

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Rolle von Mannose-binding Lectin für das
ventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von:

Philipp Werle

aus Lohr am Main

Würzburg, Dezember 2010

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. März 2011

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern,

ohne die ich nie hätte studieren können

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
2	Grundlagen	- 4 -
2.1	Pathophysiologie der Infarktheilung	- 4 -
2.2	Kardiales Remodeling nach Infarkt	- 4 -
2.3	Remodeling und Komplementsystem	- 6 -
2.4	Das Komplementsystem	- 8 -
2.5	Mannose-binding Lectin	- 10 -
3	Material und Methoden	- 13 -
3.1	Versuchstiere	- 13 -
3.2	Modell des chronischen Myokardinfarkts	- 14 -
3.3	Echokardiographie	- 15 -
3.4	Organentnahme	- 17 -
3.5	Immunhistochemische Nachweismethoden	- 17 -
3.5.1	Grundlagen der immunhistochemischen Färbemethode	- 17 -
3.5.2	Neutrophilenfärbung	- 19 -
3.5.3	Lectinfärbung	- 21 -
3.6	Auswertung der Kapillar- und Myozytenfärbung	- 23 -
3.7	Infarktgrößenbestimmung	- 23 -
3.8	Messung des Kollagengehalts	- 24 -
3.9	Statistische Auswertung	- 25 -
4	Ergebnisse	- 26 -
4.1	Mortalität	- 26 -

4.2	Lungengewichte	- 27 -
4.3	Infarktgrößen	- 27 -
4.4	Echokardiographie	- 27 -
4.5	Neutrophile	- 31 -
4.6	Kollagenauswertung	- 32 -
4.7	Neovaskularisierung und kardiale Hypertrophie	- 32 -
5	Diskussion	- 35 -
6	Zusammenfassung	- 43 -
7	Literaturverzeichnis	- 44 -
8	Abbildungsverzeichnis	- 50 -

1 Einleitung

Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz stellt in der Kardiologie eine vielschichtige, nach wie vor nicht heilbare Erkrankung dar, deren Ursache beispielsweise in arterieller Hypertonie, Myokarditis, Klappenstenose oder in einem vorausgegangenem Myokardinfarkt zu finden ist. Die Herzinsuffizienz definierte sich als der Zustand, bei dem das Herz nicht in der Lage ist, die peripheren Organe ausreichend mit Blut und damit mit Sauerstoff zu versorgen. Dabei äußert sie sich nicht nur im reinen mechanischen Versagen der Pumpfunktion, sondern auch in daraus hervorgehenden klinischen Symptomen wie Dyspnoe, Tachykardien oder Flüssigkeitsretention und deren teils schwerwiegenden Folgen. Bedingt durch die Komplexität der Symptome einerseits und der systemisch wirkenden adaptiven Prozesse andererseits musste man oben genannte Definition bald revidieren und betrachtet heute die Herzinsuffizienz nicht mehr allein als reines Pumpversagen, sondern eher als Multisystemerkrankung.¹ Das Konzept der zurzeit gängigen Therapien beruht auf Modellen, die anhand der auftretenden klinischen Symptome hergeleitet wurden. Das kardiozirkulatorische Modell sieht das herabgesetzte Output und die periphere Vasokonstriktion im Mittelpunkt, während das kardioresnale Modell sich auf die schlechte Nierendurchblutung und die damit verbundene Wasser- und Salzretention konzentriert.² Mit dem neuroendokrinen Modell schließlich fasst man hormonelle Gegenmaßnahmen zusammen, die sich in einer Sympathikusaktivierung, einer Hochregulierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), sowie einer verstärkten Vasopressin Ausschüttung äußern. Unter Berücksichtigung dieser Modelle beschränken sich eingesetzte Therapeutika auf Betablocker, ACE-Hemmer, Diuretika, Vasodilatoren und Glykoside. Diese symptombezogene Therapie wirkt darüber hinaus langfristig protektiv, indem sie die Umbauvorgänge am Herzen, allgemein als kardiales Remodeling bezeichnet, beispielsweise durch die Diuretika induzierte Senkung der Vor- und Nachlast verlangsamt. Das Remodeling an sich trägt dabei nach einer Phase der Kompensation zweifelsohne zur weiteren kardialen Dysfunktion bei und läuft anfangs stumm im Hintergrund ab, während der Patient noch asymptomatisch ist.³ Zwar weist man spätestens nach der SOLVD-Studie,⁴ dass auch ACE-Hemmer neben den blutdrucksenkenden Eigenschaften die ungünstigen Umbauvorgänge des kardialen Remode-

ling bremsen können, jedoch reicht dieser Effekt nicht aus, um diese völlig aufzuhalten. Es liegt folglich nahe, dass es noch weitere Systeme geben muss, die auf das kardiale Remodeling einwirken.

Mit der Erkenntnis, dass das angeborene Immunsystem schon früh nach Infarkt aktiviert ist und ganz wesentlich über Beeinflussung der Myozytenhypertrophie, Kollagensynthese und Ventrikeldilatation zum Remodeling beiträgt,⁵ ergeben sich völlig neue Möglichkeiten für zukünftige Therapieansätze. Ein möglicher Ansatzpunkt ist das Komplementsystem, das bereits 1970 von Hill und Ward als im Infarkt aktiviert nachgewiesen wurde. Durch den sog. Cobra Venom Factor (CVF), einem Extrakt aus Kobragift, wurde der Komplementfaktor C3 gehemmt und damit unter anderem dessen chemotaktische Wirkung, wie sich anhand geringerer Neutrophileneinwanderung in das Infarktgebiet zeigte.⁶ Schon wenig später konnte Maroko et al. anhand histologischer und enzymatischer Kriterien zeigen, dass mit CVF behandelte Hunde nach Ligation der LAD (=left anterior descending) einen geringeren Myokardschaden (Abnahme der Infarktgröße, weniger Nekrose und geringere Neutrophileneinwanderung) hatten als die Kontrollgruppe ohne jenen CVF.⁷ Folglich lässt sich zusammenfassen, dass C3 eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion nach stattgehabtem Infarkt spielt und dass dessen Hemmung sich positiv auf den Schaden auswirkt.

Wie kürzlich nachgewiesen werden konnte, lassen sich auch 8 Wochen nach einem künstlich gesetzten Infarkt erhöhte C3 Spiegel während des Remodelings in Mäuseherzen nachweisen. Als man Wildtyp (WT) Tiere mit C3-Knock Out (KO) Tieren verglich, unterschieden sich beide zwar hinsichtlich Mortalität nicht, dafür jedoch, was das Remodeling und die damit verbundene linksventrikuläre Dysfunktion betraf. C3-KO Tiere zeigten eine signifikant reduzierte linksventrikuläre Dilatation, eine geringere Rate an Apoptose und weniger Kollagen im Ventrikel als die Kontrollgruppe. (Frantz et al., personal communication) Die Frage, die sich nun stellte, war, welcher der drei Aktivierungswege des Komplementsystems (der Klassische, der Lectin oder der Alternative Weg) während des kardialen Remodelings an Mäuseherzen aktiv ist, war doch bei den C3-KO Mäusen die gemeinsame Schnittstelle der drei Wege gehemmt, nicht aber deren Aktivierung. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Mannose-binding Lectin (MBL) KO-Mäuse und WT-Mäusen hinsichtlich deren ventrikulären Remodelings nach Infarkt verglichen. Durch das fehlende MBL war eine Aktivierung des Kom-

plementsystems über den Lectin Weg nicht möglich. Ziel war es somit herauszufinden, ob sich die bei den C3-KO Mäusen beobachteten positiven Effekte bezüglich der ventrikulären Dilatation auch bei MBL-KO Mäusen zeigen würden. Damit wäre nachgewiesen, dass der MBL-Weg der Komplementaktivierung für die dauerhaft erhöhte Faktor C3 Konzentration während des Remodelings im chronisch insuffizienten Mäuseherz nach Infarkt verantwortlich ist.

2 Grundlagen

2.1 Pathophysiologie der Infarktheilung

Wie bereits erwähnt, gibt es viele mögliche Schadensereignisse, die im Herzen den Remodelingprozess in Gang setzen und damit zu einer Herzinsuffizienz führen können. Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit als initiales Ereignis der Infarkt als Auslöser des Remodelings ausgewählt wurde, soll im Weiteren nur noch darauf Bezug genommen werden.

Nach Blankensteijn folgt einem akuten Verschluss einer Koronararterie eine Heilungsreaktion, die sich in vier Phasen einteilen lässt.⁸ Innerhalb der ersten 6 Stunden kommt es aufgrund der fehlenden Blutversorgung zum Absterben der Myozyten, wie sich klinisch an erhöhten Laborparametern, wie beispielsweise dem Troponin T oder dem CK-MB, zeigt. Daran folgt im Anschluss die Entzündungsreaktion mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, gefolgt von Lymphozyten und Makrophagen, deren Hauptaufgabe darin besteht, abgestorbene Zellreste abzuräumen und in der dritten Phase ein Granulationsgewebe zu bilden. Dieses ist reich durchblutet und mit Einwanderung von Myofibroblasten beginnt mit zunehmender Kollagensynthese die Reparaturphase, die dann nach 2-3 Wochen im Narbenstadium endet.

2.2 Kardiales Remodeling nach Infarkt

Das kardiale Remodeling umschreibt am Herzen ablaufende Umbauvorgänge nach einem schädigenden Ereignis, wie dem Infarkt. Es wird definiert als alle auf genetischer, molekularer, zellulärer und interstitieller Ebene stattfindenden Veränderungen, die sich klinisch als vergrößerter, teils hypertrophierter, teils dilatierter Ventrikel mit herabgesetzter kontraktile Funktion zeigt.³ Im Gegensatz zur beschriebenen Heilungsreaktion des Infarkts (siehe 2.1), betrifft das sich daran anschließende Remodeling den gesamten Ventrikel und damit auch Areale, die ursprünglich nicht vom Infarkt betroffen waren. Innerhalb der Heilungsreaktion kommt es bedingt durch den Verlust der Myozyten zu einem Absinken der kardialen Pumpfunktion und dementsprechend zu einer Erhöhung der Vorlast. Dem kann das Herz akut mit einer Steigerung der Kontraktionskraft mittels

Frank-Starling Mechanismus, Bowditch-Effekt und Sympathikusaktivierung entgegen wirken. Neuroendokrine Kompensationsmechanismen, wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) oder verstärkte Vasopressin-Freisetzung tragen ebenfalls dazu bei, das Herz-Kreislauf-System aufrecht zu erhalten. Parallel dazu jedoch werden am Herzen selbst im Rahmen der erwähnten stattfindenden Entzündungsreaktion Serinproteasen und Matrixmetalloproteinasen aktiviert, die in dem infarzierten Gebiet das interstitielle Kollagen abbauen und damit im Infarktgebiet zu einer Expansion, Wandverdünnung und Ventrikeldilatation führen.⁹ Dies bringt gerade in den ersten Tagen die Gefahr einer Ventrikelruptur und damit das Risiko eines plötzlichen Herztodes mit sich.

Diese Kombination aus erhöhter Ventrikelfüllung und gleichzeitiger Verdünnung der Ventrikelwand erhöht die regionale Wandspannung, die in der chronischen Phase des Remodelings reduziert werden soll.⁹ Nach der Formel von Laplace kann eine erhöhte Wandspannung nur durch Zunahme der Wanddicke gesenkt werden. Getriggert durch die Wandspannung selbst, aber auch über lokal im Herzen gebildetes Angiotensin II und Zytokine wie TNF- α kommt es folglich zur Hypertrophie der Myozyten im nicht infarzierten Ventrikelbereich und damit zusammen mit den erwähnten Adaptationsvorgängen zu einer kurzfristigen Kompensation.¹⁰ Die Umbauvorgänge betreffen folglich nicht mehr das infarzierte Gebiet alleine, sondern den gesamten Ventrikel. Chronisch aktiviert können jedoch genau jene anfangs notwendigen kompensatorischen Prozesse zunächst vom Patienten unbemerkt über Blutdruckanstieg, Tachykardie, Vor- und Nachlasterhöhung, sowie den weiter voranschreitenden ventrikulären Strukturveränderungen zu einer zunehmenden Schädigung des Herzens beitragen und so betrachten Cohn et al neben dem RAAS und dem Sympathikus auch den Prozess des Remodelings an sich als unabhängigen Faktor zur Progression in die Herzinsuffizienz.¹¹ Die Begründung dafür findet sich in der fortschreitenden ventrikulären Dilatation und Wandverdünnung sowie den Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Während die Myozyten einerseits hypertrophieren, gehen andererseits Myozyten durch gleichzeitig stattfindende Nekrose und Apoptose verloren, wodurch die übrigen Myozyten noch stärker belastet werden.¹² Der Abbau der extrazellulären Matrix und die Fibrosierung fördern die Dilatation und führen gleichzeitig zur Versteifung des Ventrikels und damit verbundener erhöhter Volumenbelastung, die wiederum über Frequenzanstieg und Myozytenhypertrophie zwecks Kontraktilitätssteigerung ausgeglichen werden muss. Somit

stellt sich ein sich gegenseitig bedingender Teufelskreislauf zwischen myokardialer Dysfunktion und Remodelingmaßnahmen ein, der schließlich in einer Herzinsuffizienz mündet.² (siehe Abb. 2.1)

2.3 Remodeling und Komplementsystem

Neben den bereits erwähnten Mechanismen geht man nach heutigem Kenntnisstand davon aus, dass das kardiale Remodeling im insuffizienten Herz wesentlich durch das schon früh aktivierte angeborene Immunsystem beeinflusst wird. Während das erworbene Immunsystem hochspezialisiert antigenspezifisch arbeitet, stellt die angeborene Immunität eher eine erste unspezifische, aber dafür sofort verfügbare Immunantwort dar, die nach der „Danger-Theorie“ von Matzinger auch durch eine Gewebsverletzung und somit nicht zwangsläufig durch eine Infektion angeregt werden kann.¹³ Verletzte Zellen senden Alarmsignale aus, wie beispielsweise Sauerstoffmangel, Fibronectine oder Hitzeschockproteine, die dann von „pattern recognition receptors“ (PRRs) erkannt werden und zu einer Immunaktivierung führen.¹⁴ Dies umfasst die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen sowie auch die Aktivierung des Komplementsystems.¹ Während die Zytokine über Jahre hinweg sehr intensiv untersucht wurden, gewinnt nun auch das Komplementsystem langsam an Bedeutung in der Frage der Prävention und Therapie des Remodelings. Clark et al gaben die ersten Hinweise, dass das Komplementsystem in der chronischer Herzinsuffizienz aktiv ist und mit deren klinischen Symptomen korreliert.¹⁵ Die Arbeitsgruppe teilte Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nach Höhe der gemessenen Membranangriffskomplex (MAK) Konzentration des Komplementsystems in zwei Gruppen ein und verfolgten über 6 Monate deren klinischen Verlauf. Innerhalb dieses Zeitraums kam es in der Gruppe mit der höheren MAK-Konzentration zu signifikant mehr NYHA IV Symptomen und zu einem schlechteren klinischen Outcome als in der Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung sahen sie in der nachgewiesenen schädigenden Aktivität des Komplementsystems während des Remodelings, wie beispielsweise dem Auslösen der Apoptose, der Vasokonstriktion sowie der Interaktion mit Zytokinen, die selbst zu einer weiteren Verschlechterung des Remodelings beitragen.¹⁵ Ebenfalls einen Hinweis für die schädigende Wirkung der dauerhaften Komplementaktivierung konnten Aukrust et al bringen.¹⁶ Unabhängig vom Komplementsystem konnten sie zeigen, dass die Behand-

lung von Patienten mit hochdosierter intravenöser Immunglobulingabe langfristig zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) führte. Unklar blieb jedoch über welchen Mechanismus dieser Effekt vermittelt war. Als sie in ihrer Studie die gemessene Komplementkonzentration im peripheren Blut mit der LVEF verglichen, stellten sie fest, dass zwischen diesen beiden Parametern eine negative Korrelation bestand. Je höher die Komplementaktivierung war, desto niedriger fiel die Zunahme der LVEF aus.¹⁶ Sie schlossen daraus, dass mit zunehmender Komplementaktivierung die vorteilhaften Effekte der Immunglobulingabe aufgehoben wurden und dass dementsprechend das Komplementsystem ein lohnendes Ziel für zukünftige Therapieoptionen darstelle.

Worauf die dauerhafte Aktivierung des Komplementsystems während des Remodelings jedoch beruht, ist dabei noch unklar. Die Annahme, die chronische Aktivierung könnte auf den hämodynamischen Bedingungen beruhen, konnte Clark et al widerlegen. Nach Implantation eines „ventricular assist device“ bei NYHA IV Patienten konnte keine Änderung der Komplementfaktor C3 und C5 Konzentration gefunden werden.¹⁷ Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Lappegard et al.¹⁸ Sechs Monate nach 3-Kammer Schrittmacher Implantation konnte bei allen Patienten eine Zunahme der LVEF und eine, um mindestens eine Stufe, bessere NYHA Klassifikation verzeichnet werden. Weiterhin stellte sie fest, dass die Verbesserung der hämodynamischen Bedingungen durchaus zu einer signifikanten Reduktion der Interleukine 6 und 8 führte, jedoch zu keiner verminderten Konzentration der bestimmten Komplementfaktoren.¹⁸ Eine andere Erklärung liefern möglicherweise sowohl Giclas et al als auch Hindmarsh et al, die beide nachweisen konnten, dass es nach Endothelzellschäden durch freiliegende Mitochondrienmembranen, als auch durch subendotheliale extrazelluläre Matrixstrukturen zur Komplementaktivierung kommt.¹⁹⁻²⁰ Inwieweit dies jedoch während des Remodelings passiert, ist bisher unbekannt und bedarf weiterer Studien. Dennoch geht man, basierend auf den Erkenntnissen von Hill und Ward, davon aus, dass das Komplementsystem nach Infarkt aktiviert wird, während des Remodelings chronisch aktiviert bleibt und damit ein Ansatzpunkt für zukünftige Therapieoptionen bietet.

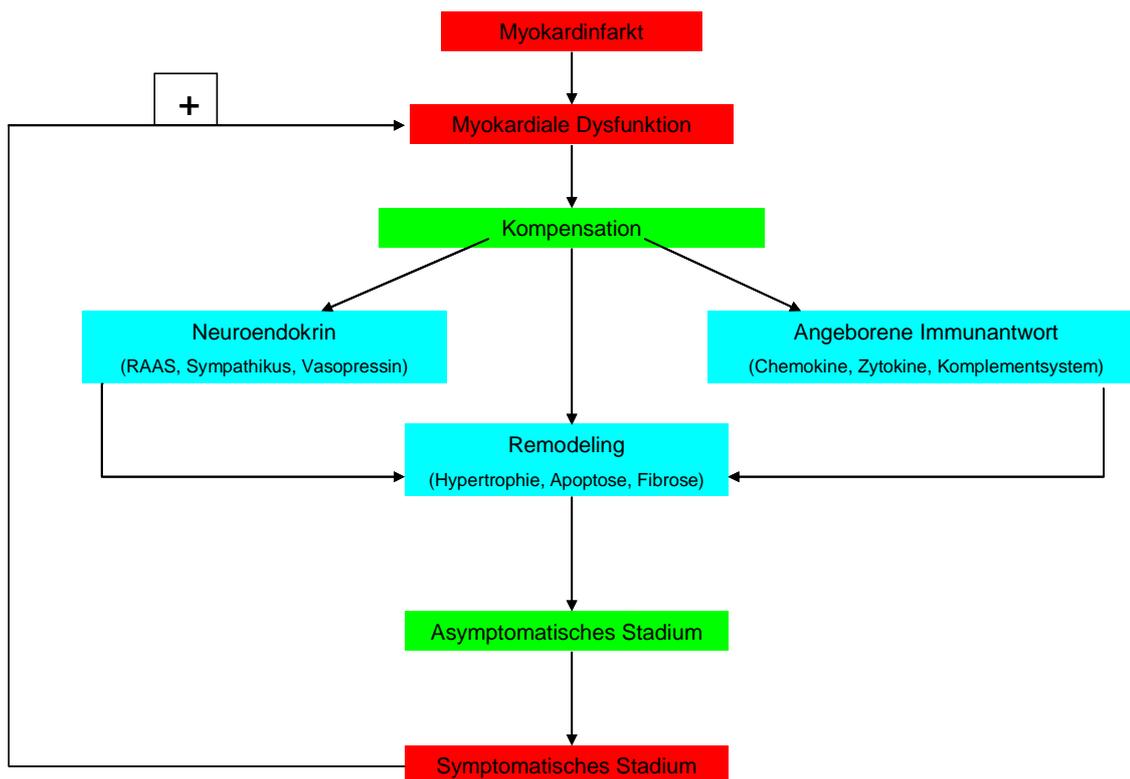


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Ablaufs vom initialen Infarkt bis zur Herzinsuffizienz. Nach Infarkt kommt es zu einer kardialen Dysfunktion, die durch neuroendokrinen Maßnahmen als auch durch direkte Umbauvorgänge am Herz (Remodeling) versucht wird zu kompensieren. Weiterhin ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems als drittes wesentliches Ereignis dargestellt. Nach initial positivem Effekt der Kompensationsmaßnahmen kommt es langfristig aufgrund der ventrikulären Dilatation und Fibrosierung zur symptomatischen Herzinsuffizienz mit erneuter kardialer Dysfunktion. Es entwickelt sich ein Teufelskreis. Modifizierte Zeichnung nach Gong et al²¹

2.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus einer, ähnlich dem Gerinnungssystem, kaskadenartig ablaufenden Aktivierungsfolge, die schließlich in der Formung des sog. Membranangriffskomplexes C5b-9 (MAK) mündet. Dieser wird in die Zellmembran von Bakterien oder Zellen eingebaut und kann entweder durch einen massiven Calciumeinstrom zu deren lytischen Zerstörung führen, deren Apoptose einleiten oder die Entzündungsreaktion durch beispielsweise erhöhte Zytokinexpression in den betroffenen Zellen beeinflussen.²² Darüber hinaus dient das Komplementsystem der Opsonierung und Chemotaxis und erfüllt folglich eine wichtige Funktion im Rahmen der frühen Immunabwehr des angeborenen Immunsystems.²³ Schließlich interagiert es auch mit dem er-

worbenen Immunsystem, indem es zu einer Erhöhung der Antikörperbildung beiträgt und bei der Ausbildung von Gedächtniszellen beteiligt ist.²³ Das Komplementsystem kann auf drei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden (Klassischer, Lectin oder Alternativer Weg). Der klassische Weg der Aktivierung erfolgt mittels an Antigenen gebundenen Antikörpern, die mit C1q als Teil des C1-Komplexes (C1q, 2x C1r und 2x C1s) interagieren, während der Lectin-Weg über Mannose-binding Lectin gestartet wird. Für die Spaltung der Faktoren C4 in C4a+C4b und C2 in C2a+C2b, das im klassischen Weg von C1s vermittelt wird, benötigt MBL sog. assoziierte Serinproteasen (MBL-associated serine proteases, MASPs), von denen 3 Stück (MASP 1-3) sowie MASP19, ein alternatives Splicingprodukt des MASP2 Gens, bekannt sind.²⁴ Die genaue Aufgabe der einzelnen MASPs ist unklar, sicher sagen kann man nur von MASP-2, dass es sowohl für die Spaltung von C4 als auch von C2 zuständig ist und dass MASP-1 Faktor C3 anscheinend direkt aktivieren kann.²⁵ C4b und C2a setzen sich zur C3-Konvertase C4b2a zusammen, die im nächsten Schritt C3 in C3a und C3b trennt. Dieses C3b wird im Anschluss zur Formierung der C5-Konvertase C4b2a3b benötigt, deren gebildetes C5b Grundlage für die Zusammensetzung des MAK C5b-9 ist.²⁶ (siehe Abb. 2.2) Diesem Reaktionsablauf steht als dritter möglicher Pfad der Komplementaktivierung der alternative Weg gegenüber, der über eine spontane Hydrolyse des Faktors C3 in C3b beginnt. C3b bindet Faktor B, der mittels Faktor D gespalten wird und so die alternative C3-Konvertase (C3bBb) formt.²⁷ Auch diese bildet wiederum C3b, das zur Zusammensetzung der alternativen C5-Konvertase C3bBb3b und der anschließenden Formierung des MAK führt. Alle drei Wege münden folglich in der Bildung einer C3-Konvertase, deren Aufgabe darin besteht, weiteres C3b zu produzieren. Dementsprechend stellt C3 die erste gemeinsame Schnittstelle der drei Aktivierungswege dar. Eine Hemmung dieses Faktors führt folglich zur Blockade des gesamten lytischen Abschnitts (ab C3b bis fertigem MAK) des Komplementsystems.

Neben dem bereits erwähnten MAK agiert das Komplementsystem auch über die als Anaphylatoxine bezeichneten Faktoren C3a, C4a und C5a, den Spaltprodukten zur Formung des MAK. Neben ihrer allgemeinen Rolle in der Entzündungsmodulation und Opsonierung bei Infektionen, wirken sie insbesondere am Herz nach Infarkt proinflammatorisch und verstärken zusammen mit dem MAK den kardialen Schaden.²⁷

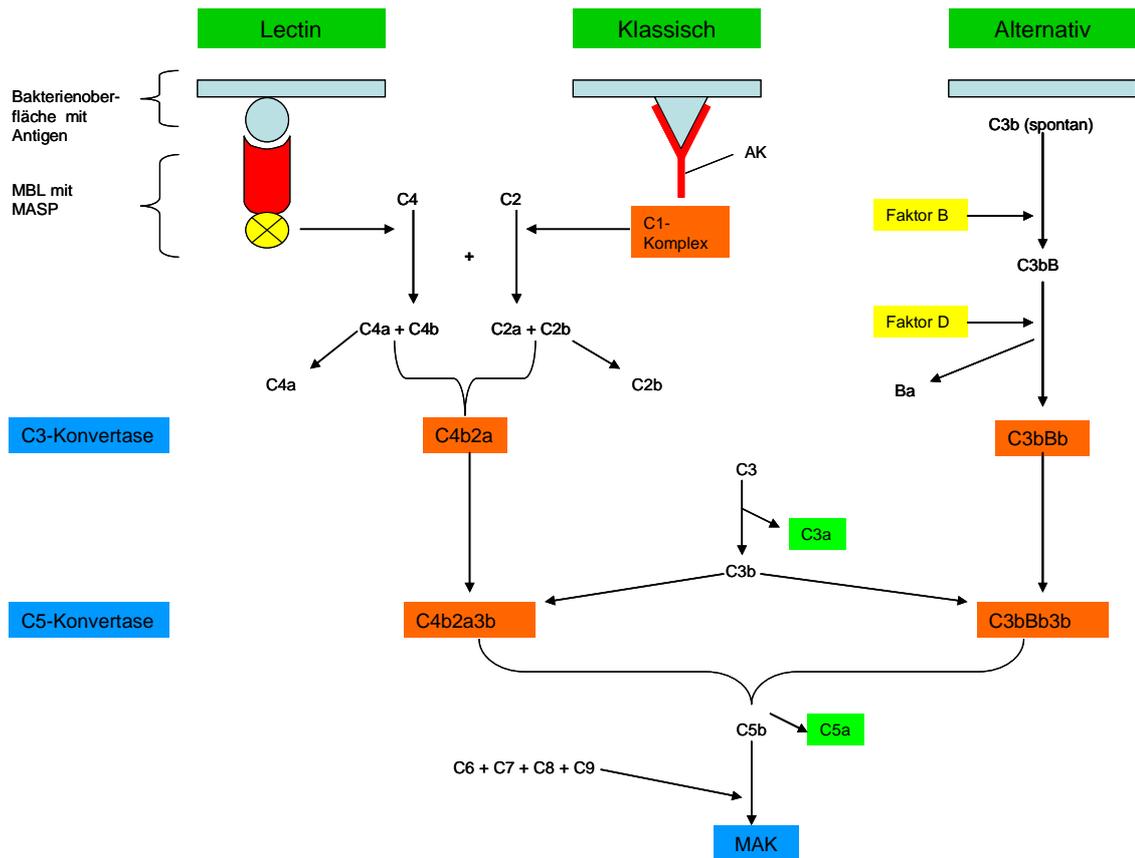


Abb. 2.2: Überblick über die Komplementkaskade. Dargestellt sind die drei Aktivierungswege des Komplementsystems. Während Klassischer und Lectin Weg die gemeinsame C3-Konvertase (C4b2a) bilden, geht aus dem sich spontan aktivierenden alternativen Weg die abgewandelte Form (C3bBb3b) hervor. Beide spalten aber aus Faktor C3 den Faktor C3b ab, der an die C3-Konvertase bindet und daraus die C5-Konvertase bildet. Diese spaltet aus C5 den Faktor C5b ab, der dann zusammen mit den Faktoren C6-9 den Membranangriffskomplex bildet (MAK). Die abgespaltenen Fragmente C3a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet. Modifizierte Zeichnung nach Walport et al²³

2.5 Mannose-binding Lectin

Mannose-binding Lectin ist ein C-Typ-Lectin Rezeptor, der zusammen mit anderen Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren oder Scavenger Rezeptoren zu den PRRs des angeborenen Immunsystems gehört.²⁸ MBL erkennt somit häufige pathogen assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) wie Mannose, Glucose, oder N-Acetylglucosamine,²⁹ leitet die Komplementaktivierung über den Lectin Weg ein oder unterstützt durch Opsonierung und Interaktion mit Makrophagen die Phagozytose der Erreger. Wie wichtig dieses Erkennen von Bakterien seitens des MBL ist, zeigte sich besonders eindrücklich bei Kindern mit einem genetisch bedingten sehr niedrigen MBL Spiegel und damit verbundener herabgesetzter Opsonierung, die extrem

anfällig gegenüber bakteriellen Infektionen waren.³⁰ Darüber hinaus erkennt MBL aber auch beschädigte Oberflächenmuster (damaged associated molecular patterns, DAMPs) wie Veränderungen der Glykosilierung von Glykoproteinen oder geänderte Zusammensetzungen der Phospholipidkomponenten der Zellmembran.²⁸ Diese Zellmembranveränderungen treten bei Zellen besonders im Rahmen der Apoptose auf wie sie bei sterilen Entzündungen, Umbauvorgängen und beim Remodeling vorkommt. MBL ist dabei nicht zwangsläufig an das Komplementsystem gekoppelt. Nauta et al konnten beweisen, dass MBL komplementunabhängig die Phagozytose apoptotischer oder nekrotischer Zellen über Makrophagen einleitete.³¹ Dementsprechend konnten Stuart et al an MBL-KO Mäusen zeigen, dass das Fehlen von MBL zu einem verspäteten Abbau apoptotischer Zellen führte.³² MBL ist strukturell ähnlich aufgebaut wie C1q aus dem klassischen Weg der Komplementaktivierung, das seinerseits nach Interaktion mit bestimmten Oberflächenmolekülen apoptotischer Zellen zu deren Phagozytose beiträgt.

Basierend auf der Erkenntnis, dass die Rolle des MBL über die bloße Komplementaktivierung nach Infektion hinaus geht, wurde in den letzten Jahren MBL immer öfter mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist nicht eindeutig geklärt, wie sich ein MBL-Mangel basierend auf einer Mutation des menschlichen MBL Gens bei Autoimmunerkrankungen auswirkt. Während nach Ramos-Casals et al Patienten mit Sjögren Syndrom von niedrigen MBL-Spiegel durch geringere Symptomausprägung profitierten,³³ so zeigten Tsutsumi et al, dass niedrige MBL-Spiegel als Risikofaktor für Systemischen Lupus Erythematoses zu sehen sind. Über die Rolle des MBL in Autoimmunerkrankungen hinaus konnten Satomura et al erhöhte MBL-Spiegel bei chronisch niereninsuffizienten Patienten nachweisen und führten dies auf eine chronische Entzündungsreaktion im insuffizienten Organ zurück.³⁴ Inwieweit MBL jedoch während des Remodelings am insuffizienten Herz eine Rolle spielt und ob die chronische Entzündung des angeborenen Immunsystems durch MBL beeinflusst wird, ist bisher weitestgehend unbekannt und diese Arbeit stellt eine der ersten Untersuchungen diesbezüglich dar. Obwohl der potenziell schädigende Einfluss des MBL bei Ischämie/Reperfusion Versuchen im Mausmodell am Herzen klar belegt ist, so fehlen hingegen Studien zum permanenten Infarkt. So konnten Busche et al zeigen, dass nach 30 min Ischämie und 4 Stunden Reperfusion Mäuse, die sowohl für IgM als auch für MBL KO waren, geringere Neutrophilen und C3-Konzentrationen aufwiesen als die WT Kontrollgruppe.³⁵ Folg-

lich hatte diese Arbeit einerseits die Zielsetzung, das Remodeling nach Myokardinfarkt bei MBL-KO Mäusen zu untersuchen und damit Rückschlüsse auf die Beeinflussung der angeborenen Immunantwort durch MBL zu ziehen. Andererseits ging es konkret darum, die Frage zu klären, ob die in einer vorausgegangenen Studie beobachtete Erhöhung des Komplementfaktors C3 (Frantz et al., personal communication) auf den durch MBL eingeleiteten Lectin-Weg des Komplementsystems zurückgeht.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden MBL-KO Mäuse verwendet, bei denen eine Aktivierung des Lectin-Weges des Komplementsystems durch MBL nicht möglich war. Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Maus 2 Gene für MBL (*mb11* und *mb12*) und somit auch zwei Formen des MBL, in der Literatur als MBL-A und MBL-C bezeichnet.³⁶ Sowohl MBL-A als auch MBL-C können in der Maus den Lectin-Weg aktivieren. Dies machte die Verwendung von Mäusen in dieser Arbeit notwendig, die weder MBL-A noch MBL-C bilden konnten. Die Züchtung dieser Tiere, die für beide MBL-Formen KO sind, geht auf Shi et al³⁶ und Takahashi et al³⁷ zurück. Beiden gelang mittels eines Target Vektors, bei dem eine Neomycin-Resistenz in ein Exon eingefügt war, und homologer Rekombination Stammzellen zu züchten, bei denen entweder das MBL-A oder MBL-C Gen durch die Neomycin-Resistenz unterbrochen und damit inaktiviert war. Diese Stammzellen wurden anschließend in Maus-Blastozysten eingepflanzt und die daraus über Zwischenkreuzungen entstandenen MBL-A KO oder MBL-C KO Mäuse schließlich, wie bei Shi et al weiter beschrieben, miteinander gekreuzt, um MBL-KO Mäuse zu erhalten. Phänotypisch entwickelten sich diese MBL-KO Mäuse wie ihre Wildtyp-Artgenossen.³⁶

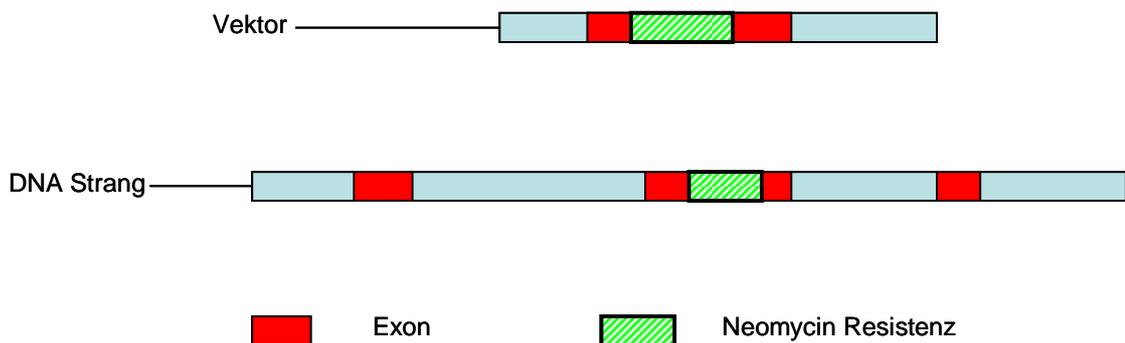


Abb. 3.1: Vereinfacht ist der konstruierte Vektor mit in einem Exon (rot) eingefügter Neomycin-Resistenz dargestellt. Nach homologer Rekombination ist die Resistenz in das Gen eingebaut und dieses damit inaktiviert. Modifiziertes Schema nach Shi et al³⁶

Von diesen gezüchteten MBL-KO Mäusen wurden für diese Arbeit insgesamt 18 Tiere bezogen. Zwölf weitere Wildtyp (WT) Tiere dienten als Kontrollgruppe. Von beiden Gruppen wurden jeweils zwei Tiere als SHAM-Tiere behandelt, bei denen zwar eine Thoraxeröffnung durchgeführt wurde, aber keine Ligation des RIVA stattfand und somit auch kein Infarkt vorlag. Eine behördliche Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche lag vor.

3.2 Modell des chronischen Myokardinfarkts

Zur Simulierung eines chronischen Myokardinfarkts mit sich anschließendem ventrikulärem Remodeling wurde bei 16 Tieren der MBL-KO Gruppe und bei 10 Tieren der WT-Gruppe mittels Ligation des RIVA künstlich eine Ischämie gesetzt und diese Unterbindung dauerhaft belassen (Gruppenbezeichnung KO/MI bzw. WT/MI). Die jeweils verbleibenden 2 Tiere beider Gruppen wurden, wie bereits erwähnt, als SHAM Tiere behandelt. Sie dienten bei der späteren Auswertung als Vergleichstiere und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als WT/Sham oder KO/Sham bezeichnet.

Zur präoperativen Narkoseeinleitung wurden die Tiere mittels Isofluran (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) betäubt und anschließend mit einer Braunüle (BD Venflon™ Pro, Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) intubiert und an ein Kleintierbeatmungsgerät (Mouse Ventilator, UGO BASILE, biological research apparatus, Comerio, Italien) angeschlossen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose bis zur Vollendung der Hautnaht erfolgte die weitere inhalative Anästhesie mit einem bis zu 8% gesättigtem Isofluran-Sauerstoff Gemisch. Mittels angelegtem EKG (Cardiofax GEM, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H, Deutschland) wurde anhand der gemessenen Herzfrequenz die Narkosetiefe individuell angepasst, wobei eine Zielfrequenz von ca. 550 Schlägen pro Minute angestrebt wurde. Außerdem wurde zur späteren Erfolgskontrolle der Ligation ein präoperatives EKG abgeleitet.

Nach durchgeführtem Hautschnitt in Höhe des 4. Interkostalraums wurde der Thorax eröffnet und das Herz dargestellt. Das Perikard wurde gefenstert und der RIVA mit einem Vicrylfaden (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) ca. 1mm apikal des linken Vorhofes dauerhaft ligiert. Der Erfolg der Unterbindung zeigte sich mit der Ausbildung eines ST-Hebungsinfarkts auf dem EKG-Ausdruck. Nach Adaptation der Gewebe-

schichten und Hautverschluss mittels Klammernaht wurden die Tiere unter Zuführung von 100%-igen Sauerstoff unter einer Wärmelampe bis zum Erwachen gelagert. Außerdem erhielten sie zur postoperativen Analgesie eine einmalig Dosis Buprenorphin (Temgesic, Essex Pharma, München, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1mg/kg Körpergewicht.

Die Tiere wurden im Anschluss an die Operation für 8 Wochen in artgerechten Käfigen gehalten und normal gefüttert. Innerhalb dieses Zeitraums wurden die Tiere dreimal echokardiographisch untersucht, bevor sie nach 56 Tagen zur Organentnahme getötet wurden.

3.3 Echokardiographie

Ein wichtiger Parameter des kardialen Remodeling stellt die Ventrikeldilatation dar. Sie ist nicht nur Folge der direkten Umbauprozesse am Herzen, sondern ist auch deren Ursache, bedingt doch die Dilatation einen zunehmenden Wandstress der Myozyten und damit wiederum einen wichtigen Stimulationsfaktor für weiteres Remodeling (siehe Kapitel 2). Zur Verlaufsbeobachtung wurden daher anhand nicht invasiver transthorakaler Echokardiographie (Echokardiographie-Gerät: Toshiba Aplio, Toshiba Medical Systems GmbH, Deutschland) die Größenveränderungen der Innenfläche und des Durchmessers des linken Ventrikels am Tag 1, 21 und 56 sowohl in der Systole, als auch in der Diastole bestimmt und anhand dieser Werte die prozentuale systolische Verkürzungsfraction (engl. fractional shortening, FS) berechnet. Dieser Wert diente zur Beurteilung der Kontraktilität und damit der Auswurfleistung des Ventrikels. Die Untersuchung erfolgte dabei sowohl in Höhe der Papillarmuskulatur (PA) als auch an der Herzspitze (Apex, AP) und wurde im B-Mode und M-Mode durchgeführt. Im B-Mode wurde in zweidimensionaler Darstellung die linksventrikuläre Endsystolische Area (ESA) und die linksventrikuläre Enddiastolische Area (EDA) bestimmt. Aus EDA und ESA ließ sich dann das FS der Area (FS-Area) nach folgender Formel berechnen:

$$\text{FS-Area} = [(EDA-ESA)/EDA] \times 100\%$$

Analog dazu wurde im M-Mode die Ventrikelbewegung nach der Zeit mit einer Laufgeschwindigkeit von 100mm/s aufgezeichnet. Im Standbild ließ sich so der Endsystolische Durchmesser (ESD) und der Enddiastolische Durchmesser (EDD) des Ventrikels ver-

messen. Wie bereits im B-Mode wurde auch aus diesen Werten wieder das FS, hier bezogen auf den Ventrikeldurchmesser (FS-D) während der Herzphasen berechnet.

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

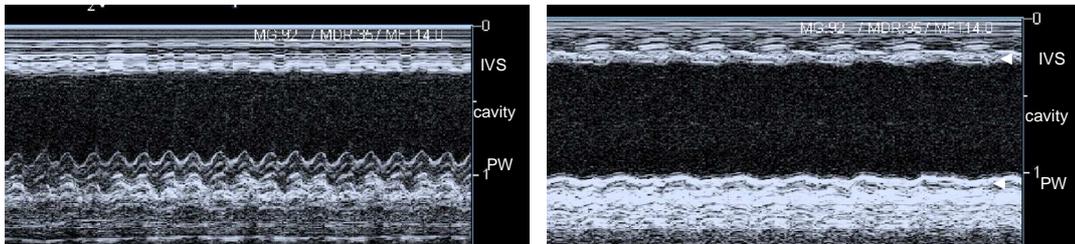


Abb. 3.2: M-Mode Darstellung der transthorakalen echokardiographischen Aufnahme des linken Ventrikels einer WT-Maus (links) und einer MBL-KO Maus (rechts). Die Ventrikelkontraktionen und damit die Veränderungen des Ventrikeldurchmessers sind nach der Zeit aufgetragen. Deutlich sieht man rechts die geringere Wandbewegung des Ventrikels der MBL-KO Maus und die größere ventrikuläre Dilatation (IVS = interventricular septum, PW = posterior wall)

Zu Beginn der Untersuchung wurden die Tiere via Atemmaske (Atemmaske für Kleintiere, FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland) mit einem 4-8%-tigen Isofluran-Sauerstoff Gemisch betäubt, mittels Klebestreifen auf einer Unterlage fixiert und am Thorax rasiert. Dieses Gasgemisch wurde der Maus zur weiteren Aufrechterhaltung der Betäubung während der gesamten Untersuchung zugeführt. Die Maus atmete dabei spontan, ihre Herzfrequenz diente wieder zur besseren Steuerung der Dosierung. Die angestrebte Zielfrequenz lag dabei zwischen 550 bis 600 Schlägen pro Minute, da zu geringe Frequenzen bei der Maus zu einer verfälschenden Ventrikeldilatation führen. Mit einem 15 MHz Schallkopf wurde zunächst parasternal ein Querschnitt des linken Ventrikels im B-Mode eingestellt und anhand des erhaltenen zweidimensionalen Bildes die Innenfläche im Bereich des größten Querschnitts (Papillarmuskel, PA) als auch an der Herzspitze (AP) mit dem Computerprogramm Nice Software (TomTec Imaging Systems, München, Deutschland) vermessen. Dies erfolgt jeweils dreimal am Ende der Systole und am Ende der Diastole. Anschließend wurden daraus die Mittelwerte und das FS berechnet.

In der sich anschließenden M-Mode Darstellung wurden wiederum jeweils dreimal der ventrikuläre Durchmesser in Höhe der Papillarmuskulatur als auch an der Herzspitze gemessen und aus den Ergebnissen wieder Mittelwert und FS errechnet. Die gesammel-

ten Daten wurden mit der Statistiksoftware Statview (Statview for Windows, Version 5.0.1, SAS Institute, Berkeley, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.4 Organentnahme

Nach erfolgter dritter echokardiographischer Untersuchung am 56. Tag wurden die Tiere erneut narkotisiert und dann operativ das Herz, sowie die beiden Lungenflügel entnommen. Es erfolgte eine quere Laparotomie unterhalb des Rippenbogens mit anschließender Thoraxeröffnung durch zwei entlang der Axillarlinien verlaufenden Schnitte. Der Thorax ließ sich dadurch wie ein Deckel nach kranial klappen und ermöglichte dadurch eine gute Darstellung der Thoraxorgane.

Die entnommenen Organe wurden zunächst im Ganzen gewogen, bevor am Herz die Vorhöfe und Herzohren entfernt wurden. Rechter und linker Ventrikel wurden entlang des Interventrikularseptums getrennt und erneut gewogen. Der frei präparierte linke Ventrikel wurde in vier ca. gleich große Stücke geschnitten und diese getrennt voneinander entweder in Paraffin eingebettet, in Isopentan auf Trockeneis eingefroren oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Herzbasis als viertes Stück wurde als Gewebereserve ebenfalls in flüssigem Stickstoff konserviert.

3.5 Immunhistochemische Nachweismethoden

3.5.1 Grundlagen der immunhistochemischen Färbemethode

Bei allen immunhistochemischen Färbemethoden macht man sich die Antigen-Antikörper-Bindung zu Nutze, um gesuchte Zielstrukturen (Antigene) nachzuweisen. Dabei lassen sich verschiedene Methoden der Antikörperbindung, als auch der Sichtbarmachung dieser stattgefundenen Bindung mittels einer Farbreaktion unterscheiden. Bei der sog. „direkten Methode“ bindet ein farblich markierter Antikörper direkt an das entsprechende Antigen, während bei der von uns verwendeten „indirekten Methode“ zum farblichen Nachweis ein zweiter Antikörper zum Einsatz kommt. Dieser sekundäre Antikörper ist gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet und ermöglicht normalerweise dank eines an ihn gebundenen Chromogens die Darstellung des Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexes und damit den Nachweis der gesuchten Zielstruktur. Die Signalintensität eines direkt an den sekundären Antikörper gebundenen Farbstoffs

ist jedoch häufig zu schwach. Stattdessen baut man zur Verstärkung des Farbsignals einen Zwischenschritt über die enzymgekoppelte Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode ein, die das Signal vervielfältigt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß isoliertes tetrameres Glykoprotein mit vier identischen Bindungsstellen für Biotin. Verwendet man nun statt dem farblich markierten einen biotinylierten sekundären Antikörper, so bindet zugegebenes Avidin kovalent an das gekoppelte Biotin und lässt noch drei weitere Bindungsstellen für Biotin frei. Daran lässt man freies, mit einem Enzym beladenes Biotin binden, das ebenfalls auf die Schnitte gegeben wird. (vgl. Abb. 3.3) Dieses Enzym, meist Meerrettichperoxidase oder Alkalische Phosphatase, ermöglicht dann die Farbreaktion des zugegebenen Farbstoffs DAB (3,3-Diaminobenzidin) zu seinem braunen Endprodukt. Das Ergebnis ist eine viel intensivere Färbung. Um Verfälschung dieser enzymatischen Reaktion vorzubeugen, blockiert man zuvor die endogene Peroxidase des Gewebes mit 3%-igen Wasserstoffperoxid. Weiterhin versucht man ungewollte Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen unspezifischen Antigenen zu verhindern, indem man die Proben mit einer Blockinglösung (Serum desjenigen Tieres aus dem der sekundäre Antikörper stammt) vorbehandelt.

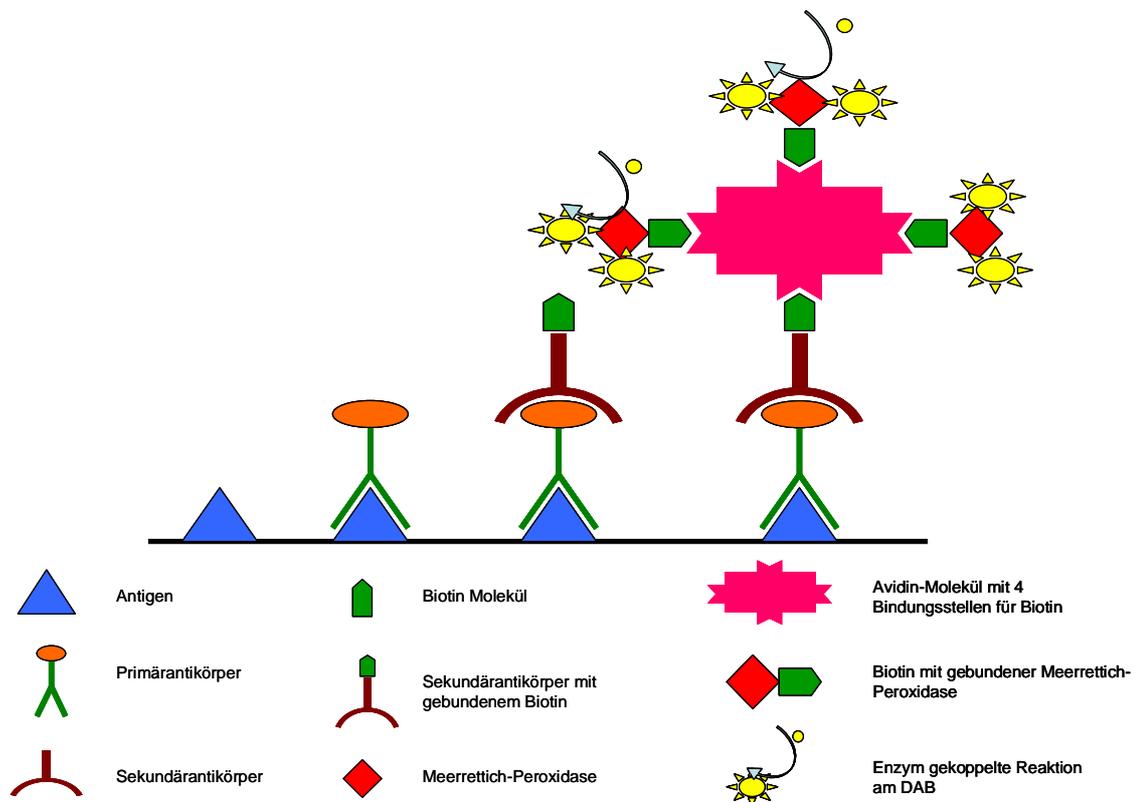


Abb. 3.3: Schema der ABC-Methode. Von links beginnend sieht man das Binden des primären Antikörpers an das Antigen. Anschließend das Binden des sekundären Antikörpers an das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Das zugefügte Avidin bindet an das Biotin des sekundären Antikörpers und geht zusätzlich drei weitere Bindungen mit den freien Biotin-Meerrettich-Peroxidase Komplexen ein. Die enzymatische Farbreaktion macht das gesuchte Antigen sichtbar. Freie, nicht gebundene Antikörper, Biotin gekoppelte Meerrettichperoxidase Komplexe oder Avidinmoleküle werden durch regelmäßige Waschschriffe abgespült (modifizierte Zeichnung nach www.vectorlabs.com)

3.5.2 Neutrophilenfärbung

Verwendete Materialien:

- Mikrotom (Hn40, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Nussloch, BRD)
- Vector® Antigen Unmasking Solutions (Citrate-based, Cat. No. H-3300 von Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010, U.S.A)
- PBS (=phosphate buffered saline)
- 3%-tige Wasserstoffperoxidlösung
- Normal Rabbit Serum, (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame CA 94010, USA)

- Primärer Antikörper (hergestellt in Ratten): Rat Anti-Mouse Neutrophiles Monoklonal Clone 7/4 (Linaris, Wertheim-Bettingen, BRD, Verdünnung 1:100)
- Sekundärer Antikörper (hergestellt in Kaninchen) Biotinylierter Rabbit Anti-Rat Antikörper BA-4001 (Vectastain ABC Kit, Verdünnung 1:500)
- Avidin (Vectastain ABC Kit)
- biotinylierte Meerrettichperoxidase (Vector PK-6100, Vectastain ABC Kit)
- Blockingpuffer (Vectastain ABC Kit)
- DAB (3,3 – Diaminobenzidin, Vectastain ABC Kit)
- Xylol
- Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen

Durchführung:

Die nach der Einbettung in Paraffin gewonnenen Gewebelöcke wurden mit dem Mikrotom in 5 oder 7µm dicke Scheiben geschnitten und jeweils 2 aufeinanderfolgende Schnitte auf handelsüblichen Objektträgern fixiert. Anschließend mussten die angefertigten Schnitte für die Färbung wieder in Xylol, gefolgt von einer in ihrer Konzentration absteigenden Ethanolreihe, entparaffiniert und gewässert werden.

Die Schnitte wurden zunächst zur Epitopdemaskierung in Unmasking Solution bei 95°C für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS gespült. Des Weiteren wurden die Gewebeproben für 30 min mit Wasserstoffperoxid und nach erneutem Spülen mit PBS für 15 min mit 5%-igen Kaninchenserum als Blockinglösung behandelt, um falsch positive Ergebnisse bei der Färbung und unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. (siehe 3.5.1) Jeweils einer der beiden Schnitte auf einem Objektträger wurde im darauffolgenden Schritt für 60min mit dem primären Antikörper inkubiert, während der andere Schnitt für die unspezifische Färbung lediglich mit Blockinglösung behandelt wurde. Erst danach wurde wieder bei allen Schnitten der sekundären Antikörper für eine Stunde zugegeben. Nach erneutem Spülen folgte die Zugabe des Avidin und der biotinylierten Meerrettichperoxidase nach Herstellervorschrift (Einwirkzeit 30min) und anschließend die Färbung mit DAB. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Färbezeit bei allen Schnitten genau gleich lang dauerte.

Die Schnitte wurden nach der Färbung mit destilliertem Wasser gespült und nach interner Vorschrift in aufsteigender Ethanolreihe wieder entwässert und permanent eingebettet. Unter dem Mikroskop war nun die Auszählung der gefärbten Neutrophilen möglich.

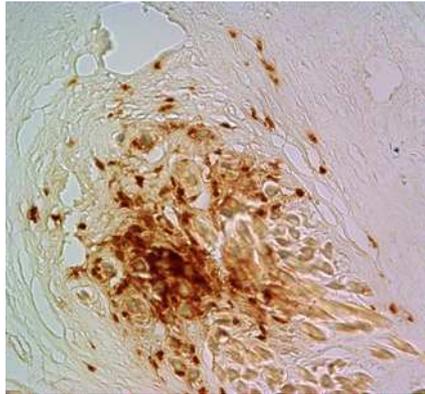


Abb. 3.4: Neutrophilenfärbung nach der ABC-Methode. Die an das Biotin gekoppelte Meerrettichperoxidase hat die Farbreaktion des DAB katalysiert, die Neutrophilen sind bräunlich angefärbt

3.5.3 Lectinfärbung

Verwendete Materialien:

- 3%-ige Wasserstoffperoxidlösung
- Avidin-Biotin Blocking Solution (Cat. No. SP-2001, Linaris, Wertheim-Bettingen, BRD)
- Carbon-Free™ Blocking Solution (Cat. No. SP-5040, Linaris)
- Biotinyliertes Lectin, verdünnt in PBS (Griffonia Simplicifolia Lectin I, Cat. No. B-1105, Linaris)
- PBS (phosphate buffered saline)
- TPBS (PBS + 0,05% Tween™20)
- Biotinylierte Meerrettichperoxidase VECTASTAIN® Elite® ABC (Cat. No. PK-6100, Vector)
- ImmPACT™ DAB (Cat. No. SK-4105)

Analog zu der in 3.5.2 beschriebenen Neutrophilenfärbung verläuft die Darstellung der Kapillaren mittels der ABC-Methode. Statt eines primären und sekundären Antikörpers wurde hier jedoch direkt biotinyliertes Lectin I aus Griffonia Simplicifolia verwendet. Lectine sind Glykoproteine, die unabhängig von einer Immunantwort an Kohlenhydratstrukturen der Zellmembran binden können. Somit übernimmt das verwendete Lectin I die Rolle des in der Neutrophilenfärbung beschriebenen primären Antikörpers, mit dem Unterschied, dass Biotin schon direkt daran gebunden ist. Das in diesem Versuch verwendete GSL-I besteht dabei aus zwei Untereinheiten, Typ A und Typ B. Während Typ A Erythrozyten der Blutgruppe A bindet (N-Acetylgalactosamin), werden Erythrozyten der Gruppe B (Galactose) vom Typ B gebunden. An das Biotin des Lectins koppelt wiederum das Avidinmolekül, an dessen Bindungsstellen die biotinylierte Meerrettich-

peroxidase die enzymatische Färbereaktion des Chromogens DAB katalysiert. (siehe Abb. 3.5)

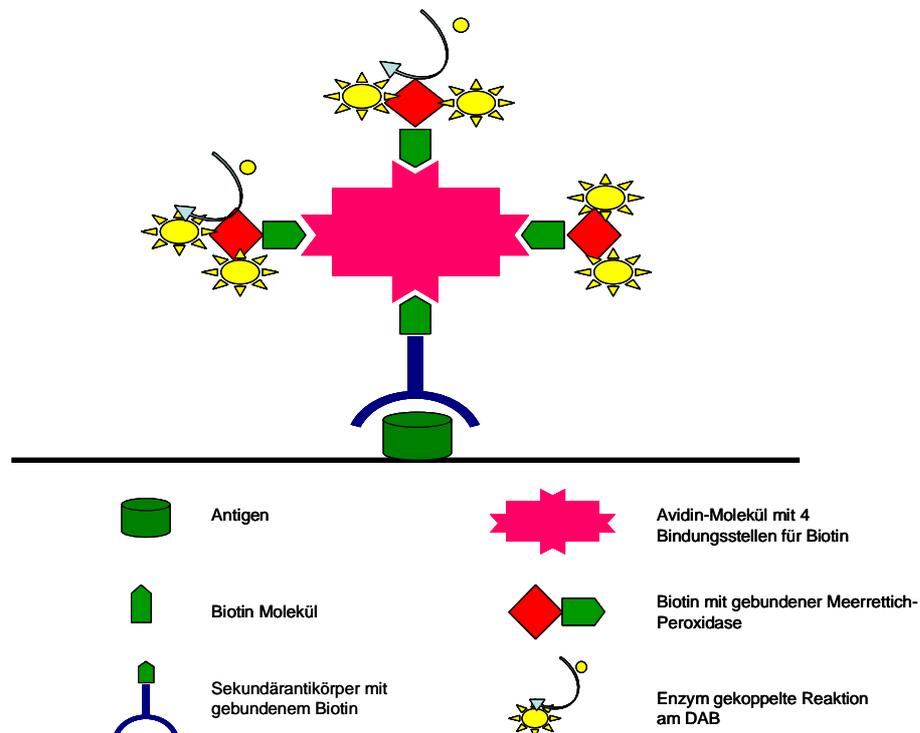


Abb. 3.5: Darstellung des Prinzips der verwendeten Lectinfärbung. Analog zur Neutrophilenfärbung wurden mittels der ABC-Methode die gesuchten Zielstrukturen durch enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht. Statt Antikörpern wurde hier jedoch das biotinylierte Lectin GSL-1 verwendet, das je nach überwiegendem Typen an das N-Acetylgalactosamin oder die Galactose der Erythrozyten bindet

Durchführung:

Die Schnitten wurden wieder nach interner Vorschrift entparaffiniert, gewässert und mit 3 %-tiger Wasserstoffperoxidlösung behandelt. Unspezifisches Binden des Lectins wurde mit nichtspezifischer Blocking Lösung und spezieller Avidin/Biotin Blocking Lösung verhindert. Anschließend erfolgte die Zugabe des in PBS gelösten, biotinylierten Lectins GSL-I für 30 Minuten. Nach einem Waschschrift mit TPBS wurden die biotinylierte Peroxidase und das Avidin auf die Schnitte gegeben und nach einer weiteren Einwirkzeit von 30 Minuten mit DAB gefärbt.

Da an diesen Schnitten neben der Bestimmung der Kapillaranzahl auch die Myozytengröße und -anzahl bestimmt werden sollte, wurden des Weiteren die Schnitte mit gängiger H.E. Färbung gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte wieder, wie

bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben, für die dauerhafte Konservierung in Paraffin eingebettet.

3.6 Auswertung der Kapillar- und Myozytenfärbung

Die Größe der Kapillardichte im hypertrophierenden Ventrikelanteil nach Infarkt stellt für die Myozyten im Zuge einer ausreichenden Sauerstoffversorgung ein entscheidender Parameter dar. Nach Aversa P nimmt im chronischen Myokardinfarkt der Ratte sowohl die Kapillardichte, als auch das Kapillarlumen ab.³⁸ Dies bedingt ein schlechteres Sauerstoffangebot und damit eine schlechte Ausgangslage für die hypertrophierenden Myozyten. Für die Beurteilung der Kapillardichte der MBL-KO Mäuse wurden die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Deutschland) digital fotografiert und mittels der Software Photoshop 6.0 ausgewertet. Zur Bestimmung der Myozytengröße wurden klar abgrenzbare Myozyten mit deutlich sichtbarem Kern bei 40-facher Vergrößerung ausgesucht und am Bildschirm umrandet. Die von der Software errechnete Pixelanzahl ließ nach vorausgegangener Eichung in die Einheit [mm²] umrechnen. Für die weitere Auswertung wurden Gesichtsfelder von 0,0218mm² Größe bei 100-facher Vergrößerung ausgewählt und darin alle deutlich begrenzten Myozyten und Kapillaren gezählt. Die erhaltenen Mittelwerte aus den ausgezählten Gesichtsfeldern wurden anschließend auf Myozytenanzahl bzw. Kapillaranzahl pro mm² umgerechnet. Zuletzt wurden Kapillaranzahl und Myozytenanzahl pro mm² ins Verhältnis gesetzt um die Kapillardichte im Ventrikel beurteilen zu können. Da technisch bedingt nicht alle Myozyten in den Schnitten klar von einander abgrenzbar waren, wurden stattdessen alle Myozytenkerne gezählt. Somit steht die Bezeichnung Kapillaranzahl pro Myozytenkern stellvertretend für Kapillaranzahl im Verhältnis zu allen tatsächlich vorhandenen Myozyten pro mm² und stellt somit den realistischeren Wert der Kapillardichte dar.

3.7 Infarktgrößenbestimmung

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte nach der bei Takagawa et al beschriebenen Methode der endokardialen und epikardialen Infarktgrößenmessung bezogen auf den Gesamtumfang des Endo- bzw Epikards.³⁹ Dazu wurden Querschnitte des linken Ventrikels wiederum entparaffiniert und mit Pikro-Sirius-Red nach interner Vorschrift

angefärbt. Hierzu wurden 3g Pikrinsäure mit 200ml heißem destilliertem Wasser übergossen und die Lösung über Nacht stehen gelassen. Danach wurden 0,1g Siriusrot auf je 100ml der gewonnenen Pikrinsäurelösung zugegeben und von dieser erhaltenen Färbelösung je 2-3 Tropfen auf die Schnitte gegeben. Unter dem Mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die Schnitte anschließend digital fotografiert und die Bilder computergestützt mit der Software Image J 1.40g (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Dabei wurde wie beschrieben die Infarkt Narbe am Bildschirm vermessen und die erhaltenen Ergebnisse prozentual umgerechnet auf die Gesamtgröße des endokardialen bzw. epikardialen Umfangs. Aus den beiden erhaltenen Werten wurde der Mittelwert in Prozent bestimmt.



Abb. 3.6: *Querschnitt des linken Ventrikels mit Infarkt Narbe. Die ausgedünnte Infarkt Narbe lässt sich eindeutig vom gesunden Myokardanteil unterscheiden. Endokardial sind die Narbe (blaue Linie) und das gesunde Myokard (grüne Linie) umrundet. Analog dazu erfolgte die Messung des epikardialen Umfangs (nicht dargestellt im Bild)*

3.8 Messung des Kollagengehalts

Zur Bestimmung des Kollagengehalts im Gewebe wurden die mit Piko-Sirius-Red gefärbten Schnitte unter dem Polarisationsmikroskop, wie bei Whittaker et al⁴⁰ beschrieben, mit zirkulär polarisiertem Licht fotografiert und der Kollagengehalt nach digitaler Bearbeitung anhand der Pixelzahl berechnet. Das polarisierte Licht trifft dabei auf das optisch anisotrope Kollagen, wodurch das Licht in zueinander senkrecht stehenden Schwingungsebenen aufgespaltet wird. Die Verwendung des Piko-Sirius-Red verstärkt dabei den doppelbrechenden Effekt um bis zu 700%.⁴¹ Von jedem Bild wurde zunächst mit 20-facher Vergrößerung ein Hellbild und ein polarisiertes Bild aufgenommen. Das

Hellbild diente später zur Berechnung der beim Schneiden unausweichlich entstehenden Gewebelücken, um die der errechnete Kollagenwert korrigiert werden musste. Das polarisierte Bild wurde mit der Software Sigma Scan Pro (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) in die vier Farben gelb, blau, rot und schwarz (Colour Separation Typ CYMK) aufgeteilt und das erhaltene Schwarz Bild vom polarisierten Bild subtrahiert. Aus dem daraus entstandenen Bild wurde die Sättigung im Histogramm (Colour Separation Typ HSV) ermittelt und aus diesen Daten der Kollagenanteil errechnet. Nach Korrektur um die bereits erwähnten Gewebelücken erhielt man den Kollagengehalt des Gewebes in Prozent.

3.9 Statistische Auswertung

Alle erhaltenen Daten wurden mit dem Statistikbearbeitungsprogramm Statview (Statview for Windows, Version 5.0.1, SAS Institute, Berkeley, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt. Dazu wurde jeweils der Mittelwert der erhaltenen Ergebnisse für die beiden Gruppen KO/MI und WT/MI berechnet und deren Standardfehler angegeben. Die Bestimmung der Signifikanz wurde mittels ANOVA durchgeführt. Ein Ergebnis galt als signifikant bei zweiseitigem $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Mortalität

Von den insgesamt 26 operierten Mäusen (16 KO/MI und 10 WT/MI) verstarben zwei MBL-KO Tiere direkt während der Operation und ein MBL-KO Tier kurz darauf, sodass für die weitere Auswertung noch 13 KO/MI Tiere und 10 WT/MI Tiere zur Verfügung standen. Von diesen verstarb am Tag 2 ein KO/MI-Tier und am Tag 3 ein WT/MI-Tier. Somit lag ein signifikanter Unterschied bezüglich der Mortalität zwischen der WT-Gruppe und der KO-Gruppe mit Beginn der Studie nach Myokardinfarkt nicht vor. Die betroffenen Tiere beider Gruppen verstarben an einen plötzlichen Herztod in Folge eines zu großen Infarktes.

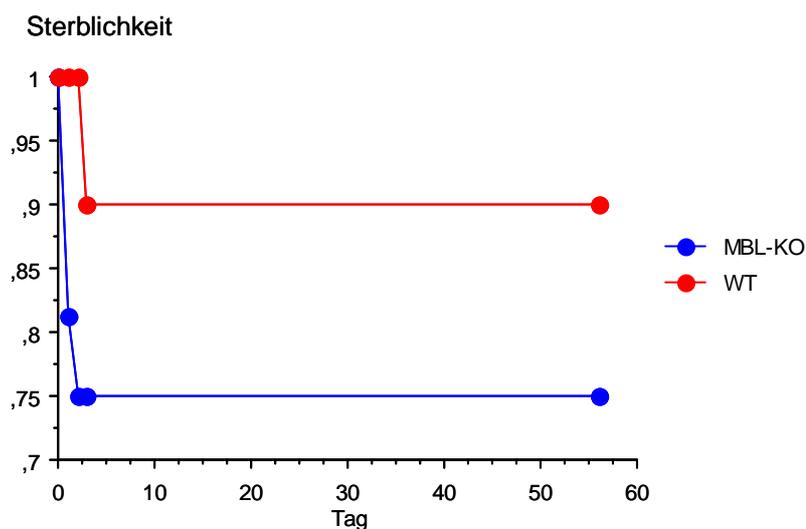


Abb. 4.1: Sterblichkeit der beiden Gruppen in Tage. Am Operationstag verstarben 3 MBL-KO Mäuse an akuten Komplikationen. Im Verlauf zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Sterblichkeit zwischen MBL-KO Mäusen und WT-Mäusen

Für die weitere statistische Auswertung der KO/MI und WT/MI Gruppen wurden nur diejenigen Tiere miteinbezogen, deren Infarktgröße bei mindestens 30% lag. Dies war bei 5 KO/MI und 7 WT/MI Tieren der Fall. Zusammen mit den in Kapitel 3 bereits erwähnten SHAM Tieren ergab sich daher folgende Gruppenverteilung der Tiere: 2 Tiere KO/SHAM, 2 Tiere WT/SHAM, 5 Tiere KO/MI und 7 Tiere WT/MI

4.2 Lungengewichte

Als Zeichen der kardialen Dekompensation und der damit verbundenen chronischen Lungenstauung wurden die Lungengewichte der beiden Gruppen miteinander verglichen. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den MBL-KO Mäusen und den WT-Mäusen. (WT vs. KO, 204,2mg \pm 19,9 vs. 225,1mg \pm 43,4, p=n.s.)

4.3 Infarktgrößen

Acht Wochen nach Myokardinfarkt wurde von jedem Tier der Infarktanteil in Prozent bezogen auf den Querschnitt des linken Ventrikels bestimmt und anschließend daraus der Mittelwert für die KO/MI und WT/MI Gruppe errechnet. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. (WT vs. KO, 53,1% \pm 3,2% vs. 62,2% \pm 5,7%, p=n.s.) (siehe Abb. 4.1) Die Ausprägung der Infarktgröße war nach diesen Ergebnissen bei chronischen RIVA Verschluss von MBL unabhängig.

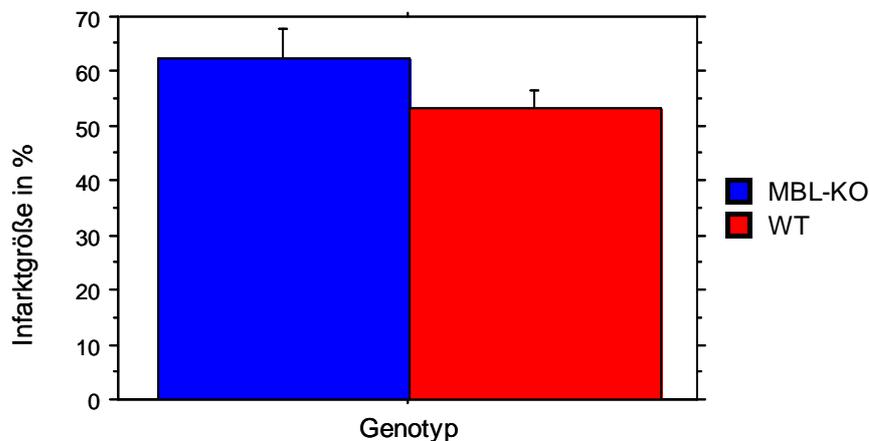


Abb. 4.2: Prozentualer Anteil der Infarktgröße des linken Ventrikels. MBL-KO Mäuse (62,2% \pm 5,7%) weisen gegenüber WT-Mäusen (53,1% \pm 3,2%) keinen signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$)

4.4 Echokardiographie

Zur Beurteilung der Veränderungen der linksventrikulären endokardialen Ventrikelfläche und des Ventrikeldurchmessers wurden die Mäuse am Tag 1, 21 und 56 nach Infarkt echokardiographisch untersucht. Die Messungen erfolgten dabei sowohl in Höhe

der Papillarmuskeln (PA) als auch an der Herzspitze (AP). Beide Gruppen wiesen mit zunehmender Ventrikeldilatation vergrößerte linksventrikuläre Innenflächen und Durchmesser auf. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die MBL-KO Tiere an der Herzspitze sowohl in der Systole als auch in der Diastole bereits am Tag 21 einen signifikant größeren linksventrikulären Durchmesser aufwiesen als die WT-MI Kontrollgruppe. Dieser Unterschied vergrößerte sich bis zur dritten Messung am Tag 56 nur noch leicht, blieb aber weiterhin signifikant. (siehe Abb. 4.2 und 4.3) Die anderen Messungen zeigten zwar ebenfalls einen deutlichen Trend hin zu größeren ventrikulären Durchmessern und Innenflächen bei der MBL-KO Gruppe, erreichten aber keine Signifikanz. Dementsprechend fielen die errechneten Verkürzungsfractionen (FS) mit Ausnahme der FS-Area-PA bei den KO-Tieren kleiner aus, wiederum jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. (siehe Tabelle 4.1)

Angesichts des signifikanten Unterschieds in den ESD-AP und EDD-AP Messungen und dem einheitlichen Trend in den übrigen Werten lässt sich eindeutig feststellen, dass die MBL-KO Tiere nach Infarkt eine größere ventrikuläre Dilatation und damit ein aggraviertes ventrikuläres Remodeling aufwiesen als die Infarkt-Kontrollgruppe. Der schädigende Effekt des Fehlens von MBL zeigt sich bereits nach 21 Tagen und lässt darauf schließen, dass die beobachteten positiven Effekte bei C3-KO Mäusen sich nicht mit MBL-KO Mäusen in Einklang bringen lassen.

	Tag 1		Tag 56	
	WT-MI	KO-MI	WT-MI	KO-MI
ESA-PA [mm ²]	9,10 ± 0,60	8,50 ± 1,11	20,88 ± 1,67	23,91 ± 2,88
EDA-PA [mm ²]	10,91 ± 0,59	10,72 ± 0,90	24,33 ± 1,89	28,38 ± 2,99
ESA-AP [mm ²]	10,15 ± 0,85	9,52 ± 0,65	20,96 ± 2,31	28,83 ± 3,55
EDA-AP [mm ²]	11,90 ± 0,74	11,57 ± 0,55	24,48 ± 2,40	32,81 ± 3,62
ESD-PA [cm]	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,59 ± 0,03
EDD-PA [cm]	0,43 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,64 ± 0,02
ESD-AP [cm]	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,63 ± 0,04*
EDD-AP [cm]	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,66 ± 0,04*
FS-Area-PA [%]	16,10 ± 4,21	22,43 ± 5,10	14,10 ± 3,10	16,60 ± 1,91
FS-Area-AP [%]	15,10 ± 3,33	18,10 ± 2,31	15,20 ± 3,03	13,10 ± 1,62
FS-D-PA [%]	11,89 ± 2,43	13,35 ± 1,29	11,65 ± 1,44	8,51 ± 1,62
FS-D-AP [%]	7,77 ± 1,08	10,61 ± 1,85	7,56 ± 1,53	4,49 ± 0,70

Tab. 4.1: Auflistung der errechneten Mittelwerte aller echokardiographischen Messungen am Tag 1 und Tag 56 und deren Standardfehler. PA = papillär, AP = apikal, ESA = Endsystolische Fläche, EDA = Enddiastolische Fläche, ESD = Endsystolischer Durchmesser, EDD = Enddiastolischer Durchmesser, FS-Area = fractional Shortening der Fläche, FS-D = fractional Shortening Durchmesser, * $p < 0,05$

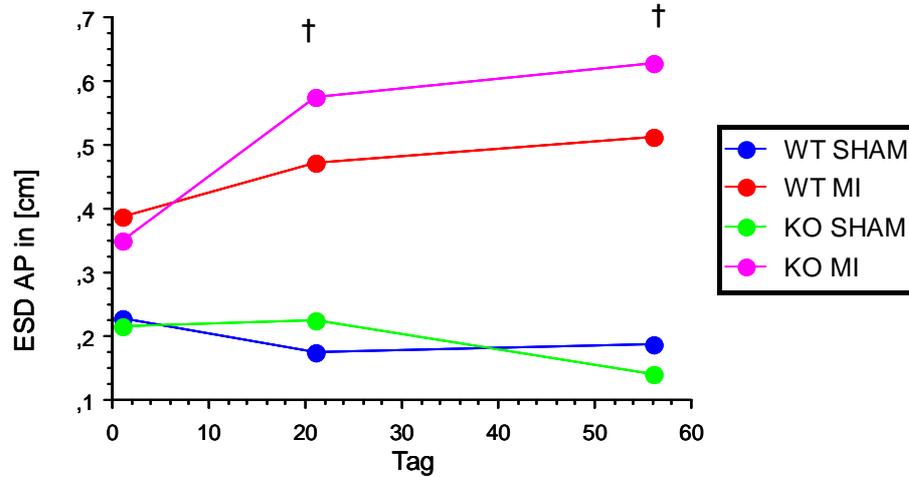


Abb. 4.3: Endsystolischer ventrikulärer Durchmesser (ESD), apikal gemessen. Zwischen MBL-KO Tieren und WT-Tieren zeigt sich bereits 21 Tage nach Infarkt ein signifikanter Unterschied bezüglich des endsystolischen ventrikulären Durchmessers. MBL-KO Tiere haben mit $0,58\text{cm} \pm 0,03$ einen größeren Durchmesser als die WT-Tiere mit $0,47\text{cm} \pm 0,03$. Am Tag 56 zeigen beide Gruppen eine Zunahme des Durchmessers, der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen bleibt bestehen (MBL-KO vs. WT, $0,63\text{cm} \pm 0,04$ vs. $0,51\text{cm} \pm 0,03$) ($\dagger = p < 0,05$, $p=s$)

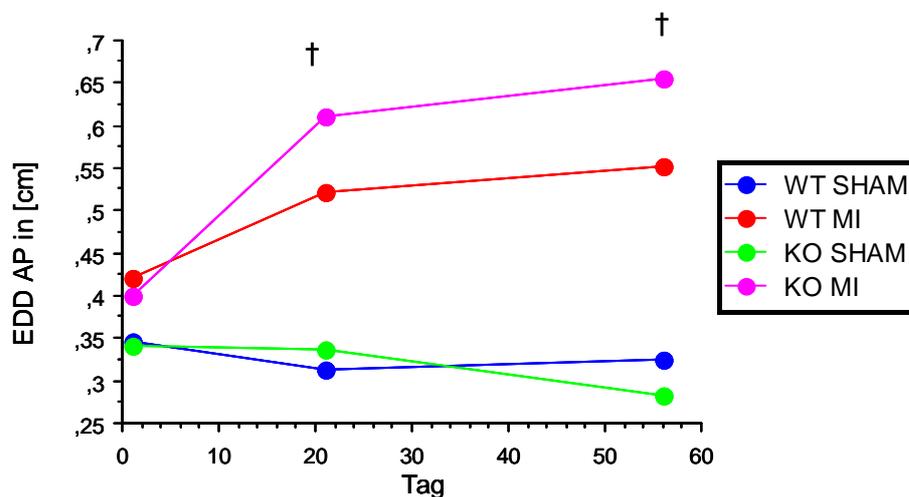


Abb. 4.4: Enddiastolischer ventrikulärer Durchmesser, apikal gemessen. Zwischen MBL-KO Tieren und WT-Tieren zeigt sich auch enddiastolisch am Tag 21 ein signifikanter Unterschied bezüglich des ventrikulären Durchmessers an der Herzspitze. (MBL-KO vs. WT, $0,61\text{cm} \pm 0,04$ vs. $0,52\text{cm} \pm 0,02$) Dieser Unterschied lässt sich auch am Tag 56 nach Infarkt nachweisen (MBL-KO vs. WT, $0,66\text{cm} \pm 0,04$ vs. $0,55\text{cm} \pm 0,03$) ($\dagger = p < 0,05$, $p=s$)

4.5 Neutrophile

Acht Wochen nach Myokardinfarkt zeigte sich bezüglich der Neutrophilenanzahl kein signifikanter Unterschied zwischen MBL-KO Mäusen ($1,5 \pm 0,6$) und WT-Mäusen ($2,6 \pm 0,7$). Da eine einzelne Auszählung der Neutrophilen mit Gesichtsfeldern nicht möglich war, wurden den einzelnen Schnitten Zahlenwerte zwischen 0 (keine Neutrophile) bis 7 (maximale Neutrophilendichte) zugeordnet und daraus der Mittelwert für beide Genotypen bestimmt. (siehe Abb. 4.4 und 4.5) Demnach hatte das Fehlen von MBL keine Auswirkung auf die Neutrophilenkonzentration im Gewebe, auch wenn die WT-Gruppe einen etwas höheren Wert aufwies.

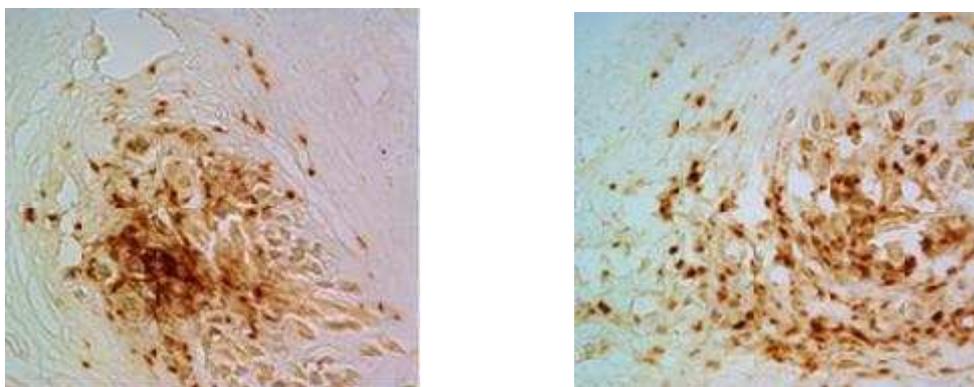


Abb. 4.5: Gefärbte Neutrophile im Vergleich. Links ist die Neutrophilenfärbung eines WT Tiers, rechts die Neutrophilenfärbung eines MBL-KO Tiers dargestellt. Eine genaue Auszählung der Neutrophilen war aufgrund der Dichte nicht möglich

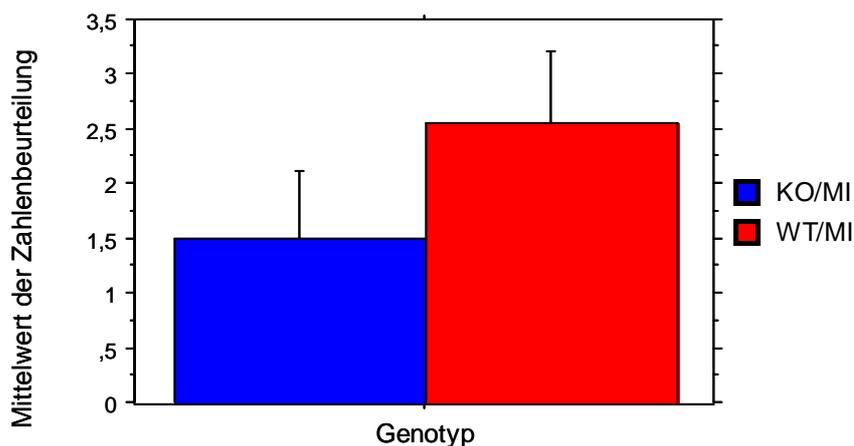


Abb. 4.6: Zahlenbeurteilung der Neutrophilendichte. Mittels Zahlen zwischen 0 (keine Neutrophile) bis 7 (maximale Neutrophilendichte) wurde die Neutrophilenkonzentration graphisch dargestellt. MBL-KO Tiere ($1,5 \pm 0,6$) und WT Tiere ($2,6 \pm 0,7$) unterscheiden sich nicht signifikant, $p > 0,05$

4.6 Kollagenauswertung

Bei der Auswertung des Kollagengehalts im Ventrikelseptum zeigte sich zwar ein leichtes Überwiegen der gemessenen Kollagenkonzentration bei den MBL-KO Mäusen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. (MBL-KO vs. WT, $1,19\% \pm 0,49\%$ vs. $0,68\% \pm 0,24\%$, $p > 0,05$) Somit hat das Fehlen von MBL in dieser Studie keinen Einfluss auf die Kollagensynthese im Ventrikel. (vgl. Abb. 4.6 und 4.7)

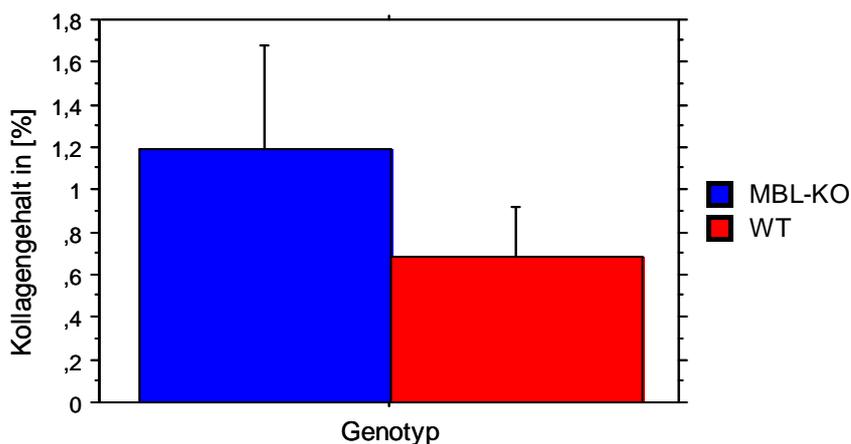


Abb. 4.7: Prozentualer Anteil des Kollagengehalts im Septum. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen MBL-KO Mäusen ($1,19\% \pm 0,49\%$) und Wildtyp Mäusen ($0,68\% \pm 0,24\%$)



Abb. 4.8: Kollagennachweis im Gewebe eines WT Tiers. Links ist das Hellbild nach Picro-Sirius-Red Färbung dargestellt, rechts das entsprechende polarisierte Bild. Die Kollagenfasern lassen sich auf dem schwarzen Hintergrund gut erkennen

4.7 Neovaskularisierung und kardiale Hypertrophie

Nach Auszählen der Gefäße und Myozyten pro mm^2 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den MBL-KO Mäusen und den Wildtypmäusen. Auch die Myozytengröße hatte sich zwischen den beiden Gruppen nicht verändert. Setzte man die

Gefäßanzahl und die Anzahl der klar voneinander abgrenzbaren Myozyten im Schnitt ins Verhältnis ergab sich keine signifikante Veränderung. Anzahl der Gefäße pro Myozytenkern jedoch ergab einen signifikanten Unterschied mit $p=0,02$ zwischen den MBL-KO Tieren ($4,62 \pm 0,31$) und den Wildtyptieren ($3,48 \pm 0,18$). (siehe Abb. 4.8). Somit wiesen die MBL-KO Tiere ein besseres Verhältnis Gefäße pro Myozyt(kern) und damit eine größere Kapillardichte auf als die Kontrollgruppe der WT-Tiere. Weitere Einzelheiten zu der Auswertung siehe Tabelle 4.2

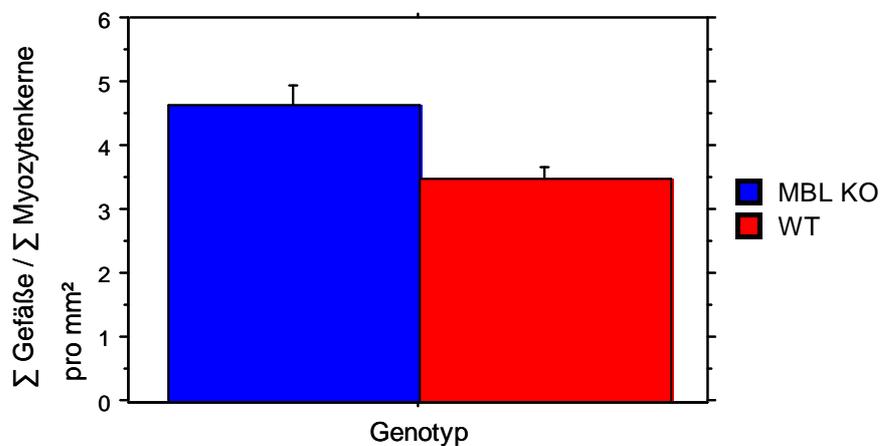


Abb. 4.9: Anzahl der Gefäße in Relation zu der Gesamtzahl der Myozyten. Da nicht jeder Myozyt sicher abgrenzbar war, wurden stattdessen die Myozytenkerne gezählt. Sie stehen stellvertretend für alle Myozyten. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den MBL-KO Mäusen ($4,62 \pm 0,31$) und den WT Mäusen ($3,48 \pm 0,18$)

	WT-MI	KO-MI
Gefäße / mm ²	3177,25 ± 93,95	2958,00 ± 163,90
Gefäße / Myozyten pro mm ²	1,30 ± 0,08	1,16 ± 0,04
Gefäße / Myozytenkern pro mm ²	3,48 ± 0,18	4,62 ± 0,31 (p<0,05)
Myozyten / mm ²	2614,00 ± 238,45	2579,80 ± 188,86
Myozytengröße in mm ²	3,06 x10 ⁻⁴ ± 1,85 x10 ⁻⁵	2,89 x10 ⁻⁴ ± 2,38 x10 ⁻⁵

Tab. 4.2: Übersicht über die Ergebnisse der Gefäßanzahlbestimmung nach Lectinfärbung und die Bestimmung der Myozytenzahl nach Gegenfärbung mit H.E. Die gezählten Gefäße bzw. Myozyten pro mm² ergeben keinen signifikanten Unterschied zwischen MBL-KO und WT Tiere. Erst nachdem die Gefäßanzahl mit der Anzahl der Myozytenkernen ins Verhältnis gesetzt wurden zeigte sich, dass MBL-KO Tiere pro Myozyt mehr Gefäße aufwiesen als die Kontrollgruppe der WT Tiere (p < 0,05)

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die dauerhafte Aktivierung des Komplementfaktors C3 während dem ventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt auf den durch Mannose-binding Lectin eingeleiteten Lectin-Weg des Komplementsystems zurückzuführen ist. Eine vorausgegangene Studie hatte gezeigt, dass C3 nicht nur unmittelbar nach Infarkt, sondern auch noch 8 Wochen danach im insuffizienten Mäuseherz nachweisbar war. Bei Verwendung von Mäusen, die eine Faktor C3 Defizienz hatten, ließ sich drei Wochen nach Infarkt im Vergleich zu WT-Mäusen eine signifikant geringere ventrikuläre Dilatation und damit ein besseres kardiales Remodeling nachweisen. (Frantz et al., personal communication) Unbeantwortet blieb jedoch, auf welchem der drei bekannten Pfade der Komplementaktivierung diese C3-Erhöhung im Modell des chronischen Infarkts beruht. Zu diesem Zweck wurden in dieser vorliegenden Studie MBL-KO Mäuse und WT-Mäuse acht Wochen nach Infarkt bezüglich Lungengewichts, Infarkt- und Ventrikelgröße sowie Neovaskularisierung, Kollagengehalt und kardialer Hypertrophie untersucht. Darüber hinaus wurden als Zeichen der Entzündungsreaktion die Neutrophilenkonzentration bestimmt. Im Gegensatz zu den beobachteten Ergebnissen bei den C3-KO Mäusen zeigte sich jedoch bei den MBL-KO Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine signifikant größere systolische und diastolische Ventrikeldilatation. Die anderen durchgeführten Untersuchungen wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Einzig in der Frage der Neovaskularisierung wiesen die MBL-KO Tiere einen signifikanten Zuwachs an Gefäßen in Relation zu den vorhandenen Myozyten auf. Auch wenn diese Zunahme zwar prinzipiell als vorteilhaft im Rahmen des Remodeling angesehen werden durfte, so zeigte doch die größere ventrikuläre Dilatation, dass sich die vorteilhaften Auswirkungen eines Fehlens von C3 bezüglich des Remodelings sich nicht mit MBL-KO Tieren in Einklang bringen ließen. Vielmehr schienen die Tiere durch das Fehlen von MBL einen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zusätzlichen Schaden davongetragen zu haben.

Diese Beobachtung wirft verschiedene Fragen auf. Zum einem bleibt es weiterhin unklar, durch welchen Weg Komplement nach Infarkt aktiviert wird. Zum anderen scheint MBL über das Komplementsystem hinaus wichtige Funktionen im Rahmen der kardial-

len Umbauprozesse zu spielen, deren Fehlen die größere ventrikuläre Dilatation der MBL-KO Gruppe erklären könnte.

Das Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Hemmung des MBL zu einer Verschlechterung des Remodelings führte, ist im Vergleich zur derzeitigen Forschung auf dem Gebiet der angeborenen Immunantwort im insuffizienten Herzen kein Einzelfall und wirft einmal mehr die Frage nach der genauen Funktion der chronischen Entzündungsreaktion während des Remodelings auf. Gerade im Bereich der Zytokine zeigt sich immer wieder, dass diese chronisch aktiviert zwar durchaus schädlich sind, jedoch auch als Teil notwendiger Kompensationsmechanismen eine wichtige Rolle spielen.⁴² Als Beispiel sei hier die Rolle des TNF- α genannt. So schützen physiologische Konzentrationen von TNF- α die Zelle vor Hypoxie und Ischämie,⁴³ während dauerhaft aktiviert TNF- α negativ inotrop wirkt und über TNF-Rezeptor 1 in kardiale Myozyten die Apoptose auslöst.⁴⁴ Dies mag erklären, warum große Anti-TNF- α Studien wie RENAISSANCE (*Randomized Etanercept North American Strategy to Study Antagonism of Cytokine*) oder RENEWAL (*Randomized Etanercept Worldwide Evaluation*) scheiterten, einen Nutzen dieser Behandlung für Patienten zwischen NYHA Stadium II-IV nachzuweisen.⁴⁵ Darüber hinaus scheinen die Entzündung und andere Kompensationsmechanismen enger miteinander verbunden zu sein, als ursprünglich gedacht. So konnte Gullestad et al zeigen, dass nach hochdosierter Enalapril Therapie Interleukin-6 gesenkt werden konnte, wodurch die Frage aufkam, inwieweit die Anti-Remodeling Effekte der ACE Hemmer sich über eine Hemmung von Il-6 äußern, das seinerseits als Stimulus für kardiale Hypertrophie gilt.⁴⁶

Trotz der intensiven Forschung auf dem Gebiet der Zytokine, sind Therapieansätze basierend auf einer Hemmung der Komplementaktivierung während des Remodelings selten. Viele Arbeitsgruppen beziehen sich auf die Komplementhemmung im akuten Infarkt und weisen hier auch Erfolge bezüglich Reduktion der Infarktgröße und Verringerung der Entzündungsreaktion auf.⁷ Das Komplementsystem ist aber auch nach der akuten Entzündungsphase im Infarkt aktiv und bleibt noch im bereits insuffizienten Herz nachweisbar. Yosojima et al konnten beispielsweise keinen signifikanten Unterschied der im Vergleich zum gesunden Myokard erhöhten Komplement RNA Konzentration zwischen jungen und alten Myokardinfarkten feststellen.⁴⁷ Weiterhin konnten Oliveira et al in Serumproben von herzinsuffizienten Patienten erhöhte Werte des

Membranangriffskomplexes (MAK) nachweisen und damit die Aktivität der Komplementkaskade beweisen.⁴⁸ Dieser MAK trägt nachgewiesenermaßen zum Remodeling bei, indem er über Stimulation von Neutrophilen zu einer erhöhten Sekretion von Leukotrienen und TNF- α führt und nach Myokardinfarkt die Infarktgröße und das Outcome negativ beeinflusst.⁴⁸⁻⁴⁹ Ein weiterer schädigender Einfluss zeigt sich bei Betrachtung der in Kapitel 2 erwähnten Anaphylatoxine (C3a und C5a). So bewirkte von Del Balzo et al in Herzen injiziertes C5a nach initial positiv inotroper Wirkung langfristig eine Abnahme der Kontraktilität, eine koronare Vasokonstriktion und damit eine Dysfunktion des linken Ventrikels.⁵⁰

Angesichts dieser offensichtlich negativen Eigenschaften des Komplementsystems auf das Remodeling ist es umso erstaunlicher, dass eine Hemmung des Lectin Weges, wie in dieser Arbeit geschehen, sogar zu einer Verschlechterung des Remodelings geführt hat. Die bekanntesten Aufgaben des MBL sind die Erkennung bakterieller Erreger, deren Opsonierung und die Aktivierung des Komplementsystems. Daher erscheint es kaum verwunderlich, dass Patienten mit inaktivierenden Mutationen für MBL häufiger und schwerer an SIRS erkranken als gesunde MBL-Gen Träger.⁵¹ Darüber hinaus erkranken Menschen mit MBL-Gen Mutationen und damit geringerer MBL Konzentration im Serum häufiger an Rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses, woraus auf eine weitere wichtige Rolle des MBL bei Autoimmunerkrankungen geschlossen werden kann.⁵²⁻⁵³ (vgl. Kapitel 2.5) Die pathogene Bedeutung von MBL am Herzen hingegen ist unklar und die Literatur diesbezüglich widersprüchlich. Beispielsweise sollen niedrige MBL-Spiegel einerseits bei rheumatischer Herzerkrankung einen Schutz gegenüber der Entwicklung einer Mitralstenose darstellen,⁵⁴ während diese andererseits nach Bypass-OP eine erhöhte Verschlusswahrscheinlichkeit des Bypass mit sich bringen.⁵⁵ Ebenso gehen hohe MBL-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für KHK bei gesunden Männern einher,⁵⁶ jedoch schützen genau diese hohen Spiegel vor Myokardinfarkt bei Patienten mit Diabetes oder Hypercholesterinämie.⁵⁷ Im Gegensatz zu diesen teils widersprüchlichen Ergebnissen, zeichnet sich bei Ischämie/Reperfusionen bezüglich MBL ein eindeutigeres Bild ab. Jordan et al konnten zeigen, dass eine Inhibition des MBL bei Mäusen nach Ischämie/Reperfusion zu weniger C3 Exposition, kleinerer Infarktgröße, geringeren Neutrophilenkonzentration und abgeschwächter proinflammatorischer Genexpression führte.⁵⁸ Diese Ergebnisse

wurden auch von Walsh et al unterstützt, in deren Studie MBL-KO Mäuse deutlich vor dem Reperfusionsschaden geschützt waren und eine externe Zugabe von MBL wiederum zu einer Zunahme der Infarktgröße führte.⁵⁹ In diesen Untersuchungen erwies sich das Fehlen von MBL folglich durchaus als vorteilhaft, die Infarktgröße war kleiner und die gemessene C3 Konzentration geringer. Zwar stellen Ischämie/Reperfusion und chronischer Myokardinfarkt zwei pathophysiologisch unterschiedliche Modelle dar, jedoch sind in beiden Fällen die gleichen Entzündungsmediatoren (Neutrophile, Makrophagen, Komplementsystem usw.) beteiligt. Folglich wirft sich die Frage auf, worin die in dieser Arbeit beobachtete fehlende Beeinflussung der Infarktgröße und der Neutrophilenkonzentration im chronischen Myokardinfarktmodell im Gegensatz zum Ischämie/Reperfusionsversuch von Jordan et al bei MBL-KO Mäusen begründet ist.

Eine mögliche Erklärung dafür mag darin liegen, dass MBL anscheinend vorwiegend bei oxidativem Stress unter Bildung freier Sauerstoffradikale aktiviert wird, wie er besonders bei Ischämie/Reperfusion vorkommt. Collard et al konnten in diesem Zusammenhang an reperfundierten Rattenherzen nach 30 Minuten Ischämiezeit deutlich erhöhte Werte an C3 und MBL nachweisen, jedoch nicht an Herzen mit 60 Minuten Ischämie ohne Reperfusion.⁶⁰ Bei Verwendung von MBL-Mangel-Serum fiel der C3b Anteil nach Reperfusion deutlich geringer aus und stieg erst nach Zugabe von isoliertem MBL wieder an, wodurch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, MBL und C3 Erhöhung bewiesen war. Ischämische Endothelzellen bildeten dabei vermehrt Cytokeratin 1, an das MBL koppelte und damit den Lectin-Weg aktivierte.⁶¹ Gab man einen Antikörper gegen Cytokeratin 1, dann kam es zu deutlich weniger MBL-Bindung und weniger C3 Expression.⁶² Nun lässt sich der bei Collard et al festgestellte Unterschied zwischen reperfundiertem und nicht reperfundiertem Gewebe natürlich in der wiederhergestellten Blut- und Sauerstoffversorgung und dem damit verbundenen massiven Anschwellen von Entzündungsmediatoren in das Infarktgebiet erklären. Gerade der im Ischämiegebiet plötzliche Sauerstoffanstieg führt zur Bildung großer Mengen an ROS (=Reactive Oxygen Species) durch die Xanthin-Oxidase oder die Phospholipase. Allerdings ist oxidativer Stress kein auf die Ischämie/Reperfusion beschränktes Phänomen. Vielmehr weisen Studien eindeutig dessen Vorhandensein und dessen negativen Einfluss auf das Remodeling durch Auslösen von Apoptose und Nekrose im bereits insuffizienten Herz nach.⁶³ Hierbei kommt es zu einem Ungleich-

gewicht zwischen ansteigenden oxidativem Stress einerseits und abnehmenden antioxidativen Gegenmaßnahmen andererseits.⁶⁴ Umso erstaunlicher ist es daher, dass Trendelenburg et al bei Patienten nach Myokardinfarkt und stattgefunderer PTCA nach 90 Tagen Beobachtungszeit keinen Unterschied bezüglich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz zwischen Patienten mit MBL-Mangel und Patienten mit normaler MBL-Konzentration finden konnten.⁶⁵ Diese Aspekte berechtigen zu der Annahme, dass MBL im Rahmen von Ischämie/Reperfusionen-Studien durch oxidativen Stress und wiederhergestellten Koronarfluss als Akute-Phase-Protein wirkt, während es langfristig von eher geringerer Bedeutung ist. Diese Theorie der Rolle des MBL in der akuten Entzündungsreaktion findet Bestätigung in den Beobachtungen von Ueland et al.⁶⁶ Diese bestimmten nach Myokardinfarkt ohne Reperfusion und sich daraus entwickelnder Herzinsuffizienz ab dem Akutereignis über 2 Jahre den MBL-Spiegel. Dabei zeigte sich, dass die MBL-Konzentration nach der Akutphase abnahm und sich auf einem unter dem der gesunden Kontrollgruppe liegenden Niveau einpendelte. Zusammenfassend lässt sich folglich sagen, dass MBL in der Akutphase von Ischämie/Reperfusionenstudien eine entscheidende Rolle spielt, während sich im chronischen Infarkt kein Anstieg dessen Konzentration finden lässt⁶⁶ und ohne Reperfusion auch keine durch MBL ausgelöste C3 Erhöhung nachweisbar ist.⁶⁰ Vielmehr liegt die MBL Konzentration anfangs beim chronischen Infarkt in Normbereich und nimmt sogar während des Remodelings ab.⁶⁶ Dies wäre damit eine mögliche Erklärung, warum sich keine Unterschiede zwischen den MBL-KO Mäusen und den WT-Mäusen in der Infarktgröße und der Neutrophilenkonzentration zeigten.

Trotzdem bleibt die Frage bestehen, warum es den MBL-KO-Mäusen bezüglich der Ventrikeldilatation signifikant schlechter ging. Das Fehlen von MBL scheint sich während des Remodelings als entscheidender Nachteil herauszustellen und das, obwohl die MBL-KO Gruppe ein signifikant besseres Kapillaren pro Myozyten Verhältnis aufwies als die Kontrollgruppe. Folglich erweckt, wie das bereits erwähnte TNF- α , auch MBL den Anschein eine während des Remodelings nicht klar abgrenzbar vorteilige oder nachteilige Rolle einzunehmen. Neben der bekannten Komplementaktivierung vermittelt MBL des weiteren über Opsonierung die komplementunabhängige Phagozytose durch Makrophagen, erkennt apoptotische Zellen und nimmt durch Entzündungsmodulation auch direkten Einfluss auf andere Entzündungsmediatoren.⁶⁷ Jack et al konnten

beispielsweise an einer Infektion mit *Neisseria meningitidis* nachweisen, dass die Höhe der MBL Konzentration die Expression von Zytokinen beeinflusste. Niedrige MBL Spiegel erhöhten die Freisetzung von Il-1, Il-6 und TNF- α , während hohe Spiegel zu einer Reduzierung dieser Spiegel führten.⁶⁸ Inwieweit MBL jedoch Einfluss auf die während des Remodelings nachgewiesenermaßen erhöhten Zytokine nimmt, ist unbekannt. Bewiesen dagegen ist, dass generell die Apoptose der Myozyten während des Remodelings erhöht ist und dass dessen Hemmung zu einer Verbesserung der kardialen Umbauprozesse führt.⁶⁹ Apoptotische Zellen exprimieren verstärkt Mannose, N-Acetylglucosamin und Fucose, also potentielle Bindungsstellen für MBL. Auf diesem Weg greift MBL auch in den Abbau eigener apoptotischer Körperzellen ein und vermittelt deren Phagozytose, ein entscheidender Vorgang bei allen körperlichen Umbauvorgängen und damit auch beim kardialen Remodeling.⁶¹ Ogden et al konnten weiterhin eine direkte Interaktion zwischen apoptotischen Zellen, MBL und Makrophagen nachweisen.⁷⁰ Demnach exprimieren apoptotische Zellen Calreticulin, an das MBL bindet. MBL wiederum leitet dann das Phagozytose-Signal an die Makrophagen über CD91 weiter, einem transmembranären α 2-Makroglobulin auf der Makrophagenoberfläche. Wie wichtig der rechtzeitige Abbau der apoptotischen Zellen ist, zeigt sich daran, dass diese sekundär nekrotisch werden können und damit Entzündungsreaktion und Komplementaktivierung auslösen können.⁷¹ Folglich wäre es denkbar, dass es durch das fehlende MBL in der Versuchsgruppe zu einem verspäteten Abbau der apoptotischen Myozyten gekommen ist und diese sekundär nekrotisch dann zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion geführt haben. Zwar konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede bezüglich der Neutrophilenkonzentration zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden, jedoch belief sich diese Bestimmung 8 Wochen nach Infarkt auf die chronische Phase der Entzündung. Yang et al konnte jedoch in einem vergleichbaren Mausmodell des chronischen Infarkts an gesunden Tieren zeigen, dass die Ventrikeldilatation am größten innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infarkt war.⁷² In diese Zeit fällt bei der Maus das akute Entzündungsstadium mit einem Maximum der Makrophagenkonzentration am vierten Tag und nach ca. sieben Tagen der Beginn der chronischen Entzündungsphase. Ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien läge somit darin, nach einer erhöhten Neutrophilenkonzentration bei MBL-KO Mäusen innerhalb dieses Zeitraums als Hinweis auf eine sekundär verstärkte Entzündungsreaktion zu suchen.

Angesichts der Tatsache, dass bei den MBL-KO Mäusen die linksventrikuläre Dilatation signifikant aggraviert war, stellte sich natürlich die Frage, ob die beobachtete dauerhafte Aktivierung des Faktors C3 nicht auf einem der beiden anderen Wege des Komplementsystems beruht. In diesem Zusammenhang untersuchten Frantz et al, in einer dieser Arbeit ähnlichen Studie, die Ausschaltung des klassischen Aktivierungsweges nach Myokardinfarkt. Dazu wurden Rag1-KO-Mäuse verwendet, die weder B- noch T-Lymphozyten bilden konnten und damit auch über keine Antikörperproduktion verfügten. Aber auch hier zeigte sich, dass die protektive Wirkung eines fehlenden Faktor C3 nicht über den klassischen Weg vermittelt sind, zeigten doch die Rag1-KO-Tiere wiederum signifikant vergrößerte linksventrikuläre Dilatation. Somit kommen wir zu dem Schluss, dass die C3 Erhöhung im insuffizienten Herz auf dem alternativen Weg der Komplementaktivierung beruhen muss. Aukrust et al konnte eindeutig anhand der alternativen C3-Konvertase C3bBbP nachweisen, dass das alternative System in der chronischen Herzinsuffizienz aktiv ist.¹⁶ Darüber hinaus scheint das alternative System auch dasjenige der drei Pfade zu sein, das nach Ligation ohne Reperfusion als erstes im Infarktgebiet vorkommt. Dafür sprechen die Ergebnisse von Vakeva et al, die am chronischen Infarkt der Ratte nach zwei Stunden nur aktiviertes C3, jedoch C1 und C2 erst nach drei Stunden nachweisen konnten.⁷³ Da C2 sowohl für den Lectin Weg als auch für den klassischen Weg benötigt wird, schlossen sie daraus, dass das alternative System als erstes im chronischen Infarkt aktiv sein muss. Der alternative Weg spielt dabei in der Hinsicht eine interessante Rolle, als dass er durch die spontane Autoaktivierung des C3 immer eingeschaltet ist und über Verstärkung oder Hemmung der positiven Feedback-Schleife zwischen C3b und alternativer C3-Konvertase hoch und runter reguliert werden kann.⁷⁴ Weiterhin dürfen die drei Wege des Komplementsystems nicht als völlig getrennt voneinander betrachtet werden. Vielmehr scheint der alternative Weg die Wirkung der beiden anderen Wege zu verstärken, indem aus klassischem und Lectin-Pfad gebildetes C3b auch an der Bildung der alternativen C3 bzw. C5 Konvertase beteiligt ist. Dieser Effekt scheint größer zu sein als ursprünglich gedacht. Harboe et al konnte durch Inhibierung des alternativen Weges eine Reduktion um bis zu 80% des im klassischen Weg gebildeten C5a und MAK nachweisen.⁷⁵

Die Beteiligung des alternativen Systems lässt sich im vorliegenden Versuchsaufbau dieser Arbeit weder beweisen noch ausschließen, da hier nur die Rolle des MBL unter-

sucht werden sollte. Wir gehen angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit und der genannten Erkenntnisse der Studie an Rag1-KO-Mäusen jedoch davon aus, dass die C3 Bildung nach Myokardinfarkt auf das alternative Komplementsystem zurückzuführen ist und dass dessen Hemmung zu den positiven Ergebnissen führt, die bei der direkten C3 Inhibition nachgewiesen werden konnten. Dies eindeutig zu beweisen, ist Aufgabe folgender Studien, bei denen die spontane Aktivierung des alternativen System durch Verwendung von beispielsweise Faktor D KO-Tieren sicher ausgeschlossen ist.⁷⁶

Gegenüber dieser Schlussfolgerung ist der Einwand sicher gerechtfertigt, dass anhand des Versuchsaufbaus nicht ausgeschlossen werden kann, dass alle drei Wege des Komplementsystems für die C3 Aktivierung verantwortlich sind. Dagegen steht jedoch, dass sowohl bei den MBL-KO Tieren als auch den Rag1-KO Tieren eine Aggravierung der linksventrikulären Dilatation beobachtet wurde, die bei einer eindeutigen Reduktion der C3 Konzentration so nicht zu erwarten wären. Weiterhin führten wir eine auf der Avidin-Biotin basierenden C3 Färbung der Gewebeschnitte durch. Obwohl sich diese Schnitte aufgrund der intensiven Färbung nicht für eine genauere Untersuchung eignen, so lässt die fehlende Differenzierung zu den gefärbten WT-Schnitten darauf schließen, dass eine Reduzierung der C3-Konzentration nicht stattgefunden hat. Somit liegt die Aufgabe zukünftiger Studien darin, einerseits die Aggravierung der linksventrikulären Dilatation bei den MBL-KO Tieren zu erklären und andererseits die Rolle des alternativen Pfades der Komplementaktivierung nach Infarkt zu beweisen.

6 Zusammenfassung

Das aktivierte Komplementsystem, als Teil der angeborenen Immunantwort nach Myokardinfarkt, beeinflusst entscheidend das kardiale Remodeling. Mäuse, die für den Komplementfaktor C3 defizient waren, wiesen acht Wochen nach Infarkt eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation auf. Ungeklärt blieb, auf welchem der drei bekannten Wege (Klassisch, MBL, Alternativ) das Komplementsystem aktiviert wird.

Anhand von MBL-KO Mäusen sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, inwieweit die Aktivierung des Komplementsystems im kardialen Remodeling auf den durch MBL eingeleiteten Pfad zurückgeht. MBL-KO Mäuse und Wildtyp (WT) Mäuse wurden über acht Wochen nach Myokardinfarkt echokardiographisch auf die Entwicklung der linksventrikulären Dilatation untersucht. Weiterhin dienten histologische und immunhistologische Färbemethoden zur Bestimmung der Infarktgröße, der Myozytenanzahl, der Neutrophilen und der Kapillardichte, während polarisationsmikroskopische Aufnahmen zur Messung des Kollagengehalts verwendet wurden. Während sich bezüglich der Infarktgrößen, der Neutrophilen und des Kollagengehalts kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte, so wiesen die MBL-KO Tiere im Vergleich zu den WT Tieren eine signifikant größere ventrikuläre Dilatation bei gleichzeitig signifikant besserer Kapillardichte auf. Im Gegensatz zu den untersuchten Faktor C3 defizienten Tieren, wiesen MBL-KO Tiere somit eine Zunahme der ventrikulären Dilatation nach Infarkt auf

Basierend auf diesen Erkenntnissen kommen wir zu dem Schluss, dass sich die bezüglich der Ventrikelgröße positiven Effekte einer C3 Hemmung nicht mit einer MBL-Hemmung in Einklang bringen lassen. Die dauerhafte Aktivierung des Komplementsystems während des ventrikulären Remodelings, beruht angesichts der Aggravierung der linksventrikulären Dilatation nicht auf dem MBL-Weg. Stattdessen sehen wir die Komplementaktivierung im alternativen Weg begründet, da eine Hemmung des klassischen Weges, in einer zu dieser Arbeit komplementären Studie, ebenfalls zu einer Vergrößerung der linksventrikulären Dilatation führte.

7 Literaturverzeichnis

1. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2005;95:3C-8C; discussion 38C-40C
2. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation.* 1999;100:999-1008
3. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:569-582
4. Greenberg B, Quinones MA, Koilpillai C, Limacher M, Shindler D, Benedict C, Shelton B. Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the solvd echocardiography substudy. *Circulation.* 1995;91:2573-2581
5. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2009;81:474-481
6. Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of c3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med.* 1971;133:885-900
7. Maroko PR, Carpenter CB, Chiariello M, Fishbein MC, Radvany P, Knostman JD, Hale SL. Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest.* 1978;61:661-670
8. 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
9. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000;101:2981-2988
10. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: Fifty years of progress. *Circulation.* 2000;102:IV14-23
11. Cohn JN. Structural basis for heart failure. Ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation.* 1995;91:2504-2507
12. Takano H, Hasegawa H, Nagai T, Komuro I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: Mechanisms and therapeutic strategies. *Intern Med.* 2003;42:465-469
13. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045
14. Knuefermann P, Vallejo J, Mann DL. The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:1-7
15. 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
16. Aukrust P, Gullestad L, Lappegard KT, Ueland T, Aass H, Wikeby L, Simonsen S, Froland SS, Mollnes TE. Complement activation in patients with congestive

- heart failure: Effect of high-dose intravenous immunoglobulin treatment. *Circulation*. 2001;104:1494-1500
17. Clark AL, Loebe M, Potapov EV, Egerer K, Knosalla C, Hetzer R, Anker SD. Ventricular assist device in severe heart failure: Effects on cytokines, complement and body weight. *Eur Heart J*. 2001;22:2275-2283
 18. Lappegard KT, Bjornstad H. Anti-inflammatory effect of cardiac resynchronization therapy. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2006;29:753-758
 19. Giclas PC, Pinckard RN, Olson MS. In vitro activation of complement by isolated human heart subcellular membranes. *J Immunol*. 1979;122:146-151
 20. Hindmarsh EJ, Marks RM. Complement activation occurs on subendothelial extracellular matrix in vitro and is initiated by retraction or removal of overlying endothelial cells. *J Immunol*. 1998;160:6128-6136
 21. Gong KZ, Song G, Spiers JP, Kelso EJ, Zhang ZG. Activation of immune and inflammatory systems in chronic heart failure: Novel therapeutic approaches. *Int J Clin Pract*. 2007;61:611-621
 22. Nijmeijer R, Lagrand WK, Visser CA, Meijer CJ, Niessen HW, Hack CE. Crp, a major culprit in complement-mediated tissue damage in acute myocardial infarction? *Int Immunopharmacol*. 2001;1:403-414
 23. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1058-1066
 24. Beinrohr L, Dobo J, Zavodszky P, Gal P. C1, mbl-masps and c1-inhibitor: Novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol Med*. 2008;14:511-521
 25. Degn SE, Thiel S, Jensenius JC. New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. *Immunobiology*. 2007;212:301-311
 26. Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. The initiating proteases of the complement system: Controlling the cleavage. *Biochimie*. 2008;90:387-395
 27. Homeister JW, Lucchesi BR. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994;34:17-40
 28. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev*. 2009;230:9-21
 29. Thiel S. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol Immunol*. 2007;44:3875-3888
 30. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*. 1989;2:1236-1239
 31. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, Ryder LP, Koch C, Garred P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:2853-2863
 32. Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol*. 2005;174:3220-3226

33. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Soria N, Nardi N, Vargas A, Munoz S, Bove A, Suarez B, Lozano F. Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48:65-69
34. Satomura A, Endo M, Ohi H, Sudo S, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M. Significant elevations in serum mannose-binding lectin levels in patients with chronic renal failure. *Nephron*. 2002;92:702-704
35. Busche MN, Pavlov V, Takahashi K, Stahl GL. Myocardial ischemia and reperfusion injury is dependent on both igm and mannose-binding lectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1853-1859
36. Shi L, Takahashi K, Dundee J, Shahroor-Karni S, Thiel S, Jensenius JC, Gad F, Hamblin MR, Sastry KN, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with staphylococcus aureus. *J Exp Med*. 2004;199:1379-1390
37. Takahashi K, Gordon J, Liu H, Sastry KN, Epstein JE, Motwani M, Laursen I, Thiel S, Jensenius JC, Carroll M, Ezekowitz RA. Lack of mannose-binding lectin-a enhances survival in a mouse model of acute septic peritonitis. *Microbes Infect*. 2002;4:773-784
38. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res*. 1986;58:26-37
39. Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Grossman W, Springer ML. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: Comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol*. 2007;102:2104-2111
40. 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
41. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-455
42. Wilson EM, Diwan A, Spinale FG, Mann DL. Duality of innate stress responses in cardiac injury, repair, and remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37:801-811
43. Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation*. 1998;97:1392-1400
44. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest*. 1996;98:2854-2865
45. Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: Is the heart in control? *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1013-1020
46. Gullestad L, Aukrust P, Ueland T, Espevik T, Yee G, Vagelos R, Froland SS, Fowler M. Effect of high- versus low-dose angiotensin converting enzyme

- inhibition on cytokine levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:2061-2067
47. 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
48. 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
49. Zwaka TP, Manolov D, Ozdemir C, Marx N, Kaya Z, Kochs M, Hoher M, Hombach V, Torzewski J. Complement and dilated cardiomyopathy: A role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in cardiac myocytes. *Am J Pathol.* 2002;161:449-457
50. del Balzo U, Sakuma I, Levi R. Cardiac dysfunction caused by recombinant human c5a anaphylatoxin: Mediation by histamine, adenosine and cyclooxygenase arachidonate metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253:171-179
51. Fidler KJ, Wilson P, Davies JC, Turner MW, Peters MJ, Klein NJ. Increased incidence and severity of the systemic inflammatory response syndrome in patients deficient in mannose-binding lectin. *Intensive Care Med.* 2004;30:1438-1445
52. Garred P, Madsen HO, Marquart H, Hansen TM, Sorensen SF, Petersen J, Volck B, Svejgaard A, Graudal NA, Rudd PM, Dwek RA, Sim RB, Andersen V. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: A cross sectional study. *J Rheumatol.* 2000;27:26-34
53. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.* 2001;2:442-450
54. Schafranski MD, Stier A, Nisihara R, Messias-Reason IJ. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (mbl) in rheumatic heart disease: A beneficial role for mbl deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:521-525
55. Limnell V, Aittoniemi J, Vaarala O, Lehtimäki T, Laine S, Virtanen V, Palosuo T, Miettinen A. Association of mannan-binding lectin deficiency with venous bypass graft occlusions in patients with coronary heart disease. *Cardiology.* 2002;98:123-126
56. Keller TT, van Leuven SI, Meuwese MC, Wareham NJ, Luben R, Stroes ES, Hack CE, Levi M, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum levels of mannose-binding lectin and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2345-2350
57. Saevarsdottir S, Oskarsson OO, Aspelund T, Eiriksdottir G, Vikingsdottir T, Gudnason V, Valdimarsson H. Mannan binding lectin as an adjunct to risk assessment for myocardial infarction in individuals with enhanced risk. *J Exp Med.* 2005;201:117-125
58. Jordan JE, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 2001;104:1413-1418

59. Walsh MC, Bourcier T, Takahashi K, Shi L, Busche MN, Rother RP, Solomon SD, Ezekowitz RA, Stahl GL. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol.* 2005;175:541-546
60. Collard CD, Vakeva A, Morrissey MA, Agah A, Rollins SA, Reenstra WR, Buras JA, Meri S, Stahl GL. Complement activation after oxidative stress: Role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol.* 2000;156:1549-1556
61. Saevarsdottir S, Vikingsdottir T, Valdimarsson H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. *Scand J Immunol.* 2004;60:23-29
62. Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: Role of cytokeratin 1. *Am J Pathol.* 2001;159:1045-1054
63. Grieve DJ, Shah AM. Oxidative stress in heart failure. More than just damage. *Eur Heart J.* 2003;24:2161-2163
64. Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol.* 1996;148:291-300
65. Trendelenburg M, Theroux P, Stebbins A, Granger C, Armstrong P, Pfisterer M. Influence of functional deficiency of complement mannose-binding lectin on outcome of patients with acute st-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2010
66. Ueland T, Espevik T, Kjekshus J, Gullestad L, Omland T, Squire IB, Froland SS, Mollnes TE, Dickstein K, Aukrust P. Mannose binding lectin and soluble toll-like receptor 2 in heart failure following acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006;12:659-663
67. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40:423-429
68. Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to neisseria meningitidis serogroup b. *J Infect Dis.* 2001;184:1152-1162
69. Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther.* 2004;104:1-16
70. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and cd91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 2001;194:781-795
71. Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res.* 1999;44:232-241
72. Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* 2002;87:547-555

73. Vakeva A, Morgan BP, Tikkanen I, Helin K, Laurila P, Meri S. Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium. *Am J Pathol.* 1994;144:1357-1368
74. Lutz HU, Fumia S, Schurtenberger C, Alaia V. Opinion paper: Stimulation of complement amplification or activation of the alternative pathway of complement? *Mol Immunol.* 2007;44:3862-3865
75. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:439-446
76. Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M, Zhao H. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003;162:449-455

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Ablaufs vom initialen Infarkt bis zur Herzinsuffizienz
- Abb. 2.2: Überblick über die Komplementkaskade
- Abb. 3.1: Vereinfachte Vektordarstellung mit eingefügter Neomycin-Resistenz im Exon
- Abb. 3.2: M-Mode Darstellung des transthorakalen echokardiographischen Bildes des linken Ventrikels
- Abb. 3.3: Schema der Avidin-Biotin-Complex (ABC) Methode
- Abb. 3.4: Neutrophilenfärbung nach der ABC-Methode
- Abb. 3.5: Darstellung des Prinzips der Lectinfärbung
- Abb. 3.6: Querschnitt des linken Ventrikels mit Infarktnarbe
- Abb. 4.1: Sterblichkeit der MBL-KO und WT Gruppe
- Abb. 4.2: Prozentualer Anteil der Infarktgröße des linken Ventrikels
- Abb. 4.3: Endsystolischer ventrikulärer Durchmesser
- Abb. 4.4: Enddiastolischer ventrikulärer Durchmesser
- Abb. 4.5: Neutrophile im Gewebe
- Abb. 4.6: Zahlenbeurteilung der Neutrophilendichte
- Abb. 4.7: Prozentualer Anteil des Kollagengehalts im Septum
- Abb. 4.8: Kollagennachweis im Gewebe
- Abb. 4.9: Anzahl der Kapillaren pro Myozyt
- Tab. 4.1: Ergebnisübersicht aller echokardiographischen Messungen am Tag 1 und Tag 56
- Tab. 4.2: Ergebnisübersicht der Gefäßanzahl- und Myozytenanzahlwertung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz für die Themenstellung und die hervorragende Betreuung bedanken. Sowohl während der experimentellen Phase als auch beim anschließenden Verfassen der Dissertation stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und half mir bei Fragen und Problemen. Mit gemütlichen Grillfeiern bei ihm im Garten schuf er ein vertrautes Miteinander zwischen allen Mitarbeiter/innen seiner Arbeitsgruppe und ermöglichte es mir schnell in seinem Team Fuß zu fassen. Eine Famulatur bei ihm hat meine Begeisterung für die Innere Medizin geweckt.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Helga Wagner, Frau Charlotte Dienesch, Frau Barbara Bayer und Frau Nadja Blömer bedanken. Sie begleiteten und unterstützten mich während meiner gesamten Labortätigkeit, arbeiteten mich in alle Techniken ein und sorgten für ein wunderbares Arbeitsklima.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ohne sie wäre ich nicht in der Lage gewesen Medizin zu studieren. In den vergangenen sechs Jahren meines Studiums standen sie mir immer zur Seite und haben mir all dies erst ermöglicht. Ihnen ist diese Dissertation gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Philipp Johannes Werle
Geburtsdatum	19.09.1983
Geburtsort	Lohr am Main

Schulbildung:

1990 – 1994	Grundschule Sackenbach
1994 – 2003	Franz Ludwig von Erthal Gymnasium Lohr Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst:

2003 – 2004	Kreiskrankenhaus Lohr am Main
-------------	-------------------------------

Studium:

2004 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Julius Maximilians Universität Würzburg
August 2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1. Tertial	Innere Medizin, Juliusspital Würzburg
2. Tertial	Anästhesiologie, Juliusspital Würzburg
3. Tertial	Chirurgie, Kantonspital St. Gallen, Schweiz

Würzburg, den 06.12.2010

Philipp Werle