

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Großhaderns der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med Steffen Massberg

**RAGE- und ICAM-1-abhängige Adhäsionsmechanismen am
Endothel nach myokardialer Ischämie und Reperfusion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Melanie Horstkotte, geb. Schröder aus Weida

2014

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Kupatt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Bernhard Heindl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas A. Koeppel

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Jan Horstkotte
---	-------------------------

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
--------	--

Tag der mündlichen Prüfung:	16.01.2014
-----------------------------	------------

1	Einleitung und Zielsetzung	5
1.1	Der akute Myokardinfarkt	5
1.2	Der Reperfusionsschaden	5
1.2.1	Reaktive Sauerstoffspezies	6
1.2.2	Leukozyten in der postischämischen Reperfusion	6
1.3	Rezeptor für advanced glycation endproducts (RAGE)	8
1.3.1	RAGE als Vermittler intrazellulärer Signalwege	9
1.3.2	RAGE-vermittelte Leukozytenrekrutierung	10
1.4	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Vorbemerkungen	12
2.2	Mausmodell	12
2.2.1	Versuchstiere	12
2.2.2	Vorbereitungen	12
2.2.3	Akute reversible Ischämie des Myokards	14
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	16
2.2.5	Blutbildkontrollen mittels Coulter Counter®	17
2.2.6	Pumpfunktionsanalyse nach myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R)	17
2.2.7	Knochenmarkstransplantation zur Generierung der knochenmark-chimären Mäuse	19
2.2.8	Nachweis der ICAM-1-Deletion in den Versuchstieren	20
2.2.9	RAGE- und ICAM-1/RAGE-defiziente Versuchstiere	21
2.2.10	Statistik	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Histologischer Nachweis der RAGE-Expression nach Ischämie und Reperfusion	23
3.2	Ausschluss von Veränderungen des Blutbildes durch Deletion von ICAM-1 oder RAGE	24
3.3	Leukozytenrekrutierung in der Intravitalmikroskopie nach akuter myokardialer Ischämie	24
3.4	Einfluss der ICAM-1/RAGE-Defizienz auf die linksventrikuläre Pumpfunktion	26
3.5	Endotheliales RAGE ist essentiell für die postischämische PMN-Rekrutierung	29
3.6	Die Defizienz von ICAM-1 und endothelialelem RAGE führt zu einer Verbesserung der postischämischen linksventrikulären Pumpfunktion	31
4	Diskussion	34
4.1	Experimentelle Modelle akuter Myokardischämie an der Maus	34
4.1.1	Fluoreszenzmikroskopie des Myokards nach Ischämie und Reperfusion	35
4.1.2	Einfluss der chirurgischen Präparation	36
4.2	Einfluss von RAGE auf die postischämische Leukozytenrekrutierung	36
4.2.1	RAGE als Adhäsionsmolekül	37

4.3	Postischämische linksventrikuläre Funktion in <i>ICAM-1/RAGE</i> -defizienten Herzen.....	38
4.4	Endotheliale versus leukozytäre RAGE-Expression	39
4.5	RAGE induzierte Signaltransduktion	40
5	Zusammenfassung.....	42
6	Abkürzungsverzeichnis.....	44
7	Literaturangaben.....	45
8	Danksagung.....	55
9	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Der akute Myokardinfarkt

Die Manifestation der Artherosklerose an den Herzkranzarterien ist die koronare Herzerkrankung (KHK), ein pathologischer Prozess, dessen Auswirkungen in Industrieländern die Krankheits- und Todesursachenstatistiken anführen¹.

Zu den akuten Manifestationen der KHK zählt der Myokardinfarkt, eine durch plötzlichen thrombotischen Verschluss der Koronarien ausgelöste Minderdurchblutung des abhängigen Myokardareals mit folglichem Sauerstoffdefizit und verringerter Adenosintriphosphat-Produktion (ATP) bei konstitutiv hohem Verbrauch energiereicher Phosphate. Für die kurzfristige Aufrechterhaltung adäquater ATP-Spiegel wird die anaerobe Glykolyse aktiviert, jedoch sammeln sich so intrazellulär saure Valenzen, und es akkumuliert Laktat. Ein abfallender interstitieller pH-Wert, Hypoxie und energetische Verarmung führen schließlich zum Zelltod und damit zur systolischen und diastolischen Myokarddysfunktion².

Zudem führt eine Störung der Transportsysteme im Sarkolemm und dem sarkoplasmatischem Retikulum zur Ansammlung zytosolischen Kalziums (calcium overload). Die anschließende Aktivierung von Proteasen resultiert in der Freisetzung von Lysophospholipiden und freien Fettsäuren sowie Störungen kontraktile Proteine³.

Die Koronarperfusion ist herabgesetzt, folglich auch die Pumpfunktion und Herzzeitvolumen; kompensatorische Steigerung des systemischen Gefäßwiderstandes und der Herzfrequenz führen zu weiterem Sauerstoffbedarf. Ein „circulus vitiosus“ beginnt, der nur durch eine frühe, auf Reperfusion ausgerichtete Intervention durchbrochen werden kann. Dabei verhindert die frühe Wiedereröffnung der Koronarien einen erhöhten kapillären Widerstand im Endstrombett, der einen adäquaten Anstieg der Blutperfusion bedingt (Mikrozirkulationstörung)⁴. Derzeit stellt die perkutane transluminale Koronarintervention (PCI) die Methode der Wahl dar⁵.

1.2 Der Reperfusionsschaden

Die Reperfusion des ischämischen Gewebes ist die effektivste therapeutische Maßnahme, um weiteren Zelluntergang zu vermeiden⁶. Die daraus folgende Wiederherstellung der Energiezufuhr und die Ausschwemmung toxischer Metabolite sind jedoch gekoppelt an eine Reihe ungünstiger Konsequenzen.

Nach prolongierter Ischämie führt der ATP-Mangel zur Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase, folglich steigt die intrazelluläre Na⁺- und Cl⁻-Konzentration. Der osmotische Gradient an der Zellmembran ist reduziert, sodass es zur Schwellung der Zellen kommt, die im kapillären Endstrombett eine Einengung der Kapillaren zur Folge hat. Dieser Vorgang liegt unter anderem einem „No-Reflow“ – Phänomen zugrunde⁴.

Weiterhin entsteht der Reperfusion über verschiedene intra- und extrazelluläre Pathomechanismen ein zusätzlicher Schaden, zum bereits existenten Ischämieschaden, größtenteils vermittelt durch reaktive Sauerstoffderivate (ROS) und neutrophile Leukozyten⁶.

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies sind potente Oxidantien die auch unter physiologischen Bedingungen in kleinen Mengen entstehen, jedoch sofort von Reduktionsäquivalenten (z.B. Glutathion) inaktiviert werden⁶.

Im reperfundierten Gewebe werden ROS im Überschuss gebildet⁶⁻¹⁰, dadurch kommt es zur Oxidation von Sulfhydrylgruppen verschiedener Strukturproteine und ungesättigter Fettsäuren der Zellmembranen sowie Hemmung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, was zu einem direkten Zellschaden führen kann¹⁰⁻¹².

Darüber hinaus interferieren ROS aber auch in anderen Signalwegen die zum ischämischen Gewebeschaden resultieren. So hat sich gezeigt, dass diese Oxidantien Stickstoffmonoxid (NO), einen endogenen Vasodilatator, inaktivieren¹³, die Adhärenz neutrophiler Leukozyten an intaktes Gefäßendothel erhöhen¹⁴, die Produktion des Plättchen-Aktivierenden-Faktors (PAF) stimulieren¹⁵ sowie dessen Abbau verhindern¹⁶. ROS fördern die Aktivierung des Neutrophilen-Chemotaktischen-Faktors (NAF)¹⁷ und regen die Synthese und Exprimierung von Thromboplastin (Tissue Factor, TF) in Endothelzellen an¹⁸, begünstigen somit die intravaskuläre Thrombose⁶.

1.2.2 Leukozyten in der postischämischen Reperfusion

Die Okklusion und Wiedereröffnung des Blutgefäßes führt zur erhöhten Leukozytenadhäsion im postischämischen Areal. Diese erfolgt in verschiedenen Schritten. Die wichtigsten Stufen sind das „Rolling“, das „Sticking“ und die „Transmigration“¹⁹.

1.2.2.1 Leukozytäre Adhäsionsmechanismen

Im ischämischen Gewebe kommt es nach der Reperfusion zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion im entsprechenden postischämischen Areal. In mehreren Schritten erfolgt das „Rolling“, „Sticking“ und schließlich die „Transmigration“¹⁹.

Diese Interaktion zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothel findet hauptsächlich in den postkapillären Venolen des postischämischen Gewebes statt^{20, 21}. Im ersten Adhäsionsschritt, dem Rolling, sind vor allem Selektine und ihre Liganden verantwortlich für die Dezeleration der vorbei strömenden Leukozyten und erste schwache, reversible Bindungen an das Endothel. Das so genannte Sticking ist der zweite Adhäsionsschritt und markiert das feste Anhaften des Leukozyten an der Endothelzelle. Die Bindungen sind fester als die der Selektine, der Aufbau dieser Bindungen benötigt jedoch auch eine längere Kontaktzeit^{22, 23}. Für diesen Schritt sind die interzellulären Adhäsionsmoleküle 1 und 2 (ICAM-1, ICAM-2) auf der endothelialen Seite von entscheidender Bedeutung. Diese Moleküle gehören zur Immunglobulin-Superfamilie²⁴.

Eine besondere Rolle spielt das ICAM-1 (CD54), welches konstitutiv in geringen Mengen auf Endothelzellen, aber auch auf Epithel, Fibroblasten, Leukozyten und vielen Tumorzellen exprimiert wird²⁴.

Bekanntere Liganden der endothelialen Adhäsionsmoleküle sind die Beta-2-Integrine Monocyte Adhesion Complex-1 (Mac-1 oder CD11b/CD18), das Lymphozyten-Funktionsassoziierte Antigen-1 (LFA-1 oder CD11a/CD18)^{25, 26} und das Very Late Antigen-4 (VLA-4 oder CD49d)²⁷. Darüber hinaus zeigte Altieri, dass ICAM-1 direkt Fibrinogen binden kann und dadurch zur Adhäsion von Thrombozyten beiträgt²⁸.

Nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-1 (IL-1) wird ICAM-1 verstärkt exprimiert^{29, 30}. Durch Antikörper-Blockade ließ sich in vitro die ICAM-1-vermittelte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten inhibieren³¹.

Die zwei CD18-Integrine LFA-1 und Mac-1 können beide an die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 binden^{26, 32, 33}, wobei beide Moleküle teilweise miteinander konkurrieren³⁴. Intravitalmikroskopische Studien erbrachten Hinweise, dass LFA-1 das wichtigste Beta-2-Integrin für feste Leukozytenbindung ist³⁵ und auch eine höhere Affinität gegenüber ICAM-1 besitzt als Mac-1³⁴.

VLA-4 wird überwiegend auf Monozyten, eosinophilen Leukozyten und Lymphozyten exprimiert³⁶. Auf neutrophilen Leukozyten ist es nur in geringen Maße exprimiert und spielt

daher nur eine untergeordnete Rolle in der postischämischen Adhäsionskaskade³⁷. In Abwesenheit von anderen Adhäsionsmolekülen jedoch kann VLF-4 leukozytäres Rolling initiieren^{38,39} und auch feste Bindungen über das endotheliale Vaskuläre-Zell-Adhäsions-Protein-1 (VCAM-1) eingehen⁴⁰.

1.2.2.2 Kardiotoxisches Potential polymorphonukleäre Leukozyten (PMN)

Einen weiteren erheblichen Beitrag zum Reperfusionsschaden leisten PMNs, die bei Eintritt in ischämisches Myokard aktiviert werden. Aktivierte polymorphonukleäre Leukozyten setzen ebenfalls mit Hilfe des membran-assoziierten NADPH-Oxidasesystems freie Sauerstoffradikale frei; ein Mechanismus, der als „respiratory burst“ bezeichnet wird, da er mit einem Anstieg des zellulären Sauerstoffverbrauchs einhergeht⁴¹.

Ebenso wird Myeloperoxidase aus sogenannten azurophilen Granula frei. Myeloperoxidase stellt ein Enzym dar, das die Reaktion von Chlorid und Wasserstoffperoxid zu Hypochlorsäure katalysiert und für einen Großteil der von Sauerstoffradikalen bedingten Zytotoxizität verantwortlich gemacht wird^{41,42}.

Diese aus PMNs freigesetzten Sauerstoffradikale vermitteln die endotheliale Dysfunktion⁴³ sowie eine Abnahme der linksventrikulären Herzfunktion⁴⁴ und inaktivieren endotheliales Stickoxid (NO)^{13,45}.

1.3 Rezeptor für advanced glycation endproducts (RAGE)

Advanced glycation end products (AGEs) sind stabile Produkte der nicht-enzymatischen Glykosilierung und Oxidation von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren. Es wurde zunächst angenommen, dass diese Moleküle „gealterte“ Proteine sind, die für die Degradation vorgesehen sind^{46-50, 51}. Die entsprechenden AGE-Rezeptoren wurden als Scavenger-Rezeptoren angesehen, verantwortlich für die Beseitigung der AGE-Moleküle und für die Zellregeneration^{47, 52, 53}. Ein defekter Clearancemechanismus von diesen glykolisierten Molekülen sollte ein wichtiger Antrieb des Alterns sein und in Krankheiten eine Rolle spielen die mit einer gesteigerten Bildung von AGEs assoziiert sind, wie z. B. Diabetes mellitus oder Arteriosklerose⁵².

Als der Rezeptor für AGEs zum ersten Mal geklont werden konnte zeigte sich, dass RAGE nicht deren Clearance und Degradation beschleunigte. Stattdessen aktivierte die Ligand-

Rezeptor-Interaktion dem Rezeptor nachgeschaltete Signalwege, welche auch die Aktivierung von p21^{ras}, MAP-Kinasen und den NF-κB-Signalweg einschließen^{54, 55}.

Unter physiologischen Bedingungen kann die Expression von RAGE in Haut- und in Lungengewebe nachgewiesen werden, die meisten andere Zellen u.a. Makrophagen, Leukozyten oder Endothelzellen zeigen keine signifikante RAGE-Expression⁵⁶. In chronischen Entzündungsprozessen, wie z. B. bei Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder chronischen Nierenerkrankungen konnte mit der erhöhten Expression von RAGE in unterschiedlichen Geweben in Verbindung gebracht werden⁵⁷⁻⁶⁰.

1.3.1 RAGE als Vermittler intrazellulärer Signalwege

RAGE ist ein transmembraner Multiligand-Rezeptor welcher zur Immunglobulin-Superfamilie gehört⁵². Neben der Funktion als Rezeptor für AGEs wurde eine Reihe weiterer Liganden identifiziert^{61, 62}. RAGE bindet unter anderem an β-Amyloide, Amyloid A, (welche bei Alzheimer oder systemischer Amyloidose akkumulieren)^{62, 63}, an S100/Calgranuline, die extrazellulär bei chronischer Inflammation akkumulieren^{64, 65}, oder dem proinflammatorischen DNS-bindenden Protein HMGB1 (Amphoterin) welches von nekrotischen Zellen freigesetzt wird⁶⁶⁻⁶⁹. Außerdem interagiert RAGE mit Oberflächenmolekülen u.a. von Prionen⁷⁰ und Leukozyten⁷¹.

Die Bindung von RAGE führt zur intrazellulären Signaltransduktion und Aktivierung von proinflammatorischen Prozessen. Dieser Effekt wird hauptsächlich der aktivierenden Wirkung auf Nuklear-Factor-κB (NF-κB) und des NF-κB-abhängigem Signalweges zugeschrieben⁷². Über diesen Signalweg wird die eigene Expression von RAGE induziert und führt so zu der Aufrechterhaltung von chronisch-entzündlichen Konditionen in Geweben (positiver feedback loop)^{52, 72, 73}.

Neben der Aktivierung der NF-κB-Signalkaskade werden durch die Bindung von Liganden an RAGE weitere intrazelluläre Signalwege getriggert. In verschiedenen Zelllinien u. a. glatten Muskelzellen, Myoblasten, Osteoblasten und monozytischen Zellen werden ERK1/2(p44/p42) MAP-Kinasen aktiviert^{55, 74-76}. Durch in vitro Studien mit verschiedenen humanen RAGE-Liganden konnte eine cytoplasmatische Bindungsstelle identifiziert werden, was eine direkte RAGE-ERK-Interaktion vermuten läßt⁷⁷.

Weiterhin wurde die Aktivierung p38 und SAPK/JNK-Kinasen in Monozyten/Makrophagen und Tumorzellen (47-49) beschrieben⁷⁸⁻⁸⁰ sowie ein Zusammenhang zwischen RAGE und der

JAK/STAT hergestellt⁸⁰⁻⁸². Ausserdem wird vermutet, dass eine weitere Interaktion des RAGE-Liganden die Bildung von ROS über NADPH-Oxidasen induziert^{55, 83}. Viele dieser Signalwege führen wiederum zur Downstream-Aktivierung der NF- κ B-Kaskade. Die Verschiedenheit der RAGE-assoziierten Signalwege ist ein Hinweis darauf, dass unterschiedliche RAGE-Liganden unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren und somit die Komplexität des RAGE-Netzwerkes erhöhen⁵².

1.3.2 RAGE-vermittelte Leukozytenrekrutierung

Sowohl auf vaskulären Endothelzellen⁸⁴, als auch auf Leukozyten⁸⁵, wird RAGE nach unterschiedlichen Stimulation exprimiert und spielt dort eine Schlüsselrolle bei inflammatorischen Prozessen^{85, 86}. Erst kürzlich wurde RAGE als neuer endothelialer Adhäsionsrezeptor für leukozytäre Integrine identifiziert. Dieser Rezeptor unterstützt dadurch die Leukozytenrekrutierung und Extravasation infiltrierender Zellen. Neben seiner Funktion als Signalmolekül bindet RAGE auch an Mac-1, ein Beta-2-Integrin ausschlaggebend für die Syk-abhängige Leukozytenadhäsion^{52, 71}. Somit ist RAGE ein Rezeptor für ein weitaus breiteres Spektrum an Molekülen als nur für AGEs⁷¹.

Es wurde bereits gezeigt, dass über einen high-mobility-group-box-1 (HMGB1)-abhängigen Mechanismus eine Rekrutierung von neutrophilen Leukozyten in vitro erfolgt und diese die Anwesenheit von RAGE und Mac-1 erfordert^{82, 87}. Die erst kürzlich bestätigte Funktion als Rezeptor für Mac-1 erklärt zumindest teilweise die reduzierte Anzahl von auswandernden Leukozyten in RAGE-defizienten Mäusen (*RAGE*^{-/-}) im Thioglykollat-induzierten Peritonitis-Modell⁸⁸. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass das RAGE-induzierte Leukozytenrekrutierung in das Peritoneum diabetischer Mäusen, bei denen RAGE überexprimiert wird, erhöht ist. Weiterhin zeigte sich in einem Sepsismodell der Maus, dass *RAGE*-defiziente Mäuse eine signifikant niedrigere Leukozytenevasion aufweisen⁵².

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass RAGE und seine Liganden eine Rolle in verschieden vaskulären Erkrankungen spielen, bei denen es zur vermehrten Leukozytenrekrutierung ins Gewebe kommt.

In einem Cremaster-Modell der trauma-induzierten Inflammation zeigte sich ein Zusammenhang von ICAM-1 und RAGE für die Leukozytenrekrutierung. Nach Deletion von ICAM-1 und RAGE war die posttraumatische Leukozytenadhäsion in dem oben genannten Modell signifikant vermindert⁸⁶.

Über eine direkte in vivo Untersuchung der Leukozytenrekrutierung im ischämischen Myokard in Abwesenheit von RAGE wurde bisher nicht berichtet.

Bei intaktem Endothel wird die Leukozytenrekrutierung maßgeblich durch ICAM-1 beeinflusst²⁴. Somit würde eine RAGE-abhängige Rekrutierung maskiert werden. Um dies zu verhindern wurden in dieser Arbeit *ICAM-1*-defiziente Mäuse eingesetzt.

1.4 Fragestellung

Auf Grund der beschriebenen Erkenntnisse ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Beeinflusst die Interaktion von RAGE und Leukozyten die postischämische myokardiale Leukozytenrekrutierung?
- Hat die Defizienz von RAGE eine funktionelle Relevanz in der subakuten Phase nach myokardialer Ischämie und Reperfusion?
- Ist endotheliales oder leukozytäres RAGE verantwortlich für die postischämischen Veränderungen der Leukozytenrekrutierung und möglichen funktionellen Effekten am Mausherzen?

2 Material und Methoden

2.1 Vorbemerkungen

Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden in der Zeit von Februar 2005 bis Januar 2011 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 55.2-12-54-2531-123-05) an der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern sowie im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.2 Mausmodell

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche und männliche Wildtypmäuse mit C57/Bl6 Hintergrund. (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Deutschland; Eigenzucht Walter-Brendel Institut für experimentelle Chirurgie, München), sowie *ICAM-1*- und *ICAM-1/RAGE*-defiziente Tiere des selben Hintergrundes (*ICAM-1*^{-/-} aus der Eigenzucht des Walter-Brendel Institut für experimentelle Medizin; *RAGE*^{-/-} und bezogen durch Prof. Dr. A. Bierhaus, Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Heidelberg) mit einem Körpergewicht von 20 bis 30g. Die Mäuse wurden bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest Deutschland). Die Tiere wurden jeweils mit dem C57/bl6-Hintergrund der 10. Generation zurück gekreuzt.

2.2.2 Vorbereitungen

2.2.2.1 Narkose

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Kombinationsinjektion, bestehend aus Midazolam (0,005mg/g Körpergewicht; Dormicum® Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland),

Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht; Domitor® Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) und Fentanyl (0,05mg/kg Körpergewicht; JANSSEN-CILAG GmbH Neuss, Deutschland) narkotisiert. Die Phase der chirurgischen Toleranz trat nach ungefähr 10 Minuten ein, in denen die Mäuse möglichst sorgfältig von Lärm und anderen ungewohnten Störfaktoren abgeschirmt wurden um Stressreaktionen zu vermeiden und bestmögliche Wirksamkeit der Pharmaka zu gewährleisten. Diese Narkose hielt bis zu 90 Minuten an, und wurde bei Bedarf nachdosiert (ein Drittel der Ausgangsmenge der genannten Narkotika).

2.2.2.2 Operationsmikroskop und Monitoring

Die Intubation und Operation der Versuchstiere erfolgte an einem mikrochirurgischem Arbeitsplatz unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leitz, Wetzlar, Deutschland), welches eine 5 bis 40-fache Vergrößerung ermöglicht. Zur Überwachung der Herztätigkeit wurde mit Elektroden und einem 3-poligen Ableitkabel kontinuierlich ein subkutanes EKG aufgezeichnet.

2.2.2.3 Intubation

Jede Maus wurde nach Narkoseeintritt mit der von Brown et al. beschriebenen Technik nichtinvasiv endotracheal intubiert. Als Tubus dienten Venenverweilkanülen (Vasofix® Braunüle, Standard-Venenverweilkanülen G22 – G20, Braun Melsungen AG) die mit Hilfe von Polyethylenschläuchen und eines y-förmigen Verbindungsstückes an ein volumengesteuertes Beatmungsgerät (Minivent, Type 845, HSE) angeschlossen wurden. Das Tidalvolumen und die Beatmungsfrequenz wurden nach durch den Hersteller empfohlenen Formeln berechnet (Tidalvolumen = $0.0062 \cdot \text{Körpergewicht in kg}$; Beatmungsfrequenz in Atemzüge pro Minute = $53,5 \cdot \text{Körpergewicht in kg}^{-0,26}$). Als Atemgas wurde Raumluft verwendet.

Nach der Intubation wurden die Tiere in Rückenlage auf eine Heizplatte gelegt um Unterkühlungen durch narkotikainduzierte Fehlregulation des Wärmehaushaltes zu vermeiden, und an beiden Vorderläufen mit Pflaster fixiert. Die Körperkerntemperatur wurde rektal mit Hilfe einer Temperatursonde kontrolliert und zwischen 36°C und 37°C konstant gehalten.

2.2.3 Akute reversible Ischämie des Myokards

Zur Analyse der Rekrutierungsmechanismen der Leukozyten wurde ein akutes in vivo Ischämie/Reperfusionmodell gewählt, in dem Wildtyp-Tiere und transgene Tiere einer 20-minütigen myokardialen Ischämie mit anschließender 15-minütiger Reperfusion ausgesetzt wurden. Nach Beendigung der Reperfusion wurden die Herzen mit saliner Lösung für 3 Minuten antegrad perfundiert, um nicht adhärenente Leukozyten und Farbstoffreste auszuwaschen. Anschließend wurde das Herz explantiert, auf einen speziellen Objektträger gebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Diese Analysen wurden auf Videoband aufgezeichnet und später offline ausgewertet.

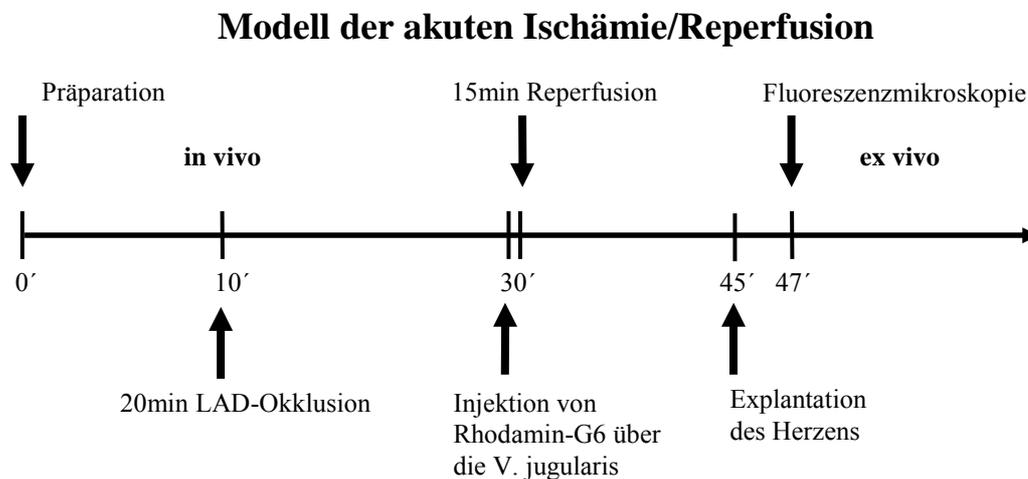


Abb 1: Schematische Darstellung des akuten Ischämie/Reperfusionmodells. Nach 20 Minuten Ischämie folgten 15 Stunden Reperfusion. Anschließend wurde das Herz explantiert, mit saliner Lösung perfundiert und dann die fluoreszenzmikroskopischen Analysen in Epilluminationstechnik durchgeführt.

2.2.3.1 Chirurgische Präparation

Die verwendete Operationstechnik wurde bereits 1995 von Entman et al beschrieben⁸⁹. Bei denen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fanden jedoch geringe Modifizierungen statt. Zur invasiven Induktion einer Myokardischämie wurde die Maus in Rechtsseitenlage fixiert um bestmöglichen Zugang für die linkslaterale Thorakotomie zu haben. Der Hautschnitt erfolgte über dem dritten Interkostalraum. Die darunter liegende Muskulatur wurde mit Hilfe einer Mikroschere auseinander präpariert und gegebenenfalls durchtrennt. Bei der Eröffnung der Zwischenrippenmuskulatur wurde sorgfältig auf die Schonung der

linken *Arteria mammaria* geachtet. Für einen freien Zugang zum Herzen wurde ein Thoraxretraktor vorsichtig eingespannt, um Lungengewebe nicht zu verletzen. Die linke Koronararterie wurde ca. 1 mm unterhalb des linken Herzohres mit einer 8-0 Prolene Fadenkombination CC 9,3mm3/8c Nadel (Ethicon, Johnson & Johnson Intl, St-Stevens-Woluwe, Belgien (J&J Intl.)) intramuskulär umstochen.

Um eine spätere Reperfusion zu ermöglichen, wurde die Ligatur auf einem ungefähr 1,5mm langem Stück Polyethylen-Plastikschlauch (PE-10; ID 0,61 mm; OD 0,92 mm) auf mit einem dreifachen chirurgischen Knoten verschlossen. Die Blutversorgung großer Myokardanteile des linken Ventrikels sowie des Septums wurde somit reversibel unterbrochen, wie sich durch die Entfärbung des betroffenen Myokards zeigte.

Um die Austrocknung des Gewebes zu vermeiden und die Beatmungssituation zu optimieren wurde der Retraktor entfernt und der Thorax anschließend mit einer einfachen Ligatur verschlossen. Um eine Trocknung der Wunde zu verhindern wurde die Wundfläche mit einem mit 0,9 % NaCl benetzten Tupfer bedeckt und während der gesamten Ischämiezeit feucht gehalten.

2.2.3.2 Venöser Gefäßzugang und Applikation von Rhodamin-G6

Zur Applikation des für die Leukozytenmarkierung notwendigen Fluoreszenzfarbstoffes wurde während der 20-minütigen Ischämie ein Katheter in die rechte *Vena jugularis* platziert. Diese wurde dazu freipräpariert und ein leicht schräg angeschnittener PE-Katheter (ID 0,4 mm; OD 0,8 mm) eingeführt. Am distalen Ende des Katheters befand sich eine Kanüle (30½G Microlance™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Deutschland (BD GmbH)) und eine 1ml-Spritze (Plastipak™, BD GmbH) zur Injektion der benötigten Substanzen. Kurz vor Beginn der Reperusionsphase wurde 0,05%-iges Rhodamin-G6 (50µl/kg Körpergewicht von Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) zur Färbung der Leukozyten injiziert.

2.2.3.3 Reperfusion

Im direkten Anschluss an die Ischämie wurde die Brusthöhle wieder eröffnet und durch das Entfernen des PE-Röhrchens der Blutfluss durch die Koronararterie wiederhergestellt. Nach 15-minütiger Reperusionszeit wurde das Herz explantiert. Zum Auswaschen nichtadhärenter Blutbestandteile wurde eine stumpfe 22G Kanüle in die Aorta eingeführt und über zwei Minuten saline Lösung mit einem Perfusionsdruck von 80cm Wassersäule antegrad infundiert.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Um die in vivo mittels Rhodamin-G6 markierten Leukozyten im epikardialen Myokard zu analysieren, wurde ein Fluoreszenzmikroskop eingesetzt (siehe Abbildung 1).

Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes

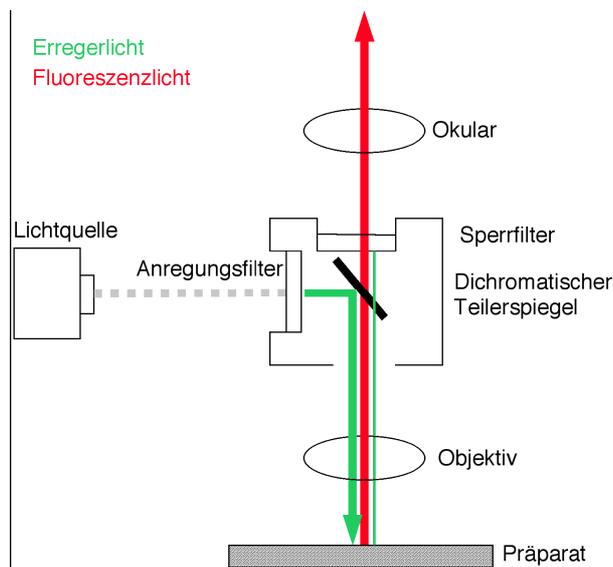


Abb. 2: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein modifiziertes Leitz-Orthoplan Mikroskop mit einer 100 Watt Quecksilberlampe verwendet, welche wiederum mit einem „Ploemo-Pack Illuminator“ (Leitz, Wetzlar, Deutschland) verbunden wurde. Mit einem 10x Objektiv (W10/0.6; Leitz, Wetzlar, Deutschland) wurden die Bilder auf Videoscreen vergrößert (PVM-1442 QM, diagonal 33 cm; Sony, München, Deutschland). Zur Aufnahme wurde eine “charge-coupled device” (CCD) Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, San Diego, CA, USA) verwendet und die Bilder zu einem Videorekorder-System transferiert (S-VHS Panasonic AG 7330; Matsushita Electric, Tokio, Japan).

Für die Darstellung der Rhodamin-G6 markierten Zellen wurde ein N2 Filter Block (Excitation, 530 bis 560 nm; Emission, >580nm, Leitz) verwendet.

Nach Platzierung des Herzens unter dem Mikroskop wurden neun Gesichtsfelder im ischämischen Areal dargestellt und mit der angeschlossenen Kamera aufgezeichnet. Die

Auszählung der Leukozyten pro Gesichtsfeld erfolgte offline durch einen geblindeten Untersucher.

2.2.5 Blutbildkontrollen mittels Coulter Counter®

Zur Kontrolle des Blutbildes der verschiedenen Versuchstiere wurde jedem Tier eine Blutprobe entnommen und die Anzahl der Blutzellen mittels Coulter Counter® (Coulter Corp., Miami, FL, USA) am Ende des Versuchs analysiert.

2.2.6 Pumpfunktionsanalyse nach myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R)

Für die Analyse der postischämischen Pumpfunktion wurde ein chronisches Ischämie/Reperusionsmodell gewählt in welchem die Tiere zunächst einer 45-minütigen Ischämie unterzogen wurden. Nach 24 Stunden Reperfusion wurden funktionelle Parameter wie unten beschrieben analysiert, anschließend die Herzen explantiert und weiter histologisch bearbeitet.

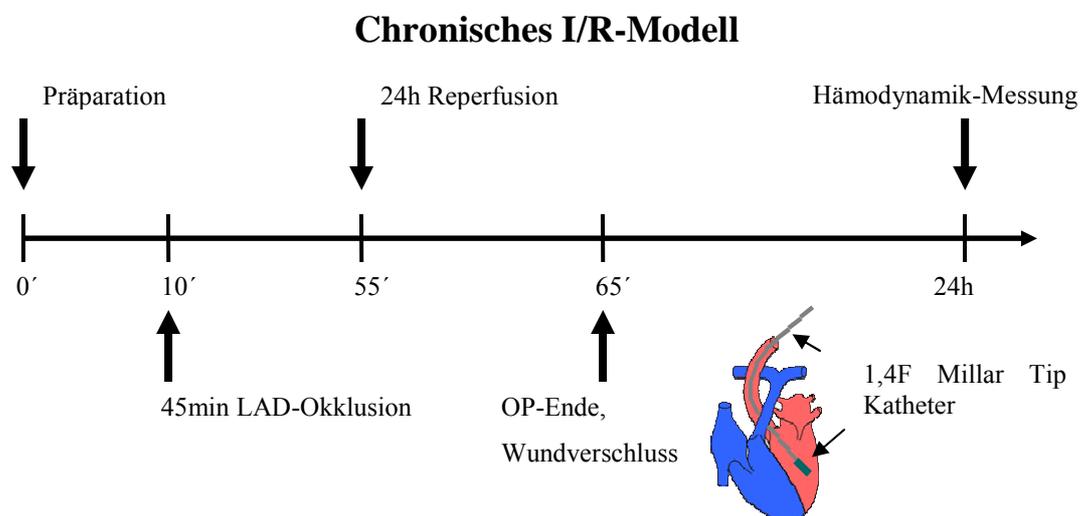


Abb. 3: Schematische Darstellung des chronischen Ischämie/Reperusionsmodells. Nach 45 Minuten Ischämie folgten 24 Stunden Reperfusion.

Das chronische Ischämie/Reperusionsmodell unterscheidet sich in einigen Punkten von dem akuten Modell. Nach Eintritt der Narkose und Intubation wurde die LAD für 45 Minuten

okkludiert, anschließend die Ligatur über dem Gefäß gelockert und entfernt. Es folgte die Reperfusionphase. Sodann wurden die Rippen und Muskeln wieder adaptiert und mit zwei bis drei Einzelheftnähten (Prolene, 6-0, Ethicon, J & J Int, USA) verschlossen. Anschließend wurde die Haut mit Einzelheftnähten vernäht.

Während des gesamten Versuchs wurde Sauerstoff zur Beatmungsluft zugegeben. Die Maus wurde sobald als möglich von der Beatmung genommen und bis zum vollständigen Erwachen in eine Box mit 30%-igem Sauerstoff unter eine Wärmelampe gelegt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Zur postoperativen Analgesie wurden vor Verschluss des Thorax 0,01mg/kgKg Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, München, Deutschland) i. p. gespritzt. Die Analgesie wurde gegebenenfalls nach 12h wiederholt.

Zur Kontrolle wurden sogenannte "Sham-Operationen" durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, ohne jedoch die linke Koronararterie zu umstechen und zu verschließen. Die Gesamtdauer der Operation betrug ungefähr 1 bis 1,5 Stunden. Nach erfolgreicher Operation wurden die Tiere 24 Stunden lang unter Standardbedingungen gehalten.

Abschließend wurden verschiedene Pumpfunktionsparameter durch invasive Messungen bestimmt. Hierfür wurden die Tiere erneut narkotisiert und anschließend wieder auf dem Operationstisch platziert. Die Körpertemperatur wurde dabei konstant bei 37°C gehalten. Die Trachea wurde freipräpariert und nach Einschnitt ein abgeschnittener 20G Venenverweilkatheter eingeführt, um die Spontanatmung zu erleichtern. Danach wurde das Carotisdreieck dargestellt und die *Arteria carotis communis* freigelegt. Der *Nervus vagus* wurde vorsichtig separiert und das Gefäß mit einem 0-5er Faden unterminiert. Die *Arteria carotis* wurde distal auf Höhe der Carotisgabel ligiert. Zwei weitere Fäden wurden um das Gefäß geführt und Knoten vorgelegt. Mit dem proximalen Faden wurde das Gefäß temporär abgebunden und im mittleren Drittel mit einer Feinschere eingeschnitten. Mit Hilfe einer an der Spitze abgebogenen Kanüle wurde ein 1,4 French Millar-Tip-Pressure-Transducer (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) in das Gefäß eingeführt. Dieser wurde nun mit dem medial liegenden Faden gesichert, anschließend der proximale Verschluss gelöst und der Katheter weiter bis in den linken Ventrikel avanciert. Anhand der Druckkurven ließ sich die richtige Lage überprüft werden (s. Abb. 4).

Intraarterielle Druckkurven gemessen mit dem Millar-Tip-Katheter



Abb. 4: Beispiel für eine Messung mittels Millar-Tip-Katheter. Abgebildet ist links eine typische Aortenkurve. Nach Passieren der Aortenklappe zeigt sich eine typische linksventrikuläre Druckkurve.

Vom Messkatheter, welcher über eine Transducer Control Unit (Model Tc-510, Millar Instruments) an einen Signalverstärker (DC Bridge Amplifier, Type 660, HSE) angeschlossen war, wurde das Signal über einen BNC-Conectorblock (BNC Conector Block, HSE) und eine A/D-Wandler-Messkarte (DT301, Data Translation, Bietigheim Bissingen, Deutschland) auf einen Computer übertragen und aufgezeichnet. Zur weiteren Auswertung wurde das Programm DASYLAB (National Instruments Irland Resources Limited) verwendet. Aus der Druckkurve des linken Ventrikels wurden der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) und als globaler Kontraktilitätsparameter die Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Druckes analysiert (dp/dt_{max}).

2.2.7 Knochenmarkstransplantation zur Generierung der knochenmark-chimären Mäuse

Zur Differenzierung, ob die Lokalisation vom RAGE (Endothel oder Leukozyten) für die Leukozytenrekrutierung eine Rolle spielt, wurden Knochenmarkschimären verwendet.

Knochenmarkszellen wurden von Spendermäusen nach zervikaler Dislokation aus den langen Röhrenknochen der Hinterläufe (Femura und Tibiae) durch Ausspülen des Knochenmarks

(KM) mit Zellkulturmedium gewonnen. Das Ausspülen und Aufbereiten des KM erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Sperandio im Walter-Brendel Institut für experimentelle Chirurgie, München.

Für den Transfer der isolierten Knochenmarkszellen wurden die Empfängertiere myeloablativ mit zweimal 6,5Gy in einem zeitlichen Abstand von mindestens 4 Stunden (Irradiator mit Cs137 Quelle; STS, Steuerungstechnik GmbH, Braunschweig) bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte am Max-Planck-Institut für Neurobiologie (Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried) in Zusammenarbeit mit PD Dr. M. Moser. Dazu wurden die Tiere ohne Narkose in einen 20 cm Durchmesser und ca. 30 cm hohen zylindrischen Behälter gesetzt und in das Gerät eingeführt. Im Anschluss wurden diese Tiere mit Spenderknochenmark (4×10^6 Zellen/Maus) intravenös rekonstituiert. Die myeloablativ Bestrahlung und anschließende Infusion des Spenderknochenmarks erfolgte durch PD Dr. Markus Moser im o.g. Max-Planck-Institut für Neurobiologie.

Die Haltung der Tiere nach Bestrahlung erfolgte am Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin (Marchioninstr. 15, 81377 München) in speziellen Käfigschränken, die mit gefilterter Luft versorgt wurden. Aufgrund der erhöhten Infektionsgefahr bei myeloablativ bestrahlten Tieren wurden diese in den ersten 14 Tagen nach Bestrahlung zusätzlich mit Antibiotikum (Ciprofloxacin, 8mg/kg/d) versetztem Trinkwasser versorgt. Sechs Wochen nach Bestrahlung wurden die knochenmarkschimären Tiere dann für den Akutversuch verwendet.

Bei nicht erfolgreicher Rekonstitution zeigten diese Tiere bereits nach ca. 8 Tagen deutliche äußere Auffälligkeiten wie gesträubtes Fell und geringe Aktivität. Diese Tiere wurden unmittelbar mittels Genickbruch getötet.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Gruppen gebildet, *ICAM-1/RAGE*-defiziente Mäuse welche Wildtyp-Knochenmark erhielten (Spendermäuse: C57/Bl6), Wildtyp-Mäuse (C57/Bl6) die Knochenmark von *ICAM-1/RAGE*-defizienten Mäusen erhielten, sowie Wildtyp-Kontrolltiere (C57/Bl6) die mit Wildtyp-Knochenmark (C57/Bl6) rekonstruiert wurden.

2.2.8 Nachweis der ICAM-1-Deletion in den Versuchstieren

Vor Einschluss aller Tiere in die Versuchsanordnung wurde die Deletion von ICAM-1 im Schwanzgewebe per Polymerase-Chain-Reaction (PCR) nachgewiesen. Das PCR-Protokoll

sowie notwendige Primer zum Nachweis des gewünschten Genotyps wurden nach denen vom Hersteller vorgegebenen Standards ausgewählt und durchgeführt (The Jackson Laboratory, 600 Main Street Bar Harbor, Maine 04609 USA). Eine Bande im Bereich von 280bp zeigt heterozygote oder Wildtyp-Tiere an (Abb. 5).

PCR-Nachweis der *ICAM-1*-Defizienz in Versuchstieren

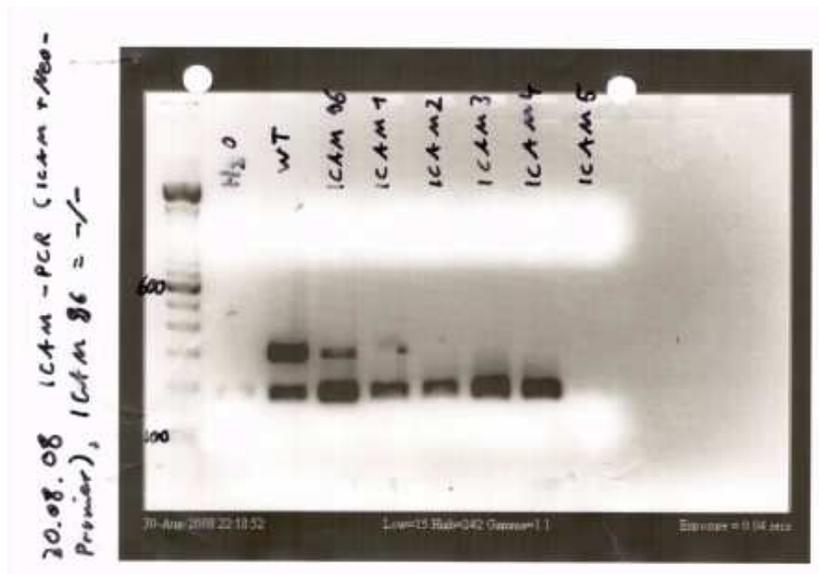


Abb. 5: Beispiel-PCR zum Nachweis der *ICAM-1*-Deletion. Ganz links die DNA-Leiter als Größenvergleich. Das *ICAM-1*-Gen hat eine Größe von 280bp, sichtbar im Wildtyp-Tier (WT) sowie in Tier *ICAM-96* (vermutlich Kreuzungsfehler, dieses Tier wurde aus dem Versuch genommen). Tier 1 bis -5 zeigt eine fehlende Bande bei 280bp, als Nachweis der *ICAM-1*-Deletion.

2.2.9 *RAGE*- und *ICAM-1/RAGE*-defiziente Versuchstiere

Für die weiteren Versuche arbeiteten wir mit homozygoten *RAGE*-null (*RAGE*^{-/-}) und *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Mäusen. Diese erhielten wir aus dem Labor von Prof. A. Bierhaus in Heidelberg. Frau Bierhaus und ihre Arbeitsgruppe entwickelten eine Mauslinie bei der essentielle Teile der extrazellulären *RAGE*-Domäne (Exons 2-7) von zwei *loxP*-sites in gleicher Orientierung flankiert wurden. Nach Kontakt mit der Cre-Rekombinase wurden die zwischengeschalteten Sequenzen deletiert. Mäuse heterozygot für die Cre-Rekombinase (Cre) wurden zur Homozygotie gezüchtet um die *RAGE*^{-/-}-Mauslinie zu erschaffen. Die Verifizierung der fehlenden *RAGE*-Expression wurde anhand fehlender mRNA in der RT-PCR von Lungengewebe überprüft. Es konnte mit Primern für die extrazelluläre *RAGE*-Domäne keine *RAGE*-mRNA in *RAGE*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Zum Vergleich der Loading-

Menge (RT-PCR) wurde das Enzym HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) verwendet.

Zur weiteren Kontrolle wurden verschiedene RAGE-Primer verwendet, welche das gesamte RAGE-Molekül abdeckten sowie andere Gewebetypen untersucht (Herz, Leber, Niere, Gehirn). Auch hier wurden keine RAGE-Bestandteile gefunden⁹⁰. Um *ICAM-1/RAGE*-doppeldefiziente Mäuse zu erzeugen wurden *RAGE*^{-/-}-Mäuse mit *ICAM-1*^{-/-}-Tieren (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA, USA) entsprechend verpaart. Neben oben genannten Kontrollen der *RAGE*-Defizienz wurde in diesen Tieren auch die *ICAM-1*-Defizienz mittels PCR durchgeführt.

Die Zucht der o.g. Tiere und der Nachweis der *RAGE*-Defizienz wurden durch das Spenderlabor von Prof. Dr. Bierhaus durchgeführt (siehe auch Liliensiek et Al, JCI 2004).

2.2.10 Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurden die Software SPSS (SPSS 11.0.1., SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Gruppen wurden mit der einfaktoriellen ANOVA-Varianzanalyse getestet. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes wurde eine post hoc Analyse mittels Student-Newman-Keuls-Prozedur durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Histologischer Nachweis der RAGE-Expression nach Ischämie und Reperfusion

Zum Nachweis der raschen RAGE-Expression nach unserem Modell entsprechender Ischämie und Reperfusion in Wildtyp-Tieren wurden Versuchstiere einer Sham-Operation unterzogen. Im Vergleich dazu wurden WT-Tiere nach 20 Minuten kardialer Ischämie und anschließenden 15 Minuten Reperfusion untersucht. Zum Nachweis der RAGE-Expression wurde ein rot fluoreszierender RAGE-Antikörper verwendet (Santa Cruz SC-8231 goat anti-RAGE-Antikörper als primärer Antikörper, Santa Cruz donkey-anti-goat Rhodamin-Antikörper als sekundärer Antikörper, 1:200). Der primäre Antikörper wurde vor Induktion der Ischämie über die Schwanzvene injiziert (30µl pro Tier). Nach Ischämie und Reperfusion zeigt sich in der Fluoreszenzmikroskopie ein deutliches endotheliales Signal im postischämischen myokardialen Gewebe (Abb. 6b).

Rasche Expression von RAGE nach myokardialer Ischämie und

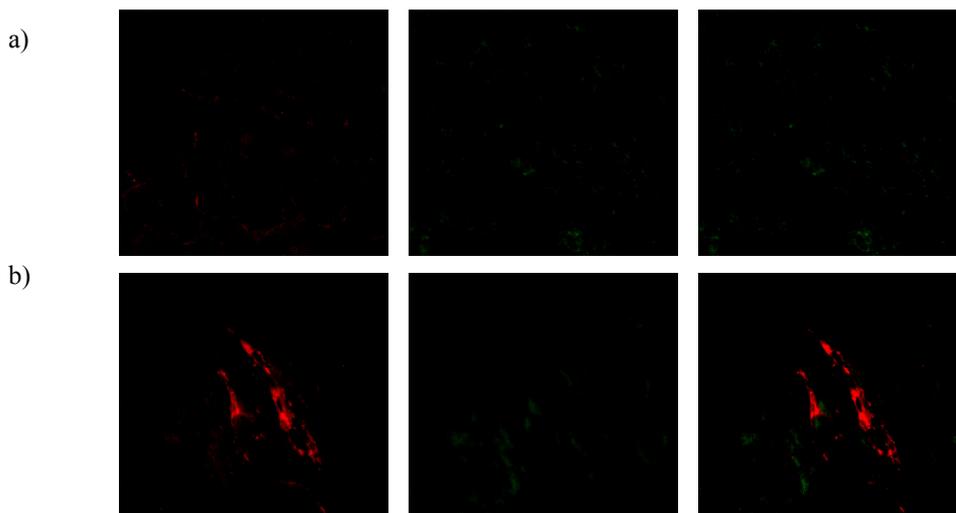


Abb. 6a und b: Systemische Injektion von 30µg RAGE-Antikörper (rote Fluoreszenz) über die Schwanzvene. Die Bilder zeigen Herzgewebe von Sham-operierten Tieren (a) ohne Nachweis von RAGE-Expression und Tieren nach 20min Ischämie und 15min Reperfusion (b). In der Ischämie zeigt sich ein deutliches Signal in den Gefäßen auf.

3.2 Ausschluss von Veränderungen des Blutbildes durch Deletion von ICAM-1 oder RAGE

Eine Veränderung des Blutbildes (z.B. vermehrte oder verringerte Produktion von Leukozyten) in *RAGE*^{-/-}, *ICAM-1*^{-/-} oder *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Mäusen wurde durch wiederholte Untersuchungen peripheren Blutes im Coulter Counter[®] ausgeschlossen. Es zeigten sich jeweils gleiche Zellzahlen für Leukozyten, Erythrozyten und Hämoglobinwerte. In Wildtyp-Tieren fanden sich $2,8 \cdot 10^3 \pm 0,2$ Leukozyten pro μL , in den verschiedenen von uns verwendeten Genotypen weichen die Leukozytenzahlen jeweils nur minimal von diesem Wert ab (siehe Tabelle 1).

Blutbildanalyse im Coulter Counter

	Wildtyp	<i>RAGE</i> ^{-/-}	<i>ICAM</i> ^{-/-}	<i>ICAM/RAGE</i> ^{-/-}
WBC	$2,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,6$
RBC	$7,5 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,9$
Hb	$12,7 \pm 0,1$	$12,5 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,5$	$11,7 \pm 0,8$
Plt	$55,3 \pm 4,5$	$70,6 \pm 6,4$	$70,6 \pm 4,2$	$36 \pm 8,0$

Tabelle 1: Leukozytenkonzentrationen in $10^3/\mu\text{L}$ gezählt im Coulter Counter in peripher-venösen Blutproben zeigen keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Genotypen.

3.3 Leukozytenrekrutierung in der Intravitalmikroskopie nach akuter myokardialer Ischämie

Zur Visualisierung der Leukozytenrekrutierung aus dem Blutkreislauf in ischämisches Myokardgewebe wurden die Versuchsorgane nach 20 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion explantiert. Vor Analyse erfolgte die retrograde Perfusion mit saliner Lösung, um noch im Gefäß befindliche nicht adhärenente Blutbestandteile auszuspülen. Anschließend wurden die Herzen intravitalmikroskopisch untersucht.

Abbildung 7 zeigt Beispiele von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus den unterschiedlichen Gruppen. In Abbildung 8 wurde die Leukozytenrekrutierung, gemessen in Leukozyten pro Gesichtsfeld, graphisch dargestellt.

Abb. 7a zeigt das ischämische Areal im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels eines sham-operierten Herzens. Hier stellt sich die fehlende Rekrutierung von Leukozyten bei fehlender Ischämie dar (Sham 3 ± 2 PMN/GF). Nach I/R kommt es in Wildtyp-Herzen zu einem deutlichen Anstieg der Leukozyten (62 ± 4 PMN/GF, Abb. 7b und Abb. 8).

In *ICAM-1*- (42 ± 15 PMN/GF) sowie in *RAGE*- (41 ± 10 PMN/GF) defizienten Tieren zeigt sich im postischämischen Myokard eine deutlich reduzierte Leukozytenzahl pro Gesichtsfeld im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abb.8).

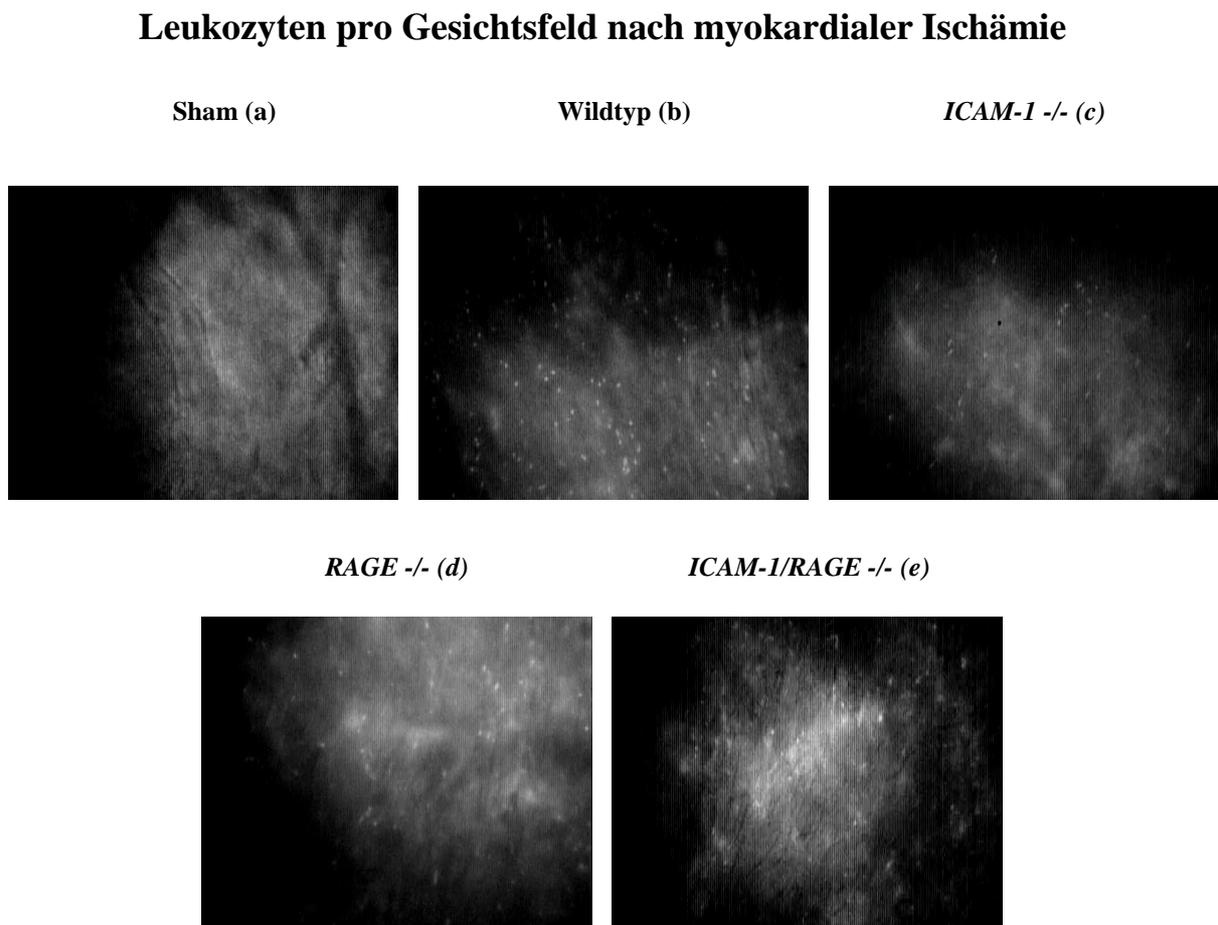


Abbildung 7: Intravitalmikroskopisch dargestelltes postischämisches Myokard, rekrutierte Leukozyten wurden mit Rhodamin-G 6 angefärbt. Sham-Operation (a), nach 20min I/R in WT (b), *ICAM-1* -/- (c), *RAGE* -/- (d) und *ICAM-1/RAGE* -/- Mäuse (e).

Die Kombination aus *ICAM-1*-/- und *RAGE* -/- in den Versuchstieren führte im Infarktareal zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Leukozytenzahlen (21 ± 12 PMN/GF) im Vergleich zu den vorherig genannten Genotypen sowie im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abb. 7 und 8).

Somit zeigt sich durch die doppelte Defizienz von *ICAM-1* und *RAGE* eine signifikante additive Reduktion der Leukozytenadhäsion.

Postischämische Leukozytenrekrutierung nach 20 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion

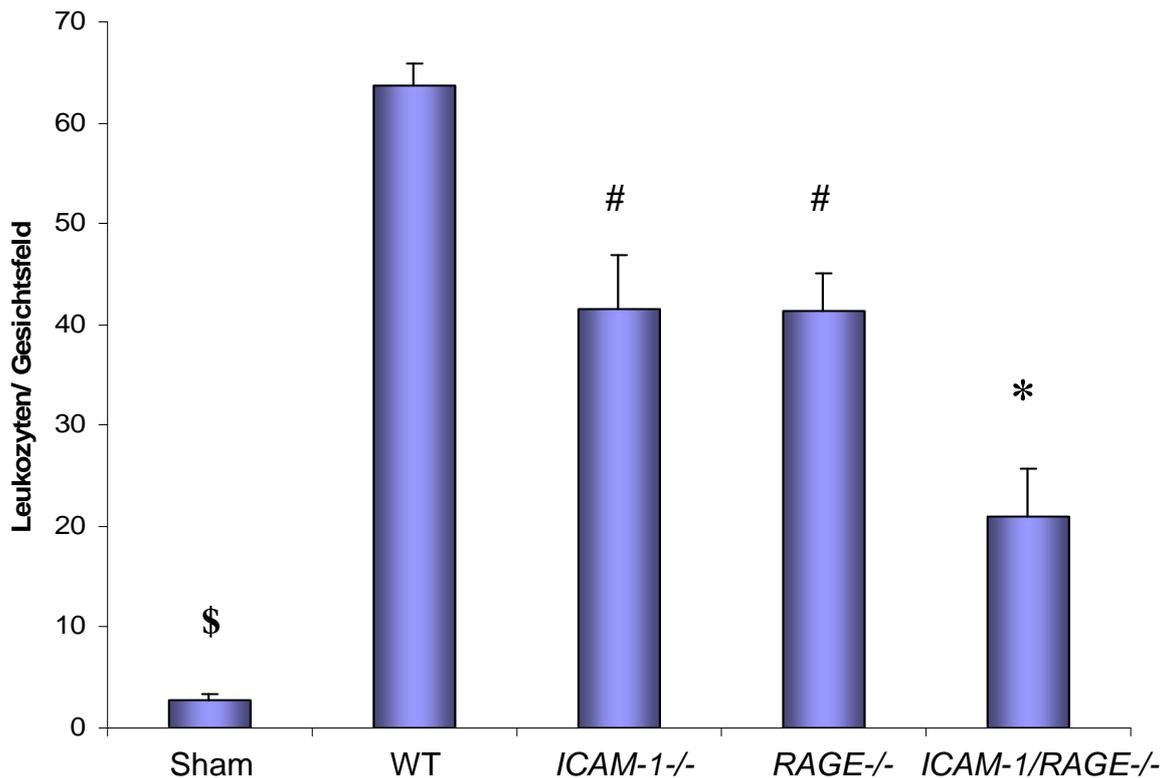


Abbildung 8: Leukozytenzahlen pro Gesichtsfeld im postischämischen Myokard. Sham-Operation (A), nach I/R in WT (B), *ICAM-1*^{-/-} (C), *RAGE*^{-/-} (D) und *ICAM-1/RAGE*^{-/-} Mäusen (E). (\$:p<0,05 vs. alle anderen Gruppen,; # p<0,05vs. WT; *p<0,05 vs. *ICAM1*^{-/-} und *RAGE*^{-/-}, n=6 pro Gruppe).

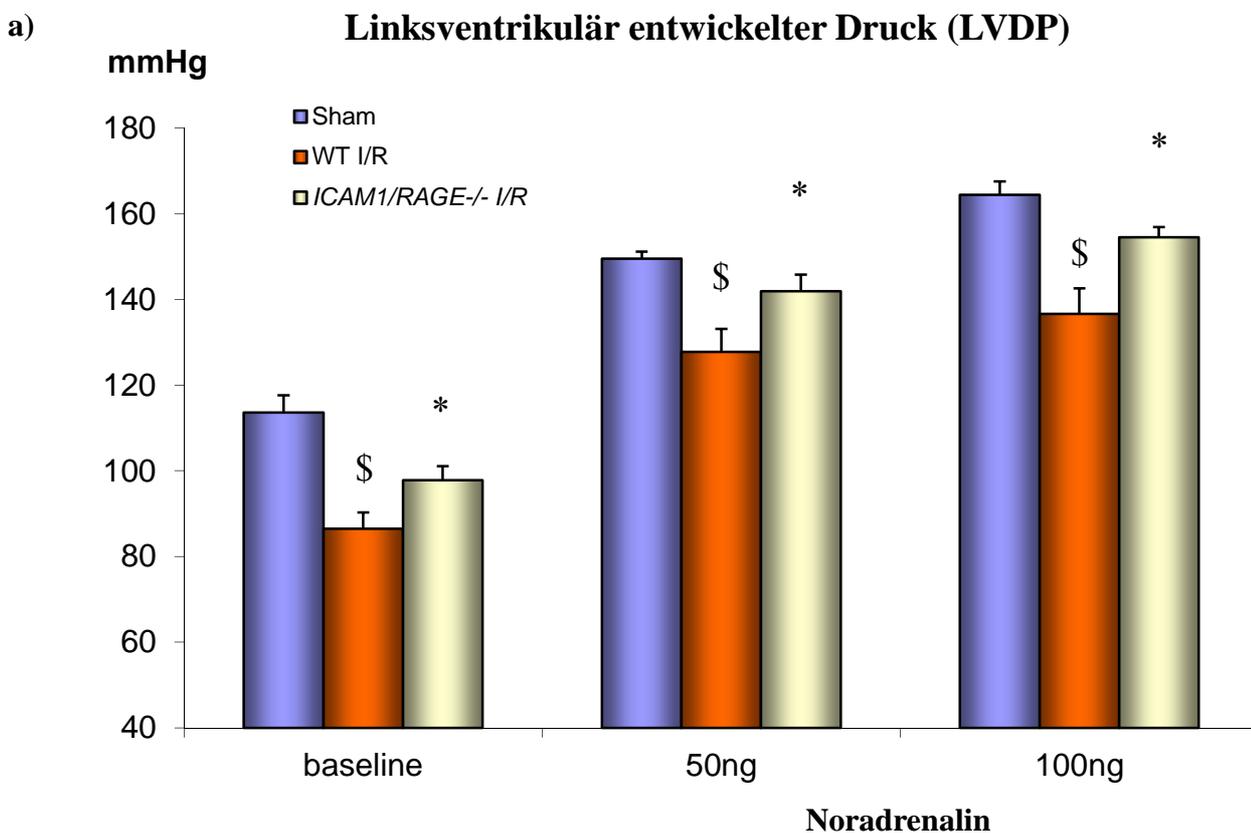
3.4 Einfluss der *ICAM-1/RAGE*-Defizienz auf die linksventrikuläre Pumpfunktion

Zur Untersuchung der Relevanz der verminderten Leukozytenrekrutierung in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Mäusen analysierten wir die Auswirkungen auf die postischämische myokardiale Funktion. Die Änderung des linksventrikulär entwickelten Druckes nach myokardialer Ischämie dient als funktioneller Parameter für die mögliche Auswirkung der fehlenden

RAGE- und ICAM-1-Expression. Die Messung der postischämischen LV-Pumpfunktion erfolgte 24 Stunden nach der 45-minütigen Reperfusionphase mittels Millar-Tip-Katheter.

Da die doppelte Defizienz von *ICAM-1* und *RAGE* den stärksten Einfluss auf die postischämische PMN-Rekrutierung in den Akutversuchen zeigte (s. Abb. 8), wurden zunächst Wildtyp-Tiere mit *ICAM-1/RAGE*-Tieren verglichen.

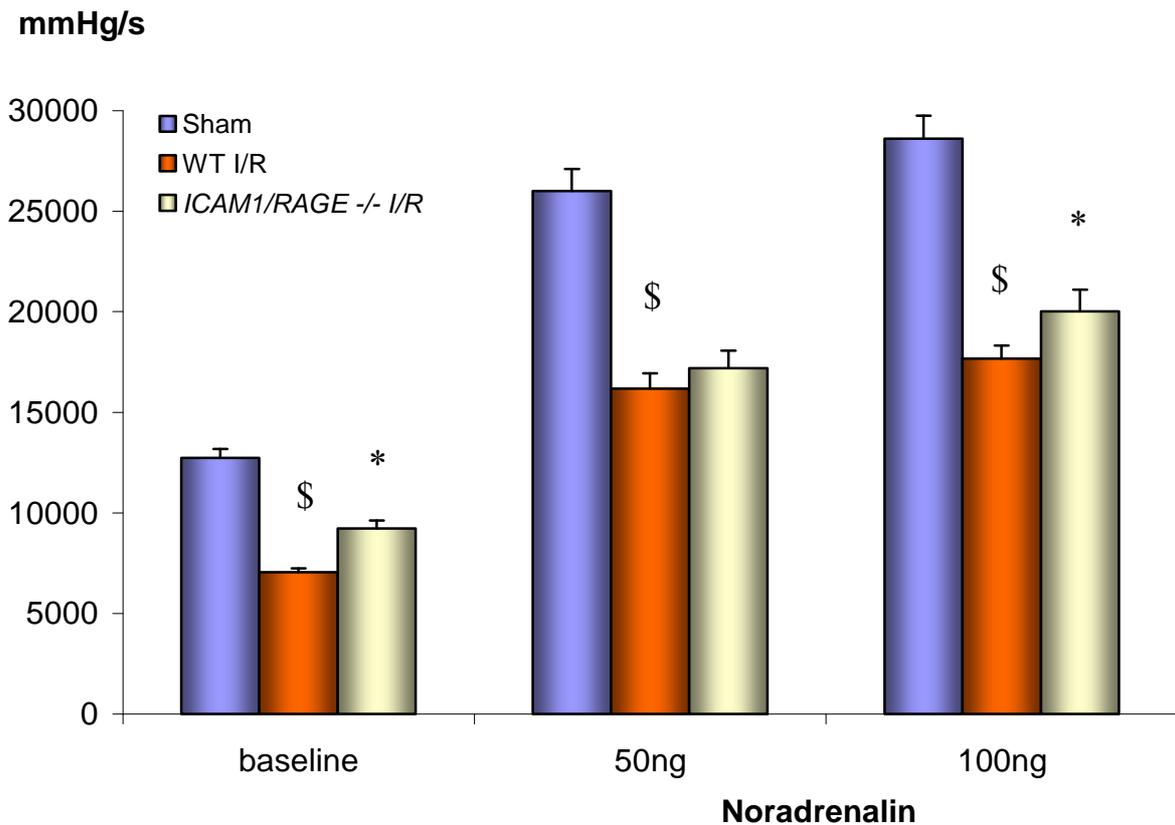
In diesen Versuchen zeigte sich, dass Herzen der WT-Tiere nach I/R (WT $86,4 \pm 3,8$ mmHg, Abb. 9a) einen deutlich niedrigeren linksventrikulären Druck entwickeln als sham-operierte Tiere (Sham: $113,6 \pm 4,1$ mmHg, Abb. 9a). Im Vergleich dazu können *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Herzen nach I/R einen signifikant höheren LV-Druck entwickeln (*ICAM-1/RAGE*^{-/-}: $97,8 \pm 3,8$ mmHg, Abb. 9a) als Wildtyp-Tiere. Es wurden zudem aufsteigende Dosen Noradrenalin über einen zentralvenösen Zugang verabreicht (50 bis 100 ng Noradrenalin als Bolus).



Kombinierte Defizienz von *ICAM-1* und *RAGE* verbessert die postischämische LV-Funktion

Abbildung 9a: Hämodynamische Messungen zeigen einen Verlust der postischämischen Funktion in WT-Tieren im Vergleich zu sham-operierten Tieren an (45min LAD-Okklusion, gefolgt von 24h Reperfusion). Kombinierte Defizienz von *ICAM-1* und *RAGE* reduziert diesen postischämischen Verlust des linksventrikulär entwickelten Druckes signifikant. ($p < 0.05$ vs. Sham, $*p < 0.05$ vs. WT-Kontrolle und Sham; $n = 6$ pro Gruppe).

b)



LV-Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max})

Abbildung 9b: Die Analyse des globalen Funktionsparameters dP/dt_{max} bestätigt die LVDP-Daten aus Abbildung 9a. ($\$p < 0.05$ vs. Sham, $*p < 0.05$ vs. WT-Kontrolle; $n=6$ pro Gruppe).

Unter dieser positiv inotropen Stimulation verhielt sich die LV-Pumpfunktion ähnlich den Baseline-Werten. Verglichen mit dem postischämischen Funktionsverlust der WT-Tiere (50ng Bolus: Sham $149,5 \pm 1,7$ mmHg vs. WT $127,7 \pm 5,4$ mmHg; 100ng Bolus: Sham $164,5 \pm 3,1$ mmHg vs. WT $136,6 \pm 6$ mmHg, Abb. 9a) zeigen die *ICAM-1/RAGE*^{-/-} Tiere einen signifikant besseren LVDP (*ICAM-1/RAGE*^{-/-} 50ng Bolus: $141,9 \pm 3,9$ mmHg; 100ng Bolus: $154,5 \pm 3,9$ mmHg, Abb. 9a).

Die Analyse des über die Zeit entwickelten Druckes (dP/dt_{max}) als Parameter für die Kontraktilität zeigt ebenfalls eine deutliche Verbesserung des postischämischen Funktionsverlustes der *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tiere unter Ruhebedingungen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Sham: 12750 ± 431 mmHg/s; WT-I/R: 7055 ± 182 mmHg/s; *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-I/R: 9218 ± 403 mmHg/s, Abb.9b). Nach kardialer Belastung, simuliert durch Noradrenalin-Gabe bleibt dieser Unterschied bestehen (50ng Bolus: Sham 25986 ± 1106 mmHg/s, WT: 16710 ± 769 mmHg/s, *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-I/R: 17182 ± 887 mmHg/s;

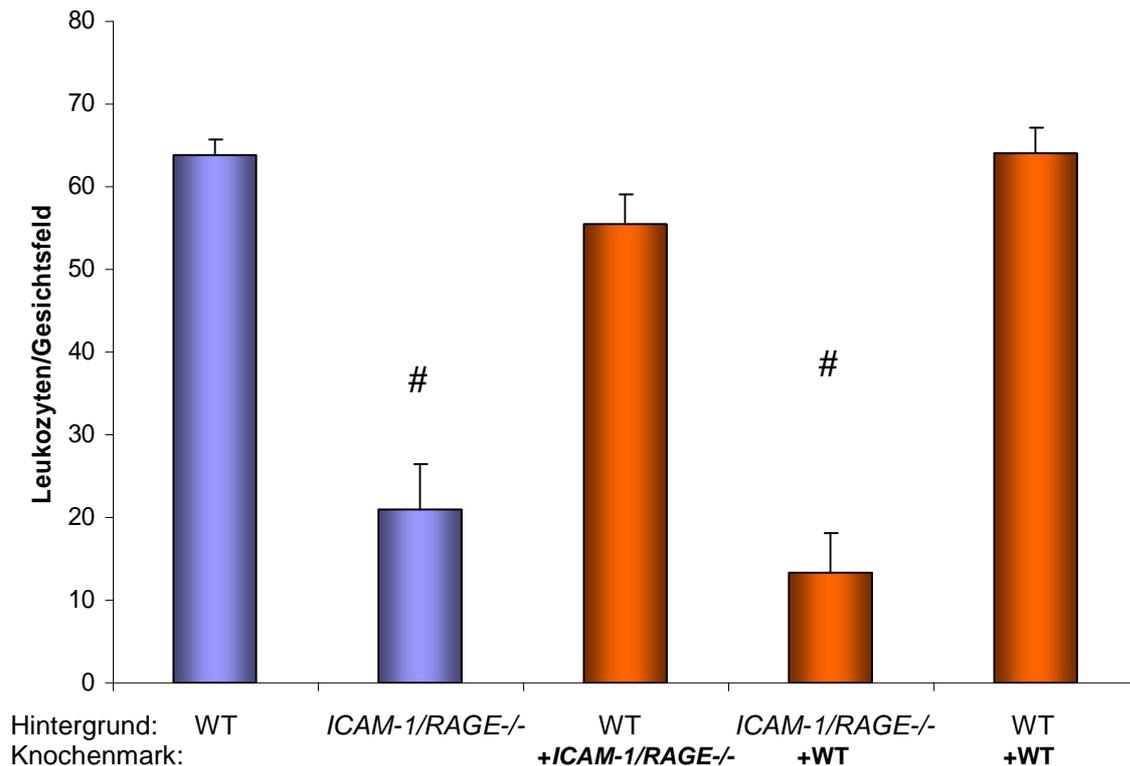
100ng Bolus: Sham: 25891±1162mmHg/s, WT-I/R: 17664±639, *ICAM-1/RAGE-I/R*: 20008±1092mmHg/s, Abb. 9b).

3.5 Endotheliales RAGE ist essentiell für die postischämische PMN-Rekrutierung

Zur Differenzierung zwischen dem Effekt von endothelialelem und leukozytärem RAGE verwendeten wir Knochenmarkschimären für unser Ischämie/Reperusionsmodell. Es wurde Wildtypieren Knochenmark aus *ICAM-1/RAGE*^{-/-} - defizienten Tieren transplantiert sowie *ICAM-1/RAGE*^{-/-} -defizienten Tieren Knochenmark aus Wildtypieren. Somit erreichten wir dass in ersteren Tieren endotheliales RAGE exprimiert wird, Leukozyten jedoch RAGE-defizient sind. In letzteren Tieren wird kein endotheliales RAGE exprimiert, während die Leukozyten RAGE produzieren können. Da ICAM-1 bekanntermaßen die Leukozytenadhäsion beeinflusst (s. Abb 8), wurden bewusst *ICAM-1/RAGE*-doppeldefiziente Tiere verwendet. Bei isolierter *RAGE*-Defizienz wäre eine Maskierung des Effektes durch ICAM-1 zu befürchten. In der Verwendung des transplantierten Knochenmarks spielt *ICAM-1*-Defizienz keine Rolle, da ICAM-1 auf Leukozyten keine relevante Funktion ausübt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse denen Knochenmark von Wildtypmäusen transplantiert wurde.

In Abbildung 10 sind zunächst die bereits erwähnten Daten zu den nicht transplantierten Wildtyp- und *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Tieren aus Abschnitt 3.5 zum Vergleich eingefügt worden (blaue Balken).

Die Analyse der Leukozytenrekrutierung der Knochenmarkschimären zeigte bei Tieren mit RAGE-defizienten Leukozyten (WT-Tiere mit *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-KM 55±6PMN/GF, Abb. 10) keinen signifikanten Unterschied zu unbehandelten Wildtypieren nach I/R (WT: 67±2 PMN/GF, Abb. 10). Bei *ICAM-1/RAGE*^{-/-} Tieren, denen endotheliales RAGE fehlt, kam es nach Transplantation von WT-Knochenmark zu einer deutlich reduzierten Leukozytenadhäsion (*ICAM-1/RAGE*^{-/-}+WT-KM: 13±5 PMN/GF, Abb. 10), vergleichbar mit unbehandelten *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Versuchstieren nach I/R (*ICAM-1/RAGE*^{-/-}: 21±12 PMN/GF, Abb. 10). Die zur Kontrolle behandelten Wildtypiere, welche Wildtyp-Knochenmark erhielten zeigten nach Ischämie und Reperfusion ähnliche Werte wie unbehandelte I/R-Wildtyp-Tiere (WT+WT-KM:64±2 PMN/GF, Abb. 10).



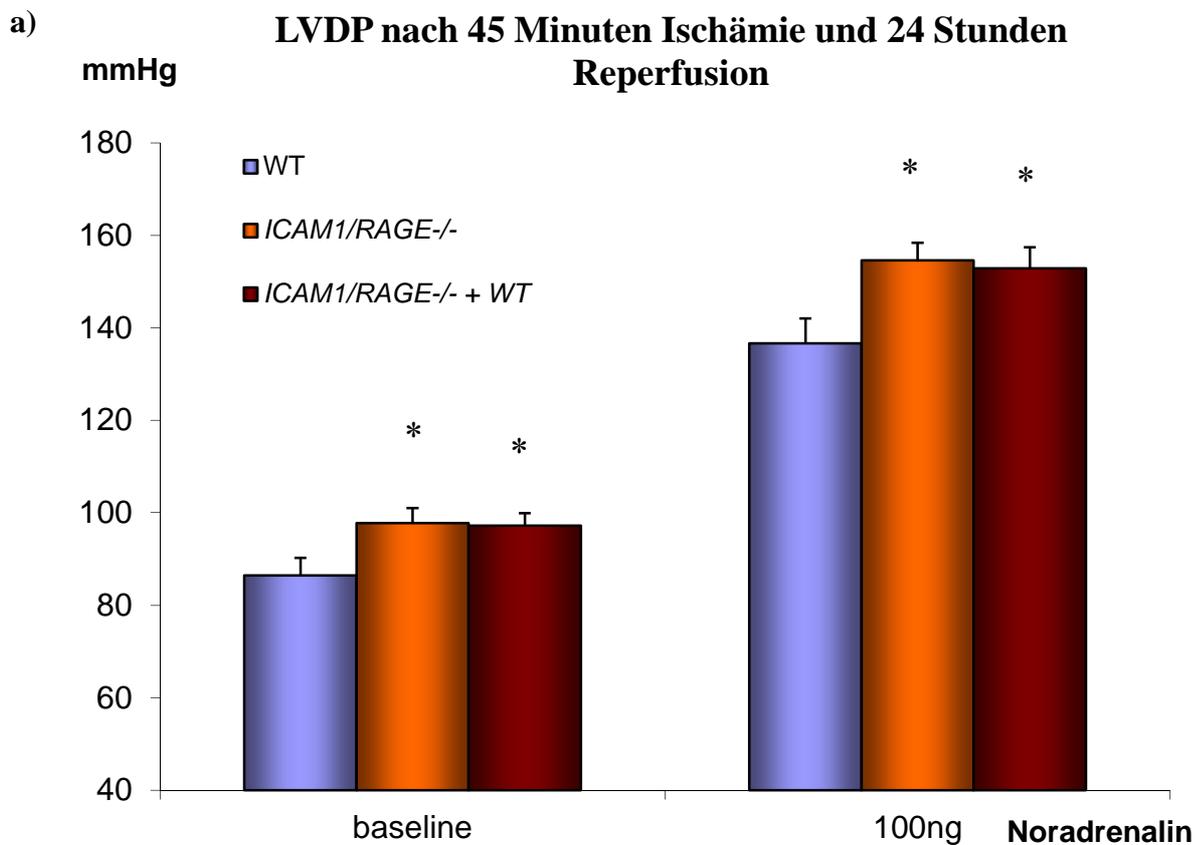
Leukozytenrekrutierung nach myokardialer Ischämie und Reperfusion in Knochenmarks-Chimären

Abbildung 10: Nach Knochenmarktransplantation zeigt sich in *ICAM-1/RAGE*^{-/-} Tieren mit WT-KM (ausschließlich leukozytäres RAGE) eine deutliche Reduktion der Leukozytenzahlen. Bei WT-Tieren zeigt sich nach Transplantation von *ICAM-1/RAGE*^{-/-} Knochenmark nur eine minimale, nicht signifikante Reduktion der Leukozytenzahlen. (#*p* < 0,05 vs. WT-Hintergrund; n= 6 pro Gruppe).

In den oben genannten Versuchen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Leukozytenrekrutierung in den Tieren, denen endotheliales ICAM-1 und RAGE fehlt. Diese Reduktion war unabhängig vom leukozytären RAGE, wie die Versuche mit den Knochenmarkchimären zeigten. Somit können wir schlussfolgern, dass endotheliales, nicht jedoch leukozytäres RAGE zur postischämischen Leukozytenrekrutierung beiträgt.

3.6 Die Defizienz von ICAM-1 und endothelialem RAGE führt zu einer Verbesserung der postischämischen linksventrikulären Pumpfunktion

Zur Beurteilung der funktionellen Relevanz dieser Ergebnisse wurde auch bei den Knochenmarkschimären die linksventrikuläre Pumpfunktion wie bereits erwähnt mittels Drucksensor im linken Ventrikel gemessen.



Linksventrikuläre Pumpfunktion (LVDP) und die globale Kontraktilität (dP/dt_{max}) nach Knochenmarkstransplantation

Abb. 11a: Hämodynamische Messungen zeigen eine deutliche Besserung der postischämischen Funktion in Abwesenheit von ICAM-1 und endothelialem RAGE. Der LVDP ist in *ICAM-1/RAGE-/-*+WT-KM-Chimären unter Ruhebedingungen und zumindest teilweise auch nach Stimulation signifikant verbessert im Vergleich zu den WT-Tieren (* $p < 0,05$ vs. WT, $n = 6$ pro Gruppe).

Wie schon in Abschnitt 3.4 beschrieben kommt es zu einer Verbesserung der postischämischen linksventrikulären Funktion in den *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren schon unter Ruhebedingungen (LVDP: *ICAM-1/RAGE*^{-/-}: 97,8±3,8mmHg vs WT: 86,4±3,8mmHg, Abb 11a). Die *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tiere, welchen Wildtyp-Knochenmark transplantiert wurde, zeigten eine vergleichbare Verbesserung des linksventrikulär entwickelten Druckes nach Ischämie und Reperfusion wie die *ICAM-1/RAGE*^{-/-}-Tiere mit nativen Knochenmark (LVDP: *ICAM-1/RAGE*^{-/-}+WT-KM: 97,2±2,7mmHg, Abb. 11a). Diese Verbesserung des LVDP war ebenfalls signifikant verbessert im Vergleich zu den WT-Tieren nach I/R.

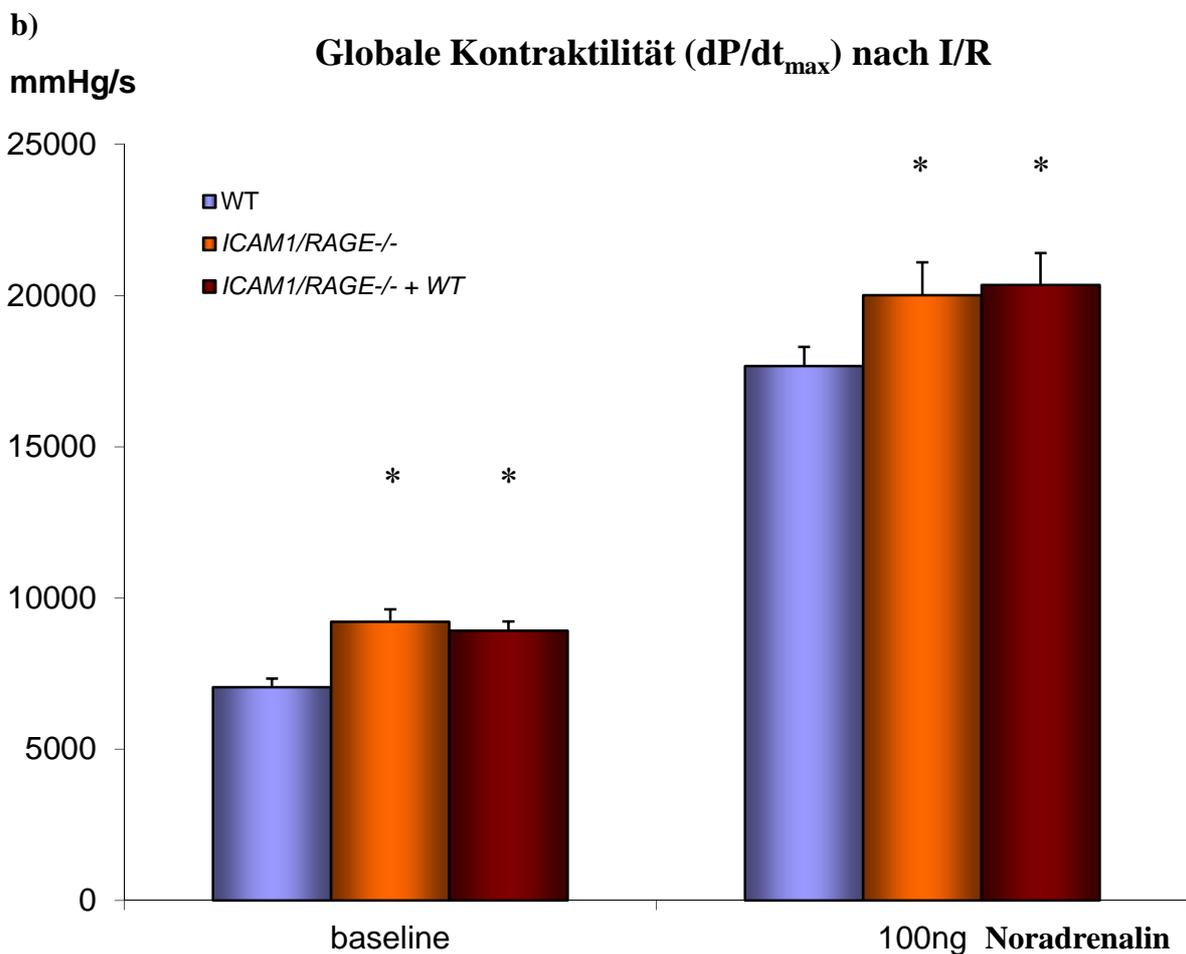


Abbildung 11b: Auch die globale Kontraktilität dp/dt_{max} ist in *ICAM-1/RAGE*^{-/-}+WT-KM-Chimären unter Ruhebedingungen und nach Stimulation signifikant verbessert im Vergleich zu den WT-Tieren (* $p < 0,05$ vs. WT, $n=6$ pro Gruppe).

Ähnliche Ergebnisse zeigt die Auswertung des globalen Kontraktilitätsparameters dP/dt_{\max} (Abb. 11b). Hier zeigen sich sowohl unter Ruhebedingungen (WT: 7055 ± 182 mmHg/s vs. *ICAM-1/RAGE*^{-/+}WT-KM-I/R: 8919 ± 391 mmHg/s, Abb. 11b), als auch nach Stimulation mit 100ng NA eine deutliche Verminderung des postischämischen Funktionsverlustes in den KM-Chimären mit endothelialer *RAGE*-Defizienz (100ng Bolus: WT: 17664 ± 639 VS: *ICAM-1/RAGE*^{-/*wt-mk}: 20346 ± 1060 mmHg/s, Abb. 11b).

Es zeigt sich, dass die Deletion von *ICAM-1* und *RAGE* zu einer verminderten postischämischen Leukozytenadhäsion nach akuter Ischämie und Reperfusion führt, somit scheint sich diese reduzierte Leukozytenrekrutierung positiv auf den postischämischen Funktionsverlust auszuwirken.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die postischämische Interaktion von RAGE und Leukozyten sowie deren funktionelle Relevanz in einem Mausmodell analysiert. In *RAGE*- oder *ICAM-1*-defizienten Tieren kam es nach 20 Minuten Ischämie gefolgt von 15 Minuten Reperfusion zu einer gleichwertigen Verminderung der postischämischen Leukozytenrekrutierung (Abb. 8) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. In *ICAM-1/RAGE*-doppeldefizienten Tieren kam es zu einer additiven Reduktion der postischämischen Leukozytenrekrutierung. Ebenso zeigten *RAGE/ICAM-1*-/-Tiere eine verbesserte postischämische LV-Funktion im Vergleich zu WT-Kontrollen nach 45 Minuten myokardialer Ischämie und 24 Stunden Reperfusion.

Um zwischen endothelial und leukozytär exprimiertem RAGE zu differenzieren, wurden Knochenmark-Chimären mit WT und *ICAM-1/RAGE*-/- Tieren generiert. In Wildtyp-Tieren mit *ICAM-1/RAGE*-defizientem Knochenmark zeigte sich eine ähnlich ausgeprägte postischämische Leukozytenrekrutierung verglichen mit den WT-Kontrollen. Interessanterweise führte das Fehlen des endothelialen RAGE in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren mit WT-Knochenmark zu einer signifikanten Reduktion der postischämischen Leukozytenrekrutierung. Gleichzeitig zeigte sich die postischämische LV-Funktion in den Knochenmark-Chimären mit *ICAM-1/RAGE*-/-Hintergrund und WT-Knochenmark eine verbesserte postischämische LV-Funktion im Vergleich zu den WT-Kontrollen.

4.1 Experimentelle Modelle akuter Myokardischämie an der Maus

In den vorgestellten Untersuchungen wurde für die Analyse des postischämischen Myokardschadens ein in vivo Mausmodell gewählt. Dieses Modell weist Unterschiede zu humanpathologischen Vorgängen auf, bietet jedoch auch offensichtliche Vorteile. Der Versuchsaufbau zur Induktion einer akuten myokardialen Ischämie in vivo ist in der Literatur bereits beschrieben und etabliert⁹¹.

Das verwendete akute Tiermodell erlaubt es, unterschiedliche zelluläre Komponenten der akuten Myokardischämie, im speziellen Fall jedoch Leukozyten, mittels Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und so deren Beitrag zum Ischämie/Reperfusionsschaden unter Berücksichtigung der makrohämodynamischen Parameter zu beurteilen. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse der postischämischen

Adhäsionsmechanismen in vivo ist der Mausorganismus aufgrund geringer Organgröße gut geeignet.

Die Tatsache, dass speziell das Genom des C57/BL6-Stammes bereits in internationaler Zusammenarbeit sequenziert und analysiert wurde, und dadurch die genetische Deletion und der Austausch endogener Gene möglich wurde, trug entscheidend zur Speziesauswahl bei. So ließ die Verwendung verschiedener gentechnisch veränderter Tierstämme Rückschlüsse auf die Relevanz einzelner genetischer Komponenten vor allem der Leukozytenadhäsion zu.

Zur Analyse der Adhäsionsmechanismen wurde ein in vivo Modell gewählt, da nur hier die Komplexität aller Blut- und Endothelbestandteile sowie physikalische Gegebenheiten die größtmögliche Berücksichtigung finden. Weiterhin erlaubt dieses in vivo Modell die Erhebung funktioneller Daten durch kathetergestützte Druckmessungen im linken Ventrikel. Neben diesen Vorteilen bietet das Mausmodell die bekannten allgemeinen Vorzüge wie standardisierte Haltungsbedingungen, kurze Generationszeiten und die Möglichkeit große Kohorten zu züchten.

Als Nachteil erweist sich die invasive Präparationsmethode, welche durch die hierbei in Gang gesetzten Gerinnungsprozesse und das Freisetzen inflammatorischer Signalstoffe starke Störfaktoren generieren.

Um durch die Präparation entstandene Einflüsse auf die Leukozytenadhäsion zu beurteilen, wurden sogenannte sham-operierte Gruppen eingefügt und analysiert, welche die Narkose sowie die Operationsprozedur durchliefen, jedoch ohne Okklusion des Koronargefäßes, damit ohne Myokardischämie.

Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Beurteilbarkeit chronischer Veränderungen am Myokard, weshalb wir neben dem Akutversuch auch Untersuchungen zu chronisch – ischämischen Läsionen durchführten. Hierdurch konnten wir Funktionsdaten auch 24 Stunden nach akuter Myokardischämie gewinnen, um subakute Veränderungen zu analysieren.

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopie des Myokards nach Ischämie und Reperfusion

Im Anschluss an die in vivo Experimente wurden die explantierten Herzen ex vivo fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die hohe physiologische Herzfrequenz der Tiere (350-500/min) macht es bisher unmöglich, intravitalmikroskopische Analysen am schlagenden Herzen durchzuführen. Daher ist dieser Nachteil als systemimmanent anzusehen. Eine

intravitalmikroskopische Analyse des schlagenden Herzens mit auf dem Myokard befestigter Optik ist bisher nur am Großtiermodell beschrieben⁹². Da die entsprechenden genetisch veränderten Tiere nicht verfügbar sind, griffen wir für unsere Fragestellung auf das oben beschriebene Modell zurück.

4.1.2 Einfluss der chirurgischen Präparation

Im Rahmen der mikrochirurgischen Präparation werden bereits vor Ischämie und Reperfusion Gerinnungsprozesse sowie eine inflammatorischen Reaktion in Gang gesetzt, welche einen großen Störfaktor darstellen. Um diese kleinstmöglich zu halten wurde auf minimale Traumatisierung, möglichst geringen Blutverlust und zügige Präparation geachtet. Auch die unphysiologische künstliche Beatmung sowie die Narkose der Tiere ist als systemimmanente Fehlerquelle anzusehen. Um den Einfluss dieser unvermeidlichen Bestandteile des Modells zu erfassen wurden Sham-Kontrollgruppen analysiert. Ein Versuchsmodell zur Umgehung des Einflusses der Präparation auf die myokardiale Ischämie lieferte Mark Entman et al., dessen Versuchsanordnung vorsah, nach der Präparation und Umschlingung der LAD die losen Enden der Ligatur nach Verschluss der Thorakotomiewunde unter der Haut zu belassen. Nach Abschluss der Wundheilung hat man durch einen Hautschnitt erneut Zugang zu den Ligaturnähten und kann diese elektiv okkludieren und eine Myokardischämie auslösen⁹³. Da auch diese Methode nicht völlig ohne Störfaktoren durchzuführen ist (Narkose, alter Myokardschaden durch vorpräparierte LAD) entschieden wir uns für oben genanntes Maus-Modell.

4.2 Einfluss von RAGE auf die postischämische

Leukozytenrekrutierung

In verschiedenen Tierversuchen, aber auch klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte Leukozytenrekrutierung mit dem myokardialen Reperfusionsschaden korreliert⁹⁴⁻⁹⁷.

In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass nach genetischem Knock-out von ICAM-1 die Leukozytenadhäsion im ischämischen Myokard deutlich verringert ist. Ein ähnlicher Effekt liess sich durch den Knock-out von P-Selektin erreichen. In doppel-knock-out Tieren, also Tieren, die weder ICAM-1 noch P-Selektin exprimieren, verringert sich die Anzahl

adhärenter Leukozyten schließlich noch weiter⁹¹. Es bleibt jedoch stets eine Restadhäsion leukozytärer Zellen, was auf die Existenz weiterer Mechanismen schließen lässt, welche die Leukozytenrekrutierung vermitteln. Z. B. ist in *ICAM-1/P-Selektin*-defizienten Mäusen eine Thrombozyten-vermittelte Leukozytenrekrutierung beschrieben⁹¹. Ein alternativer Mechanismus könnte eine RAGE-vermittelte Leukozytenrekrutierung sein.

4.2.1 RAGE als Adhäsionsmolekül

RAGE wurde als wichtiges Adhäsionsmolekül für Leukozyten bereits mehrfach als Ligand für Mac-1 identifiziert, sowohl im inflammatorisch als auch traumatisch geschädigtem Gewebe^{84, 85}. Daher versuchten wir, die Adhäsion durch RAGE von der ICAM-1-abhängigen Funktion zu differenzieren.

Es ist beschrieben, dass ICAM-1 über die von Leukozyten exprimierte Beta-Integrine LFA-1 und Mac-1 in überlappender Funktion die feste Leukozytenadhäsion *in vivo* vermitteln⁹⁸⁻¹⁰⁰. In den von uns durchgeführten intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich eine signifikant reduzierte Leukozytenrekrutierung nach akuter myokardialer Ischämie in *ICAM-1*-defizienten Mäusen (Abb. 8). Auch in *RAGE*-defizienten Tieren zeigte sich eine vergleichbare, signifikante Reduktion der adhärenen Leukozyten (Abb. 8).

Die Kombination von *ICAM-1*- und *RAGE*-Defizienz zeigt nicht nur im Vergleich zur Wildtypgruppe, sondern auch im Vergleich zu den Single-Knockout-Tieren eine additive Reduktion der Leukozytenrekrutierung pro Gesichtsfeld (Abb.8).

Einhergehend mit unseren Befunden im postischämischen Myokard zeigte sich in einem Cremaster-Modell der trauma-induzierten Inflammation ebenfalls eine massive Reduktion adhäsiver Leukozyten in Absenz von ICAM-1 und RAGE⁸⁶. Im Unterschied zu unserem Modell führte eine einfache Deletion von ICAM-1 oder RAGE im trauma-induzierten Cremastermodell nicht zu relevanten Veränderungen der Leukozytenadhäsion⁸⁶, was zum einen an dem unterschiedlichen inflammatorischen Stimulus und zum anderen an den verschiedenen Flussverhältnissen liegen kann.

Daraus lässt sich schließen, dass bei akuter myokardialer Ischämie RAGE und ICAM-1 in redundanter Weise die Leukozytenrekrutierung steigern. Eine RAGE-Defizienz führt demzufolge, wie in oben genanntem Traumamodell, zu einer verringerten Leukozytenadhäsion. Die additive Reduktion der Leukozytenrekrutierung in *ICAM-1/RAGE*-/- -

Herzen ist ein Hinweis auf einen redundanten postischämischen Adhäsionsmechanismus zur bisher beschriebenen P-Selektin/ICAM-1-Achse.

Auch am Tiermodell der Thioglycollat-Peritonitis war die Leukozytenrekrutierung signifikant verringert in *RAGE*-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren. In vitro war *RAGE*-abhängige Leukozytenadhäsion an endotheliale Zellen von einer direkten Interaktion zwischen *RAGE* und sowohl dem Beta-2-Integrin Mac-1 als auch zu geringerem Anteil mit p150/95 vermittelt. LFA-1 und Beta-1-Integrine spielten bei dieser Interaktion keine Rolle^{71, 86}.

Andererseits interagiert das Beta-Integrin ICAM-1 überwiegend als Ligand für LFA-1¹⁰⁰, während die Interaktion von ICAM-1 und Mac-1 eine untergeordnete Rolle für die Adhäsion von Leukozyten über ICAM-1 spielt⁹⁸.

4.3 Postischämische linksventrikuläre Funktion in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Herzen

Es ist bereits beschrieben worden, dass die Deletion des *RAGE*-Genes bei Mäusen einen Einfluss auf die linksventrikuläre Pumpfunktion hat. Aleshin et al. konnten anhand eines Mausmodells zeigen, dass *RAGE*^{-/-}-defiziente Tiere nach myokardialer Ischämie und Reperfusion eine verbesserte echokardiografisch gemessene Ejektionsfraktion (EF) aufweisen als Wildtyp-Tiere. Zudem konnte anhand von TUNEL-Färbungen eine verminderte Apoptoserate und mittels Western blots eine erniedrigte Aktivität von Cytochrom C und Caspase-3 nachgewiesen werden¹⁰¹. Diese Versuche, insbesondere der mögliche Einfluss von *RAGE* auf die Caspase-3 könnten auf einen Zusammenhang mit mitochondrialen Apoptose-Signalwegen hinweisen.

In einer weiteren Versuchsreihe konnten Bucciarelli et al. zeigen, dass in Rattenherzen die *RAGE*-Expression nach Ischämie deutlich ansteigt. Auch hier wurden myokardiale Funktionsdaten erhoben, allerdings am isoliert perfundierten Herzen. Die gemessenen Werte für LVDP, LVEDP und koronaren Perfusionsdruck sind für *RAGE*^{-/-}-Tiere deutlich höher als für Wildtyp-Kontrollen. Die Aktivierung der *RAGE*-Achse wurde hier in Verbindung gebracht mit dem Anstieg des NO-, cGMP- und Nitrotyrosingehalts, sowie der erhöhten Expression der induzierbaren NO-Synthetase¹⁰².

Einhergehend mit diesen Daten zeigte sich in unseren Versuchen nach 45 Minuten LAD-Okklusion in vivo nach 24 Stunden eine deutliche Verbesserung der postischämischen

linksventrikulären Pumpfunktion in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (s. Abb. 9a und 9b). Gleichzeitig war in der frühen postischämischen Reperfusion eine deutliche Reduktion der Leukozytenrekrutierung vor allem in den *ICAM-1/RAGE*-doppelfizienten Tieren nachweisbar (Abb. 8, Abb. 10). Wie schon in unserer und von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, ist die frühe postischämische Leukozytenrekrutierung für die Ausprägung des postischämischen Funktionsverlust entscheidend^{91, 96, 97}.

Somit scheinen die benefiziellen Effekte der reduzierten Leukozytenadhäsion sowie möglicherweise zusätzlich der Einfluss von RAGE auf die Caspase-3 und die Erhöhung der NO-Synthetase zur Reduktion des postischämischen Funktionsverlustes beitragen, wobei letzteres in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde.

4.4 Endotheliale versus leukozytäre RAGE-Expression

Neben der endothelialen RAGE-Expression wurde RAGE unter anderem auf neutrophilen Granulozyten beschrieben^{52, 85, 103}. Um die These der Interaktion zwischen endotheliale RAGE und leukozytärem Mac-1 zu festigen, wurden Chimären generiert, die entweder defizient für endotheliales oder leukozytäres RAGE waren. Während WT-Tiere mit *RAGE*-defizienten Leukozyten keine Unterschiede in der postischämischen Leukozytenrekrutierung zeigten, war diese in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren mit WT-Knochenmark, in denen nur das endotheliale RAGE deletiert ist, fast vollständig depletiert (siehe Abbildung 10).

Ähnliche Befunde konnten Frommhold et al in vivo im trauma-induzierten Cremastermodell der Maus zeigen. In der gleichen Arbeit zeigten in vitro Versuche mit immobilisiertem RAGE eine starke Adhäsion mit murinen und humanen Leukozyten, die abhängig war von Mac-1, nicht jedoch von LFA-1⁸⁶.

In der Analyse der postischämischen linksventrikulären Funktion zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der linksventrikulären Funktion in den *ICAM-1/RAGE*-Chimären mit WT-Knochenmark im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Sowohl in den Adhäsionsanalysen (siehe Punkt 3.5), als auch in den Funktionsmessungen (s. Punkt 3.6) waren die Verbesserungen in den *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren am stärksten ausgeprägt, unabhängig von der Expression des leukozytären RAGE.

4.5 RAGE induzierte Signaltransduktion

Es ist gezeigt worden, dass die leukozytäre frühe Rekrutierung in der Reperusionsphase zu dem postischämischen Funktionsverlust beiträgt⁹⁶. In Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und auch von anderen wurde gezeigt, dass die Leukozytenrekrutierung mit einer verminderten linksventrikulären Funktion korreliert⁹⁵⁻⁹⁷.

Eine Ursache für die verbesserte Funktion könnte in der verminderten Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren sein. Neben der direkten Leukozytenadhäsion ist die Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen durch RAGE beschrieben worden. Mögliche Mechanismen über welche RAGE zu schädigenden Wirkungen führt sind im JNK- und STAT5-Signalübertragungsweg zu finden^{101, 104}. Zudem wurde in Western blot Analysen eine Verringerung der JNK- und STAT5-Phosphorylierung in *RAGE*-defizienten Tieren nachgewiesen. Im Gegensatz dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression von STAT3 und phosphoSTAT3¹⁰¹. Auch im Rattenmodell wurde nach LAD-Okklusion eine Phosphorylierung von JAK2, STAT1, STAT3, STAT5a und STAT6 beobachtet, sogar bereits fünf Minuten nach Infarkt. Dabei blieben STAT1, STAT3 und STAT5a bis zu sieben Tage nach Ischämie aktiviert¹⁰⁴.

Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs wurde bereits mehrfach mit einer postischämischen Dysfunktion assoziiert^{104, 105}. Auch wenn WT-Mäusen lösliches RAGE (sRAGE, soluble RAGE), ein ligandenbindendes Agens, injiziert wurde, reduzierte sich die Infarktgröße ebenfalls signifikant, vergleichbar mit der Infarktreduktion in *RAGE*-defizienten Mäusen, was auf den Einfluss der Ligandenbindung auf den RAGE-abhängigem Ischämieschaden hinweist. Die Cytochrom C –Freisetzung ins Zytosol war in *sRAGE*-Mäusen ebenfalls deutlich reduziert, so dass sRAGE vermutlich protektiv im ischämischen Mauserzen wirkt¹⁰¹.

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass nicht-enzymatisch glykolierte Proteine selbst reaktive Sauerstoffzwischenstufen generieren können^{90, 102, 106}. Das Vorhandensein von AGEs nahe der Zellmembranen und deren darauffolgende Internalisation scheint damit eine Umgebung zu erschaffen, die oxidativen Stress fördert. Im extrazellulären Raum könnte die Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies eine Erklärung für die beobachtete Tilgung von Stickoxid sein¹⁰¹. In *in vitro* Versuchen zeigte sich zudem, dass nach Stimulation mit AGEs endotheliale Zellen vermehrt Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen bildeten, Häm-Oxygenase mRNA induziert und der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert wurde^{101, 106}. In entsprechenden *in vivo* Untersuchungen an Mäusen, denen AGEs

verabreicht wurden, fanden sich konkordante Hinweise für vermehrten oxidativen Stress im Vergleich zu Kontrolltieren denen Albumin injiziert wurde.

Neben den durch AGEs geschaffenen reaktiven Sauerstoff-Intermediären scheint die NF- κ B-Aktivierung eines wichtigsten Faktors für die Aufrechterhaltung der RAGE-abhängigen chronisch-inflammatorischen Reaktion zu sein. In ruhenden Zellen befindet sich NF- κ B an sein Inhibitor-molekül I κ B α gebunden, somit in inaktiver Form, im Zytoplasma. Nach Aktivierung wird I κ B α rasch phosphoryliert und degradiert, was zur Freisetzung und Translokation von NF- κ B in den Nukleus führt. Daraus resultierend bindet NF- κ B an entsprechende Stellen der DNA und leitet die Transkription von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, prothrombotischen und vasokonstriktiven Genprodukten, RAGE selbst und I κ B α ein. Damit stellt die NF- κ B-Aktivierung eine sofortige und sensitive Zellantwort, die das zelluläre Überleben durch eine verstärkte Inflammation negativ beeinflusst. Es konnte bereits in vorangehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Antagonisierung von NF- κ B mittels eines Decoys in Kombination mit der Gabe eines CD18-Antikörpers zu einer Reduktion der Infarktgröße führt⁹⁵.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse schlussfolgern wir, dass die Interaktion von endotheliale RAGE und dem leukozytären Beta-2-Integrin Mac-1 als redundanter Mechanismus für Leukozytenrekrutierung nach myokardialer Ischämie und Reperfusion besteht. Im klinischen Kontext könnte dieser Mechanismus von Wichtigkeit sein, wenn die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und Beta-2-Integrine z. B. durch die Gabe von blockierenden Antikörpern neutralisiert werden. Dies würde erklären, warum klinische Studien mit CD11/CD18-Antikörper-Gabe nach PTCA keine positiven Wirkungen auf die Ausprägungen der Infarktgröße erreichten^{107, 108}.

Weiterhin weist die Verbesserung der postischämischen Funktion nach 24 Stunden Reperfusion darauf hin, dass die Verminderung der postischämischen Inflammation sich positiv auf die linksventrikuläre Funktion auswirkt. Die genauere Aufschlüsselung und Differenzierung zwischen direkter Rezeptor-Leukozyten Interaktion und RAGE als Mediator für die inflammatorische Kaskade nach Ischämie und Reperfusion waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Es wäre allerdings denkbar, durch eine Kombination von ICAM-1 und RAGE-Inhibition einen therapeutisch wirksamen Ansatz zur Verminderung des Reperfusionsschadens zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Die Manifestation der Artherosklerose an den Herzkranzarterien ist die koronare Herzerkrankung (KHK), ein pathologischer Prozess dessen Auswirkungen in Industrieländern die Krankheits- und Todesursachenstatistiken anführen¹. Der Myokardinfarkt mit thrombotischem Verschluss einer Koronararterie ist dabei eine der häufigsten Komplikationen. Die zeitnahe Revaskularisation ist die wichtigste therapeutische Maßnahme zur Reduzierung des postischämischen Myokardschadens, wobei auch durch die Reperfusion selbst eine Schädigung der Myozyten und des Endothels stattfindet.

Mit Wiedereröffnung der verschlossenen Herzkranzgefäße setzt eine gesteigerte inflammatorische Reaktion ein, begleitet von erhöhter Leukozytenmigration in myokardiales Gewebe.

Der Rezeptor der advanced glycation end products (RAGE) wurde in verschiedenen Vorarbeiten im Kontext der myokardialen Ischämie und Reperfusion beschrieben. In dieser Arbeit wurden die postischämische Interaktion von RAGE und Leukozyten und deren funktionelle Relevanz in einem Mausmodell analysiert. Tiere, die defizient für das endotheliale Adhäsionsmolekül ICAM-1 oder für RAGE sind, sowie doppeldefiziente Tiere wurden einer 20-minütigen Okklusion der LAD unterzogen. Nach einer darauf folgenden 15-minütigen Reperfusion wurde die Leukozytenrekrutierung mittels Rhodamin-G6 Infusion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Außerdem wurde in WT und in *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren die linksventrikuläre Funktion nach 45 Minuten myokardialer Ischämie und 24 Stunden Reperfusion mittels invasiver intrakardialer Druckmessung untersucht.

In *RAGE*- oder *ICAM-1*-defizienten Tieren kam es zu einer gleichwertigen Verminderung der Leukozytenrekrutierung (Abb. 8) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. In *ICAM-1/RAGE*-/- Tieren kam es zu einer additiven Reduktion. Ebenso zeigten *RAGE/ICAM-1*-/-Tiere eine verbesserte postischämische LV-Funktion im Vergleich zu WT-Kontrollen.

Um zwischen endothelial und leukozytär exprimiertem RAGE zu differenzieren, wurden Knochenmark-Chimären mit WT und *ICAM-1/RAGE*-/- Tieren generiert. Hierzu wurden Wildtyp-Mäusen nach Bestrahlung Knochenmark von *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren transplantiert, um Mäuse mit leukozytärer *ICAM-1/RAGE*-Defizienz zu generieren. Umgekehrt wurde *ICAM-1/RAGE*-defizienten Tieren Knochenmark von Wildtyp-Tieren transplantiert. Dadurch erhielten wir Mäuse mit ausschließlich auf dem Endothel fehlender *ICAM-1/RAGE*-Expression.

In diesen Knochenmarkschimären konnten wir zeigen, dass das Fehlen des endothelialen RAGE zu einer deutlichen Reduktion der Leukozytenadhäsion führt, das Fehlen von leukozytärem RAGE hingegen kaum zu einer Änderung der Leukozytenadhäsion. Somit konnten wir zeigen, dass nicht das leukozytäre sondern endotheliales RAGE einen redundanten Effekt für die Leukozytenrekrutierung darstellt. Wir konnten nachweisen, dass diese *ICAM-1/RAGE*-Defizienz zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion führt. Ein möglicher Mechanismus ist die Interaktion zwischen leukozytärem Mac-1 und endothelialelem RAGE. Die reduzierte inflammatorische Reaktion ist verantwortlich für die verbesserte linksventrikuläre Funktion und könnte als neuartiger therapeutischer Ansatz von Nutzen sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced glycation end products
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of Differentiation
GF	Gesichtsfeld
HMGB1	High-mobility-group-box-1
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
<i>ICAM-1</i> ^{-/-}	ICAM-1-defiziente Mäuse
<i>ICAM-1/RAGE</i> ^{-/-}	ICAM-1- und RAGE-doppeldefiziente Mäuse
I/R	Ischämie und Reperfusion
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left Ascending Artery
LFA-1	Lymphozyten-Funktionsassoziiertes Antigen-1
LV	Linker Ventrikel
LVDP	Leftventricular Developed Pressure
MAC-1	Monocyte Adhesion Complex-1
NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAGE	Receptor für Advanced glycation end products
<i>RAGE</i> ^{-/-}	RAGE-defiziente Mäuse
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
sRAGE	soluble RAGE
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
VLA-4	Very Late Antigen-4
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
vWF	von Willebrand Factor
WT	Wildtyp

7 Literaturangaben

1. Bundesamt S, Deutschland. Todesursachenstatistiken 1950 - 2007. 2008
2. Stanley WC. Cardiac energetics during ischaemia and the rationale for metabolic interventions. *Coron.Artery Dis.* 2001;12 Suppl 1:S3-7.:S3-S7
3. Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med.Clin.North Am.* 2007;91:553-572
4. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJGM. Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Research.* 2007;74:343-355
5. Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, Hochman JS, Krumholz HM, Lamas GA, Mullany CJ, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., COMMITTEE W, Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC, Jr., Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. 2007 focused update of the acc/aha 2004 guidelines for the management of patients with st-elevation myocardial infarction: A report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines: Developed in collaboration with the canadian cardiovascular society endorsed by the american academy of family physicians: 2007 writing group to review new evidence and update the acc/aha 2004 guidelines for the management of patients with st-elevation myocardial infarction, writing on behalf of the 2004 writing committee. *Circulation.* 2008;117:296-329
6. Ambrosio G, Tritto I. Myocardial reperfusion injury. *European Heart Journal Supplements.* 2002;4:B28-B30
7. Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. *New Horiz.* 1996;4:224-234
8. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol.* 1988;255:H1269-H1275
9. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc.Pathol.* 2005;14:170-175
10. Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, Tritto I, Santoro G, Elia PP, Condorelli M, Chiariello M. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin.Invest.* 1991;87:2056-2066
11. Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol.Cell Cardiol.* 1991;23:1359-1374

12. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A, Visioli O. Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: Role of the cellular defences against oxygen toxicity. *J Mol.Cell Cardiol.* 1985;17:937-945
13. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320:454-456
14. Gasic AC, McGuire G, Krater S, Farhood AI, Goldstein MA, Smith CW, Entman ML, Taylor AA. Hydrogen peroxide pretreatment of perfused canine vessels induces icam-1 and cd18-dependent neutrophil adherence. *Circulation.* 1991;84:2154-2166
15. Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin.Invest.* 1988;82:2045-2055
16. Ambrosio G, Oriente A, Napoli C, Palumbo G, Chiariello P, Marone G, Condorelli M, Chiariello M, Triggiani M. Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor. *J Clin.Invest.* 1994;93:2408-2416
17. Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980;77:1159-1163
18. Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, Ambrosio G. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat.Med.* 1996;2:35-40
19. Ley K, Gaehtgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res.* 1991;69:1034-1041
20. Habazettl H, Kupatt C, Zahler S, Becker BF, Messmer K. Selectins and beta 2-integrins mediate post-ischaemic venular adhesion of polymorphonuclear leukocytes, but not capillary plugging, in isolated hearts. *Pfl++gers Archiv European Journal of Physiology.* 1999;438:479-485
21. Zahler S, Kupatt C, Seligmann C, Kowalski C, Becker BF, Gerlach E. Retention of leucocytes in reperfused, isolated hearts does not cause haemodynamically relevant permanent capillary plugging. *Pfl++gers Archiv European Journal of Physiology.* 1997;433:713-720
22. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *Journal of Clinical Investigation.* 1998;102:1526-1533
23. Kunkel EJ, Chomas JE, Ley K. Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo. *Circulation Research.* 1998;82:30-38
24. Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol.Today.* 1993;14:506-512

25. Rothlein R, Springer TA. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *The Journal of Experimental Medicine*. 1986;163:1132-1149
26. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of icam-2, a cell adhesion ligand for lfa-1 homologous to icam-1. *Nature*. 1989;339:61-64
27. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors K, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for lecam-1 and the leukocyte β 2 integrins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88:7538-7542
28. Altieri DC. Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion. *Blood*. 1993;81:569-579
29. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by il 1 and interferon-gamma: Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (icam-1). *The Journal of Immunology*. 1986;137:245-254
30. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *The Journal of Immunology*. 1988;141:1665-1669
31. Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins cd11a/cd18 and cd11b/cd18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood*. 1991;78:2089-2097
32. Xie J, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nortamo P, Gahmberg CG. Intercellular adhesion molecule-2 (cd102) binds to the leukocyte integrin cd11b/cd18 through the a domain. *The Journal of Immunology*. 1995;155:3619-3628
33. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (lfa-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (icam-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*. 1988;107:321-331
34. Lub M, van KY, Figdor CG. Competition between lymphocyte function-associated antigen 1 (cd11a/cd18) and mac-1 (cd11b/cd18) for binding to intercellular adhesion molecule-1 (cd54). *J Leukoc.Biol*. 1996;59:648-655
35. Schmits R, Kundig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJ, Duncan G, Wakeham A, Shahinian A, van der Heiden A, Bachmann MF, Ohashi PS, Mak TW, Hickstein DD. Lfa-1-deficient mice show normal ctl responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;183:1415-1426
36. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25

37. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin. Invest.* 1995;95:2510-2519
38. Sriramarao P, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH. L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *The Journal of Immunology.* 1994;153:4238-4246
39. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin $\alpha_4\beta_1$ supports tethering and rolling in flow on vcam-1. *The Journal of Cell Biology.* 1995;128:1243-1253
40. Lusinskas FW, Ding H, Lichtman AH. P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4^+ T lymphocytes on tumor necrosis factor α -activated vascular endothelium under flow. *The Journal of Experimental Medicine.* 1995;181:1179-1186
41. Badwey JA, Karnovsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu.Rev.Biochem.* 1980;49:695-726.:695-726
42. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J Med.* 1989;320:365-376
43. Tsao PS, Ma XL, Lefer AM. Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. *Am.Heart J.* 1992;123:1464-1471
44. Gillespie MN, Kojima S, Kunitomo M, Jay M. Coronary and myocardial effects of activated neutrophils in perfused rabbit hearts. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 1986;239:836-840
45. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am.J Physiol.* 1986;250:H822-H827
46. Schmidt AM, Yan SD, Stern DM. The dark side of glucose. *Nat Med.* 1995;1:1002-1004
47. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 1994;70:138-151
48. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. Ages and their interaction with age-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The age concept. *Cardiovasc Res.* 1998;37:586-600
49. Baynes JW. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC.* 2003;41:1159-1165
50. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. Age receptors, receptor recognition factors and functional classification of ages. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France).* 1998;44:1013-1023
51. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism: clinical and experimental.* 2000;49:9-13

52. Bierhaus A, Humpert P, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern D, Nawroth P. Understanding rage, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*. 2005;83:876-886
53. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: A potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82:5588-5592
54. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:14998-15004
55. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:17810-17814
56. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology*. 1993;143:1699-1712
57. Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E, et al. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1995;10:1662-1667
58. Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, Sayed AA, Andrassy M, Schiekofer S, Schneider JG, Schulz JB, Heuss D, Neundorfer B, Dierl S, Huber J, Tritschler H, Schmidt AM, Schwaninger M, Haering HU, Schleicher E, Kasper M, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest*. 2004;114:1741-1751
59. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1999;68:1905-1912
60. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor rage: A mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*. 2002;105:816-822
61. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, Taguchi A, Yan SF, Yan SD, Stern DM, Schmidt AM. Rage is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: Implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59:1117-1128
62. Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med*. 2000;6:643-651

63. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. Rage and amyloid-beta peptide neurotoxicity in alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685-691
64. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. Rage mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for s100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97:889-901
65. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:1111-1122
66. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, et al. The receptor for advanced glycation end products (rage) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:25752-25761
67. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. Hmg-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999;285:248-251
68. Andersson U, Tracey KJ. Hmgb1 in sepsis. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2003;35:577-584
69. Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Yang H, Tracey KJ, Andersson J, Palmblad JE. High mobility group 1 b-box mediates activation of human endothelium. *Journal of internal medicine*. 2003;254:375-385
70. Sasaki N, Takeuchi M, Chowei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, Makita Z. Advanced glycation end products (age) and their receptor (rage) in the brain of patients with creutzfeldt-jakob disease with prion plaques. *Neuroscience letters*. 2002;326:117-120
71. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition receptor (rage) is a counterreceptor for leukocyte integrins. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198:1507-1515
72. Bierhaus A, Schiekofler S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappab. *Diabetes*. 2001;50:2792-2808
73. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of rage, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:16498-16506

74. Sorci G, Riuzzi F, Agneletti AL, Marchetti C, Donato R. S100b causes apoptosis in a myoblast cell line in a rage-independent manner. *Journal of cellular physiology*. 2004;199:274-283
75. Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD. Advanced glycation end-products (ages) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor rage and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (erk). *Molecular and cellular biochemistry*. 2003;250:1-10
76. Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:34834-34844
77. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (rage) directly binds to erk by a d-domain-like docking site. *FEBS Lett*. 2003;550:107-113
78. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in rage-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001;50:1495-1504
79. Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and s100b via rage binding. *Mol Cell Biol*. 2004;24:4880-4894
80. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of rage-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000;405:354-360
81. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (rage)-mediated neurite outgrowth and activation of nf-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:19919-19924
82. Huang W, Liu Y, Li L, Zhang R, Liu W, Wu J, Mao E, Tang Y. Hmgb1 increases permeability of the endothelial cell monolayer via rage and src family tyrosine kinase pathways. *Inflammation*. 2011:1-13
83. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of nadph oxidase by age links oxidant stress to altered gene expression via rage. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2001;280:E685-694
84. Zen K, Chen CX-J, Chen YT, Wilton R, Liu Y. Receptor for advanced glycation endproducts mediates neutrophil migration across intestinal epithelium. *The Journal of Immunology*. 2007;178:2483-2490
85. Orlova VV, Choi EY, Xie C, Chavakis E, Bierhaus A, Ihanus E, Ballantyne CM, Gahmberg CG, Bianchi ME, Nawroth PP, Chavakis T. A novel pathway of hmgb1-mediated inflammatory cell recruitment that requires mac-1-integrin. *EMBO J*. 2007;26:1129-1139

86. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Luki-ç IK, Socher I, Zablotskaya V, Buschmann K, Lange-Sperandio B, Schymeinsky J, Ryschich E, Poeschl J, Kupatt C, Nawroth PP, Moser M, Walzog B, Bierhaus A, Sperandio M. Rage and icam-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*. 2010;116:841-849
87. Nogueira-Machado JA, Volpe CMdO, Veloso CA, Chaves MM. Hmgb1, tlr and rage: A functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2011:1-13
88. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of lps. *The Journal of Immunology*. 2011;186:3248-3257
89. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: A murine model. *AJP - Heart and Circulatory Physiology*. 1995;269:H2147-H2154
90. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gr+Âne HJ, Kurschus FC, Schmidt AM, Yan SD, Martin E, Schleicher E, Stern DM, H+ñmmerling GnJ, Nawroth PP, Arnold B. Receptor for advanced glycation end products (rage) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *The Journal of Clinical Investigation*. 2004;113:1641-1650
91. Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;72:455-461
92. Sheridan FM, Cole PG, Ramage D. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation*. 1996;93:1784-1787
93. Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: A model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc.Res*. 1994;28:1301-1311
94. Jones SP, Trocha SD, Strange MB, Granger DN, Kevil CG, Bullard DC, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. *AJP - Heart and Circulatory Physiology*. 2000;279:H2196-H2201
95. Kupatt C, Wichels R, Deiss M, Molnar A, Lebherz C, Raake P, von DG, Hahnel D, Boekstegers P. Retroinfusion of nfkappab decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by cd18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther*. 2002;9:518-526
96. Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *EXS*. 1996;76:263-84.:263-284

97. Lefer DJ, Flynn DM, Anderson DC, Buda AJ. Combined inhibition of p-selectin and icam-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion. *AJP - Heart and Circulatory Physiology*. 1996;271:H2421-H2429
98. Henderson RB, Lim LH, Tessier PA, Gavins FN, Mathies M, Perretti M, Hogg N. The use of lymphocyte function-associated antigen (lfa)-1-deficient mice to determine the role of lfa-1, mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp.Med*. 2001;194:219-226
99. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in tnf- α -induced inflammation by lfa-1 and mac-1. *Blood*. 2002;99:336-341
100. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. Icam-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of tnf- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106:584-592
101. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, Song F, Bakr S, Szabolcs M, D'Agati V, Liu R, Homma S, Schmidt AM, Yan SF, Ramasamy R. Rage modulates myocardial injury consequent to lad infarction via impact on jnk and stat signaling in a murine model. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2008;294:H1823-H1832
102. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang YC, Lerner S, Bakr S, Li Q, Lu Y, Song F, Qu W, Gomez T, Zou YS, Yan SF, Schmidt AM, Ramasamy R. Receptor for advanced-glycation end products: Key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation*. 2006;113:1226-1234
103. Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, Davies ZA, Moss RB, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Tirouvanziam R. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106:5779-5783
104. Mascareno E, El-Shafei M, Maulik N, Sato M, Guo Y, Das DK, Siddiqui MAQ. Jak/stat signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation*. 2001;104:325-329
105. Negoro S, Kunisada K, Tone E, Funamoto M, Oh H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Activation of jak/stat pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2000;47:797-805
106. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation endproducts (rage) and cardiovascular disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2009;11:null-null
107. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the cd11/cd18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: The results of the halt-mi study. *J Am Coll.Cardiol*. 2002;40:1199-1204
108. Rusnak JM, Kopecky SL, Clements IP, Gibbons RJ, Holland AE, Peterman HS, Martin JS, Saoud JB, Feldman RL, Breisblatt WM, Simons M, Gessler CJ, Jr., Yu AS. An anti-cd11/cd18 monoclonal antibody in patients with acute myocardial infarction

having percutaneous transluminal coronary angioplasty (the festival study). *Am J Cardiol.* 2001;88:482-487

8 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. med. Christian Kupatt der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm. Unter seiner Anleitung lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Durch sein unermüdliches Interesse und seine Anregungen trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, vor allem Rabea Hinkel und meinem Ehemann Jan Horstkotte, möchte ich für die freundschaftliche, wissenschaftliche und technische Unterstützung danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Für die viele Hilfestellung bei der histologischen Bearbeitung unserer Proben und für die mentale Unterstützung in schwierigen Phasen danke ich ganz herzlich Susanne Pfeiler.

Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, der uns die Räumlichkeiten des Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin zur Durchführung unserer Experimente zur Verfügung stellte, möchte ich danken. Im Besonderen danke ich Prof. Dr. med. Markus Sperandio und Frau Dr. Claudia Nussbaum für die freundliche Aufnahme und Unterstützung am Walter-Brendel-Zentrum.

Im Weiteren Danke ich Frau Prof. Angelika Bierhaus vom Universitätsklinikum Heidelberg für die Bereitstellung der *RAGE*-defizienten Tiere sowie Dr. Markus Moser, PhD, vom Max-Planck-Institut Martinsried für die hilfreiche Unterstützung.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Mutter Dagmar Schröder, die mit uneingeschränkter, liebevoller Unterstützung meine Ausbildung und diese Arbeit ermöglichte.