

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

Die Rolle des Komplementfaktors C3 in der chronischen Herzinsuffizienz

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

vorgelegt von
Andreas Schenk
aus Lohr a. Main
Würzburg, August 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz

Korreferent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2010

Der Promovend ist Arzt

**Meiner Mutter, Karlheinz
sowie meinem Vater gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG.....	1
1.1 Myokardinfarkt	1
1.2 Wundheilung nach Myokardinfarkt	3
1.3 Komplementsystem und dessen Funktion bei kardialer Ischämie	7
1.4 Bisherige klinische Bedeutung.....	12
1.5 Fragestellung.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Tiermodell.....	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 Infarktinduktion	16
2.2 Immunhistochemische Nachweise.....	18
2.2.1 C3 im Gewebe.....	18
2.2.2 Neutrophile Granulozyten	21
2.3 C3-Konzentration im Serum.....	22
2.4 Echokardiographische Untersuchungen	22
2.5 Bestimmung der Apoptose-Rate (TUNEL-Methode).....	24
2.6 Kollagen-Gehalt im Gewebe	27
2.7 TGF-β-Expression	28
2.7.1 RNA-Extraktion.....	29
2.7.2 cDNA-Synthese	31
2.7.3 Realtime-quantitative PCR.....	32
2.8 Statistische Auswertung.....	37
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1 Komplementfaktor C3	38
3.1.1 C3-Gehalt im Gewebe	38
3.1.2 C3-Konzentration im Serum.....	38
3.2 Überlebenszeit.....	39
3.3 Einwanderung neutrophiler Granulozyten	40

3.4	Linksventrikuläre Dilatation.....	41
3.5	Apoptose-Rate.....	42
3.6	Kollagen-Anteil.....	42
3.7	TGF- β -Gehalt.....	43
4.	DISKUSSION	44
4.1	Aktivierung des Komplementsystems bei myokardialer Ischämie.....	44
4.2	Einfluss von C3 auf die Wundheilung nach Myokardinfarkt.....	45
4.2.1	Inflammation.....	45
4.2.2	Apoptose und linksventrikuläre Funktion.....	46
4.2.3	Kollagenstoffwechsel.....	48
4.3	Zukünftige Forschung.....	49
5.	ZUSAMMENFASSUNG	51
6.	LITERATURVERZEICHNIS	54

1. Einführung

Obwohl die malignen Erkrankungen in den westlichen Industrienationen in den letzten 30 Jahren einen immer größeren Anteil an den Todesursachen des Menschen einnehmen, belegen die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems nach wie vor mit großem Abstand den ersten Platz (Statistisches Bundesamt, 2009). Bei 42,2 Prozent aller im Jahr 2008 verstorbenen Bundesbürger wurde eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems als Todesursache angegeben. Die größte Subgruppe davon machen die ischämischen Herzkrankheiten aus, gefolgt von „sonstigen Formen der Herzkrankheit“ zu denen nach ICD-10 auch die Herzinsuffizienz zählt. Deren mit Abstand häufigste Ursachen sind wiederum die koronare Herzkrankheit und der Myokardinfarkt¹. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Lebenserwartung und des damit zunehmend häufigeren Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen wird es daher immer wichtiger sich mit den pathophysiologischen Prozessen nach einem Myokardinfarkt zu beschäftigen, um die bisherigen Therapiemöglichkeiten zu erweitern.

1.1 Myokardinfarkt

Ursache eines Myokardinfarkts ist der akute Verschluss eines Koronargefäßes durch eine Plaqueruptur, der zur abrupten Abnahme des Blutflusses distal der Okklusion führt. Dies bedingt einen akuten Sauerstoffmangel im betroffenen Gebiet. Darüber hinaus können entstandene schädliche Stoffwechselprodukte nicht mehr abtransportiert werden. Es kommt zum Zelluntergang und zum Funktionsausfall des betroffenen Myokards. Die Post-Infarkt-Phase führt zu bindegewebigen Umbauvorgängen („kardiales Remodeling“, siehe Kapitel 1.2), welche langfristig die Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz mit schlechter Prognose bedingen².

Grundlage der oben genannten Plaqueentstehung ist die Arteriosklerose. Nachgewiesene Risikofaktoren sind unter anderem Adipositas, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, familiäre Belastung sowie Alter und männliches Geschlecht³. In letzter Zeit werden auch

die chronische Niereninsuffizienz⁴ sowie depressive Erkrankungen⁵ als Risikofaktoren beschrieben. Plaques entstehen über viele Jahre und beinhalten unter anderem Lymphozyten, Makrophagen, Lipid-beladene Schaumzellen, glatte Muskelzellen, extrazelluläre Matrix und verschiedene Lipide wie LDL und HDL. Kommt es zur Plaqueruptur gerät das Innere des Plaque mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt. Es lagern sich Thrombozyten an die nun freiliegenden Inhalte. Es kommt im weiteren Verlauf auch zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung über den Faktor VII. Durch diese Mechanismen wird das Thrombuswachstum gefördert bis schließlich ein vollständiger Gefäßverschluss erreicht wird⁶.

Tierexperimentell wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass der irreversible Zelltod der Myozyten etwa 20-30 Minuten nach Verschluss der Koronararterien beginnt⁷. Es kommt wenige Zeit später zu irreversiblen Strukturschäden an den Myozyten. Dadurch werden zelluläre Proteine freigesetzt, deren Konzentration im Blutplasma nach einiger Zeit messbar ansteigt was eine wichtige Bedeutung in der Diagnostik hat. Es konnte inzwischen eine positive Korrelation zwischen der Infarktgröße und dem gemessenen Integral der freigesetzten kardialen Serummarker Troponin I oder T in der akuten Krankheitsphase gezeigt werden⁸.

Mit modernen Therapieverfahren versucht man die Ischämie-Dauer möglichst gering zu halten. In der Klinik haben sich hierzu zwei Verfahren etabliert: die Lyse, bei der der Thrombus durch Aktivatoren der Fibrinolyse aufgelöst werden soll, und die perkutane Coronarintervention (PCI), welche man als Goldstandard bezeichnen darf. Hierbei wird die Stenose mit einem arteriell eingeführten Katheter aufgesucht, anschließend dilatiert und meist mit einem Stent versorgt.

Dass die ständigen Therapieverbesserungen Erfolge verzeichnen zeigt ein Bericht der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, der die Infarktsterblichkeit der Jahre 1990 und 2003 vergleicht: „so sank die altersstandardisierte Infarktsterblichkeit bei Frauen von 48,0 auf 32,4 jährliche Infarktodesfälle pro 100000 Einwohnerinnen. Bei Männern reduzierte sich die

Sterbeziffer im selben Zeitraum von 127,6 auf 71,4“ (Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Koronare Herzerkrankung und akuter Myokardinfarkt, 2006). Doch ein großer Anteil der Überlebenden entwickelt nach dem Ereignis eine chronische Herzinsuffizienz, die eine ernste Prognose aufweist. Die mittlere Überlebensdauer ab der Stellung dieser Diagnose ist geschlechtsspezifisch: so beträgt sie nach den Daten der Framingham-Offspring-Studie für Männer 1,7 Jahre, für Frauen hingegen 3,2 Jahre⁹. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Frauen bei 38%, bei Männern bei 25%¹⁰. Zu beachten ist jedoch, dass es sich hierbei um Durchschnittswerte handelt, die Schwankungsbreite innerhalb der verschiedenen Schweregrade der Herzinsuffizienz ist enorm¹¹. Die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz in Europa liegt bei etwa 1,8%¹². In fortgeschrittenen Stadien ähneln die Prognosen durchaus denen von malignen Erkrankungen.

1.2 Wundheilung nach Myokardinfarkt

Die Fähigkeit des menschlichen Herzens zur Regeneration nach einem Myokardinfarkt ist äußerst gering. Unzählige vergangene Arbeiten hatten in den letzten Jahrzehnten zum Ziel das komplexe System der kardialen Wundheilung und der sich anschließenden Umbauvorgänge (Remodeling) zu entschlüsseln. Ein genaueres Verständnis darüber könnte in Zukunft bessere Therapieansätze für die Behandlung des akuten Myokardinfarktes liefern. Die Übersichtsarbeit von Ertl und Frantz aus dem Jahr 2004 zeigt wichtige Säulen der kardialen Wundheilung auf¹³.

Man kann im zeitlichen Verlauf folgende Phasen unterscheiden¹⁴:

- Zelltod der Kardiomyozyten - sofort
- Inflammation - erste 48h
- Proliferation - ab 48h
- Bildung von stabilem Narbengewebe - 2. Woche bis Jahre

Zunächst kommt es im ischämischen Areal zu Apoptosen und Nekrosen. Noch innerhalb der ersten Stunden setzt durch die freiwerdenden Produkte des Gewebeschadens (z.B. reaktive Sauerstoffspezies und intrazelluläre Proteine)

getriggert eine inflammatorische Reaktion ein, die als eine Antwort des Organismus auf den kardialen Schaden verstanden werden kann¹⁵. Sie stellt zugleich eine wichtige Basis der sich anschließenden Reparatur der Gewebeschäden dar an deren Ende der Umbau in kollagenes Narbengewebe mündet. Die Reaktion auf die Ischämie ist teilweise sinnvoll und nützlich, beispielsweise um die geschädigten Zellen zunächst abzuräumen. Eine überschießende Gewebeentzündung sorgt jedoch für langfristig ungünstige Umbauvorgänge.

In der frühen (inflammatorischen) Phase kommt es zur Produktion von Zytokinen wie Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin (IL) 1, IL-6 und IL-18 sowie zur lokalen Aktivierung des Komplementsystems¹⁶⁻¹⁷. Dadurch erfolgt die Aktivierung und Einwanderung von Entzündungszellen in das Infarktgebiet (besonders in dessen Grenzzone)¹⁸. Es handelt sich dabei vor allem um neutrophile Granulozyten, im weiteren Verlauf jedoch auch um Monozyten. Entscheidend an der Attraktion der Neutrophilen beteiligt sind Teile des Komplementsystems, sowie der Transforming Growth Factor β (TGF- β).

Die Einwanderung der Neutrophilen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Selektinen und Integrinen gesteuert, welche unter anderem die Adhäsion an das Endothel ermöglichen¹⁹. Gelingt die Transmigration durch das Endothel in das Gewebe, beginnen die Neutrophilen mit dem Abbau abgestorbener Kardiomyozyten. Darüber hinaus scheinen sie zwischen den Myozyten einen Zellschaden durch Freisetzung von proteolytischen Enzymen und Bildung von Superoxid-Anionen zu verursachen²⁰. Untersuchungen an Tieren ohne Neutrophile ergaben, dass sich im Ischämie-Reperfusionmodell eine signifikant geringere Infarktgröße ergeben hat, was den Rückschluss bereits 1983 nahelegte, dass die Neutrophilen einen erheblichen Anteil des Post-Infarkt-Schadens verursachen²¹.

Die Rolle von TGF- β bei myokardialer Ischämie ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Grund sind die komplexe Biologie der Aktivierung von TGF- β und die mannigfaltigen Effekte, die es ausübt. TGF- β beeinflusst jedoch bei der kardialen Wundheilung viele Zwischenschritte entscheidend. Unter

anderem führt es zur Rekrutierung der Monozyten und auch Neutrophilen in das Infarktareal. Darüber hinaus supprimiert und kontrolliert es oben genannte proinflammatorische Zytokine²². Experimentelle Inhibition von TGF- β während der proliferativen Phase bremst das kardiale Remodeling und führt zu geringerer Hypertrophie der Kardiomyozyten und zu geringerer Fibrosierung des nicht vom Infarkt betroffenen Myokards²³. Erhöhte Spiegel wiederum führen zu einer verzögerten Wundheilung²⁴. Jedoch ist die Situation in der inflammatorischen Phase umgekehrt: dort führt eine Inhibition zu erhöhter Mortalität und zu schädlicherem Remodeling²⁵. TGF- β spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.

Die extrazelluläre Matrix im Herzmuskel kann als Grundgerüst für die zellulären Bestandteile verstanden werden. Sie wird durch ein System aus verschiedenen proteolytischen Enzymen, den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), und deren Inhibitoren, den Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), kontrolliert. Physiologischerweise stehen diese Enzymsysteme im Gleichgewicht. Kommt es zur erhöhten Aktivität der MMPs, so wird das kardiale Remodeling gefördert was zu vermehrter Kollagensynthese und kardialer Fibrosierung führt. Beides schränkt langfristig die Herzfunktion ein und mündet in die Herzinsuffizienz. MMP-2-KO-Mäuse haben nach experimentellem Myokardinfarkt eine signifikant bessere Überlebensrate und eine geringere linksventrikuläre Dilatation¹³. MMP-9-KO-Mäuse wiesen ein günstigeres kardiales Remodeling nach Infarkt auf²⁶.

Etwa ab dem 2. Tag nach Infarkt beginnt sich Granulationsgewebe auszubilden; dies kennzeichnet den Übergang in die Proliferationsphase. Es erscheinen Myofibroblasten im Infarktgebiet und bestimmen sowohl Ab- als auch Aufbau der extrazellulären Matrix. Die physiologische Kollagen-Architektur wird innerhalb der ersten Woche nach Infarkt abgeräumt. Die erhöhte Aktivität von Kollagenasen wird für diesen rapiden Abbau der extrazellulären Matrix im nekrotischen Zellgebiet verantwortlich gemacht¹³. Währenddessen sorgen die Myofibroblasten jedoch auch für den Aufbau einer neuen Kollagenstruktur, die zunächst vor allem aus Kollagen Typ III besteht. Dabei ist es deren Aufgabe unter den schwierigen Bedingungen (innerhalb des kontraktiven Organs) eine

organisierte Narbe auszubilden, die den extremen Beanspruchungen dauerhaft standhalten kann. Makrophagen und Myofibroblasten wandern Tage danach von der Grenzzone in das Zentrum des Infarktes ein, um die Narbe zu stabilisieren. Im Verlauf der nächsten Wochen folgt der Übergang vom Granulations- zum Narbengewebe. In diesem Rahmen kommt es zur Vernetzung der Kollagenfibrillen, um den hohen Anforderungen standhalten zu können. Nach einigen Wochen hat sich schließlich im Idealfall eine stabile Narbe ausgebildet mit einigen jahrelang darin verbleibenden Myofibroblasten.

Ein großer Verlust von Kardiomyozyten führt aber nicht bloß zur Ausdünnung des kontraktiven Gewebes im Infarktbereich. Beachtet werden muss auch, dass nun das restliche Gewebe des Herzens Mehrarbeit zu leisten hat. Kompensatorisch entsteht daher im Verlauf eine Myokardhypertrophie²⁷⁻²⁸. Ab einem kritischen Herzgewicht von etwa 500 g kommt es aufgrund von Diffusionsbeschränkungen zu einer relativen Koronarinsuffizienz mit einer weiteren Abnahme der kardialen Leistung. Folge ist die Verstärkung des Remodelings mit weiterer Fibrosierung des Myokards und die Entwicklung einer gestörten Architektur der Kardiomyozyten²⁹. Dabei ist zunehmend auch das ursprünglich nicht durch die Ischämie geschädigte Gewebe betroffen. Das Kollagen-Syntheseverhalten verändert sich und führt zu einer gestörten Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix, welche zu Relaxationsstörungen, Arrhythmieneigung und fortschreitender ventrikulärer Dysfunktion führen kann. Als Ausdruck der Schädigung findet man im insuffizienten Herzen auch eine erhöhte Apoptose-Rate³⁰.

Zur Kompensation dieses Zustandes verfügt das erkrankte Herz über mehrere Mechanismen: über das neuroendokrine System kommt es zur Sympathikusaktivierung mit erhöhter Katecholaminausschüttung. Der Effekt von Noradrenalin (positive Inotropie) wird jedoch im Verlauf durch Beta-Rezeptor-Downregulation am Myokard immer geringer. Die vermittelte Vasokonstriktion bleibt trotzdem erhalten, langfristig erhöht sich somit für das erkrankte Herz die Nachlast. Erhöhte Plasma-Noradrenalin-Spiegel korrelieren mit einer schlechteren Prognose³¹. Ebenfalls wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-

System (RAAS) aktiviert, welches über Angiotensin II eine Vasokonstriktion erzeugt, um einen adäquaten Blutdruck aufrecht zu erhalten. Dadurch erhöht sich jedoch ebenso die Nachlast. Über Aldosteron kommt es zur Natrium- und Wasserretention, was sich durch eine Vorlasterhöhung kurzfristig positiv auf die Inotropie des Herzens auswirkt. Sowohl Angiotensin II als auch Aldosteron fördern das ventrikuläre Remodeling und stören damit langfristig die Zell-Architektur im Myokard³². Ebenfalls neuroendokrin erfolgt die Ausschüttung von Vasopressin (ADH), welches zur Vasokonstriktion und zur Wasserretention führt³³. Die genannten Mechanismen helfen kurzfristig eine adäquate Hämodynamik aufrechtzuerhalten, treiben das geschädigte Herz jedoch langfristig in fortgeschrittene Herzinsuffizienz-Stadien und sind somit auf Dauer schädlich³⁴. Klinisch eindeutig belegt ist mittlerweile der langfristige pharmakologische Nutzen von ACE-Hemmern³⁵, Aldosteron-Antagonisten³⁶ und Betablockern³⁷ nach einem Myokardinfarkt.

Die kardiale Wundheilung ist insgesamt betrachtet ein enorm komplexer Prozess, der gegenüber Störungen anfällig ist und es zudem nicht leisten kann den ursprünglichen Zustand des Gewebes wiederherzustellen. Die Reparatur-Mechanismen sind jedoch ein attraktives Ziel für zukünftige Therapieoptionen. Tierexperimentell wurde beispielsweise schon vor vielen Jahren gezeigt, dass durch einfache antiinflammatorische Therapie mit Glucocorticoiden die Infarktgröße um 35% reduziert werden kann³⁸.

1.3 Komplementsystem und dessen Funktion bei kardialer Ischämie

Auf die Rolle des Komplementsystems bei der kardialen Wundheilung soll in diesem Kapitel nach allgemeiner Einführung näher eingegangen werden.

Das Komplementsystem wird in der Literatur zum unspezifischen Immunsystem gezählt. Seine Funktion, die ihm daher primär zugeschrieben wird, ist es unmittelbar auf Krankheitserreger zu reagieren. Ursprünglich wurde es als ergänzender - also „komplementierender“ - Teil der Immunantwort entdeckt. Es besteht aus über 30 Proteinen, die in einer Gesamtkonzentration von 3 g/l im Plasma vorliegen³⁹. Die einzelnen Komplementfaktoren müssen erst

kaskadenartig aktiviert werden. Der dadurch letztendlich entstehende Membranangriffskomplex kann sich in Zellmembranen eines Erregers integrieren und dort eine Perforation herbeiführen, die zu dessen Untergang führt. Eine weitere Aufgabe des Komplements ist die Attraktion von Leukozyten. Man kennt drei verschiedene Aktivierungskaskaden: die klassische und die alternative Aktivierung, sowie den Lektin-Weg (s. Abb. 1). Die einzelnen Komponenten des Komplementsystems sind sowohl im Plasma, als auch im Gewebe enthalten⁴⁰.

(1) Die klassische Komplementaktivierung beruht auf der Triggerung durch Antikörper, die vermehrt entstehen, wenn B-Lymphozyten fremde Antigene erkennen, sich daraufhin in Plasmazellen differenzieren und spezifische Antikörper sezernieren. Die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip entstehenden Antigen-Antikörperkomplexe aktivieren den Faktor C1 des Komplementsystems. Dieser erreicht dadurch proteolytische Eigenschaften und stimuliert die Faktoren C2 und C4 mit der Folge, dass diese sich zum C4b2a-Komplex verbinden können. Auch dieser ist eine Protease („C3-Konvertase“), deren Zielprotein der Faktor C3 ist aus dem durch limitierte Proteolyse C3b entsteht. C4b2a und C3b fusionieren zu C4b2a3b („C5-Konvertase) und spalten den Faktor C5 zu C5b, einer weiteren Protease, die nun den letzten Schritt katalysiert: die Komponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 werden zum C5b-C9 Komplex gebunden. Dieser heißt Membranangriffskomplex und kann wie oben beschrieben die Lyse eines Erregers durch Porenbildung in der Zellmembran erreichen. Die Aktivierungsreihenfolge der Faktoren wurde erst entdeckt, nachdem die einzelnen Faktoren bereits von C1 bis C9 benannt waren³⁹.

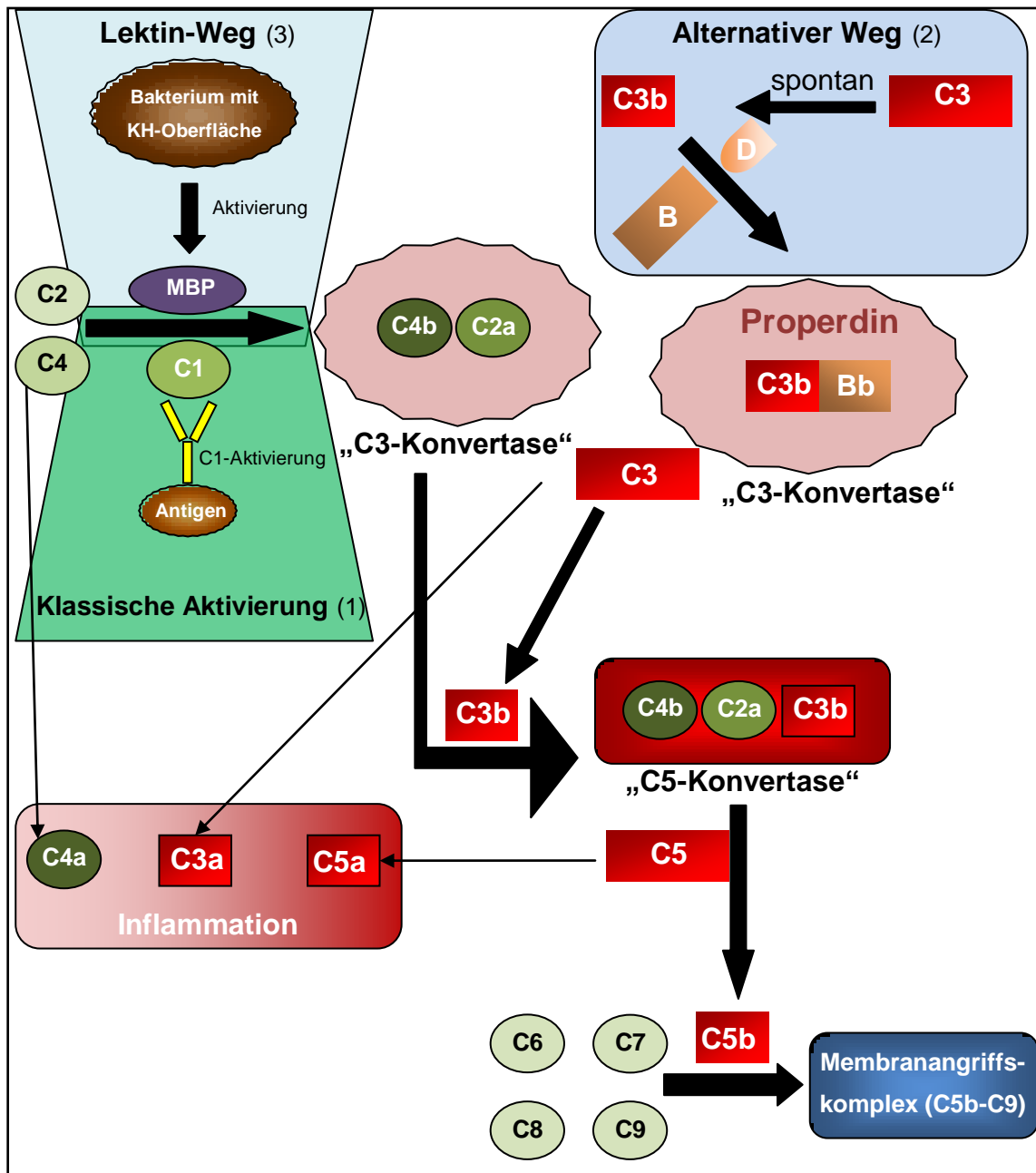


Abbildung 1: Vereinfachte, schematische Darstellung der Komplementaktivierung. Bei der klassischen Komplementaktivierung (1) wird C1 durch einen Antigen-Antikörper-Komplex aktiviert und katalysiert so die Bildung einer C3-Konvertase aus C2 und C4. Ähnlich verläuft der Lektin-Weg (3), bei dem das Mannose-bindende Protein durch kohlenhydratreiche Oberflächen aktiviert wird. Bei der alternativen Komplementaktivierung (2) entsteht eine andere C3-Konvertase (C3bBb), die aber auch C3b von C3 abspaltet. Dadurch kann mithilfe von C4b2a die C5-Konvertase gebildet werden, die letztlich über die Entstehung von C5b zur Bildung des Membranangriffskomplexes (C5b-C9) führt. C3 ist der erste Faktor der gemeinsamen Endstrecke aller drei Aktivierungswege (modifiziertes Schema nach Markiewski et al., Makrides et al.).

(2) Die sogenannte alternative Komplementaktivierung ist auf den geringen Spontanzerfall von C3 zu C3b angewiesen. Im Zusammenspiel mit den weiteren Plasmaproteinen Faktor B und D entsteht die aktivierte Protease C3bBb („C3-Konvertase“), deren Halbwertszeit durch Properdin, ein Plasmaprotein, erhöht wird⁴¹. Das durch die C3-Konvertase in größeren Mengen entstehende C3b trägt zur Spaltung von C5 zu C5b bei. C5b kann nun auch hier den Membranangriffskomplex aus C5b-C9 bilden⁴².

(3) Ebenfalls in die Entstehung des C4b2a-Komplexes (wie die klassische Aktivierung) mündet der sogenannte Lektin-Weg, der erstmals 1989 beschrieben wurde: Das sogenannte Mannose-bindende-Lektin (MBL) ist nach Bindung an Kohlenhydraten – wie zum Beispiel auf Bakterien- oder Virenoberflächen vorkommend – in der Lage C2 und C4 zu aktivieren. Der weitere Weg erfolgt analog der Aktivierung des klassischen Komplementsystems und führt ebenso zur Bildung des Membranangriffskomplexes⁴³.

Eine Schlüsselposition nimmt der Faktor C3 ein, da ohne ihn keiner der drei Aktivierungswege zur Bildung des Membranangriffskomplexes führen kann. Er stellt den Beginn der gemeinsamen Endstrecke dar (siehe Abb. 1).

Außer den bereits erläuterten Faktoren entstehen durch die proteolytischen Prozesse noch folgende Proteine: aus C4 entsteht neben dem genannten C4b zusätzlich C4a. Aus C5 entsteht nicht nur C5b, sondern auch C5a. C3 bringt durch limitierte Proteolyse außer C3b auch noch C3a hervor. C3a, C4a und C5a sind nicht an der Bildung des Membranangriffskomplexes beteiligt, aber sie sind äußerst potente Entzündungsmediatoren. Eine der Aufgaben ist die chemotaktische Attraktion von Neutrophilen in das Gewebe. Am stärksten wirkt dabei C5a, gefolgt von C3a. Die niedrigste inflammatorische Potenz hat C4a⁴⁴.

Es existieren schon seit längerem Untersuchungen und Hinweise auf die enge Verzahnung zwischen dem Komplementsystem und dem akuten Ischämie-Schaden nach Myokardinfarkt. Wird die Komplementaktivierung exzessiv gesteigert, so kann sich ein nicht unerhebliches pathogenetisches Potential

entwickeln. 1971 zeigten Hill und Ward im Rattenmodell erstmals, dass myokardiale Ischämien die Aktivierung des Komplementsystems induzieren und dass dieses somit auch an nicht-immunologischen Aufgaben beteiligt ist⁴⁵. Yasojima et al. konnten in akuten und auch in älteren Myokardinfarktarealen ein gesteigertes Vorkommen an Proteinen des Komplementsystems nachweisen. Auch die zugehörigen mRNAs stiegen nach einem Myokardinfarkt selektiv im Herzen an⁴⁶. Damit wurde gezeigt, dass das Herz bei Ischämie endogen Komplementfaktoren produziert. Am Rattenmodell demonstrierten Sumitra et al., dass nach einem durch Koronararterienligatur herbeigeführten akuten Myokardinfarkt die Komplementaktivierung nach 8 Stunden begann⁴⁷.

Zusammen mit Zytokinen spielt das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der chemotaktisch-vermittelten Rekrutierung von Neutrophilen in Ischämie-Gebiete⁴⁸. Diese wandern überwiegend in die Grenzzone (area of risk) und weniger in das Zentrum des Ischämie-Gebietes ein¹⁸.

Bisherige Studien zum Einfluss des Komplementsystems auf hypoxische Gewebeschäden konzentrierten sich überwiegend auf Ischämie-/Reperfusionenversuche, bei denen der Blutfluss in einer Herzkranzarterie nur für eine bestimmte Zeit unterbunden und anschließend wieder freigegeben wird. Der Versuchsaufbau entspricht in der Praxis also weitgehend einem Myokardinfarkt mit zeitnaher Revaskularisation. Man weiß seit einiger Zeit, dass es dabei jedoch auch zum sogenannten „Reperfusionsschaden“ kommt. Viele Arbeiten existieren zu diesem Thema bereits für andere Organsysteme, mehrere dazu in den Arbeitsgruppen um M. Carroll: so berichteten Weiser et al. dass Mäuse, die kein C3 produzieren konnten, verglichen mit Wildtypieren einen geringeren Ischämie-/Reperfusionen-Schaden im Skelettmuskel aufwiesen⁴⁹. Im Modell der mesenterialen Ischämie mit anschließender Reperfusion zeigten Zhang et al. auf, dass natürliches IgM das Komplementsystem durch den Lektin-Weg aktiviert⁵⁰.

Im renalen Ischämie/Reperfusionenmodell zeigten Zhou et al. durch deren Experimente, dass C3-Knockout-Mäuse vor einem Ischämie-Schaden weitgehend geschützt sind. Ursache sind zum einen die verminderte

Neutrophilen-Einwanderung und zum anderen auch die verringerte Bildung des Membranangriffskomplexes⁵¹. C4-Knockout-Mäuse wiederum erfuhren keinen derartigen Schutz, was auf die besondere Bedeutung von C3 hindeutet. C3-Knockout-Mäuse können darüber hinaus auch kein C3a bilden, womit ein wichtiger Faktor für die Chemotaxis fehlt.

Dass Komplementinhibition den Ischämie-/Reperfusionsschaden auch am Myokard zu reduzieren vermag, konnten unter anderem La Bonte et al. demonstrieren⁵².

Im Mittelpunkt bei Ischämie-/Reperfusion-Versuchen steht die Betrachtung des akuten Ischämie-Schadens. Unser Fokus lag auf der chronischen Herzinsuffizienz, die durch einen Myokardinfarkt ausgelöst wurde, der nicht revascularisiert wurde. Diese sogenannte permanente Koronarligation, die von uns und auch anderen Arbeitsgruppen herangezogen wurde⁵³⁻⁵⁴, eignet sich dazu das Remodeling nach Myokardinfarkt zu untersuchen. Zum jetzigen Zeitpunkt findet man in der Literatur kaum Daten zur Rolle des Komplementsystems in der chronischen Herzinsuffizienz.

1.4 Bisherige klinische Bedeutung

Klinische Bedeutungen des Komplementsystems in der Kardiologie werden seit langem geprüft. So haben Engstrom et al. untersucht, ob hohe Plasmaspiegel von C3 und C4 mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von kardiovaskulären Ereignissen einhergehen. Es konnte in einem 18-Jahre-Beobachtungszeitraum eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen der Komplementfaktoren und der Menge kardiovaskulärer Ereignisse gezeigt werden, teilweise auf dem Boden von erhöhten klassischen Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie oder Hypercholesterinämie⁵⁵. Clark et al. zeigten 2001, dass die Serumspiegel des Membranangriffskomplexes (C5b-C9) bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz signifikant höher waren als bei einer Kontrollgruppe. Ferner gingen besonders hohe Serumspiegel mit schwerwiegenderen Herzinsuffizienzstadien einher⁵⁶.

Noch kein Konsens herrscht derzeit in der Frage darüber, ob die therapeutische Modulation des Komplementsystems beim Myokardinfarkt das Outcome beeinflusst: Bei der Auswertung mehrerer Studien mit insgesamt 5916 Patienten konnten Mahaffey et al. erkennen, dass Patienten nach Myokardinfarkt oder nach Bypassoperation bei Gabe von Pexelizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen C5, eine signifikant geringere 30-Tage-Mortalität gegenüber Placebo aufwiesen⁵⁷. Auf der anderen Seite stellten Armstrong et al. in einer multizentrischen, prospektiven Doppel-Blind-Studie fest, dass die Gabe von Pexelizumab bei STEMI zusätzlich zur PCI die Mortalität nicht senken konnte und damit die hohen Erwartungen enttäuschte (n=5745)⁵⁸.

Im Jahr 2003 wurde in einer Arbeit von Granger et al. Patienten mit STEMI, die sich einer PCI unterzogen, der C5-Inhibitor Pexelizumab verabreicht. Der Versuchsaufbau entspricht einem Ischämie-/Reperfusion-Versuch. In dieser Studie kam es zwar zu keinem messbaren Effekt auf Infarktgröße, jedoch zu einer Reduktion der Mortalität wenn die Patienten eine Pexelizumab-Bolusgabe und anschließend eine kontinuierliche Infusion erhielten⁵⁹. Eine ähnliche Untersuchung existiert für Patienten mit STEMI, die eine Lysetherapie erhielten. Hier kam es allerdings weder bei einfacher Bolusgabe von Pexelizumab, noch bei Bolusgabe und anschließender kontinuierlicher Infusion zu messbaren, positiven Veränderungen⁶⁰. Die Tatsache, dass Fibrinolytika starke Aktivator des Komplementsystems sind - und somit die Vorteile der Komplementinhibition aufheben - vermag zumindestens die Ergebnisse für die mit einer Lysetherapie behandelten Patienten zu erklären⁶¹.

Es stellt sich jedoch berechtigterweise die Frage, ob C5 überhaupt der richtige bzw. der ideale Angriffspunkt ist. Aus pathophysiologischen Gründen lässt sich ableiten, dass die ideale Hemmung der Komplementkaskade beim Faktor C3 ansetzen müsste („Schlüsselposition“ der Komplementkaskade, siehe Kapitel 1.3) und nicht bei C5. Dadurch könnte die Komplementkaskade in ihrer Gesamtheit effektiver gehemmt werden. Jedoch sind dem Verfasser keine Studien mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen den Faktor C3 bekannt. Dadurch müsste auch das inflammatorische C3a in der Entstehung

gehemmt werden, was bei der Inhibition von C5 nicht funktioniert. Möglicherweise liegt hier die Ursache für die bisher teilweise eher enttäuschenden Ergebnisse mit dem C5-Antikörper.

Ähnliche Ziele versuchte man mit dem C1-Esterase-Inhibitor (C1INH) zu erreichen. Diese Serin-Protease kontrolliert die Aktivierung des Komplementsystems und kann als dessen einziger natürlicher Inhibitor angesehen werden. Beispielsweise führte in der Arbeit von Buerke et al. im Ischämie-Reperusionsmodell bei Katzen die Gabe von C1INH kurz vor der Reperfusion zu einer um 65% reduzierten Infarktgröße. Es kam hier zu einer verringerten Serum- und Gewebe-Myeloperoxidase-Aktivität, so dass gefolgert wurde, dass ein Teil des kardioprotektiven Effekts dieses Versuches auf die verminderte Neutrophilen-Einwanderung zurückzuführen ist⁶². Diese Ergebnisse wurden 1995 von Murohara im Rattenmodell bestätigt⁶³. Durch die C1INH-Behandlung kam es zu verminderten zirkulierenden Spiegeln der Anaphylatoxine C3a und C5a, was die Autoren als Ursache für den positiven Effekt ansahen⁶⁴.

1.5 Fragestellung

Trotz der enormen Verbesserung des Therapie-Regimes in den letzten Jahren stirbt immer noch ein beträchtlicher Anteil der Bevölkerung am Myokardinfarkt und an dessen Folgen. Aus Ischämie-/Reperusions-Experimenten ist bekannt, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in Bezug auf den akuten Ischämie-Schaden am Herzen spielt. Es gibt jedoch nur wenige Daten zur Bedeutung des Komplementsystems in der chronischen Herzinsuffizienz. Und auch in klinischen Studien konnte bisher noch kein durchschlagender Erfolg verzeichnet werden, wenn es darum ging das Komplementsystem nach Myokardischämie therapeutisch zu modulieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Rolle des Komplementsystems im Modell des chronischen Myokardinfarktes – und damit der chronischen Herzinsuffizienz - tiefergehend zu untersuchen. Gemäß dem bisherigen Kenntnisstand sollte das Ausschalten des Komplementsystems durch eine

Verringerung des inflammatorischen Schadens einen positiven Einfluss auf die Veränderungen am Myokard haben. Dazu wurden Wildtypmäuse mit intaktem Komplementsystem und C3-Knockout-Mäuse herangezogen. Im Gegensatz zu einer medikamentösen Inhibition muss man hierbei nicht mit unerwünschten pharmakologischen Wirkungen rechnen. Untersucht wurden im Einzelnen die Überlebenszeit, die linksventrikuläre Dilatation, die Apoptose-Rate, die Einwanderung von Neutrophilen sowie der Kollagen- und TGF- β -Gehalt im Myokardgewebe nach experimentellem Myokardinfarkt. Außerdem erfolgten bei beiden Tiergruppen Kontrollen auf den C3-Gehalt sowohl im Gewebe als auch im Plasma.

Die gewonnenen Daten sollen zeigen, ob C3 ein attraktives Ziel zur Verbesserung der kardialen Wundheilung nach Myokardinfarkt darstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell

2.1.1 Versuchstiere

Für die Studie wurden C3-Knockout-Mäuse herangezogen und mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Die Tiere wurden bezogen vom „Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, Maine, USA). Die Tiere mit der homozygoten Mutation im C3-Gen entwickeln sich normal und sind fruchtbar. Beschrieben wird eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Streptokokken der Gruppe B. Ein Teil der kodierenden Region des C3-Gens wurde durch eine PGK/Neo-Kassette ersetzt. Dieses Gen-Konstrukt wurde in embryonale Stammzellen übertragen (129S4/SvJae derived J1 ES cells). Die erfolgreich veränderten Stammzellen wurden anschließend in 3,5 Tage alte C57BL/6-Blastozysten injiziert und in den Uterus von weiblichen Mäusen übertragen. Die männlichen chimären Mäuse wurden dann mit C57BL/6-Weibchen gekreuzt. Während unserer Versuche prüften wir, dass die Tiere kein C3 produzieren konnten.

Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Mäuse sechs bis acht Wochen alt, deren Gewicht betrug zwischen 20 und 28 Gramm. Gleiche Werte galten für die Kontrollgruppe. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20° Celsius und einer Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten. Wasser und Spezialfutter für Mäuse stand den Tieren ausreichend zur Verfügung. Die Genehmigung für diese Studie lag vor.

2.1.2 Infarktinduktion

Spezifische Materialien

- Beheizbare 20x20cm große Platte
- Wärmelampe
- Endotracheal-Tubus (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Beatmungsgerät „Mouse Ventilator“ (UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien)

- EKG-Gerät (cardiofax GEM, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H., Deutschland)
- Medizinischer Sauerstoff
- Narkosemittelverdampfer Dräger Vapor 2000 (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland)
- Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- OP-Besteck (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Vicrylfäden (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Temgesic® (Essex Pharma, München, Deutschland)

Der Myokardinfarkt wurde bei allen Studientieren operativ herbeigeführt. Die Mäuse wurden endotracheal intubiert und an ein spezielles Kleintier-Beatmungsgerät angeschlossen. Dieses generiert sehr kleine Atemzugvolumina bei hoher Frequenz, so dass auf die Atemphysiologie der Tiere Rücksicht genommen werden konnte. Die Maus wurde in Rückenlage auf eine beheizbare Platte gelegt, außerdem wurden deren Extremitäten mit Klebestreifen an dieser fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde dem Atemgas (reiner Sauerstoff) Isofluran als Inhalationsnarkotikum beigemischt. Eine Messung der inspiratorischen Isoflurankonzentration erfolgte nicht, die Dosierung während der OP erfolgte über den Narkosemittelverdampfer anhand von Vigilanz und Herzfrequenz. Dazu wurde die Maus an ein EKG-Gerät angeschlossen und zusätzlich vor Beginn der OP ein EKG abgeleitet und archiviert. Nach dem Hautschnitt eröffnete man den Thorax und präparierte bis zum Herzen weiter. Dann wurde am schlagenden Organ der Ramus interventricularis anterior aufgesucht und mit einem Vicrylfaden umstochen und ligiert, so dass sich ein tiefer, vollständiger Infarkt ausbreiten konnte. Der Erfolg der Maßnahme ließ sich nach kurzer Zeit am EKG anhand von ST-Strecken-Veränderungen dokumentieren. Nach Adaptation der verschiedenen Gewebeschichten erfolgte der Hautverschluss durch Klammern. Bei OP-Ende wurde die Isofluranzufuhr beendet und die Maus bis zum Aufwachen mit reinem Sauerstoff weiterbeatmet. Bei zunehmender Vigilanz extubierte sich die Maus durch Kopfbewegungen in der Regel selbst. Zur postoperativen Analgesie

wurde 0,1 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®) subcutan appliziert. Nach der Aufwachphase unter einer Wärmelampe wurde die Maus zurück in den Käfig gebracht. Die Operationen wurden stets von derselben Medizinisch-Technischen-Assistentin durchgeführt, die im Bereich der Kleintier-Operation über jahrzehntelange Erfahrung verfügt. Damit war sichergestellt, dass die Methode standardisiert durchgeführt wurde.

2.2 Immunhistochemische Nachweise

2.2.1 C3 im Gewebe

Spezifische Materialien

- Demineralisiertes H₂O, Ethanol, Xylol, H₂O₂
- PBS-Lösung (Phosphate buffered saline)
- Primärer Antikörper: F(AB')₂ Goat Anti-Mouse Complement C3, #55474 (Cappel Laboratories, West Chester, USA)
- Sekundärer Antikörper: Vector BA-5000 = biotinylierter Antikörper Anti-Goat IgG, hergestellt in Kaninchen (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Vectastain ABC Kit PK-6100 (Vector Laboratories, Burlingame, USA): enthält reines Kaninchen-Serum (als Blockierungslösung), biotinylierte Meerrettich-Peroxidase, Avidin und einen unspezifischen primären Antikörper (zur Kontrolle).
- Diaminobenzidin= DAB (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Enthellan (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Mithilfe immunhistochemischer Arbeitsmethoden lassen sich selektiv bestimmte Oberflächenantigene markieren und nachweisen. Dabei werden spezifische Antikörper verwendet, die an Antigene (bzw. Epitope) der Struktur, die man nachweisen möchte, binden. So ist es für unsere Studie möglich gewesen den Komplementfaktor C3 in verschiedenen Gewebeschnitten nachzuweisen und dessen Häufigkeit bzw. Verteilung zu vergleichen.

Allgemeine Methodenbeschreibung: In einem ersten Schritt wird das Gewebepräparat entparaffiniert und hydriert. Zur Vermeidung von unspezifischen Kreuzreaktionen, die falsch-positive Ergebnisse verursachen würden, behandelt man die Gewebeschnitte vor der eigentlichen Färbereaktion mit einer Blockierungslösung, die unspezifische Oberflächenmerkmale abschirmt. Diesen Zweck erfüllt beispielsweise das Normalserum der Spezies von der die sekundären Antikörper gewonnen wurden. Anschließend inkubiert man das Gewebe mit dem primären Antikörper, der fest an die gesuchte Zielstruktur bindet. Der Antikörper erkennt den Faktor C3 nicht in seiner Ganzheit, sondern bindet an ein darauf vorkommendes Epitop, welches möglichst spezifisch für C3 ist. Nun ist die Zielstruktur zwar durch die Antikörperbindung markiert, aber noch nicht sichtbar gemacht worden. Für diesen Zweck gibt man einen sekundären Antikörper hinzu, der an kein Epitop von C3, sondern an den primären Antikörper bindet mit der Aufgabe ein detektierbares Signal abzugeben. Hierzu ist er mit einem Farbstoff beladen. Beim zweiten Antikörper handelt es sich um Immunglobuline derjenigen Spezies, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde. In vielen Fällen ist das durch das bis hier beschriebene Verfahren hervorgebrachte Signal jedoch zu schwach. Zur Verstärkung setzen wir die sogenannte Avidin-Biotin-Complex(ABC)-Methode ein⁶⁵. Dabei ist der sekundäre Antikörper mit Biotin, das von Avidin gebunden wird, beladen. Diese Bindung ist so fest, dass sie als irreversibel angesehen werden kann. Da Avidin insgesamt vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, kann es, am sekundären Antikörper gebunden, noch zusätzliche biotinylierte Markermoleküle binden. Bei dieser Methode wird dafür biotinylierte Meerrettich-Peroxidase zugegeben. Zum Färben wird schließlich Diaminobenzidin (DAB) hinzugefügt, welches der Peroxidase als Substrat dient und ein braunes Endprodukt hervorbringt. Das Epitop wird somit verstärkt markiert. Bei Verwendung der ABC-Methode ist es vor der Färbung nötig die Gewebe mit H₂O₂ zu behandeln, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Ansonsten käme es zu falsch-positiven Signalen.

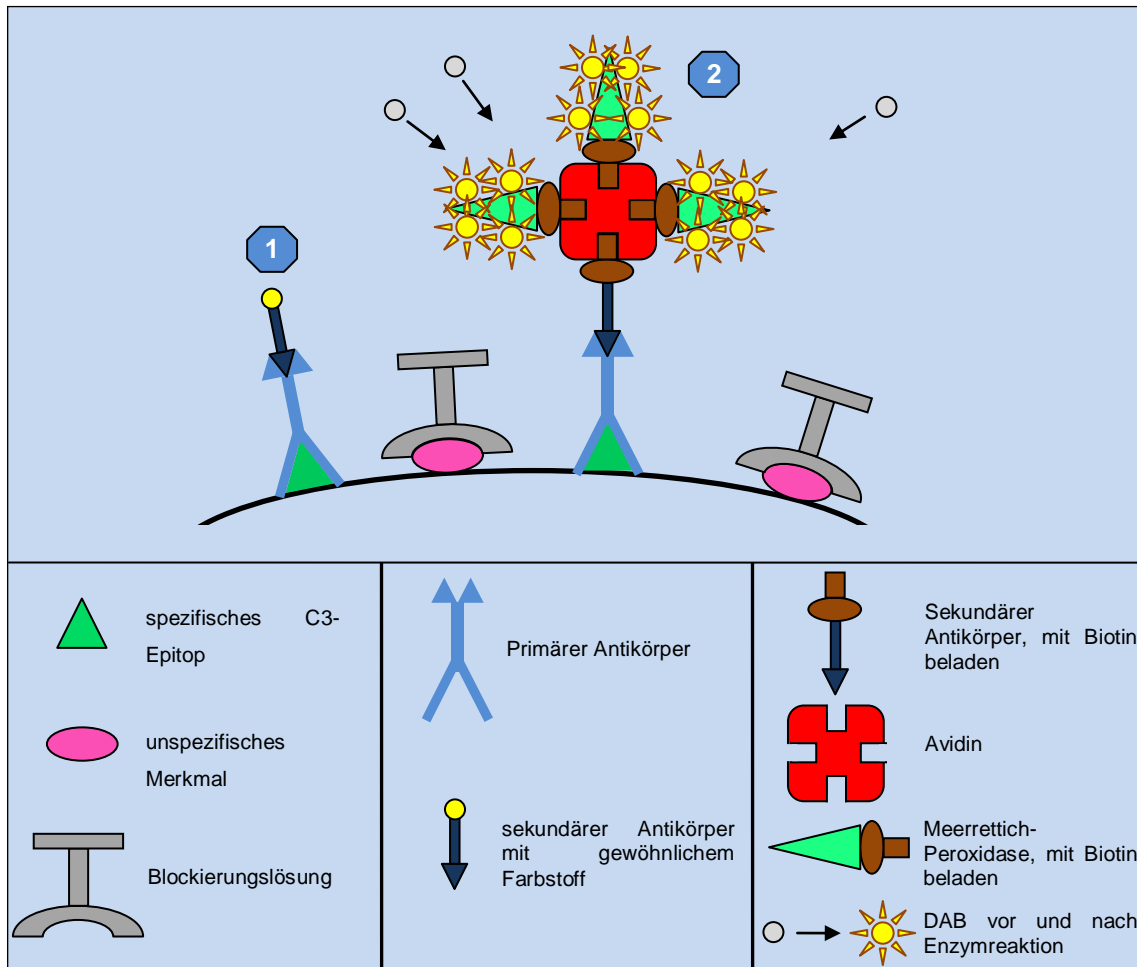


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Signalverstärkung durch die ABC-Methode (nach www.vectorlabs.com vom 11.03.2009). Bei der Anfärbung des Epitops durch einen primären und sekundären Antikörper mit gewöhnlichem Farbstoff entsteht in vielen Fällen ein schwaches Signal (1). Durch die ABC-Methode entsteht ein großer Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Dieser kann das Signal extrem verstärken, indem er eine Farbreaktion von DAB katalysiert (2). Nähere Einzelheiten siehe Text.

Detaillierter Arbeitsablauf: Die Paraffinschnitte wurden nach interner Laborvorschrift in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe (absolut, 95%, 90%, 80% und 70%, jeweils mit demineralisiertem Wasser verdünnt) entparaffiniert, und anschließend 5 Minuten in demineralisiertem Wasser hydriert. Dann wurden sie getrocknet und mit 2 Tropfen H₂O₂ (3%) versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase in der feuchten Kammer werden sie in PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden dann 20 Minuten mit der Blockierungslösung behandelt (5%iges Kaninchen-Serum, gelöst in PBS). Daraufhin erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:500). Zur Kontrolle wurden entsprechende Schnitte über Nacht

mit einem unspezifischen Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper wurde abgeklopft und die Schnitte wurden dreimal jeweils 5 Minuten gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen (Verdünnung 1:200 in Blockierungslösung). Die Einwirkzeit betrug hier 120 Minuten. Auch dieser wurde danach dreimal jeweils 5 Minuten gründlich mit PBS entfernt.

Danach erfolgte die 30-minütige Inkubation mit Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase. Auch nach diesem Schritt wurden die Schnitte wieder dreimal jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Gewebepräparate 10 Minuten lang in DAB entwickelt, um die gewünschte Farbreaktion zu erhalten. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben erneut in PBS gewaschen, nach internen Laborvorschriften dehydriert und schließlich in Enthellan eingebettet. Nun konnte man die Verteilung des Komplementfaktors C3 unter dem Mikroskop betrachten.

2.2.2 Neutrophile Granulozyten

Spezifische Materialien (siehe auch 2.2.1)

- Primärer Antikörper: Rat Anti-Mouse neutrophiles monoclonal, clone 7/4 (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
- Sekundärer Antikörper: BA-4001, Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame CA, USA)

Der Nachweis von neutrophilen Granulozyten erfolgte immunhistochemisch analog den Erläuterungen aus Kapitel 2.2.1 (siehe dort). Der primäre Antikörper markiert in diesem Fall ein neutrophilen-spezifisches Epitop. Als Kontrolle wurden auch bei diesem Versuch Gewebeschnitte mit einem unspezifischen Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte genauso wie beim Nachweis von C3 die Verstärkung des Signals durch den Einsatz der Avidin-Biotin-Methode. Nun konnten die neutrophilen Granulozyten unter entsprechender Vergrößerung ausgezählt werden.

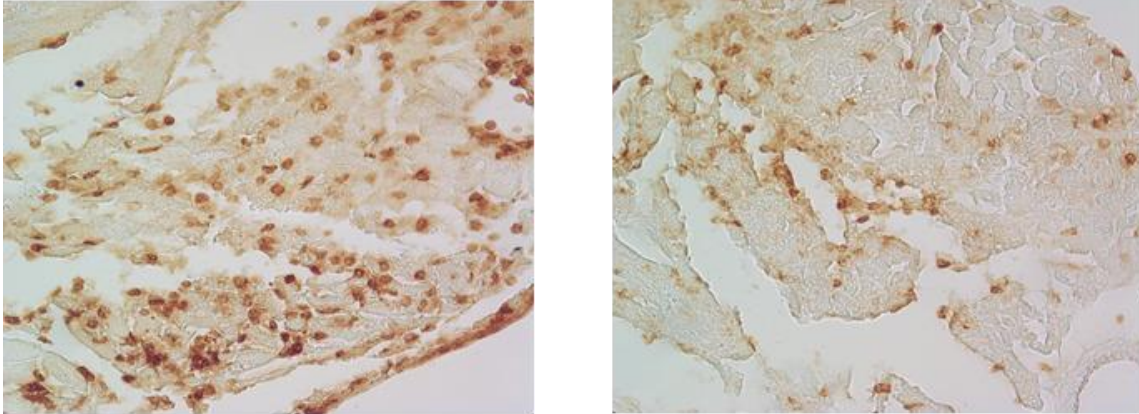


Abbildung 3: Immunhistochemische Anfärbung von neutrophilen Granulozyten bei zwei unterschiedlichen Gewebeschnitten. Im linken Schnitt findet sich eine deutlich größere Anzahl dieser Zellen als im rechten Bild.

2.3 C3-Konzentration im Serum

Spezifische Materialien:

- Cobas Integra 800 mit Testkit „Tina-quant Complement C3c ver.2“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Bei 2 Wildtyp- und 14 Knockout-Tieren wurden jeweils die C3-Konzentrationen im Serum ermittelt. Bei einer korrekten Züchtung darf hier bei den Knockout-Tieren selbstverständlich kein C3 nachzuweisen sein. Für diese Bestimmung wurde Mäuse-Serum an ein externes Labor gesandt. Dort wurde der in-vitro-Test mit einem Cobas Integra System von Roche zur quantitativen Bestimmung von C3 durchgeführt. C3 bildet bei diesem immunologischen Trübungstest mit einem spezifischen Antiserum einen Niederschlag, der turbidimetrisch bei 340nm gemessen wird. Die Bestimmungen wurden vom externen Labor nach den Vorschriften der Firma Roche durchgeführt.

2.4 Echokardiographische Untersuchungen

Spezifische Materialien

- Ultraschallgerät Toshiba Aplio (TOSHIBA Medical Systems GmbH Deutschland, Neuss, Deutschland) mit 14 MHz-Schallkopf
- Medizinischer Sauerstoff
- Narkosemittelverdampfer Dräger Vapor 2000 (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, Deutschland)

- Isofluran (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- Atemmaske für Kleintiere (FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland)

Als bildgebendes Verfahren zur Herzdarstellung wurde die Echokardiographie gewählt. Dies hat sich bei Mäuseherzen inzwischen als sehr gutes nicht-invasives Verfahren zur Quantifizierung von pathologischen Befunden nach Myokardinfarkt bewährt⁶⁶. Die Studientiere wurden sowohl unmittelbar vor der Infarktinduktion sowie an den Tagen 1 und 21 nach der Koronarligation echokardiographisch untersucht. Zum Einsatz kam ein 14 MHz-Schallkopf, welcher die notwendige hohe Auflösung bei ausreichender Eindringtiefe lieferte. Auch wurden alle Untersuchungen von derselben Medizinisch-Technischen Assistentin, die über eine langjährige Erfahrung in der Echokardiographie von Mäusen verfügt, durchgeführt. Somit waren untersucherabhängige Unterschiede minimiert. Ausgewertet wurden die Daten mit der Software Image Arena (TomTec, Unterschleißheim, Deutschland).

Über eine Atemmaske wurde den zu untersuchenden Tieren zur Narkotisierung ein Atemgemisch aus Sauerstoff und Isofluran angeboten. Auch während der Echokardiographie wurde die Narkose durch Isofluran aufrechterhalten, welches über eine Maske zugeführt wurde. Dabei atmete die Maus spontan. Die Steuerung der Narkosegaskonzentration erfolgte anhand klinischer Parameter. So wurde eine Herzfrequenz zwischen 500 und 580 Schlägen pro Minute angestrebt. Bei deutlich niedrigeren Frequenzen dilatieren die Herzen zu sehr. Während der Untersuchungsphase wurden dafür am Narkosemittelverdampfer Konzentrationen zwischen 0,4 und 1,0 Vol.-% Isofluran eingestellt. Die schlafende Maus wurde während der Prozedur auf den Rücken gelegt und die Extremitäten wurden mit Klebeband an einer Platte fixiert. Zur Aufzeichnung des EKG wurden Nadel-Elektroden verwendet, die unter der Haut platziert werden. Die Untersuchungsdauer betrug mit Vorbereitungen insgesamt etwa 5 bis 15 Minuten. Erhoben wurden sowohl im B- als auch im M-Mode end-systolische (ESA) und end-diastolische Ventrikelfläche (EDA) bzw. end-systolischer (ESD) und end-diastolischer

Ventrikeldurchmesser (EDD). Dies geschah jeweils apikal und auf Höhe des mittleren Papillarmuskels. Aus diesen Daten ließ sich die sogenannte prozentuale systolische Verkürzungsfraction ermitteln (engl. FS = fractional shortening):

$$\text{FS in \%} = (\text{EDD} - \text{ESD}) \times 100 / \text{EDD}$$

Die FS, deren Normwert > 25% ist, korreliert gut mit der Ejektionsfraction des Herzens⁶⁷. Dieser Parameter gilt deshalb als Maß für die Kontraktilität. Der in dieser Studie von uns vorrangig betrachtete Parameter war die endsystolische Fläche des linken Ventrikels.

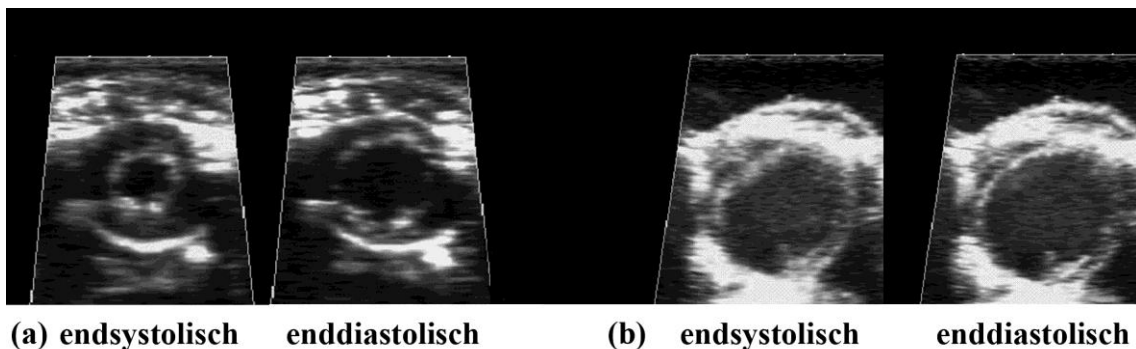


Abbildung 4: Darstellung unterschiedlich gut kontrahierender Herzen. Im Beispiel (a) ist die gute Kontraktion zu erkennen mit geringer endsystolischer Fläche. Im Beispiel (b) erkennt man ein vergleichsweise dilatiertes Herz mit nur geringer Kontraktion und dementsprechend großer endsystolischer Fläche.

2.5 Bestimmung der Apoptose-Rate (TUNEL-Methode)

Spezifische Materialien

- Objektträger mit paraffiniertem Gewebeschnitt
- Ethanol, Xylol, DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)
- Triton-X-100 (0,1%)
- PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)
- In situ Cell Death Detection Kit (Roche, Penzberg, Deutschland): Label-Solution (enthält Nukleotid-Mix in Pufferlösung), Enzyme-Solution (enthält rekombinante Kalbs-TdT aus E. coli)

- DNase (3000 U/ml in 50 mM Tris-HCl)
- Citrat-Puffer (0,1 M, pH 6.0)
- Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Software „Axioskop 2“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)

Allgemeine Methodenbeschreibung: Die Ischämie ist einer der unphysiologischen Zustände, die zu einer abnormalen Regulation der Apoptose führen. Um die jeweilige Rate an Zellen, die sich in der Phase der Apoptose befinden, in den verschiedenen Gewebeschnitten zu ermitteln und zu vergleichen wurde von uns die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) verwendet. Anders als man wegen des Akronyms vermuten würde lässt sich die Reaktion jedoch nicht ausschließlich mit dUTP-Biotin realisieren, sondern zum Beispiel auch mit Fluoreszin-dUTP. Bei dieser erstmals 1992 beschriebenen Vorgehensweise macht man sich die Tatsache zunutze, dass Zellen im Apoptosevorgang ihre DNA mittels Calcium-abhängigen Endonukleasen in viele kleine Bruchstücke fragmentieren⁶⁸. An Einzelstrangbruchstellen liegen nun freie 3'OH-Gruppen vor, die bei diesem Verfahren in einem ersten Schritt durch das Enzym TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) mit Fluoreszin-dUTP verknüpft werden. Fluoreszin-dUPT emittiert grünes Licht, welches in einem zweiten Schritt mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Dadurch wird eine statistische Auswertung auf Einzelzellebene ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Methode auch sehr frühe Apoptosestadien identifiziert. Bei der Reaktion werden bevorzugt apoptotische und weniger nekrotische Zelluntergänge markiert, es liegt also eine gewisse Spezifität für Apoptose vor. Die von uns verwendete Methode wurde von Sgonc et al. 1994 publiziert⁶⁹.

Detaillierter Arbeitsablauf: Zu Beginn wurde der entsprechende Gewebeschnitt entparaffiniert. Dazu benutzte man Xylol und anschließend eine Ethanolreihe in absteigender Konzentration (absolut, 95%, 90%, 80% und 70%, jeweils mit demineralisiertem Wasser verdünnt).

Das Gewebe, bzw. der Objektträger, wurde nun mit 0,1% Triton-X-100 in 0,1%igem Citratpuffer 8 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert, anschließend mit demineralisiertem Wasser gespült und dreimal 5 Minuten lang mit PBS inkubiert.

Für 20 Untersuchungen benötigte man 500 µl der TUNEL-Reaktionslösung. Dazu pipettierte man 450 µl Label-Solution und 50 µl Enzyme-Solution zusammen und vortexte den entstandenen Reaktions-Mix. Für die eigentliche Reaktion gab man 25 µl des TUNEL-Reaktions-Mix hinzu und inkubierte den Objektträger 60 Minuten lang bei 37°C in einer dunklen, feuchten Kammer. Anschließend erfolgte die Zugabe von DAPI (10 mg/2 ml und 1:1000 verdünnt), um die Zellkerne anzufärben. Diese Markierungsreaktion wurde nach 10 Minuten beendet. Zum Schluss wurde der Gewebeschnitt dreimal jeweils 5 Minuten lang mit PBS gewaschen.

Dann konnten die Ergebnisse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden. Zur Auswertung am PC wurden Fotos mittels einer speziellen Kameraausrüstung aufgenommen. Die Auszählung der TUNEL-positiven Kardiomyozyten (grüne Fluoreszenz) außerhalb des Infarktareals erfolgte per Hand. Dabei wurden nur die TUNEL-positiven Kerne mit blauen Kernen gezählt, die innerhalb des Bereichs liegen, der bestimmt werden sollte (z.B. Boarderzone des Infarkts).

Die Negativkontrollen behandelte man nur mit 25 µl Label-Solution (ohne Enzyme-Solution), die Positivkontrollen wurden vor der TUNEL-Reaktion zusätzlich 10 Minuten lang bei 20 °C mit DNase behandelt, um ausreichend DNA-Strangbrüche zu induzieren.

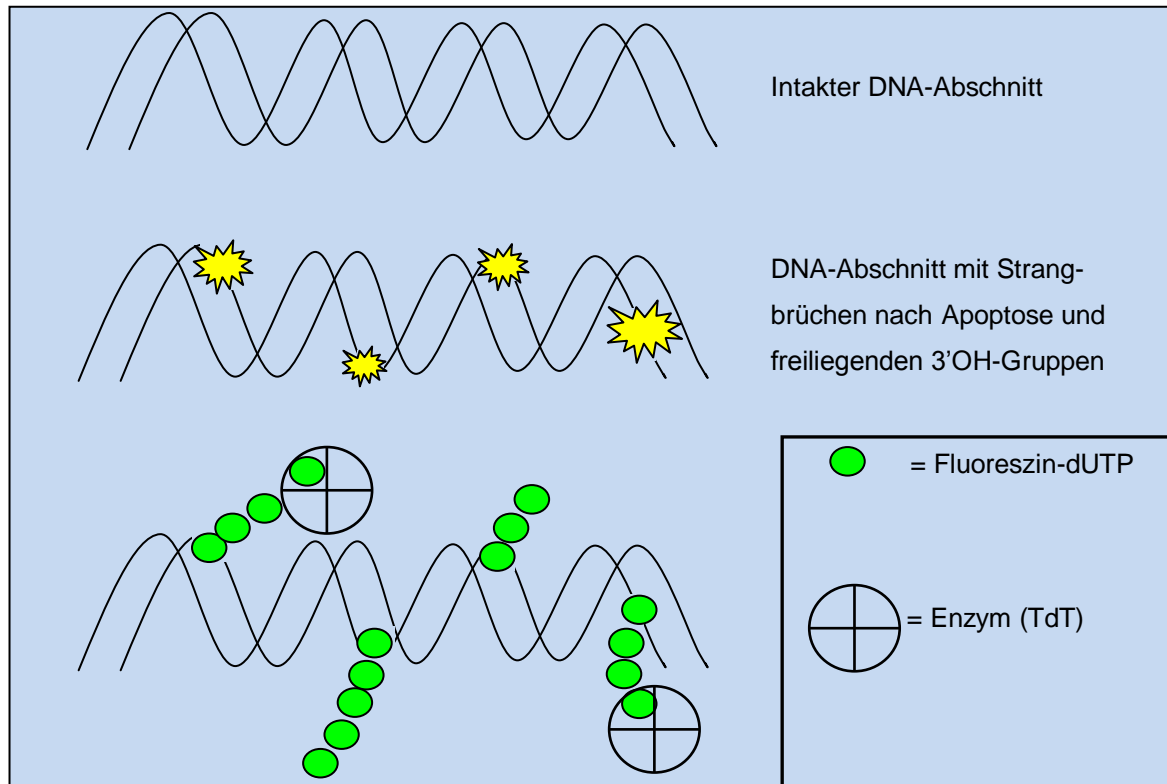


Abbildung 5: Schema der TUNEL-Reaktion (nach Darzynkiewicz). Bei Apoptosevorgängen werden intakte DNA-Abschnitte durch Endonukleasen fragmentiert. Die freiliegenden 3'OH-Gruppen an den Einzelstrangbrüchen kann man nun mit Fluoreszin-dUTP markieren. Den Vorgang katalysiert das Enzym TdT (weitere Details siehe Text).

2.6 Kollagen-Gehalt im Gewebe

Spezifische Materialien

- Pikrinsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Sirius-Rot (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Zeiss Axioskop mit zirkulärem Polarisationsfilter (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Software SigmaScan Pro 5.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)

Die Darstellung von Kollagen in den Gewebeschnitten erfolgte unter dem Mikroskop unter Zuhilfenahme von zirkulär polarisiertem Licht nach der von Whittaker beschriebenen Methode⁷⁰. Die fotografierten Ergebnisse wurden anschließend computerunterstützt ausgewertet. Die Schnitte wurden hierfür

vorher mit Pikrosirius-Rot nach internen Laborvorschriften gefärbt. Dazu wurden 3,0 g Pikrinsäure mit 200 ml erhitztem destilliertem Wasser übergossen. Anschließend ließ man die entstandene Lösung unter mehrmaligem Mischen abkühlen. Dann löste man 0,1 g Siriusrot in 100 ml der zuvor hergestellten Pikrinsäurelösung und färbte damit die Schnitte. Die unter zirkulär polarisiertem Licht aufgenommenen Bilder wurden mit der PC-Software SigmaScan Pro 5.0, die zum Analysieren von digitalen Bildern eingesetzt wurde, ausgewertet. Dazu wurde eine sogenannte Hellfeld-Aufnahme mit der polarisierten Aufnahme verrechnet. Die Software bestimmte daraufhin automatisch den Anteil der Bildpunkte, welche die Kollagenfasern darstellen. Die Aufnahmebedingungen (u.a. Belichtungszeit, Brennweite, Abstand etc.) wurden für jede Studie exakt identisch eingestellt. Ebenso wurde darauf geachtet alle zusammengehörigen Bilder in der gleichen Sitzung aufzunehmen, um Schwankungen in der Beleuchtungsstärke zu vermeiden. Man erhielt so für jeden Gewebeschnitt den entsprechenden Kollagenanteil.

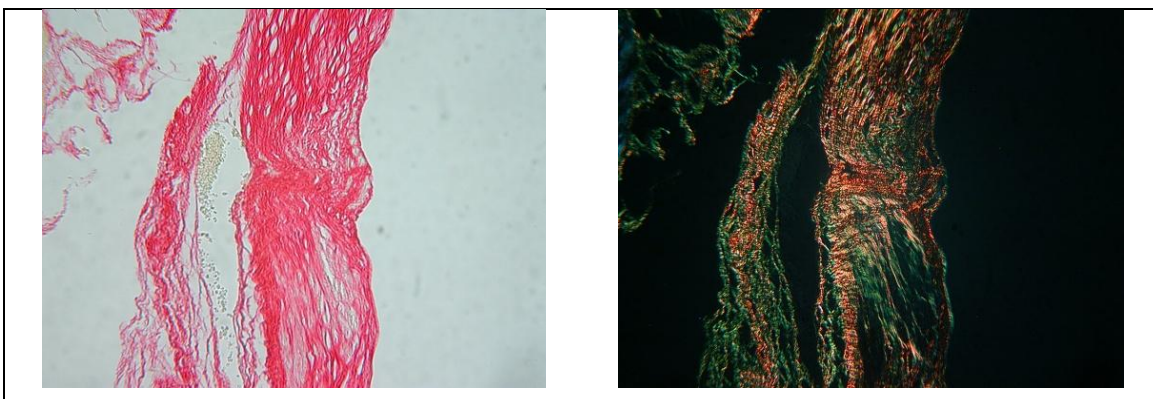


Abbildung 6: Darstellung der Hellfeldaufnahme und des gleichen Gewebeausschnitts unter polarisiertem Licht. Die Bildbearbeitungssoftware benötigt beide Aufnahmen, um den Kollagengehalt zu bestimmen.

2.7 TGF- β -Expression

Um den TGF- β -Gehalt im Gewebe zu untersuchen, haben wir uns aufgrund des geringen Gehalts an direktem Endprodukt einer indirekten Methode bedient. Wir bestimmten die im Gewebe enthaltene Menge an mRNA, die für TGF- β kodiert, um dann einen Rückschluss auf die Menge von exprimiertem TGF- β ziehen zu können. Viel TGF-mRNA spiegelt demnach einen hohen TGF- β -Gehalt im Gewebe wider. Folgende drei Arbeitsschritte waren nötig: Extraktion der

Gesamt-RNA aus den Herzen, Umschreibung in cDNA und anschließende Quantifizierung der für TGF- β -kodierenden Abschnitte per Realtime-PCR.

2.7.1 RNA-Extraktion

Spezifische Materialien

- Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser
- Trizol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- „Ethanol absolute“ (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- AMP-D1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland): DNase I (1 U/ μ l), 10x Reaktionspufferlösung (200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM MgCl₂), Stop-Solution (50mM EDTA)
- Homogenisierungsstab
- Zentrifuge „Biofuge fresco“ (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Photometer „Ultrospec 3100 pro“ (GE Healthcare Europe, München, Deutschland)

Ziel dieses Schrittes war es die Gewebeproben (Mäuse-Herz-Spitzen) so zu verarbeiten, dass man möglichst reine RNA in Lösung erhielt. Aufgrund der beinahe allgegenwärtigen DNasen kam bei der Methode anstatt destilliertem Wasser, sofern dies der jeweilige Reaktionsschritt nicht verbot, Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser zum Einsatz. Dieses zerstört die Aktivität der RNasen.

Zur Isolierung der RNA verwendeten wir eine Variante der sogenannten single-step-Methode, die von Chomczynski und Sacchi 1987 erstbeschrieben wurde⁷¹: Ein Homogenisierungsstab wurde 10 Minuten in 3%iges H₂O₂ gestellt und anschließend mit DEPC-Wasser gereinigt. Unter einem Abzug wurden damit etwa 150 mg der gefrorenen Herzspitze in 1 ml Trizol-Reagenz 40 Sekunden lang homogenisiert und anschließend 5 Minuten lang inkubiert. Trizol besteht aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Letzteres ist ein Salz, welches Proteine

denaturiert und RNasen inaktiviert. Phenol entfernt Proteine und löst kleinere DNA-Fragmente. Dadurch bleibt die RNA unberührt, andere zelluläre Bestandteile werden weitgehend zerstört. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kräftigem Schütteln zentrifugierte man die Proben 10 Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute (UPM) und einer Temperatur von 4 °C. Es bildeten sich drei Phasen: eine organische Phase, in der sich die denaturierten Proteine befinden, der wässrige Überstand, in welchem die RNA gelöst ist und die dazwischen liegende Interphase, die unter anderem DNA enthält. Nun pipettierte man den Überstand ab ohne dabei Material aus der Interphase mitzunehmen. Um einen möglichst hohen RNA-Gehalt zu erzielen, wurde der Chloroform-Trennschritt anschließend jeweils mit dem Überstand noch zweimal wiederholt. Die dadurch erhaltene RNA fällte man nun durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Nach kurzem Schütteln ließ man die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen und gab sie dann in die Zentrifuge (10 Minuten, 10000 UPM, 4 °C). Am Boden des Tubes fand man nun ein kleines RNA-Pellet. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Um das Pellet zu reinigen, gab man 1 ml 75%ige Ethanol-Lösung hinzu (in DEPC-Wasser verdünnt) und zentrifugierte 10 Minuten lang bei 13000 UPM und 4 °C. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-Wasser rekonstituiert. Die Konzentrationen der Proben ermittelte man danach im Photometer mit dem festeingestellten RNA-Programm (verwendete Wellenlängen: 260 nm und 280 nm).

Anschließend erfolgte noch ein DNase-Verdau, um eventuell doch noch vorhandene DNA-Reste sicher zu entfernen. Dazu wurden 1 µg RNA (benötigtes Volumen berechnete sich aus jeweiliger Konzentration) in 8 µl RNase-freiem Wasser gelöst, mit 1 µl 10x Reaktionspufferlösung und 1 µl DNase I zusammenpipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden DNA-Reste verdaut. Anschließend gab man 1 µl der Stop-Solution hinzu und inkubierte 10 Minuten lang bei 70 °C. Dies denaturierte die DNase I, brach gleichzeitig die Sekundärstruktur der RNA auf und bereitete diese dadurch ideal für die weitere Behandlung mit der Reversen Transkriptase vor⁷². Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis gestellt.

2.7.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte unter Verwendung des iScript cDNA Synthesekits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Es kam das PCR-Gerät „Mastercycler gradient“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz.

Reaktions-Ansatz pro PCR-Tube (ergibt 20 µl):

- 11 µl RNA-Lösung (DNase-behandelt, aus vorherigem Schritt)
- 4 µl 2x Puffer
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 4 µl H₂O_{dest.}

Für die Durchführung der Realtime-PCR wurde cDNA benötigt, welche aus der isolierten RNA erstellt wurde. Es wurde also nicht einfach ein Satz des kompletten Genoms der Zelle verwendet, denn durch den Zwischenschritt über die RNA erhielt man ein Abbild davon, welche Gene im Gewebe häufig exprimiert wurden und welche nicht. Ein quantitativer Rückschluss auf die Expression bestimmter Gene wurde so erst möglich. Um die cDNA zu erhalten, benötigte man die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Das verwendete Kit enthielt die RT des Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT). Damit die RT-PCR die komplette RNA und nicht nur einzelne Abschnitte in cDNA umschreibt, wurden unspezifische Hexamer-Primer verwendet.

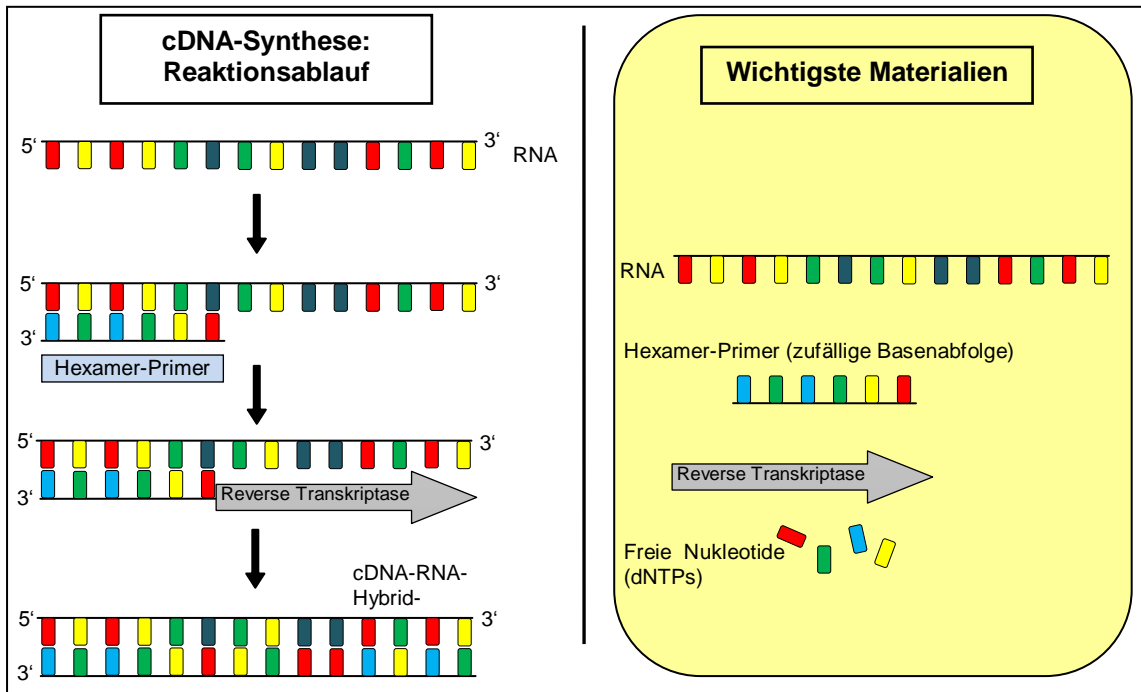


Abbildung 7: Schema der cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase (RT). Zufällige Hexamer-Primer binden unspezifisch an komplementäre Stellen des RNA-Einzelstrangs. Anschließend vervollständigt die Reverse-Transkriptase die Bildung des cDNA-Strangs in Richtung 5'-Ende. Hier nicht dargestellt ist die nachfolgende Verdauung des RNA-Einzelstranges durch die RNase, um aus dem RNA-DNA-Hybridstrang den cDNA-Strang freizulegen.

Der Reaktionsmix wird 5 Minuten bei 25°C inkubiert, dann erhöhte man die Temperatur für 30 Minuten auf 42°C. Weitere 5 Minuten wurde die Temperatur auf 85°C eingestellt. Die synthetisierte cDNA konnte anschließend bei -20°C aufbewahrt werden.

2.7.3 Realtime-quantitative PCR

Materialien

- Demineralisiertes H₂O
- cDNA von TGF-β-mRNA (aus vorherigem Schritt)
- Taqman Universal PCR Mastermix (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, USA)
- DNA-Sonden Eukaryotic 18s rRNA Assay ID Hs99999901_s1 und TGF-β Assay ID Mm00441724_m1 (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, USA)
- 96-well-Realtime-PCR-Platten

- Realtime-PCR Gerät iCycler (Bio-RAD Laboratories, München, Deutschland)

Eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion) dient dazu, vorhandenes Genmaterial zu amplifizieren. Man benötigt dazu DNA-Ausgangsmaterial, Nukleotide, Primer des entsprechenden Zielgens und eine DNA-Polymerase. Hier hat sich die Taq-Polymerase bewährt, weil sie bei den nötigen hohen Temperaturen stabil bleibt.

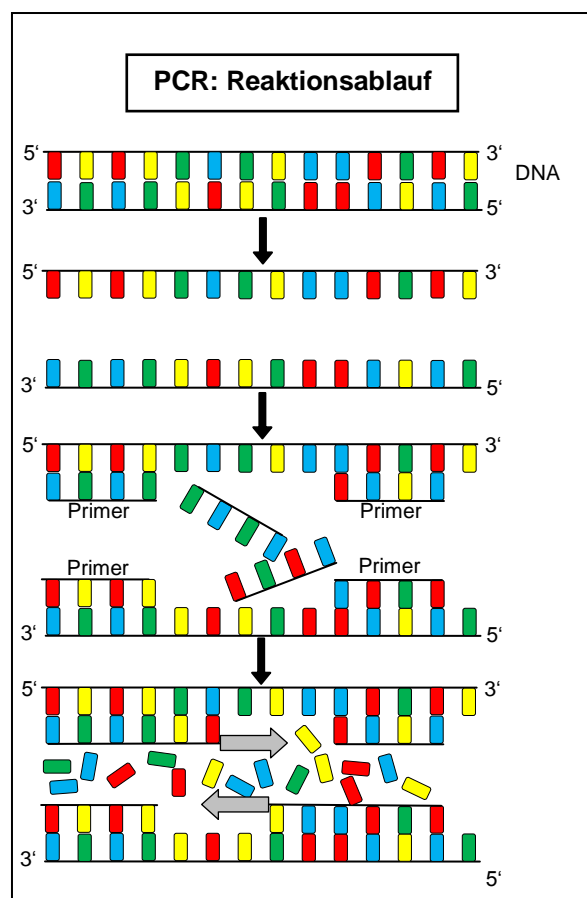


Abbildung 8: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die ursprünglich vorliegende Doppelstrang-DNA wird in einem ersten Schritt bei 94°C in ihre zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierungsphase). Anschließend können die im Überschuss zugegebenen Primer bei 54°C binden (Annealingphase). Die DNA-Polymerase (grauer Pfeil) verlängert mittels zugegebener Nukleotide die Primer, so dass wieder doppelsträngige DNA entsteht.

Es werden folgende Schritte in sich wiederholender Abfolge durchlaufen: Erhitzen des DNA-Materials auf 94°C, um die Einzelstränge aufzutrennen (Denaturierungsschritt). In der Annealingphase bei 54°C können dann die im Überschuss vorhandenen Primer an die korrespondierenden Stellen an den DNA-Einzelsträngen binden. Die Primer werden - anders als bei der cDNA-Synthese - nicht zufällig ausgewählt. Es werden spezifische Primer verwendet, die den Anfang und das Ende eines bestimmten Genprodukts, welches man amplifizieren bzw. nachweisen möchte, darstellen. Bei 72°C verlängert die Taq-Polymerase anschließend aus den zugegebenen Nukleotiden den Primer in 5'-Richtung, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt (Elongationsschritt). Danach kann die Abfolge wieder von vorne beginnen. Bei jedem Schritt wird so die DNA-Menge theoretisch verdoppelt. In der Praxis kommt es aus verschiedenen Gründen in der Regel pro Zyklus zu einer Multiplikation von etwa 1,6. Der eigentlichen PCR geht eine 5-minütige initiale Denaturierung bei 94°C voran. Die nachfolgenden einzelnen Zyklen dauern in der Regel wie folgt: 30 Sekunden Denaturierung, 30 Sekunden Annealing, 90 Sekunden Elongation. Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine finale Elongation von 5 Minuten Dauer.

Das Besondere an der Realtime-quantitativen PCR ist die Tatsache, dass nicht nur das genetische Material amplifiziert, sondern gleichzeitig noch eine quantitative Aussage darüber getroffen wird wieviel DNA sich nach jedem Zyklus in den Tubes befindet. Aus diesen Daten lässt sich am Ende der Prozedur ableiten wieviel Genmaterial zu Beginn in der Probe enthalten war. Man kann also nach der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese unter Zuhilfenahme der Realtime-PCR einen Rückschluss ziehen, ob eine bestimmte RNA im Gewebe häufiger oder seltener exprimiert wurde. Durch einen Vergleich mit Standardwerten lassen sich die Expressionsraten der Gene gut quantifizieren. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts während der PCR (daher „Realtime“) kommen Fluoreszenzmessungen zum Einsatz. Die Stärke des Fluoreszenzsignals nimmt direkt proportional mit der Menge an entstehendem DNA-Produkt zu. Für nur einige wenige PCR-Zyklen liegt eine exponentielle Phase vor. Die Messwerte der Fluoreszenz in dieser Phase sind ausschlaggebend für die weiteren Berechnungen. Zum Einsatz kommt das

Prinzip des „Fluorescence resonance energy transfer“ (FRET): die Gensonde (komplementär zur gesuchten Gensequenz) besitzt am 5'-Ende einen Reporter- („helles“ Donor-Fluorochrom) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff („dunkles“ Akzeptor-Fluorochrom). Bei jedem Zyklus werden die Farbstoffe durch Licht der Wellenlänge 480nm angeregt. Solange sie nah genug beieinander sind löscht der Quencher-Farbstoff durch FRET die Emission des Reporter-Farbstoffes aus und es resultiert keine Fluoreszenz. Sind Reporter- und Quencher-Farbstoff zu Beginn noch an der Sonde angeheftet kommt es durch deren räumliche Nähe zur Signalauslöschung. Da die für die Realtime-quantitative PCR verwendete DNA-Polymerase eine Exonuklease-Aktivität besitzt, baut sie nach der erfolgreichen Hybridisierung die beiden Farbstoffe ab. Sie können sich dann voneinander entfernen. Dadurch kann der Quencher-Farbstoff die Emission des Reporter-Farbstoffes nicht mehr unterdrücken. Es resultiert eine effektive Fluoreszenz, deren Signalstärke proportional zur Menge des fertig hybridisierten DNA-Produktes ist. Man misst dabei den Zeitpunkt wann die Fluoreszenz signifikant eine bestimmte Schwelle (Hintergrundrauschen) überschreitet. Die Zykluszahl bei der das der Fall ist wird CT-Wert (cycle threshold = "Schwellenwert-Zyklus") genannt. Je kleiner der CT-Wert ist, also je früher das Rauschen überschritten wird, desto mehr DNA-Ausgangsmaterial war in der Probe enthalten.

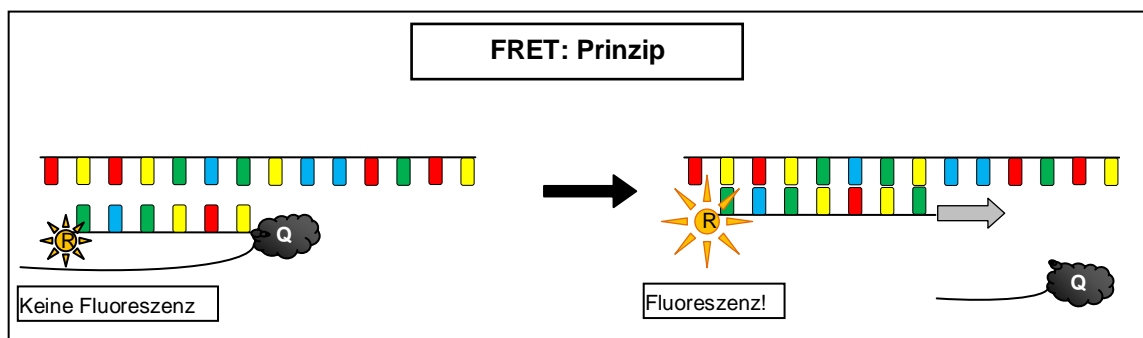


Abbildung 9: FRET-Prinzip. An einer Gensonde befindet sich auf der einen Seite der Reporter-Farbstoff (R), auf der anderen Seite der Quencher-Farbstoff (Q). Solange beide an der Gensonde anhaften löscht der Quencher-Farbstoff die Emission des Reporterfarbstoffes aus, es resultiert keine Fluoreszenz. Kommt es zur erfolgreichen Hybridisierung, so werden die Farbstoffe abgespalten. Durch die Aufhebung der räumlichen Nähe kann der Quencher-Farbstoff die Emission des Reporter-Farbstoffes nicht mehr verhindern, eine Fluoreszenz wird messbar.

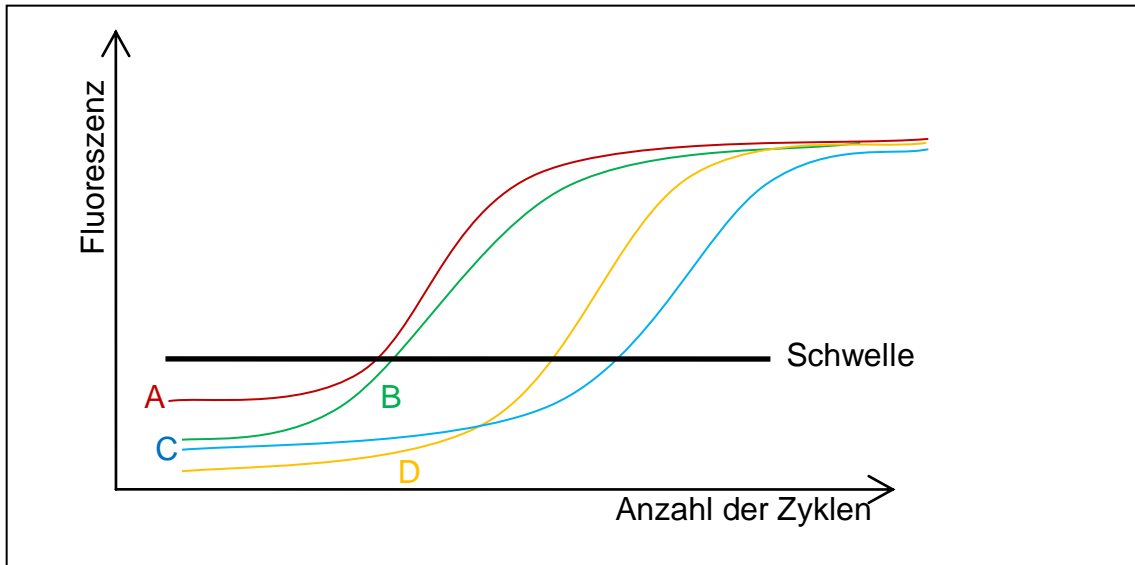


Abbildung 10: Auswertung bei der Realtime-PCR: Aufgetragen wird die Stärke des Fluoreszenzsignals der einzelnen Proben nach jedem PCR-Zyklus. Proben, die früher den Schwellenwert überschreiten, enthielten ursprünglich mehr DNA-Ausgangsmaterial. Ein relativer Vergleich lässt sich also aufstellen. In diesem Beispiel überschreitet die Probe A als erstes den CT-Wert, sie enthielt also am meisten DNA. Fast genausoviel DNA war in Probe B enthalten. Mit größerem Abstand folgt Probe D. Am wenigsten DNA enthielt Probe C. Werden bekannte DNA-Konzentrationen mitgemessen, so kann man anhand einer Standardkurve absolute Ausgangswerte ermitteln.

Eine relative Aussage ist so bereits möglich. Zur besseren Quantifizierung misst man im selben Durchlauf eine Standardreihe bekannter DNA-Konzentrationen in verschiedenen Verdünnungen mit. Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen und dem jeweiligen CT-Wert besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung. Nach Erstellen einer Standardkurve kann daher anhand dieser für jede gemessene Probe die Konzentration ermittelt werden.

Da nicht in jedem Gewebeareal gleichermaßen viel RNA produziert wird, muss man nun noch die gemessenen Werte der einzelnen Proben untereinander vergleichbar machen. Dazu werden diese normiert. Zu diesem Zweck vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse für die TGF- β -Expression mit denen von Genen aus derselben Probe, die in einer Zelle immer proportional zur Gesamtproteinproduktion hergestellt werden. Solche Gene werden Housekeeping-Gene genannt. Zellen, die viel RNA produzieren, besitzen auch viel Housekeeping-Genprodukt. Verwendet wurde von uns dafür das 18s-Protein bzw. dessen cDNA. Um nun an normierte Ergebnisse zu kommen,

dividiert man die ermittelte Konzentration von TGF- β durch diejenige des 18s-Proteins.

Für die Realtime-PCR dieser Studie wurden Standardreihen für TGF- β und 18s aus Proben verschiedener Verdünnungen hergestellt. Jeweils 5 μ l dieser Standards, sowie von den Proben, die durch die cDNA-Herstellung erhalten worden waren, wurden mit je 12,5 μ l Taqman Universal PCR Mastermix (enthält unter anderem die Taq-Polymerase, dNTPs und optimierte Pufferlösung) und je 1,25 μ l der spezifischen Taqmansonden (für 18s und TGF- β), und 6,25 μ l Wasser versetzt und in Dreifachbestimmung auf eine 96-well-Realtime-PCR-Platte pipettiert. Im iCycler wurde danach die Realtime-PCR durchgeführt.

2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung aller Ergebnisse dieser Studie wurde die Software „StatView“ herangezogen (Abacus Concepts Inc., Berkeley, USA). Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardfehlern angegeben und graphisch dargestellt. Die absoluten Unterschiede zwischen den Gruppen wurden jeweils mit einer ANOVA (engl.: analysis of variance) untersucht. Als signifikant wurde dabei $p < 0,05$ angesehen.

3. Ergebnisse

Für diese Studie wurde sowohl bei den C3-Knockout-Mäusen als auch bei den Wildtyp-Tieren durch permanente Ligation der Herzkranzarterien (wie im Kapitel 2.1.2 beschrieben) experimentell ein Myokardinfarkt erzeugt.

3.1 Komplementfaktor C3

3.1.1 C3-Gehalt im Gewebe

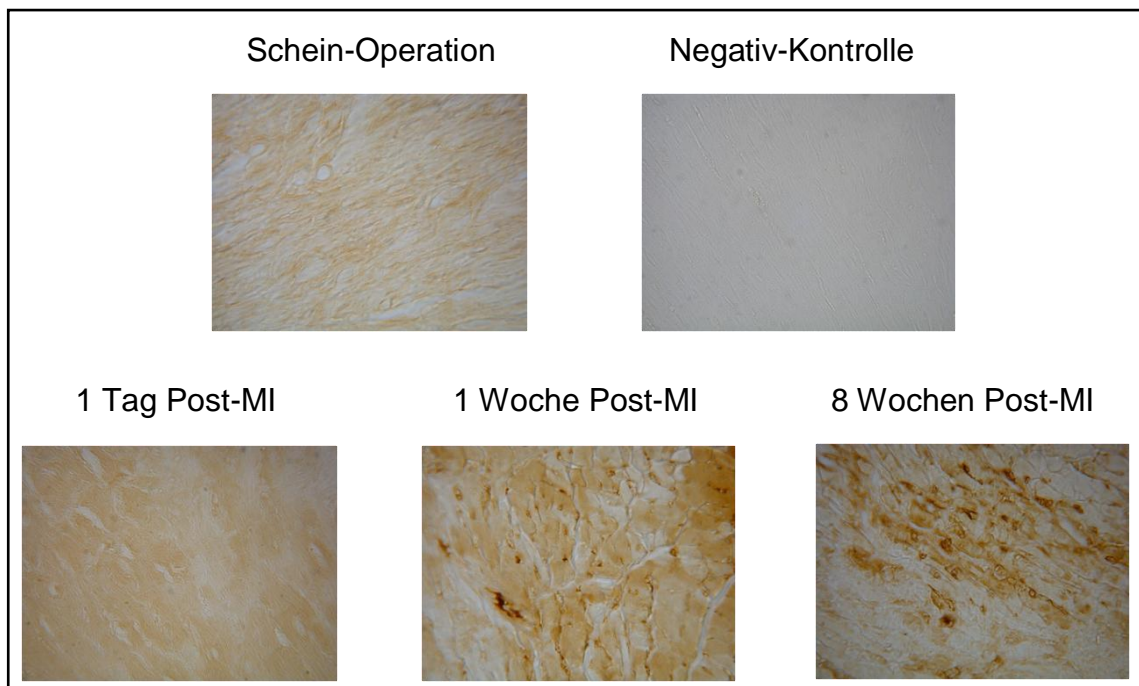


Abbildung 11: Darstellung verschiedener Gewebeschnitte nach immunhistochemischer C3-Anfärbung bis zu 8 Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt.

Durch immunhistochemisches Anfärben von C3 an den Tagen 1, 7 und 56 konnte gezeigt werden, dass bei Wildtyp-Tieren nach einem großen Myokardinfarkt eine Zunahme der C3-Aktivität im nun insuffizienten Herzen vorliegt (siehe Abbildung 11).

3.1.2 C3-Konzentration im Serum

Untersuchungen an den Tagen 1, 7 und 56 nach den großen Myokardinfarkten belegten, dass die C3-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine messbaren C3-Konzentrationen im Serum aufwiesen (n=16).

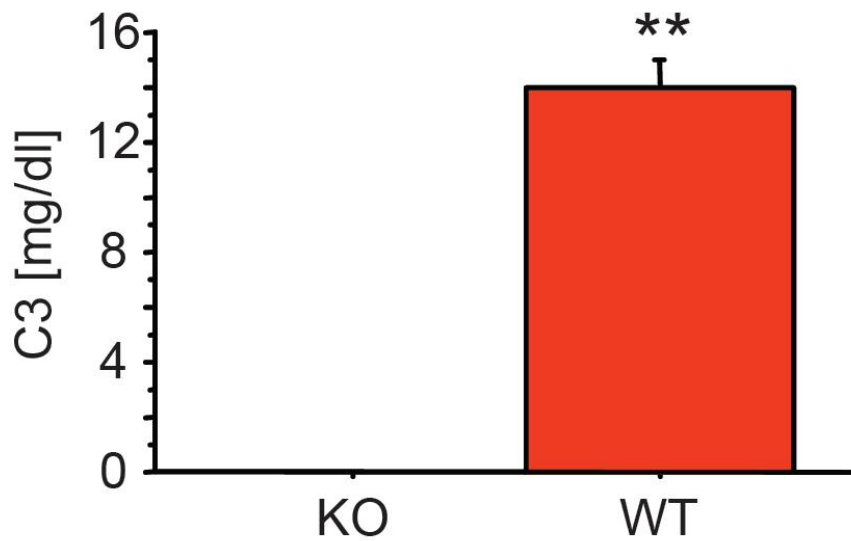


Abbildung 12: C3-KO-Tieren produzieren kein C3.

3.2 Überlebenszeit

Bei der mittleren Überlebenszeit nach der Koronarligatur zeichnete sich zwar eine Tendenz zugunsten der Wildtyp-Tiere ab, jedoch war die Mortalität für beide Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

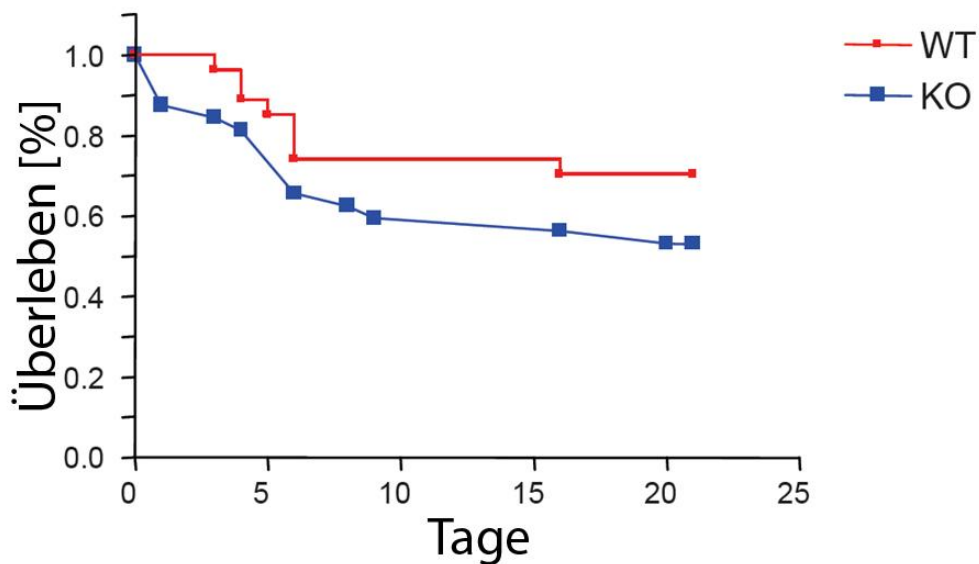


Abbildung 13: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Überlebenszeiten nach experimentellem Myokardinfarkt bei Wildtyp und C3-KO-Tieren. Es konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

3.3 Einwanderung neutrophiler Granulozyten

Bei beiden Tiergruppen wurde in den myokardialen Gewebeschnitten nach immunhistochemischer Anfärbung gezählt wieviele neutrophile Granulozyten 3 Tage nach Infarkt eingewandert sind. Es zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied: während bei den Wildtyp-Tieren im Mittel 112 Neutrophile gezählt werden konnten, waren es bei den C3-KO-Tieren nur etwa 62.

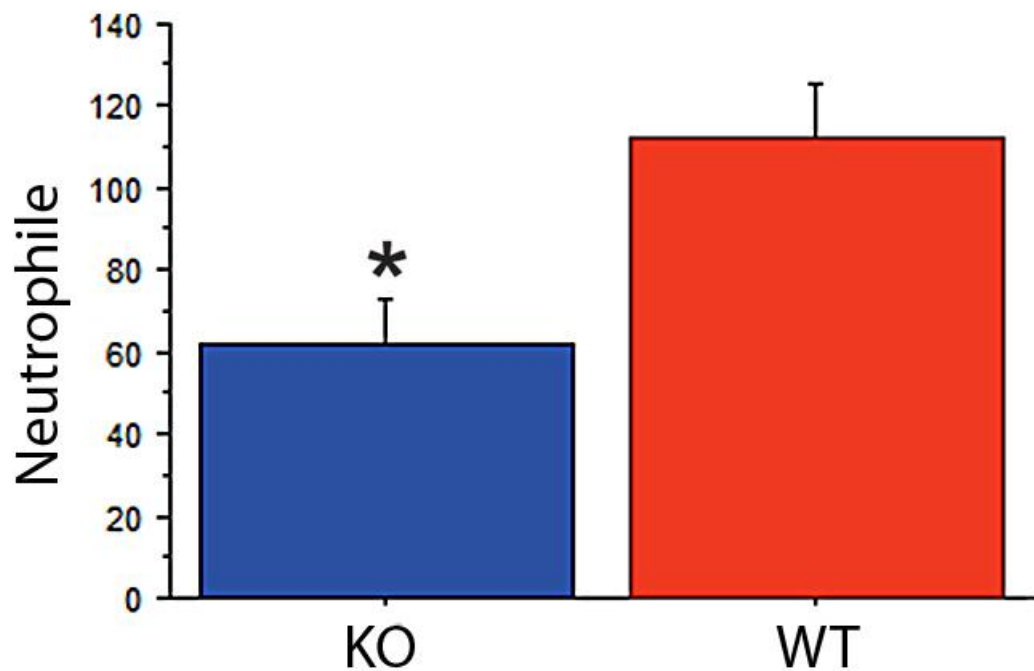


Abbildung 14: Bei den C3-KO Tieren kam es zu einer signifikant geringeren Einwanderung neutrophiler Granulozyten in myokardiales Gewebe: $61,75 \pm 10,87$ KO vs. $112,29 \pm 13,37$ WT ($p=0,03$).

3.4 Linksventrikuläre Dilatation

Untersucht wurden 12 Wildtyp- und 14-Knockout-Tiere. In beiden Gruppen kam es nach experimentellem Myokardinfarkt zu linksventrikulärer Dilatation als Ausdruck der schlechteren Ventrikelfunktion nach dem kardialen Schaden.

Die C3-KO-Mäuse zeigten bei der echokardiographischen Untersuchung am Tag 21 nach dem Myokardinfarkt eine signifikant geringer ausgeprägte linksventrikuläre Dilatation im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In der transthorakalen Echokardiographie wiesen die C3-KO-Mäuse auf Papillarmuskelebene eine endsystolische linksventrikuläre Fläche von $13,9 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ auf, die Wildtypmäuse von $19,6 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ ($p=0,01$).

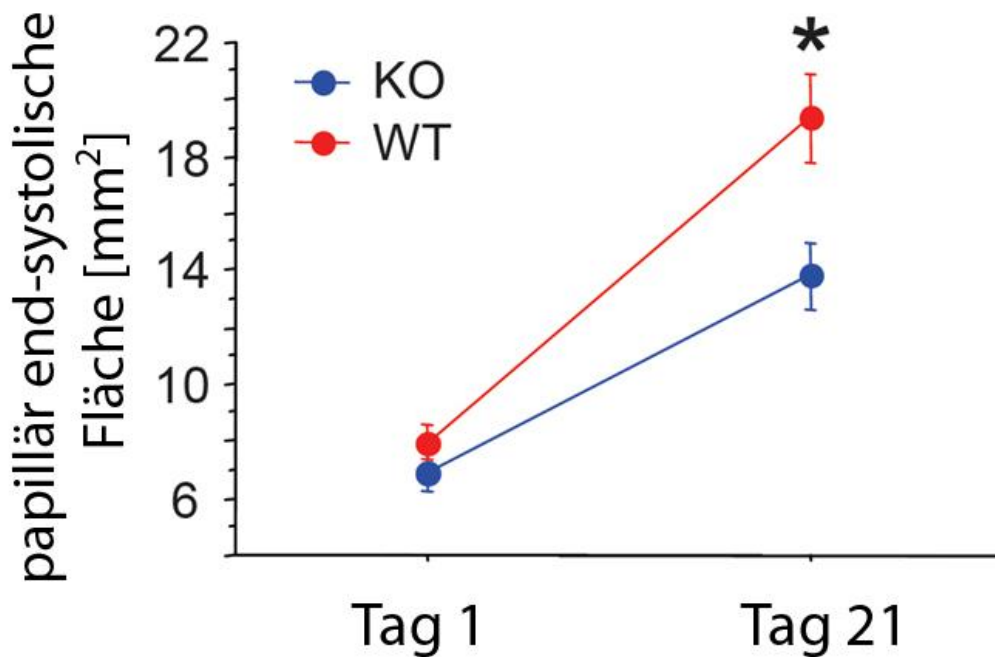


Abbildung 15: Darstellung der linksventrikulären Dilatation per Echokardiographie. Sowohl bei Versuchs- als auch Kontrolltieren wurde die endsystolische Fläche auf Höhe der Papillarmuskel-Ebene bestimmt. Der Unterschied war signifikant: $13,9 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ bei den C3-KO-Tieren, $19,6 \pm 1,2 \text{ mm}^2$ bei den Wildtyp-Tieren ($p=0,01$).

3.5 Apoptose-Rate

3 Tage nach dem Infarkt wurden mittels TUNEL-Assay die Apoptose-Raten in den Myokardgeweben beider Versuchsgruppen ermittelt. Für den Test wurden 6 Wildtyp- und 7 Knockout-Tiere herangezogen. Dabei war der Anteil der in Apoptose befindlichen Zellen bei den Knockout-Tieren signifikant reduziert gegenüber dem bei den Wildtyp-Tieren ($1,6\% \pm 0,68\%$ vs. $7,0\% \pm 1,48\%$; $p=0,01$).

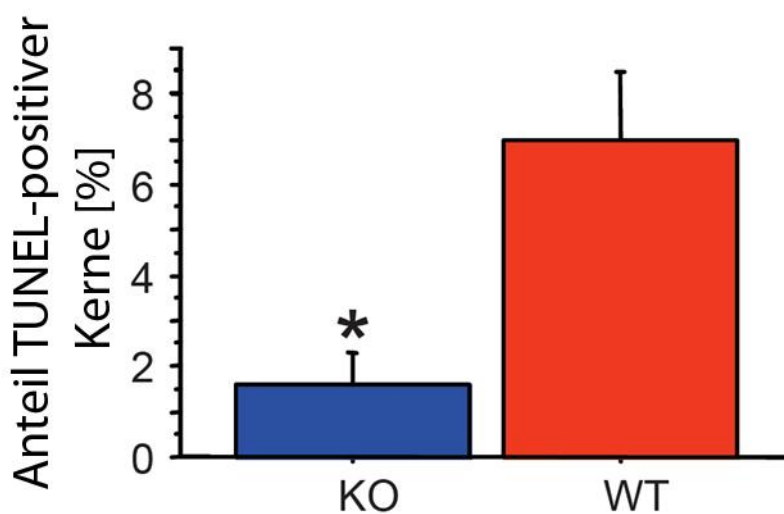


Abbildung 16: Mittels TUNEL-Assay wurde die Apoptose-Rate bei beiden Tier-Gruppen bestimmt. Dabei wiesen die C3-KO-Tiere signifikant weniger apoptotische Zellen auf ($1,6\% \pm 0,68\%$ vs. $7,0\% \pm 1,48\%$; $p=0,01$).

3.6 Kollagen-Anteil

Per Polarisationsmikroskopie wurde bei jeweils 9 Tieren aus den beiden Gruppen in den Gewebeschnitten der Kollagenanteil ermittelt. Bei den C3-defizienten Tieren wurde ein Kollagen-Anteil von $20,74 \pm 1,97\%$, bei den Wildtyp-Tieren von $36,20 \pm 1,99\%$ ermittelt ($p<0,0001$).

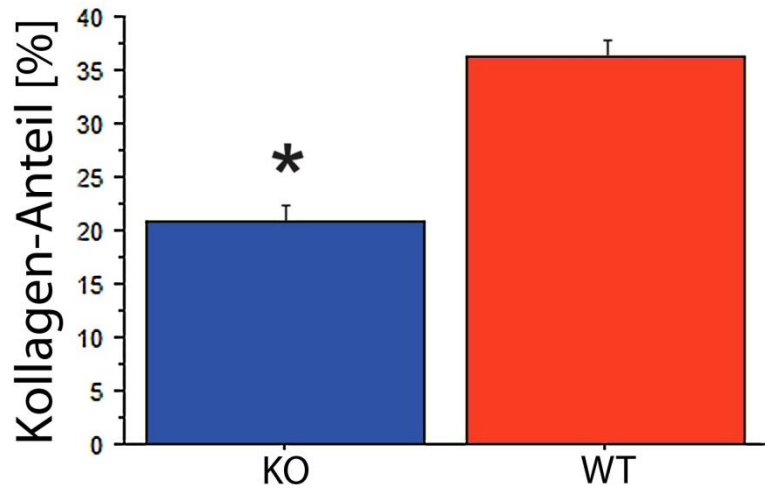


Abbildung 17: Die Untersuchungen zeigten bei den C3-KO-Tieren ein signifikant geringeres Kollagen-Vorkommen im Gewebe nach experimentellem Myokardinfarkt auf.

3.7 TGF- β -Gehalt

3 Tage nach Infarkt wurde mittels Realtime-PCR der TGF- β -Gehalt im Myokardgewebe bestimmt und jeweils mit 18s verglichen. Wir untersuchten 6 Wildtyp- und 7 C3-KO-Tiere. Bei den Mäusen ohne C3 lagen nach dem Infarkt signifikant höhere TGF- β -Konzentrationen als bei den Wildtyp-Mäusen vor (TGF/18s: $0,188 \pm 0,05$ KO vs. $0,06 \pm 0,011$ WT; $p=0,048$).

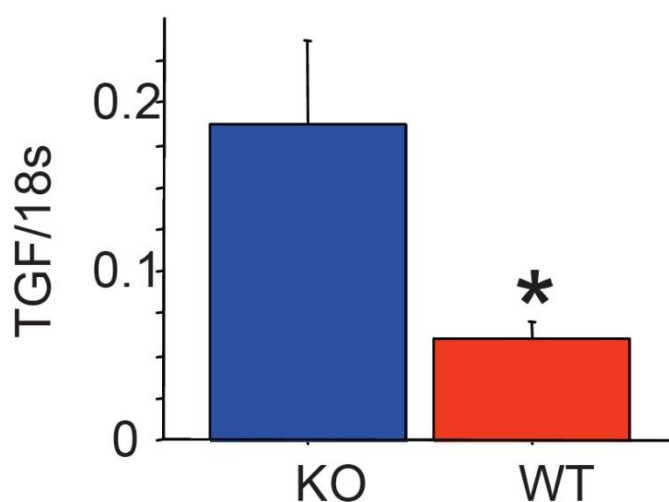


Abbildung 18: Ermittlung des TGF- β -Gehalts im Myokardgewebe. Bei den C3-KO-Mäusen zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen als in der Wildtyp-Kontrollgruppe (TGF/18s: $0,188 \pm 0,05$ KO vs. $0,06 \pm 0,011$ WT; $p=0,048$).

4. Diskussion

Gut untersucht ist bislang am Herzen nur die Rolle des Komplementsystems bei Ischämie-/ Reperfusion-Versuchen. Dabei wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass C3-KO-Tiere einen reduzierten Ischämie-/Reperfusion-Schaden haben. Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Komplementfaktors C3 nach einem permanenten Myokardinfarkt - als Modell der chronischen Herzinsuffizienz - anhand von C3-Knockout-Mäusen aufgezeigt. Bei den echokardiographischen Untersuchungen zeigte sich bei den Tieren ohne C3 eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation gegenüber der Kontrollgruppe. Auch Apoptose-Rate und Kollagengehalt waren bei den Versuchstieren deutlich geringer ausgeprägt. Es kam bei den C3-KO-Tieren zu einer deutlich verringerten Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. TGF- β war im Myokard der Tiere ohne C3 nach Infarkt signifikant stärker exprimiert. Diese Ergebnisse betonen den enormen Einfluss des Komplementsystems auf die chronische myokardiale Ischämie.

4.1 Aktivierung des Komplementsystems bei myokardialer Ischämie

Bereits 1971 belegten Hill und Ward, dass das Komplementsystem nach Myokardinfarkt aktiviert wird woraus man auf die Bedeutung des Komplementsystems für die pathophysiologischen Vorgänge nach Myokardischämie schließen konnte. Yasojima et al. veröffentlichten 1998 eine Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Kardiomyozyten im menschlichen Herzen nach einem Myokardinfarkt selbst Komplement bilden können⁴⁶. Dies konnten wir immunhistochemisch in einem der Teilversuche bestätigen (siehe Kapitel 3.1.1). Bis zur achten Woche nach Infarkt kam es zu einer Zunahme von C3 in den Gewebeschnitten. In einer klinischen Studie untersuchten Clark et al. die Serum-Spiegel der Komplementproteine bei 36 Patienten mit Herzinsuffizienz bei denen die Ejektionsfraktion unter 40% lag. Dabei wurden gegenüber der gesunden Kontrollgruppe etwa dreifach höhere Mengen des Membranangriffskomplexes (C5b-C9) entdeckt⁵⁶. Myokardischämien gelten als häufigste Ursache einer chronischen Herzinsuffizienz. Man postulierte eine bedeutsame Rolle des Komplementsystems bei dieser Erkrankung. Fu et al.

zeigten im Rattenmodell nach myokardialen Ischämie-/Reperfusionsexperimenten eine gesteigerte C3-Expression auf, die sich jedoch nicht nachweisen ließ, wenn die Tiere mit C1-Esterase-Inhibitor behandelt wurden⁷³.

Unsere Untersuchungen bestärken, dass auch bei chronischem myokardialen Schaden das Komplementsystem aktiviert wird und den Ablauf der Heilung beeinflusst.

4.2 Einfluss von C3 auf die Wundheilung nach Myokardinfarkt

Bei der Beurteilung des Post-Infarkt-Remodelings in beiden Tiergruppen haben wir uns auf drei Aspekte konzentriert: Inflammation, Apoptose und Kollagenstoffwechsel.

4.2.1 Inflammation

Wie eingangs beschrieben, kommt es durch den Gewebeschaden nach Ischämie zur Freisetzung toxischer Substanzen, wie reaktiven Sauerstoffspezies oder intrazellulären Proteinen, die die inflammatorische Phase initiieren und Komplement aktivieren¹⁵. Als Marker für die Ausprägung der Inflammation zählten wir die Neutrophilen, die drei Tage nach Infarkt in das Gewebe eingewandert sind. Neutrophile werden, obwohl sie für den Abräumungsprozess nötig sind, auch für einen Großteil des Gewebeschadens nach myokardialer Ischämie mit anschließender Reperfusion verantwortlich gemacht^{18, 74}. Am Neutrophilen-depletierten Hundemodell konnten Romson et al. in Ischämie-/Reperfusionstudien verringerte Infarktgrößen darlegen²¹.

Um die Wirkung zu entfalten, müssen die Neutrophilen zunächst in das Gewebe gelangen. Sie finden ihr Ziel mittels Chemotaxis. In Ischämie-Reperfusionversuchen konnte neben vielen weiteren Faktoren wie IL-1, IL-6, IL-8, Platelet Activating Factor (PAF) und Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) bisher aus der Reihe der Komplementfaktoren nur die chemotaktische Bedeutung von C5a auf Neutrophile aufgezeigt werden⁴⁸: Foreman et al. kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass C3a, im Gegensatz zu C5a, keine chemotaktische Affinität auf Neutrophile besitzt⁷⁵. Ähnliches zeigten Daffern et al. 1995: sie postulierten ebenso, dass C3a kein Chemotaxin für die

Neutrophilen-Attraktion ist, vielmehr zeige es Wirkung auf Eosinophile. Gleichzeitig konnte bewiesen werden, dass C3a und C5a ihre Wirkungen über verschiedene Rezeptoren entfalten⁷⁶.

In unseren Ergebnissen kam es bei den C3-KO-Tieren jedoch zu einer deutlich geringeren Neutrophilen-Invasion, so dass die Schlussfolgerung getroffen werden kann, dass C3 bei myokardialer Ischämie pro-inflammatorisch wirkt. Unser Ergebnis wirft also die Frage auf, ob C3a bei chronischer Ischämie ohne Reperfusion nicht doch ein potentes Chemotaxin für Neutrophile ist oder ob die verringerte Neutrophilen-Einwanderung eine indirekte Folge des Fehlens von C3 ist. Um dies zu differenzieren, müssen in Zukunft weitere Modelle untersucht werden (siehe Kapitel 4.3).

4.2.2 Apoptose und linksventrikuläre Funktion

Apoptose kann durch verschiedene extra- oder intrazelluläre Stimuli ausgelöst werden, die zur Aktivierung von Caspasen führen und letztlich den programmierten Zelltod auslösen⁷⁷. Man unterscheidet pro-apoptotische (Caspasen 2, 3, 6, 7-10) und pro-inflammatorische Caspasen (Caspasen 1, 4, 5, 11, 12). Von Erstgenannten weiß man, dass sie eine wichtige Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen⁷⁷. Die genauen Signalwege, die bei myokardialer Ischämie und beim chronischen Myokardinfarkt zur Apoptose führen, sind jedoch noch nicht gut erforscht. Die Arbeitsgruppe um Long et al. berichtete von p53-abhängigen Signalwegen, die bei der Apoptose-Steuerung hypoxischer Kardiomyozyten eine Rolle spielen⁷⁸. Bialik et al. berichten hingegen, dass die Apoptose per se im Rahmen eines Myokardinfarktes unabhängig vom p53-Signalweg abzulaufen scheint⁷⁹. Bei Ischämie-/Reperfusion scheinen sowohl der MAC (C5b-9)⁸⁰, als auch die Aktivierung des C5a-Rezeptors⁸¹ über den p21 (Ras)-Signalweg die Apoptose zu vermitteln.

Als gesichert angesehen werden darf jedoch die Tatsache, dass in der Herzinsuffizienz eine erhöhte Rate an Myozyten, die sich in Apoptose befinden, vorliegt⁸² und dass der programmierte Zelltod eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz spielt⁸³. Lange Zeit blieb jedoch unklar, ob die

Apoptose eine kausale Komponente in der Entwicklung der Herzinsuffizienz ist, ob es sich um eine Folge der Erkrankung handelt oder ob es sich gar um einen protektiven Prozess handelt, der konsekutiv entsteht. Wencker et al. erschufen ein transgenes Mausmodell, in dem es durch myokardiale Expression einer Liganden-aktivierten Caspase möglich war Apoptose kontrolliert auszulösen. Hier reichten bereits geringe myokardiale Apoptose-Raten aus, um eine letale, dilatative Kardiomyopathie zu verursachen⁸⁴. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine Inhibition der Apoptose eine Basis neuer Herzinsuffizienz-Therapien darstellen könnte.

Im Ischämie-Reperusionsmodell konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass sich durch Modulation des Komplementsystems Änderungen am Apoptoseverhalten ergeben: Fu et al. postulierten einen anti-apoptotischen Effekt bei Applikation von C1-Esterase-Inhibitor (C1INH), der sich zum einen durch direkte anti-apoptotische Wirkung von C1INH erklären ließ, zum anderen nach Meinung der Autoren jedoch auch durch Inhibition des Komplementsystems an sich⁸⁵. Ähnliche Effekte wurden von einer anderen Arbeitsgruppe durch die Applikation eines monoklonalen C5-Antikörpers gezeigt: Nach 30-minütiger Ischämie und anschließender 7-tägiger Reperfusion ergab sich dadurch eine deutliche Reduktion der Apoptose- und der Nekrose-Rate im Myokard⁸⁶. Daten für den Einfluss des Komplementsystems auf die chronische Herzinsuffizienz nach permanenter Koronarligatur liegen bisher nicht vor.

Wir konnten auch nach chronischem Myokardinfarkt durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) im C3-KO-Kollektiv eine verringerte Apoptose-Rate im Myokardgewebe feststellen. Die Messung mittels TUNEL-Assay erfolgte drei Tage nach Infarkt. Einzig und allein das Fehlen von C3 zieht also bereits einen signifikant anti-apoptotischen Effekt nach sich. Unklar ist noch, wie genau das Komplementsystem, insbesondere C3, die Signalkaskade im Apoptosevorgang beeinflusst. Zwar wurde schon gezeigt, dass der am Ende der Komplementkaskade stehende Membrane-Attack-Complex sowohl Lyse als auch Apoptose vermittelt bzw. initiiert⁸⁷. Es existieren jedoch noch weitere

denkbare Möglichkeiten: die durch die Komplementkaskade entstehenden Anaphylatoxine (z.B. C3a) könnten in die Apoptose-Regulation eingreifen und pro-apoptotische Caspasen, wie zum Beispiel Caspase 3 aktivieren, die letztendlich zum programmierten Zelltod führen. Eine wahrscheinliche Möglichkeit ist auch, dass Neutrophile – im C3-KO-Modell signifikant geringer ins Gewebe einwandernd – bzw. deren zytotoxische Produkte wie Superoxid-Anionen die Apoptose auslösen. In Zukunft könnte durch weitere Forschungsmodelle diesbezüglich Klarheit geschaffen werden (siehe Kapitel 4.3), indem beispielsweise C3a-Rezeptor-KO-Modelle untersucht werden.

Gemäß den oben genannten Vorarbeiten müsste die verringerte Apoptose mit einer weniger ausgeprägten Herzinsuffizienz einhergehen. Im Myokardinfarkt-Modell der Maus hat sich die Echokardiographie als gut-verfügbare, nicht-invasive Möglichkeit zur Ermittlung der linksventrikulären Funktion etabliert⁶⁶. 21 Tage nach Myokardinfarkt zeigten sich in unserer Studie sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe verringerte Ejektionsfraktionen und zunehmende Ventrikelgrößen. Die C3-Knockout-Tiere wiesen hierbei jedoch eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation auf als die Kontrolltiere (siehe Kapitel 3.4). Dies ist ein deutlicher klinischer Hinweis auf die schädlichen Effekte von C3 bei Myokardischämie und unterstützt die oben zitierte Erkenntnis, dass eine erhöhte Apoptose-Rate mit Herzinsuffizienz einhergeht.

4.2.3 Kollagenstoffwechsel

Im vorliegenden Modell ist der myokardiale Kollagengehalt bei den Tieren mit C3-Knockout nach Myokardinfarkt verringert. Die Veränderung der extrazellulären Matrix könnte neben reduzierter Apoptose ein weiterer Grund für die verbesserte linksventrikuläre Funktion in der C3-KO-Gruppe sein. Von Vanhoutte et al. wurde bereits früher postuliert, dass Veränderungen der extrazellulären Matrix in Struktur und Zusammensetzung das ventrikuläre Remodeling stark beeinflussen⁸⁸. Durcharme et al. zeigten, dass MMP-9-KO-Mäuse nach Infarkt eine geringere linksventrikuläre Dilatation und weniger Kollagengehalt aufweisen²⁶. Es ist somit höchstwahrscheinlich, dass die

verbesserte linksventrikuläre Funktion bei den C3-Knockout-Tieren auf günstigeren Remodeling-Effekten mit geringerer Fibrosierung basiert.

Eine Rolle könnte hierbei auch TGF- β spielen. Denn obwohl die genaueren Mechanismen dafür bisher noch nicht gut verstanden sind, weiß man bereits, dass TGF- β beim Myokardinfarkt hochreguliert wird⁸⁹ und eine wichtige Rolle in den sich anschließenden Heilungsprozessen spielt. Eine der wesentlichen Aufgaben von TGF- β ist die Kontrolle und Suppression von inflammatorischen Zytokinen. In der aktuellen Literatur wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt über die Beeinflussung von Endothelzellen und Leukozyten vermittelt wird⁹⁰. Ebenso soll TGF- β am Übergang von der inflammatorischen in die proliferative Phase eine große Rolle spielen. Frantz et al. zeigten im Mausmodell nach experimentellem Myokardinfarkt, dass die Applikation von monoklonalem Antikörper gegen TGF- β zu erhöhter Mortalität und deutlich schädlicherem linksventrikulärem Remodeling führt. Dies legt einen positiven Effekt von TGF- β nahe, was zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut passt. Die Autoren folgerten, dass maßgebliche Ursachen in der veränderten Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix liegen²⁵.

Allerdings gibt es in der Literatur auch nicht wenige Hinweise, dass vermehrtes TGF- β mit Wundheilungsverzögerungen einhergeht²⁴. Es scheint der Zeitpunkt wichtig zu sein, den man betrachtet. Ikeuchi et al. untersuchten diese zeitlichen Abhängigkeiten und wiesen nach, dass TGF- β in der Frühphase protektiv gegenüber myokardialen Schaden nach Ischämie wirkt. Bleibt die Expression auf hohem Niveau erhalten, führt dies langfristig jedoch zu schädlichen linksventrikulären Remodeling-Vorgängen und chronischer Herzinsuffizienz²³.

4.3 Zukünftige Forschung

Die Ausschaltung des Komplementfaktors C3 wirkt bei myokardialer Ischämie positiv auf die Vorgänge des kardialen Remodelings. In Zukunft sollten die genauen Aktivierungsmechanismen des Komplementsystems mit der Fragestellung aufgedeckt werden, ob der klassische, der alternative oder der Lektin-Weg verantwortlich ist. In entsprechenden Voruntersuchungen (Daten

bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz) zeichnet sich ab, dass die Aktivierung des Komplementsystems bei chronischer Herzinsuffizienz weder durch den klassischen, noch durch den Lektin-Weg vermittelt ist. Dies ist zunächst überraschend, da bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, dass im Ischämie-/Reperusionsmodell der Lektin-Weg eine große Rolle spielt⁹¹. Zudem müssen die Effektormechanismen näher aufgeschlüsselt werden. Hierbei können C5-KO- und C3a-Rezeptor-KO-Modelle hilfreich sein. Im Zuge dessen könnte geklärt werden, welcher der beiden Hauptwirkungen des Komplementsystems für die schädlichen Effekte maßgeblich verantwortlich ist: der Membranangriffskomplex (über C5) oder die anaphylatoxine Wirkung (über C3a). Durch ein noch besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse gelingt es möglicherweise in Zukunft durch gezielte Modulation des Komplements den kardialen Schaden nach Ischämie zu minimieren und gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen einer Therapie möglichst gering zu halten.

5. Zusammenfassung

Vergangene Studien zeigten, dass das Komplementsystem bei myokardialer Ischämie und Reperfusion einen negativen Einfluss auf den Reperfusionsschaden hat. Der Einfluss des Komplementsystems auf die Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt ist allerdings bislang nicht untersucht. Diese Arbeit untersuchte deshalb in einem C3-Knockout(KO)-Modell pathophysiologische Auswirkungen des Komplementfaktors C3 auf die chronische Herzinsuffizienz.

Bei Wildtyp- und C3-KO-Mäusen wurden durch permanente Ligatur der linken Kranzarterie große Myokardinfarkte erzeugt, ein Modell für die Herzinsuffizienz. Bei Wildtyp-Tieren wurde immunhistochemisch belegt, dass C3 im Myokard bis 8 Wochen nach Infarkt aktiviert wird. Die Überlebenszeit zwischen beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant. Bei der C3-defizienten Gruppe entwickelte sich bis Tag 21 nach Infarkt echokardiographisch eine geringere linksventrikuläre Dilatation. Im TUNEL-Assay war der Anteil apoptotischer Zellen 3 Tage nach Infarkt in der C3-KO-Gruppe reduziert. Bei C3 KOs kam es nach Infarkt zu einer geringeren myokardialen Einwanderung neutrophiler Granulozyten und polarisationsmikroskopisch stellte sich ein geringerer Kollagen-Anteil dar. Per Realtime-quantitativer PCR wurde bei den C3 KO-Tieren eine Erhöhung der TGF- β -Konzentration gemessen.

Zusammenfassend spielt C3 eine negative Rolle in der Entwicklung der linksventrikulären Dilatation, am ehesten vermittelt durch seine Wirkung auf Apoptose, Inflammation und Remodeling der extrazellulären Matrix. Die Hemmung von Komplement könnte deshalb ein wichtiger neuer Ansatz in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz sein.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADH	Anti-Diuretisches-Hormon
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
cDNA	Copy-Desoxyribonucleinacid
CT	Cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EDA	Enddiastolische Fläche (enddiastolic area)
EDD	Enddiastolischer Durchmesser
EKG	Elektrokardiographie/Elektrokardiogramm
ESA	Endsystolische Fläche (endsystolic area)
ESD	Endsystolischer Durchmesser
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRET	Fluoreszenz-Energietransfer
FS	Fractional shortening
HDL	High-Density-Lipoproteine
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IL	Interleukin
KO	Knockout
LDL	Low-Density-Lipoproteine
MAC	Membrane-Attack-Complex
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase

mRNA	Messenger-ribonucleinacid
n.s.	Nicht signifikant
NADH	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid
OP	Operation
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
PCI	Percutaneous coronary intervention
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonucleinacid
RT	Reverse Transkriptase
STEMI	ST-Elevation myocardial infarction (ST-Hebungs-Infarkt)
TGF- β	Transforming-Growth-Factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α	Tumor-necrosis-factor alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WT	Wildtyp

6. Literaturverzeichnis

1. Bart BA, Ertl G, Held P, Kuch J, Maggioni AP, McMurray J, Michelson EL, Rouleau JL, Warner Stevenson L, Swedberg K, Young JB, Yusuf S, Sellers MA, Granger CB, Califf RM, Pfeffer MA. Contemporary management of patients with left ventricular systolic dysfunction. Results from the study of patients intolerant of converting enzyme inhibitors (spice) registry. *Eur Heart J*. 1999;20:1182-1190
2. Gaudron P, Eilles C, Ertl G, Kochsiek K. Early remodelling of the left ventricle in patients with myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1990;11 Suppl B:139-146
3. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516
4. Parikh NI, Hwang SJ, Larson MG, Levy D, Fox CS. Chronic kidney disease as a predictor of cardiovascular disease (from the framingham heart study). *Am J Cardiol*. 2008;102:47-53
5. Van der Kooy K, van Hout H, Marwijk H, Marten H, Stehouwer C, Beekman A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: Systematic review and meta analysis. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2007;22:613-626
6. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2005.
7. Sommers HM, Jennings RB. Experimental acute myocardial infarction; histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery. *Lab Invest*. 1964;13:1491-1503
8. Tzivoni D, Koukoui D, Guetta V, Novack L, Cowing G. Comparison of troponin t to creatine kinase and to radionuclide cardiac imaging infarct size in patients with st-elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty. *Am J Cardiol*. 2008;101:753-757
9. Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, Rabi D, Tremblay J, Alamian A, Barnett T, Cox J, Ghali WA, Grace S, Hamet P, Ho T, Kirkland S, Lambert M, Libersan D, O'Loughlin J, Paradis G, Petrovich M, Tagalakis V. A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *CMAJ*. 2007;176:S1-44
10. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev*. 2000;5:167-173
11. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL. 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). *Eur Heart J*. 2008;29:2388-2442
12. Lloyd-Jones DM. The risk of congestive heart failure: Sobering lessons from the framingham heart study. *Curr Cardiol Rep*. 2001;3:184-190
 13. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005;66:22-32
 14. Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: Observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:75-82
 15. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474-481
 16. Entman ML, Michael L, Rossen RD, Dreyer WJ, Anderson DC, Taylor AA, Smith CW. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J*. 1991;5:2529-2537
 17. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-esterase inhibitor: An anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev*. 2000;52:91-112
 18. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61:481-497
 19. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53:31-47
 20. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*. 1997;61:647-653
 21. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983;67:1016-1023
 22. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of tgf-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74:184-195
 23. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, Kubota T, Takeshita A. Inhibition of tgf-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res*. 2004;64:526-535
 24. Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowski K, Jing S, Field LJ. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res*. 2000;86:571-579
 25. Frantz S, Hu K, Adamek A, Wolf J, Sallam A, Maier SK, Lonning S, Ling H, Ertl G, Bauersachs J. Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2008;103:485-492
 26. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2000;106:55-62
 27. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-1172

28. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1991;260:H1406-1414
29. Ritter O, Neyses L. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med.* 2003;9:313-321
30. Anversa P, Kajstura J. Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res.* 1998;82:1231-1233
31. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984;311:819-823
32. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin ii--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the at1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993;73:413-423
33. Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, Olivari MT, Cohn JN. The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1984;101:370-377
34. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004;5 Suppl 1:S7-10
35. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The save investigators. *N Engl J Med.* 1992;327:669-677
36. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003;348:1309-1321
37. Sabbah HN, Shimoyama H, Kono T, Gupta RC, Sharov VG, Scieli G, Levine TB, Goldstein S. Effects of long-term monotherapy with enalapril, metoprolol, and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. *Circulation.* 1994;89:2852-2859
38. Libby P, Maroko PR, Bloor CM, Sobel BE, Braunwald E. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J Clin Invest.* 1973;52:599-607
39. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1058-1066
40. Dominguez M, Moreno I, Aizpurua C, Torano A. Early mechanisms of leishmania infection in human blood. *Microbes Infect.* 2003;5:507-513
41. Fearon DT, Austen KF. Properdin: Binding to c3b and stabilization of the c3b-dependent c3 convertase. *J Exp Med.* 1975;142:856-863
42. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* 2007;171:715-727
43. Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. *J Biochem.* 1989;106:483-489
44. Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev.* 1998;50:59-87

45. Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of c3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med.* 1971;133:885-900
46. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998;83:860-869
47. Sumitra M, Manikandan P, Nayeem M, Manohar BM, Lokanadam B, Vairamuthu S, Subramaniam S, Puvanakrishnan R. Time course studies on the initiation of complement activation in acute myocardial infarction induced by coronary artery ligation in rats. *Mol Cell Biochem.* 2005;268:149-158
48. Dreyer WJ, Michael LH, Nguyen T, Smith CW, Anderson DC, Entman ML, Rossen RD. Kinetics of c5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circ Res.* 1992;71:1518-1524
49. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr., Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, Carroll MC. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med.* 1996;183:2343-2348
50. Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, Thiel S, Jensenius JC, Ezekowitz RA, Moore FD, Carroll MC. Activation of the lectin pathway by natural igm in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 2006;177:4727-4734
51. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL, Sacks SH. Predominant role for c5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2000;105:1363-1371
52. La Bonte LR, Davis-Gorman G, Stahl GL, McDonagh PF. Complement inhibition reduces injury in the type 2 diabetic heart following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H1282-1290
53. Strijkers GJ, Bouts A, Blankesteyn WM, Peeters TH, Vilanova A, van Prooijen MC, Sanders HM, Heijman E, Nicolay K. Diffusion tensor imaging of left ventricular remodeling in response to myocardial infarction in the mouse. *NMR Biomed.* 2009;22:182-190
54. Roncal C, Buyschaert I, Chorianopoulos E, Georgiadou M, Meilhac O, Demol M, Michel JB, Vinckier S, Moons L, Carmeliet P. Beneficial effects of prolonged systemic administration of plgf on late outcome of post-ischaemic myocardial performance. *J Pathol.* 2008;216:236-244
55. Engstrom G, Hedblad B, Janzon L, Lindgarde F. Complement c3 and c4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: A population-based cohort study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14:392-397
56. Clark DJ, Cleman MW, Pfau SE, Rollins SA, Ramahi TM, Mayer C, Caulin-Glaser T, Daher E, Kosiborod M, Bell L, Setaro JF. Serum complement activation in congestive heart failure. *Am Heart J.* 2001;141:684-690
57. Mahaffey KW, Van de Werf F, Shernan SK, Granger CB, Verrier ED, Filloon TG, Todaro TG, Adams PX, Levy JH, Hasselblad V, Armstrong PW. Effect of pexelizumab on mortality in patients with acute myocardial infarction or undergoing coronary artery bypass surgery: A systematic overview. *Am Heart J.* 2006;152:291-296
58. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, Todaro TG, Vahanian A, Van de Werf F. Pexelizumab for acute st-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: A randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;297:43-51

59. Granger CB, Mahaffey KW, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Rollins S, Todaro TG, Nicolau JC, Ruzylo W, Armstrong PW. Pexelizumab, an anti-c5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: The complement inhibition in myocardial infarction treated with angioplasty (comma) trial. *Circulation*. 2003;108:1184-1190
60. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzylo W, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Mojcik CF, Todaro TG, Armstrong PW. Effect of pexelizumab, an anti-c5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: The complement inhibition in myocardial infarction treated with thrombolytics (comply) trial. *Circulation*. 2003;108:1176-1183
61. Frangi D, Gardinali M, Conciato L, Cafaro C, Pozzoni L, Agostoni A. Abrupt complement activation and transient neutropenia in patients with acute myocardial infarction treated with streptokinase. *Circulation*. 1994;89:76-80
62. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a c1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1995;91:393-402
63. Murohara T, Guo JP, Delyani JA, Lefer AM. Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1995;17:499-507
64. Horstick G, Heimann A, Gotze O, Hafner G, Berg O, Bohmer P, Becker P, Darius H, Rupprecht HJ, Loos M, Bhakdi S, Meyer J, Kempfski O. Intracoronary application of c1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1997;95:701-708
65. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques: A comparison between abc and unlabeled antibody (pap) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:577-580
66. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, Kovacs A. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002;15:601-609
67. Quinones MA, Pickering E, Alexander JK. Percentage of shortening of the echocardiographic left ventricular dimension. Its use in determining ejection fraction and stroke volume. *Chest*. 1978;74:59-65
68. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev*. 1992;11:105-119
69. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet*. 1994;10:41-42
70. Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994;89:397-410
71. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159

72. Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS. Optimization of dnase i removal of contaminating DNA from rna for use in quantitative rna-pcr. *Biotechniques*. 1996;20:1012-1014, 1016, 1018-1020
73. Fu J, Lin G, Zeng B, Wu Z, Wu Y, Chu H, Qin G, Liang G, Li J, Gan X, Yu X, Li C, Liu D. Anti-ischemia/reperfusion of c1 inhibitor in myocardial cell injury via regulation of local myocardial c3 activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350:162-168
74. Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, Bhurgri H, Khan A, Gowani SA, Waqar SN, Choudhary MI, Jalil S, Zaidi AH, Ara I. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: Reactive oxygen species and the role of neutrophil. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2005;15:507-514
75. Foreman KE, Glovsky MM, Warner RL, Horvath SJ, Ward PA. Comparative effect of c3a and c5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation*. 1996;20:1-9
76. Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med*. 1995;181:2119-2127
77. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*. 2003;23:447-459
78. Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, Cirielli C, Lakatta EG, Crow MT. P53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1997;99:2635-2643
79. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest*. 1997;100:1363-1372
80. Niculescu F, Rus H, van Biesen T, Shin ML. Activation of ras and mitogen-activated protein kinase pathway by terminal complement complexes is g protein dependent. *J Immunol*. 1997;158:4405-4412
81. Buhl AM, Avdi N, Worthen GS, Johnson GL. Mapping of the c5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:9190-9194
82. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997;336:1131-1141
83. van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: A balancing act. *Cardiovasc Res*. 2004;63:487-499
84. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 2003;111:1497-1504
85. Fu J, Lin G, Wu Z, Ceng B, Wu Y, Liang G, Qin G, Li J, Chiu I, Liu D. Anti-apoptotic role for c1 inhibitor in ischemia/reperfusion-induced myocardial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349:504-512
86. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the terminal complement components and inhibition by anti-c5 therapy. *Circulation*. 1998;97:2259-2267

87. Oliveira GH, Brann CN, Becker K, Thohan V, Koerner MM, Loebe M, Noon GP, Torre-Amione G. Dynamic expression of the membrane attack complex (mac) of the complement system in failing human myocardium. *Am J Cardiol.* 2006;97:1626-1629
88. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovasc Res.* 2006;69:604-613
89. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors.* 1988;1:91-99
90. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58:88-111
91. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 2001;104:1413-1418

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz für die Überlassung des Themas der Dissertation und für die Übernahme des Referates bedanken. Darüber hinaus möchte ich „Danke“ sagen für die stets überaus schnellen Hilfestellungen, wenn ich einmal nicht weiter wusste. Durch seine Hinweise habe ich auch insbesondere während des Verfassens der Arbeit noch viele weitere Facetten des wissenschaftlichen Arbeitens kennengelernt.

Bei dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Herrn Prof. Dr. med. Georg Ertl, bedanke ich mich herzlich für das Überlassen der Laborräumlichkeiten zur Durchführung der experimentellen Arbeiten und ebenso für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit.

Für die anfängliche Begleitung meiner Labortätigkeiten bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Jürgen Wolf. Er hat mich als erster in die „Laborwelt“ eingeführt.

Bei Frau Dipl.-Biol. Nadja Blömer bedanke ich mich herzlich für die kontinuierliche Unterstützung während meiner Experimente im Labor und ihre große Geduld bei all meinen Fragestellungen.

Frau Helga Wagner, Frau Charlotte Dienesch und Frau Barbara Bayer gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung in wirklich allen Belangen zum wissenschaftlichen Arbeiten. Bei allen Fragen, die ich hatte, wurde mir stets auf angenehme Art geholfen. Danke auch für die freundliche Aufnahme in das Laborteam, ich habe mich dort stets sehr wohl gefühlt.

Mein Dank gilt jedoch explizit auch all denjenigen hier nicht genannten Personen, die mir bei der Erstellung dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich bei der Fertigstellung unterstützt haben.