktivierungsweg, scheint also einen geringen Einfluss auf die Neubildung der extrazellulären Matrix nach Myokardinfarkt zu besitzen.

4.6 C3-Nachweis

Der Komplementfaktor C3 stellt das zentrale Element aller drei Komplementaktivierungswege dar und hat einen großen Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt. Daher ist es von großer Bedeutung herauszufinden, welche Komplementaktivierungswege nach Myokardinfarkt relevant sind und welchen Einfluss sie auf das Remodelling nach Myokardinfarkt besitzen.

Der Einfluss des Lektin-Aktivierungsweges wurde in dieser Arbeitsgruppe bereits anhand von MBL-KO-Tieren untersucht. Hier zeigten sich 6 Wochen nach Myokardinfarkt signifikant stärker dilatierte linke Ventrikel in der MBL-KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Des Weiteren ließ sich in den MBL-KO-Tieren immunhistochemisch weiterhin Komplementfaktor C3 im Präparat nachweisen. Dies zeigt, dass eine Komplementaktivierung trotz Ausschalten des Lektin-Aktivierungsweges weiterhin stattfand [60].

Allerdings erfolgte der C3-Nachweis in der Studie an MBL-KO-Tieren auf immunhistochemischem Weg. Hierbei wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen ein Serumblock verwendet. In der vorliegenden Arbeit an C1qKO-Tieren konnte gezeigt werden, dass der verwendete Serumblock Komplementfaktor C3 enthält. Somit war das Präparat mit Komplementfaktor C3 kontaminiert. Allerdings kann eine Komplementaktivierung unabhängig von den drei Komplementaktivierungswegen durch von nekrotischen Zellen freigesetzte Proteasen sowie Proteasen des Gerinnungssystems erfolgen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass sich tatsächlich auch endogen produziertes, aktives C3 im Präparat befand.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges nach Myokardinfarkt anhand von C1qKO-Tieren untersucht. Wie bereits erwähnt fanden Yasojima et al. 1998 heraus, dass der klassische Komplementaktivierungsweg nach Myokardinfarkt aktiv ist. Die Gruppe konnte außerdem zeigen, dass das menschliche Herz in der Lage ist, selbst endogen Komplementfaktoren zu produzieren. Hierfür wiesen die Autoren die mRNAs mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion sowie die zugehörigen Komplementproteine mittels Westernblot und Immunhistochemie nach. In alten

Infarktbereichen ließen sich signifikant mehr mRNAs und Komplementproteine nachweisen als in nicht-infarzierten Kontrollpräparaten. Gleichzeitig konnten die Autoren immunhistochemisch abgelagerte C4d, C3d und Membranangriffskomplexe auf Kardiomyozyten nachweisen. Diese Komplementkomponenten ließen sich auch in Westernblots infarzierter Gewebe nachweisen, ebenso wie die Komplementaktivierungsprodukte des klassischen Aktivierungswegs C1q, C1r und C1s. Die Autoren schlussfolgerten, dass der klassische Aktivierungsweg für die Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt eine zentrale Rolle spielt [56].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein immunhistochemischer Nachweis von Komplementfaktor C3 in C1qKO-Tieren angestrebt. Dies würde bedeuten, dass auch unter Ausschalten des klassischen Komplementaktivierungsweges eine Komplementaktivierung stattfindet.

Bei der Anwendung der bisher üblichen Protokolle zum C3-Nachweis zeigte sich im Fluoreszenzmikroskop ein deutlich positives Signal [60]. Allerdings ließ sich in Schnitten des linken Ventrikels von C3KO-Tieren bei Verwendung dieses Antikörpers ebenfalls ein Signal detektieren. Im Westernblot ließ sich hingegen, wie vermutet, kein C3 in den C3KO-Tieren detektieren. Dies lässt auf eine Kontamination der Präparate mit im Blockingsserum gelösten Komplementfaktoren schließen.

Allerdings traten die falsch positiven Signale in den C3KO-Tieren auch unter Verwendung eines Glycin-Gewebeblocks auf. Dies deutet darauf hin, dass sich trotz ausgiebigen Waschens der Schnitte in PBS nicht alle Einblutungen und darin gelöste Komplementfaktoren aus dem Gewebe entfernen lassen.

Auch unter Verwendung eines Antikörpers, welcher sich gegen zellgebundene Komplementspaltprodukte richtet, ließ sich weiterhin ein positives Signal in C3KO-Tieren erkennen. In infarzierten Rattenherzen zeigte sich hingegen kein positives Signal.

Wie im Methodenkapitel beschrieben musste zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen ein MOM-Block erfolgen. Letztlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich auch im MOM-Block gelöste Serumproteine und damit Komplementfaktoren befinden. Die genaue Zusammensetzung des MOM-Blocks ist allerdings Herstellergeheimnis.

Zusammenfassend konnte an dieser Stelle kein Nachweis von aktivem C3 mittels Immunfluoreszenz bzw. der Immunhistochemie erfolgen. Es lässt sich somit in dieser Arbeit keine sichere Aussage über die Einflussstärke des klassischen Komplementaktivierungsweges nach Myokardinfarkt treffen.

4.7 Einfluss des Komplementsystems auf das Remodelling nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz

Wie oben beschrieben führten Studien, die den Einfluss des Komplementsystems auf das Remodelling nach Myokardinfarkt untersuchten teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Obwohl die Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt vor allem in der frühen inflammatorischen Phase stattfindet, spielt sie auch im späteren Stadium der Herzinsuffizienz eine große Rolle. Auch bezüglich der Rolle des Komplementsystems bei ischämischer Herzinsuffizienz existieren widersprüchliche Ergebnisse.

In einer Studie von Clark et al. konnte bei Patienten mit chronischer ischämischer Herzinsuffizienz eine verstärkte Komplementaktivierung nachgewiesen werden [86]. Im Gegensatz hierzu stehen Studien, bei denen sich im Serum herzinsuffizienter Patienten weniger Komplementfaktoren als im Serum gesunder Probanden nachweisen ließen. In einer klinischen Studie konnten Frey et al. ein besseres Outcome bei herzinsuffizienten Patienten mit erhöhten C3c-Serumwerten beobachten. Patienten mit Herzinsuffizienz wiesen eine chronisch geringere Aktivierung des Immunsystems auf [87]. Dies widerlegt die Vermutung, dass eine stärkere Komplementaktivierung bei Herzinsuffizienz einen negativen Einfluss auf das Outcome hat.

Die genauen Ursachen für die kontroversen Einflüsse des Komplementsystems nach Myokardinfarkt sind bislang nicht ausreichend bekannt. Vieles deutet außerdem darauf hin, dass die Komplementaktivierung bei verschiedenen Individuen nach Myokardinfarkt unterschiedlich stark erfolgt und unterschiedlich lang anhält. Außerdem scheinen zahlreiche weitere Faktoren darüber zu entscheiden, ob sich eine Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt positiv oder negativ auswirkt. In den vergangenen Jahren konnten bereits einige dieser Faktoren identifiziert werden.

Der in dieser Arbeit untersuchte klassische Komplementaktivierungsweg steht in engem Zusammenhang mit weiteren Entzündungsmediatoren, welche in der frühen inflammatorischen Phase aktiv sind. Unter anderem werden die Pentraxine CRP und SAP (Serumamyloid P) freigesetzt. Diese sind in der Lage, C1q zu binden und so eine Komplementaktivierung auszulösen [88]. Außerdem kann CRP mit dem Regulatorprotein Faktor H interagieren. Faktor H spaltet aktiviertes C3b in inaktives C3b und hemmt somit die Bildung der C3-Konvertase aller drei Komplementaktivierungswege [89]. CRP kann somit nicht nur zu einer Aktivierung, sondern auch zu einer Hemmung des Komplementsystems beitragen. Des Weiteren sind sowohl CRP, als auch SAP in der Lage den Komplementfaktor C4b zu binden und somit regulatorisch auf den klassischen Komplementaktivierungsweg einzuwirken [90]. In menschlichen Autopsiepräparaten co-lokalisierten CRP, Komplementaktivierungsprodukte und IgM in infarziertem Gewebe [91].

In der Vergangenheit wurde ein starker Fokus auf die proinflammatorische Wirkung des Komplementsystems gelegt. Hierbei wurde die immunmodulatorische Wirkung einiger Komplementfaktoren und Komplementinhibitoren wenig beachtet. Das Komplementspaltprodukt C1q ist auch in Abwesenheit von anderen Komplementfaktoren ein potentes immunmodulatorisches Molekül. Wie bereits beschrieben hat es einen entscheidenden Einfluss bei der Beseitigung apoptotischer Zellen und einen hemmenden Einfluss auf die Makrophageninfiltration ins Gewebe [76]. Durch Interaktion mit Monozyten und dendritischen Zellen kann C1q außerdem eine verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine bewirken [92, 93]. Dies unterstreicht, dass C1q nicht ausschließlich eine proinflammatorische Wirkung besitzt, sondern vielmehr immunmodulatorisch wirksam ist. In den in dieser Arbeit untersuchten C1qKO-Tieren bewirkte das Fehlen von C1q also nicht nur eine Hemmung des klassischen Aktivierungswegs. Vielmehr fehlte zusätzlich die von C1q vermittelte immunmodulatorische Komponente. Schädliche Remodellingvorgänge nach Myokardinfarkt hängen vermutlich mit einer Dysregulation der Komplementaktivierung zusammen. Somit könnte nicht nur eine überschießende Aktivierung des Komplementsystems, sondern auch das Fehlen inhibitorischer Faktoren einen negativen Einfluss besitzen.

4.8 Komplementsystem und antiinflammatorische Therapie

In experimentellen Studien konnte die wichtige Rolle des Immunsystems bei der Heilung nach Myokardinfarkt belegt werden. Leider sind in der Vergangenheit Versuche, dieses Wissen in der klinischen Therapie umzusetzen, größtenteils gescheitert.

Die Ansätze, durch Hemmung des Komplementsystems eine Prognoseverbesserung nach Myokardinfarkt zu erzielen, konnten bislang keine zufriedenstellenden Ergebnisse hervorbringen. In der APEX-AMI Studie erhielten 5745 Patienten mit STEMI den anti-C5 Antikörper Pexelizumab zuerst als Bolus im Rahmen der perkutanen Intervention und anschließend als Kurzinfusion über 24 Stunden. Die 30-Tages-Mortalität blieb hierbei von der Antikörpergabe unbeeinflusst. Auch im Verlauf zeigte sich keine Verminderung von Mortalität, Herzinsuffizienzrate oder kardiogenen Schockereignissen [94].

Auch Versuche, durch die Applikation von Komplementregulatorproteinen in die Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt einzugreifen, konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der klinischen Praxis liefern. Nichtsdestotrotz führte die Hemmung des Komplementsystems mittels C1-Esterase-Inhibitor tierexperimentell zu vielversprechenden Ergebnissen. C1-Esterase-Inhibitor gehört zur Familie der Serinproteasen und hemmt alle drei Wege der Komplementaktivierung [95–97]. In Tierexperimenten konnte nach Applikation von C1-Esterase-Inhibitor ein kardioprotektiver Effekt in Ischämie-Reperfusionen-Modellen beobachtet werden [98, 99]. Der kardioprotektive Effekt beruhte hierbei nicht alleine auf der Komplementhemmung. Fengxin et al. konnten zeigen, dass C1-Esterase-Inhibitor nach Ischämie-Reperfusion in der Lage ist, die Leukozytentransmigration in Mäusen direkt, das heißt unabhängig von seiner proteolytischen Wirkung, zu hemmen [100]. Eine Leukozytendepletion in Tierversuchen hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Infarktgröße. Hier ließen sich bis zu 40% geringere Infarktgrößen nach reperfundiertem Myokardinfarkt nachweisen [73]. In klinischen Studien ließen sich hingegen keine geringeren Infarktgrößen durch Leukozytendepletion erzielen [101]. Auffällig war außerdem, dass höhere Dosen des C1-Esterase-Inhibitors keinen protektiven Effekt mehr bewirkten, sondern vielmehr prokoagulatorisch wirkten [102].

Die Gründe für das Versagen der bisherigen komplementhemmenden Therapieansätze sind bislang nicht ausreichend bekannt.

Eine mögliche Erklärung für den unzureichenden Effekt des anti-C5-Antikörpers Pexelizumab in der APEX-AMI Studie könnte allerdings eine ineffektive Unterdrückung der inflammatorischen Antwort sein. Dies legt eine Messung zirkulierender Biomarker in einer Subgruppe der Studie nahe, bei der sich keine suffiziente Unterdrückung der Entzündungsreaktion zeigte [94].

Außerdem lassen sich im Tierversuchsmodell gewonnene Erkenntnisse nicht immer in den heterogenen und komplexeren klinischen Kontext übertragen. Unterschiede in Geschlecht, Alter, Genetik, Ausprägung der koronaren Gefäßerkrankung, Begleiterkrankungen sowie Pharmakotherapie haben im klinischen Alltag starken Einfluss auf die pathophysiologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt. Demgegenüber sind im Tiermodell diese Variabilitäten weitgehend ausgeschaltet. Tiermodelle sind demnach sehr gut geeignet, die pathophysiologischen Vorgänge nach Myokardinfarkt zu verstehen, jedoch nicht um die Wirksamkeit möglicher Therapien endgültig zu beweisen [103].

Allerdings zeigten sich auch im Tiermodell Unterschiede in Stärke und Dauer der inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt. Unter anderem scheint eine Altersabhängigkeit zu bestehen. So zeigte sich in Versuchen an älteren Tieren eine deutlich schwächere und teilweise verlängerte inflammatorische Antwort im Vergleich zu jungen Tieren [104].

Ziel einer antiinflammatorischen Therapie nach Myokardinfarkt sollte es sein, das Myokard vor den negativen Einflüssen des Immunsystems zu schützen, ohne dabei die notwendigen Reparaturprozesse zu behindern. Zum einen gilt es, Patienten mit einer überschießenden Immunreaktion nach Myokardinfarkt zu identifizieren und ggf. einer anti-inflammatorischen Therapie zuzuführen [105]. Zum anderen könnte die Messung von Biomarkern wie zum Beispiel Komplementfaktor C3 oder TGF- β neue Möglichkeiten bieten, gezielt und individuell in die Pathogenese der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt einzugreifen.

4.9 Einfluss der einzelnen Komplementaktivierungswege nach Myokardinfarkt und bei Herzinsuffizienz

Die Rolle des Lektin-Aktivierungsweges beim chronischen Myokardinfarkt wurde bereits in einer vorherigen Arbeit dieser Gruppe untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der Lektin-Aktivierungsweg nicht allein für die Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt verantwortlich ist [60].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges auf das Remodelling nach Myokardinfarkt untersucht. Wie bereits beschrieben konnten zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe kein Unterschied in der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt festgestellt werden. Vielmehr zeigen sich die signifikant besseren hämodynamischen Parameter der C1qKO-Gruppe, die vor Myokardinfarkt bestanden, nach Infarktinduktion nicht mehr. Dies könnte bedeuten, dass das Fehlen des Komplementfaktors C1q einen negativen Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt besitzt. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede in der Mortalität sowie in den Infarktgrößen zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe. In der vorliegenden Arbeit ließ sich nicht feststellen, ob sich aktiviertes C3 im Myokard der C1qKO-Tiere befand. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, welchen Einfluss das Ausschalten des klassischen Aktivierungsweges auf die C3-Bildung nach Myokardinfarkt besitzt. Nichtsdestotrotz scheint der klassische Komplementaktivierungsweg nicht ausschließlich für die Remodellingvorgänge nach Myokardinfarkt verantwortlich zu sein, da sich der Einfluss einer C3-Defizienz auf das Outcome nach Myokardinfarkt nicht in den C1qKO-Tieren reproduzieren ließ.

Daher lässt sich schlussfolgern, dass dem alternativen Komplementaktivierungsweg eine zentrale Rolle nach Myokardinfarkt zukommt. In einer Studie am infarzierten Rattenherzen konnten Väkevä et al. das Komplementprotein C3 bereits 2 Stunden nach Myokardinfarkt nachweisen. Die Komplementproteine C1 und C2 des klassischen bzw. Lektin-Aktivierungsweges ließen sich hingegen erst 3 Stunden nach Myokardinfarkt detektieren [61]. Die Schlussfolgerung, dass der alternative Komplementaktivierungsweg demnach als erster der drei Komplementaktivierungswege nach Myokardinfarkt aktiviert wird, ist jedoch kritisch zu betrachten. Zusätzlich zu den drei Komplementaktivierungswegen existieren weitere Möglichkeiten der

Komplementaktivierung die einen Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt besitzen könnten. Vor allem in der frühen inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt setzen nekrotische Kardiomyozyten Proteasen frei, die zu einer proteolytischen Aktivierung der Faktoren C3 und C5 ohne Beteiligung vorgeschalteter Komplementaktivierungswege führen können [53, 106]. In einer Studie an C3KO-Tieren blieb die C5-Aktivierung 48 Stunden nach Myokardinfarkt trotz Fehlen von C3 identisch zu WT-Gruppe [85]. Dies unterstreicht, dass auch eine Komplementaktivierung unabhängig von den drei Aktivierungswegen eine zentrale Rolle nach Myokardinfarkt spielt. Hierbei könnten auch Endothelzellen beteiligt sein. Sowohl die Endothelzelle selber, als auch die subendothelial gelegene extrazelluläre Matrix, können durch Freisetzung von Zytokinen eine Komplementaktivierung bewirken [107].

Weiterhin steht das Komplementsystem in Zusammenhang mit dem Gerinnungssystem. Sowohl die Komplementkaskade, als auch die Gerinnungskaskade enthalten zahlreiche Serinproteasen. Einige dieser Serinproteasen können als Aktivatoren bzw. Inhibitoren in beiden Systemen fungieren. Plasmin sowie die Gerinnungsfaktoren Xa und XIa sind in der Lage, die Faktoren C5 und C3 in ihre aktiven Formen zu überführen [106]. Faktor XIIa des Gerinnungssystems kann eine Aktivierung des Komplementfaktors C1q bewirken. Auch das Komplementregulatorprotein C1-Esterase-Inhibitor interagiert mit Faktoren der Gerinnungskaskade, wie Kallikrein oder Faktor XIIa [108]. Umgekehrt ist der Gerinnungsfaktor Thrombin in der Lage, als C5 Konvertase zu fungieren und C5 auch in Abwesenheit von C3 in seine aktiven Spaltprodukte zu überführen [48]. Gleichzeitig kann C5a eine Aktivierung des Gerinnungssystems bewirken [109].

Es besitzen also nicht nur die drei Komplementaktivierungswege, sondern auch eine Komplementaktivierung über die Gerinnungskaskade oder unspezifische Proteasen einen Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt. Die drei Komplementaktivierungswege stehen außerdem in einem engen Zusammenhang zueinander und können sich gegenseitig amplifizieren. Der in dieser Arbeit untersuchte klassische Komplementaktivierungsweg amplifiziert den alternativen Komplementaktivierungsweg durch Bildung von C3b [110]. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die drei Komplementaktivierungswege auch nach Myokardinfarkt nicht getrennt voneinander zu betrachten sind.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der klassische Komplementaktivierungsweg nicht alleinig für das Remodelling nach Myokardinfarkt verantwortlich ist. Zwar zeigte sich nach Myokardinfarkt eine signifikant geringere Apoptoserate in der C1qKO-Gruppe, jedoch ließen sich die signifikant besseren linksventrikulären Funktionsparameter der C1qKO-Tiere der basalen Charakterisierung nach Myokardinfarkt nicht mehr zeigen. Das Ausschalten des klassischen Komplementaktivierungsweges hat also sowohl am nicht-infarzierten Herzen, als auch nach Myokardinfarkt komplexe Auswirkungen.

Ein besseres Verständnis über die Rolle des Komplementsystems am gesunden Herzen sowie über dessen immunmodulatorische Komponente zu gewinnen muss also Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Da das Herz in der Lage ist, endogen Komplementfaktoren zu produzieren, könnte der Einfluss von C1q anhand von Tieren untersucht werden, bei denen das codierende Gen ausschließlich im Myokard ausgeschaltet ist.

Da die Komplementaktivierung eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt spielt, stellt das Komplementsystem auch einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt dar. Auch wenn komplementhemmende Wirkstoffe bisher zu keinen überzeugenden Ergebnissen im klinischen Alltag führen konnten, zeigen sich in Tiermodellen durchaus vielversprechende Ergebnisse. Die kontroversen Ergebnisse verschiedener Studien zur Rolle des Komplementsystems nach Myokardinfarkt, lassen vermuten, dass eher eine Dysregulation der Komplementaktivierung als ausschließlich eine überschießende Aktivierung für die negativen Remodellingprozesse verantwortlich ist. Somit könnte die Messung von Komplement-assoziierten Biomarkern die Möglichkeit bieten, gezielt und individuell in die Entwicklung der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt einzugreifen und bestimmte Patientenkollektive identifizieren, die von der Komplement-modulierenden Therapie profitieren würden.

5. Zusammenfassung

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine C3-Defizienz einen entscheidenden Einfluss auf das Remodelling nach Myokardinfarkt besitzt. Dies wirft die Frage auf, welche Rolle die einzelnen Komplementaktivierungswege an dieser Stelle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des klassischen Komplementaktivierungsweges auf das Remodelling nach Myokardinfarkt untersucht. Hierzu wurden C1qKO-Tiere mit WT-Tieren vor und nach Myokardinfarkt echokardiographisch und hämodynamisch untersucht. Nach Myokardinfarkt erfolgten außerdem eine Infarktgrößenbestimmung sowie eine fluoreszenzmikroskopische Messung des Kollagengehaltes. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten, Makrophagen sowie apoptotischer Zellen wurde drei Tage nach Myokardinfarkt bestimmt.

In der C1qKO-Gruppe zeigten sich vor Myokardinfarkt signifikant größere Ejektionsfraktionen im Vergleich zur WT-Gruppe. Dies ließ sich nach Myokardinfarkt nicht mehr beobachten. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen C1qKO-Gruppe und WT-Gruppe. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in den Parametern Mortalität, Infarktgrößen, Organgewichte, Kollagengehalt des Gewebes, Makrophagenanzahl und Neutrophilenanzahl. Allerdings zeigte sich drei Tage nach Myokardinfarkt eine deutlich geringere Anzahl apoptotischer Zellen in der C1qKO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe.

Insgesamt lassen sich die beobachteten Effekte bei C3-Defizienz nicht in den C1qKO-Tieren reproduzieren. Die Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt ist somit nicht ausschließlich auf eine Aktivität des klassischen Komplementaktivierungsweges zurückzuführen. Vielmehr scheint ein Zusammenspiel aller drei Komplementaktivierungswege sowie zusätzlich eine Komplementaktivierung durch komplementunabhängige Proteasen zum linksventrikulären Remodelling nach Myokardinfarkt beizutragen.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANOVA	Analysis of variance
AP	Apikal
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	danger-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
EDA	Enddiastolische Fläche (enddiastolic area)
EDD	Enddiastolischer Durchmesser
EKG	Elektrokardiographie/Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immuno absorbance assay
ESA	Endsystolische Fläche (endsystolic area)
ESD	Endsystolischer Durchmesser
et al.	et alteri
FLICA	Fluorochrome Inhibitor of Caspases
FMK	Fluormethylketon
SR	Sulforhodamin
FS	Fractional shortening
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon gamma
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Knock-out
LV	linker Ventrikel
M	Mol
MAC	Membrane-Attack-Complex
MASP	MBL-assoziierte Serinproteasen
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
mRNA	Messenger-ribonucleinacid
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
μ	Micro
NaCl	Natrium Chlorid
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ns	Nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
PA	Pappilär
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
pg	Picogramm
PBS	phosphate buffered saline
PRR	pathogen recognition receptor
RAG	recombination-activating gene

RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonucleinacid
RV	rechter Ventrikel
SAP	Serumamyloid P
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STEMI	ST-Elevation myocardial infarction (ST-Hebungs-Infarkt)
TGF β	transforming growth factor beta
TLR	Toll-like-Rezeptor
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF α	tumor necrosis factor- α
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Volt
WT	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- 1 **Statistisches Bundesamt:**
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>. Abruf 03.11.17
- 2 **Heusch, G. and Gersh, B. J.**, The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *European heart journal*. 2016.
- 3 **Erdmann, E.**, *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, 8th edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2011.
- 4 **Ertl, G. and Frantz, S.**, Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2005. **66**(1): 22–32.
- 5 **Prabhu, S. D.**, Post-infarction ventricular remodeling: an array of molecular events. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005. **38**(4): 547–550.
- 6 **Kain, V., Prabhu, S. D. and Halade, G. V.**, Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2014. **109**(6): 444.
- 7 **Prabhu, S. D. and Frangogiannis, N. G.**, The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research*. 2016. **119**(1): 91–112.
- 8 **Frangogiannis, N. G.**, The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research*. 2008. **58**(2): 88–111.
- 9 **Cahill, T. J. and Kharbanda, R. K.**, Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World journal of cardiology*. 2017. **9**(5): 407–415.
- 10 **Timmers, L., Pasterkamp, G. and Hoog, V. C. de, Arslan, F., Appelman, Y., de Kleijn, Dominique P V**, The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular research*. 2012. **94**(2): 276–283.
- 11 **Arslan, F., Kleijn, D. P. de and Pasterkamp, G.**, Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nature reviews. Cardiology*. 2011. **8**(5): 292–300.
- 12 **Ghigo, A., Franco, I. and Morello, F., Hirsch, E.**, Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovascular research*. 2014. **102**(2): 270–280.
- 13 **Haan, J. J. de, Smeets, M. B. and Pasterkamp, G., Arslan, F.**, Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators of inflammation*. 2013. **2013**: 206039.

- 14 **Mann, D. L.**, The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circulation research*. 2011. **108**(9): 1133–1145.
- 15 **Newton, K. and Dixit, V. M.**, Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012. **4**(3).
- 16 **Nahrendorf, M., Pittet, M. J. and Swirski, F. K.**, Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010. **121**(22): 2437–2445.
- 17 **Hofmann, U., Beyersdorf, N. and Weirather, J., Podolskaya, A., Bauersachs, J., Ertl, G., Kerkau, T., Frantz, S.**, Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012. **125**(13): 1652–1663.
- 18 **Eltzschig, H. K. and Eckle, T.**, Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine*. 2011. **17**(11): 1391–1401.
- 19 **Frangogiannis, N. G., Smith, C. W. and Entman, M. L.**, The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2002. **53**(1): 31–47.
- 20 **Kobayashi, Y.**, Neutrophil infiltration and chemokines. *Critical reviews in immunology*. 2006. **26**(4): 307–316.
- 21 **White, G. E., Iqbal, A. J. and Greaves, D. R.**, CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacological reviews*. 2013. **65**(1): 47–89.
- 22 **Frangogiannis, N. G.**, Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research*. 2012. **110**(1): 159–173.
- 23 **WILLEMS, INGRID E. M. G., ARENDS, J.-W. and DAEMEN, MAT J. A. P.**, TENASCIN AND FIBRONECTIN EXPRESSION IN HEALING HUMAN MYOCARDIAL SCARS. *J. Pathol.* 1996. **179**(3): 321–325.
- 24 **Blankesteijn, W. M., Creemers, E. and Lutgens, E., Cleutjens, J. P., Daemen, M. J., Smits, J. F.**, Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta physiologica Scandinavica*. 2001. **173**(1): 75–82.
- 25 **Chen, W. and Frangogiannis, N. G.**, Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et biophysica acta*. 2013. **1833**(4): 945–953.
- 26 **Frangogiannis, N. G., Mendoza, L. H. and Lindsey, M. L., Ballantyne, C. M., Michael, L. H., Smith, C. W., Entman, M. L.**, IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 2000. **165**(5): 2798–2808.
- 27 **Whittaker, P., Boughner, D. R. and Kloner, R. A.**, Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1991. **84**(5): 2123–2134.
- 28 **Skyschally, A., Schulz, R. and Heusch, G.**, Pathophysiology of myocardial infarction: protection by ischemic pre- and postconditioning. *Herz*. 2008. **33**(2): 88–100.

- 29 **López, B., González, A. and Ravassa, S., Beaumont, J., Moreno, M. U., San José, G., Querejeta, R., Díez, J.,** Circulating Biomarkers of Myocardial Fibrosis: The Need for a Reappraisal. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015. **65**(22): 2449–2456.
- 30 **Leask, A.,** Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. *Circulation research*. 2015. **116**(7): 1269–1276.
- 31 **Fitchett, D. H., Goodman, S. G. and Leiter, L. A., Lin, P., Welsh, R., Stone, J., Grégoire, J. et al.,** Secondary Prevention Beyond Hospital Discharge for Acute Coronary Syndrome: Evidence-Based Recommendations. *The Canadian journal of cardiology*. 2016. **32**(7 Suppl): 34.
- 32 **Ertl, G.,** A systemic disease with different etiologies: cardiac insufficiency. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2015. **140**(6): 394.
- 33 **Ponikowski, P., Voors, A. A. and Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V. et al.,** 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2016. **37**(27): 2129–2200.
- 34 **Lindpaintner, K., Lu, W. and Neidermayer, N., Schieffer, B., Just, H., Ganten, D., Drexler, H.,** Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1993. **25**(2): 133–143.
- 35 **Seropian, I. M., Toldo, S. and van Tassell, B. W., Abbate, A.,** Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014. **63**(16): 1593–1603.
- 36 **Angermann, C. E. and Ertl, G.,** Acute heart failure - a unique challenge. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2015. **140**(6): 395–401.
- 37 **Ertl, G., Brenner, S. and Angermann, C. E.,** Kardiales Remodelling nach Myokardinfarkt: Update für die klinische Praxis. *Herz*. 2017. **42**(1): 107–120.
- 38 **Dickstein, K., Cohen-Solal, A. and Filippatos, G., McMurray, J. J. V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A., Strömberg, A. et al.,** ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *European journal of heart failure*. 2008. **10**(10): 933–989.
- 39 **Lloyd-Jones, D. M.,** Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2002. **106**(24): 3068–3072.

- 40 **Kasper, D. L., Fauci, A. S. and Harrison, T. R.**, *Harrisons Innere Medizin*, 19th edn. McGraw-Hill Education; ABW Wissenschaftsverlag; Thieme, New York, NY, Berlin, Stuttgart 2016.
- 41 **Li, K., Sacks, S. H. and Zhou, W.**, The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Molecular immunology*. 2007. **44**(16): 3866–3874.
- 42 **Ricklin, D., Hajshengallis, G. and Yang, K., Lambris, J. D.**, Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010. **11**(9): 785–797.
- 43 **Dunkelberger, J. R. and Song, W.-C.**, Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*. 2010. **20**(1): 34–50.
- 44 **Frantz, S., Kobzik, L. and Kim, Y. D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R. T., Kelly, R. A.**, Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of clinical investigation*. 1999. **104**(3): 271–280.
- 45 **Schraufstatter, I. U., Khaldoyanidi, S. K. and DiScipio, R. G.**, Complement activation in the context of stem cells and tissue repair. *World journal of stem cells*. 2015. **7**(8): 1090–1108.
- 46 **Beltrame, M. H., Catarino, S. J. and Goeldner, I., Boldt, A. B. W., Messias-Reason, I. J. de**, The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Frontiers in pediatrics*. 2014. **2**: 148.
- 47 **Walport, M. J.**, Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001. **344**(14): 1058–1066.
- 48 **Huber-Lang, M., Sarma, J. V. and Zetoune, F. S., Rittirsch, D., Neff, T. A., McGuire, S. R., Lambris, J. D. et al.**, Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature medicine*. 2006. **12**(6): 682–687.
- 49 **Markiewski, M. M., Nilsson, B. and Ekdahl, K. N., Mollnes, T. E., Lambris, J. D.**, Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in immunology*. 2007. **28**(4): 184–192.
- 50 **Hourcade, D. E.**, The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *The Journal of biological chemistry*. 2006. **281**(4): 2128–2132.
- 51 **Spitzer, D., Mitchell, L. M. and Atkinson, J. P., Hourcade, D. E.**, Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 2007. **179**(4): 2600–2608.
- 52 **Zhang, C., Li, Y. and Wang, C., Wu, Y., Cui, W., Miwa, T., Sato, S. et al.**, Complement 5a receptor mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014. **34**(6): 1240–1248.

- 53 **Hill, J. H.**, THE PHLOGISTIC ROLE OF C3 LEUKOTACTIC FRAGMENTS IN MYOCARDIAL INFARCTS OF RATS. *Journal of Experimental Medicine*. 1971. **133**(4): 885–900.
- 54 **Pinckard, R. N., Olson, M. S. and Giclas, P. C., Terry, R., Boyer, J. T., O'Rourke, R. A.**, Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 1975. **56**(3): 740–750.
- 55 **Yasojima, K., Kilgore, K. S. and Washington, R. A., Lucchesi, B. R., McGeer, P. L.**, Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circulation research*. 1998. **82**(11): 1224–1230.
- 56 **Yasojima, K., Schwab, C. and McGeer, E. G., McGeer, P. L.**, Human Heart Generates Complement Proteins That Are Upregulated and Activated After Myocardial Infarction. *Circulation research*. 1998. **83**(8): 860–869.
- 57 **Hosszu, K. K., Santiago-Schwarz, F. and Peerschke, E. I. B., Ghebrehiwet, B.**, Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity. *Innate immunity*. 2010. **16**(2): 115–127.
- 58 **Busche, M. N. and Stahl, G. L.**, Role of the complement components C5 and C3a in a mouse model of myocardial ischemia and reperfusion injury. *German medical science GMS e-journal*. 2010. **8**.
- 59 **Schenk, A.**, *Die Rolle des Komplementfaktors C3 in der chronischen Herzinsuffizienz*. Würzburg, Univ., Diss., 2010.
- 60 **Werle, P.**, *Rolle von Mannose-binding-Lectin für das ventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt*. Würzburg, Univ., Diss., 2011.
- 61 **Vakeva, A. P., Agah, A. and Rollins, S. A., Matis, L. A., Li, L., Stahl, G. L.**, Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation*. 1998. **97**(22): 2259–2267.
- 62 **Botto, M., Dell'Agnola, C. and Bygrave, A. E., Thompson, E. M., Cook, H. T., Petry, F., Loos, M. et al.**, Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nature genetics*. 1998. **19**(1): 56–59.
- 63 **Michael, L. H., Entman, M. L. and Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K. et al.**, Myocardial ischemia and reperfusion: A murine model. *The American journal of physiology*. 1995. **269**(6 Pt 2): H2147-54.
- 64 **Baudouy, D., Michiels, J.-F. and Vukolic, A., Wagner, K.-D., Wagner, N.**, Echocardiographic and Histological Examination of Cardiac Morphology in the Mouse. *Journal of visualized experiments JoVE*. 2017(128).
- 65 **Frantz, S., Hu, K. and Widder, J., Bayer, B., Witzel, C. C., Schmidt, I., Galuppo, P. et al.**, Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *British journal of pharmacology*. 2004. **141**(1): 9–14.

- 66 **Urayama, K., Dedeoglu, D. B. and Guilini, C., Frantz, S., Ertl, G., Messaddeq, N., Nebigil, C. G.**, Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovascular research*. 2009. **81**(1): 28–37.
- 67 **Lang, G.**, *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer-Verlag/Wien, Vienna 2006.
- 68 **Die Grimm, S.**, Die Apoptose: Programmierter Zelltod. *Chemie in unserer Zeit*. 2003. **37**(3): 172–178.
- 69 **Grasl-Kraupp, B., Ruttkay-Nedecky, B. and Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., Schulte-Hermann, R.**, In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 1995. **21**(5): 1465–1468.
- 70 **Slee, E. A., Adrain, C. and Martin, S. J.**, Serial killers: Ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell death and differentiation*. 1999. **6**(11): 1067–1074.
- 71 **Ekert, P. G., Silke, J. and Vaux, D. L.**, Caspase inhibitors. *Cell death and differentiation*. 1999. **6**(11): 1081–1086.
- 72 **Vogel, B., Siebert, H. and Hofmann, U., Frantz, S.**, Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*. 2015. **2**: 124–134.
- 73 **Romson, J. L., Hook, B. G. and Kunkel, S. L., Abrams, G. D., Schork, M. A., Lucchesi, B. R.**, Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983. **67**(5): 1016–1023.
- 74 **Mullane, K. M., Read, N. and Salmon, J. A., Moncada, S.**, Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1984. **228**(2): 510–522.
- 75 **Engler, R. L., Dahlgren, M. D. and Morris, D. D., Peterson, M. A., Schmid-Schönbein, G. W.**, Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *The American journal of physiology*. 1986. **251**(2 Pt 2): H314-23.
- 76 **Benoit, M. E., Clarke, E. V. and Morgado, P., Fraser, D. A., Tenner, A. J.**, Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 2012. **188**(11): 5682–5693.
- 77 **Pulanco, M. C., Cosman, J. and Ho, M.-M., Huynh, J., Fing, K., Turcu, J., Fraser, D. A.**, Complement Protein C1q Enhances Macrophage Foam Cell Survival and Efferocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 2017. **198**(1): 472–480.
- 78 **Crow, M. T., Mani, K. and Nam, Y.-J., Kitsis, R. N.**, The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation research*. 2004. **95**(10): 957–970.

- 79 **Chandrashekhar, Y., Sen, S. and Anway, R., Shuros, A., Anand, I.**, Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004. **43**(2): 295–301.
- 80 **Park, M., Shen, Y.-T. and Gaussin, V., Heyndrickx, G. R., Bartunek, J., Resuello, R. R. G., Natividad, F. F. et al.**, Apoptosis predominates in nonmyocytes in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2009. **297**(2): H785-91.
- 81 **Truedsson, L., Bengtsson, A. A. and Sturfelt, G.**, Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2007. **40**(8): 560–566.
- 82 **Ghebrehiwet, B. and Peerschke, E. I.**, The C1q-R participates in immunoregulation and signal transduction. *Behring Institute Mitteilungen*. 1993(93): 236–240.
- 83 **Tenner, A. J.**, Functional aspects of the C1q receptors. *Behring Institute Mitteilungen*. 1993(93): 241–253.
- 84 **Fu, J., Guo, F. and Chen, C., Yu, X., Hu, K., Li, M.**, C1 inhibitor-mediated myocardial protection from chronic intermittent hypoxia-induced injury. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016. **12**(4): 2208–2214.
- 85 **Wysoczynski, M., Solanki, M. and Borkowska, S., van Hoose, P., Brittan, K. R., Prabhu, S. D., Ratajczak, M. Z., Rokosh, G.**, Complement component 3 is necessary to preserve myocardium and myocardial function in chronic myocardial infarction. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2014. **32**(9): 2502–2515.
- 86 **Clark, D. J., Cleman, M. W. and Pfau, S. E., Rollins, S. A., Ramahi, T. M., Mayer, C., Caulin-Glaser, T. et al.**, Serum complement activation in congestive heart failure. *American heart journal*. 2001. **141**(4): 684–690.
- 87 **Frey, A., Ertl, G. and Angermann, C. E., Hofmann, U., Stork, S., Frantz, S.**, Complement C3c as a biomarker in heart failure. *Mediators of inflammation*. 2013. **2013**: 716902.
- 88 **Kaplan, M. H. and Volanakis, J. E.**, Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 1974. **112**(6): 2135–2147.
- 89 **Mold, C., Gewurz, H. and Du Clos, T. W.**, Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*. 1999. **42**(1-3): 23–30.
- 90 **Sjöberg, A. P., Trouw, L. A. and McGrath, F. D. G., Hack, C. E., Blom, A. M.**, Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 2006. **176**(12): 7612–7620.

- 91 **Krijnen, P. A. J., Ciurana, C. and Cramer, T., Hazes, T., Meijer, C. J. L. M., Visser, C. A., Niessen, H. W. M., Hack, C. E.**, IgM colocalises with complement and C reactive protein in infarcted human myocardium. *Journal of clinical pathology*. 2005. **58**(4): 382–388.
- 92 **Fraser, D. A., Bohlsion, S. S. and Jasinskiene, N., Rawal, N., Palmarini, G., Ruiz, S., Rochford, R., Tenner, A. J.**, C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *Journal of leukocyte biology*. 2006. **80**(1): 107–116.
- 93 **Yamada, M., Oritani, K. and Kaisho, T., Ishikawa, J., Yoshida, H., Takahashi, I., Kawamoto, S. et al.**, Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *European journal of immunology*. 2004. **34**(1): 221–230.
- 94 **Armstrong, P. W., Granger, C. B. and Adams, P. X., Hamm, C., Holmes, D., O'Neill, W. W., Todaro, T. G. et al.**, Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007. **297**(1): 43–51.
- 95 **Petersen, S. V., Thiel, S. and Jensen, L., Vorup-Jensen, T., Koch, C., Jensenius, J. C.**, Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Molecular immunology*. 2000. **37**(14): 803–811.
- 96 **Wong, N. K., Kojima, M. and Dobó, J., Ambrus, G., Sim, R. B.**, Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. *Molecular immunology*. 1999. **36**(13-14): 853–861.
- 97 **Jiang, H., Wagner, E. and Zhang, H., Frank, M. M.**, Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *Journal of Experimental Medicine*. 2001. **194**(11): 1609–1616.
- 98 **Buerke, M., Murohara, T. and Lefer, A. M.**, Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1995. **91**(2): 393–402.
- 99 **Horstick, G., Heimann, A. and Götze, O., Hafner, G., Berg, O., Böhmer, P., Becker, P. et al.**, Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1997. **95**(3): 701–708.
- 100 **Lu, F., Fernandes, S. M. and Davis, A. E.**, The effect of C1 inhibitor on myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular pathology the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2013. **22**(1): 75–80.
- 101 **Chatelain, P., Latour, J. G. and Tran, D., Lorgé, M. de, Dupras, G., Bourassa, M.**, Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation*. 1987. **75**(5): 1083–1090.
- 102 **Horstick, G., Berg, O. and Heimann, A., Götze, O., Loos, M., Hafner, G., Bierbach, B. et al.**, Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of

- ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation*. 2001. **104**(25): 3125–3131.
- 103 **Frangogiannis, N. G.**, Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Current medicinal chemistry*. 2006. **13**(16): 1877–1893.
- 104 **Bujak, M., Kweon, H. J. and Chatila, K., Li, N., Taffet, G., Frangogiannis, N. G.**, Aging-related defects are associated with adverse cardiac remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008. **51**(14): 1384–1392.
- 105 **Saxena, A., Russo, I. and Frangogiannis, N. G.**, Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational research the journal of laboratory and clinical medicine*. 2016. **167**(1): 152–166.
- 106 **Amara, U., Rittirsch, D. and Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D., Huber-Lang, M.**, Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008. **632**: 71–79.
- 107 **Hindmarsh, E. J. and Marks, R. M.**, Complement activation occurs on subendothelial extracellular matrix in vitro and is initiated by retraction or removal of overlying endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*. 1998. **160**(12): 6128–6136.
- 108 **Davis, A. E., Mejia, P. and Lu, F.**, Biological activities of C1 inhibitor. *Molecular immunology*. 2008. **45**(16): 4057–4063.
- 109 **Ikeda, K., Nagasawa, K. and Horiuchi, T., Tsuru, T., Nishizaka, H., Niho, Y.**, C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 1997. **77**(2): 394–398.
- 110 **Harboe, M., Ulvund, G. and Vien, L., Fung, M., Mollnes, T. E.**, The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clinical and experimental immunology*. 2004. **138**(3): 439–446.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Vorgänge nach Myokardinfarkt.....	6
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der drei Komplementaktivierungswege	11
Abbildung 3: Generierung des C1qaKO Target Gens	18
Abbildung 4: Organentnahme	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Organentnahme.....	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode	27
Abbildung 7: TUNEL-Assay.....	33
Abbildung 8: Caspase-Activity-Assay	35
Abbildung 9: Optimierung der C3-Detektion mittels Immunfluoreszenz	39
Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Westernblots.....	45
Abbildung 11: Computergestützte Infarktgrößenbestimmung	48
Abbildung 12: Kollagennachweis mit PSR-Fluoreszenz	50
Abbildung 13: Überlebenszeiten	52
Abbildung 14: Infarktgrößen	54
Abbildung 15: Herzfrequenzen 56 Tage nach Myokardinfarkt.....	56
Abbildung 16: Hämodynamische Messungen vor Myokardinfarkt	59
Abbildung 17: Neutrophileninfiltration	60
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Makrophageninfiltration	61
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Makrophageninfiltration.....	62
Abbildung 20: Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld.....	63
Abbildung 21: TUNEL-Assay und Caspase-Activity-Assay	63
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach C3-Färbung.....	64
Abbildung 23: Westernblot mit Serumproben und einem gegen C3 gerichteten Antikörper....	65
Abbildung 24: C3-Detektion im Westernblot mit Serumproben verschiedener Tiere	66
Abbildung 25: Nachweis von C3 im linken Ventrikel	66
Abbildung 26: Detektion von zellgebundenem und inaktivem C3 im Westernblot	67
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von zellgebundenem und inaktivem C3	68
Abbildung 28: Kollagengehalt.....	69

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organgewichte vor Myokardinfarkt.....	53
Tabelle 2: Organgewichte 8 Wochen nach Myokardinfarkt	53
Tabelle 3: Echokardiographische Parameter vor Myokardinfarkt.....	55
Tabelle 4: Hämodynamische Parameter basal (vor Myokardinfarkt).....	57
Tabelle 5: Hämodynamische Parameter nach Myokardinfarkt	60

Danksagung

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Stefan Frantz für die wunderbare Betreuung. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und stand mir mit sehr gutem Rat zur Seite.

Frau PD Dr. Anna Frey und Hr. PD Dr. Ullrich Hofmann danke ich ganz herzlich für die exzellente Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Benjamin Vogel. Durch ihn habe ich die Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten entdeckt. Auch in schwierigen Phasen hat er mich immer unterstützt und zurück auf den richtigen Weg gelenkt.

Weiterhin möchte ich Helga Wagner danken, die mich in meinen ersten Tagen im Labor „an die Hand genommen“ hat. Mit ihrem umfangreichen Wissen konnte sie mir viele wichtige Tipps geben, die mir noch heute sehr nützlich sind. Sandra Umbenhauer und Andrea Leupold danke ich für die großartige Unterstützung und die Durchführung und Auswertung der echokardiographischen Untersuchungen. Charlotte Dienesch danke ich sehr für die stets zuverlässige Operation meiner Versuchstiere.

Auch alle anderen Kolleginnen und Kollegen meiner Laborgruppen die namentlich nicht genannt wurden bin ich sehr dankbar für die großartige Zeit, die sie mir beschwert haben.

Meiner Familie und meinem Freund Julian danke ich für die wunderbare Unterstützung während des letzten Jahres.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Hanna Mareike Siebert

Geburtsdatum 18.08.1991

Geburtsort Wiesbaden

Berufliche Tätigkeit

01/2018 -heute Assistenzärztin Kardiologie
Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik I

06/2018- heute Forschungsrotation, Physiologisches Institut Würzburg; AG Kuhn

Universitäre Ausbildung

07/2017 Approbation als Ärztin

10/2010 – 06/2017 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg

Schulische Ausbildung

07/2010 Allgemeine Hochschulreife, Leibniz Gymnasium Wiesbaden

Veröffentlichungen

Vogel, B., Siebert, H. and Hofmann, U., Frantz, S., Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*. 2015. **2**: 124–134.

Würzburg, den 07.09.2018

