
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Einfluss des Retinoid-X-Rezeptors α in Monozyten und
Makrophagen auf die Umbau- und Heilungsprozesse nach
akutem Myokardinfarkt**

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

vorgelegt von
Saskia Janina Räuber
aus
Bad Homburg v. d. Höhe

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Schulz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler
Prof. Dr. Christian Kupatt
Prof. Dr. Wolfgang Scheidt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Tobias Weinberger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2021

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	9
1.	Myokardinfarkt	9
1.1.	Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes	9
1.2.	Pathophysiologie des Myokardinfarktes	11
1.3.	Medikamentöse Beeinflussung des kardialen Remodelings	13
1.4.	Rolle der Reperfusion in der Therapie des Myokardinfarktes	14
2.	Makrophagen	15
2.1.	Grundlagen der Phagozytose und der Efferozytose	16
2.2.	Monozyten und Makrophagen im Herzen unter Steady State Bedingungen und im Rahmen des akuten Myokardinfarktes	17
2.2.1.	Kardiale Makrophagen im Steady State und als Reaktion auf eine kardiale Läsion	20
3.	Retinoid-X-Rezeptoren	22
3.1.	Struktur, Vorkommen und Liganden der Retinoid-X-Rezeptoren	22
3.2.	Funktion der Retinoid-X-Rezeptoren bei der Hämatopoese und beim Zelltod	23
3.3.	Makrophagen und Retinoid-X-Rezeptoren	24
3.4.	Der Einfluss von RXR auf das Immunsystem	24
3.4.1.	Beteiligung von RXR bei der Immunmodulation von ischämischen Erkrankungen	27
II.	Zielsetzung der Arbeit	28
III.	Material und Methoden	30
1.	Material	30
1.1.	Chemikalien und Reagenzien	30
1.2.	Puffer und Lösungen	31
1.3.	Operationszubehör	31
1.4.	Pharmaka	32
1.5.	Antikörper	32
1.6.	Kits und Primer	33
1.7.	Laborbedarf	33
1.8.	Tierhaltung	34
1.9.	Geräte	34
1.10.	Software	35

2.	Versuchstiere	35
2.1.	Tierhaltung und Zucht	35
2.2.	Mausstämme	36
2.2.1.	Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR alpha ^{flox/flox}	36
2.2.1.1.	Tamoxifengabe	38
2.2.2.	Cx3cr1-GFP Reportermause	39
2.2.3.	Mx1-Cre; Myb ^{flox/flox}	39
2.2.3.1.	Knochenmarktransplantation	39
2.2.3.1.1.	Vorbereitung des Knochenmarks für die Transplantation	40
2.2.3.1.2.	Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation	41
3.	Operative Eingriffe	41
3.1.	Narkose	41
3.2.	Ischämie-Reperusions-Modell (I/R-Modell)	42
3.3.	Organentnahmen	44
4.	Durchflusszytometrie	45
4.1.	Grundlagen der Durchflusszytometrie	45
4.2.	Vorbereitung der Blutproben	46
4.3.	Vorbereitung des Knochenmarks	47
4.4.	Vorbereitung des Gehirns	47
4.5.	Vorbereitung der Herzen	48
4.6.	Phagozytoseassay	49
4.6.1.	Prinzip der pHrodo™ Red BioParticles®	49
4.6.2.	Vorbereitung der Proben für den Phagozytoseassay	50
4.7.	Vorbereitung der Kompensations-Beads	50
5.	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	51
5.1.	RNA-Isolation	51
5.2.	Reverse Transkription	51
5.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
5.3.1.	Grundlagen der PCR	52
5.3.1.1.	Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)	52
5.3.2.	Durchführung der qPCR	53
5.4.	Agarose-Gelelektrophorese	53
5.4.1.	Herstellung des 2,5%igen Agarosegels und Durchführung der Elektrophorese	54
6.	Blutanalyse	54

7.	Nuklearmedizinische Bildgebung	54
7.1.	Grundlagen der [¹⁸ F] FDG-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und des [¹⁸ F] FDG-PET/CT	54
7.2.	Ablauf der [¹⁸ F] FDG-PET/CT-Untersuchung	55
7.3.	Analyse der PET-Daten	57
8.	Histologische Untersuchungen	57
8.1.	Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie	57
8.2.	Erstellung von Schnittpräparaten	58
8.3.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	59
8.3.1.	Abgrenzung des Infarktareals mit der „Wheat germ agglutinin“ (WGA) Färbung	59
8.3.2.	Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung	60
8.3.3.	ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	61
8.3.3.1.	Prinzip des Kits	61
8.3.3.2.	Vorbereitung	61
8.3.3.3.	Durchführung der Färbung	62
8.4.	Histologische Auswertung	62
9.	Untersuchung der Expression von Zyto-, Chemokinen und Wachstumsfaktoren	63
9.1.	Vorbereitung der Proben mithilfe des „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit“	63
10.	Statistische Auswertung	64
IV.	Ergebnisse	65
1.	Evaluation der Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen der Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR alpha^{lox/lox} Tiere	65
2.	Einfluss einer verminderten Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{lox/lox} Tiere auf das Blutbild	67
3.	Auswirkung einer Reduktion der RXRα-Expression in Monozyten und Makrophagen der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{lox/lox} Tiere auf die Infarktgröße	69
4.	Untersuchung der Rolle des RXRα bei der Phagozytose	72
5.	Bedeutung des RXRα bei der Gefäßneubildung nach einem Myokardinfarkt	74
6.	Effekt einer reduzierten Expression des RXRα auf die Proliferationsrate von Makrophagen	76
7.	Bedeutung des RXRα bei der Apoptose von Zellen	79

8.	Beeinflussung der Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Herzen durch RXRα in Monozyten und Makrophagen	80
9.	Einfluss einer verminderten Expression des RXRα auf die Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen	84
9.1.	Charakterisierung von Makrophagen anhand der Expression von MHCII im Steady State und in Reaktion auf einen Myokardinfarkt	84
9.2.	Auswirkungen einer Reduktion der Expression des RXR α auf die Zusammensetzung der Monozyten- und Makrophagenpopulationen	89
V.	Diskussion	94
1.	Eine verminderte Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen besitzt negative Effekte auf die Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt	95
2.	Der RXRα in myeloiden Zellen spielt keine maßgebliche Rolle bei der Hämatopoese	96
3.	Eine Reduktion der Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen besitzt keinen Einfluss auf deren phagozytotische Aktivität	96
4.	Die Angiogenese nach einem akuten Myokardinfarkt wird durch eine verminderte Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen negativ beeinflusst	98
5.	RXRα als Regulator der Proliferation von Makrophagen	99
6.	Eine verminderte Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen erhöht die Zahl der apoptotischen Zellen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt	100
7.	Eine Reduktion der Expression des RXRα in Monozyten und Makrophagen besitzt keinen maßgeblichen Einfluss auf die Zyto- und Chemokinexpressionen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt	101
8.	Weitergehende Charakterisierung der Subpopulationen von Makrophagen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt und Funktion des RXRα bei der Zusammensetzung der Subpopulationen	102
8.1.	Dynamische Veränderungen der Monozyten- und Makrophagenpopulationen im Herzen als Reaktion auf ein ischämisches Ereignis	102
8.2.	Evaluation der Funktion des RXR α in Monozyten und Makrophagen bei der Zusammensetzung der Subpopulationen	104
VI.	Zusammenfassung	107
VII.	Abkürzungsverzeichnis	108
VIII.	Tabellenverzeichnis	110

Inhaltsverzeichnis

IX.	Abbildungsverzeichnis	111
X.	Literaturverzeichnis	114
XI.	Danksagung	128

I. Einleitung

1. Myokardinfarkt

1.1. Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes

Ischämische Herzkrankheiten stellen weltweit die führende Todesursache dar [1]. Auch in Deutschland sind noch immer die meisten Todesfälle auf kardiale Erkrankungen zurückzuführen. Führend dabei sind die chronisch ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz. Aufgrund moderner Diagnostik- und Therapieverfahren des akuten Myokardinfarktes konnte jedoch tendenziell ein Rückgang der altersstandardisierten Sterbeziffer seit 1993 beobachtet werden [2].

Bezüglich der Geschlechterverteilung ist das männliche Geschlecht insgesamt häufiger von ischämischen Herzkrankheiten betroffen als das weibliche. Die Hospitalisierungsrate der männlichen Bevölkerung belief sich 2016 auf mehr als das Doppelte [2].

Aufgrund der zunehmend alternden Gesellschaft, ist zukünftig mit einer steigenden Belastung des Gesundheitssystems durch kardiovaskuläre Erkrankungen zu rechnen [3]. Somit kommt dem genaueren Verständnis pathophysiologischer Grundlagen und der Entwicklung neuer Therapiestrategien eine wichtige Bedeutung zu.

Hauptursache eines akuten transmuralen Myokardinfarktes ist die Entstehung eines Thrombus in den Koronargefäßen. Dieser führt durch die Blockade des Blutflusses zur Minderversorgung des nachgeschalteten Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff [4]. Intravaskuläre Thromben sind Folge einer Plaqueruptur oder einer Erosion der Endotheloberfläche des Plaques. Letztere führt zur Freilegung von thrombogenem Material aus dem Inneren des Plaques. Eine weitere mögliche Ursache der Thrombusformation stellt der Kontakt von Blut mit kalzifizierten Knoten innerhalb des Plaques dar. Die Ruptur arteriosklerotischer Plaques ist am häufigsten für die Bildung eines intrakoronaren Thrombus verantwortlich [5].

Ein hoher Blutcholesterinspiegel ist ein wichtiger prädisponierender Faktor bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques [6]. Der Transport von Cholesterin im Blut erfolgt in Form von Lipoproteinen. Das Low Density Lipoprotein (LDL) transportiert Cholesterin und Cholesterinester aus der Leber in periphere Gewebe. Eine LDL-Erhöhung geht mit einem erhöhten Arteriosklerose-Risiko einher [7]. LDL akkumuliert in der Intima der Arterien und unterliegt dort durch Oxidation und Aggregation einer Modifikation [6, 8]. Cholesterinmoleküle stimulieren wiederum eine Immunreaktion [8, 9]. Sie induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen - wie „Vascular Cell Adhesion Molecule 1“ (VCAM-1) oder P-/E-Selectin - auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen, fördern die Freisetzung von Zytokinen - wie Interleukin-8 - und Chemokinen - wie „Monocyte

Einleitung

Chemoattractant Protein-1“ (MCP-1) [9, 10]. Hierdurch entsteht eine lokale Entzündungsreaktion und die Migration von Leukozyten zur Stelle der Läsion sowie die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen werden gefördert [10-12]. Makrophagen exprimieren Scavenger- und Toll-like-Rezeptoren, welche an der Aufnahme von Cholesterinmolekülen und an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt sind [13, 14]. Die Lipid-beladenen Makrophagen werden auch als Schaumzellen bezeichnet. Zusätzlich zur Einwanderung von Immunzellen kommt es zur Akkumulation von glatten Muskelzellen in der Intima [8]. Die Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix durch die glatten Muskelzellen führt zur Bildung einer protektiven fibrotischen Kappe über der Läsion [15].

Die Aufnahme von Cholesterinmolekülen in Makrophagen triggert eine mitochondriale Dysfunktion dieser Zellen. Folge ist eine zunehmende Apoptose der lipidbeladenen Makrophagen mit nachfolgender Entstehung eines nekrotischen Kerns des Plaques [8].

Zytokine, die im Rahmen der Entzündungsreaktion ausgeschüttet werden, sowie modifizierte LDL-Moleküle fördern die Expression von Metalloproteinasen. Diese tragen zur Degradation der extrazellulären Matrix des Plaque-Kerns bei [16]. Des Weiteren modulieren sie die Synthese von Kollagen durch die glatten Muskelzellen, welches als Teil der fibrösen Kappe des Plaques protektive Eigenschaften besitzt [17]. Folge ist die Progression der Arteriosklerose und die Entstehung eines vulnerablen Plaques. Vulnerable Plaques kennzeichnen sich durch einen großen nekrotischen, lipidhaltigen Kern bei einer dünnen fibrotischen Kappe, reichlich entzündliche Zellinfiltration sowie einen Mangel an glatten Muskelzellen. Folglich weisen sie ein hohes Rupturrisiko auf [18, 19]. Durch die Zunahme des nekrotischen, lipidreichen Kerns kommt es zu einer ineffizienten Umverteilung des Wandstresses innerhalb des Plaques. Die fokale Konzentration der Belastung im Bereich der fibrösen Kappe führt zu hohen lokalen Krafteinwirkungen. Die Kombination aus abnehmender Widerstandsfähigkeit des Plaques aufgrund von Strukturveränderungen und hoher lokaler Krafteinwirkung führt schlussendlich zur Ruptur des Plaques in das Lumen des Gefäßes [20-22].

Die Ruptur der fibrotischen Kappe legt wiederum thrombogenes Material des nekrotischen, lipidreichen Kerns frei. Dieses führt durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade und durch die Aggregation von Thrombozyten zur Bildung eines Thrombus [23, 24]. Folge ist ein plötzlicher Verschluss des betroffenen Koronargefäßes und die Entstehung eines Myokardinfarktes.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose werden das Zigarettenrauchen, die Hypercholesterinämie, ein erniedrigter HDL-Wert, eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus und eine familiäre Prädisposition gezählt [25-28]. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von Ablagerungen bereits im Kindesalter beginnt und

das Risiko mit zunehmendem Alter ansteigt [29, 30]. Das Auftreten sowie die Progression der Ablagerungen werden durch das Vorhandensein von Risikofaktoren gefördert [30].

Die Manifestation eines akuten Myokardinfarktes findet zumeist nicht zufällig statt, sondern ein großer Teil scheint durch externe Faktoren begünstigt zu sein. So wurde unter anderem eine Häufung von Myokardinfarkten in den frühen Morgenstunden, insbesondere innerhalb der ersten Stunde nach dem Aufstehen, bei Kälte, emotionalem Stress und schwerer körperlicher Belastung beobachtet [31-34]. Hierfür werden Prozesse wie eine Hyperkoagulabilität, eine erhöhte Aggregationsneigung der Thrombozyten, Vasokonstriktion sowie eine beeinträchtigte Fibrinolyse verantwortlich gemacht [35-38].

1.2. Pathophysiologie des Myokardinfarktes

In Reaktion auf eine Minderversorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes finden Veränderungen im Herzen statt, welche unter dem Begriff "Remodeling" zusammengefasst werden können. Hierbei handelt es sich um Veränderungen auf zellulärer, molekularer und interstitieller Ebene als Folge auf eine Belastung oder Schädigung des Herzens. Diese beeinflussen die Größe, Form und Funktionalität des Herzens [39]. Remodeling im Rahmen kardialer Belastung oder Läsion kann einerseits als physiologische Anpassungsreaktion ablaufen, andererseits aber auch als pathologischer Prozess schädliche Auswirkungen auf das Herz besitzen [40-42]. Das physiologische Remodeling ermöglicht den Erhalt funktioneller Eigenschaften des Herzens (Schlagvolumen, Ejektionsfraktion) während der akuten Phase einer kardialen Läsion oder Belastung [40]. Ungefähr ein Viertel der Patienten nach dem ersten akuten Myokardinfarkt entwickelt eine linksventrikuläre Dilatation innerhalb der ersten vier Wochen, wodurch die Verbesserung der Funktionalität des Herzens erreicht wird [43]. Pathologisches Remodeling bedingt hingegen eine Funktionsstörung des Herzens und führt zur Herzinsuffizienz, welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht [41]. Der Übergang zwischen den physiologischen Anpassungsreaktionen und dem pathologischen Prozess ist jedoch fließend und somit schwer vorhersehbar [42].

In Postinfarkt-Modellen konnte gezeigt werden, dass der Prozess des linksventrikulären Remodelings zeitnah, meist innerhalb der ersten Stunden, nach der Läsion beginnt und über die Zeit fortschreitet [44-46]. Der Vorgang des kardialen Remodelings betrifft sowohl das Infarktgebiet als auch nicht-infarzierte Areale und weist einen stadienhaften Verlauf auf [47, 48]. Das Ausmaß der Umbauprozesse wird hierbei durch die Infarktgröße bestimmt [42].

In Folge einer Belastung oder Schädigung des Herzens kommt es zu einem zunehmenden Untergang von Herzmuskelzellen, welcher eine essenzielle Rolle im Rahmen des Remodelings

spielt. Es konnten drei verschiedene Mechanismen des Zelltods beobachtet werden: die Apoptose (programmierter Zelltod), die Nekrose und die Autophagie [42, 49, 50]. Neben dem Untergang der Kardiomyozyten findet auch eine Degradation der extrazellulären Matrix durch eine gesteigerte Aktivität von Kollagenasen (u. a. Matrix Metalloproteinase-1) und Proteinasen im Bereich des Perfusionsdefizites statt [51, 52]. Durch die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix wird ein Auseinanderweichen der Kardiomyozyten begünstigt [47]. Der Zelltod sowie das Auseinanderweichen von Kardiomyozyten führt einerseits zu einer akuten Dilatation des Infarktgebiets mit einem gesteigerten diastolischen Wandstress und andererseits zur systolischen Funktionsstörung durch den Verlust von kontraktilen Material in der Herzwand. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme des enddiastolischen Volumens mit konsekutiv erhöhten enddiastolischen Füllungsdrücken im linken Ventrikel. Die Steigerung des enddiastolischen Volumens erhöht die Krafteinwirkung auf das umliegende gesunde Herzmuskelgewebe. Dieses reagiert mit einer Hypertrophie, um dem gesteigerten Wandstress - entsprechend des Laplace-Gesetzes - entgegenzuwirken [42, 47]. Initial kann durch die Anpassungsprozesse nach dem Frank-Starling-Mechanismus eine Verbesserung der Kontraktilität und des Schlagvolumens erreicht werden (siehe Abbildung 1). Mit dem Fortschreiten der Prozesse werden diese Kompensationsmechanismen allerdings ausgeschöpft. Es resultiert ein Circulus vitiosus mit Folge der Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz [42, 43, 53].

Das zweite Stadium des Remodelings kennzeichnet sich durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen durch die untergehenden Herzmuskelzellen. Folge ist die Einwanderung von Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in das Infarktareal [48, 54, 55]. Ein erhöhtes Vorkommen von Monozyten ist mit einer gesteigerten linksventrikulären Dysfunktion assoziiert und stellt einen Prädiktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sowie für das Auftreten weiterer kardialer Ereignisse dar [56].

Eingewanderte Makrophagen setzen Zytokine wie den „Transforming Growth Factor β_1 “ (TGF- β_1) frei. TGF- β_1 induziert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche Bestandteile der extrazellulären Matrix, u. a. Kollagen I, sezernieren [47]. Neben TGF- β_1 sind auch weitere Substanzen - hierunter Angiotensin II, Aldosteron und Endothelin-1 - in erhöhter Konzentration im infarzierten Herzen zu finden. Diese sind ebenfalls an der Entstehung einer Fibrose beteiligt [47, 57-60]. Da Kardiomyozyten nur begrenzt zur Proliferation fähig sind, ist kein ausreichender Ersatz des abgestorbenen Herzmuskelgewebes durch vitales Gewebe möglich [61]. Die abgestorbenen Zellen werden nach und nach durch eine fibrotische Narbe ersetzt. Die Stabilität der Narbe verhindert eine Ruptur des Ventrikels als Folge des ischämisch bedingten Zelluntergangs [62]. Auf der anderen Seite stört die Fibrose die Kontraktilität des Herzen und fördert die

Entstehung von Herzrhythmusstörungen, welche mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [48, 63] [64].

1.3. Medikamentöse Beeinflussung des kardialen Remodelings

Medikamentöse Therapieprinzipien nach einem akuten Myokardinfarkt haben sich zum Ziel gesetzt, pathologisches Remodeling zu verlangsamen, abzumildern und sofern möglich, rückgängig zu machen [65].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle während der Remodeling-Prozesse [66]. Durch den mechanischen Stress auf die Kardiomyozyten setzen diese direkt Angiotensin II frei [67]. Neben diesem lokal gebildeten Angiotensin ist auch systemisches Angiotensin an den Umbauprozessen beteiligt [42]. Die Expression des „Angiotensin Converting Enzyme“ (ACE) wird als Reaktion auf die kardiale Läsion im Randbereich des Infarktareals erhöht [68]. Zudem konnte ein gesteigertes Vorkommen des AT1-Rezeptors im nicht-infarzierten Areal nachgewiesen werden [69].

Während der Initialphase des akuten Myokardinfarktes stellt das RAAS einen essenziellen Bestandteil im Rahmen der Anpassungsreaktion dar. Zum einen verbessert Angiotensin II die Kontraktilität der Kardiomyozyten und erhöht, gemeinsam mit Aldosteron, das intravasale Volumen, welches über den Frank-Starling-Mechanismus zu einer Verbesserung der kardialen Auswurfleistung führt. Zum anderen gewährt eine Vasokonstriktion die Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks. Somit vermittelt das RAAS in der Akutphase nach einem akuten Myokardinfarkt einen positiven Effekt auf die Hämodynamik [66].

Dem gegenüber konnte gezeigt werden, dass bei einer langfristigen und übermäßigen Aktivierung des RAAS die oben genannten positiven Eigenschaften abnehmen. Die systemische Vasokonstriktion verlängert die Ischämiedauer und eine Stimulation der Kollagensynthese durch Fibroblasten begünstigt eine übermäßige Fibrose im Herzen [47, 60, 66, 70]. Es entsteht ein Circulus vitiosus mit einem nachteiligen Effekt auf die Hämodynamik und das Outcome [66].

Die Applikation von Hemmstoffen des „Angiotensin-Converting-Enzyme“ (ACE-Hemmer) wie Enalapril können die pathologischen Prozesse im Rahmen des Remodelings teilweise abmildern oder sogar rückgängig machen [71-73]. In Studien zeigten ACE-Hemmer protektive Eigenschaften auf die Entwicklung sowie auf das Outcome einer Herzinsuffizienz [74, 75].

Daneben besitzt auch eine Aktivierung des Sympathikus in der Akutphase kompensatorische Eigenschaften auf die Hämodynamik des Herzens. Die langfristige und übermäßige Sympathikusaktivität schöpft diese Kompensationsmechanismen allerdings ebenfalls aus und kann zur Entstehung einer Herzinsuffizienz beitragen [7]. Die Langzeittherapie mit β -Blockern

nach einem akuten Myokardinfarkt mit linksventrikulärer Dysfunktion weist durch eine Verbesserung hämodynamischer Eigenschaften positive Effekte auf das Outcome auf [76, 77].

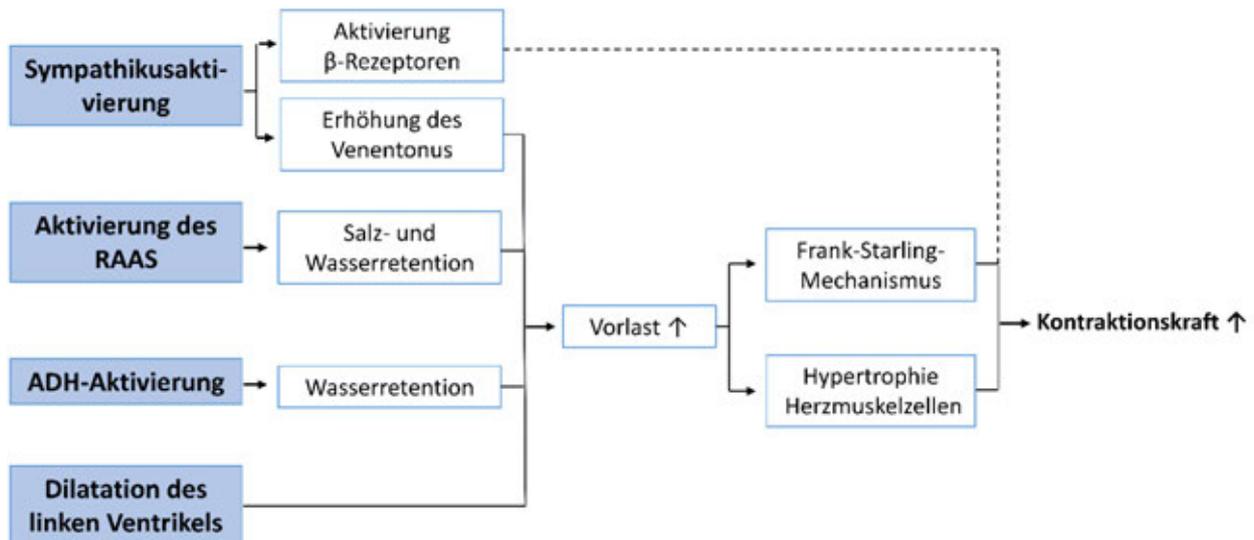


Abbildung 1 - Kompensationsmechanismen nach einem akuten Myokardinfarkt (vereinfachte Darstellung) (RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; ADH = Antidiuretisches Hormon) (erstellt nach [7])

1.4. Rolle der Reperfusion in der Therapie des Myokardinfarktes

Die Wiederherstellung der Perfusion des Herzmuskelgewebes, vornehmlich mittels einer perkutanen Koronarintervention (PCI), stellt eine wichtige Initialmaßnahme zur Reduktion der Infarktgröße und Verbesserung des Outcomes nach einem akuten Myokardinfarkt dar [78]. Sowohl das Ausmaß als auch die Dauer des Perfusionsdefizites beeinflussen den Grad der zellulären Dysfunktion im Herzen [79]. Die PCI sollte somit früh, innerhalb von 120 min (idealerweise bis zu 90 min), nach dem ischämischen Ereignis erfolgen [80].

Allerdings weist die Wiederherstellung des Blutflusses nach einem Myokardinfarkt nicht nur positive Effekte auf, sondern kann ganz im Gegenteil selbst zur Schädigung des Herzmuskelgewebes beitragen [78]. Dieses Phänomen wurde in den 1960er Jahren apparent und ist unter dem Begriff „Reperfusionsschaden“ bekannt [79]. Durch die Reperfusion finden Veränderungen auf zellulärer Ebene statt, welche paradoxerweise zum Absterben von Kardiomyozyten führen und folglich das Ausmaß der Läsion vergrößern können [78, 79]. Diese Art der myokardialen Schädigung ist mitverantwortlich für die Tatsache, dass es bei optimaler Reperfusion des Infarktgebiets in fast 25% der Fälle zur Entstehung einer Herzinsuffizienz kommt [78].

2. Makrophagen

Makrophagen wurden zum ersten Mal im späten 19. Jahrhundert durch Elie Metchnikoff beschrieben. Sein Interesse galt dabei insbesondere den Prozessen der Phagozytose und ihren immunologischen Auswirkungen [81]. Über die letzten Jahre war es möglich, einen deutlich differenzierteren Blick auf die weitreichenden Funktionen von Makrophagen zu erhalten. Durch Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wurde deutlich, dass die Funktion dieser Zellen über die Aufnahme und den Abbau von Pathogenen deutlich hinaus geht. Ihre Rolle unter physiologischen Bedingungen sowie bei der Pathophysiologie von Erkrankungen hat folglich zunehmende Bedeutung bekommen. Somit sind Makrophagen zu einem zentralen Forschungsbereich geworden.

Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen an der unmittelbaren Abwehr von Pathogenen im Körper beteiligt. Sie sind mit Pathogen-Erkennungsrezeptoren („Pathogen Recognition Receptors“) ausgestattet, welche die Aufnahme und Abtötung von Pathogenen (Phagozytose) aktivieren und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen fördern. Über die Präsentation von Antigenen auf ihrer Oberfläche mithilfe des „Major Histocompatibility Complex II“ (MHC II) stehen sie in enger Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem. Makrophagen sind unverzichtbare Bestandteile bei der Modulation von Entzündungsreaktionen. Hierzu tragen sie unter anderem durch die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Botenstoffe, durch die Beseitigung von abgestorbenen Zellen und durch die Regulation der Gefäßneubildung sowie der Entstehung von Granulationsgewebe bei [82].

In Wirbeltieren finden sich Makrophagen in allen Organen. Je nach umgebendem Milieu nehmen sie unterschiedliche Phänotypen an und sind an der Ausübung verschiedener Funktionen beteiligt [83].

Bei der Aktivierung von Makrophagen lassen sich vereinfacht zwei Subtypen abgrenzen.

Klassisch aktivierte Makrophagen - auch Interferon- γ (IFN- γ) regulierte M1 Makrophagen - weisen einen proinflammatorischen Phänotyp auf. Sie sind an der Phagozytose von Pathogenen beteiligt und tragen zur Degradation der extrazellulären Matrix sowie zur Apoptose von Zellen bei. Ihre Aktivierung erfolgt durch T-Helfer 1 Lymphozyten unter der Beteiligung von IFN- γ , Lipopolysacchariden (LPS), Zytokinen wie TNF und dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF). Klassisch aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine - hierunter IL-12, IL-23, IL-27, TNF- und Chemokine wie „C-X-C Motif Chemokine Ligand 9“ (CXCL9), CXCL10 und CXCL11. Die Folge ist eine gesteigerte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), reaktiven Sauerstoffspezies und proteolytischen Enzymen wie Matrix-Metalloproteinase, welche an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt sind [82].

Alternativ aktivierte Makrophagen - Interleukin-4/-13 regulierte M2 Makrophagen - zeigen

immunmodulatorische/antiinflammatorische Eigenschaften und fördern die Bildung der extrazellulären Matrix sowie die Angiogenese [82, 84]. An der Aktivierung sind vornehmlich T-Helfer 2 Lymphozyten sowie die Interleukine 4 und 13 beteiligt. Alternativ aktivierte Makrophagen sezernieren unter anderem antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, TGF- β und „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). Hierdurch tragen sie zur Gefäßneubildung bei und regen Fibroblasten zur Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix an. Insgesamt fördern alternativ aktivierte Makrophagen die Eindämmung der Entzündungsreaktion und haben somit einen positiven Effekt auf die Heilungsprozesse [82].

Diese Einteilung ist allerdings als stark vereinfachte Darstellung zur groben Orientierung zu sehen und besitzt somit nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf reale Verhältnisse in Lebewesen [85].

2.1. Grundlagen der Phagozytose und der Efferozytose

Zum ersten Mal beschrieben wurde die Phagozytose von Elie Metchnikoff (1845–1916). Während seiner Studien an wirbellosen Meerestieren in den 1880er Jahren konnte er die Aufnahme von Partikeln in Zellen beobachten. Für seinen Beitrag zu fundamentalen Konzepten der zellulären Immunität wurde Elie Metchnikoff 1908 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [86].

Der Mechanismus der Phagozytose ist ein hoch komplexer Vorgang, der einen elementaren Bestandteil der angeborenen Immunantwort darstellt [87]. Dieser Prozess wird überwiegend von spezialisierten Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, ausgeführt [88].

Makrophagen erkennen Pathogene hierbei mithilfe von Pathogen-Erkennungsrezeptoren (engl. „pattern recognition receptors“) wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren, Mannose-, Komplement- und Fc-Rezeptoren [89]. Die Bindung von Pathogenen an diese Rezeptoren führt zu einer Aktivierung und Ausreifung von antigenpräsentierenden Zellen, steigert deren Phagozytoseaktivität und erhöht ihre Produktion von Zytokinen [90]. Dabei finden Veränderungen im Aktin-Zytoskelett und eine Erweiterung der Plasmamembran statt. Hierdurch kommt es zur Aufnahme der Pathogene in die Zelle und zur Bildung von Phagosomen. Die Fusion mit Endosomen hat einen deutlichen Abfall des pH-Werts im Phagosom zur Folge. Nach der Verschmelzung mit Lysosomen bilden sich Phagolysosomen. Durch den niedrigen pH-Wert im Inneren der Phagolysosomen werden proteolytischen Enzyme aktiviert und es entstehen reaktiven Sauerstoffspezies, welche am Zersetzungsprozess der Pathogene beteiligt sind [89].

Neben der Phagozytose von Pathogenen kommt Makrophagen auch eine bedeutende Rolle bei der Efferozytose von körpereigenen apoptotischen Zellen zu. Die Aufnahme von apoptotischen Zellen

ist ein wichtiger Prozess bei der Eindämmung einer Entzündungsreaktion und dem Erhalt der Selbsttoleranz. Während der Apoptose exponieren die Zellen vermehrt Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Makrophagen erkennen die Moleküle an der Oberfläche von apoptotischen Zellen mithilfe verschiedener Proteine, hierunter AXL Rezeptortyrosinkinase (AXL), Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase MER (MERTK) und T-Zell Membranprotein 4 (TIM4). Dies führt zur Aktivierung der Makrophagen und zur Aufnahme der apoptotischen Zellen [91, 92].

2.2. Monozyten und Makrophagen im Herzen unter Steady State Bedingungen und im Rahmen des akuten Myokardinfarktes

Makrophagen wurde schon lange eine bedeutende Rolle bei den Remodeling-Prozessen und bei der Heilung nach kardialen Läsionen zugesprochen [93].

Das Fehlen von Makrophagen im Herzen nach einer Myokardläsion geht mit einer erhöhten linksventrikulären Dilatation und Wandverdünnung einher und hat eine gesteigerte Mortalitätsrate zur Folge. Die Ablation von Makrophagen beeinflusst die antiinflammatorische Phase nach einer Myokardläsion nachteilig und weist einen negativen Einfluss auf die Gefäßneubildung und das Remodeling der extrazellulären Matrix auf [94]. Makrophagen stellen somit einen unverzichtbaren Bestandteil während der Heilungsprozesse im Herzen dar. Dies macht sie zum vielversprechenden Ziel potenzieller neuer Therapiestrategien kardialer Erkrankungen.

Die Immunantwort auf ein myokardiales Perfusionsdefizit lässt sich vereinfacht in zwei Phasen einteilen, welche eine teilweise Überlappung aufweisen.

Die frühe Phase bezieht sich auf die ersten 4 Tage nach Myokardinfarkt, an welche sich die Spätphase zwischen Tag 4 und Tag 7 anschließt [95, 96].

Das Einwandern von Monozyten aus dem Blutstrom in das Herz beginnt bereits früh (innerhalb von 30 min) nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) im Mausmodell [97].

Blutmonozyten aus Mäusen lassen sich in zwei prinzipielle Subtypen gliedern. Nr4a1^{lo} Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo} Monozyten (äquivalent zu CD14⁺ Monozyten im Menschen) werden auch als „inflammatorische Monozyten“ bezeichnet Sie stellen den Großteil der einwandernden Monozyten in das Herz im Rahmen eines Myokardinfarktes dar und sind insbesondere während der frühen Phase nach Läsion der prädominante Subtyp. Die Monozyten weisen eine hohe Expression des CCR2-Rezeptors (Rezeptor für den C-C- Chemokin Ligand 2) auf, welcher eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der Monozyten aus dem Knochenmark über das Blut in das Herzgewebe spielt [95, 98]. Neben der Phagozytose von Zell-Debris sezernieren sie proinflammatorische Zytokine, hierunter IL-1 α , IL-6 und TNF- α . Somit tragen sie zur akuten Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt bei, besitzen potenziell schädliche Eigenschaften auf das Herzmuskelgewebe und

Einleitung

weisen einen negativen Einfluss auf das Outcome auf [95, 96].

Der zweite Subtyp von Blutmonozyten besteht aus Nr4a1^{hi} Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi} Monozyten (äquivalent zu CD14^{dim} CD16⁺ Monozyten im Menschen) [95, 98]. Diese Monozyten sind vor allem in späteren Phasen nach Myokardinfarkt im Herzen zu finden. Durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie VEGF, TGF- β und IL-10, tragen sie zur Angiogenese sowie zur Synthese der extrazellulären Matrix im Rahmen der Infarktheilung bei [95]. Die hohe Expression des Transkriptionsfaktors Nr4a1 (Nur77) reguliert einerseits die Differenzierung und das Überleben der Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi} Monozyten, moduliert die Expression von CCR2 - wodurch der Influx von Monozyten in das Herz limitiert wird - und ist an der Expression der antiinflammatorischen Zytokine beteiligt [98, 99].

Fate-Mapping Analysen zeigen, dass die beiden Subtypen nicht als vollständig unabhängig voneinander existierende Arten von Monozyten gesehen werden sollten, sondern vielmehr auch voneinander abstammen können. So konnte bei den Untersuchungen eine Differenzierung der Ly6C^{hi} Monozyten zu Ly6C^{lo} Monozyten nachgewiesen werden [98].

Darüber hinaus wurde deutlich, dass Monozyten, in unterschiedlichem Ausmaß, zur Entstehung kardialer Makrophagen beitragen. Somit scheinen Ly6C^{hi} Monozyten sowohl an der Entstehung der inflammatorischen Ly6C^{hi} Makrophagenpopulation als auch an der antiinflammatorischen Ly6C^{lo} Makrophagenpopulation im Herzen beteiligt zu sein. Ly6C^{lo} Monozyten tragen wiederum nicht maßgeblich zur Entstehung von Ly6C^{lo} Makrophagen bei [98].

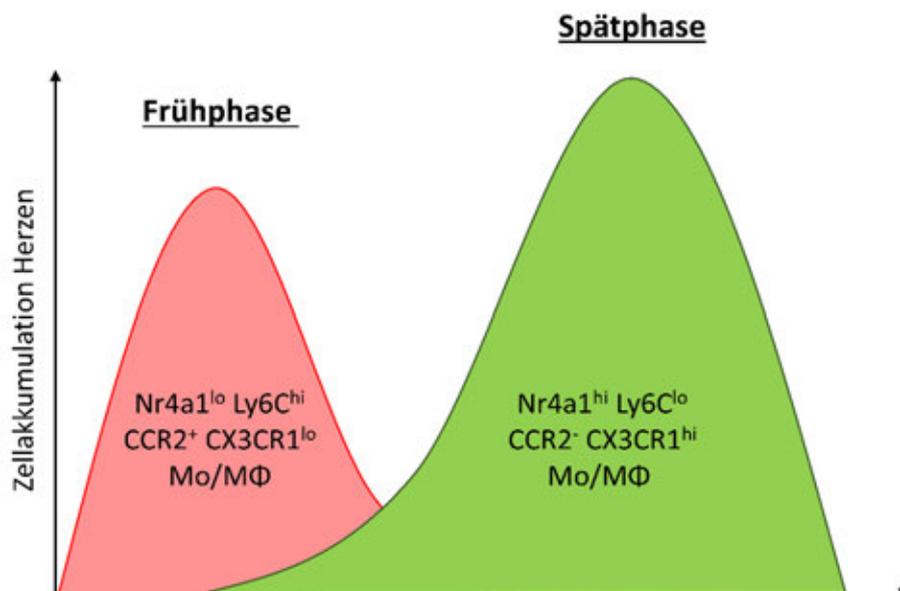


Abbildung 2 - Biphasische Immunantwort der Monozyten und Makrophagen als Reaktion auf ein ischämisches kardiales Ereignis (erstellt nach [85, 95, 96, 98])

(Mo = Monozyten, MΦ = Makrophagen; rot = inflammatorischer Phänotyp, grün = antiinflammatorischer Phänotyp)

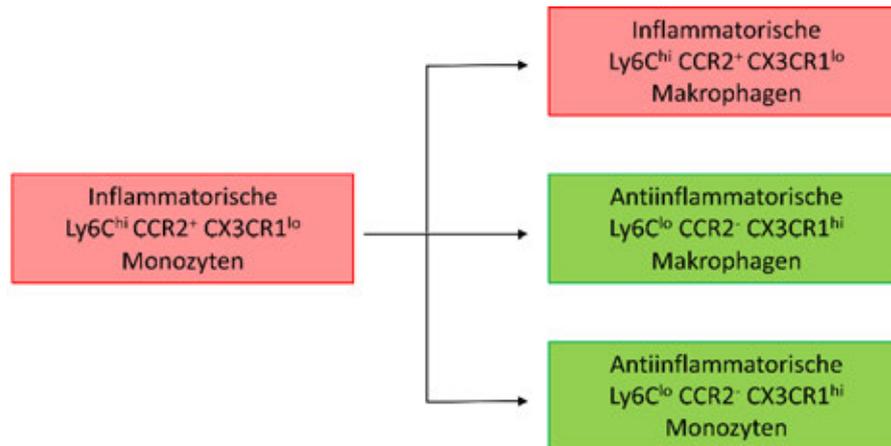


Abbildung 3 - Abstammung unterschiedlicher Populationen von Monozyten und Makrophagen im Herzen (erstellt nach [98])

Die strenge Modulation und der reibungsfreie Ablauf der komplexen Entzündungsreaktion nach einem kardialen Perfusionsdefizit ist von besonderer Bedeutung. Eine gestörte Eindämmung der Entzündungsreaktion schränkt den Ablauf regenerativer Prozesse ein und beschleunigt die linksventrikuläre Dilatation [85]. Eine Erhöhung der Ly6C^{hi} Monozyten, auf Kosten der Ly6C^{lo} Population, zeigte zum Beispiel einen hemmenden Einfluss auf die Eindämmung der Entzündungsreaktion und ging mit einem gesteigerten pathologischen linksventrikulären Remodeling einher [100].

Der sequenzielle Ablauf der beiden Phasen der Entzündungsreaktion ist Voraussetzung für einen adäquaten Heilungsprozess. Sowohl eine gestörte Abfolge der Frühphase als auch der 2. Phase führt zu einer Beeinflussung der Heilung mit Veränderungen in der Zusammensetzung des Granulationsgewebes. Eine selektive Ablation der inflammatorischen Phase stellt somit keinen Ansatz dar, die Remodeling-Prozesse nach Myokardinfarkt positiv zu beeinflussen [95].

Nicht nur die Rolle einzelner Zellpopulationen und deren potenzielle Modulation ist von großem Interesse, auch die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen des Immunsystems rückt immer mehr in den Fokus aktueller Studien. T-Lymphozyten konnten regulatorische Eigenschaften bei der Einwanderung von Monozyten nach Myokardinfarkt zeigen. In Mäusen, die eine Defizienz der CD4(+) T-Zellen aufweisen, wurde eine gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten, inklusive inflammatorischer Monozyten, in das Herz beobachtet. Dies hatte ebenfalls eine gestörte Eindämmung der Entzündungsreaktion mit einem vermehrten pathologischen Remodeling zur Folge [101]. Auch B-Lymphozyten scheinen durch die Produktion von „CC-Chemokine Ligand 7“ (CCL7) an der Einwanderung inflammatorischer Monozyten beteiligt zu sein [102].

2.2.1. Kardiale Makrophagen im Steady State und als Reaktion auf eine kardiale Läsion

Neben den einwandernden Monozyten aus dem Blutstrom stellen auch residente kardiale Makrophagen einen Bestandteil der angeborenen Immunantwort im Rahmen des akuten Entzündungsprozesses nach Myokardinfarkt dar [103-105].

Entgegen früherer Annahmen konnten neuere Studien nachweisen, dass residente Makrophagen nicht ausschließlich von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ausgehen. Fate-Mapping-Analysen zeigten, dass ein Teil der residenten Makrophagen während der Embryonalentwicklung im Dottersack unabhängig von HSC gebildet wird und bis in das Erwachsenenalter persistiert [106, 107]. Residente Makrophagen finden sich in unterschiedlichen Organen. Dabei weisen sie eine hohe Diversität auf, welche als Hinweis dafür zu sehen ist, dass ein spezifisches Milieu im Gewebe zur Differenzierung der residenten Makrophagen beiträgt [104].

Unter Steady State Bedingungen lassen sich Monozyten und Makrophagen im adulten Herzen in vier Subpopulationen einteilen: 1. CCR2⁻ MHC II^{hi}, 2. CCR2⁻ MHC II^{lo}, 3. CCR2⁺ MHC II^{hi} 4. CCR2⁺ MHC II^{lo}. Während die CCR2⁻ Populationen einen gemischten Ursprung (HSC und Dottersack) aufweisen, entstehen die CCR2⁺ Populationen ausschließlich während der Hämatopoese im Knochenmark [105]. Unter Steady State Bedingungen sind die residenten Makrophagen zur Selbsterneuerung durch Proliferation fähig und können folglich weitgehend unabhängig von Blutmonozyten bestehen [103].

Neben Unterschieden im Ursprung der Populationen weisen diese auch divergente funktionelle Eigenschaften auf. CCR2⁺ Makrophagen exprimieren unter anderem IL-1 β , MCP1, MCP3, CXCL1, IL6 sowie TNF- α und sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung akuter Entzündungsreaktionen beteiligt [103, 105]. Isolationen von CCR2⁻ Makrophagen aus neonatalen und adulten Herzen konnten verdeutlichen, dass diese potenziell reparative Eigenschaften und somit einen positiven Einfluss auf die Infarktheilung besitzen. Unter Steady State Bedingungen stellen die CCR2⁻ Makrophagen sowohl im neonatalen als auch im adulten Herz die prädominante Population dar [105].

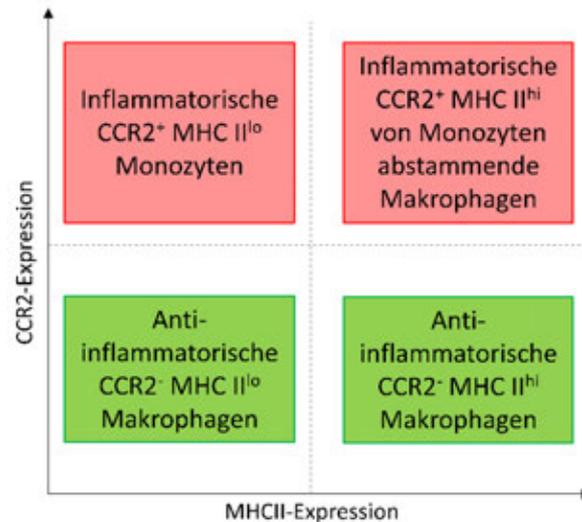


Abbildung 4 - Populationen kardialer Makrophagen und Monozyten im Steady State (erstellt nach [105])

In Reaktion auf eine kardiale Läsion reagiert das adulte Herz mit der selektiven Rekrutierung von Blutmonozyten und der Expansion der inflammatorischen CCR2⁺ MHCII^{hi} von Monozyten abstammenden Makrophagen auf Kosten der potenziell reparativen residenten CCR2⁻ Makrophagen. Die gezielte Modulation der CCR2⁺ Makrophagen zeigte positive Eigenschaften nach Myokardinfarkt und stellt somit einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Die Blockade der Einwanderung von CCR2⁺ Blutmonozyten in das Herz durch die Applikation eines CCR2-Inhibitors konnte zur Aufrechterhaltung der residenten CCR2⁻ Makrophagen beitragen und führte zu einer verminderten Entzündungsreaktion sowie einer gesteigerten Gefäßneubildung [105].

Insgesamt wird deutlich, dass nach einem akuten Myokardinfarkt komplexe immunologische Vorgänge im Herzen ablaufen, welche einer präzisen Kontrolle unterliegen müssen. Störungen im Ablauf der Entzündungsreaktion beeinflussen das Outcome nach einem Myokardinfarkt negativ. Ein tieferes Verständnis der genauen Mechanismen kann helfen, potenzielle Therapiestrategien zu entwickeln. Die Untersuchung der Mechanismen nach einem akuten Myokardinfarkt ist somit Gegenstand der aktuellen Forschung.

3. Retinoid-X-Rezeptoren

3.1. Struktur, Vorkommen und Liganden der Retinoid-X-Rezeptoren

Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) sind nukleäre Rezeptoren aus der Gruppe der Steroid-/Thyroid-Hormonrezeptoren. Durch die Bindung an spezifische Sequenzen der DNA im Bereich der Promotorregion von Genen fungieren sie als Transkriptionsfaktoren. Hierbei liegen RXR als Dimere mit anderen nukleären Rezeptoren (Heterodimere) oder mit weiteren RXR (Homodimere) vor [108].

RXR lassen sich in die drei Subtypen (α , β und γ) einteilen, welche jeweils mehrere Isoformen aufweisen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Vorkommens im Gewebe. Während RXR β ubiquitär zu finden sind, werden RXR α vorwiegend in der Epidermis, dem Darm, den Nieren und der Leber exprimiert. Daneben sind RXR α unter anderem auch im Herzen sowie im Gehirn anzutreffen. RXR γ finden sich vor allem im Gehirn sowie in Muskel- und Fettgewebe. Das verbreitete Vorkommen von RXR in unterschiedlichen Regionen des Körpers kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass RXR an einer Reihe unterschiedlicher physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge im Körper beteiligt sind [108, 109].

Die Modulation der RXR erfolgt durch unterschiedliche Liganden. Abhängig davon mit welchen weiteren nukleären Rezeptoren RXR Heterodimere bilden, unterscheidet man zwischen „permissiven“ und „nicht-permissiven“ Heterodimeren. „Permissive“ Heterodimere werden entweder durch einen selektiven RXR-Agonisten (ein Retinoid) oder durch einen Liganden des Partnerrezeptors moduliert. Die Regulation von „nicht-permissiven“ Heterodimeren ist nur durch einen Liganden des Partnerrezeptors möglich. Diese Art der Heterodimere spricht nicht auf die alleinige Anwesenheit eines Retinoids an. Die Bindung eines RXR-Liganden kann die Aktivität des Heterodimers allerdings bei Vorhandensein eines Liganden des Partnerrezeptors erhöhen (Synergismus) [108, 109].

In Abwesenheit eines Liganden sind RXR-Dimere im Zellkern lokalisiert. Durch die Bildung eines Komplexes mit einem Corepressor wird ihre Funktion jedoch unterdrückt. Als Folge der Aktivierung durch einen Liganden, löst sich der Corepressor von dem Dimer und wird durch einen Coaktivator ersetzt. Infolgedessen kann das RXR-Dimer seinen regulatorischen Effekt auf die Transkription ausüben [110].

Bezüglich des natürlichen Liganden der RXR herrscht Kontroversität. Obwohl die 9-cis-Retinsäure mit hoher Affinität an RXR bindet und ursprünglich als natürlicher Ligand angesehen wurde, konnte diese in vielen Arbeiten nicht endogen gefunden werden [111]. In den letzten Jahren war es möglich, weitere potente Vitamin A Derivate nachzuweisen. Hierunter finden sich Dihydro-

Einleitung

Retinsäure, All-trans-Retinaldehyd und β -apo-14'-carotinal, welche als physiologische RXR-Liganden in Erwägung gezogen werden [112]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass RXR Fettsäuren wie Docosahexaensäure (DHA) [113] und Phytansäure binden [114]. Ein Mangel an DHA in Ratten und Menschen führte zu Veränderungen ähnlich wie in RXR α defizienten Mäusen [113]. Fettsäuren scheint somit eine wichtige Bedeutung bei der Funktion der RXR zuzukommen. Mehrere synthetische Liganden der RXR sind bekannt und können hergestellt werden [112]. Das Retinoid Bexaroten findet zum Beispiel bereits in der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms Anwendung [115].

Die gegenwärtige Herausforderung bei der Entwicklung neuer Retinoide als potenzielle Pharmaka liegt in der gezielten Modulation von RXR in bestimmten Zelltypen und in der selektiven Regulation bestimmter Funktionen von RXR (so genannte selektive RXR-Modulatoren) [112].

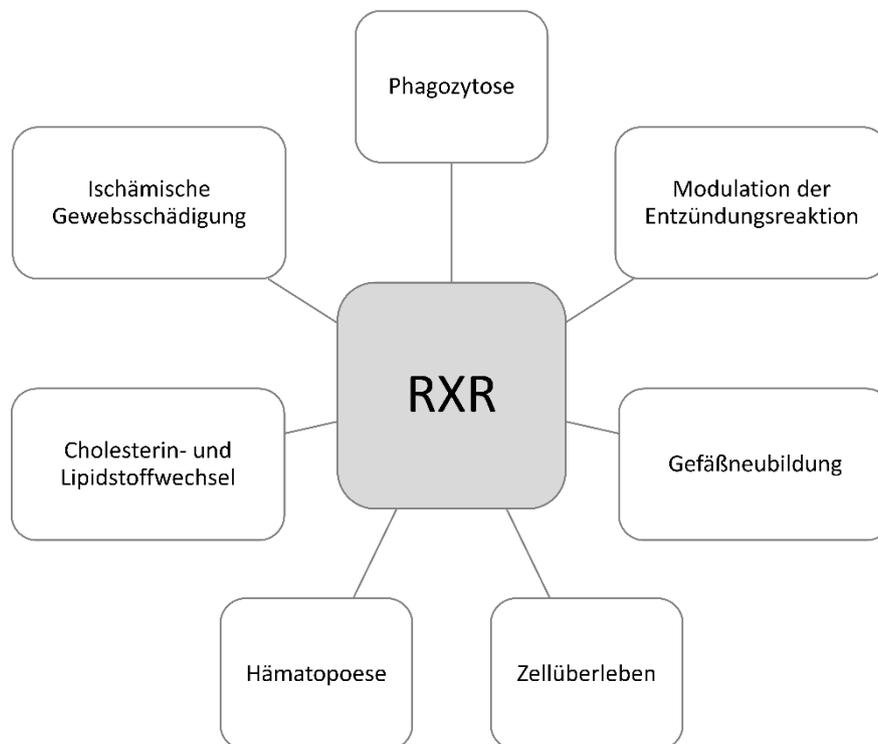


Abbildung 5 - Überblick über unterschiedliche Funktionen von Retinoid-X-Rezeptoren (erstellt nach [116])

3.2. Funktion der Retinoid-X-Rezeptoren bei der Hämatopoese und beim Zelltod

Während nachgewiesen werden konnte, dass der Retinsäure-Rezeptor α (RAR α) eine entscheidende Funktion bei der Hämatopoese besitzt, ist die Rolle der RXR noch nicht ausreichend verstanden [117].

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass ein Fehlen des RXR α alleine keine Auswirkung auf die Hämatopoese besitzt [118]. Allerdings ist eine verminderte Expression des RXR α bei der terminalen Differenzierung von neutrophilen Granulozyten notwendig. Eine Überexpression störte

den physiologischen Ablauf des Differenzierungsprozesses [119]. Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Beteiligung des RXR α bei der Entstehung von Leukämien. Ein Funktionsverlust des RXR α in Mäusen verhinderte das Auftreten der akuten Promyelozytenleukämie [120, 121].

Während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen findet eine Erhöhung der Expression des RXR α statt. Dies kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass RXR α am Differenzierungsprozess von Monozyten beteiligt ist [122]. Der genaue Stellenwert des RXR α bei diesem Vorgang wird jedoch noch kontrovers diskutiert, da unter der Zugabe von RXR-Agonisten eine Blockade der Differenzierung beobachtet werden konnte [123].

Insgesamt scheint somit eine Beteiligung von RXR bei der Hämatopoese, welche über die Funktion als Bindungspartner der RAR hinausgeht, wahrscheinlich.

Neben der Beteiligung von RXR bei der Hämatopoese gibt es auch Anhaltspunkte für eine Involvierung des RXR α bei der Apoptose von Zellen. Tarrade et al. konnten RXR α als elementaren Bestandteil bei der Induktion der Apoptose durch Arsenitrioxid identifizieren. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Retinsäure den apoptotischen Effekt von Arsenitrioxid verstärkt [124]. Darüber hinaus gelang es Mehta et al., einen Apoptose-induzierenden Effekt des RXR α ohne Anwesenheit von Arsenitrioxid nachzuweisen [125].

3.3. Makrophagen und Retinoid-X-Rezeptoren

Makrophagen weisen eine hohe Expressionsrate des RXR α auf. Dahingegen wird RXR β in geringerem Ausmaß exprimiert und RXR γ ist nicht nachweisbar. Neben RXR sind 29 weitere Kernrezeptoren in Makrophagen zu finden, wovon ungefähr 15 als Heterodimere mit RXR interagieren [116].

Die Funktion von Retinoid-X-Rezeptoren wurde durch die Applikation von agonistisch wirkenden Substanzen in zahlreichen Studien untersucht [123, 126-128]. Eine selektive Deletion des RXR α in Zellen der myeloiden Reihe wurde allerdings erst in wenigen Arbeiten durchgeführt [129, 130]. Folglich ist die Funktion des RXR α in Makrophagen noch weitgehend unverstanden und bedarf weiterer Untersuchungen.

3.4. Der Einfluss von RXR auf das Immunsystem

Nukleären Rezeptoren kommt eine elementare Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort zu. Sie sind unter anderem an der Modulation der Genexpression inflammatorischer Botenstoffe während akuter Entzündungsreaktionen beteiligt, beeinflussen die Zellmigration, das Zellüberleben und die Gefäßneubildung [116, 130, 131].

Durch eine Modulation der Genexpressionsprogramme tragen RXR zur Rekrutierung von

Einleitung

Leukozyten in das Entzündungsareal bei. Der RXR α wirkt unter anderem an der Regulation der Chemokine CCL2, CCL6 und CCL9 in Makrophagen sowie der Adhäsionsmoleküle VCAM- und „Intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) auf Endothelzellen mit [130, 132]. Allerdings wurden hinsichtlich der Bedeutung des RXR α bei der Leukozytenmigration teils kontroverse Beobachtungen gemacht. Sanz et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit RXR-Agonisten wie Bexaroten oder 9-cis-Retinsäure zu einer verminderten Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom in das Gewebe und infolgedessen zu einer Hemmung der initialen Phase der Entzündungsreaktion führt. Hierbei konnte die zentrale Beteiligung des RXR α /PPAR γ -Heterodimers identifiziert werden [132]. Nunez et al. stellten wiederum einen erniedrigten Spiegel an CCL6 und CCL9 in Mäusen, welche einen Mangel an RXR α in Zellen der myeloiden Reihe aufwiesen, fest. Diese Tiere zeigten folglich eine verminderte Einwanderung von Leukozyten in das Areal der akuten Entzündungsreaktion [130].

Hinsichtlich des Überlebens von Immunzellen konnte ein Einfluss von RXR und weiteren nukleären Rezeptoren auf die Lebensdauer von Makrophagen nachgewiesen werden. Die Behandlung von Mäusen mit 9-cis-Retinsäure oder einem LXR-Agonist führte zur Hochregulation anti-apoptotischer Gene – hierunter CD51, „B-cell lymphoma 2-like 1“ (BCL2L1) und „NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein“ (NAIP1) – wohingegen pro-apoptotische Gene – Caspasen, Fas-Ligand, DNasen – vermindert exprimiert wurden [116].

Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien eine antiinflammatorische Wirkung von RXR-Agonisten deutlich. Die Behandlung von LPS-stimulierten Monozyten und Makrophagen beziehungsweise Mikroglia mit 9-cis-Retinsäure ging mit einer Erhöhung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 einher. Gleichzeitig fand sich eine Reduktion der inflammatorischen Botenstoffe IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie von Stickstoffmonoxid (NO) [128, 133].

Die anti-entzündliche Wirkung von Retinoiden beruht auch auf einer verminderten Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix sowie einer gesteigerten Angiogenese [131, 134, 135]. All-trans-Retinsäure verringert die Expression der Matrix-Metalloproteinase 9 durch eine Modulation der „Tissue Inhibitor Metalloproteinase“ (TIMP-1). Zudem senkt sie die Konzentration der Urokinase (u-PA) bei paralleler extrazellulärer Akkumulation von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 (PAI-2) [134, 135]. Die Aktivierung von RXR in Makrophagen führt über die Hochregulation angiogenetisch wirkender Substanzen wie VEGF-A, „Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor“ (HB-EGF) und Lipopolysaccharid-induzierter Tumornekrosefaktor- α -Faktor (LITAF) zu einer vermehrten Neubildung von Gefäßen [131].

Eine Beteiligung des RXR α bei der akuten Entzündungsreaktion und hierbei insbesondere der

Einleitung

antiinflammatorischen Phase konnte ebenfalls an einem Modell der IL-1beta-induzierten Entzündungsreaktion in der Leber veranschaulicht werden. IL-1beta vermittelte den Export des RXR α aus dem Zellkern und führte somit zu erniedrigten nukleären RXR α -Spiegeln [136].

Im Gegensatz dazu gibt es allerdings auch Hinweise auf eine Verstärkung der Entzündungsreaktion durch die Aktivierung von Retinoid-Rezeptoren. Yamada et al. zeigten, dass eine Gabe von Retinsäure im Rahmen einer Tuberkulose-Infektion in Mäusen eine gesteigerte Einwanderung von Makrophagen und T-Zellen und eine vermehrte inflammatorische Zytokinreaktion zur Folge hat. Die behandelten Tiere wiesen jedoch eine mildere Infektion mit Tuberkulose-Bakterien auf, wodurch auf einen positiven Effekt der Retinsäure bei der Entwicklung einer Tuberkulose-Infektion geschlossen wurde [137]. Nunez et al. beobachteten eine geringere Anfälligkeit für die Entwicklung einer Sepsis, eine mildere Verlaufsform dieser und eine höhere Überlebensrate in RXR α -KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen [130].

Die Relevanz von RXR bei der Regulation der Immunantwort wird dadurch deutlich, dass ein Fehlen von RXR zu einer fehlgeleiteten Immunantwort führt und mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten bei einer gestörten Selbsttoleranz einhergeht [129].

Mäuse mit einer Deletion des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ (PPAR γ) beziehungsweise RXR α fielen durch die Entwicklung einer Glomerulonephritis vom Autoimmuntyp auf. Diese kennzeichnete sich durch eine ausgeprägte Infiltration von Makrophagen, durch eine Ablagerung von IgG/IgM im Mesangium der Glomeruli sowie durch einen Verlust der Selbsttoleranz mit Bildung von Autoantikörpern gegen Kernantigene (ANA) [129].

Als Ursache für die gestörte Immunantwort konnte eine Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen in PPAR γ /RXR α -KO-Mäusen identifiziert werden. Physiologischerweise steigert die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Makrophagen die Expression von Rezeptoren und Opsoninen, welche für die phagozytotische Aktivität der Immunzellen notwendig sind [129]. Darüber hinaus fördert die Phagozytose die Polarisierung von Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp und ist für die Erhaltung der Selbsttoleranz von Bedeutung [138, 139]. Die Sekretion anti-entzündlicher Zytokine wie IL-10 und TGF- β wird gesteigert bei gleichzeitiger Hemmung der Transkription entzündungsfördernder Moleküle. In PPAR γ /RXR α -KO-Mäusen wurde eine Einschränkung der Phagozytoseaktivität beobachtet, welche mit einer Beeinträchtigung der Differenzierung von Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp und folglich mit einer gestörten Eindämmung der Entzündungsreaktion einherging. Dies konnte auf eine transkriptionelle Regulation von Rezeptoren und Opsoninen, welche für die Phagozytose benötigt werden (hierunter Mertk, Axl, CD36, C1q und FCGR1) durch PPAR γ /RXR α zurückgeführt werden. Dementsprechend konnte durch die Gabe eines RXR α -Agonisten die

Expressionsrate dieser Gene gesteigert werden [129]. In gleicher Weise konnten Cramer et al. nachweisen, dass der RXR-Agonist Bexaroten in einem Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung die Aufnahme von β -Amyloid durch Mikroglia induziert und infolgedessen die Entzündungsreaktion abmildert [140].

Die zentrale Rolle der RXR bei der Modulation der Immunantwort konnte in zahlreichen Vorarbeiten belegt werden. Der genaue Stellenwert der einzelnen RXR in diesem Zusammenhang und die zugrundeliegenden Mechanismen bleiben allerdings weiterhin unzureichend geklärt. Weitere Studien werden notwendig sein, um die Funktionen der einzelnen RXR bei Entzündungsreaktionen besser zu verstehen und um die Rolle von RXR-Agonisten in der Therapie verschiedener Erkrankungen zu evaluieren.

3.4.1. Beteiligung von RXR bei der Immunmodulation von ischämischen Erkrankungen

In Vorarbeiten wurde die Funktion des RXR/PPAR γ -Heterodimers im Rahmen zerebraler Ischämien untersucht. Hierbei erfolgte ein transientser Verschluss der A. cerebri media für 30 min mit anschließender Reperfusion. Die Aktivierung des RXR/PPAR γ -Heterodimers mit dem Agonisten Bexaroten konnte neuroprotektive Eigenschaften bei der Gabe bis zu 4,5 h nach dem ischämischen Ereignis zeigen. Die behandelten Mäuse wiesen eine geringere Infarktgröße, ein vermindertes neurologisches Defizit sowie eine verringerte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke auf. Hierbei wurde der Modulation der peripheren Immunantwort eine entscheidende Rolle zugesprochen. Bexaroten konnte die Milzatrophy und die nachfolgende immunsuppressive Wirkung als Reaktion auf eine ischämische Hirnläsion verbessern. Das Ausmaß der Atrophie konnte abgemildert werden und es wurde eine verstärkte Polarisation von neutrophilen Granulozyten zum antiinflammatorischen N2-Typ in der Milz beobachtet. Das erhöhte Vorkommen von antiinflammatorischen N2-Neutrophilen in der Milz ging mit einer verstärkten Infiltration dieser Zellen in das ZNS einher [126].

Ähnliche Beobachtungen wurden in einem Ischämie-/Reperfusion (I/R)-Modell des Hippocampus gemacht. All-trans-Retinsäure verringerte den Untergang von Neuronen, bedingt durch einen Mangel an Sauerstoff sowie Glucose, und demonstrierte somit neuroprotektive Eigenschaften [141].

Wayman et al. stellten bei Untersuchungen an Herzen aus Ratten fest, dass die Applikation von Liganden der PPAR- α/γ zu einer verminderten Infarktgröße nach einem akuten ischämischen Ereignis im Herzen führt. Die Regulation der Genexpression durch PPAR erfolgt mittels Bildung von Heterodimeren mit RXR [142].

Folglich scheint die Modulation der nukleären Rezeptoren vielversprechende Auswirkungen auf Remodelingprozesse nach akuten ischämischen Ereignissen zu haben.

II. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Sterbefälle in den letzten Jahren rückläufig waren, stellen die ischämischen Herzkrankheiten weltweit noch immer die führende Todesursache dar [1, 2]. Bisher ist es noch nicht gelungen, eine kausale Therapie des akuten Myokardinfarktes zu finden. Trotz einer optimalen myokardialen Reperfusionstherapie erreicht die Zahl der Todesfälle und die Zahl der Patienten, die eine chronische Herzinsuffizienz als Folge entwickeln, noch immer ein beachtliches Ausmaß [78]. Aufgrund der zunehmend alternden Gesellschaft, ist zukünftig mit einer steigenden Belastung des Gesundheitssystems durch kardiovaskuläre Erkrankungen zu rechnen [3]. Folglich kommt der Entwicklung neuer Therapiestrategien des akuten Myokardinfarktes eine wichtige Bedeutung zu.

Makrophagen als integraler Bestandteil der akuten Immunreaktion besitzen schon lange eine bedeutende Rolle bei den pathophysiologischen Prozessen nach einem ischämischen Ereignis [93, 94]. Somit sind Makrophagen in den letzten Jahren immer mehr zum Interesse der aktuellen Forschung geworden. Dabei ist es gelungen, diese immer präziser zu charakterisieren und erste Ansätze zu entwickeln, durch eine gezielte Modulation der Makrophagen den Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion positiv zu beeinflussen [95, 105].

Auch Retinoid-X-Rezeptoren sind durch ihr weit verbreitetes Vorkommen im Organismus zu einem Ziel potenzieller Therapiemöglichkeiten bei unterschiedlichen Krankheitsprozessen im Körper geworden [109]. In zahlreichen Studien wurde ihre Bedeutung bei akuten Entzündungsreaktionen hervorgehoben [127-133, 136, 137, 140, 143-147]. Es konnten bereits positive Effekte der Applikation von RXR-Agonisten sowie PPAR-Agonisten im Rahmen akuter ischämischer Erkrankungen nachgewiesen werden [126, 141, 142]. Eine spezifische Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen zur Untersuchung der Prozesse nach einem akuten Myokardinfarkt wurde bisher allerdings noch nicht durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Auswirkung einer Monozyten- und Makrophagen-spezifischen Deletion des RXR α auf die Umbau- und Heilungsprozesse im Herzen nach einem akuten ischämischen Ereignis untersucht werden. Die zentrale Frage hierbei ist, ob eine gezielte Modulation von Retinoid-X-Rezeptoren das Outcome von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt verbessern kann und somit eine neue therapeutische Option zur Behandlung des akuten Myokardinfarktes darstellen könnte.

Zielsetzung der Arbeit

Dabei sollen folgende weitere Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Funktion kommt dem RXR α bei der akuten Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt zu?
2. Welche zugrundeliegenden Prozesse im Herzen unterliegen einer Modulation durch den RXR α ?
3. Wie ändert sich die Zusammensetzung der Makrophagenpopulationen nach einem akuten Myokardinfarkt und welcher Stellenwert kommt der Expression von MHCII zu? Ist der RXR α an der Modulation der Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen beteiligt?
4. Besitzen selektive RXR-Agonisten ein therapeutisches Potenzial bei einem akuten Myokardinfarkt?

III. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien und Reagenzien

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphate-Buffered Saline (10X)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ 16% Formaldehyd Methanol frei	Thermo Scientific, Waltham, USA
Hoechst 33342	Thermo Scientific, Waltham, USA
EDTA (0.5 M)	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™, Carlsbad, USA
Buffer RLT Plus	Qiagen, Hilden, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Life Science/Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glucose 10% Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Saponin von quillaja bark	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluorescence Mounting Medium	DAKO GmbH, Jena
Cytochalasin D 10 mM, 1:4000	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM/F-12, HEPES, ohne Phenolrot	Thermo Scientific, Waltham, USA
Live Cell Imaging Solution	Life Technologies Corporation, OR USA
pHrodo™ Red E. coli BioParticles™ Conjugate for Phagocytosis	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™, Carlsbad, USA
Protease Inhibitor Cocktail	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Collagenase from Clostridium histolyticum Type I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase from Clostridium histolyticum Type XI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase D	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dispase II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deoxyribonuclease I Typ II	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hyaluronidase from bovine testes	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly(I:C) high molecular weight	InvivoGen, San Diego, USA
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CD45 MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Roti®-GelStain	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Scientific, Waltham, USA

Material und Methoden

1.2. Puffer und Lösungen

FACS-Puffer (PBS/0,5% BSA/2 mM EDTA)	500 ml 1x Phosphate-Buffered Saline 2,5 g Albumin Fraktion V 2 ml EDTA 0,5M
Sort-Puffer	990 µl Puffer RLT Plus 10 µl 2-Mercaptoethanol
Ammoniumchlorid-Lysinlösung (10x)	20 g Ammoniumchlorid 1,5 M 2,5 g Kaliumhydrogencarbonat 0,1 M 5 ml 0,5 M EDTA 250ml destilliertes, sterilfiltriertes Wasser
Ammoniumchlorid-Lysinlösung (1x)	5 ml Ammoniumchlorid-Lysinlösung (10x) 45 ml Aqua ad iniectabilia
Ablösungspuffer	500 ml 1x Phosphate-Buffered Saline 0,09 g Glucose 3 ml EDTA 0,5M
Sucroselösung	30 g Sucrose 100 ml Phosphate-Buffered Saline
Stock-Lösung	50 ml 1x Phosphate-Buffered Saline 0,5 g Albumin Fraktion V 0,25 g Saponin von quillaja bark
Block Lösung	4,5 ml Stock Lösung 500 µl Ziegenserum
Paraformaldehyd 4%	10 ml Paraformaldehyd Methanol-frei 30 ml 1x Phosphate-Buffered Saline
Waschlösung	100 ml 10x Phosphate-Buffered Saline 900 ml destilliertes Wasser 1 ml Tween 20
RIPA Lysis and Extraction Buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
TBE - Puffer (5X)	AppliChem GmbH, Darmstadt

1.3. Operationszubehör

30G Kanüle	BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA
1 ml Spritze	Injekt-F, B.Braun, Melsungen
Transpore	3M Deutschland GmbH, Neuss
Zellstofftupfer	Orbis Dental, Münster
19G Metallkanüle	
MiniVent Type845	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
5-0 Prolene	Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt
7-0 Prolene	Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt
8-0 Prolene	Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt
Mikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Kaltlichtlampe CL 6000 LED	Carl Zeiss, Jena
TMF-3402 Rektaltemperatur Messfühler	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
Temperatur-Kontrollmodul-0904	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach
5-0 Prolene-Faden	Ethicon, Norderstedt

Material und Methoden

Tupfer	Sugi Eyespear pointed tip, Kettenbach, Eschenburg
Mullkompressen	Noba Verbandmittel Danz, Wetter

1.4. Pharmaka

Isofluran CP	Cp-pharma, Burgdorf
Buprenovet	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Dorbene vet	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
Alzane	Zoetis Deutschland GmbH, Ulm
Flumazenil	Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing;
NaCl 0,9% Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Heparin- Natrium- 25.000	Ratiopharm GmbH, Ulm
Cotrim-ratiopharm Ampullen	Ratiopharm GmbH, Ulm
[¹⁸ F]Fluorodesoxyglucose	PET Net GmbH, Erlangen

1.5. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Fc-Rezeptor-Block		
Purified Ratte anti-Maus CD16/CD32 (Maus BD Fc Block™)	1:50	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FACS-Antikörper		
BV 421 anti-Maus CD115	1:100	Biolegend, San Diego, USA
APC anti-Maus CD115	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PerCP/Cyanine5.5 anti-Maus CD45	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-Maus NK-1.1	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-Maus Ly6G	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-Maus TCR β chain	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-Maus Ter119	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE anti-Maus CD11c	1:100	Biolegend, San Diego, USA
APC anti-Maus CD64	1:100	Biolegend, San Diego, USA
BV 421™ anti-Maus F4/80	1:50	Biolegend, San Diego, USA
BV 421™ anti-Maus Ly-6C	1:100	Biolegend, San Diego, USA
BV 510™ anti-Maus Ly-6C	1:100	Biolegend, San Diego, USA
PE/Cy7 anti-Maus I-A/I-E	1:100	Biolegend, San Diego, USA
FITC Maus anti-Maus CD45.1	1:100	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
APC-Cy™7 Maus anti-Maus CD45.2	1:100	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Histologie		
Primäre, unkonjugierte Antikörper		
Monoklonaler Ratte anti-Maus F4/80	1:50	eBioScience Thermofisher Scientific, Waltham, USA
Ki-67/MKI67	1:50	Novus Biologicals, Littleton, USA

Material und Methoden

Purified Ratte anti-Maus CD31	1:25	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Polyklonaler Kaninchen anti-Maus GFP	1:50	Thermofisher Scientific, Waltham, USA
Sekundäre Antikörper		
Ziege anti-Ratte IgG Fc _γ -Fragment spezifisch Cy3 konjugiert	1:200	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa-Fluor 488 konjugiert	1:200	Thermofisher Scientific, Waltham, USA
Primäre, konjugierte Antikörper		
Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor 350 konjugiert	1:100	Thermofisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Maus I-A/I-E-Ak Alexa Fluor 647 konjugiert	1:200	Thermofisher Scientific, Waltham, USA

1.6. Kits und Primer

RNeasy® Plus Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	Merck Millipore, Burlington, USA
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	BIO-RAD, Hercules, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermofisher Scientific, Waltham, USA
Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array	R & D Systems, Minneapolis, USA
Primer RXRα	Eurofins Scientific, Luxemburg
Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
Mm_Ccr2_3_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden

1.7. Laborbedarf

BD Discardit II 2ml/10ml/20ml	Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA
20G/24G/27G Kanülen	BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA
Non-Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, U-Bottom, Falcon	Corning, Mexiko
Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, Flat-Bottom, Falcon	Corning, Mexiko
96 Well PCR Platte	VWR International GmbH, Radnor, USA
Costar 6 Well Plate, flat bottom	Corning, New York, USA
TC-Schale 35, Standard	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Sicherheitsklingen	Aesculap AG, Tuttlingen
Cell strainer: 70 µm Nylon, Falcon®	Corning, New York, USA
Cell Trics 50 µm	Sysmex Partec, Görlitz
Cell strainer, 40 µm Nylon, Falcon®,	Corning, NY, USA
Falcon 15ml/50ml High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom	Corning, New York, USA

Material und Methoden

Transferpipetten 3,5 ml	Starstedt, Nümbrecht
ep Dualfilter T.I.P.S	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe
Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm	Sakura Finetek
Menzel Gläser Superfrost Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig
Microvette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorf Safe-Lock Tubes (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Neonatale EKG-Elektroden	3M, St. Paul, USA

1.8. Tierhaltung

Standard Makrolon Käfigen vom Typ II long	Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italy
Pelletiertes Alleinfuttermittel	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
SmartFlow	Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Käfigwechselstation	Techniplast, Varese, Italy
Alleinfuttermittel für Mäuse mit Tamoxifen	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

1.9. Geräte

Eppendorf epT.I.P.S	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810R (Serien-Nr: 5811BP568226)	Eppendorf, Hamburg
FTA-1, Aspirator with trap flask	BioSan, Riga, Lettland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5810R (Serien-Nr: 5811BP568226)	Eppendorf, Hamburg
Accu-jet pro	Brand, Wertheim
IKA MS 3 basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
ABX Micros 60	Horiba, Ltd., Kyoto, Japan
Trocken- und Wärmeschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen,
FACS BD LSF Fortessa	Becton Dickson, Franklin Lakes, USA
Beckman Coulter Astrios	Beckman Coulter, Brea, USA
Axio Imager M2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System	BIO-RAD, Hercules, USA
CryoStar NX70	Thermo Scientific, Waltham, USA
Verdampfer	Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf
µPET-Scanner, Inveon P120	Siemens, München
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel (IKA)
Tecan GENios Microplate Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
HERAfreeze Top	Thermo Scientific, Waltham, USA
Forma™ High-Performance Lab Freezer	Thermo Scientific, Waltham, USA

Material und Methoden

Gel Doc 2000	BIO-RAD, Hercules, USA
Mikrowelle Typ AM925ESW	Siemens, München
PerfectBlue™ gel system, Mini L	VWR International, Radnor, USA
MiniRocker MR-1	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt
BioVet	Spin Systems Pty Ltd., Brisbane, Australia

1.10. Software

Inveon acquisition workplace Version 1.5.0.28	Siemens Medical Solutions, Knoxville, USA
Quantitative Gated SPECT (QGS)	Cedars-Sinai, Los Angeles, USA
GraphPad Prism Version 6.2	GraphPad Software, La Jolla, USA
FlowJo Version 10.2	FlowJo, LLC, Ashland, USA
AxioVision SE64 Rel. 4.9.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Image Studio™ Lite	LI-COR Biosciences; Lincoln, USA
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Redmond, USA
Adobe® Acrobat® XI	Adobe Systems, San José, USA

2. Versuchstiere

Die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde am Mausmodell durchgeführt.

Aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft und der Ähnlichkeit physiologischer Vorgänge werden Mäuse schon lange Zeit als Versuchstiere für die Untersuchung von pathologischen und physiologischen Vorgängen im Menschen verwendet. Die kurze Generationszeit, die unkomplizierte, kostengünstige Haltung und Zucht von Mäusen, sowie die Verfügbarkeit unterschiedlicher Linien erweisen sich hierbei als sehr vorteilhaft [148].

Um den Einfluss einer Monozyten- und Makrophagen-spezifischen Deletion des RXR α auf das Outcome nach einem akuten Myokardinfarkt zu untersuchen, kamen unten beschriebene Mauslinien zum Einsatz.

Die Tierversuche wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (§ 8 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006, zuletzt geändert am 20.11.2019 durch Artikel 101 G). Eine Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern ist erfolgt.

2.1. Tierhaltung und Zucht

Die Zucht der Tiere erfolgte im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung. Anschließend wurden die Tiere im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrum, Campus Großhadern, untergebracht. Die Tiere wurden im Walter-Brendel-Zentrum in dafür eingerichteten Räumen gehalten. Die Hygienebedingungen entsprachen den erforderlichen Richtlinien (FELASA erweitert). Die Mäuse wurden in IVC-System THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen (Typ M II, verlängert) mit max. 5 Tieren/

Material und Methoden

Käfig gehalten. Wasser und Standardfutter für Labornager stand den Tieren unbegrenzt zur Verfügung. Die Raumtemperatur wurde mittels eines Gebläsesystems (SmartFlow) konstant bei $22 \pm 1^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit bei $55 \pm 5\%$ gehalten. Das Lichtprogramm erfolgte über einen Zeitschalter für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus. Zur Beschäftigung erhielten die Tiere neben einem Haus aus Tonkarton grobe Einstreu, Holzwolle, Nestlets sowie Kosmetiktücher.

Die Reinigung des Tierstalls erfolgte einmal pro Woche. Die Käfige wurden autoklaviert und die Tiere in frische Käfige gesetzt. Futter, Einstreu und Wasser wurden grundsätzlich in der Tierhaltung autoklaviert.

Das Öffnen von Käfigen sowie das Umsetzen von Tieren fanden unter einer Käfigwechselstation, bei einer Frontluftbarriere von 30 m/s, statt. Zur Vermeidung der Einschleppung von Krankheitserregern und zur Stressreduktion der Tiere wurde der Zugang zur Tierhaltung streng limitiert. Von der Tierhaltung zur Schleuse und zum Reinigungsraum bestand ein abfallender Druckgradient. Das Personal musste Schutzkleidung anlegen und gelangte über eine Nassschleuse in die Tierhaltung. Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde nach den FELASA Richtlinien überprüft.

Die Tiere wurden frühestens 6 Tage nach Anlieferung aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in den Versuch genommen, damit sie sich an die veränderten Umweltbedingungen adaptieren und vom Transportstress erholen konnten.

2.2. Mäusstämme

2.2.1. Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXRalpha^{flox/flox}

In wissenschaftlichen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine homozygote permanente Deletion des RXR α -Gens embryonal zu einer Letalität zwischen Entwicklungstag 13.5 und 16.5 führt. Ursächlich hierfür ist vor allem die gestörte Entwicklung der Herzventrikel [149].

Die Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXRalpha^{flox/flox} Mauslinie besitzt ein Tamoxifen-abhängiges Cre/lox site-spezifisches Rekombinationssystem, welches sowohl die örtlich als auch zeitlich spezifische Kontrolle von Genen gewährleistet [150].

Die Cre („cyclization recombination“) ist ein Enzym, welches die Rekombination zwischen zwei DNA-Erkennungssequenzen von jeweils 34 Basenpaaren - den so genannten loxP („crossing [x-ing]-over of bacteriophage P1“) - katalysiert. Das Enzym entstammt P1 Bakteriophagen und wurde zum ersten Mal erfolgreich Ende der 1980er/Anfang der 1990er Jahre verwendet [150, 151].

Das Grundprinzip des Cre/lox-Systems ist die Veränderung von DNA-Abschnitten eines bestimmten Gens mittels der Cre. Hierfür wird einem bestimmten Genabschnitt, durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen, je eine „loxP-site“ vor- und nachgeschaltet (das Gen

Material und Methoden

wird „gefloxt“). Die Orientierung der „loxP-sites“ entscheidet darüber, ob die Cre eine Deletion, Insertion oder Translokation eines DNA-Abschnittes katalysiert [152]. In den *Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXRalpha^{flox/flox}* Mäusen wurde das Exon 4 des RXR α -Gens „gefloxt“. Die Cre katalysierte hierbei die Deletion des DNA-Abschnittes. Exon 4 des RXR α -Gens codiert für einen Großteil der DNA-Bindungsstelle des RXR α und ist somit essenziell für die Funktion des Rezeptors. Das Fehlen von Teilen des Exons 4 führt somit zum Funktionsverlust des RXR α [153].

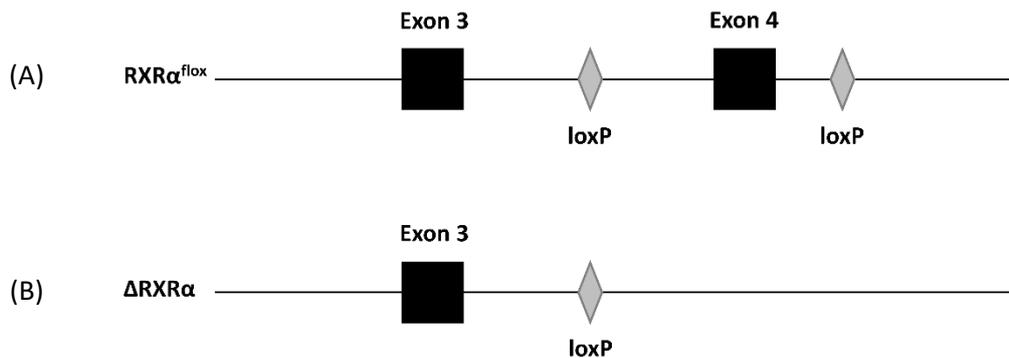


Abbildung 6 - Darstellung des RXR α -Gens in *Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR alpha^{flox/flox}* Mäusen (erstellt nach [153])

(A) Grundstruktur des RXR α -Gens

(B) Struktur des RXR α -Gens nach Rekombination durch die Cre

Durch die Fusion der Cre mit einer Hormonbindungsdomäne (HBD) wird eine präzise Kontrolle ihrer Aktivität erreicht. Das entstehende Fusionsprotein liegt in Abwesenheit des Liganden, durch Bindung an inhibitorische Komplexe, im inaktiven Zustand vor. Bindet der Ligand an die HBD, löst sich das Fusionsprotein von diesen inhibitorischen Komplexen und es kommt somit zur Aktivierung der Cre.

Das momentan erfolgversprechendste induzierbare Cre-System ist das Tamoxifen-abhängige Cre-ER-System, welches auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde [150]. Hierbei findet eine Fusion der Cre mit der HBD eines mutierten Estrogen-Rezeptors - ER(TAM) - statt. ER(TAM) hat im Vergleich zum normalen Estrogen-Rezeptor eine deutlich geringere Affinität für Estrogen, bindet allerdings das synthetische Steroid 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT). Da es sich bei 4-OHT um eine kostenintensive Substanz handelt, kann alternativ der günstigere Vorläufer Tamoxifen appliziert werden. Dieser wird dann in der Leber enzymatisch zu 4-OHT umgewandelt [154]. Die Verwendung dieses Systems gewährleistet die zeitliche Kontrolle der Cre.

Um neben der zeitlichen auch eine örtliche Kontrolle der Cre-Aktivität zu erreichen, befand sich die Cre unter dem Promotor des *CX₃CR₁*-Gens. *CX₃CR₁* ist der Rezeptor des Chemokins Fraktalkin (FKN). FKN liegt im Organismus sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vor. Das lösliche FKN induziert die Migration von Leukozyten, insbesondere von Monozyten und T-Zellen. Die Zell-gebundene Form ist unter anderem auf Endothelzellen lokalisiert, wobei die Expression im Rahmen einer Entzündungsreaktion deutlich erhöht wird. Diese spielt bei der Adhäsion von

Material und Methoden

Leukozyten, vor allem Monozyten und T-Zellen, eine bedeutende Rolle [155]. Die Wirkung des Chemokins Fraktalkin wird über die Bindung an den Fraktalkin Rezeptor CX₃CR₁ vermittelt. Hierbei handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, welcher in hoher Konzentration unter anderem von der Mehrheit der Monozyten und einem Teil der Makrophagen exprimiert wird [156]. Die Abstammung von CX₃CR₁ positiven Zellen gewährleistet auch eine Expression der Cre in Makrophagenpopulationen, welche das CX₃CR₁-Gen herunter reguliert haben [157]. Somit konnte zusätzlich zu der zeitlichen- auch eine örtliche Kontrolle der Cre-Aktivität erreicht werden.

RXR alpha^{flox/flox} Mäuse sind bereits publiziert und wurden als vital, normal züchtend und nicht belastet beschrieben [153, 158].

Als Kontrolltiere (+/+) wurden Wildtyp-Geschwistertiere verwendet, welche ein „gefloxtes“ RXR α -Gen aufwiesen, aber keine Cre exprimierten.

2.2.1.1. Tamoxifengabe

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte die intraperitoneale Applikation von Tamoxifen bereits etabliert werden. Unter Verwendung eines Cre/lox-Systems wurde durch die Tamoxifenapplikation eine spezifische Markierung von Makrophagen während der Embryonalentwicklung erreicht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass eine Linie residenter Makrophagen im Gewebe existiert, welche sich unabhängig von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und ohne Einfluss des Transkriptionsfaktors Myb entwickelt [106].

In neueren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass auch oral verabreichtes Tamoxifen bei identischer Dosierung in gleicher Weise zur Markierung von Makrophagen während der Embryonalentwicklung und im Dottersack verwendet werden kann [159]. Andere Studien belegten sogar die schnellere Wirkung und die bessere Aktivität der Cre sowie eine geringere embryonale Toxizität bei oraler im Vergleich zur intraperitonealen Gabe von Tamoxifen [160].

Im Rahmen dieser Arbeit kam die orale Applikation von Tamoxifen zur Anwendung. Die Tiere wurde für vier Wochen mit Tamoxifen-haltiger Nahrung gefüttert. Dabei wurden 400 mg Tamoxifen pro kg verwendet, welches einer Aufnahme von ca. 40 mg Tamoxifen per kg Körpergewicht einer Maus mit 25 g entsprach. Die applizierte Dosis wurde bereits in wissenschaftlichen Studien untersucht und als effizient und nicht toxisch beschrieben [161]. Als Nebenwirkung der Behandlung wurde ein Gewichtsverlust innerhalb der ersten drei Tage von ca. 10% beschrieben, welcher auf die Verweigerung der Aufnahme des Tamoxifen-haltigen Futters zurückgeführt werden konnte. Dieser Gewichtsverlust war allerdings nur vorübergehend zu verzeichnen. Es folgte eine kontinuierliche Gewichtszunahme über die nächsten vier Wochen. Die

Material und Methoden

Entwicklung des Körpergewichts der Tiere, welche Tamoxifen-Futter erhielten, war dabei mit der von Mäusen auf Standardfutter vergleichbar [161]. Zur Überwachung der Tiere während der Tamoxifen-Applikation wurde ein Score Sheet verwendet.

Die Dauer der Tamoxifen-Fütterung betrug vier Wochen. Vorarbeiten konnten zeigen, dass nach dieser Zeitspanne eine ausreichende Aktivität des Cre/lox-Systems zu verzeichnen war [161].

2.2.2. Cx3cr1-GFP Reportermäuse

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) kommt physiologisch in der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* und der Seefeder *Renilla reniformis* vor. Die Besonderheit des GFP liegt in der Codierung der Fluoreszenz auf der DNA, wobei das Fluorophor durch eine autokatalytische Reaktion aus einem Teil des Proteins entsteht [162].

Die Cx3cr1-GFP Mauslinie wurde bereits im Jahr 2000 durch Jung et al. beschrieben. Diese Linie weist ein EGFP („enhanced“ GFP) anstelle der ersten 360 bp des Cx3cr1-Locus auf [163]. Im Unterschied zum herkömmlichen GFP besitzt das EGFP ein stärkeres Fluoreszenzsignal [164].

Die Expression des CX₃CR₁ in Monozyten und Makrophagen bzw. die Abstammung von CX₃CR₁ exprimierenden Zellen (siehe Abschnitt III.2.2.1) ermöglichte die Markierung von Monozyten und Makrophagen im Gewebe.

2.2.3. Mx1-Cre; Myb^{flx/flx}

Bei der Mx1-Cre; Myb^{flx/flx} Mauslinie befindet sich die Cre unter der Kontrolle des ubiquitär vorkommenden Promoters Mx-1, welcher durch die Gabe von rekombinantem Poly(I:C) aktiviert wird. Durch repetitive intraperitoneale Gabe von rekombinantem Poly(I:C) wird der Transkriptionsfaktor Myb, welcher essenziell für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen ist, ausgeschaltet [165-168]. Die daraus resultierende Myeloablation wird durch Knochenmarkstransplantation, ohne weitere Konditionierungsregime, behoben. Die Mx1-Cre; Myb^{flx/flx} Empfängertiere (auf C57Bl6 Hintergrund) werden durch die Expression des CD45.2 Allels differenziert. Die Knochenmarkspendertiere haben einen C57Bl6 CD45.1 Hintergrund. Somit ermöglicht dieses Mausmodell eine Differenzierung zwischen Knochenmark-abhängigen und Knochenmark-unabhängigen Makrophagen.

2.2.3.1. Knochenmarkstransplantation

Bei den Mx1-Cre; Myb^{flx/flx} Empfängertieren wurde das Knochenmark durch die Applikation von rekombinantem Poly(I:C) - 10 µg/g Körpergewicht - ablädiert. Im Mittel erfolgte hierfür die intraperitoneale Gabe von 4 Einzeldosen (jeden 2. Tag). 3 Tage vor der ersten Gabe von Poly(I:C) wurde begonnen, die Tiere über 4 Wochen mit angesäuertem und mit Antibiotika versetztem Wasser (pH = 3,1) zu behandeln. Eine zusätzliche Konditionierung oder Bestrahlung war nicht

Material und Methoden

notwendig. Die Knochenmarktransplantation fand an Tag 7 statt. Dafür wurden Knochenmarkspendertiere (C57Bl6 CD45.1 Hintergrund) in tiefer Isoflurannarkose durch Genickbruch getötet und das Knochenmark aus den großen Röhrenknochen aufbereitet (siehe Abschnitt III.2.2.3.1.1). Anschließend erfolgte die Injektion von circa 10 Mio. Zellen in einem Volumen von 150 µl über einen Katheter in eine laterale Schwanzvene der Empfängertiere (C57Bl6 CD45.2 Hintergrund). Die Überwachung der Tiere erfolgte über 3 Wochen mithilfe eines Score-Sheets. Die Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) fand nach einer Erholungsphase von 4 Wochen statt.

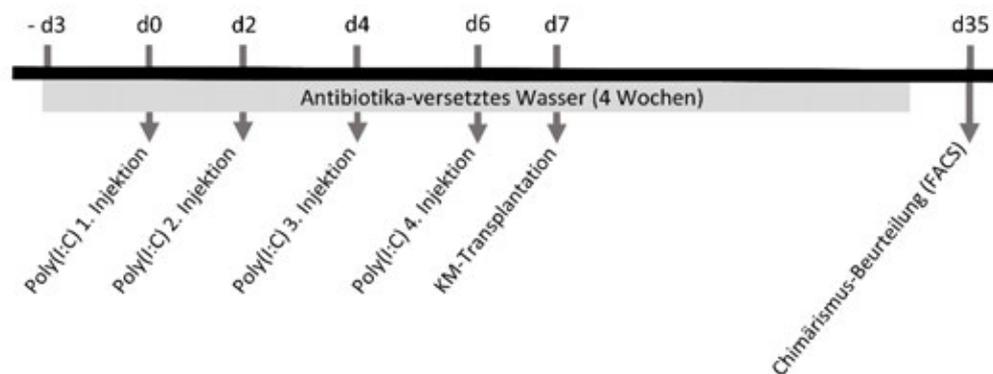


Abbildung 7 – Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Erstellung von Knochenmarkchimären

2.2.3.1.1. Vorbereitung des Knochenmarks für die Transplantation

Die langen Röhrenknochen wurden nach der Entnahme frei präpariert, in eine Petrischale mit sterilem PBS auf Eis gelegt und unter einer Sterilbank an beiden Enden mit einem Skalpell eröffnet. Mithilfe einer 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle wurden die Knochen von einer Seite mit PBS + 2% FBS durchgespült. Die Zellen wurden mit einer 10 ml Spritze und einer 20G Kanüle aufgenommen, gespült und vereinzelt. Anschließend wurden diese durch einen 70 µm Sieb in ein 50 ml Falcon gegeben und für 7 min bei 350 x g (rcf) und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Lösung des Pellets in 3 ml Ammoniumchlorid-Lysin. Die Lyse wurde nach 5 min mit 3 ml PBS gestoppt und die Proben wurden zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS gelöst und es erfolgte die Zugabe von 1 µl der Probe zu 99 µl PBS + 0,5% BSA. Von der entstandenen Lösung wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau vermischt. Unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl aus 10 µl bestimmt. Dabei kam folgende Formel zur Anwendung:

$$\frac{\text{Zellzahl der 64 kleinen Quadrate}}{4} \times 100 \times 2 \times 10^4$$

Die Probe wurde daraufhin so verdünnt, dass eine Zellzahl von 10 Mio. Zellen in 150 µl erreicht wurde. Mittels Katheter wurden den Empfängertieren die Zellen über eine laterale Schwanzvene appliziert.

2.2.3.1.2. Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation

Nach 4 Wochen wurde den Tieren durch eine Punktion der V. facialis 50 µl Blut abgenommen. Um die Stressbelastung der Tiere zu minimieren, erfolgte die Applikation von Buprenorphin 30 min vor dem Eingriff und die Narkotisierung mit Isofluran für die Punktion. Die Vene wurde mithilfe einer Lanzette am Unterkiefer punktiert und das Blut in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Die Blutstillung erfolgte mit einem Wattestäbchen.

Das Blut wurde entsprechend des Abschnittes 4.2 vorbereitet und der Chimärismus in der Durchflusszytometrie beurteilt. Es wurden nur Tiere in den Versuch genommen, bei denen mehr als 90% der Monozyten CD45.1 positiv waren.

3. Operative Eingriffe

3.1. Narkose

Alle Untersuchungen wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Bei einer Narkose werden verschiedene Komponenten beeinflusst, um die angemessene Durchführbarkeit des operativen Eingriffs zu gewährleisten. Hierzu gehören unter anderem der Bewusstseinsverlust (Hypnose) mittels Anästhetika, der Schmerzverlust (Analgesie) durch den Einsatz von Opioiden, der Verlust von Reflexen (Areflexie) mithilfe von Anästhetika, Opioiden und Muskelrelaxanzien, sowie die Muskelrelaxation mittels Muskelrelaxanzien [169]. Die Substanzen wurden in NaCl verdünnt und die Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.) mithilfe einer 30G Kanüle und einer 1 ml Spritze. Nachfolgend soll auf die verwendeten Pharmaka genauer eingegangen werden.

Als Opioid fand Fentanyl in einer Konzentration von 0,05 mg/kg Körpergewicht Anwendung. Fentanyl ist die Leitsubstanz der Opioid-Analgetika in der Anästhesie. Mit einer Potenz von 125 (im Bezug zu Morphin) wird es zu den hochpotenten Opioiden gezählt. Durch seine hohe Lipophilie flutet es rasch im ZNS an und besitzt somit einen schnellen Wirkungseintritt. Die Wirkdauer ist mit 20-30 min relativ kurz. Somit ist es zwar gut steuerbar, allerdings wird keine postoperative Analgesie erreicht. Um diese zu gewährleisten wurde zusätzlich das Opioid Buprenorphin in einer Dosierung von 0,1 mg/kg Körpergewicht in die Nacken- oder Kniefalte injiziert. Dies weist mit 6-8 h eine deutlich längere Wirkdauer auf als Fentanyl und besitzt eine analgetische Potenz von 30-40 (im Vergleich zu Morphin) [169].

Des Weiteren wurde der Wirkstoff Medetomidin in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Dieser gehört zur Gruppe der α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten und wirkt dosisabhängig unter anderem sedativ, analgetisch und muskelrelaxierend. Medetomidin ist ebenfalls lipophil und flutet somit schnell im ZNS an. Die Wirkdauer beträgt 1-2 h [170, 171].

Aus der Gruppe der Benzodiazepine wurde das kurzwirksame Midazolam in einer Konzentration

Material und Methoden

von 5,0 mg/kg Körpergewicht verwendet. Neben der hypnotischen und der analgetischen Wirkung zeigt es auch muskelrelaxierende, anxiolytische und antikonvulsive Eigenschaften [169].

Um die Injektion der Narkotika in die Bauchhöhle zu erleichtern und die Stressbelastung zu minimieren, wurden die Tiere vor der i.p.-Injektion durch Inhalation von 5,0 Vol. % Isofluran kurzzeitig narkotisiert. Hierfür wurde die Maus in eine durchsichtige Plexiglasröhre gebracht. Diese war an einer Seite an eine Absaugvorrichtung und an der gegenüberliegenden Seite an einen Verdampfer, über welchen ein 5%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch in die Röhre geleitet wurde, angeschlossen. Nachdem der Stellreflex erloschen war, wurde die Maus aus der Plexiglasröhre genommen und die i.p.-Injektionen durchgeführt. Hierbei wurde stets darauf geachtet, die Substanzen nicht in die Blase oder den Darm zu applizieren. Um die Maus von äußeren Reizen abzuschirmen, wurde diese in eine Narkosebox gebracht. Durch Überprüfung des Flexorreflexes wurde in regelmäßigen Abständen evaluiert, ob eine Nachinjektion notwendig war.

Nach der Beendigung des Eingriffs wurde die Narkose mit Atipamezol (Dosierung 3,75 mg/kg), einem α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten, und Flumazenil (Dosierung 0,72 mg/kg) aufgehoben [169, 171].

3.2. Ischämie-Reperfusions-Modell (I/R-Modell)

Zur Induktion eines Myokardinfarktes kam das Ischämie-Reperfusions-Modell (I/R-Modell) zum Einsatz. Aufgrund der schnellen Verfügbarkeit einer perkutanen Koronarintervention heutzutage, kommt dieses Modell dem klinischen Alltag deutlich näher als die permanente Ligatur des RIVA. Somit eignet sich das I/R-Modell besonders gut zur Untersuchung der pathophysiologischen Grundlagen des akuten Myokardinfarktes [172].

Vor der Durchführung der Operation wurden die Mäuse wie im Abschnitt 3.1 beschrieben narkotisiert. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere mit dem Rücken auf eine Wärmeplatte gelegt. Der Kopf wurde auf einen Zellstofftupfer gebettet, die Extremitäten wurden mittels Klebestreifen und der Oberkiefer mithilfe eines Gummibands fixiert. Im Anschluss fand eine Enthaarung und Jod-Desinfektion des Halsbereiches sowie der linken Thoraxseite statt.

Nachdem die chirurgische Toleranz erreicht wurde, konnte ein etwa 1 cm langer Hautschnitt im Verlauf der Trachea durchgeführt werden. Die Trachea wurde unter Schonung der Glandula mandibularis freipräpariert und es erfolgte die Intubation unter Sicht mit einer 19G Metallkanüle. Die korrekte Lage des Tubus wurde durch Beobachten von gleichmäßigen Thoraxexkursionen überprüft. Die anschließende Beatmung wurde mit einem Intubationsgerät (MiniVent) bei einer Atemfrequenz von 150/min und einem Atemvolumen von 200 μ l durchgeführt.

Die Maus wurde unter einem Mikroskop mit Kaltlichtlampe platziert. Die Körpertemperatur

Material und Methoden

während des Eingriffs wurde mithilfe einer Rektalsonde sowie eines Temperatur-Kontrollmoduls durchgehend auf 37,5°C gehalten.

Es folgte ein Hautschnitt auf Höhe des 2. Interkostalraumes. Der M. pectoralis und der M. rectus thoracis wurden auf dieser Höhe durchtrennt, um Sicht auf die Zwischenrippenmuskulatur zu erhalten.

Unter Schonung der A. mammaria sinistra wurde der 2. Zwischenrippenraum mit einer Mikroschere eröffnet. Um ein geeignetes Sichtfeld auf die linke Herzkranzarterie herzustellen, wurde die 2. und 3. Rippe mit einem Faden (5-0 Prolene) je zweifach umstochen sowie nach kranial und kaudal aufgespannt.

Anschließend wurde das Perikard eröffnet und der RIVA aufgesucht. Um die Lunge zu schützen, wurde das Perikard über die Pleura gelegt und mit einem in Jod getränkten Tupfer befestigt. Im Folgenden wurde der RIVA mit einem Faden umstochen und ligiert. Zwischen Faden und Herzmuskel wurde ein Platzhalter, bestehend aus einer 30G Kanüle und einem Polyethylenschlauch, gelegt. Das Ablassen des Herzmuskelgewebes im Versorgungsgebiet des RIVA konnte als Zeichen einer erfolgreichen Gefäßligatur herangezogen werden. Der eröffnete Thorax wurde mit einer in NaCl getränkten Mullkompressen abgedeckt, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern.

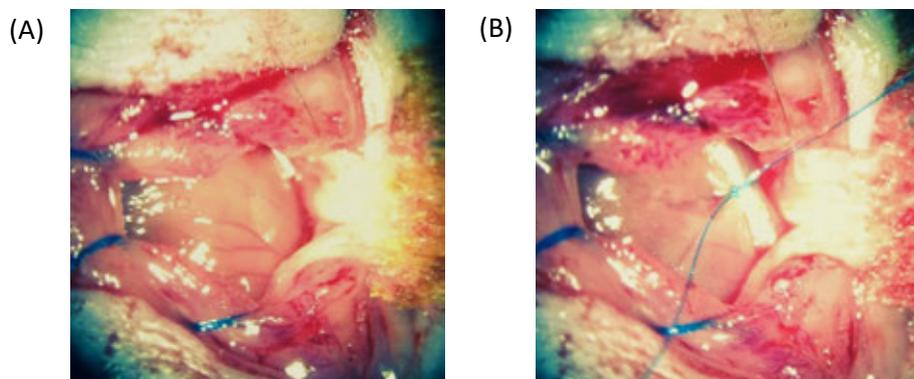


Abbildung 8 - Ischämie-Reperfusionen-Modell

(A) Darstellung des RIVA im 2. Interkostalraum (B) Ligation des RIVA unter Verwendung eines Platzhalters

Nach einer 30-minütigen Ischämiezeit wurde der Platzhalter entfernt und somit die Reperfusion des Herzmuskels gewährleistet.

Im Anschluss wurden die Spannfäden entfernt und der Thorax mit zwei bis drei Einzelknopfnähten verschlossen. Der Verschluss des M. pectoralis und des M. longus thoracis erfolgte ebenfalls mittels Einzelknopfnähten. Die Haut wurde anschließend mit fortlaufenden Nähten verschlossen und die Wunde mit Jod desinfiziert. Die gesamte Operationszeit betrug ca. 60 min.

Im nächsten Schritt fand die Antagonisierung der Narkose statt. Hierfür wurden Atipamezol (3,75mg/kg Körpergewicht) und Flumazenil (0,72mg/kg Körpergewicht) subkutan appliziert.

Material und Methoden

Somit wurde gewährleistet, dass die Tiere kontrolliert auf einer Wärmeplatte erwachen. Bis zum Erreichen einer suffizienten Eigenatmung fand eine maschinelle Beatmung statt. Daraufhin wurde die Extubation durchgeführt und die Tiere wurden in den Käfig gelegt, welcher sich unter einer Wärmelampe befand. Um eine suffiziente Analgesie zu garantieren, erhielten die Tiere über fünf Tage, unter engmaschiger Beobachtung, Buprenorphin subkutan (0,1 mg/kg Körpergewicht) zweimal täglich. Die Tiere wurden postoperativ mittels eines Score-Sheets überwacht.

Zusätzlich wurden bei Kontrolltieren Scheinoperationen (Sham-Operationen) durchgeführt. Diese entsprachen vom Vorgehen her dem oben beschriebenen Operationsablauf. Allerdings wurde nur eine Umstechung des RIVA aber keine Ligation durchgeführt.

Damit ein Einfluss der Operation auf die Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden konnte, wurden nur Mäuse in die Auswertung einbezogen, welche die Operation für mindestens 24 Stunden überlebt haben.

3.3. Organentnahmen

Die Entnahme der Organe erfolgte je nach weiterführender Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Hierfür wurde die Maus in Narkose gelegt, auf dem Rücken gelagert und mittels Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Daraufhin wurde ein Hautschnitt auf Höhe des 2. Interkostalraumes gesetzt. Es erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des Herzens im 2. Zwischenrippenraum im 45° Winkel mit einer 2 ml Spritze (gefüllt mit 5 µl Heparin) und einer 27G Kanüle.

Anschließend wurde die Maus durch Genickbruch getötet. Als nächstes erfolgte die Eröffnung der Bauch- sowie Brusthöhle und es wurde ein Schnitt in die Leber gesetzt. Die Perfusion des Herzens erfolgte mit einer 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle, welche mit PBS gefüllt waren. Anschließend wurde das Herz präpariert und herausgenommen. Die Abgänge der großen Gefäße sowie die Herzohren wurden mitentfernt.

Für die Entnahme des Gehirns wurde das Foramen magnum frei präpariert. Der Schädel wurde entlang der Suturen vorsichtig aufgeschnitten und das Schädeldach aufgeklappt, um das Gehirn freizulegen und anschließend herauszulösen.

4. Durchflusszytometrie

4.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Messung und Analyse der physikalischen Eigenschaften von Partikeln wie zum Beispiel Zellen [173]. Synonym wird der Begriff FACS („fluorescence-activated cell sorting/sorter“) verwendet, wobei dieser streng genommen eine Handelsmarke bezeichnet [174]. Bei diesem Verfahren werden die relative Partikelgröße, die relative Granularität und die relative Fluoreszenzintensität bestimmt [173]. Geeignete Partikel besitzen eine Größe von 0,2 – 150 μm . Somit muss bei der Untersuchung von Zellen aus Gewebeverbänden zuerst eine Vorbereitung des Gewebes erfolgen [174].

Die Zellen fließen als Zellsuspension durch das Gerät, wobei sie nacheinander einzeln an einem oder mehreren Lasern unterschiedlicher Wellenlängen vorbei geleitet werden. Gelangt eine Zelle in den Laserstrahl, streut diese das Licht. Verschiedene Zellen weisen dabei unterschiedliche Signale auf und lassen sich dadurch charakterisieren. Die Intensität des Streulichts entlang der einfallenden Lichtachse (Vorwärtsstreulicht, „Forward Scatter“, FSC) ist proportional zur Größe der Partikel. Die Intensität des Seitwärtsstreulichts (Seitwärtsstreulicht, „Side Scatter“, SSC) hingegen stellt ein Maß für die Granularität oder Komplexität von Partikeln dar. Das Streulicht wird gesammelt und von einem Detektor wahrgenommen [173, 174].

Neben der Charakterisierung von Partikeln anhand der Größe und der Granularität können auch unterschiedliche Zellbestandteile mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die Antikörper binden entsprechend des Schlüssel-Schloss-Prinzips an spezifische Antigene. Die Fluorochrome der Antikörper werden durch das Laserlicht angeregt und emittieren anschließend Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen. Durch die Absorption von Photonen des Laserlichts werden die Elektronen der Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau angehoben. Hierdurch entsteht ein instabiler Zustand (angeregter Zustand). Nach kurzer Zeit (Nanosekunden) kehren die Elektronen wieder in ihren energetisch stabilen Ausgangszustand zurück, wobei Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert wird. Das emittierte Licht kann dann durch Detektoren gemessen werden [174]. Aufgrund eines Energieverlustes während dieses Prozesses ist das emittierte Licht energieärmer und weist folglich eine größere Wellenlänge auf als das absorbierte Licht („stokes shift“) [175]. Die Intensität des Signals ist dabei ein Maß für die Menge des untersuchten Zellbestandteils. Um Spezifität eines Detektors für einen bestimmten Fluoreszenzfarbstoff zu erreichen kommen Filtersysteme zur Anwendung, welche dem Detektor vorgeschaltet werden [173]. Bandpassfilter sind nur für Wellen eines bestimmten Spektralbereiches durchlässig. Dieser liegt in der Regel im Bereich um das Emissionsmaximum eines bestimmten Fluorochroms. Dadurch wird eine Störung des Signals durch einfallendes Licht

Material und Methoden

aus anderen Lasern verhindert. Um den Einsatz mehrerer Laser bei einer Probe zu ermöglichen, sind diese hintereinander geschaltet. Die Zellen fließen nacheinander einzeln an den Lasern vorbei. Folglich werden die laserspezifischen Fluoreszenzsignale getrennt detektiert [174].

Somit erlaubt die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern eine genauere Analyse verschiedener Zellpopulationen anhand von Zellbestandteilen, wie zum Beispiel Oberflächenmolekülen.

Die eingesetzten Fluorochrome besitzen allerdings keine diskreten Anregungs- und Emissionsenergiemengen, sondern Anregungs- und Emissionsspektren. Diese Tatsache ist insbesondere bei der zeitgleichen Verwendung mehrerer Fluorochrome von Bedeutung. Hierbei kann es zu einer Überlappung der Emissionsspektren kommen. Dies führt dazu, dass ein Detektor Signale mehrerer Fluorochrome aufnimmt [174]. Um dennoch eine gute Auflösung sowie Abgrenzbarkeit der Zellpopulationen zu erhalten, ist eine Kompensation - zum Beispiel mithilfe von Beads (Mikropartikel aus Polystyrol) - notwendig. Ziel der Kompensation ist die Elimination des Signals eines bestimmten Fluorochroms aus den Nachbarkanälen [176]. Für jedes verwendete Fluorochrom wird eine eigene Positivkontrolle, bestehend aus Beads und Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Antikörper, erstellt. An die Oberfläche der Beads sind bereits Antikörper gekoppelt, welche die kappa-Leichtketten der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper binden [176]. Somit kann die Überlappung effektiv gemessen und durch Verrechnungsprozesse minimiert werden.

Die gemessenen Signale können auf unterschiedliche Weise dargestellt werden. Hier sind exemplarisch zwei Formate genannt. Das Histogramm trägt die Signalstärke (x-Achse) gegenüber der Zellzahl (y-Achse) auf. Um gleichzeitig zwei Parameter darzustellen, findet zum Beispiel der Contour Plot Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Software FlowJo 10.2 zur Analyse der Daten verwendet.

Im Falle einer Zell-Sortierung wurden die gewünschten Populationen im Anschluss an die Analyse in einem Puffer aufgefangen [174].

4.2. Vorbereitung der Blutproben

In einem 15 ml Falcon wurde Ammoniumchlorid-Lysinlösung vorgelegt und anschließend die Blutprobe dazu gegeben. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von 3 ml PBS, wodurch die Erythrozytenlyse gestoppt wurde. Es fand eine Zentrifugation für 7 min bei 350 x g (rcf) und 4°C statt. Der Überstand wurde vorsichtig mit einem Aspirator abgenommen, das Pellet erneut in Ammoniumchlorid-Lysinlösung suspendiert und die oben genannten Schritte wurden wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen in 50 µl Fc-Block suspendiert. Hierdurch wurde die unspezifische

Material und Methoden

Bindung des Fc-Anteils der später hinzugegebenen Antikörper an Fc-Rezeptor-tragende Zellen (wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen) im Gewebe verringert. Dies minimiert das Hintergrundsignal und trägt somit zu einer besseren Qualität des Fluoreszenzsignals bei. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte überführt und es folgte ein Inkubationsschritt für 10 min auf Eis. Dann wurden 50 µl des Antikörpermixes (siehe Tabelle 1) in jedes Well gegeben. Die Inkubation fand für 20 min lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C statt. Danach wurde erneut eine Zentrifugation durchgeführt und das Pellet in 200 µl FACS-Puffer suspendiert. Vor der Analyse fand ein Transfer der Proben in ein FACS-Röhrchen statt.

Tabelle 1 - Antikörper für die Vorbereitung der Blutproben

FACS Antikörper - Blut Subpopulationen	
APC anti-Maus CD115	1:100
PE/Cy7 anti-Maus I-A/I-E	1:100
BV 421 anti-Maus Ly-6C	1:100
FACS Antikörper - Blut Phagozytoseassay	
BV 421 anti-Maus CD115	1:100
FACS Antikörper - Blut Chimären	
BV 421 anti-Maus CD115	1:100
FITC anti-Maus CD45.1	1:100
APC-Cy™7 Maus anti-Maus CD45.2	1:100

4.3. Vorbereitung des Knochenmarks

Der Beginn erfolgte analog zur Vorbereitung des Knochenmarks für die Transplantation (siehe Abschnitt III.2.2.3.1.1). Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 50 µl Fc-Block suspendiert und in eine 96 Well-Platte überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Antikörper dazu gegeben und die Platte zur Inkubation für 20 min in den Kühlschrank bei 4°C gestellt.

Nach der Inkubationsphase wurden 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Platte erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 200 µl FACS-Puffer suspendiert und die Proben wurden durch einen 50 µl Sieb in ein FACS-Röhrchen überführt.

Tabelle 2 - Antikörper für die Vorbereitung des Knochenmarks

FACS Antikörper - Knochenmark	
BV 421 anti-Maus CD115	1:100

4.4. Vorbereitung des Gehirns

Für die Vorbereitung des Enzymmixes wurden je 100 µl Dispase (120 mg/ml), Collagenase D (50 mg/ml) und DNase I (3000 U/ml) zu 5 ml PBS gegeben. Nach der Entnahme des Gehirns wurde

Material und Methoden

dieses in zwei Hälften geteilt. Pro Gehirnhälfte wurden 2,5 ml Enzymmix verwendet. Das Gewebe wurde vorsichtig zerkleinert, in ein 50 ml Falcon überführt und für 30 min im Thermomixer bei 37°C und 400 rpm inkubiert.

In einer 6-Wellplatte wurden 6 ml FACS-Puffer vorgelegt und das verdaute Gewebe mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch einen 70-µm-Zellsieb gefiltert. Hierdurch wurde gewährleistet, dass möglichst alle Monozyten und Makrophagen (Durchmesser zwischen 12 und 20 µm) in die Lösung gelangen und größere Gewebsbestandteile zurückgehalten wurden. Mittels einer Transferpipette wurde die Flüssigkeit aus der 6-Wellplatte in ein 15 ml Falcon überführt.

Nach einer Zentrifugation bei 350 x g (rcf) und 4°C für 7 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 250 µl Fc-Block suspendiert und es erfolgte der Transfer der Proben in eine 96-Wellplatte (50 µl pro Well). In jedes Well wurden 2 µl der CD45 MicroBeads gegeben und es folgte eine Inkubation für 15 min im Kühlschrank bei 4°C.

Im Anschluss wurden in jedes Well 50 µl des Antikörpermixes gegeben und erneut für 20 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Danach wurden 150 µl FACS-Puffer in jedes Well pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in je 100 µl FACS-Puffer suspendiert. Nachfolgend wurde die magnetische Separation, wie im Protokoll der CD45 MicroBeads beschrieben, durchgeführt.

Bevor der Transfer in ein FACS-Röhrchen erfolgte, wurden die Proben durch ein 50 µm Sieb gefiltert.

Tabelle 3 - Antikörper für die Vorbereitung des Gehirns

FACS Antikörper - Gehirn	
PerCP/Cyanine5.5 anti-Maus CD45	1:100
PE anti-Maus NK-1.1	1:100
PE anti-Maus Ly6G	1:100
PE anti-Maus TCRβ chain	1:100
PE anti-Maus Ter119	1:100
PE anti-Maus CD11c	1:100
APC anti-Maus CD64	1:100
BV 421™ anti-Maus F4/80	1:50

4.5. Vorbereitung der Herzen

Die Herzen wurden in Petrischalen mithilfe eines Skalpell und einer Pinzette in 1-2 mm große Stücke zerkleinert. Für den Gewebeverdau wurde ein Enzymmix (siehe Tabelle 4) angesetzt. Es wurden je 6 ml des Enzymmixes zu den zerkleinerten Herzen gegeben. Die Probe wurde in ein 50 ml Falcon transferiert und anschließend im Thermomixer bei 37°C und 400 rpm inkubiert.

Material und Methoden

Die weiteren Schritte erfolgten äquivalent zur Vorbereitung des Gehirns (siehe Abschnitt III.4.4). Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4 - Enzymmix für den Gewebeverdau der Herzen

Enzymmix Herz	
Substanz	Menge pro Herz
Collagenase XI	1000 µl
DNase I	240 µl
Collagenase I	1800 µl
Hyaluronidase	120 µl
PBS	2800 µl

Tabelle 5 - Antikörper für die Vorbereitung der Herzen

FACS/Sort Antikörper - Herz	
PerCP/Cyanine 5.5 anti-Maus CD45	1:100
PE anti-Maus NK-1.1	1:100
PE anti-Maus Ly6G	1:100
PE anti-Maus TCRβ chain	1:100
PE anti-Maus Ter119	1:100
PE anti-Maus CD11c	1:100
APC anti-Maus CD64	1:100
BV 421™ anti-Maus F4/80	1:50
Zusätzliche FACS Antikörper - Herz Subpopulationen	
PE/Cy7 anti-Maus I-A/I-E	1:100
BV 510™ anti-Maus Ly-6C	1:100

4.6. Phagozytoseassay

4.6.1. Prinzip der pHrodo™ Red BioParticles®

„pHrodo™ Red BioParticles®“ ermöglichen die quantitative Messung der Phagozytoseaktivität von Zellen. Das Prinzip beruht auf einer Änderung der Intensität des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom pH-Wert. Dabei steigt die Intensität mit abnehmendem pH-Wert an. Aufgrund des erniedrigten pH-Werts in Phagosomen und Phagolysosomen lässt der Anstieg des Fluoreszenzsignals Rückschlüsse auf die phagozytotische Aktivität der Zelle zu.

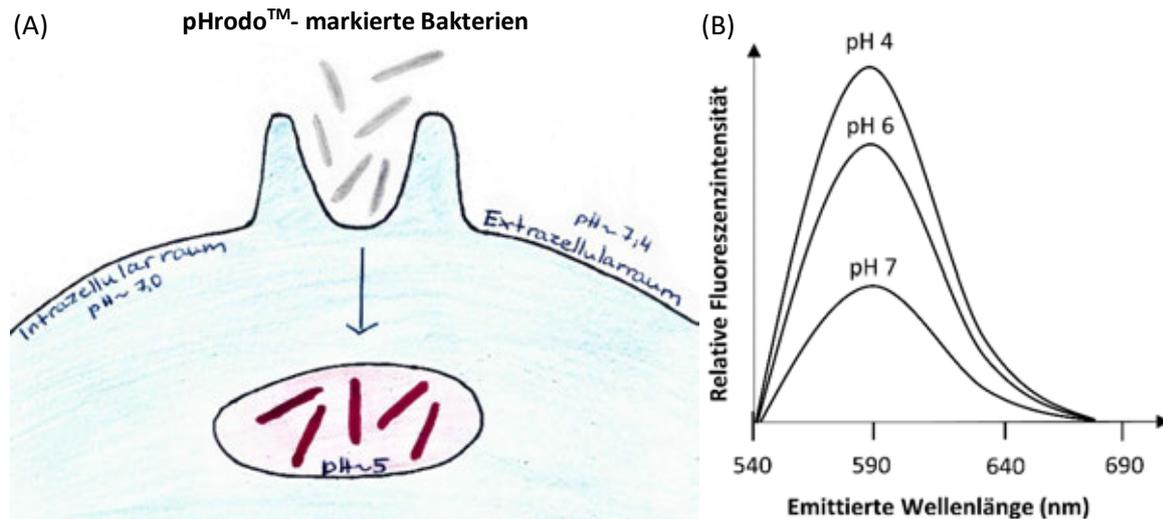


Abbildung 9 - Prinzip der „pHrodo™ Red BioParticles®“

(A) Veränderungen des pH-Wertes während der Phagozytose

(B) Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der „pHrodo™ Red BioParticles®“ vom pH-Wert (erstellt nach [177])

4.6.2. Vorbereitung der Proben für den Phagozytoseassay

Die Blutproben und die Herzen wurden analog zu Abschnitt 4.2 bzw. 4.5 vorbereitet. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Pellets in 100 µl DMEM/F-12 HEPES ohne Phenolrot suspendiert und in eine 96-Well-Platte mit Zellkulturbeschichtung überführt. Die Platte wurde für 1 h in einen Wärmeschrank (37°C) gestellt, um den Zellen die Möglichkeit zu geben sich abzusetzen und adhären zu werden. Nach 40 min wurde zur Negativkontrolle 0,04 µl Cytochalasin (Konzentration 2,5 mM) gegeben. Cytochalasin D ist ein Toxin, welches an Aktinfilamente bindet und so unter anderem deren Polymerisation verhindert. Da Aktinfilamente eine entscheidende Rolle bei der Phagozytose spielen, wird dieser Prozess durch das Toxin effektiv gehemmt [178].

Die „pHrodo™ BioParticles®“ wurden in 2 ml Live Cell Imaging Solution (Endkonzentration 1 mg/ml) gelöst. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde das Zell-Medium vorsichtig abgesaugt und 100 µl der Partikel zu jedem Well dazu gegeben. Zur Negativkontrolle wurden zusätzlich 0,04 µl Cytochalasin D pipettiert. Es erfolgte erneut eine Inkubation für 1 h in einem Wärmeschrank (37°C). Im Folgenden wurde die Flüssigkeit wieder vorsichtig abgenommen, durch 100 µl Ablösungspuffer ersetzt und die Platte für 15 min in den Wärmeschrank (37°C) gestellt. Nachdem sich die Zellen abgelöst haben, wurden diese in eine 96-Well-Platte ohne Zellkulturbeschichtung überführt und für 7 min bei 350 x g (rcf) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets in FACS-Puffer suspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

4.7. Vorbereitung der Kompensations-Beads

Für alle verwendeten Fluorochrome wurden Kompensations-Beads erstellt. Hierfür wurden je 100 µl FACS-Puffer in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Es folgte die Zugabe von je einem

Material und Methoden

Tropfen Negativ- und Positivkontrolle des Kompensationssets. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Speziesangabe des Sets mit der des verwendeten Antikörpers übereinstimmt. Danach wurde je 1 µl der für die Analyse verwendeten Antikörper hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von 10 min lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C. Anschließend wurden in jedes Gefäß 500 µl FACS-Puffer pipettiert und diese für 7 min bei 400 x g (rcf) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets in 500 µl FACS-Puffer suspendiert.

Die Analyse aller Proben wurde mithilfe des Cell Analyzer BD LSR Fortessa durchgeführt. Für die Zellsortierung wurde der Beckman Coulter Astrios eingesetzt.

5. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

5.1. RNA-Isolation

Nach dem Zellsortierungsprozess mit dem Beckman Coulter Astrios wurden die Zellen in je 350 µl eines RLT Plus Lysepuffers mit 2-Mercaptoethanol aufgefangen. Anschließend wurden 350 µl Ethanol (70%) zu jeder Probe dazu gegeben. Die Proben wurden in RNeasy MinElute Säulen mit Kollektionsgefäßen überführt und bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Die RNeasy MinElute Säulen wurden in neue Kollektionsgefäße gestellt, 700 µl RW1-Puffer auf die Membran jeder Säule gegeben und erneut für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nachdem die Kollektionsgefäße noch einmal ausgetauscht wurden, erfolgte die Applikation von 500 µl RPE-Puffer auf jede Membran und eine erneute Zentrifugation schloss sich an. Die Kollektionsgefäße wurden wieder ausgetauscht, 500 µl Ethanol (80%) zugegeben und es wurde für 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Kollektionsgefäß transferiert und es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit, um die Membranen zu trocknen. Nach Entsorgung der Überstände schloss sich ein Waschschriff mit RNase-freiem Wasser an, um die RNA aus den Membranen herauszulösen.

5.2. Reverse Transkription

Bevor mit der PCR begonnen werden konnte, wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu kam ein „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ zum Einsatz.

Als erstes wurde der 2 x RT Master-Mix, wie im Handbuch beschrieben, vorbereitet. Für jede Probe wurden 10 µl des RT Master-Mixes in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Es erfolgte die Zugabe der RNA-Proben, so dass ein Endvolumen von 20 µl pro Reaktionsgefäß erreicht wurde. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben in einen Thermocycler gestellt. Dieser führte die reverse Transkription in drei Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen durch (25°C, 37°C und 85°C). Die entstandene cDNA wurde anschließend für eine PCR verwendet oder bei -80°C gelagert.

5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.3.1. Grundlagen der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt ein Verfahren zur Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz („template“) dar. Mit ihrer Hilfe können Analysen selbst bei geringen Ausgangsmengen an DNA durchgeführt werden. Ihre Entdeckung in den 1980er Jahren war somit ein bedeutsamer Fortschritt in der Molekularbiologie [179].

Grundprinzip der PCR ist die Synthese eines komplementären DNA-Stranges aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten mithilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Voraussetzung für eine PCR ist, dass die Nukleotid-Sequenzen, welche die zu amplifizierende Region umschließen, bekannt sind. Dies ist notwendig, um spezifische Oligonukleotid-Primer zu verwenden. Die Primer binden an diese Sequenzen und dienen somit als Startpunkt für die DNA-Polymerase.

Die PCR läuft in mehreren Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturen ab, um immer die optimale Temperatur für den jeweiligen Schritt zu gewährleisten [179].

Der erste Schritt besteht in der Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94°C. Durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen entstehen folglich zwei Einzelstränge [179].

Anschließend wird die Temperatur auf ca. 40-50°C abgekühlt, um die Primerhybridisierung („primer annealing“) zu ermöglichen. Die genaue Temperatur ist unter anderem von der Primersequenz und der Primerlänge abhängig [179].

Danach findet die Elongationsphase bei ca. 70°C statt. Hierbei kommt eine thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die so genannte Taq-Polymerase, zum Einsatz. Diese katalysiert die Verknüpfung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten mit dem freien 3'-Ende des synthetisierten Stranges. Somit verläuft die Syntheserichtung von 5' → 3' [179]. Nachteil der Taq-Polymerase ist die fehlende 3' → 5'-Exonukleaseaktivität („proof reading“). Somit ist der Syntheseprozess mit der Taq-Polymerase fehleranfälliger als der bei Verwendung herkömmlicher DNA-Polymerasen [180].

Die Dauer eines Zyklus beträgt circa 2-3 Minuten und es werden in der Regel um die 30 Zyklen hintereinander durchgeführt. Durch die logarithmische Amplifikation kommt es insgesamt zu einer Anreicherung der DNA-Sequenz um den Faktor $10^5 - 10^6$ [179].

5.3.1.1. Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR)

Mithilfe der qPCR ist es möglich, eine präzise quantitative Bestimmung der DNA-Menge durchzuführen. Die Menge des PCR-Produkts kann dabei kontinuierlich während des Versuchsablaufs dargestellt werden. Um eine Visualisierung der DNA-Menge zu erreichen,

Material und Methoden

kommen Fluoreszenzfarbstoffe, wie zum Beispiel SYBR® Green, zum Einsatz.

SYBR® Green ist ein interkalierender Farbstoff, welcher während der PCR-Reaktion an doppelsträngige DNA bindet und somit eine optische Darstellung der DNA-Menge ermöglicht. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur DNA-Menge und erlaubt folglich eine Quantifikation dieser [181].

5.3.2. Durchführung der qPCR

Die qPCR wurde mithilfe des SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Kits durchgeführt. Die Reagenzien wurden wie in der Anleitung beschrieben vorbereitet. Für jeden Primer wurde ein getrennter Master-Mix erstellt.

Tabelle 6 - Vorbereitung der Reagenzien für die qPCR

Komponenten	Volumen per 20 µl Ansatz
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10 µl
Primer	2 µl
Nukleasen-freies Wasser	6 µl
Summe:	18 µl

18 µl des Master-Mixes wurden in je ein Well der 96-Well-PCR-Platte gegeben und es erfolgte die Zugabe von 2 µl der Probe (zu amplifizierende DNA) pro Well. Die Platte wurde mit einem transparenten Film versiegelt und kurz abzentrifugiert. Als Referenz-Gen kam GAPDH zum Einsatz.

Das PCR-Gerät wurde programmiert, die Platte in das Gerät gestellt und die PCR gestartet. Hierbei wurden 3 unterschiedliche Temperaturniveaus verwendet (95°C, 63°C und 72°C) welche in jedem Zyklus nacheinander durchlaufen wurden.

Um die Expressionsrate des Gens zu bestimmen kam folgende Formeln zum Einsatz:

$$\Delta C_{T\ mean} = C_{T\ mean\ (Probe,\ Zielgen)} - C_{T\ mean\ (Probe,\ GAPDH)}$$

$$Genormte\ Genexpressionsrate = 2^{-\Delta C_{T\ mean}}$$

5.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Verwendung der Agarose-Gelelektrophorese ermöglichte es, die PCR-Produkte in Form von Banden sichtbar zu machen und somit die Expression der Allele im Rahmen der Genotypisierung darzustellen. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die DNA besitzt aufgrund ihrer Phosphatreste eine negative Ladung (Polyanion). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird nicht nur von dem Ausmaß der Ladung, sondern auch von den Eigenschaften des Gels sowie der Konformation und Größe der Moleküle

beeinflusst. Die Laufstrecke linearer DNA-Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Die Elektrophorese führt somit zur Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Länge. Bei der Elektrophorese von Nukleinsäuren finden vor allem Gele aus Agarose Anwendung. Um die unterschiedlichen Banden optisch sichtbar zu machen, werden interkalierende Farbstoffe verwendet [182, 183].

5.4.1. Herstellung des 2,5%igen Agarosegels und Durchführung der Elektrophorese

Für die Herstellung des Agarosegels wurden 3 g Agarose abgewogen und zusammen mit 120 ml 1 x TBE-Puffer in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Dieser wurde für 2,5 min bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 µl „Roti-GelStain“. Durch leichtes Schwenken des Kolbens wurde der Inhalt gemischt und dann in die Gelkammer gegossen. Das Gel wurde für 30 – 60 min abkühlen gelassen bis dieses erstarrt war. Währenddessen wurden die cDNA-Proben für die Elektrophorese vorbereitet. Dafür wurden 20 µl jeder Probe mit 4 µl Ladepuffer gemischt und bei 2000 rpm kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden zusammen mit „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“ aufgetragen und die Elektrophorese bei 120 – 160 Volt gestartet. Nach 30 – 50 min wurde die Elektrophorese gestoppt und mithilfe des „Gel Doc“ ein Bild entwickelt.

6. Blutanalyse

Unter Verwendung des ABX Micros 60 wurde eine Blutanalyse zum Vergleich unterschiedlicher Parameter zwischen den RXR α -deletierten und den Kontroll-Tieren durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100 µl Blut eines Tieres in eine Microvette gegeben. Das Gefäß wurde in das Analyse-Gerät gestellt und die Analyse gestartet. Anschließend wurden die relevanten Parameter – hierunter Hämoglobin, Hämokrit sowie das Differenzialblutbild - auf einem Ausdruck dargestellt.

7. Nuklearmedizinische Bildgebung

7.1. Grundlagen der [¹⁸F] FDG- Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und des [¹⁸F] FDG-PET/CT

Der erste PET-Scanner kam im Jahre 1975 zum Einsatz. Seither findet die PET umfangreiche Anwendung unter anderem in der Tumordiagnostik. Abgesehen davon wird die PET auch für die Bildgebung des Herzens verwendet und stellt den Goldstandard für die Darstellung des myokardialen Funktionsstoffwechsels dar [184, 185].

Die PET macht sich das Prinzip der Vernichtungsstrahlung zu Nutze. Beim β^+ -Zerfall werden Positronen freigesetzt, welche mit je einem Elektron vernichtet werden. Hierbei entstehen zwei Photonen, welche sich in entgegengesetzte Richtungen auseinander bewegen. Diese Photonen werden von einem Detektorring wahrgenommen. Die Stelle der Detektion lässt auf den Ort des

Material und Methoden

Vernichtungsprozesses und folglich auf die Lokalisation des β -Strahlers im Gewebe schließen [186].

Der Tracer [^{18}F] FDG (Fluordesoxyglukose) setzt sich aus Fluor-18 und einem Analogon der D-Glukose zusammen. Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes in der Tumordiagnostik findet der Tracer im klinischen Alltag häufig Anwendung. [^{18}F] FDG ist ebenfalls der am häufigsten verwendete Tracer in der thorakalen PET-Untersuchung und eignet sich im Herzen zur Darstellung des myokardialen Glukosestoffwechsels. Hierbei können Rückschlüsse auf die Funktionalität des Gewebes gezogen werden [184, 187]. FDG wird insbesondere von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und erfährt intrazellulär eine Phosphorylierung. Das FDG-6-Phosphat kann durch das Enzym Glucose-6-Phosphatase nicht weiter verstoffwechselt werden und ein Transport aus der Zelle ist nicht ohne weiteres möglich. Folglich akkumuliert FDG-6-Phosphat in der Zelle. Das Fluor-18 setzt bei seinem Zerfall Positronen frei und nach dem oben genannten Vernichtungsprinzip entsteht ein messbares Signal [187].

Im Rahmen einer kardialen Ischämie ist der Stoffwechsel der Kardiomyozyten vornehmlich von Glukose abhängig. Die Aufnahme und Ansammlung von [^{18}F] FDG deutet auf eine vorhandene metabolische Aktivität hin und spricht somit für Vitalität des Herzmuskelgewebes [188]. Myokardnarben zeigen hingegen aufgrund des stark verminderten bis fehlenden Strukturstoffwechsels eine erhebliche Reduktion der FDG-Anreicherung [184]. Die Intensität des PET-Signals korreliert folglich mit der Infarktgröße und konnte als unabhängiger Prognoseparameter der kardialen Funktionsparameter – hierunter die Ejektionsfraktion (EF), das enddiastolische Volumen (EDV) sowie das endsystolische Volumen (ESV) – identifiziert werden [189]. Im klinischen Alltag findet die PET bei der Beurteilung der Vitalität von ischämischem Herzmuskelgewebe Anwendung [188].

Das PET-CT ermöglicht die Kombination der Funktionsdiagnostik mit einer hochauflösenden Darstellung von anatomischen Strukturen. Somit wird eine präzise Lokalisation der pathologischen Stoffwechselfvorgänge erreicht [186].

7.2. Ablauf der [^{18}F] FDG-PET/CT-Untersuchung

Die Durchführung der PET-Untersuchung erfolgte nach einem etablierten Protokoll, welches in der nuklearmedizinischen Abteilung für präklinische Forschung angewandt wird (AZ: 55.2-1-54-2532-101-13). Die Versuche wurden in Kooperation mit der Abteilung für Nuklearmedizin durchgeführt. Dabei wurde ein Inveon P120 μ PET Scanner verwendet. Als Radionukleotid kam ^{18}F zum Einsatz, welches von der Firma PET Net GmbH bezogen wurde. Der synthetisierte Tracer [^{18}F] FDG wurde uns bereitgestellt und kam nach einer Verwendbarkeits- und Qualitätskontrolle zur Anwendung.

Material und Methoden

Während der gesamten Untersuchung fand eine EKG-Ableitung statt. Hierfür wurden Elektroden auf den beiden Vorderfüßen sowie auf dem linken Hinterfuß angebracht. Die Überwachung der Vitalparameter wurde mit einem Monitoring-System (BioVet) durchgeführt.

Vor der Durchführung der μ PET-Untersuchung wurden die Tiere mit 2% Isofluran bei einer Sauerstoffdurchflussrate von 1-2 l/min narkotisiert. Während der Untersuchung wurde die Narkose bei 1,5%-Isofluran aufrechterhalten. Zum Schutz vor Austrocknung der Kornea wurde eine Bepanthen-Augensalbe verabreicht. Nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes wurde mit der Applikation des Tracers begonnen. 150 μ l des Tracers 20 MBq [18 F]-FDG wurden unter Zuhilfenahme einer 24G Kanüle in eine der beiden lateralen Schwanzvenen injiziert. Anschließend wurde der Katheter mit 50 μ l Kochsalzlösung gespült. Um eine adäquate Verteilung des Tracers zu gewährleisten, wurden die Tiere 20 min in Narkose belassen bevor mit dem μ PET-Scan begonnen wurde. Während der ganzen Zeit fand eine Temperaturkontrolle mittels einer Analsonde statt, wobei die Temperatur durch eine Wärmeplatte konstant auf 37,5°C gehalten wurde.

Für die μ PET-Untersuchung wurden die Tiere auf die Liege des μ PET-Scanners transferiert. Es erfolgte eine 15-minütige Emissions- gefolgt von einer 7-minütigen Transmissionsmessung. Nachdem die Messung abgeschlossen war, wurde der Schwanzvenenkatheter entfernt. Die Tiere wurden aus der Narkose aufgeweckt, einzeln in frische Käfige mit Nestbaumaterial gesetzt und durch eine Wärmematte gewärmt. Als die Tiere Putz- und Appetenzverhalten zeigten, fand ein Transfer in den ursprünglichen Käfig statt. An Tag 30 nach der μ PET-Untersuchung wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet.

(A)



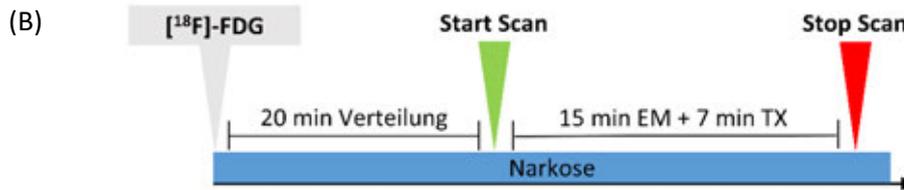


Abbildung 10 - μ PET/CT-Untersuchung zur Quantifikation der Infarktgröße

(A) μ PET/CT-Scanner

(B) Durchführungsprotokoll der μ PET/CT-Untersuchung
(EM = Emissionsmessung, TX = Transmissionsmessung)

7.3. Analyse der PET-Daten

Die Daten wurden durch eine Emissions- mit anschließender Transmissionsmessung zur Schwächungskorrektur akquiriert. Um eine dreidimensionale Rekonstruktion des Bildes zu erreichen, wurde die Software „Inveon acquisition workplace“ verwendet. Dabei fand zuerst eine Konvertierung in zweidimensionale Datensätze (Sinogramme) statt, aus welchen anschließend mittels mathematischer Methoden dreidimensionale Bilder rekonstruiert wurden. Die Rekonstruktion erfolgte, wie vom Hersteller empfohlen, durch die Kombination des iterativen Algorithmus „Ordered Subsets Expectation Maximization“ mit dem „3D Ordinary-Poisson Maximum a Priori“ Algorithmus. Die Berechnung der Funktionsparameter (EF und EDV) wurde unter Zuhilfenahme des EKGs mit der Software „Quantitative Gated SPECT“ durchgeführt.

In die Auswertung wurden nur Tiere aufgenommen, bei welchen ein adäquater Infarkt durch die Ligatur des RIVA induziert wurde und ein transmuraler Infarkt durch eine permanente Ligatur ausgeschlossen werden konnte.

8. Histologische Untersuchungen

8.1. Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie

Grundlage der Immunfluoreszenzmikroskopie ist die Fluoreszenz von Fluorochromen, mit deren Hilfe bestimmte Strukturen von Präparaten optisch dargestellt werden können. Das Phänomen der Fluoreszenz wurde erstmals im Rahmen der Lichtmikroskopie Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts beobachtet. Die Physiker Otto Heimstädt und Heinrich Lehmann entwickelten zwischen 1911 und 1913 die ersten Fluoreszenzmikroskope. Die Technik wurde seither kontinuierlich weiterentwickelt. Die Immunfluoreszenzmikroskopie stellt heutzutage einen elementaren Bestandteil bei der histologischen Untersuchung von Geweben dar [190].

Das Prinzip beruht auf der Verwendung spezifischer Antikörper, wodurch bestimmte Antigene mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und folglich optisch sichtbar gemacht werden können [190]. Anhand der Art der verwendeten Antikörper unterscheidet man zwei grundlegende Prinzipien der Immunfluoreszenz.

Material und Methoden

Bei der direkten Immunfluoreszenz kommen primäre Antikörper zum Einsatz, welche bereits mit einem Fluorochrom konjugiert sind. Diese primären Antikörper binden direkt an das Ziel-Antigen. Die sekundäre Immunfluoreszenz benötigt hingegen - neben den primären - auch sekundäre Antikörper. Die primären Antikörper sind noch nicht mit einem Fluorochrom verbunden (unkonjugiert). Diese binden an das Ziel-Antigen. Erst in einem zweiten Schritt werden konjugierte sekundäre Antikörper dazu gegeben, welche wiederum an den primären Antikörper binden [191].

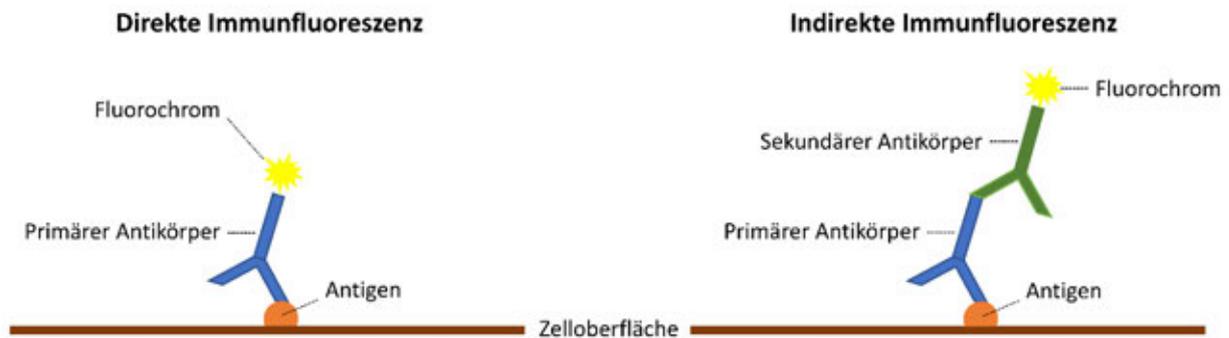


Abbildung 11 - Prinzip der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz (erstellt nach [191])

Eine Schwierigkeit bei der Immunfluoreszenzmikroskopie besteht darin, eine Bestrahlung des Präparates mit Licht spezifischer Wellenlängen und hoher Intensität zu erreichen und gleichzeitig das deutlich schwächere emittierte Licht zu detektieren. Um dies zu ermöglichen wird eine Kombination unterschiedlicher Filtersysteme angewandt. Von der Lichtquelle ausgehende Lichtstrahlen fallen durch einen Anregungsfilter, welcher nur Licht im Anregungsbereich des Fluorochroms passieren lässt. Anschließend wird das Licht durch einen dichroitischen Filter in Richtung des Präparates geleitet. Das von den Fluorochromen emittierte Licht (siehe Abschnitt III.4.1) wird wiederum zum dichroitischen Filter geleitet. Dieser lässt das emittierte Licht passieren, wohingegen kontaminierendes Licht der Lichtquelle zu dieser zurückgeworfen wird. Auf dem weiteren Weg gelangt das Licht erneut durch einen Filter, den sogenannten Emissionsfilter. Dieser lässt nur Licht im Emissionsbereich des Fluorochroms passieren. Anschließend wird das emittierte Licht von einem Detektor wahrgenommen. Die genannten Mechanismen gewährleisten, dass Streulicht am Detektor minimiert wird und sind somit Voraussetzung für eine hohe Bildqualität [190].

8.2. Erstellung von Schnittpräparaten

Nachdem die Herzen, wie in Abschnitt III.3.3 beschrieben, entnommen wurden, erfolgte eine Fixierung für 30 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung. Anschließend wurden die Herzen für 24 h in eine 30%ige Sucroslösung gegeben. Diese sorgte für eine Entwässerung des Gewebes und wirkte somit der Ausbildung von Kristallen beim Gefrieren entgegen. Nach 24 h wurden die Herzen in drei Teile geschnitten und mit einem Einbettmedium („Tissue-Tek“) in Kryoformen eingebettet.

Material und Methoden

Der Gefrierprozess wurde durch die Verwendung von Trockeneis beschleunigt. Die Lagerung der Herzen erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C.

Mithilfe eines Kryotoms wurden 8 µm dicke Gewebeschnitte erstellt. Hierzu wurde die Innenraumtemperatur des Geräts auf -18°C und die Klingentemperatur auf -25°C eingestellt. Durch einen Trimmschnitt von 50 µm wurde zu Beginn überschüssiges Einbettmedium entfernt. Nach fünf Schnitten wurde ebenfalls ein Trimmschnitt von 30 µm durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Präparate aus unterschiedlichen Ebenen des Herzens stammen. Die so entstandenen Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und entweder direkt für eine Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder in einem Gefrierschrank bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Von jedem Herzen wurden mindestens 3 Schnitte, aus unterschiedlichen Ebenen, für die histologische Untersuchung erstellt.

8.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

8.3.1. Abgrenzung des Infarktareals mit der „Wheat germ agglutinin“ (WGA) Färbung

Um in den d30-Herzen eine Abgrenzung des Infarktareals zu erreichen, wurde eine „Wheat germ agglutinin“ Färbung verwendet.

WGA ist ein Kohlenhydrat-freies Protein bestehend aus zwei Untereinheiten [192]. Entdeckt wurde die Substanz zufällig 1963 durch Joseph C. Aub im Rahmen der Krebsforschung am Massachusetts General Hospital in Boston. Die Namensgebung erfolgte aufgrund der agglutinierenden Eigenschaften, welche zur Agglutination von malignen Zellen im Versuchsansatz führten [193].

WGA bindet an Oligosaccharide wie N-Acetylglucosamin, welche unter anderem als Bestandteil von Glykosaminoglykanen sowie Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix vorkommen und auf der Oberfläche von Zellmembranen zu finden sind [194, 195]. Der Nachweis einer Bindung von WGA an Komponenten der extrazellulären Matrix wurde durch eine Kombinationsfärbung mit einem anti-Kollagen-I-Antikörper erbracht. Hierbei zeigte sich eine Überlagerung beider Färbungen, welches als Beweis der Bindung von WGA an Bestandteile der extrazellulären Matrix anzusehen ist. Vorzüge von WGA im Vergleich zur Picosirius red Färbung, welche eine Standardmethode für den Nachweis von fibrotischem Gewebe darstellt, sind die bessere Anwendung bei Kryoschnitten sowie die Möglichkeit der Kombinationsfärbung mit weiteren Antikörpern. Die WGA Färbung erwies sich bei planimetrischen Untersuchungen der Infarktgröße als zuverlässige Methode zur Darstellung von fibrotischem Gewebe [196]. Daher kann mithilfe der WGA Färbung eine solide Abgrenzung des Infarktgebiets von der Infarkt-Grenzzone und dem Remote-Areal erreicht werden. Die Durchführung der Färbung erfolgte in Kombination mit weiteren Färbungen wie in Abschnitt 8.3.2 beschrieben.

8.3.2. Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 5 bis 30 min trocknen gelassen und anschließend für 10 min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Waschvorgang (3 x 5 min) in einer Küvette mit Waschlösung folgte das Blocken und Permeabilisieren in PBS mit 0,5% Saponin, 10% Ziegen Serum und 1% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden die primären Antikörper in der Block-/Permeabilisierungslösung mit 10% Ziegen Serum verdünnt. Nach 1 Stunde wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern entfernt, durch 50 µl Antikörperlösung pro Schnitt ersetzt und es fand eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht statt.

Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) wurden die sekundären Antikörper und der Farbstoff Hoechst in der Block-/Permeabilisierungslösung ohne Ziegen Serum verdünnt, auf die Präparate gegeben (50 µl pro Schnitt) und es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Die Waschschrte wurden wiederholt und - falls erwünscht - zusätzlich eine WGA-Färbung oder eine Färbung mit primär-konjugierten Antikörpern durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte in Block-/Permeabilisierungslösung ohne Ziegen Serum, es wurden 50 µl pro Schnitt verwendet und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem letzten Waschschrte (3 x 5 min) wurden die Präparate mit „Fluorescence Mounting Medium“ eingedeckt.

Tabelle 7 - Verwendete Antikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Darstellung der Gefäße	
Purified Ratte anti-Maus CD31	Ziege anti-Ratte IgG Fc _γ -Fragment spezifisch Cy3 konjugiert
Wheat Germ Agglutin, Alexa Fluor 350 konjugiert	-
Darstellung der Proliferation von Makrophagen	
Monoklonaler Ratte anti-Maus F4/80	Ziege anti-Ratte IgG Fc _γ -Fragment spezifisch Cy3 konjugiert
Ki-67/MKI67	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa-Fluor 488 konjugiert
Charakterisierung der Makrophagenpopulationen	
Monoklonaler Ratte anti-Maus F4/80	Ziege anti-Ratte IgG Fc _γ -Fragment spezifisch Cy3 konjugiert
Polyklonaler Kaninchen anti-Maus GFP	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa-Fluor 488 konjugiert
Anti-Maus I-A/I-E Alexa Fluor 647 konjugiert	-
Wheat Germ Agglutin, Alexa Fluor 350 konjugiert	-

8.3.3. ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit

8.3.3.1. Prinzip des Kits

Die Apoptose stellt einen kontrollierten, programmierten Zelltod dar, im Rahmen dessen einzelne Zellen im Gewebeverbund zugrunde gehen, ohne umliegendes Gewebe zu schädigen. Dabei kommt es in der Zelle zur Kondensation von Chromatin mit folgender Zellkernschrumpfung, zur Blasenbildung der Plasmamembran, der Fragmentierung des Zellkerns und schließlich der gesamten Zelle in apoptotische Körperchen, die phagozytiert werden [195].

Das ApoTag Plus In Situ Detection Kit beruht auf der Detektion enzymatisch markierter freier 3'-OH-Gruppen der DNA mit modifizierten Nukleotiden. Diese freien 3'-OH Gruppen entstehen als Folge der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen. Im Vergleich dazu weisen normale oder proliferierende Zellen einen vernachlässigbar kleinen Anteil dieser Gruppen auf. Das Kit ist dafür ausgelegt, sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche zu erkennen [197].

Der im Kit enthaltene „Reaction Buffer“ enthält sowohl Digoxigenin-markierte als auch unmarkierte Nukleotide. Das Verhältnis dieser Nukleotide zueinander wurde im Hinblick auf die Anti-Digoxigenin-Antikörperbindung sowie die Vermeidung von Fluoreszenzauslöschung optimiert. Durch das Enzym terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) werden die Nukleotidtriphosphate an die 3'-OH-Enden der Doppel- beziehungsweise der Einzelstrang-DNA angefügt. Es entsteht ein Oligomer, welches aus Digoxigenin-markierten und unmarkierten Nukleotiden in einer zufälligen Sequenz besteht. DNA-Fragmente, die mit einem Digoxigenin-Nukleotid markiert wurden, werden in Folge von einem Anti-Digoxigenin-Antikörper gebunden, welcher wiederum mit dem Farbstoff Fluorescein gekoppelt ist [197].

Die Methode konnte eine hohe Sensitivität zeigen und ermöglicht somit eine valide Abgrenzung von apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen [198]. Durch die Entfernung des Fc-Teils des Anti-Digoxigenin-Antikörpers werden unspezifische Bindungen vermindert und somit das Hintergrundsignal verringert [197].

8.3.3.2. Vorbereitung

Für die Färbung eines Objektträgers (2 Schnitte) wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien wie in Tabelle 8 angegeben, vorbereitet.

Tabelle 8 - Vorbereitung der Reagenzien des „ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit“

Reagenz	Ansatz
„Working Strength TdT Enzyme“	77 µl Reaction Buffer 33 µl TdT Enzym
„Working Strength Stop/Wash Buffer“	1 ml Stop/Wash Buffer 34 ml dH ₂ O

Material und Methoden

„Working Strength Fluorescein Antibody Solution“	68 µl Blocking Solution 62 µl Anti-Digoxigenin Conjugate
--	---

8.3.3.3. Durchführung der Färbung

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 5 bis 30 min trocknen gelassen und anschließend für 10 min mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Nach 2 Waschgängen für jeweils 5 min in einer Küvette mit Waschlösung erfolgte eine Postfixierung in einem vorgekühlten Ethanol-Essigsäure-Gemisch (Verhältnis 2:1). Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min gewaschen und pro Schnitt 75 µl „Equilibration Buffer“ für 1 min auf den Objektträger gegeben. Die Flüssigkeit wurde abgeklopft und auf jedes Präparat wurden 55 µl „Working Strength TdT Enzyme“ pipettiert. Die Inkubation fand in einem Wärmeschrank bei 37°C für 1 Stunde statt.

Nachfolgend wurden die Schnitte in eine Küvette mit „Working Strength Stop/Wash Buffer“ gegeben und diese für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach 3 Waschgängen je 1 min wurden 65 µl der „Working Strength Fluorescein Antibody Solution“ auf jeden Schnitt gegeben und es folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

Es schlossen sich nochmals 4 Waschgänge je 2 min an. Anschließend wurde der Farbstoff Hoechst, verdünnt in Block/Permeabilisierungslösung ohne Ziegen Serum, für 5 min auf die Schnitte gegeben (50 µl pro Schnitt).

Die Präparate wurde noch dreimal für je 5 min gewaschen und dann mit „Fluorescence Mounting Medium“ eingedeckt.

8.4. Histologische Auswertung

Die Bilder für die histologische Auswertung wurden unter Verwendung des Epifluoreszenzmikroskops „Axio Imager M2“, welches mit der Digitalkamera „AxioCam MRm“ ausgestattet war, aufgenommen. Als Filter-Sets kamen hierbei DAPI (BP 445/50), GFP (BP 525/50), Cy3 (BP 605/70) und Cy5 (BP 690/50) zum Einsatz.

Von jedem Herzen wurden mindestens 3 Schnitte aus unterschiedlichen Schnittebenen analysiert. Zur Untersuchung der Angiogenese mit CD31, der Proliferation mit Ki-67 und der Makrophagenpopulationen wurde das Herz in je 2-3 Bereiche (Infarktgebiet, Infarkt-Grenzzone und Remote-Areal) unterteilt. Aus jedem Bereich erfolgte die Aufnahme von je 3 Bildern pro Schnitt. Zur Evaluation der Apoptose wurden pro Schnitt jeweils 5 Bilder analysiert.

Die Auswertung wurde mit der Software „AxioVision SE64 Rel. 4.9.1“ durchgeführt.

9. Untersuchung der Expression von Zyto-, Chemokinen und Wachstumsfaktoren

Um Unterschiede in der Konzentration von Zyto-, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) gegenüber den Kontrollen (+/+) zu detektieren, wurde das „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit“ verwendet. Das Kit ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von 111 löslichen Stoffen. Hierbei kommen Nitrocellulose-Membranen zum Einsatz auf deren Oberfläche Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper binden während der Inkubation Proteine aus der Probe. Durch die Zugabe von Antikörper zur Detektion und der Streptavidin-HRP-Reagenz können die Proteinmengen in der Probe mithilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden [199].

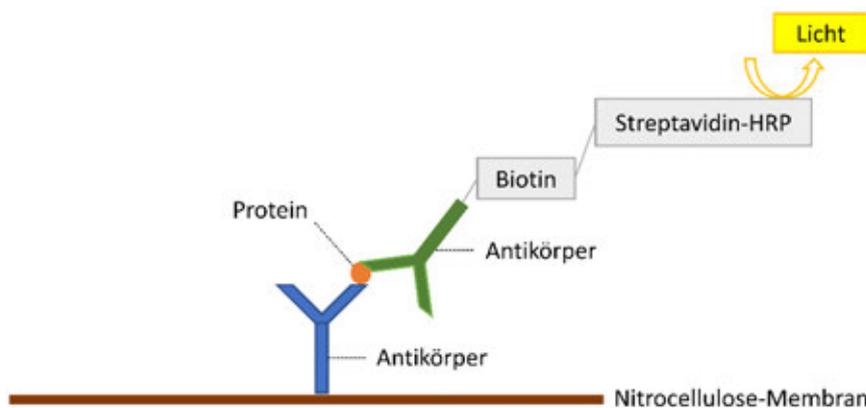


Abbildung 12 – Prinzip des „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit“ (erstellt nach [199, 200])

9.1. Vorbereitung der Proben mithilfe des „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit“

Für den Array wurden Gewebelysate aus den Herzen erstellt. Dafür wurden die Herzen nach der Entnahme (siehe Abschnitt III.3.3) in 3 Teile geschnitten. Die Herzspitzen, welche das Infarktareal enthielten, wurden für die Durchführung des Arrays verwendet.

Zur Herstellung der Gewebelysate wurde das Gewebe zu 1 ml RIPA Puffer mit 100 μ l EDTA und 100 μ l Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail) in ein 15 ml Falcon gegeben. Mithilfe eines Ultra-Turrax wurden die Proben homogenisiert. Anschließend fand die Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß statt und es wurde bei 10,000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ und einem „Tecan GENios Microplate Reader“.

Die Vorbereitung der Reagenzien des Kits fand wie im Protokoll beschrieben statt. In jedes Well der 4-Well Platte wurden 2 ml des Array-Puffers pipettiert und die Membranen für 1 h zum Blocken in den Puffer gelegt. Dabei wurde die 4-Well-Platte auf einen Schüttler gestellt, um eine

Material und Methoden

möglichst gleichmäßige Inkubation zu ermöglichen.

300 µl Protein aus jeder Probe wurde mit 0,5 ml des Array-Puffers 4 gemischt und mit dem Array-Puffer 6 auf ein Volumen von 1,5 ml pro Probe aufgefüllt.

Nach erfolgter Inkubation wurde der Block-Puffer vorsichtig abgenommen, durch die Proben ersetzt und es fand eine Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler statt.

Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit abpipettiert und es folgten 3 Waschschrte mit 20 ml Waschpuffer für je 10 min. Nun wurde der Antikörper-Cocktail auf die Membranen gegeben und es erfolgte erneut eine Inkubation für 1 h auf einem Schüttler. Nach der Wiederholung des Waschschrtes, wurden je 2 ml Streptavidin-HRP zu den Membranen gegeben und für 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Der Waschvorgang wurde erneut durchgeführt und nachfolgend wurde je 1 ml der „Chemi Reagent“-Lösung auf die Membranen pipettiert und für 1 min inkubiert.

Nachdem die Membranen abgetrocknet wurden, konnten diese auf einen Röntgenfilm gelegt werden. Die Entwicklung der Bilder erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, um eine optimale Belichtungszeit zu gewährleisten.

10. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Graphen erfolgte unter Verwendung des Programmes GraphPad PRISM sowie Microsoft Excel. Bei einer Gesamt-n-Zahl < 15 kam der Fisher-Pitman-Test (ein Randomisierungstest für unabhängige Stichproben) zur Anwendung [213]. Bei einer Gesamt-n-Zahl > 15 wurde der t-Test (Welch) durchgeführt. Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

IV. Ergebnisse

Bisher wurde nur in wenigen Studien der Effekt einer Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen auf pathophysiologische Veränderungen im Organismus analysiert. Eine Untersuchung dieser Deletion im Rahmen des akuten Myokardinfarktes wurde bisher noch nicht beschrieben und soll im Fokus dieser Arbeit stehen.

Dabei soll der Einfluss einer spezifischen Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen auf die Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt analysiert werden. Hierzu wurde eine Mauslinie verwendet, welche eine Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen aufweist. Es soll betrachtet werden, wie der RXR α das Outcome nach einem akuten ischämischen Ereignis im Herzen beeinflusst und welche zellulären und molekularen Prozesse hierzu beitragen. Dabei soll die Frage adressiert werden, ob die Applikation von spezifischen RXR-Agonisten einen potenziellen Nutzen in der Behandlung ischämischer Herzkrankheiten besitzt und somit einen Stellenwert in der Therapie des akuten Myokardinfarktes finden kann.

Um eine möglichst gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation zu gewährleisten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ischämie-Reperfusion-Modell zur Induktion des Myokardinfarktes verwendet.

1. Evaluation der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen der Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR alpha^{flx/flx} Tiere

Für die Untersuchung der Expression des RXR α Wildtyp-Allels sowie des rekombinanten geflochtenen RXR α -Allels (RXR α L- Allel) in Monozyten beziehungsweise in Makrophagen aus unterschiedlichen Geweben wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Zellpopulation mithilfe eines Beckman Coulter Astrios gewonnen. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, diese wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend folgte die Durchführung einer PCR. Hierbei kamen drei spezifische Primer zur Anwendung, welche bereits publiziert sind [201].

Für das RXR α Wildtyp-Allel wurde ein Primerpaar verwendet, das in Exon 3 (ZO243) und in Exon 4 (ZO244) des RXR α -Gens bindet. Die Rekombination der loxP durch die Cre führt zur Deletion des Exons 4 des RXR α -Gens, weshalb keine Amplifikation des RXR α L- Allels stattfindet.

Um die Expression des RXR α L- Allels zu charakterisieren, kam neben dem Primer ZO243 zusätzlicher der Primer UD196 zum Einsatz. Dieser bindet im Bereich des Introns zwischen Exon 4 und Exon 5.

Die Proben wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden somit sichtbar gemacht.

In den Kontroll-Tieren konnte die Expression des RXR α Wildtyp-Allels in unterschiedlichen

Ergebnisse

Gewebe nachgewiesen werden, während das RXR α L- Allel nicht zu detektieren war.

Die Cre/+ Tiere zeigten neben der Expression des RXR α Wildtyp-Allels auch eine Expression des RXR α L- Allels (siehe Abbildung 13).

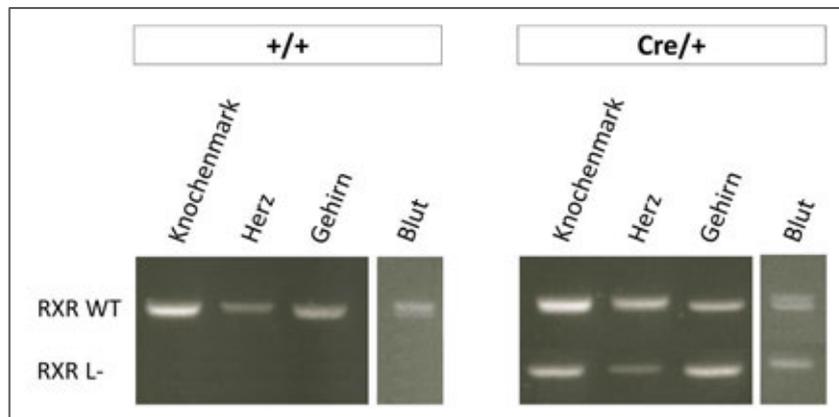


Abbildung 13 - Vergleich der Expression des RXR α Wildtyp-Allels und des RXR α L- Allels in Monozyten/Makrophagen unterschiedlicher Gewebe der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+)

Im nächsten Schritt sollte die Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen in den Cre/+ Tieren quantifiziert werden. Hierfür wurde das Blut der Tiere gemäß III.4.2 vorbereitet und die Isolation der Zellpopulationen erfolgte mithilfe eines Beckman Coulter Astrios. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert, diese wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend eine qPCR durchgeführt. Die Primer für die Quantifikation der Expression von intakten RXR α wurden entsprechend der Sequenz des RXR α -Gens erstellt und über die Firma Eurofins Genomics bezogen. Die Sequenz des „upward“-Primers wurde so gewählt, dass dieser zwischen Exon 3 und Exon 4 des RXR α -Gens binden konnte (Primer-Sequenz: CGCTCCTCAGGCAAACTATG). Der „downward“-Primer hatte seine Bindungsstelle in Exon 4 (Primer-Sequenz: GGTTCGCTGTCTCTTGTCG). Da die Rekombination der loxP durch die Cre zu einer Deletion des Exons 4 des RXR α -Gens führt, konnte der „downward“-Primer nur an die cDNA des intakten RXR α -Gens binden.

Die genormten Genexpressionsraten des RXR α in den Cre/+ Tieren wurde mit der Genexpression in den Kontroll-Tieren verglichen. Die Cre/+ Tiere wiesen eine circa auf die Hälfte (0,53) reduzierte Expression des RXR α im Vergleich zu den Kontroll-Tieren auf (+/+ 4,347 \pm 1,281 vs. Cre/+ 2,317 \pm 1,069) (siehe Abbildung 14).

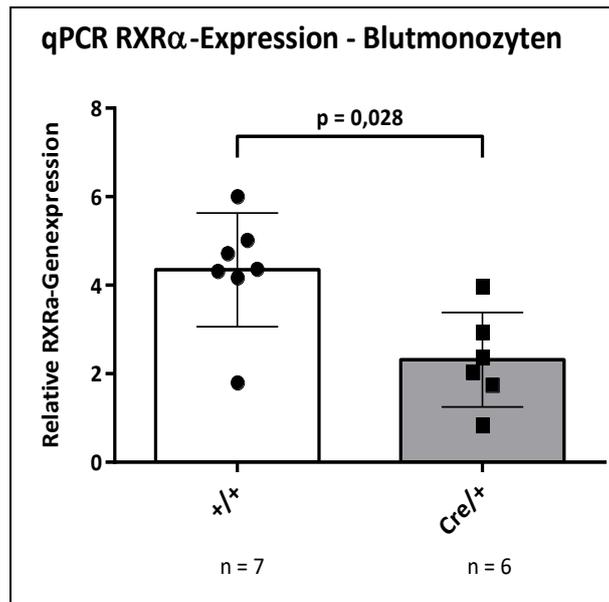


Abbildung 14 - Quantifikation der Genexpression des RXR α in Blutmonozyten der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox}* Mauslinie: Vergleich der RXR α -deletierten (*Cre/+*) mit den Kontroll-Tieren (*+/+*)

2. Einfluss einer verminderten Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox}* Tiere auf das Blutbild

Mittels Blutanalysen an Tag 30 nach Myokardinfarkt wurde die Auswirkung einer reduzierten Expression des Retinoid-X-Rezeptors α in Monozyten und Makrophagen auf unterschiedliche Blutparameter untersucht.

In unseren Analysen konnte kein Einfluss einer verminderten RXR α -Expression auf die Blutzellzahlen sowie auf den Hämoglobinwert nachgewiesen werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Leukozyten-, der Erythrozyten- sowie der Thrombozytenzahl und des Hämoglobinwertes zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren (Leukozyten: *+/+* $1,756 \pm 1,183 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs. *Cre/+* $1,862 \pm 1,487 \times 10^3/\mu\text{l}$; Erythrozyten: *+/+* $6,418 \pm 1,243 \times 10^6/\mu\text{l}$ vs. *Cre/+* $6,075 \pm 1,389 \times 10^6/\mu\text{l}$; Thrombozyten: *+/+* $632,8 \pm 259,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs. *Cre/+* $559,4 \pm 164,3 \times 10^3/\mu\text{l}$; Hämoglobin: *+/+* $10,19 \pm 1,372 \text{ mg/dl}$ vs. *Cre/+* $9,885 \pm 1,748 \text{ mg/dl}$) (siehe Abbildung 15).

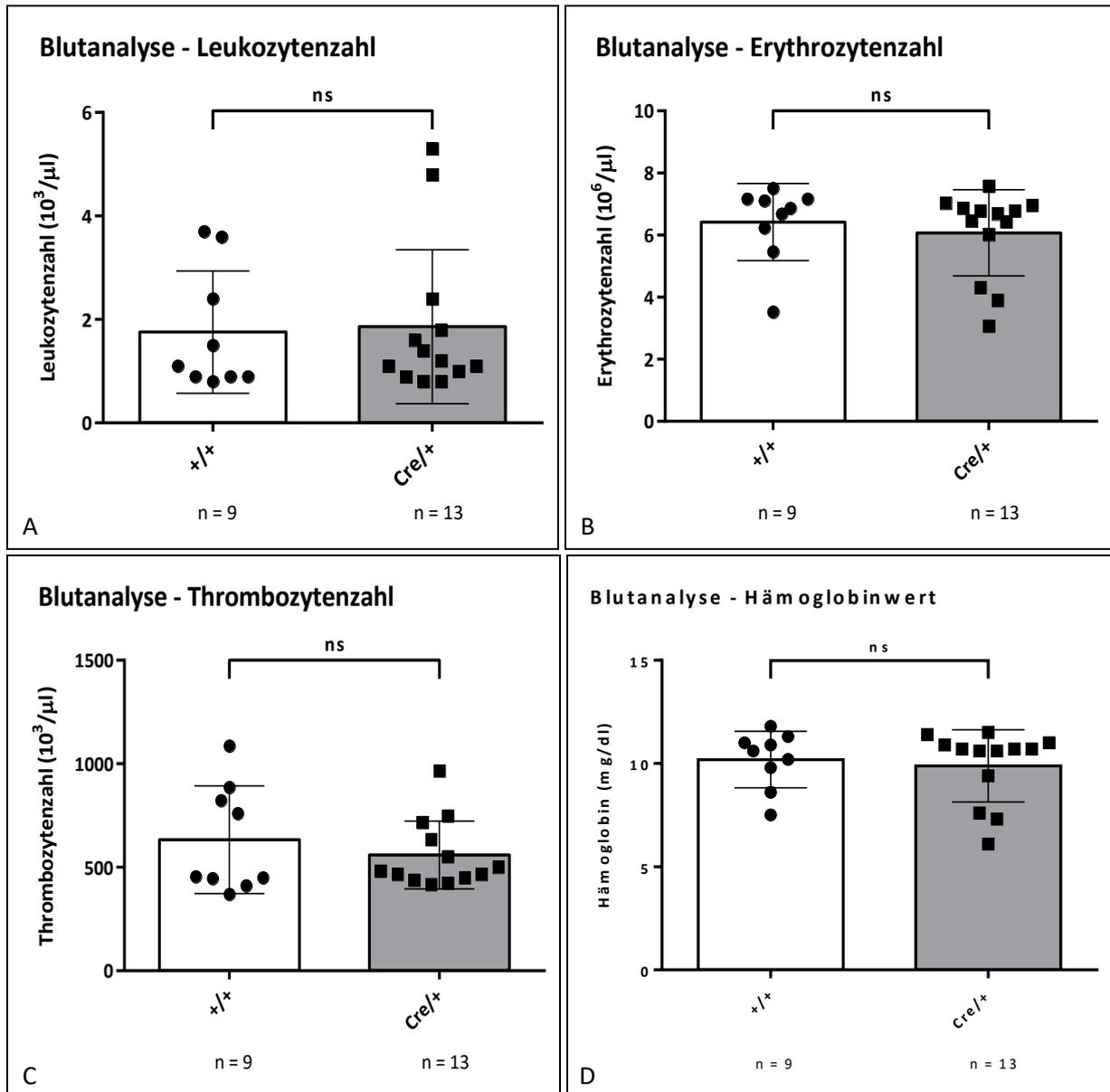


Abbildung 15 - Vergleich verschiedener Blutwerte zwischen den Kontroll- (+/+) und den *RXR α* -deletierten Tieren (*Cre/+*) der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Mauslinie
 (A) Leukozytenzahl, (B) Erythrozytenzahl, (C) Thrombozytenzahl, (D) Hämoglobinwert

3. Auswirkung einer Reduktion der RXR α -Expression in Monozyten und Makrophagen der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox} Tiere auf die Infarktgröße

Bevor mit der Untersuchung der spezifischen Funktionen des Retinoid-X-Rezeptors α in Monozyten und Makrophagen im Rahmen des akuten Myokardinfarktes begonnen wurde, sollte evaluiert werden, ob eine Reduktion der RXR α -Expression mit einer Veränderung der Infarktgröße einhergeht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde das [¹⁸F] FDG-PET/CT als Funktionsdiagnostik angewandt. Da der Stoffwechsel der Herzmuskelzellen während der kardialen Ischämie auf Glukose angewiesen ist, zeigt die Aufnahme und Akkumulation von [¹⁸F] FDG in Zellen eine vorhandene metabolische Aktivität und weist somit auf Vitalität des Gewebes hin [188]. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde das totale Perfusionsdefizit (TPD) bestimmt und als Maß für die Infarktgröße herangezogen. Das TPD in den Herzen der Kontroll-Tiere sowie der Cre/+ Tiere wurde an Tag 6 und an Tag 30 nach der I/R-Verletzung gemessen. Anschließend fand ein Vergleich zwischen den beiden Gruppen statt (siehe Abbildung 16).

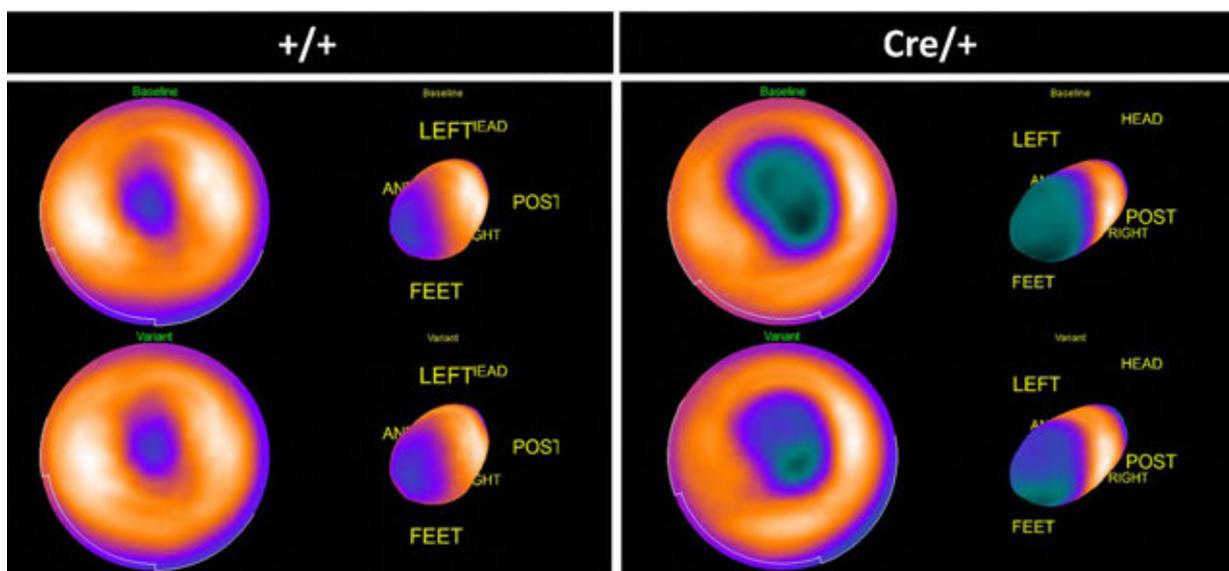


Abbildung 16 - Exemplarische Bilder der μ PET/CT-Untersuchung der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox} Mauslinie

Durch die Reperfusion des Herzmuskelgewebes nach der ischämischen Phase konnte in beiden Gruppen eine Abnahme des TPD über die Zeit beobachtet werden. In die Auswertung wurden nur Tiere mit aufgenommen, deren TPD diesen Zeitverlauf zeigte, um einen transmuralen Infarkt durch eine permanente Ligatur des RIVA auszuschließen (siehe Abbildung 17).

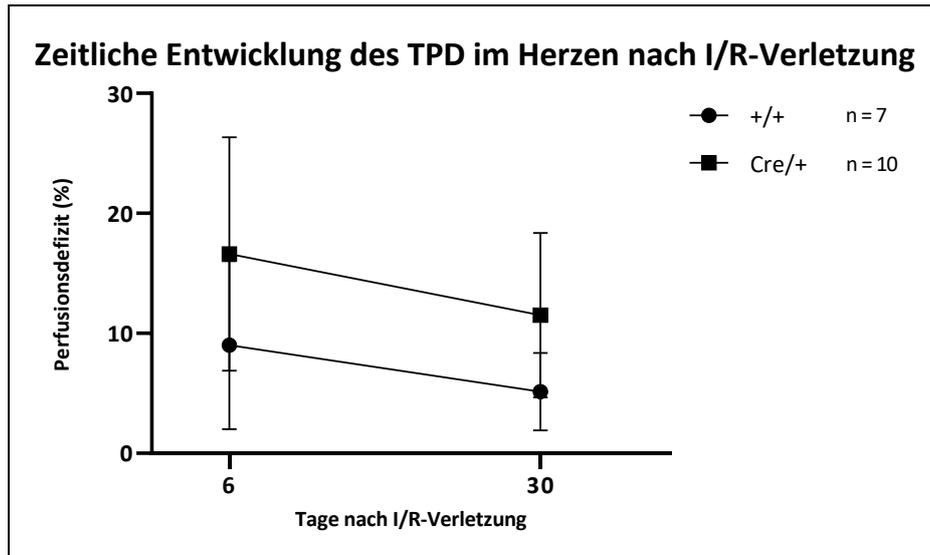


Abbildung 17 - Vergleich der zeitlichen Entwicklung des totalen Perfusionsdefizits in den Herzen der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{lox/lox}$ Mauslinie

Beim Vergleich der beiden Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde an Tag 6 nach I/R-Verletzung kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren gefunden (+/+ 9,00 ± 7,00 %; Cre/+ 16,60 ± 9,74 %) (siehe Abbildung 18).

An Tag 30 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden. Während die Kontroll-Tiere ein TPD von 5,14 ± 3,24 % zeigten, besaßen die RXR α -deletierten Tiere ein Perfusionsdefizit von 11,50 ± 6,59 % (siehe Abbildung 18).

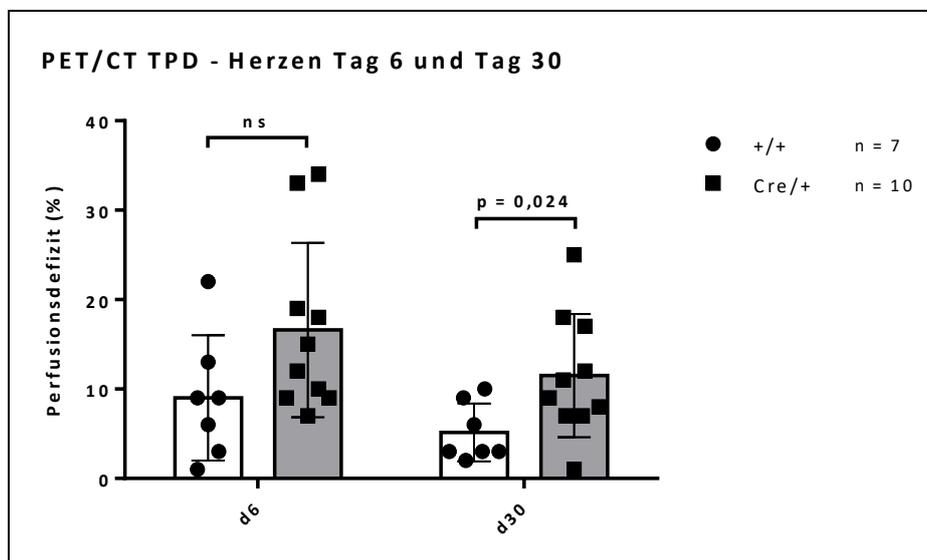


Abbildung 18 - Vergleich des totalen Perfusionsdefizites (TPD) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{lox/lox}$ Mauslinie

Neben der Bestimmung des TPD erfolgte auch die Ermittlung funktioneller Parameter wie der Ejektionsfraktion (EF) und dem enddiastolischen Volumen (EDV) als Maß für die abgelaufenen

Ergebnisse

Remodeling-Prozesse im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt. Weder bei der EF noch bei dem EDV ergaben sich relevante Unterschiede zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren (EF d6: +/+ 66,57 \pm 11,28 % vs. Cre/+ 61,00 \pm 11,13 %; EF d30: +/+ 72,86 \pm 10,57 % vs. Cre/+ 65,00 \pm 13,28 %; EDV d6 +/+ 39,43 \pm 4,89 ml vs. Cre/+ 43,20 \pm 6,58 ml; EDV d30: +/+ 42,43 \pm 4,39 ml vs. Cre/+ 46,90 \pm 9,63 ml) (siehe Abbildungen 19 und 20).

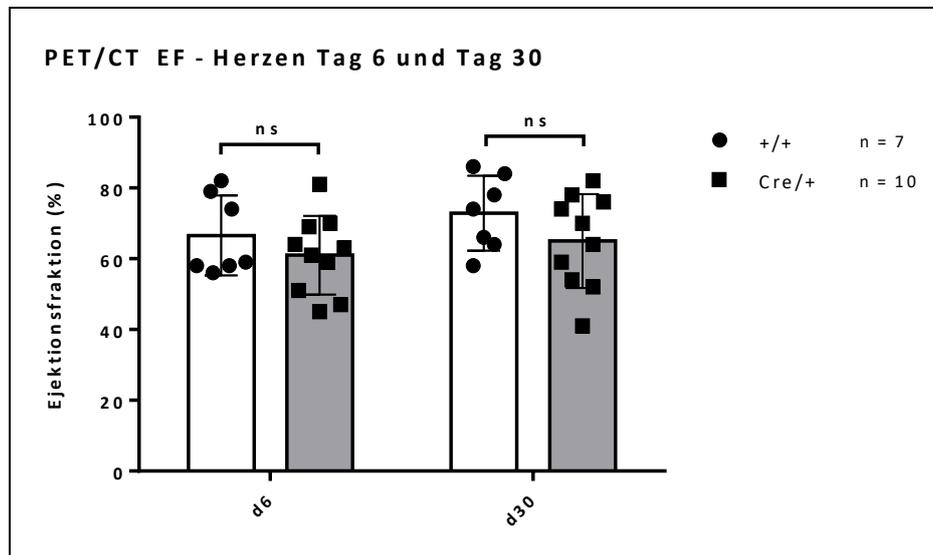


Abbildung 19 - Vergleich der Ejektionsfraktion (EF) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flx/flx}$ Mauslinie

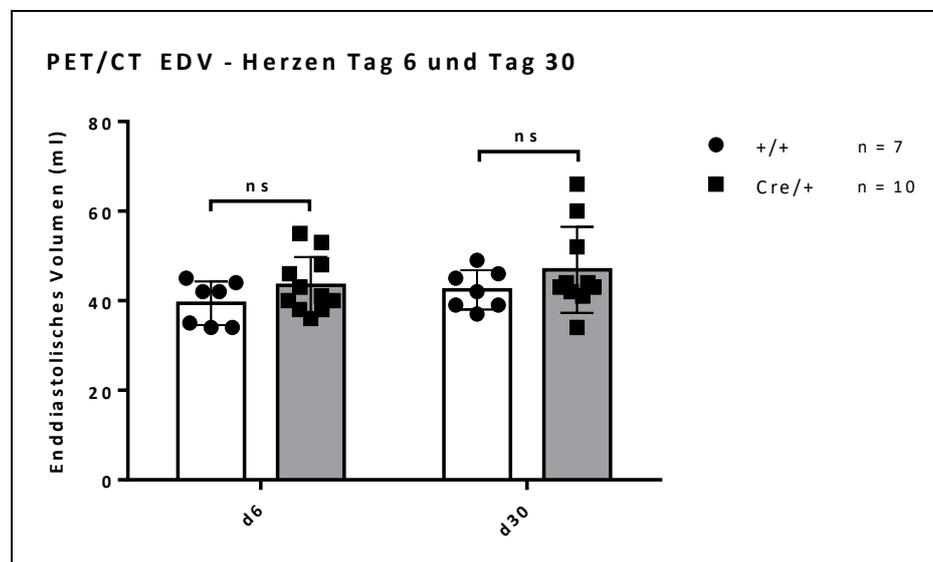


Abbildung 20 - Vergleich des enddiastolischen Volumens (EDV) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flx/flx}$ Mauslinie

Nachdem der Einfluss einer verminderten Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen auf die Infarktgröße nach einem akuten Myokardinfarkt evaluiert werden konnte, sollten im Rahmen weitergehender Untersuchungen die zugrundeliegenden Prozesse, welche einer

Modulation durch den RXR α unterliegen, analysiert werden.

4. Untersuchung der Rolle des RXR α bei der Phagozytose

Unter Verwendung eines Phagozytoseassays mit „pHrodo™ Red BioParticles®“ wurde die Auswirkung einer verminderten Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen auf deren phagozytotische Aktivität untersucht. Das Grundprinzip des Assays beruht auf einer Änderung der Intensität des Fluoreszenzsignals der Partikel in Abhängigkeit vom pH-Wert. Hierdurch eignet sich dieser zur Quantifikation der Phagozytoseaktivität von Zellen (siehe Abschnitt III.4.6.1). Dabei korreliert die Stärke des Fluoreszenzsignals mit der phagozytotischen Aktivität der Zellen. Für den Assay wurde das Blut der Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung verwendet und, wie in Abschnitt III.4.2. beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurde der Phagozytoseassay, wie in Abschnitt III.4.6. dargestellt, durchgeführt. Als Negativkontrolle kam Cytochalasin D zur Anwendung. Dieses Toxin hemmt die Polymerisation der Aktinfilamente und verhindert somit die Phagozytose. Die Gating-Strategie für diesen Versuch ist in der nachfolgenden Abbildung 21 exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

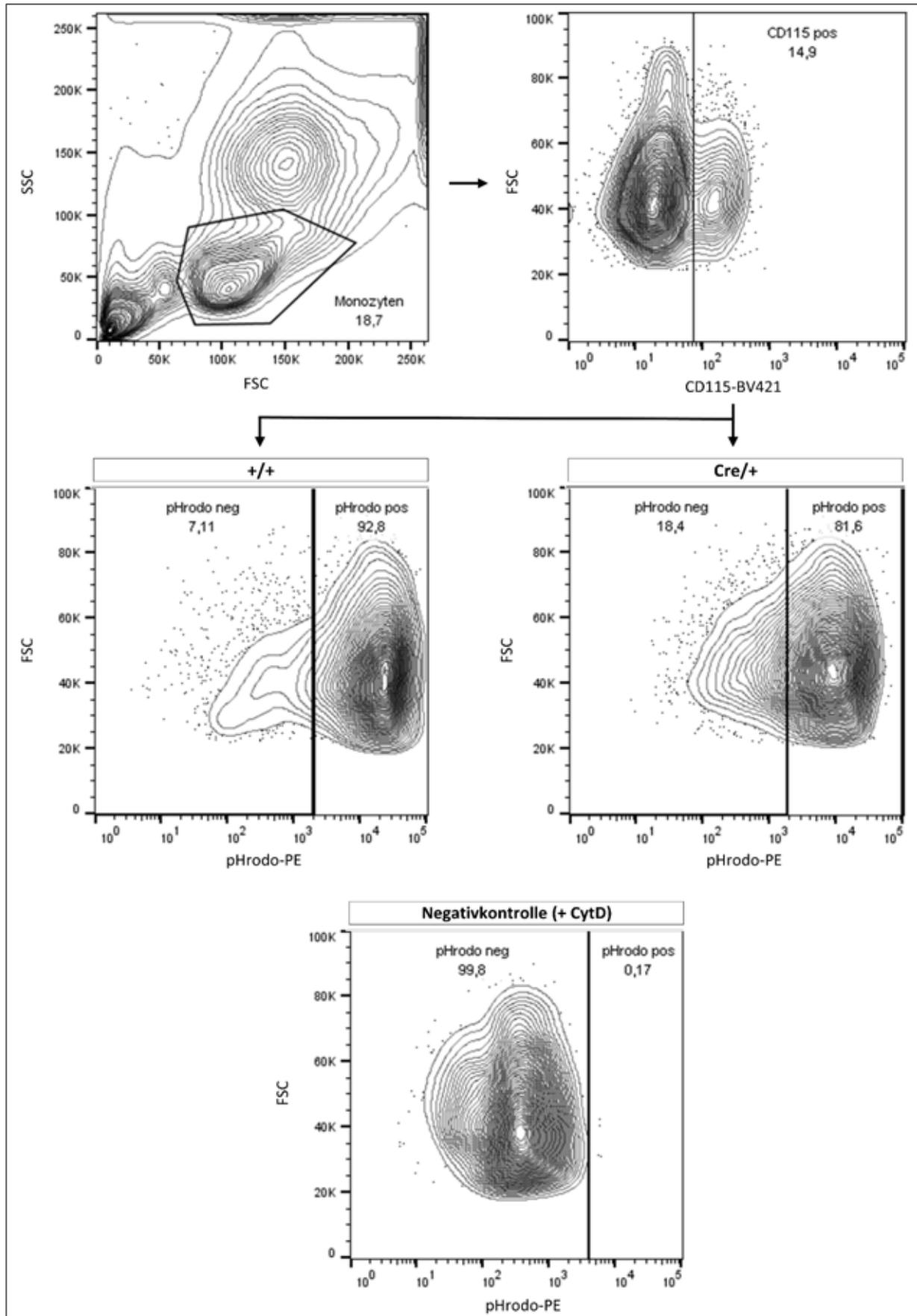


Abbildung 21 - Gating des Phagozytoseassays mit „pHrodo™Red BioParticles®“

Ergebnisse

Bei den Kontroll-Tieren waren $73,13 \pm 12,02$ % der Blutmonozyten phagozytotisch aktiv. Von den Blutmonozyten der RXR α -deletierten Tiere zeigten $60,82 \pm 17,35$ % eine phagozytotische Aktivität. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Phagozytoseaktivität zwischen den Kontrollen und den Cre/+ Tieren gefunden werden (siehe Abbildung 22).

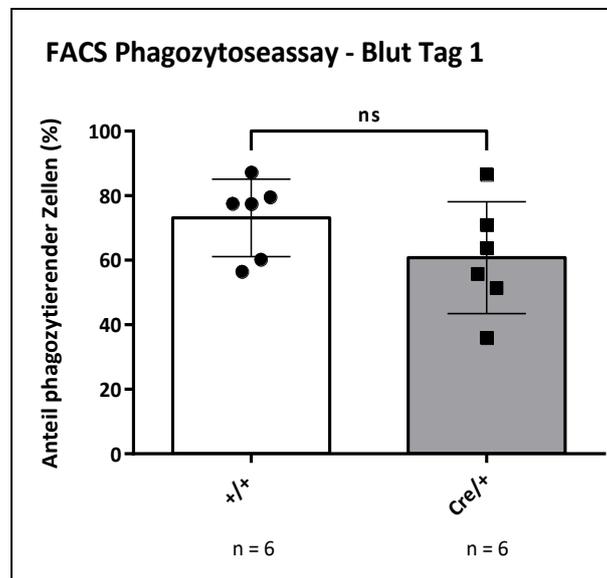


Abbildung 22 - Gegenüberstellung der phagozytotischen Aktivität von Blutmonozyten der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flox/flox}$ Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung

5. Bedeutung des RXR α bei der Gefäßneubildung nach einem Myokardinfarkt

Damit der Einfluss einer reduzierten RXR α -Expression auf die Gefäßneubildung nach einem akuten Myokardinfarkt quantifiziert werden konnte, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Schnittpräparaten aus den Herzen, welche an Tag 30 nach der I/R-Verletzung entnommen wurden, durchgeführt. Dabei fanden Antikörper, welche an den Endothelzellmarker CD31 binden, Anwendung und es wurde die Gefäßdichte pro Fläche zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren verglichen.

Die Abgrenzung der Infarkt-Grenzzone war mithilfe von „Wheat germ agglutinin“ (WGA) möglich. WGA ist ein Kohlenhydrat-freies Protein, welches an Komponenten der extrazellulären Matrix bindet (siehe Abschnitt III.8.3.1). Während der Umbau- und Heilungsprozesse nach Myokardinfarkt kommt es zu einer Akkumulation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix im Infarktgebiet. Folglich stellt die WGA-Färbung eine zuverlässige Methode zur Abgrenzung des Infarktareals dar. Die Infarkt-Grenzzone wurde definiert als der Bereich, welcher sich 500 μ m um das Infarktgebiet befindet. Alle Areale, die einen größeren Abstand als 500 μ m vom Infarktgebiet besaßen, wurden als Remote-Areal charakterisiert (siehe Abbildung 23).

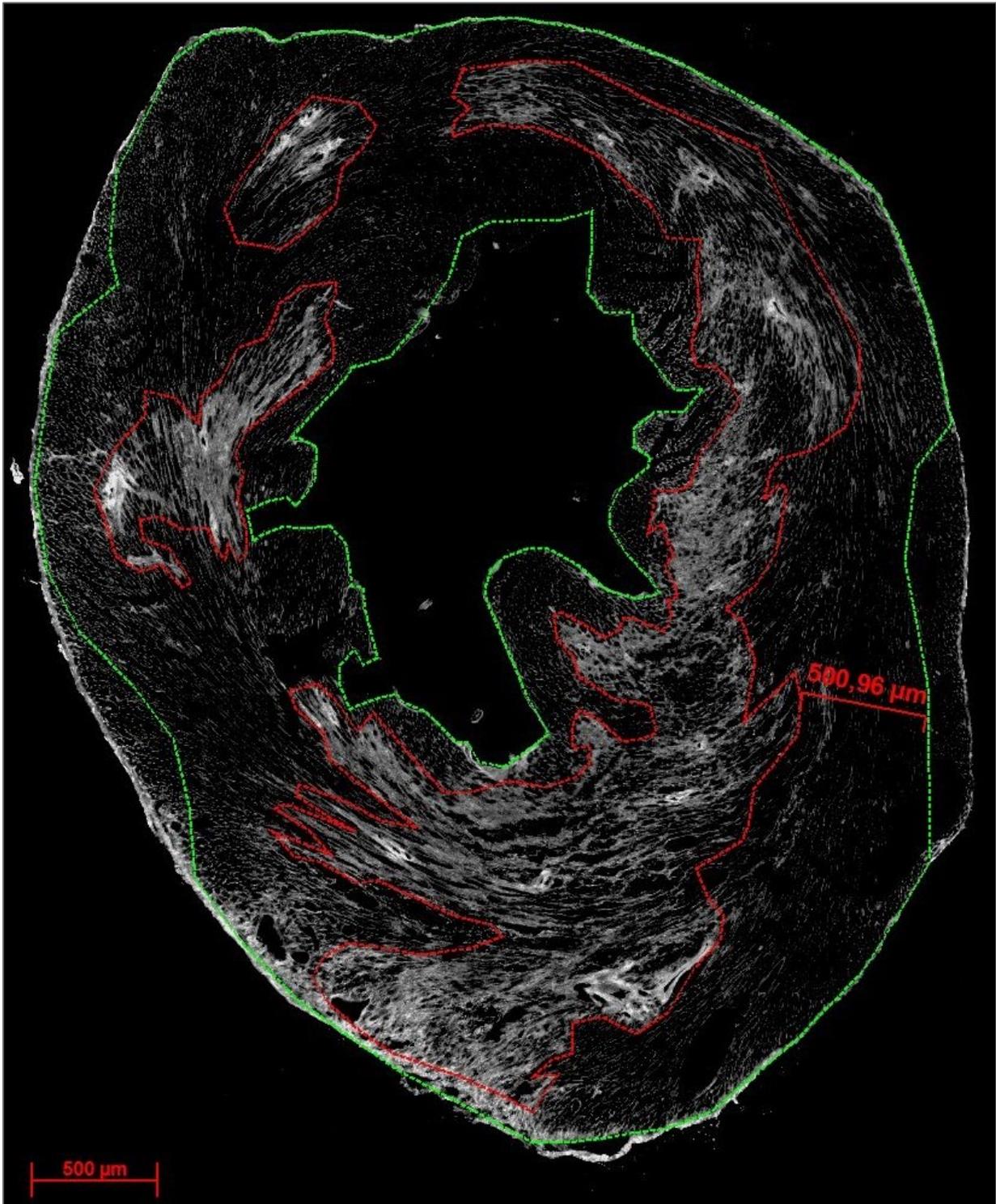


Abbildung 23 - Beispielhafte Darstellung der Färbung mit WGA zur Abgrenzung des Infarktareals (Infarktgebiet: umrandet durch die rote Linie, Infarkt-Grenzzone: Bereich zwischen der roten und der grünen Linie, Remote-Areal: Bereich jenseits der grünen Linie)

Die Immunfluoreszenzfärbung mit einem CD31-Antikörper (siehe Abbildung 24) wurde wie in Abschnitt III.8.3.2. beschrieben durchgeführt.

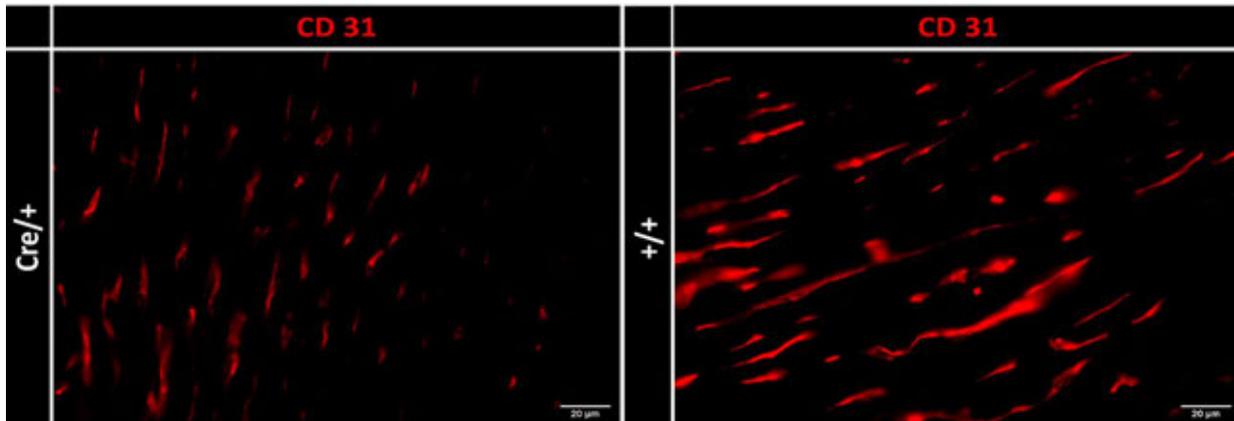


Abbildung 24 - Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-CD31 Antikörper zur Quantifikation der Gefäßneubildung in den Herzen der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Tiere an Tag 30 nach I/R-Verletzung

Die Infarkt-Grenzzone in den Herzen der Kontroll-Tiere zeigte eine signifikant höhere Gefäßdichte pro Fläche als die Grenzzone in den Herzen der $RXR\alpha$ -deletierten Tiere. Während die Kontrollen eine Dichte von $0,049 \pm 0,021$ pro μm^2 aufwiesen, fanden sich in den Herzen der $RXR\alpha$ -deletierten Tiere nur Werte von $0,010 \pm 0,003$ pro μm^2 (siehe Abbildung 25).

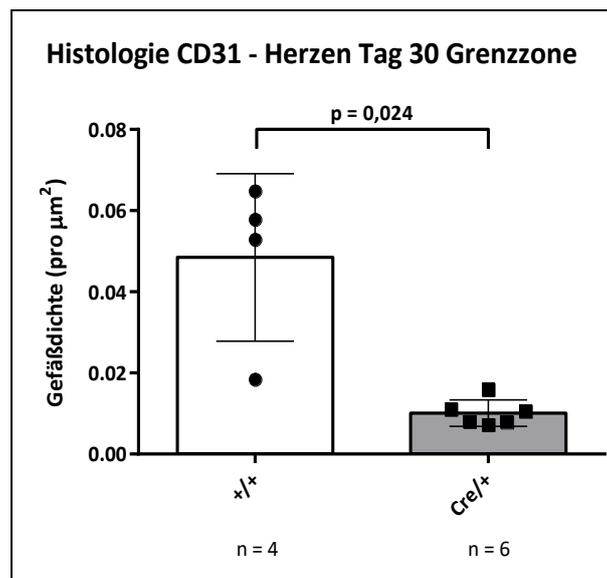


Abbildung 25 - Gegenüberstellung der Gefäßdichte in der Infarkt-Grenzzone der Herzen der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Mauslinie an Tag 30 nach I/R-Verletzung (Vergleich Kontrollen mit *Cre/+* Tieren)

6. Effekt einer reduzierten Expression des $RXR\alpha$ auf die Proliferationsrate von Makrophagen

Die Beurteilung der Proliferationsrate von Makrophagen erfolgte mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung der Herzen, welche an Tag 2 nach I/R-Verletzung entnommen wurden. Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte entsprechend Abschnitt III.8.3.2. Die Makrophagen im Gewebe wurden mit einem Antikörper, welcher an den spezifischen

Ergebnisse

Oberflächenmarker F4/80 bindet, detektiert. Die Proliferationsrate konnte mit dem Proliferationsmarker Ki-67 bestimmt werden. Der Farbstoff Hoechst wurde zur Darstellung der Zellkerne verwendet (siehe Abbildung 26).

Es wurde die Proliferationsrate der Makrophagen in unterschiedlichen Arealen der Herzen von Kontroll- und RXR α -deletierten Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox} Mauslinie untersucht und verglichen. Da die Umbauprozesse an Tag 2 nach dem akuten ischämischen Ereignis noch nicht weit genug fortgeschritten sind, war eine genaue Abgrenzung des Infarktareals mittels der WGA-Färbung nicht möglich. Folglich wurden Schnittpräparate aus dem 3. Teil der Herzen (Herzspitze) zur Untersuchung des Infarktareals/der Infarkt-Grenzzone erstellt (siehe Abschnitt III.8.2.) und Präparate aus dem 1. Teil der Herzen (Herzbasis) zur Beurteilung des Remote-Areals herangezogen.

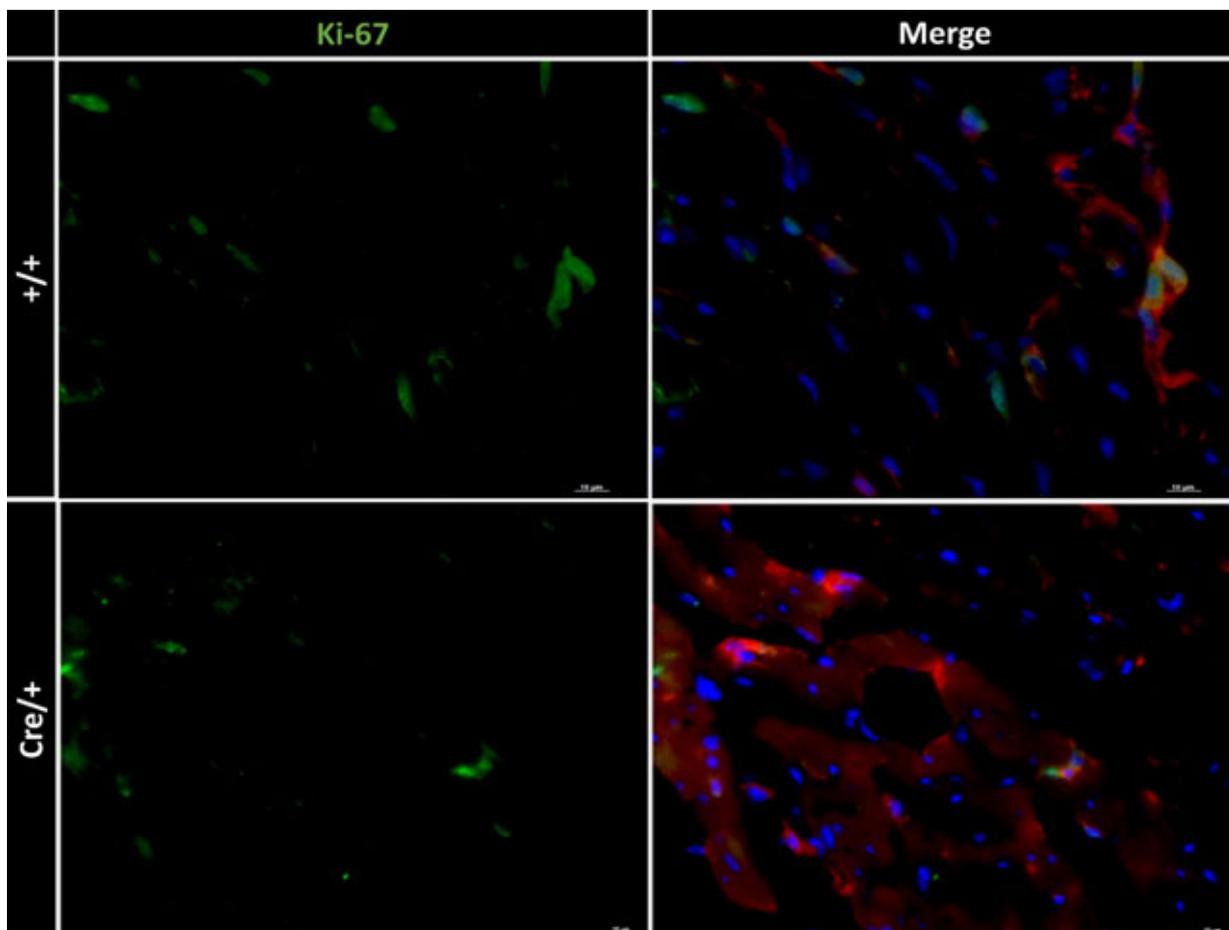


Abbildung 26 - Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-F4/80-Cy3 (zur Markierung der Makrophagen), anti-Ki-67-AF488 (zur Darstellung der Zellproliferation) und Hoechst (als Zellkernmarker) der Herzen von Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox} Tieren an Tag 2 nach I/R-Verletzung

Im Infarktareal/der Infarkt-Grenzzone konnte eine signifikant höhere Proliferationsrate von Makrophagen in den Kontrollen verglichen mit den RXR α -deletierten Tieren festgestellt werden. Die Proliferationsrate der Kontroll-Tiere lag bei $9,932 \pm 2,401 \times 10^{-5}$ Zellen/ μm^2 Fläche wohingegen

Ergebnisse

bei den RXR α -deletierten Tieren $4,385 \pm 1,425 \times 10^{-5}$ Zellen/ μm^2 Fläche proliferierten (siehe Abbildung 27 A).

Im Remote-Areal zeigte sich wiederum kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Proliferationsrate Remote-Areal: +/+ $1,287 \pm 1,378 \times 10^{-5}$ Zellen/ μm^2 Fläche vs. Cre/+ $1,000 \pm 1,326 \times 10^{-5}$ Zellen/ μm^2 Fläche) (siehe Abbildung 27 B).

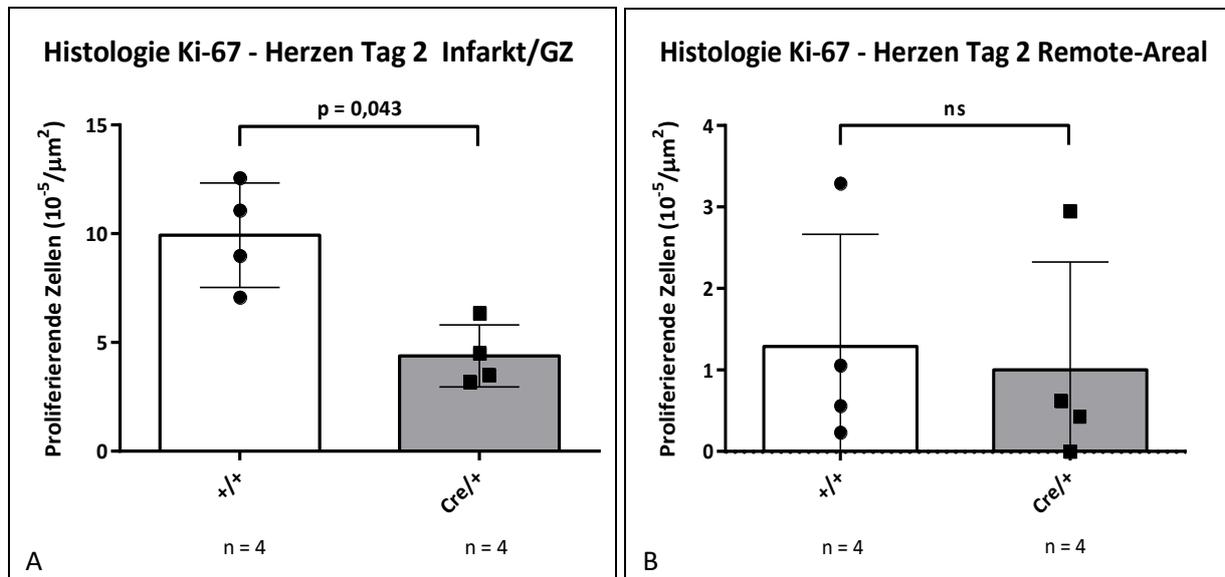


Abbildung 27 - Vergleich der Proliferationsrate von Makrophagen/Fläche im Herzen zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{\text{lox/lox}}$ Mauslinie an Tag 2 nach I/R-Verletzung (A) Infarktareal/Infarkt-Grenzzone (GZ) (B) Remote-Areal

In einem nächsten Schritt sollte betrachtet werden, ob die verminderte Proliferationsrate von Makrophagen im Infarktareal/der Infarkt-Grenzzone der RXR α -deletierten Tiere mit einer verminderten Gesamtzahl an Makrophagen im Herzen einhergeht. Hierfür wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung der Herzen an Tag 1 nach I/R-Verletzung durchgeführt. Die Herzen wurden entsprechend Abschnitt III.4.5. vorbereitet. Der Vergleich der Makrophagenzahlen in den Herzen der RXR α -deletierten Tiere mit den Zellzahlen der Kontrollen erbrachte keinen signifikanten Unterschied (+/+ $184,00 \pm 97,55$ Makrophagen pro mg Herzgewicht vs. Cre/+ $147,20 \pm 80,22$ Makrophagen pro mg Herzgewicht) (siehe Abbildung 28).

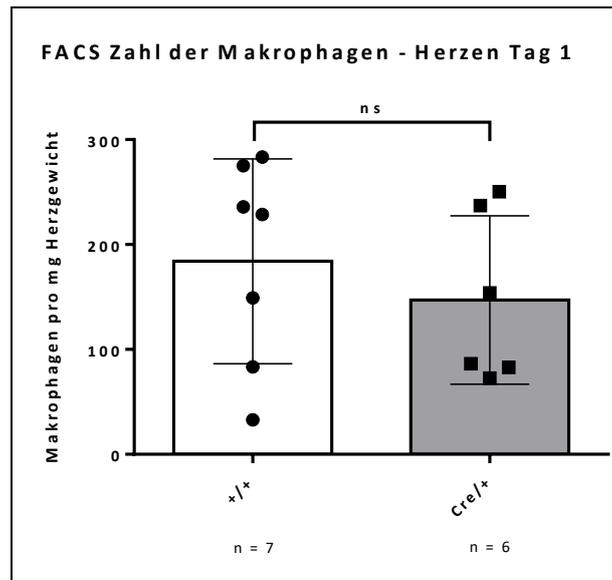


Abbildung 28 - Vergleich der Anzahl an Makrophagen im Herzen von Cre/+ und von +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flox/flox}$ Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung

7. Bedeutung des RXR α bei der Apoptose von Zellen

Zur Beurteilung des Einflusses des RXR α auf die Apoptose von Zellen wurde das „ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit“ verwendet. Hierbei wurden Schnittpräparate aus den Herzen, welche an Tag 1 nach der I/R-Verletzung entnommen wurden, gemäß Abschnitt III.8.2. erstellt. Die Durchführung der Färbung erfolgte wie in Abschnitt III.8.3.3. beschrieben. Durch die Hinzunahme des Zellkern-Farbstoffes Hoechst war es möglich, apoptotische Zellen zu detektieren. Die Anzahl dieser Zellen wurde zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren verglichen (siehe Abbildung 29).

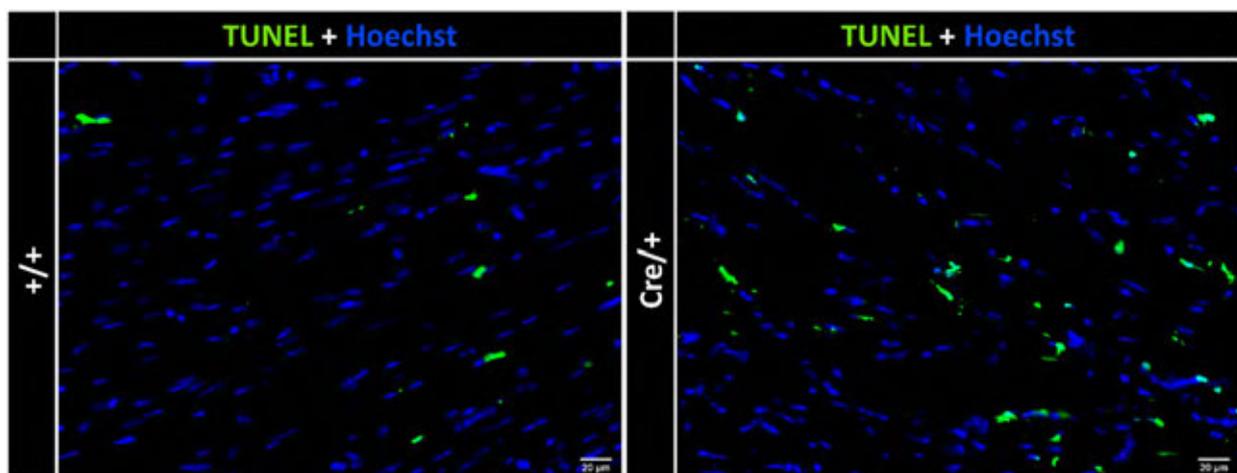


Abbildung 29 - Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung apoptotischer Zellen in den Herzen der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flox/flox}$ Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung

Der Vergleich von Kontrollen und RXR α -deletierten Tieren zeigte, dass eine Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen zu einer signifikant höheren Anzahl apoptotischer Zellen im Rahmen

Ergebnisse

der akuten Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt führt. Während die Kontroll-Tiere nur $10,060 \pm 2,748 \times 10^{-5}$ apoptotische Zellen pro μm^2 Fläche aufwiesen, lag die Zahl der apoptotischen Zellen in den Cre/+ Tieren mit $36,110 \pm 22,820 \times 10^{-5}$ pro μm^2 Fläche deutlich höher (siehe Abbildung 30).

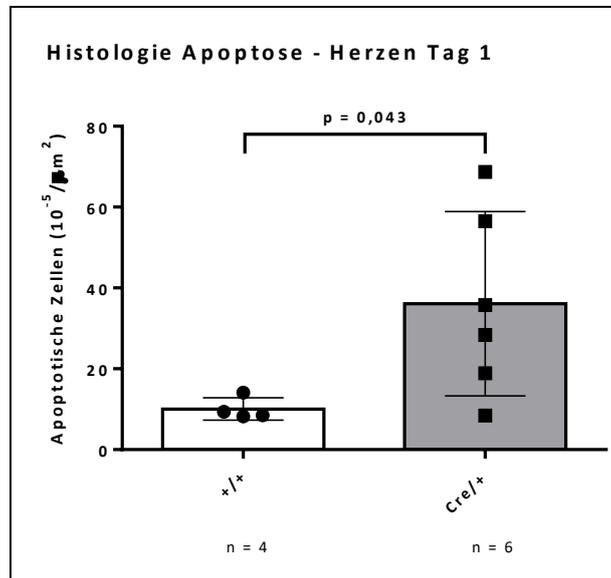


Abbildung 30 - Vergleich der Anzahl apoptotischer Zellen in den Herzen von Kontroll- und Cre/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{fllox/fllox}$ Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung

8. Beeinflussung der Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Herzen durch RXR α in Monozyten und Makrophagen

Der „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array“ ermöglichte es uns, die Funktion des RXR α in Monozyten und Makrophagen bei der Genexpression von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Hierfür wurden Gewebelysate der Infarktareale aus Herzen an Tag 1 nach I/R-Verletzung gemäß Abschnitt III.9.1. erstellt und mittels des Arrays hinsichtlich der Konzentrationen von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren verglichen.

Der Vergleich von 110 Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren konnte keine relevanten Unterschiede der Expressionsraten in den Herzen der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere zeigen (siehe Abbildungen 31 - 33).

Ergebnisse

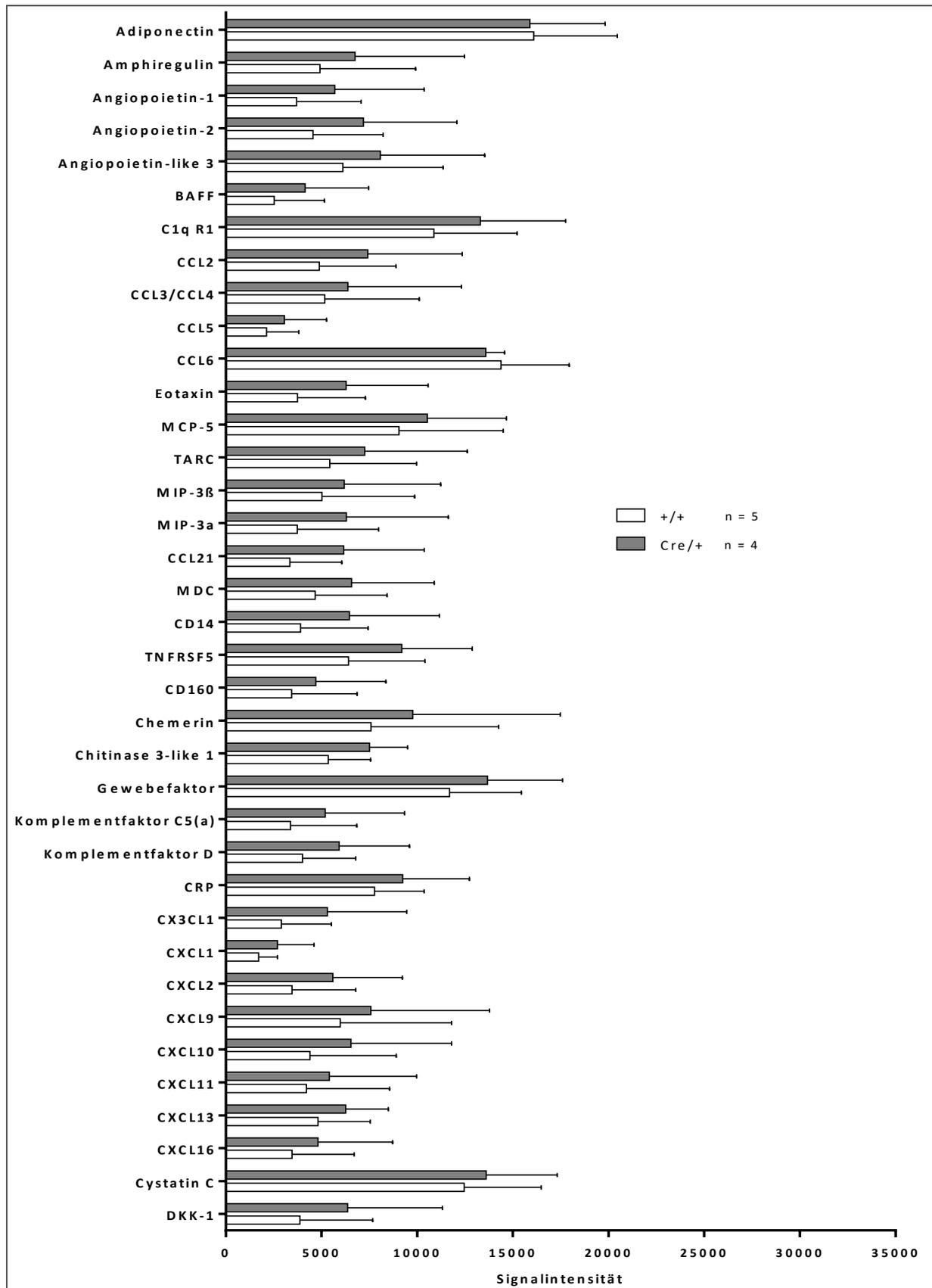


Abbildung 31 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 1)

Ergebnisse

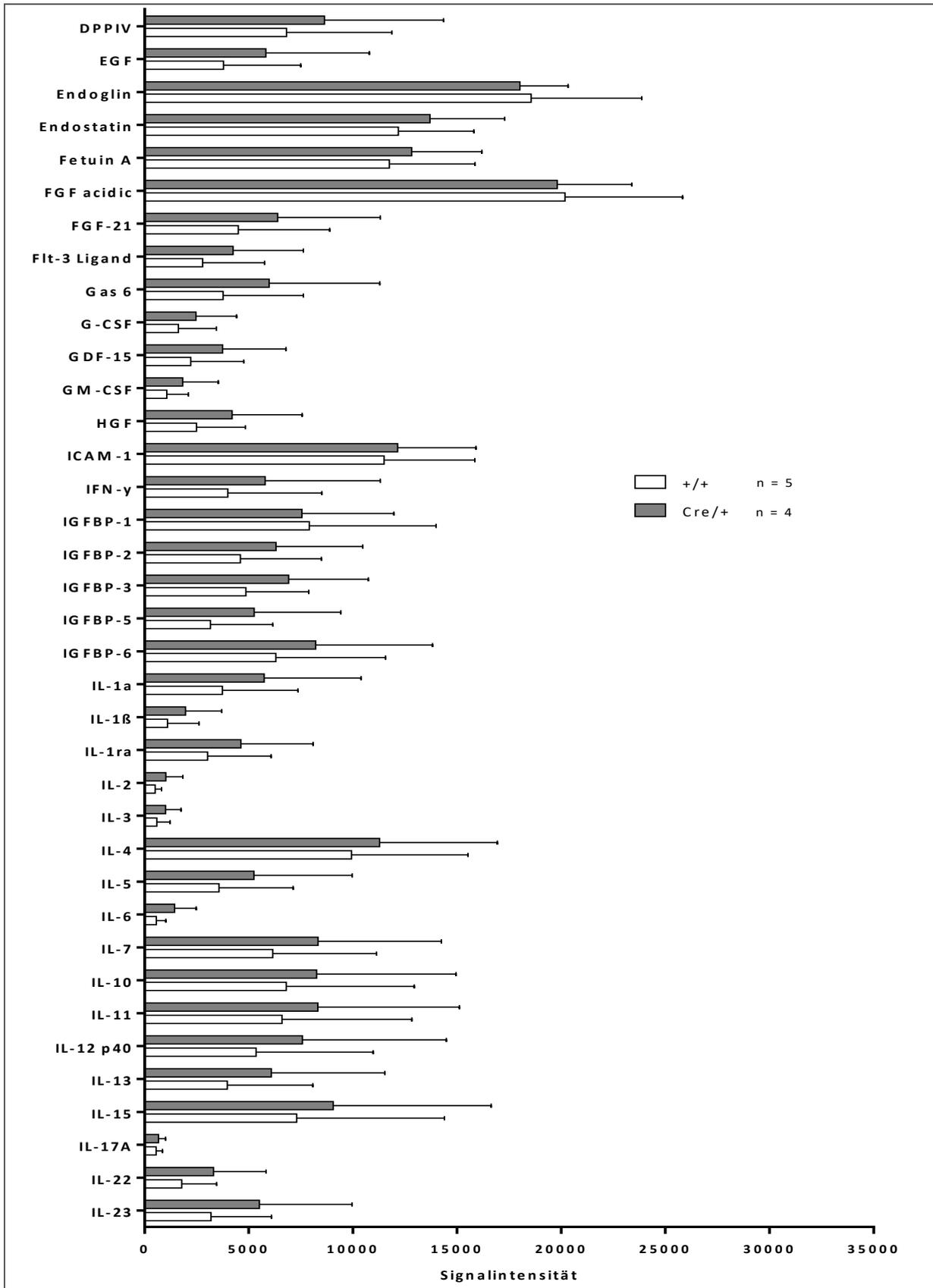


Abbildung 32 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 2)

Ergebnisse

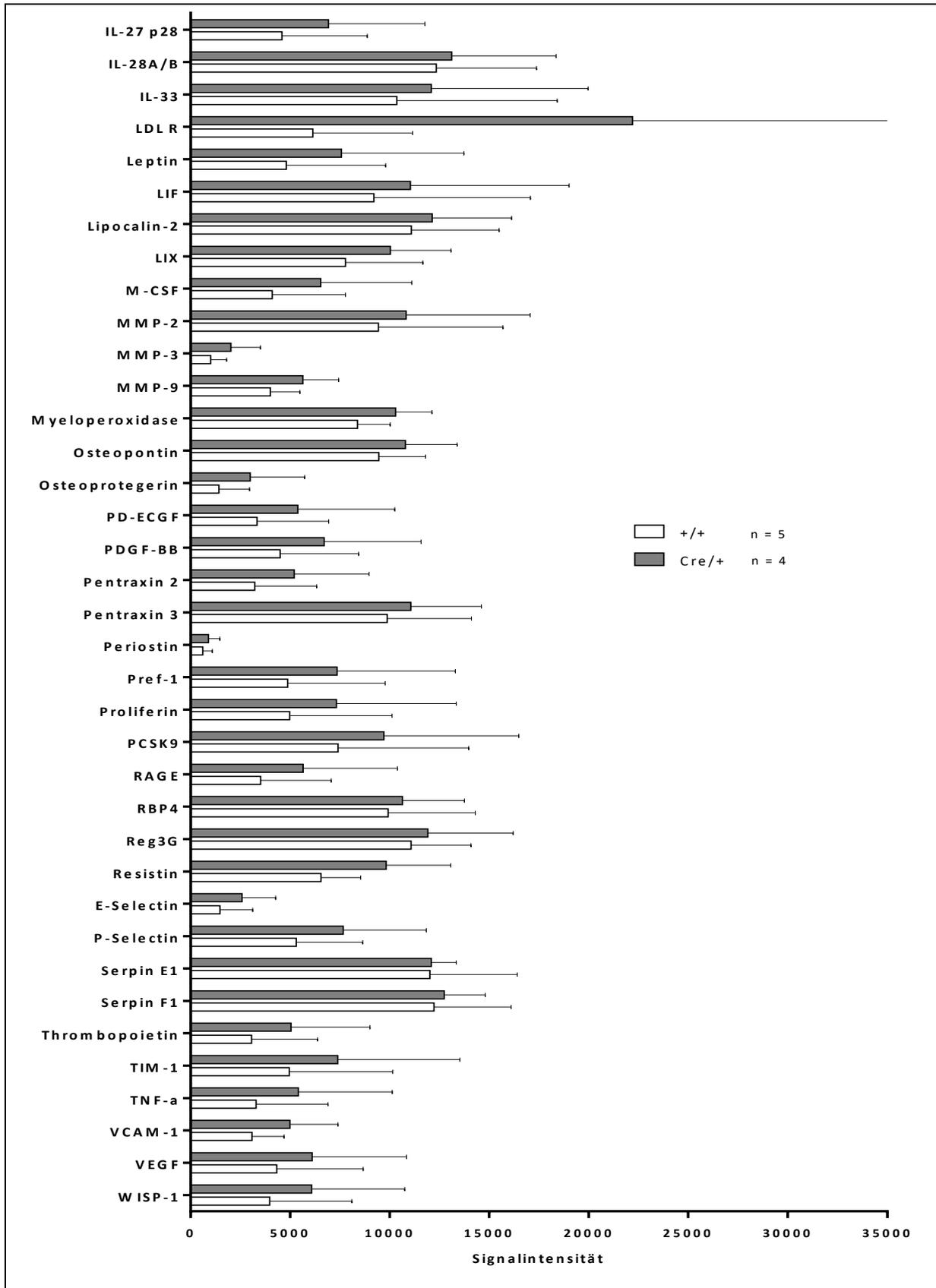


Abbildung 33 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{flx/flx}$ Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 3)

9. Einfluss einer verminderten Expression des RXR α auf die Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen

9.1. Charakterisierung von Makrophagen anhand der Expression von MHCII im Steady State und in Reaktion auf einen Myokardinfarkt

Die Einteilung der Makrophagen zur weitergehenden Charakterisierung der Subpopulationen erfolgte anhand des Oberflächenmoleküls MHCII in den Cx3cr1-GFP Reporter-mäusen. Mittels durchflusszytometrischer und histologischer Untersuchungen der Herzen konnte die Expression von MHCII im Steady State (SS) und im Rahmen des akuten Myokardinfarktes untersucht werden. Die Vorbereitung der Herzen für die durchflusszytometrischen Analysen erfolgte wie in Abschnitt III.4.5. beschrieben. Die verwendete Gating-Strategie ist nachfolgend beispielhaft dargestellt.

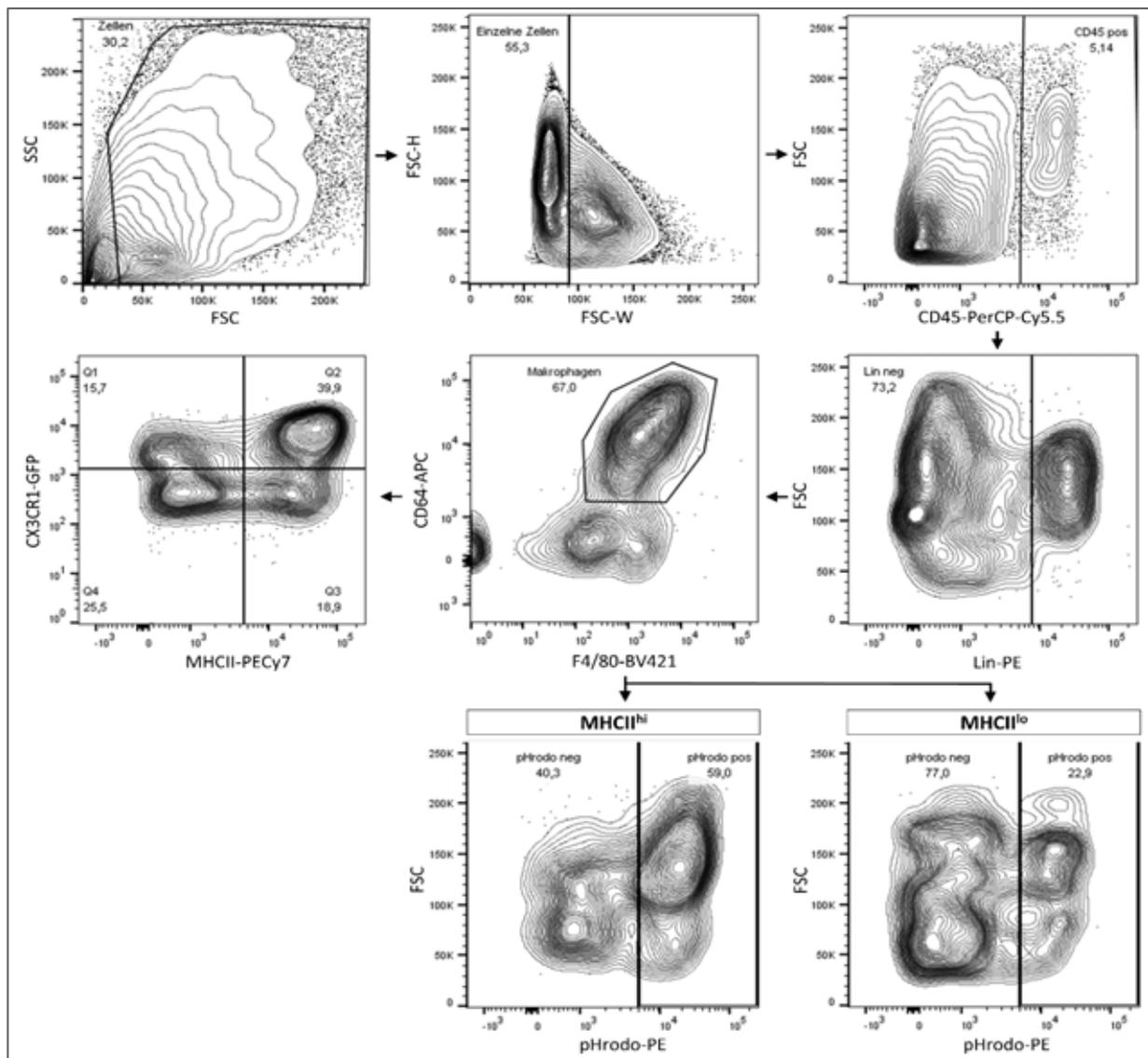


Abbildung 34 - Gating zur Charakterisierung der Makrophagenpopulationen in den Herzen der Cx3cr1-GFP Tiere sowie des Phagozytoseassays (hierbei ohne Lin-PE)

Ergebnisse

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Herzen im SS, an Tag 2/6/30 nach I/R-Verletzung zeigten, dass im Steady State die Mehrzahl der Makrophagen im Herzen ($62,46 \pm 6,25$ %) eine hohe Expressionsrate an MHCII (MHCII^{hi}) aufweist. In Reaktion auf ein ischämisches Ereignis nimmt die Population der Makrophagen mit einer geringen Expression von MHCII (MHCII^{lo}) auf Kosten der MHCII^{hi} Zellen zu. An Tag 2 nach einem akuten Myokardinfarkt ist der Anteil der MHCII^{hi} Zellen auf $18,72 \pm 5,83$ % gefallen. Im Zeitverlauf erholt sich die Population der MHCII^{hi} Makrophagen wieder. An Tag 6 nach I/R-Verletzung ist der Anteil der MHCII^{hi} Makrophagen bereits wieder auf $40,74 \pm 4,84$ % gestiegen. Die Verteilung an Tag 30 nach Myokardinfarkt kommt der unter Steady State Bedingungen nahe (MHCII^{hi} MΦ an Tag 30: $58,50 \pm 4,42$ %) (siehe Abbildung 35).

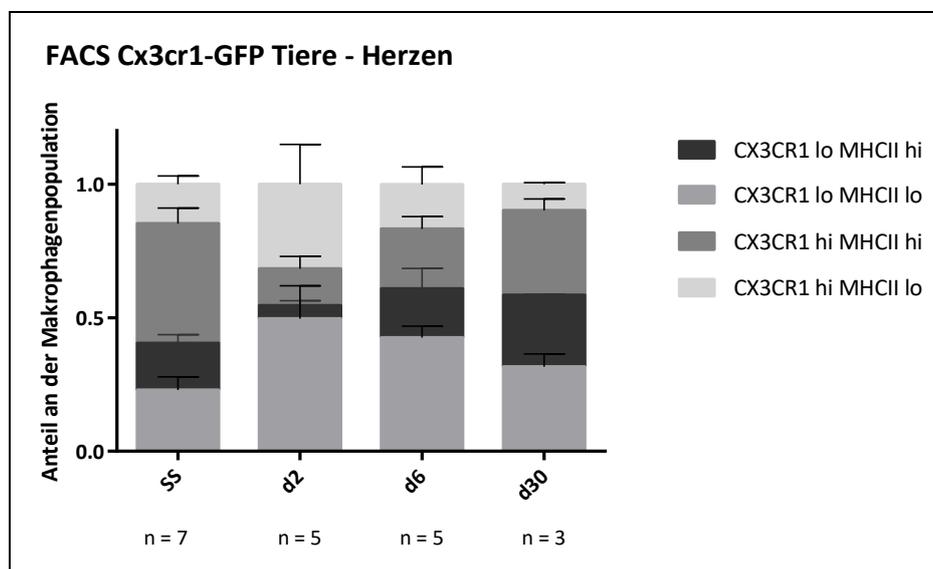


Abbildung 35 - Dynamische Veränderung der Makrophagenpopulationen im Herzen als Reaktion auf einen akuten Myokardinfarkt

Die histologischen Untersuchungen ermöglichten eine genauere Analyse der Verteilung der Makrophagenpopulationen im Herzen. Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-F4/80-Antikörper (zur Markierung der kardialen Makrophagen), einem anti-GFP-Antikörper (zur Darstellung der CX₃CR₁-Expression), einem anti-MHCII-Antikörper (zur Evaluation der MHCII-Expression) und dem Farbstoff Hoechst (zur Markierung der Zellkerne) durchgeführt (siehe Abschnitt III.8.3.2. und Abbildung 36). Die Abgrenzung des Infarktareals in den Herzen an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung erfolgte mittels WGA wie im Abschnitt III.8.3.1. und im Abschnitt IV.5. beschrieben (siehe Abbildung 23).

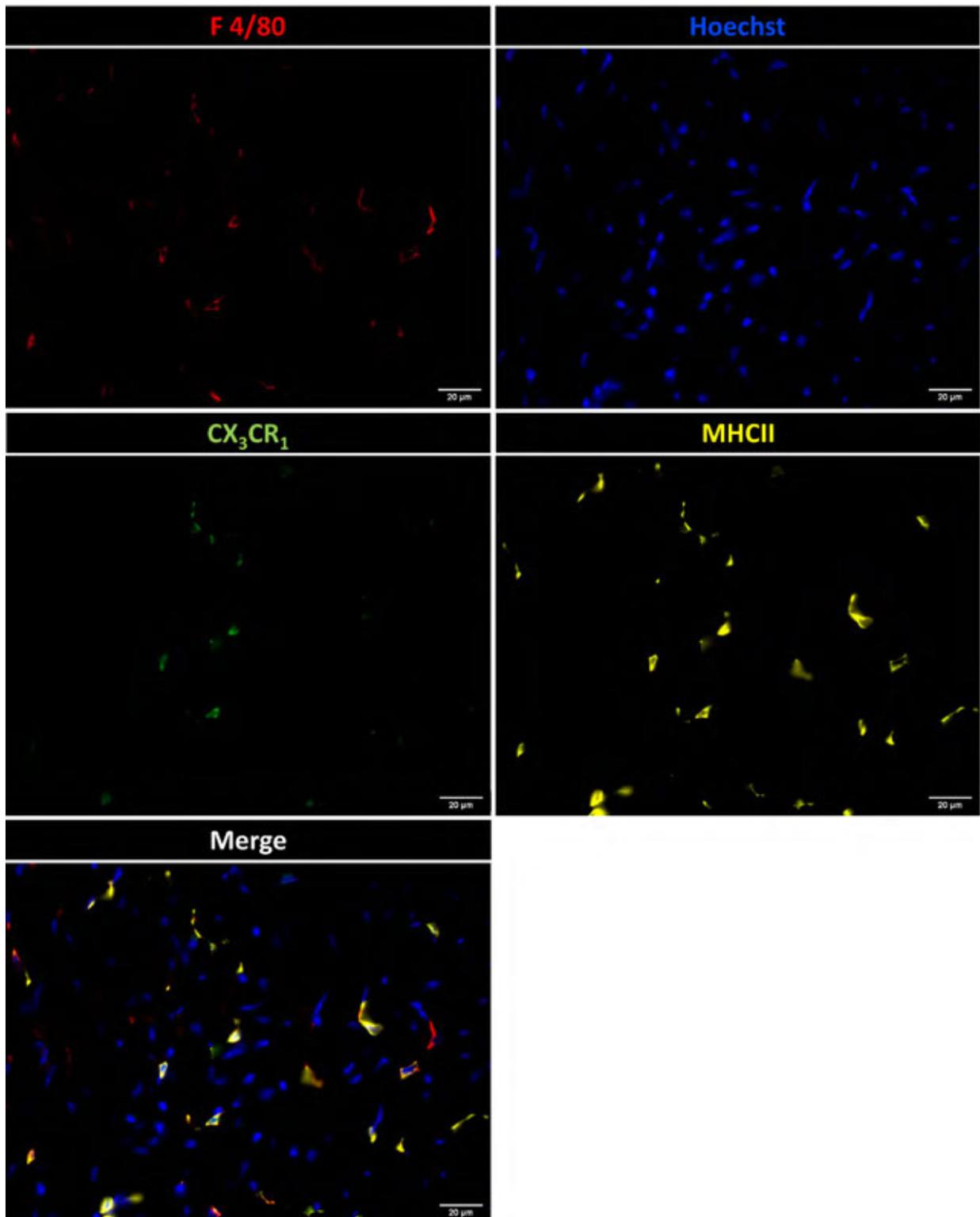


Abbildung 36 - Repräsentative Bilder der histologischen Untersuchung der Herzen von *Cx3cr1-GFP*-Tieren

Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erbrachte im Remote-Areal der Infarktherzen eine Zusammensetzung der Makrophagenpopulation, die vergleichbar ist mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchungen an Tag 30. An Tag 6 nach I/R-Verletzung stellten die MHCII^{hi} Makrophagen im Remote-Areal mit $47,33 \pm 7,53$ % die dominante

Ergebnisse

Subpopulation dar. In der Infarkt-Grenzzone, noch deutlicher im Infarktareal nahm diese Population anteilmäßig ab und die Menge der MHCII^{lo} Makrophagen stieg prozentual an (MHCII^{hi} MΦ Infarkt-Grenzzone: $30,12 \pm 1,48$ %; MHCII^{hi} MΦ Infarktareal: $18,59 \pm 2,55$ %) (siehe Abbildung 37).

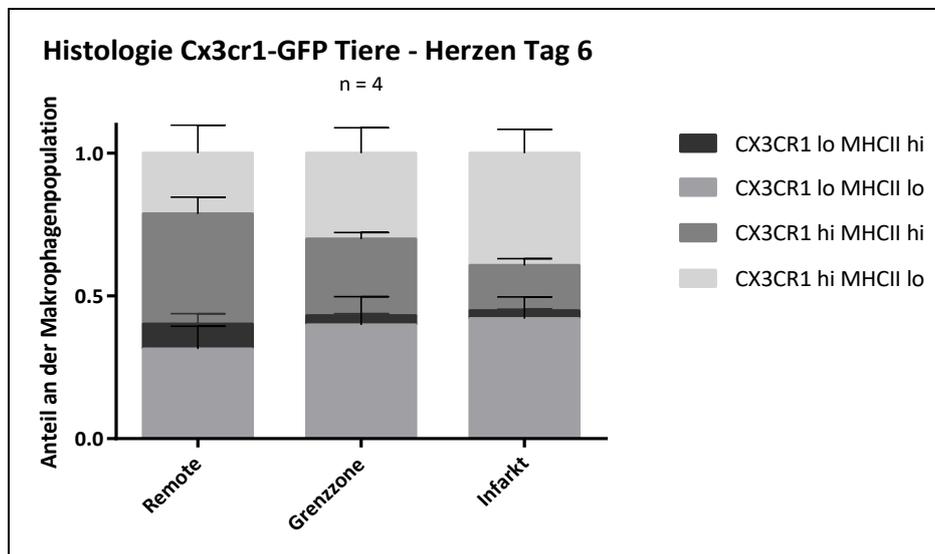


Abbildung 37 - Verteilung der Makrophagenpopulationen in den Herzen der Cx3cr1-GFP Tiere an Tag 6 nach I/R-Verletzung

Mithilfe der Mx1-Cre;Myb^{flox/flox} Mauslinie konnte weitergehend der Ursprung der MHCII^{lo} Makrophagen charakterisiert werden. Dafür wurden mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen die CD45.1 positiven Zellen betrachtet, welche bei der Hämatopoese im Knochenmark entstehen.

Die Unterteilung der CD45.1 positiven Makrophagen in MHCII^{hi} und MHCII^{lo} Populationen machte deutlich, dass der Großteil der einwandernden Zellen an Tag 2 nach einem Myokardinfarkt sowohl im Infarktgebiet als auch im Remote-Areal eine geringe Expression von MHCII aufweist (MHCII^{lo} MΦ Infarkt Tag 2: $81,55 \pm 7,15$ %; MHCII^{lo} MΦ Remote-Areal Tag 2: $75,6 \pm 6,77$ %) (siehe Abbildung 38).

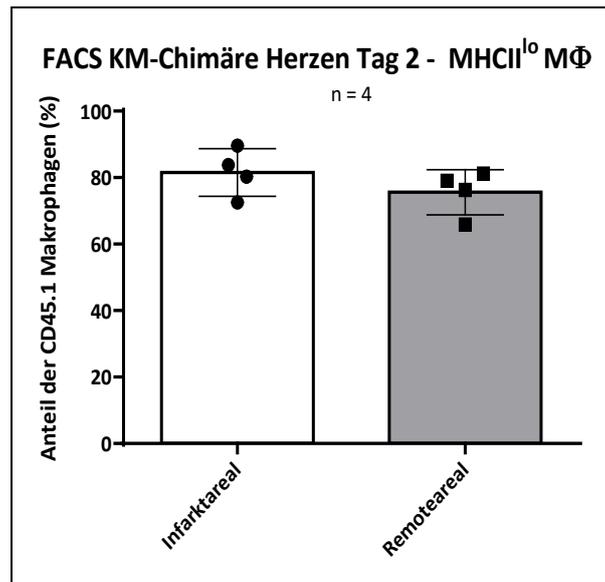


Abbildung 38 - Anteil der MHCII^{lo} Makrophagen an allen CD45.1 positiven Makrophagen im Infarktgebiet und im Remote-Areal der Herzen von Mx1-Cre;Myb^{fllox/fllox} Tieren an Tag 2 nach I/R-Verletzung

In einem nächsten Schritt sollte genauer betrachtet werden, ob sich die MHCII^{hi} und MHCII^{lo} Makrophagen funktionell unterscheiden. Hierzu wurde ein Phagozytoseassay mit „pHrodo™ Red BioParticles®“ am Durchflusszytometer, entsprechend Abschnitt III.4.6. durchgeführt.

Im Steady State wiesen die MHCII^{hi} Makrophagen eine signifikant höhere phagozytotische Aktivität verglichen mit der MHCII^{lo} Population auf (Steady State: MHCII^{hi} MΦ 49,43 ± 7,99 % vs. MHCII^{lo} MΦ 22,15 ± 5,91 %) (siehe Abbildung 39).

Um die Phagozytoseaktivität der Makrophagenpopulationen unter Infarktbedingungen zu charakterisieren, wurde der Assay mit kardialen Makrophagen an Tag 1 nach I/R-Verletzung wiederholt.

Dabei war ersichtlich, dass sowohl die Population der MHCII^{hi} als auch der MHCII^{lo} Makrophagen eine Zunahme der phagozytotischen Aktivität im Infarktareal verglichen mit den Steady State Bedingungen zeigte. Die MHCII^{hi} Makrophagen waren, wie auch unter Steady State Bedingungen, effektiver in der Aufnahme von Partikeln im Vergleich zu den MHCII^{lo} Zellen (Tag 1 Infarktareal: MHCII^{hi} MΦ 60,95 ± 3,58 % vs. MHCII^{lo} MΦ 31,88 ± 5,86 %) (siehe Abbildung 39).

Die Phagozytoseaktivität der MHCII^{hi} und MHCII^{lo} Makrophagen im Remote-Areal der Infarktherzen unterschied sich wiederum nicht signifikant von der Aktivität der Zellen in den Steady State Herzen (Tag 1 Remote-Areal: MHCII^{hi} MΦ 42,18 ± 13,04 % vs. MHCII^{lo} MΦ 23,28 ± 8,24 %) (siehe Abbildung 39).

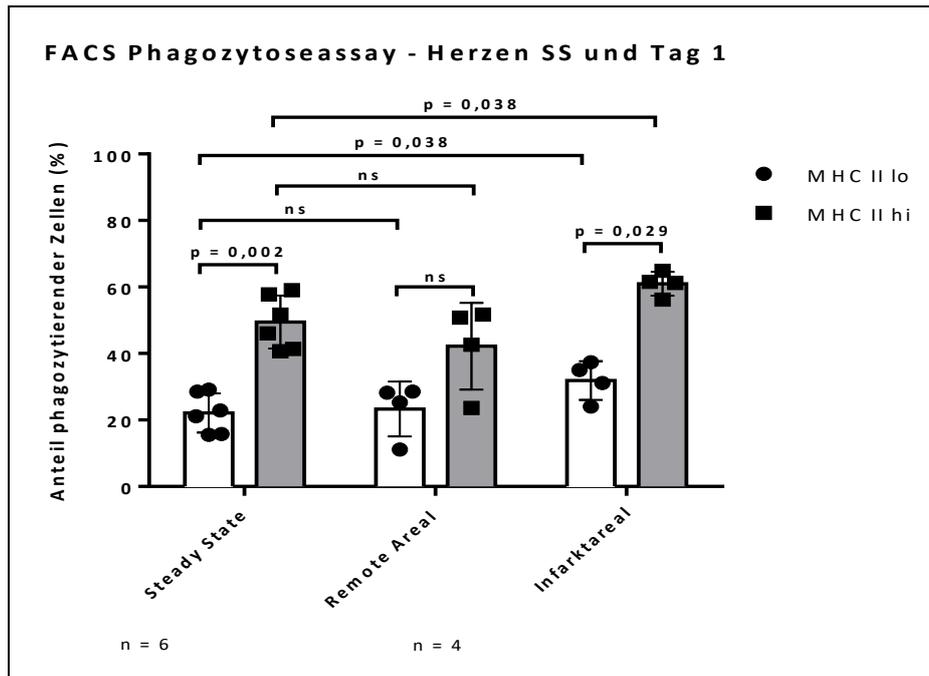


Abbildung 39 - Charakterisierung der phagozytischen Aktivität von kardialen MHCII^{hi} und MHCII^{lo} Makrophagen im SS und im Rahmen des akuten Myokardinfarktes an Tag 1 nach I/R-Verletzung im Infarktgebiet und Remote-Areal

9.2. Auswirkungen einer Reduktion der Expression des RXR α auf die Zusammensetzung der Monozyten- und Makrophagenpopulationen

Der Einfluss des RXR α auf die Zusammensetzung der Monozyten- und Makrophagenpopulationen wurden anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen und Genexpressionsanalysen der Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR $\alpha^{\text{fllox/fllox}}$ Tiere untersucht. Dabei wurden die Expression der Oberflächenmoleküle Ly6C, MHCII und CCR2 betrachtet.

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Ly6C- und der MHCII-Expression von Blutmonozyten und kardialen Makrophagen wurden die Proben, wie in Abschnitt III.4.2. und III.4.5. beschrieben, vorbereitet. Folgende Gating-Strategien kamen dabei zur Anwendung (siehe Abbildungen 40 und 41).

Ergebnisse

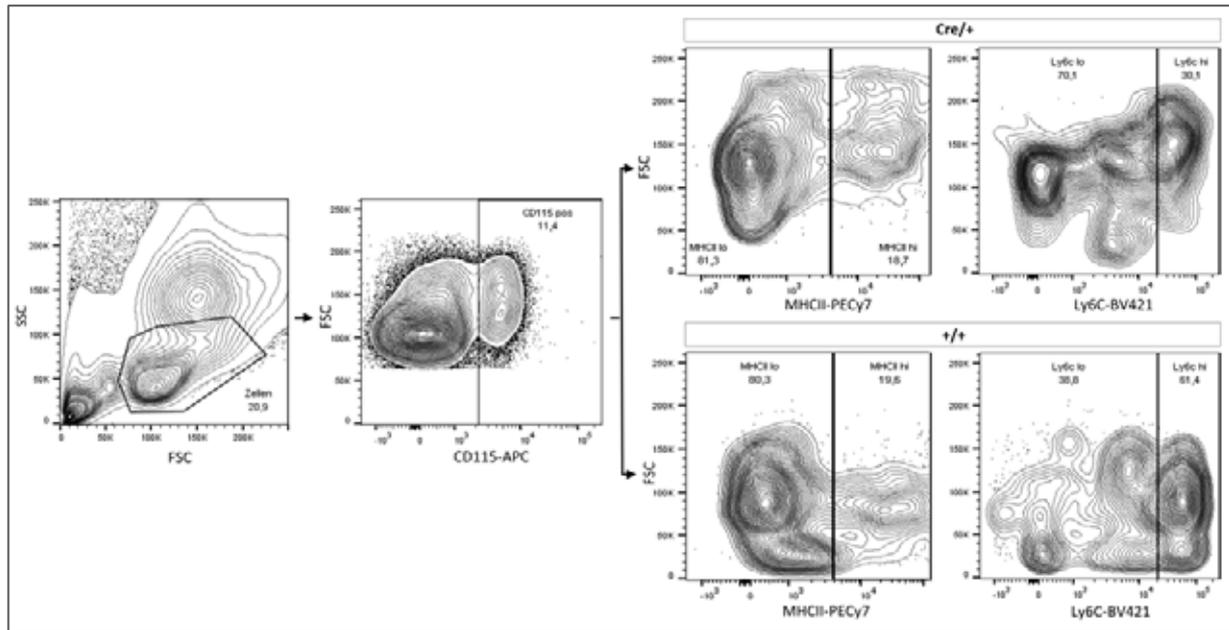


Abbildung 40 - Gating zum Vergleich der Monozytenpopulationen im Blut von *Cre/+* und *+/+* Tieren der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox}* Mauslinie

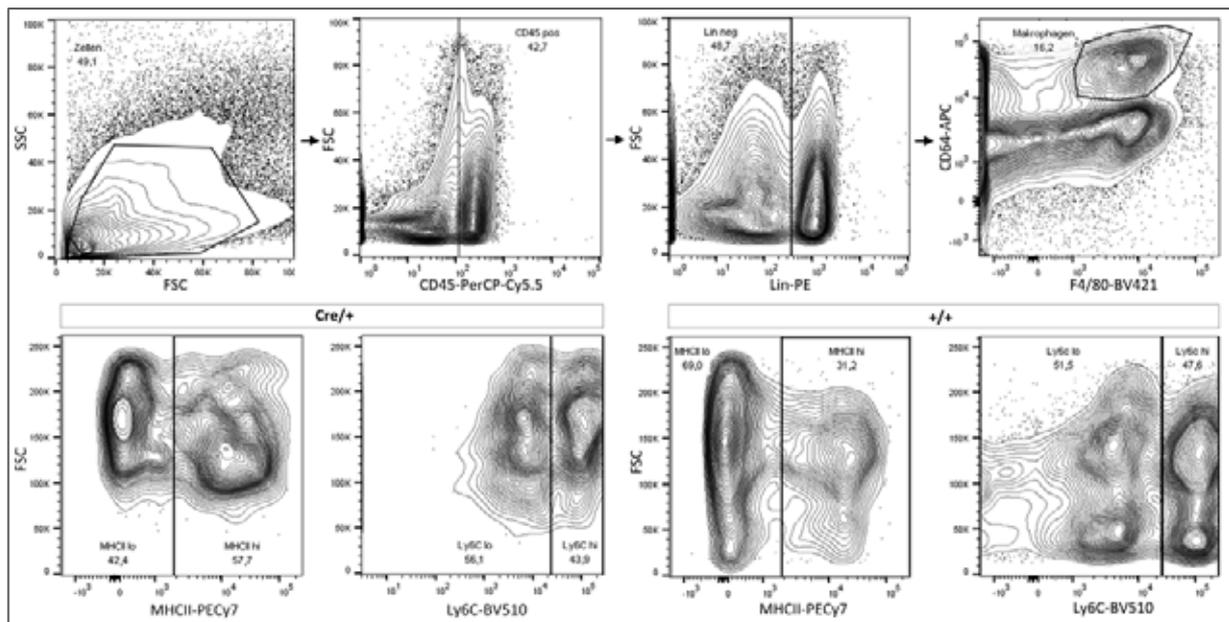


Abbildung 41 – Gating zum Vergleich der Makrophagenpopulationen in den Herzen von *Cre/+* und *+/+* Tieren der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{flox/flox}* Mauslinie

Die Expression von MHCII der Blutmonozyten wurde an Tag 1 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung quantifiziert. Hierbei konnte kein bedeutsamer Unterschied zwischen den Kontroll- (*+/+*) und den $RXR\alpha$ -deletierten Tieren (*Cre/+*) festgestellt werden (MHCII^{hi} Mo an Tag 1: *+/+* $17,74 \pm 4,83$ % vs. *Cre/+* $15,28 \pm 8,48$ %; MHCII^{hi} Mo an Tag 30: *+/+* $17,13 \pm 6,90$ % vs. *Cre/+* $14,26 \pm 6,74$ %) (siehe Abbildung 42 A, B). Im Herzen wurde die MHCII-Expression der Makrophagen an Tag 1 nach I/R-Verletzung analysiert. Der Anteil der MHCII^{hi} Makrophagen in den *Cre/+* Tieren lag dabei mit $54,96 \pm 11,48$ % signifikant höher als der Anteil der MHCII^{hi} Makrophagen in den *+/+* Tieren mit $36,70 \pm 11,16$ % (siehe Abbildung 42 C).

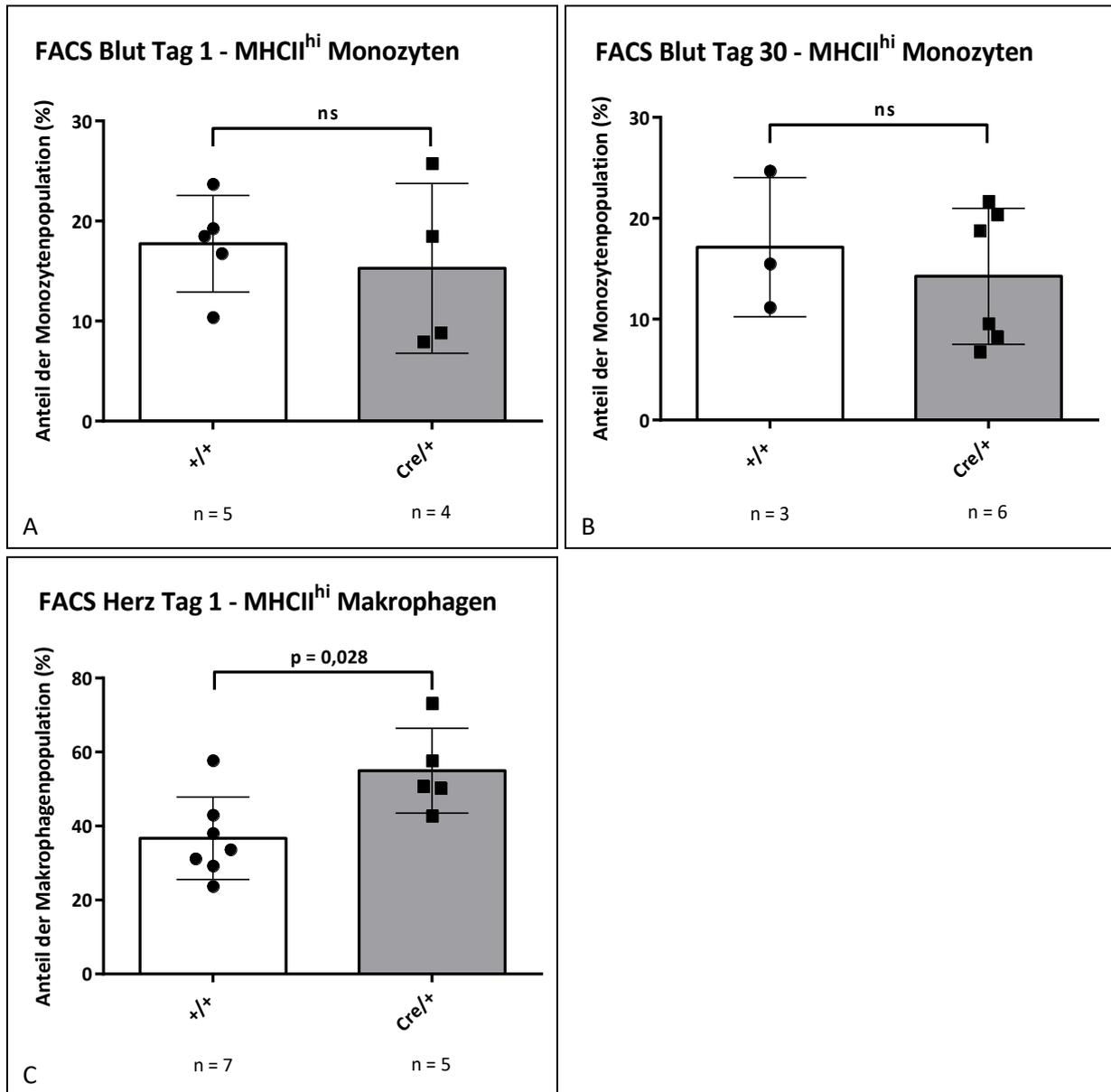


Abbildung 42 - Vergleich des Anteils der MHCII^{hi} Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation im Blut der +/+ und Cre/+ Tiere an Tag 1 (A) und an Tag 30 (B) nach I/R-Verletzung sowie der MHCII^{hi} Makrophagen an der gesamten Makrophagenpopulation in den Herzen an Tag 1 nach I/R-Verletzung (C)

Die Bedeutung des RXR α in Monozyten und Makrophagen für die Zusammensetzung der Ly6C^{hi} und Ly6C^{lo} Monozyten- und Makrophagenpopulationen wurde im Rahmen des akuten Entzündungsprozesses an Tag 1 nach I/R-Verletzung im Blut und im Herzen sowie in der Spätphase an Tag 30 nach I/R-Verletzung im Blut untersucht.

An Tag 1 wiesen die Kontroll-Tiere mit $75,08 \pm 13,43$ % einen signifikant höheren Anteil der Ly6C^{hi} Monozyten an der gesamten Blutmonozytenpopulation im Vergleich zu den Cre/+ Tieren ($40,6 \pm 10,36$ %) auf. Bei den kardialen Makrophagen waren wiederum keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Ly6C-Expression in den Cre/+ gegenüber den +/+ Tieren zu verzeichnen (Anteil der Ly6C^{hi} Makrophagen in den Herzen der Cre/+ Tiere: $31,40 \pm 22,11$ % vs. +/+ Tiere: $54,16 \pm$

Ergebnisse

13,50 %) (siehe Abbildung 43 A, C).

In der Spätphase nach Myokardinfarkt konnte keine nennenswerte Diskrepanz hinsichtlich des Verhältnisses von Ly6C^{hi} zu Ly6C^{lo} Monozyten im Blut zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Anteil der Ly6C^{hi} Blutmonozyten in den +/+ Tieren: 34,08 ± 9,57 % vs. Cre/+ Tieren: 41,03 ± 10,31 %) (siehe Abbildung 43 B).

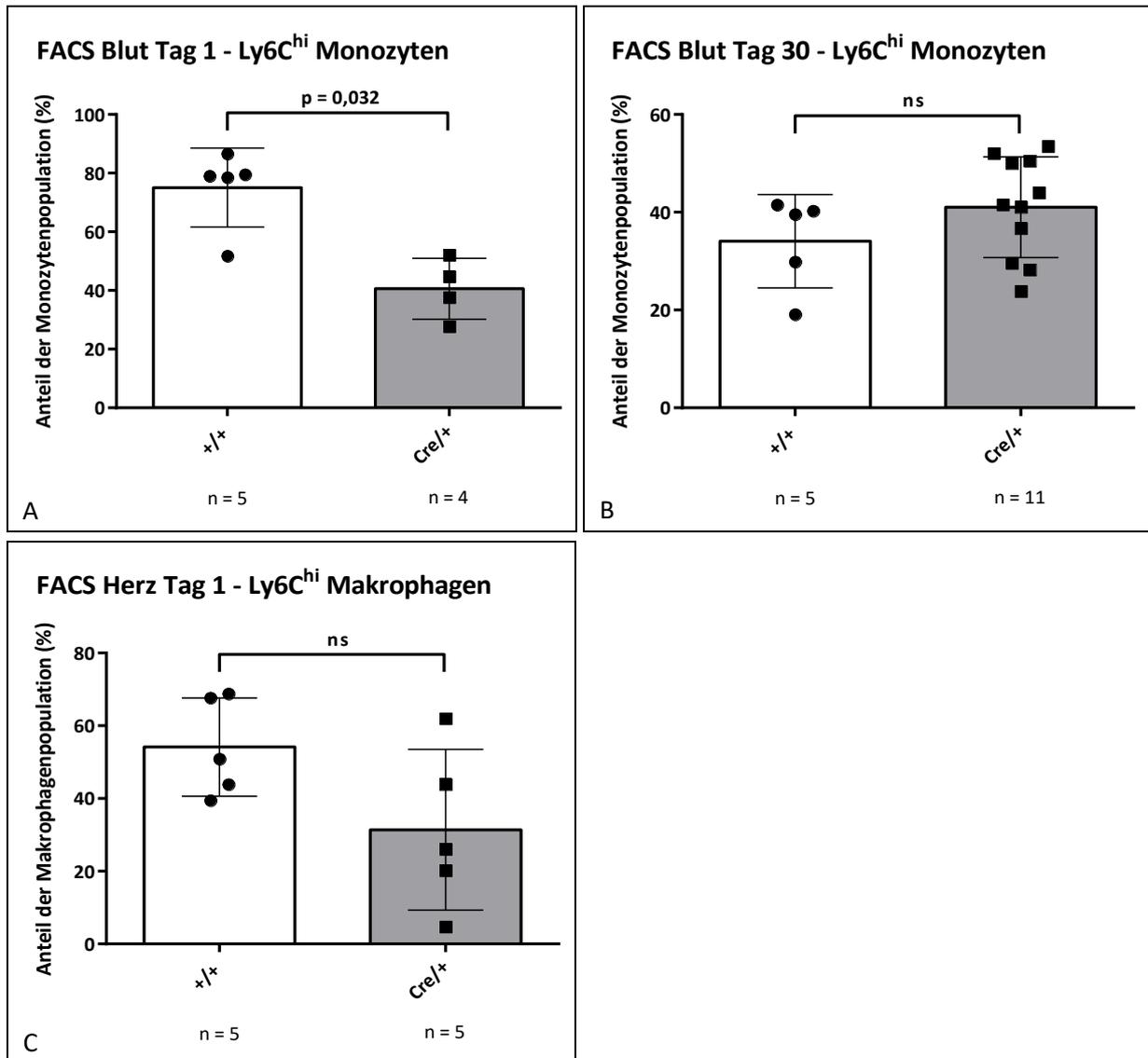


Abbildung 43 - Gegenüberstellung des prozentualen Anteils der Ly6C^{hi} Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation im Blut der Kontroll- und Cre/+ Tiere an Tag 1 (A) und an Tag 30 (B) nach I/R-Verletzung sowie des Anteils der Ly6C^{hi} Makrophagen an der gesamten Makrophagenpopulation in den Herzen der Kontroll- und Cre/+ Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung (C)

Die Auswirkung einer Deletion des RXR α auf die CCR2^{hi}- und CCR2^{lo}-Monozyten- und Makrophagenpopulationen im Blut und im Herzen wurde an Tag 1 nach I/R-Verletzung untersucht. Die Vorbereitung der Proben der Cx3cr1-Cre RXR α ^{fl^{ox}/fl^{ox}} Tiere erfolgte wie in den Abschnitten III.4.2 und III.4.5. dargestellt. Anschließend wurde eine Zellsortierung mittels eines Beckman

Ergebnisse

Coulter Astrios zur Gewinnung der Monozytenpopulationen aus dem Blut beziehungsweise der Makrophagenpopulationen aus den Herzen durchgeführt. Für die Analyse der CCR2-Expression der Zellen kam eine RT-qPCR (siehe Abschnitt III.5.) zur Anwendung. Die Blutmonozyten wiesen keinen relevanten Unterschied in der CCR2-Expression zwischen den Cre/+ und Kontroll-Tieren auf ($+/+$ $8,904 \pm 3,398$ vs. Cre/+ $9,405 \pm 2,652$) (siehe Abbildung 44 A). Auch die Makrophagenpopulationen im Herzen zeigten hinsichtlich der CCR2-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($+/+$ $11,32 \pm 7,025$ vs. Cre/+ $9,378 \pm 7,208$) (siehe Abbildung 44 B).

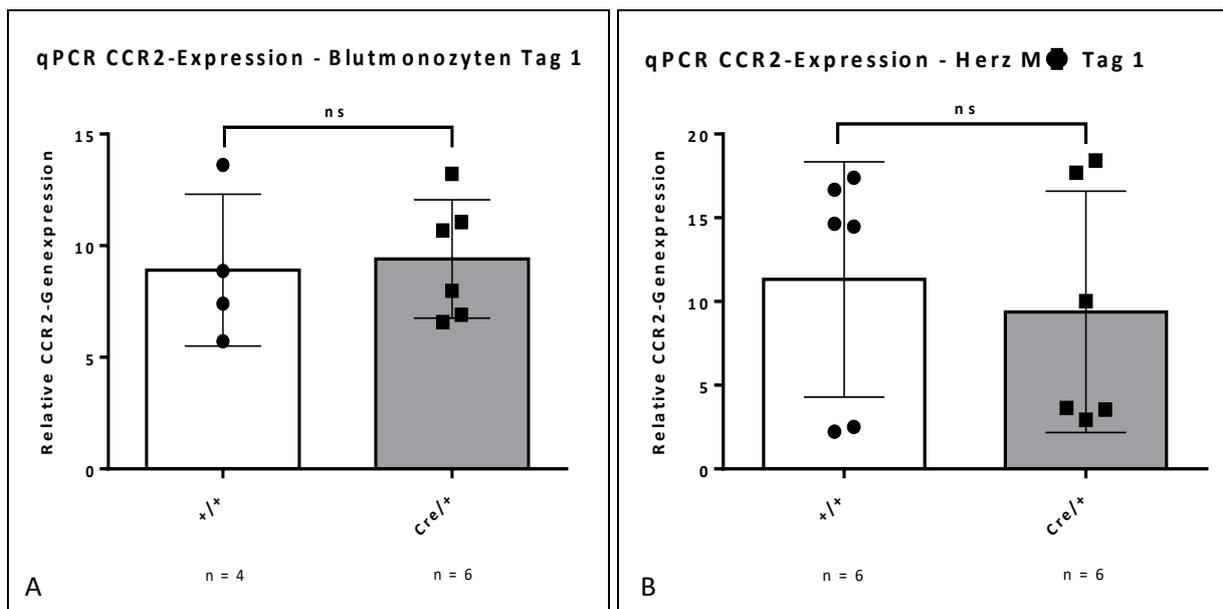


Abbildung 44 - Vergleich der CCR2-Expression in Blutmonozyten (A) und kardialen Makrophagen (B) zwischen Kontroll- und Cre/+ Tieren der *Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fllox/fllox}* Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung

V. Diskussion

Fortschritte in der Therapie der ischämischen Herzerkrankungen haben in den letzten Jahren zu einem Rückgang der Mortalität sowie der Morbidität geführt. Dennoch entwickelt ein nicht zu vernachlässigender Teil der Patienten im weiteren Verlauf eine Herzinsuffizienz und weltweit gesehen stellen die ischämischen Herzerkrankungen noch immer die häufigste Todesursache dar [1, 2, 78].

Bei den Umbau- und Heilungsprozessen nach einem akuten Myokardinfarkt konnte das Immunsystem als zentraler Bestandteil identifiziert werden [96]. Sowohl eine überschießende als auch eine unzureichende Entzündungsreaktion nach einem Herzinfarkt wurde mit einem negativen Outcome in Verbindung gebracht [85, 95]. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die immunologischen Vorgänge einer strikten Regulation unterliegen müssen. Pro- und antiinflammatorische Monozyten und Makrophagen sind daran beteiligt, die Prozesse in Balance zu halten und stellen folglich bedeutende Modulatoren der Entzündungsreaktion dar [95].

Einige immunmodulatorische Substanzen konnten bereits positive Effekte auf das Outcome nach Myokardinfarkt in präklinischen Studien aufzeigen. Bisher hat allerdings noch keine Substanz überzeugende Ergebnisse im klinischen Setting gezeigt und somit Einzug in das Therapieregime der akuten ischämischen Herzerkrankungen gefunden [202]. Dementsprechend sind weitere Untersuchungen für ein genaueres Verständnis zugrundeliegender immunologischer Prozesse und zur Identifizierung neuer Ansätze für potenzielle Therapien von entscheidender Bedeutung.

Retinoid-X-Rezeptoren werden in zahlreichen Geweben exprimiert und stellen somit einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Modulation unterschiedlicher Krankheitsprozesse dar [109]. Bislang wurden viele Studien zur Funktion von Retinoid-X-Rezeptoren bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen im Organismus durchgeführt. Die Auswirkung einer spezifischen Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen wurde dabei allerdings nur von wenigen Arbeitsgruppen betrachtet. Bei akuten ischämischen Herzerkrankungen sind die Folgen dieser spezifischen Deletion bisher noch nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der RXR α durch die Verwendung eines Tamoxifen-abhängigen Cre-lox-Systems gezielt in Monozyten und Makrophagen deletiert. Mithilfe des Ischämie-Reperfusion-Modells konnte somit die Auswirkung einer Deletion auf das Outcome nach einem akuten Myokardinfarkt untersucht werden. Das Modell ist bereits vorbeschrieben und liefert den entscheidenden Vorteil, durch den transienten Verschluss des RIVA den klinischen Alltagsbedingungen sehr nahe zu kommen [172].

1. Eine verminderte Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen besitzt negative Effekte auf die Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt

Makrophagen stellen eine wichtige Komponente bei der Regulation der Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt dar. Sie sorgen durch die Aufnahme abgestorbener Zellen für die Beseitigung von nekrotischem Gewebe, für den adäquaten Ersatz durch Granulationsgewebe und schlussendlich für die Bildung einer kollagenreichen Infarkt Narbe. Zudem fördern sie über die Freisetzung von angiogenetisch wirksamen Mediatoren, hierunter TGF- β 1 und VEGF-A die Gefäßneubildung. Das Fehlen von Makrophagen im Herzen nach einer akuten Myokardläsion führt zu einer veränderten Zusammensetzung der Infarkt Narbe, erhöht somit die Rate an Komplikationen und geht insgesamt mit einem schlechteren Outcome einher [94].

Bereits in Vorarbeiten wurde ein Effekt der Modulation von RXR auf die Infarktgröße im Rahmen von ischämischen Erkrankungen beschrieben.

Certo et al. zeigten, dass die Gabe des RXR-Agonisten Bexaroten bis zu 4,5 h nach einem ischämischen Schlaganfall zu einer Reduktion des Infarkt volumens führt und folglich neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Hierbei wurde die Beeinflussung der peripheren Immunantwort als bedeutender Faktor identifiziert [126].

Die Verwendung der Positronen-Emissions-Tomographie ermöglichte uns, den Einfluss einer RXR α -Deletion in Makrophagen und Monozyten auf den Heilungsverlauf nach einem akuten Myokardinfarkt zu untersuchen. Hierbei konnten wir sowohl den Einfluss auf die akute Infarkttheilung (totales Perfusionsdefizit) sowie auf das Remodeling (z. B. Ejektionsfraktion und enddiastolisches Volumen) beurteilen. Der transiente Verschluss des RIVA im Ischämie-Reperfusion-Modell führte zu einem deutlichen Myokardschaden, welcher sich im Verlauf sowohl in den Kontroll- als auch in den RXR α -deletierten Tieren besserte (siehe Abbildung 17). Beim Vergleich des TPDs der RXR α -deletierten Tiere mit dem TPD der Kontroll-Gruppe fiel auf, dass eine Reduktion der RXR α -Expression mit einer signifikanten Vergrößerung des Infarktgebiets an Tag 30 nach I/R-Verletzung im Mausmodell einhergeht (siehe Abbildung 18). An Tag 6 nach I/R-Verletzung konnte lediglich ein Trend hin zu einem Anstieg der Infarktgröße in den Herzen der Cre/+ Tiere beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz. Beim Vergleich der Auswurfleistung der Herzen von Kontroll- und RXR α -deletierten Tieren wurde kein maßgeblicher Unterschied vermerkt (siehe Abbildung 19). Ebenso ergab die Bestimmung des enddiastolischen Volumens als Maß für die ventrikuläre Dilatation im Rahmen des kardialen Remodelings keine relevanten Änderungen bei den RXR α -deletierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 20).

Zusammenfassend liefern diese Erkenntnisse Hinweise darauf, dass eine Deletion des RXR α in Makrophagen und Monozyten die Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt negativ beeinflusst. Folglich könnte die Modulation des RXR α einen potenziellen Therapieansatz zur Behandlung des Myokardinfarktes darstellen. Inwieweit RXR-Agonisten einen Benefit in der Therapie ischämischer kardialer Erkrankungen besitzen, bleibt weiterhin unzureichend geklärt. Weitere Studien werden notwendig sein, um den Nutzen und die Risiken einer Behandlung mit RXR-Agonisten bei ischämischen kardialen Erkrankungen zu evaluieren.

2. Der RXR α in myeloiden Zellen spielt keine maßgebliche Rolle bei der Hämatopoese

Der Stellenwert des RXR α bei der Regulation der Hämatopoese wurde bisher kontrovers diskutiert. Einerseits wiesen Ricote et al. nach, dass ein Verlust des RXR α in murinen hämatopoetischen Stammzellen keinen Effekt auf die Hämatopoese besitzt. Dies wurde auf den kompensatorischen Effekt des RXR β bei der Hämatopoese zurückgeführt [118]. Der RXR β konnte, verglichen mit dem RXR α , in höheren Konzentrationen in hämatopoetischen Progenitorzellen detektiert werden [203]. Auf der anderen Seite wurde wiederum eine Beteiligung des RXR α bei der Hämatopoese gezeigt. So scheint der RXR α eine Bedeutung bei den Differenzierungsprozessen von Monozyten zu Makrophagen und der Differenzierung von neutrophilen Granulozyten zu besitzen [119, 122, 123]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass ein Funktionsverlust des RXR α die Entstehung von Leukämien verhindert [120, 121].

Unsere Analyse der Blutparameter von Kontroll- und RXR α -deletierten Tieren ergab keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 15). Wir konnten folglich schließen, dass eine spezifische Reduktion der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen keine maßgebliche Auswirkung auf das Blutbild bei Mäusen besitzt.

3. Eine Reduktion der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen besitzt keinen Einfluss auf deren phagozytotische Aktivität

In Studien, welche die Auswirkung einer Deletion des RXR α in mononukleären Zellen auf die Entwicklung von Nierenerkrankungen untersucht haben, wurde ein gestörter Ablauf der Phagozytose als Ursache für eine fehlgeleitete Immunantwort mit Verlust der Selbsttoleranz identifiziert [129].

Der Prozess der Phagozytose ist maßgeblich an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Die Aufnahme von Partikeln durch Makrophagen fördert deren Polarisation zu einem antiinflammatorischen Phänotyp und trägt zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei. Dieser

Diskussion

Phänotyp zeichnet sich durch eine gesteigerte Genexpression anti-entzündlicher Botenstoffe - hierunter Il-10 und TGF- β - bei einer Reduktion proinflammatorischer Moleküle aus [129, 138, 139]. Roszer et al. konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass eine Deletion des RXR α den Ablauf der Phagozytose beeinträchtigt. Hierfür wurde eine verminderte Expression von Rezeptoren und Opsoninen, welche für die Phagozytose notwendig sind, verantwortlich gemacht [129]. Auch Cramer et al. konnten die Bedeutung der RXR bei der Modulation der phagozytotischen Aktivität bestätigen. So führte eine Behandlung von Mäusen mit dem RXR-Agonisten Bexaroten zu einer gesteigerten Aufnahme von β -Amyloid durch Mikroglia und ging folglich mit einer Eindämmung der akuten Entzündungsreaktion einher [140].

In unseren Arbeiten haben wir untersucht, ob eine Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen die phagozytotische Aktivität dieser Zellen beeinflusst und somit durch eine gestörte Regulation der Entzündungsreaktion zur Steigerung der Infarktgröße nach I/R-Verletzung beiträgt. Hierfür wurde eine Assay mit Blutmonozyten und pHrodo™ Red BioParticles® etabliert. Durch die Verwendung von Cytochalasin D, einem Hemmstoff der Polymerisation von Aktinfilamenten, als Negativkontrolle wurde eine valide Abgrenzung der phagozytotisch aktiven Zellen gewährleistet. Wir konnten dabei keinen signifikanten Unterschied in der phagozytotischen Aktivität zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren nachweisen (siehe Abbildung 22).

Im Unterschied zu Roszer et al. kamen bei der Untersuchung der Phagozytoseaktivität keine fluoreszenz-markierten apoptotischen Thymozyten sondern „pHrodo™ Red E. coli BioParticles®“ zum Einsatz. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte die Tatsache sein, dass der Phagozytose von Pathogenen (wie z. B. Bakterien) andere Mechanismen als der Efferozytose von apoptotischen Zellen zugrunde liegen. Die Erkennung und Internalisation von Bakterien erfolgt u. a. durch Pathogen-Erkennungsrezeptoren (engl. „Pattern Recognition Receptors“) - hierunter z. B. Scavenger-Rezeptoren. Diese binden an die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. „Pathogen-associated Molecular Patterns“) auf der Bakterienoberfläche. Bei der Efferozytose von apoptotischen Zellen kommt der Erkennung von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche durch phagozytierende Zellen eine wichtige Bedeutung zu. In vitalen Zellen befindet sich Phosphatidylserin vorwiegend auf der Innenseite der Zellmembran. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu einer Umstrukturierung mit einer gesteigerten Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran, welches durch phagozytierende Zellen erkannt wird [204, 205].

Auch Roszer et al. verwendeten in einem weiteren Versuchsansatz Fluoreszenz-markierte Beads, womit kein relevanter Einfluss einer Deletion des RXR α auf die Phagozytoseaktivität detektiert werden konnte.

Die Verwendung des Cre/lox-Systems erreichte lediglich eine Reduktion der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen um circa 50% (siehe Abbildung 14). Diese könnte möglicherweise nicht ausreichend sein, um einen relevanten Einfluss auf die Abläufe der Phagozytose zu bewirken.

4. Die Angiogenese nach einem akuten Myokardinfarkt wird durch eine verminderte Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen negativ beeinflusst

Die Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil im Rahmen des Heilungsprozesses nach einem akuten Myokardinfarkt [206]. Gerade die Gefäßneubildung im Bereich der Infarkt-Grenzzone ist elementar, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des noch vitalen Herzmuskelgewebes zu gewährleisten und folglich die Ausdehnung des Infarktkerns einzudämmen [207]. Makrophagen sind maßgeblich an der Ausbildung neuer Gefäße nach ischämischen Ereignissen im Herzen beteiligt. Durch die Sekretion von Mediatoren wie VEGF-A fördern sie die Gefäßneubildung und verbessern somit die Sauerstoffversorgung des Herzmuskelgewebes. Eine Depletion von kardialen Makrophagen beeinflusst die Angiogenese nach einer akuten Myokardläsion negativ und geht mit einem schlechteren Outcome einher [94].

In Vorarbeiten wurde bereits die Funktion der RXR bei der Gefäßneubildung betrachtet. Durch die Applikation von RXR-Agonisten konnte eine erhöhte Expression angiogenetisch wirkender Substanzen - unter anderem VEGF-A - beobachtet werden. Ebenfalls zeigten in vivo Versuche eine Steigerung der Ausbildung neuer Gefäße durch die Behandlung von Makrophagen mit RXR-Agonisten [131].

Die Ergebnisse unserer Studien konnten diese Erkenntnisse belegen. Wir waren in der Lage, mithilfe histologischer Untersuchungen an Tag 30 nach Myokardinfarkt, eine geringere Gefäßdichte in der Infarkt-Grenzzone der RXR α -deletierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen nachzuweisen (siehe Abbildung 25). Diese Beobachtungen stehen ebenfalls im Einklang mit vorherigen Studien. Diese konnten zeigen, dass eine Erhöhung angiogenetisch wirkender Substanzen in der Infarkt-Grenzzone mit einer gesteigerten Gefäßneubildung einhergeht, wohingegen keine Veränderungen im nicht-infarzierten Areal zu verzeichnen waren [208]. Die verringerte Gefäßdichte in den RXR α -deletierten-Tieren (im Vergleich zu den Kontrollen) liefert einen Erklärungsansatz für das höhere totale Perfusionsdefizit, welches mittels PET/CT-Untersuchung nachgewiesen werden konnte. Die verminderte Ausbildung von Gefäßen in der Infarkt-Grenzzone besitzt einen negativen Einfluss auf die Versorgung des vitalen Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff. Insbesondere ist noch vitales Gewebe, welches aufgrund des Gefäßverschlusses eine geringere Sauerstoffversorgung erhält, nach einem akuten Myokardinfarkt gefährdet.

Die verminderte Angiogenese in den Herzen der RXR α -deletierten Tiere verhindert somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung des gefährdeten vitalen Gewebes. Die Folge ist ein Verlust weiterer Herzmuskelzellen und eine hierdurch bedingte Vergrößerung des Infarktareals.

Im Gegensatz zu Daniel et al. [131] konnten wir jedoch keine signifikanten Unterschiede der VEGF-A-Konzentration in den Infarktgebieten der RXR α -deletierten Tiere und der Kontrollen an Tag 1 nach I/R-Verletzung als Ursache für die verminderte Angiogenese finden (siehe Abbildung 33). Es bleibt allerdings offen, ob eine Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen Einfluss auf die VEGF-A-Expression im Herzen zu einem späteren Zeitpunkt besitzt und somit für die Unterschiede in der Gefäßdichte an Tag 30 verantwortlich sein könnte. Des Weiteren ist eine Beteiligung anderer Signalmoleküle an der Regulation der Angiogenese durch den RXR α denkbar. Es sind folglich weitergehende Untersuchungen notwendig, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren.

5. RXR α als Regulator der Proliferation von Makrophagen

Retinoide wie All-trans-Retinsäure werden in der Therapie von hämatoonkologischen Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt [209]. Hierbei weisen sie inhibitorische Effekte auf die Proliferation von Zellen auf [210].

Ein Einfluss der Modulation der RXR auf das Überleben von Makrophagen konnte bereits gezeigt werden. Die Behandlung von Makrophagen mit 9-cis-Retinsäure führte zu einer Hochregulation anti-apoptotischer Gene bei gleichzeitig verminderter Expression pro-apoptotischer Gene [116].

In dieser Arbeit wurde die Funktion des RXR α bei der Proliferation von Makrophagen mithilfe histologischer Methoden untersucht. Dabei konnte in den Herzen der RXR α -deletierten Tiere an Tag 2 nach I/R-Verletzung eine niedrigere Proliferationsrate im Infarktareal/der Infarkt-Grenzzone gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden. Im Remote-Areal zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 27). Die Analyse der Gesamtzahl an Makrophagen im Herzen mittels Durchflusszytometrie an Tag 1 nach I/R-Verletzung erbrachte keinen maßgeblichen Unterschied zwischen den Zellzahlen in den RXR α -deletierten Tieren gegenüber den Kontrollen.

Makrophagen kommt bei akuten Entzündungsreaktionen im Herzen eine bedeutende Rolle zu. Das Fehlen von Makrophagen im Herzen nach einer kardialen Läsion führt zu einer gestörten Modulation der akuten Entzündungsreaktion und geht mit einem schlechteren Outcome einher [94]. Wir konnten in unseren Analysen nachweisen, dass die Proliferationsrate der Makrophagen im Infarktgebiet/der Infarkt-Grenzzone der RXR α -deletierten Tiere vermindert ist. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung des RXR α bei der Regulation der Makrophagenproliferation

im Herzen hin. Die zugrundeliegenden Signalwege, über welche RXR α eine Veränderung der Zellteilungsrate bewirkt, bleiben allerdings noch ungeklärt. Die Gesamtzahl an Makrophagen im Herzen an Tag 1 nach einem akuten Myokardinfarkt zeigte sich in unseren Analysen unverändert. Eine genauere Untersuchung der Zahl residenter kardialer Makrophagen sowie aus der Blutbahn einwandernder Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Es ist bekannt, dass residente kardiale Makrophagen grundsätzlich zur Selbsterneuerung durch Proliferation fähig sind. Residente Makrophagen weisen antiinflammatorische Eigenschaften auf und besitzen potenziell protektive Effekte nach einem akuten Myokardinfarkt [103, 105]. Ob eine Deletion von RXR α Einfluss auf die Proliferation und auf die Zellzahl residenter kardialer Makrophagen nach einem Herzinfarkt besitzt, bleibt weiterhin unklar. Es wäre denkbar, dass eine verminderte Proliferationsrate potenziell antiinflammatorischer Makrophagen und eine gesteigerte Einwanderung entzündungsfördernder Zellen ein proinflammatorisches Milieu begünstigt und somit mitverantwortlich für eine Vergrößerung des Infarktareals ist. Weitere Studien auf diesem Gebiet werden notwendig sein, um den Einfluss des RXR α auf einzelne Makrophagenpopulationen zu untersuchen. Ob eine gezielte Modulation residenter Makrophagen durch RXR α -Agonisten möglich ist und in der Therapie des akuten Myokardinfarktes erfolgreich eingesetzt werden kann, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6. Eine verminderte Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen erhöht die Zahl der apoptotischen Zellen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt

Mehrere Studien haben bereits die Beteiligung des RXR α bei der Regulation der Apoptose von Zellen identifiziert. Allerdings wurden auch hierbei zum Teil kontroverse Beobachtungen gemacht. Einige Arbeitsgruppen konnten einen pro-apoptotischen Effekt von RXR-Agonisten sowohl in Kombination mit Arsentrioxid als auch isoliert zeigen [124, 125].

Demgegenüber wurde aber auch beschrieben, dass RXR-Agonisten die Apoptose von Makrophagen verringern. Die Behandlung von Makrophagen mit 9-cis-Retinsäure führte zu einer Hochregulation unterschiedlicher anti-apoptotischer Gene [116]. Des Weiteren konnten Roszer et al. eine RXR α -Deletion mit einer gesteigerten Anzahl apoptotischer Zellen in der Niere in Verbindung bringen. Eine gestörte Phagozytoseaktivität der Makrophagen wurde als elementarer Parameter im Rahmen dieses Prozesses identifiziert [129].

Wir haben die Bedeutung des RXR α bei der Apoptose während der akuten Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt untersucht. Dabei war von zentralem Interesse, ob der RXR α in Monozyten und Makrophagen einen Einfluss auf die Apoptose von Zellen besitzt und eine Veränderung apoptotischer Prozesse in RXR α -deletierten Tieren somit einen Beitrag zur beobachteten

Vergrößerung des Infarktgebiets leistet.

Unsere histologischen Untersuchungen an Tag 1 nach I/R-Verletzung haben ergeben, dass eine Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen mit einer Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen nach akutem Myokardinfarkt einhergeht (siehe Abbildung 30). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Roszer et al. beschriebenen gesteigerten Zahl apoptotischer Zellen in der Niere von RXR α -KO Tieren. Hierbei wurde eine Beeinträchtigung der Phagozytose von Makrophagen mit konsekutiv gestörtem Ablauf der akuten Entzündungsreaktion als ursächlicher Faktor identifiziert [129]. Unsere Untersuchungen der Phagozytoseaktivität von Blutmonozyten erbrachten zwar einen Trend zur verminderten phagozytotischen Aktivität der Monozyten aus RXR α -deletierten Tieren gegenüber der Monozyten aus Kontroll-Tieren, jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Abbildung 22). Somit könnte eine verminderte Aufnahme apoptotischer Zellen durch RXR α -deletierte Makrophagen im Herzen zu oben beschriebener Zellzahlerhöhung beitragen. Ob dies tatsächlich der Fall ist oder ob andere Mechanismen der höheren Zahl apoptotischer Zellen zugrunde liegen, muss in weiteren Studien evaluiert werden. Es lässt sich dennoch festhalten, dass die erhöhte Zahl apoptotischer Zellen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt einerseits hinweisend auf eine Störung des reibungsfreien Ablaufs der akuten Entzündungsreaktion scheint und andererseits wiederum selbst negative Effekte auf die Eindämmung der Entzündungsreaktion besitzt.

7. Eine Reduktion der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen besitzt keinen maßgeblichen Einfluss auf die Zyto- und Chemokinexpressionen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt

In einigen Vorarbeiten wurde die Beteiligung des RXR α bei der Regulation der Genexpression von Zyto- und Chemokinen während der akuten Entzündungsreaktion hervorgehoben.

Es wurde verdeutlicht, dass der RXR α durch eine Regulation der Chemokine CCL2, CCL6 und CCL9 auf transkriptioneller Ebene an der Rekrutierung von Leukozyten in das Entzündungsareal beteiligt zu sein scheint. Weitere Studien konnten die allgemeine Bedeutung von Retinoid-X-Rezeptoren bei der Leukozyteninvasion in das Gebiet der akuten Entzündungsreaktion durch eine Modulation der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und MCP-1 aufzeigen. Auch bezüglich der Modulation von Zyto- und Chemokinen durch RXR wurden teilweise gegensätzliche Beobachtungen gemacht [130, 132].

Des Weiteren wurde in Vorarbeiten eine Aktivierung von Retinoid-X-Rezeptoren mit einer Verschiebung der Zytokinexpression hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp in Verbindung gebracht. Dabei konnte unter anderem eine gesteigerte Expression von Il-10 bei gleichzeitiger

Diskussion

Reduktion der inflammatorischen Botenstoffe Il-1 β , Il-6 und TNF- α sowie von Stickstoffmonoxid (NO) und Matrix-Metalloproteinasen beobachtet werden [128, 133, 134].

Unsere Studien ergaben keinen maßgeblichen Einfluss einer Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen auf die Zyto- und Chemokinexpressionen im Herzen im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion an Tag 1 nach Myokardinfarkt (siehe Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33). Die Rolle des RXR α bei der Regulation von Zyto- und Chemokinen in späteren Phasen nach Myokardinfarkt wurde hierbei allerdings nicht untersucht. Somit ist es nicht ausgeschlossen, dass eine Deletion des RXR α zu Veränderungen der Zyto- und Chemokinexpressionen im Herzen zu einem späteren Zeitpunkt nach einem akuten Myokardinfarkt führt.

Des Weiteren haben viele Arbeiten Effekte der Applikation von allgemeinen Retinoidrezeptoragonisten auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen beschrieben. Folglich ist es möglich, dass eine alleinige Deletion des RXR α nicht ausreichend für einen sichtbaren Effekt im Herzen ist. Auch die nur ca. 50%ige Reduktion der RXR α -Expression mittels Cre/lox System könnte die negativen Ergebnisse mitverantworten.

Weitere Untersuchungen mit Deletionsmodellen höherer Effizienz und Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einem akuten Myokardinfarkt erscheinen sinnvoll zur Klärung der Funktion des RXR α in Monozyten und Makrophagen bei der Regulation von Zytokinen und Chemokinen im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen.

8. Weitergehende Charakterisierung der Subpopulationen von Makrophagen im Herzen nach einem akuten Myokardinfarkt und Funktion des RXR α bei der Zusammensetzung der Subpopulationen

8.1. Dynamische Veränderungen der Monozyten- und Makrophagenpopulationen im Herzen als Reaktion auf ein ischämisches Ereignis

Die Monozyten- und Makrophagenpopulationen weisen dynamische Veränderungen als Reaktion auf kardiale Läsionen auf. Die Einteilung der Makrophagen und Monozyten erfolgt dabei unter anderem anhand von Oberflächenmarkern wie CCR2, Ly6C und MHCII. Diese Subpopulationen unterscheiden sich im Hinblick auf das Genexpressionsmuster sowie auf ihre funktionellen Eigenschaften [95, 96, 105].

Wir haben uns zur weitergehenden Charakterisierung der Subpopulationen auf das Oberflächenmolekül MHCII fokussiert. Bereits Lavine et al. nahmen eine Einteilung kardialer Makrophagen anhand dieses Oberflächenmarkers vor. Als Folge einer kardialen Läsion durch eine

Diskussion

Depletion von Kardiomyozyten reagierte das adulte Herz mit einer Zunahme der MHCII^{hi} CCR2^{hi} Makrophagenpopulation [105].

Unsere Analysen ermöglichten es, die dynamischen Veränderungen der MHCII^{hi} und MHCII^{lo} Populationen nach einem akuten Myokardinfarkt sowie deren funktionellen Eigenschaften genauer zu analysieren. Im Gegensatz zum Depletionsmodell von Lavine et al. zeigte sich nach einem ischämischen Ereignis eine deutliche Zunahme der MHCII^{lo} auf Kosten der MHCII^{hi} Makrophagenpopulation im Herzen (siehe Abbildung 35 und Abbildung 37). Mithilfe der Knochenmarkchimären konnten wir nachweisen, dass es in der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt zur Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen ins Herz kommt. Die Charakterisierung dieser Zellen anhand des Oberflächenmoleküls MHCII machte deutlich, dass diese vorwiegend zu der MHCII^{lo} Makrophagenpopulation beitragen (siehe Abbildung 38).

Es ist bekannt, dass Makrophagen sowohl in der Frühphase nach einem kardialen Perfusionsdefizit an der Entstehung der akuten Entzündungsreaktion als auch in der Spätphase an den Umbau- und Heilungsprozessen beteiligt sind [95, 96, 98]. Unsere Untersuchungen ergaben, dass MHCII^{lo} Makrophagen in der frühen Phase der akuten Entzündungsreaktion den prädominanten Phänotyp darstellen, wohingegen MHCII^{hi} Zellen vor allem in der späteren Phase der Infarktheilung eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen.

Hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften dieser Zellen konnten Epelman et al. beobachten, dass MHCII^{lo} Zellen eine höhere phagozytotische Aktivität aufweisen [103]. Unsere Analysen kardialer Makrophagen verdeutlichten jedoch, dass die MHCII^{hi} Makrophagen eine stärkere phagozytotische Aktivität innehaben als MHCII^{lo} Makrophagen (siehe Abbildung 39).

Bei beiden Populationen konnte ein signifikanter Anstieg der phagozytotischen Aktivität im Infarktareal nach Myokardinfarkt detektiert werden. Die Phagozytoseaktivität der Zellen im Remote-Areal an Tag 1 nach I/R-Verletzung unterschied sich wiederum nicht maßgeblich von der phagozytotischen Aktivität der Makrophagen im Ruhezustand. Der Anstieg der Phagozytoseaktivität im Infarktareal verdeutlicht die elementare Rolle von Makrophagen bei der Phagozytose von Zell-Debris im Rahmen der Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt.

Im Vergleich der beiden Makrophagenpopulationen zeigte sich ein erhöhter Anteil phagozytotisch aktiver Zellen in der MHCII^{hi} Population sowohl unter Ruhebedingungen als auch im Infarktareal nach Myokardinfarkt (siehe Abbildung 39).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Epelman et al. kamen bei unseren Analysen „pHrodo Red E. coli BioParticles®“ und keine markierten apoptotischen Zellen zum Einsatz. Wie bereits in Abschnitt 3 diskutiert, sind bei der Phagozytose von Bakterien und der Efferozytose von

Diskussion

apoptotischen Zellen unterschiedliche Mechanismen beteiligt. Diese Tatsache könnte zur Diskrepanz der Ergebnisse beitragen.

Es ist bekannt, dass Makrophagen im Rahmen der angeborenen Immunabwehr Antigenbestandteile von Pathogenen mithilfe des Moleküls MHCII an ihrer Oberfläche präsentieren und zur Aktivierung anderer Immunzellen, unter anderem T-Zellen, beitragen. Die Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung von Antigenen führt zur Entstehung von Antigenfragmenten, welche mithilfe des MHCII-Rezeptors an der Zelloberfläche präsentiert werden können [211]. Diese Beobachtung würde im Einklang mit unseren Ergebnissen einer hohen Aktivität der MHCII^{hi} Makrophagenpopulation bei der Phagozytose von markierten E.coli-Partikeln stehen.

Ergänzende Untersuchungen mit apoptotischen kardialen Zellen sind notwendig, um die Phagozytoseaktivität der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen im Rahmen der Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt zu beurteilen.

8.2. Evaluation der Funktion des RXR α in Monozyten und Makrophagen bei der Zusammensetzung der Subpopulationen

In einem nächsten Schritt haben wir den Einfluss einer RXR α -Deletion auf die Zusammensetzung der Monozyten- und Makrophagenpopulationen untersucht. Die Bedeutung des RXR α bei der Modulation der Monozyten- und Makrophagenpopulationen nach einem ischämischen Ereignis im Herzen war bisher unverstanden. Unsere Untersuchungen konnten dazu beitragen, das Verständnis der Funktionen des RXR α bei der Regulation der Subpopulationen von Monozyten und Makrophagen im Herzen zu erweitern.

Hinsichtlich der Expression des Oberflächenmoleküls MHCII auf Blutmonozyten konnte weder in der akuten Phase (Tag 1) noch in der Spätphase (Tag 30) ein maßgeblicher Unterschied zwischen den Kontroll- und den RXR α -deletierten Tieren verzeichnet werden. Bei der Analyse der MHCII-Makrophagenpopulationen im Herzen an Tag 1 nach Myokardinfarkt fiel eine signifikant höhere Expression von MHCII der kardialen Makrophagen in den Herzen der Cre/+ Tiere, verglichen mit den Kontrollen, auf (siehe Abbildung 42).

Wie bereits oben beschrieben, konnten wir nachweisen, dass die MHCII^{hi} Makrophagen im Herzen eine höhere phagozytotische Aktivität, verglichen mit den MHCII^{lo} Zellen, aufweisen. Die Untersuchungen der Phagozytoseaktivität von Blutmonozyten der Cx3cr1-Cre RXR alpha^{fl^{ox}/fl^{ox}} Tiere erbrachte keinen Effekt einer verminderten Expression des RXR α auf deren phagozytotische Aktivität. Ob die Phagozytoseaktivität der kardialen Makrophagen durch eine Deletion des RXR α beeinträchtigt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und bleibt somit weiterhin ungeklärt.

Diskussion

Es ist vorbeschrieben, dass der MHCII-Komplex maßgeblich an der Präsentation von Antigenbestandteilen auf Immunzellen beteiligt ist. Die Erkennung dieser Antigenfragmente durch T-Zellen stellt einen wichtigen Schritt der T-Zell-Aktivierung dar und ist folglich für den Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion von zentraler Bedeutung [211]. Ob eine gesteigerte Expression des MHCII-Komplexes auf kardialen Makrophagen der RXR α -deletierten Tiere zu einer Veränderung der T-Zell-Antwort führt und hierdurch das Outcome nach Myokardinfarkt negativ beeinflusst, ist bisher unklar. Ebenfalls ungeklärt sind die molekularen Mechanismen, welche der veränderten Expression von Oberflächenmolekülen durch den RXR α zugrunde liegen. Folglich sind weitere Untersuchungen notwendig, um diesen Fragestellungen nachzugehen.

Im Hinblick auf die Expression des Oberflächenmoleküls Ly6C lassen sich Monozyten und Makrophagen in Ly6C^{hi} und Ly6C^{lo} Populationen einteilen. Dabei wurde beschrieben, dass Ly6C^{hi} Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp aufweisen, während Ly6C^{lo} Zellen eher antiinflammatorische, proangiogenetische Eigenschaften besitzen [95, 96].

Wir haben mithilfe der Cx3cr1-Cre RXR $\alpha^{lox/lox}$ Tiere den Einfluss einer Deletion des RXR α auf die Zusammensetzung der Ly6C Zellpopulationen analysiert. Dabei konnten wir eine deutliche Abnahme der proinflammatorischen Ly6C^{hi} Monozyten im Blut der RXR α -deletierten Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung nachweisen (siehe Abbildung 43).

Es ist bekannt, dass Monozyten an der Bildung kardialer Makrophagen beteiligt sind. Inflammatorische Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo} Monozyten tragen sowohl zur Entstehung inflammatorischer Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo} Makrophagen als auch zur Bildung von antiinflammatorischen Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi} Makrophagen bei [98].

Folglich sollte in einer weiteren Untersuchung analysiert werden, ob der geringere Anteil der Ly6C^{hi} Monozyten im Blut der Cre/+ Tiere mit einer Veränderung der Zusammensetzung der Makrophagenpopulationen im Herzen nach Myokardinfarkt einhergeht und durch einen veränderten Ablauf der akuten Entzündungsreaktion im Herzen negative Effekte auf die Heilungsprozesse besitzt.

Nahrendorf et al. verdeutlichten bereits die Bedeutung des sequenziellen Ablaufs der Phasen einer Entzündungsreaktion für einen adäquaten Heilungsprozess. Dabei wird eine frühe Nr4a1^{lo} Ly6C^{hi} CCR2⁺ CX3CR1^{lo} Mo/M Φ prädominante Phase und eine folgende Nr4a1^{hi} Ly6C^{lo} CCR2⁻ CX3CR1^{hi} Mo/M Φ dominierende Phase beschrieben. Ein gestörter Ablauf dieser Phasen besitzt einen negativen Einfluss auf die Heilungsprozesse nach einer kardialen Läsion [95, 96].

Unsere Beobachtung einer verringerten Anzahl an Ly6C^{hi} Monozyten im Blut der RXR α -deletierten Tiere, welche in der frühen Phase der Entzündungsreaktion prädominant sind, kann als Hinweis auf einen gestörten Ablauf der Phasen der Entzündungsreaktion in Cre/+ Tieren gesehen werden.

Diskussion

Allerdings ließ sich diese Beobachtung nicht auf die Makrophagenpopulationen im Herzen übertragen. Die kardialen Makrophagenpopulationen der Cre/+ Tiere zeigten keinen relevanten Unterschied in der Expression des Oberflächenmarkers Ly6C an Tag 1 nach I/R-Verletzung verglichen mit den +/+ Tieren (siehe Abbildung 43). Ob und inwiefern die veränderte Zusammensetzung der Blutmonozytenpopulation Einfluss auf kardiale Heilungs- und Umbauprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt besitzt, bleibt folglich unklar.

Eine weitere Einteilung von Monozyten und Makrophagen in der Literatur erfolgt anhand des Oberflächenmoleküls CCR2. Während der akuten Phase nach Myokardinfarkt kommt es bevorzugt zur Einwanderung von CCR2^{hi} Zellen. Diese Zellen zeigen insgesamt einen proinflammatorischen Phänotyp [96, 105].

Hilgendorf et al. konnten die Beteiligung eines nukleären Rezeptors (Nr4a1) bei der Expression von CCR2 aufzeigen [98]. Nr4a1 kann seine Funktionen als Homodimer, ohne weiteren Bindungspartner, oder als Heterodimer ausüben. Dabei wurde beschrieben, dass Nr4a1 Heterodimere mit RXR bilden kann [212]. Inwieweit der RXR α an der Regulation der CCR2-Expression auf Monozyten und Makrophagen beteiligt ist, war bislang weitgehend unverstanden.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, haben wir die CCR2-Expression der Blutmonozyten und der kardialen Makrophagen der RXR α -deletierten und der Kontroll-Tiere verglichen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der RXR α nicht maßgeblich an der Regulation der Genexpression von CCR2 in Monozyten und Makrophagen beteiligt zu sein scheint (siehe Abbildung 44).

VI. Zusammenfassung

Fortschritte in der Therapie ischämischer Herzerkrankungen in den letzten Jahren haben zu einem Rückgang der Sterbefälle geführt. Dennoch stellen die ischämischen Herzerkrankungen weltweit gesehen noch immer die häufigste Todesursache dar [1, 2, 78]. Folglich kommt der Entwicklung neuer Therapieansätze des akuten Myokardinfarktes eine wichtige Bedeutung zu.

Vorarbeiten konnten eine zentrale Funktion der RXR bei unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgängen im Organismus nachweisen. Dabei wurden bereits positive Effekte durch eine Modulation dieser Rezeptoren auf das Outcome verschiedener Krankheitsprozesse beschrieben. Bisher wurden noch keine Untersuchungen zur Rolle des RXR α in Monozyten und Makrophagen bei den Umbau- und Heilungsprozessen nach einem akuten Myokardinfarkt durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine spezifische Deletion des RXR α in Monozyten und Makrophagen durch ein Cre/lox-System erreicht und mithilfe des Ischämie-Reperfusion-Modells die Auswirkung einer Deletion auf die Umbau- und Heilungsprozesse nach einem akuten Myokardinfarkt analysiert.

Durch die PET/CT-Untersuchung an Tag 30 nach einem akuten Myokardinfarkt gelang uns der Nachweis, dass eine Reduktion der Expression des RXR α in Monozyten und Makrophagen mit einer signifikanten Vergrößerung des Infarktareals einhergeht.

Die Verwendung unterschiedlicher Methoden ermöglichte es uns, die Mechanismen zu verstehen, durch welche der RXR α an der Modulation der Infarktgröße nach einem akuten Myokardinfarkt beteiligt ist. Wir konnten nachweisen, dass eine Deletion des RXR α zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen an Tag 1 nach Myokardinfarkt führt und mit einer verminderten Gefäßdichte in der Infarkt-Grenzzone an Tag 30 einhergeht. Des Weiteren besitzt die verminderte Expression des RXR α Einfluss auf die Zusammensetzung der Monozyten- und Makrophagenpopulationen im Blut und im Herzen und führt zu einer verminderten Proliferation von Makrophagen im Infarktareal/der Infarkt-Grenzzone. Wir konnten keine wesentliche Beteiligung des RXR α bei der Regulation der Phagozytoseaktivität von Blutmonozyten, bei der Modulation der Genexpression verschiedener Zyto- und Chemokine im Herzen an Tag 1 nach Myokardinfarkt sowie bei der Hämatopoese nachweisen.

Eine Therapie mit selektiven RXR α -Agonisten könnte folglich ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung des Outcomes nach einem akuten Myokardinfarkt sein. Weitergehende Untersuchungen werden notwendig sein, um den genauen Nutzen, die potenziellen Risiken sowie den optimalen Therapiezeitpunkt zu evaluieren.

VII. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	Engl. Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ak	Antikörper
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
BCL2L1	Engl. B-Cell Lymphoma 2-Like 1
BP	Bandpass
bp	Basenpaare
BV	Brilliant Violet
CCL	CC-Chemokine Ligand
CCR2	Engl. C-C chemokine Receptor type 2
Cre	Engl. cyclization recombination
Cre/+	RXR α -deletierte Tiere
CT	Computertomographie
CXCL	Engl. C-X-C Motif Chemokine Ligand
CX ₃ CR ₁	CX3C Chemokin Rezeptor 1
C1q	Komplementfaktor 1q (engl. Complement Component 1q)
DHA	Docosahexaensäure
E	Entwicklungstag
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGFP	Engl. Enhanced GFP
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Emissionsmessung
ESV	Endsystolisches Volumen
FACS	Engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting/Sorter
FCGR1	Engl. High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I
FDG	Fluordesoxyglukose
FKN	Fraktalkin
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GZ	Grenzzone
HBD	Hormonbindungsdomäne
HBEGF	Engl. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor
HIPK2	Engl. Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
ICAM	Engl. Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IL/II	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
i.v.	Intravenös

Abkürzungsverzeichnis

KM	Knochenmark
KO	Knock-out
LDL	Low-density Lipoprotein
LITAF	Lipopolysaccharid-Induzierter Tumornekrosefaktor- α -Faktor
LPS	Lipopolysaccharide
M.	Musculus
MCP-1	Engl. Monocyte Chemoattractant Protein-1
MERTK	Protoonkogen-Tyrosin-Protein-Kinase MER
MHC	Engl. Major Histocompatibility Complex
Mio.	Millionen
Mo	Monozyten
M Φ	Makrophagen
NaCl	Natriumchlorid
NAIP1	Engl. NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein
NF- κ B	Engl. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-2	Engl. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter Rezeptor
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAR	Retinsäure-Rezeptor (engl. Retinoic Acid Receptor)
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SS	Steady State
SSC	Seitwärtsstreulichts (engl. Side Scatter)
TGF- β ₁	Engl. Transforming Growth Factor
TIMP	Engl. Tissue Inhibitor Metalloproteinase
TIM4	T-Zell Membranprotein 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TPD	Totales Perfusionsdefizit
TX	Transmissionsmessung
u-PA	Urokinase
V.	Vena
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsprotein 1 (engl. Vascular Cell Adhesion Molecule 1)
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)
WGA	Engl. Wheat Germ Agglutinin
+/+	Wildtyp-Geschwistertiere (Kontrollen)
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen

VIII. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 - Antikörper für die Vorbereitung der Blutproben</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 2 - Antikörper für die Vorbereitung des Knochenmarks</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 3 - Antikörper für die Vorbereitung des Gehirns</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 4 - Enzymmix für den Gewebeerweichung der Herzen</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 5 - Antikörper für die Vorbereitung der Herzen</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 6 - Vorbereitung der Reagenzien für die qPCR</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 7 - Verwendete Antikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 8 - Vorbereitung der Reagenzien des „Apoptag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit“</i>	<i>61</i>

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Kompensationsmechanismen nach einem akuten Myokardinfarkt (vereinfachte Darstellung)	14
Abbildung 2 - Biphaseische Immunantwort der Monozyten und Makrophagen als Reaktion auf ein ischämisches kardiales Ereignis (erstellt nach [85, 95, 96, 98])	18
Abbildung 3 - Abstammung unterschiedlicher Populationen von Monozyten und Makrophagen im Herzen (erstellt nach [98])	19
Abbildung 4 - Populationen kardialer Makrophagen und Monozyten im Steady State (erstellt nach [105])	21
Abbildung 5 - Überblick über unterschiedliche Funktionen von Retinoid-X-Rezeptoren (erstellt nach [116])	23
Abbildung 6 - Darstellung des RXR α -Gens in Cx3cr1-Cre-ERT2-YFP RXR alpha ^{flα/flα} Mäusen (erstellt nach [153])	37
Abbildung 7 - Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Erstellung von Knochenmarkchimären	40
Abbildung 8 - Ischämie-Reperfusion-Modell	43
Abbildung 9 - Prinzip der „pHrodo™ Red BioParticles®“	50
Abbildung 10 - μ PET/CT-Untersuchung zur Quantifikation der Infarktgröße	57
Abbildung 11 - Prinzip der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz (erstellt nach [191])	58
Abbildung 12 - Prinzip des „Proteome Profiler™ Mouse XL Cytokine Array Kit“ (erstellt nach [199, 200])	63
Abbildung 13 - Vergleich der Expression des RXR α Wildtyp-Allels und des RXR α L- Allels in Monozyten/Makrophagen unterschiedlicher Gewebe der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+)	66
Abbildung 14 - Quantifikation der Genexpression des RXR α in Blutmonozyten der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie: Vergleich der RXR α -deletierten (Cre/+) mit den Kontroll-Tieren (+/+)	67
Abbildung 15 - Vergleich verschiedener Blutwerte zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	68
Abbildung 16 - Exemplarische Bilder der μ PET/CT-Untersuchung der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	69
Abbildung 17 - Vergleich der zeitlichen Entwicklung des totalen Perfusionsdefizits in den Herzen der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 18 - Vergleich des totalen Perfusionsdefizites (TPD) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	70
Abbildung 19 - Vergleich der Ejektionsfraktion (EF) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	71
Abbildung 20 - Vergleich des enddiastolischen Volumens (EDV) an Tag 6 und an Tag 30 nach I/R-Verletzung zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie	71
Abbildung 21 - Gating des Phagozytoseassays mit „pHrodo™Red BioParticles®“	73
Abbildung 22 - Gegenüberstellung der phagozytotischen Aktivität von Blutmonozyten der Kontroll- (+/+) und der RXR α -deletierten Tiere (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung	74
Abbildung 23 - Beispielhafte Darstellung der Färbung mit WGA zur Abgrenzung des Infarktareals	75
Abbildung 24 - Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-CD31 Antikörper zur Quantifikation der Gefäßneubildung in den Herzen der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Tiere an Tag 30 nach I/R-Verletzung	76
Abbildung 25 - Gegenüberstellung der Gefäßdichte in der Infarkt-Grenzzone der Herzen der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 30 nach I/R-Verletzung (Vergleich Kontrollen mit Cre/+ Tieren)	76
Abbildung 26 - Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-F4/80-Cy3 (zur Markierung der Makrophagen), anti-Ki-67-AF488 (zur Darstellung der Zellproliferation) und Hoechst (als Zellkernmarker) der Herzen von Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Tieren an Tag 2 nach I/R-Verletzung	77
Abbildung 27 - Vergleich der Proliferationsrate von Makrophagen/Fläche im Herzen zwischen den Kontroll- (+/+) und den RXR α -deletierten Tieren (Cre/+) der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 2 nach I/R-Verletzung (A) Infarktareal/Infarkt-Grenzzone (GZ) (B) Remote-Areal	78
Abbildung 28 - Vergleich der Anzahl an Makrophagen im Herzen von Cre/+ und von +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung	79
Abbildung 29 - Exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung apoptotischer Zellen in den Herzen der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung	79
Abbildung 30 - Vergleich der Anzahl apoptotischer Zellen in den Herzen von Kontroll- und Cre/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung	80
Abbildung 31 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{flα/flα} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 1)	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 32 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{fllox/fllox} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 2)	82
Abbildung 33 - Expression von Zyto-/Chemokinen und Wachstumsfaktoren in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{fllox/fllox} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung (Teil 3)	83
Abbildung 34 - Gating zur Charakterisierung der Makrophagenpopulationen in den Herzen der Cx3cr1-GFP Tiere sowie des Phagozytoseassays (hierbei ohne Lin-PE)	84
Abbildung 35 - Dynamische Veränderung der Makrophagenpopulationen im Herzen als Reaktion auf einen akuten Myokardinfarkt	85
Abbildung 36 - Repräsentative Bilder der histologischen Untersuchung der Herzen von Cx3cr1-GFP-Tieren	86
Abbildung 37 - Verteilung der Makrophagenpopulationen in den Herzen der Cx3cr1-GFP Tiere an Tag 6 nach I/R-Verletzung	87
Abbildung 38 - Anteil der MHCII ^{lo} Makrophagen an allen CD45.1 positiven Makrophagen im Infarktgebiet und im Remote-Areal der Herzen von Mx1-Cre;Myb ^{fllox/fllox} Tieren an Tag 2 nach I/R-Verletzung	88
Abbildung 39 - Charakterisierung der phagozytotischen Aktivität von kardialen MHCII ^{hi} und MHCII ^{lo} Makrophagen im SS und im Rahmen des akuten Myokardinfarktes an Tag 1 nach I/R-Verletzung im Infarktgebiet und Remote-Areal	89
Abbildung 40 - Gating zum Vergleich der Monozytenpopulationen im Blut von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{fllox/fllox} Mauslinie	90
Abbildung 41 - Gating zum Vergleich der Makrophagenpopulationen in den Herzen von Cre/+ und +/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{fllox/fllox} Mauslinie	90
Abbildung 42 - Vergleich des Anteils der MHCII ^{hi} Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation im Blut der +/+ und Cre/+ Tiere an Tag 1 (A) und an Tag 30 (B) nach I/R-Verletzung sowie der MHCII ^{hi} Makrophagen an der gesamten Makrophagenpopulation in den Herzen an Tag 1 nach I/R-Verletzung (C)	91
Abbildung 43 - Gegenüberstellung des prozentualen Anteils der Ly6C ^{hi} Monozyten an der gesamten Monozytenpopulation im Blut der Kontroll- und Cre/+ Tiere an Tag 1 (A) und an Tag 30 (B) nach I/R-Verletzung sowie des Anteils der Ly6C ^{hi} Makrophagen an der gesamten Makrophagenpopulation in den Herzen der Kontroll- und Cre/+ Tiere an Tag 1 nach I/R-Verletzung (C)	92
Abbildung 44 - Vergleich der CCR2-Expression in Blutmonozyten (A) und kardialen Makrophagen (B) zwischen Kontroll- und Cre/+ Tieren der Cx3cr1-Cre RXR alpha ^{fllox/fllox} Mauslinie an Tag 1 nach I/R-Verletzung	93

X. Literaturverzeichnis

1. WHO. *The top 10 causes of death.* Zugänglich unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en> (Stand: 14.03.2018).
2. *Deutscher Herzbericht 2017.* Deutsche Herzstiftung. p. 32-33, 46.
3. Heidenreich, P.A., et al., *Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States.* A Policy Statement From the American Heart Association, 2011. 123(8): p. 933-944.
4. Davies, M.J., et al., *Factors influencing the presence or absence of acute coronary artery thrombi in sudden ischaemic death.* European Heart Journal, 1989. 10(3): p. 203-208.
5. Virmani, R., et al., *Pathology of the Vulnerable Plaque.* Journal of the American College of Cardiology, 2006. 47(8 Supplement): p. C13-C18.
6. Ross, R. and L. Harker, *Hyperlipidemia and atherosclerosis.* Science, 1976. 193(4258): p. 1094-1100.
7. Herold, G. and Mitarbeiter, *Innere Medizin.* 2019, Gerd Herold: Köln. p. 211, 212, 709.
8. Xue-Qiao Zhao, *Pathogenesis of atherosclerosis.* Zugänglich unter: https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-atherosclerosis?search=vulnerable%20plaque&source=search_result&selectedTitle=2~17&usage_type=default&display_rank=2 (Stand: 13.12.2019).
9. Brand, K., et al., *Dysregulation of Monocytic Nuclear Factor- κ B by Oxidized Low-Density Lipoprotein.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997. 17(10): p. 1901-1909.
10. Steinberg, D., *Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime.* Nature Medicine, 2002. 8(11): p. 1211-1217.
11. Cybulsky, M. and M. Gimbrone, *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.* Science, 1991. 251(4995): p. 788-791.
12. Swirski, F.K., et al., *Ly-6C(hi) monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata.* Journal of Clinical Investigation, 2007. 117(1): p. 195-205.
13. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity.* Current Opinion in Immunology, 2002. 14(1): p. 123-128.
14. Xu, X.H., et al., *Toll-Like Receptor-4 Is Expressed by Macrophages in Murine and Human Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques and Upregulated by Oxidized LDL.* Circulation, 2001. 104(25): p. 3103-3108.
15. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis.* Nature, 2011. 473(7347): p. 317.
16. Rajavashisth, T.B., et al., *Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase.* Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(17): p. 11924-11929.

Literaturverzeichnis

17. Amento, E.P., et al., *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1991. 11(5): p. 1223-1230.
18. Davies, M.J., et al., *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content*. British Heart Journal, 1993. 69(5): p. 377-381.
19. Falk, E., *Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes*. The American Journal of Cardiology, 1989. 63(10): p. E114-E120.
20. Richardson, P.D., M.J. Davies, and G.V.R. Born, *Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques*. The Lancet, 1989. 334(8669): p. 941-944.
21. Cheng, G.C., et al., *Distribution of circumferential stress in ruptured and stable atherosclerotic lesions. A structural analysis with histopathological correlation*. Circulation, 1993. 87(4): p. 1179-1187.
22. Lendon, C.L., et al., *Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophage density is increased*. Atherosclerosis, 1991. 87(1): p. 87-90.
23. Fernández-Ortiz, A., et al., *Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture*. Journal of the American College of Cardiology, 1994. 23(7): p. 1562-1569.
24. Friedman, M. and G.J. Van den Bovenkamp, *The pathogenesis of a coronary thrombus*. The American Journal of Pathology, 1966. 48(1): p. 19-44.
25. Gidding, S.S., et al., *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Risk Score in Young Adults Predicts Coronary Artery and Abdominal Aorta Calcium in Middle Age*. The CARDIA Study, 2016. 133(2): p. 139-146.
26. Njølstad, I., E. Arnesen, and P.G. Lund-Larsen, *Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction: a 12-year follow-up of the Finnmark Study*. Circulation, 1996. 93(3): p. 450-456.
27. Paul, O., *Background of the prevention of cardiovascular disease. II. Arteriosclerosis, hypertension, and selected risk factors*. Circulation, 1989. 80(1): p. 206-214.
28. Rissanen, A.M., *Familial aggregation of coronary heart disease in a high incidence area (North Karelia, Finland)*. British Heart Journal, 1979. 42(3): p. 294-303.
29. Stary, H.C., *Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults*. Arteriosclerosis (Dallas, Tex.), 1989. 9(1 Suppl): p. 119-32.
30. McGill, H.C., et al., *Associations of Coronary Heart Disease Risk Factors With the Intermediate Lesion of Atherosclerosis in Youth*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. 20(8): p. 1998-2004.
31. Goldberg, R.J., et al., *Time of onset of symptoms of acute myocardial infarction*. The American journal of cardiology, 1990. 66(2): p. 140-144.
32. Marchant, B., et al., *Circadian and seasonal factors in the pathogenesis of acute myocardial*

- infarction: the influence of environmental temperature.* Heart, 1993. 69(5): p. 385-387.
33. Gelernt, M.D. and J.S. Hochman, *Acute myocardial infarction triggered by emotional stress.* American Journal of Cardiology, 1992. 69(17): p. 1512-1513.
34. Mittleman, M.A., et al., *Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion--protection against triggering by regular exertion.* New England Journal of Medicine, 1993. 329(23): p. 1677-1683.
35. Prisco, D., et al., *Thrombin generation after physical exercise.* Thrombosis research, 1993. 69(1): p. 159-164.
36. Tofler, G.H., et al., *Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death.* New England Journal of Medicine, 1987. 316(24): p. 1514-1518.
37. Quyyumi, A.A., et al., *Circadian variation in ischemic threshold. A mechanism underlying the circadian variation in ischemic events.* Circulation, 1992. 86(1): p. 22-28.
38. Bridges, A., et al., *Circadian variation of tissue plasminogen activator and its inhibitor, von Willebrand factor antigen, and prostacyclin stimulating factor in men with ischaemic heart disease.* Heart, 1993. 69(2): p. 121-124.
39. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling.* Journal of the American College of Cardiology, 2000. 35(3): p. 569-582.
40. Sabbah, H.N. and S. Goldstein, *Ventricular remodelling: consequences and therapy.* European Heart Journal, 1993. 14(suppl_C): p. 24-29.
41. Fraccarollo, D., P. Galuppo, and J. Bauersachs, *Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling.* Cardiovascular Research, 2012. 94(2): p. 293-303.
42. Jay N Cohn, *Cardiac remodeling: Basic aspects.* Zugänglich unter: <https://www.uptodate.com/contents/cardiac-remodeling-basic-aspects> (Stand: Juni 2018).
43. Gaudron, P., et al., *Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors.* Circulation, 1993. 87(3): p. 755-763.
44. Korup, E., et al., *Comparison of Degrees of Left Ventricular Dilation Within Three Hours and Up to Six Days After Onset of First Acute Myocardial Infarction.* American Journal of Cardiology, 1997. 80(4): p. 449-453.
45. Rumberger, J.A., et al., *Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans.* Journal of the American College of Cardiology, 1993. 21(3): p. 673-682.
46. Hochman, J.S. and B.H. Bulkley, *Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study.* Circulation, 1982. 65(7): p. 1446-1450.
47. Swynghedauw, B., *Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling.* Physiological Reviews, 1999. 79(1): p. 215-262.

Literaturverzeichnis

48. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological Ventricular Remodeling. Mechanisms: Part 1 of 2*, 2013. 128(4): p. 388-400.
49. Matsui, Y., et al., *Distinct Roles of Autophagy in the Heart During Ischemia and Reperfusion. Roles of AMP-Activated Protein Kinase and Beclin 1 in Mediating Autophagy*, 2007. 100(6): p. 914-922.
50. Miyata, S., et al., *Autophagic Cardiomyocyte Death in Cardiomyopathic Hamsters and Its Prevention by Granulocyte Colony-Stimulating Factor*. The American Journal of Pathology, 2006. 168(2): p. 386-397.
51. Takahashi, S., A.C. Barry, and S.M. Factor, *Collagen degradation in ischaemic rat hearts*. Biochemical Journal, 1990. 265(1): p. 233-241.
52. Cleutjens, J.P.M., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1995. 27(6): p. 1281-1292.
53. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. 81(4): p. 1161-1172.
54. Berry, M.F., et al., *Administration of a tumor necrosis factor inhibitor at the time of myocardial infarction attenuates subsequent ventricular remodeling*. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2004. 23(9): p. 1061-1068.
55. Al-Amran, F.G., et al., *Blockade of the Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor Pathway Ameliorates Myocardial Injury in Animal Models of Ischemia and Reperfusion*. Pharmacology, 2014. 93(5-6): p. 296-302.
56. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. 39(2): p. 241-246.
57. Schorb, W., et al., *Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts*. Circulation Research, 1993. 72(6): p. 1245-1254.
58. Crawford, D.C., A.V. Chobanian, and P. Brecher, *Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat*. Circulation Research, 1994. 74(4): p. 727-739.
59. Guarda, E., et al., *Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts*. Cardiovascular research, 1993. 27(12): p. 2130-2134.
60. Silvestre, J.-S., et al., *Activation of Cardiac Aldosterone Production in Rat Myocardial Infarction. Effect of Angiotensin II Receptor Blockade and Role in Cardiac Fibrosis*, 1999. 99(20): p. 2694-2701.
61. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science (New York, N.Y.), 2009. 324(5923): p. 98-102.
62. Lerman, R.H., et al., *Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit*. Circulation Research, 1983. 53(3): p. 378-388.
63. de Bakker, J.M., et al., *Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation*. Circulation, 1993. 88(3): p. 915-926.

64. Morita, N., et al., *Cardiac fibrosis as a determinant of ventricular tachyarrhythmias*. Journal of arrhythmia, 2014. 30(6): p. 389-394.
65. Reis Filho, J.R.d.A.R., et al., *Reverse Cardiac Remodeling: A Marker of Better Prognosis in Heart Failure*. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2015. 104(6): p. 502-506.
66. Dargie, H.J. and J. Byrne, *Pathophysiological Aspects of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System in Acute Myocardial Infarction*. Journal of Cardiovascular Risk, 1995. 2(5): p. 389-395.
67. Sadoshima, J.-i., et al., *Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro*. Cell, 1993. 75(5): p. 977-984.
68. Hokimoto, S., et al., *Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction*. Circulation, 1996. 94(7): p. 1513-1518.
69. Harada, K., et al., *Angiotensin II Type 1A Receptor Knockout Mice Display Less Left Ventricular Remodeling and Improved Survival After Myocardial Infarction*. Circulation, 1999. 100(20): p. 2093-2099.
70. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1994. 26(7): p. 809-820.
71. van Krimpen, C., et al., *DNA synthesis in the non-infarcted cardiac interstitium after left coronary artery ligation in the rat: effects of captopril*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1991. 23(11): p. 1245-1253.
72. Konstam, M.A., et al., *Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators*. Circulation, 1992. 86(2): p. 431-438.
73. Konstam, M.A., et al., *Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilatation in patients with asymptomatic systolic dysfunction. SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) Investigators*. Circulation, 1993. 88(5): p. 2277-2283.
74. The Acute Infarction Ramipril Efficacy Study Investigators, *Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure*. The Lancet, 1993. 342(8875): p. 821-828.
75. Garg, R., et al., *Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure*. Jama, 1995. 273(18): p. 1450-1456.
76. Dargie, H., *Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial*. The Lancet, 2001. 357(9266): p. 1385-1390.
77. Doughty, R.N., et al., *Left ventricular remodeling with carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. Australia-New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group*. Journal of the American College of Cardiology, 1997. 29(5): p. 1060-1066.
78. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial Reperfusion Injury*. New England Journal of

Literaturverzeichnis

Medicine, 2007. 357(11): p. 1121-1135.

79. Theodore Kalogeris, C.P.B., Maike Krenz, and Ronald J. Korthuis, *Ischemia/Reperfusion*. Comprehensive Physiology.

80. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. European Heart Journal, 2018. 39(2): p. 119-177.

81. Gordon, S., *Elie Metchnikoff: Father of natural immunity*. European Journal of Immunology, 2008. 38(12): p. 3257-3264.

82. Gombozhapova, A., et al., *Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling*. Journal of Biomedical Science, 2017. 24: p. 13.

83. Weinberger, T. and C. Schulz, *Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling*. Frontiers in Physiology, 2015. 6(107).

84. Alberto, M., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. The Journal of Pathology, 2013. 229(2): p. 176-185.

85. Frantz, S. and M. Nahrendorf, *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. Cardiovascular Research, 2014. 102(2): p. 240-248.

86. Vikhanski, L., *Immunity: How Elie Metchnikoff changed the course of modern medicine*. 2016: Chicago Review Press.

87. Underhill, A.A.a.D.M., *MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES*. Annual Review of Immunology, 1999. 17(1): p. 593-623.

88. Desjardins, M., et al., *Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus*. The Journal of Cell Biology, 1994. 124(5): p. 677-688.

89. Gordon, S., *Fundamental Immunology*. 2013, Lippincott Williams & Wilkins: 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106 USA. p. 448-467.

90. Haase, H., *Das angeborene Immunsystem*, in *Immunologie für Einsteiger*. 2015, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 33-49.

91. Kawano, M. and S. Nagata, *Efferocytosis and autoimmune disease*. International immunology, 2018. 30(12): p. 551-558.

92. Scott, R.S., et al., *Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER*. Nature, 2001. 411(6834): p. 207-211.

93. Kenneth Mallory, G., P.D. White, and J. Salcedo-Salgar, *The speed of healing of myocardial infarction: A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases*. American Heart Journal, 1939. 18(6): p. 647-671.

94. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice*. The American Journal of Pathology, 2007. 170(3): p. 818-829.

Literaturverzeichnis

95. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007. 204(12): p. 3037-3047.
96. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair*. *Circulation*, 2010. 121(22): p. 2437-2445.
97. Jung, K., et al., *Endoscopic Time-Lapse Imaging of Immune Cells in Infarcted Mouse Hearts*. *Circulation Research*, 2013. 112(6): p. 891-899.
98. Hilgendorf, I., et al., *Monocytes Depend on Nr4a1 to Balance Both Inflammatory and Reparative Phases in the Infarcted Myocardium*. *Circulation Research*, 2014. 114(10): p. 1611-1622.
99. Hanna, R.N., et al., *The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁻ monocytes*. *Nature Immunology*, 2011. 12: p. 778.
100. Panizzi, P., et al., *Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010. 55(15): p. 1629-1638.
101. Hofmann, U., et al., *Activation of CD4(+) T Lymphocytes Improves Wound Healing and Survival After Experimental Myocardial Infarction in Mice*. *Circulation*, 2012. 125(13): p. 1652-1663.
102. Zouggari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nature medicine*, 2013. 19(10): p. 1273-1280.
103. Epelman, S., et al., *Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation*. *Immunity*, 2014. 40(1): p. 91-104.
104. Epelman, S., Kory J. Lavine, and Gwendalyn J. Randolph, *Origin and Functions of Tissue Macrophages*. *Immunity*, 2014. 41(1): p. 21-35.
105. Lavine, K.J., et al., *Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. 111(45): p. 16029-16034.
106. Schulz, C., et al., *A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells*. *Science*, 2012. 336(6077): p. 86-90.
107. Hashimoto, D., et al., *Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes*. *Immunity*, 2013. 38(4): p. 792-804.
108. Dawson, M.I. and Z. Xia, *The Retinoid X Receptors and Their Ligands*. *Biochimica et biophysica acta*, 2012. 1821(1): p. 21-56.
109. Germain, P., et al., *International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. 58(4): p. 760-72.
110. Nagy, L. and J.W.R. Schwabe, *Mechanism of the nuclear receptor molecular switch*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004. 29(6): p. 317-324.
111. Wolf, G., *Is 9-Cis-Retinoic Acid the Endogenous Ligand for the Retinoic Acid-X Receptor?* *Nutrition Reviews*, 2006. 64(12): p. 532-538.

Literaturverzeichnis

112. Pérez, E., et al., *Modulation of RXR function through ligand design*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2012. 1821(1): p. 57-69.
113. de Urquiza, A.M., et al., *Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain*. Science, 2000. 290(5499): p. 2140-2144.
114. Lemotte, P.K., S. Keidel, and C.M. Apfel, *Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand*. The FEBS Journal, 1996. 236(1): p. 328-333.
115. Wong, S.-F., *Oral Bexarotene in the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma*. Annals of Pharmacotherapy, 2001. 35(9): p. 1056-1065.
116. Rószler, T., et al., *Retinoid X receptors in macrophage biology*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2013. 24(9): p. 460-468.
117. Thomas, M., M.A. Sukhai, and S. Kamel-Reid, *An emerging role for retinoid X receptor α in malignant hematopoiesis*. Leukemia research, 2012. 36(9): p. 1075-1081.
118. Ricote, M., et al., *Normal hematopoiesis after conditional targeting of RXR α in murine hematopoietic stem/progenitor cells*. J Leukoc Biol, 2006. 80(4): p. 850-61.
119. Taschner, S., et al., *Down-regulation of RXR α expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors*. Blood, 2007. 109(3): p. 971-979.
120. Sukhai, M.A., et al., *Evidence of functional interaction between NuMA-RAR α and RXR α in an in vivo model of acute promyelocytic leukemia*. Oncogene, 2008. 27: p. 4666.
121. Zhu, J., et al., *RXR is an essential component of the oncogenic PML/RARA complex in vivo*. Cancer cell, 2007. 12(1): p. 23-35.
122. Toshihiro, K., et al., *Expression of liver X receptor α and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage*. Pathology International, 2009. 59(3): p. 152-160.
123. Zhou, L., et al., *Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2010. 335(1): p. 283-289.
124. Tarrade, A., et al., *Retinoic acid and arsenic trioxide cooperate for apoptosis through phosphorylated RXR α* . Oncogene, 2005. 24: p. 2277.
125. Mehta, K., et al., *Activation of retinoid receptors RAR α and RXR α induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells*. Cell Growth Differ, 1996. 7(2): p. 179-186.
126. Certo, M., et al., *Activation of RXR/PPAR γ underlies neuroprotection by bexarotene in ischemic stroke*. Pharmacol Res, 2015. 102: p. 298-307.
127. Diab, A., et al., *Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and the retinoid X receptor exert additive anti-inflammatory effects on experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroimmunology, 2004. 148(1): p. 116-126.
128. Jihong, X., et al., *Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor- α and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia*. Journal of Neuroscience Research, 2005.

81(3): p. 403-411.

129. Roszer, T., et al., *Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency*. J Immunol, 2011. 186(1): p. 621-31.

130. Nunez, V., et al., *Retinoid X receptor alpha controls innate inflammatory responses through the up-regulation of chemokine expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(23): p. 10626-31.

131. Daniel, B., et al., *The active enhancer network operated by liganded RXR supports angiogenic activity in macrophages*. Genes Dev, 2014. 28(14): p. 1562-77.

132. Sanz, M.-J., et al., *Retinoid X Receptor Agonists Impair Arterial Mononuclear Cell Recruitment through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activation*. The Journal of Immunology, 2012. 189(1): p. 411-424.

133. Wang, X., C. Allen, and M. Ballow, *Retinoic Acid Enhances the Production of IL-10 While Reducing the Synthesis of IL-12 and TNF- α from LPS-Stimulated Monocytes/Macrophages*. Journal of Clinical Immunology, 2007. 27(2): p. 193-200.

134. Dutta, A., T. Sen, and A. Chatterjee, *All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules*. Cell Adhesion & Migration, 2010. 4(3): p. 409-418.

135. Montemurro P., B.G., Conese M., Gabriele S., Petio M., Colucci M., Semeraro N., *Retinoic acid stimulates plasminogen activator inhibitor 2 production by blood mononuclear cells and inhibits urokinase-induced extracellular proteolysis*. British Journal of Haematology, 1999. 107(2): p. 294-299.

136. Zimmerman, T.L., et al., *Nuclear export of retinoid X receptor α in response to interleukin-1 β -mediated cell signaling ROLES FOR JNK AND SER260*. Journal of Biological Chemistry, 2006. 281(22): p. 15434-15440.

137. Yamada, H., et al., *Retinoic Acid Therapy Attenuates the Severity of Tuberculosis While Altering Lymphocyte and Macrophage Numbers and Cytokine Expression in Rats Infected with Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Nutrition, 2007. 137(12): p. 2696-2700.

138. Henson, P.M., *Dampening inflammation*. Nature Immunology, 2005. 6: p. 1179.

139. Ravichandran, K.S. and U. Lorenz, *Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal*. Nature Reviews Immunology, 2007. 7: p. 964.

140. Cramer, P.E., et al., *ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models*. Science, 2012. 335(6075): p. 1503-1506.

141. Shinozaki, Y., et al., *Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase*. Neuroscience, 2007. 147(1): p. 153-163.

142. Wayman, N.S., et al., *Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ and PPAR- α) reduce myocardial infarct size*. The FASEB Journal, 2002. 16(9): p. 1027-1040.

143. Glass, C.K. and K. Saijo, *Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells*. Nature Reviews Immunology, 2010. 10: p. 365.

Literaturverzeichnis

144. Zhu, L., et al., *9-cis Retinoic Acid Induces Monocyte Chemoattractant Protein-1 Secretion in Human Monocytic THP-1 Cells*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999. 19(9): p. 2105-2111.
145. Xu, J. and P.D. Drew, *9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes*. *Journal of Neuroimmunology*, 2006. 171(1): p. 135-144.
146. Du, X., et al., *An essential role for Rrxr in the development of Th2 responses*. *European Journal of Immunology*, 2005. 35(12): p. 3414-3423.
147. Racke, M.K., et al., *Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course*. *The Journal of Immunology*, 1995. 154(1): p. 450-458.
148. *Why mouse genetics? Zugänglich unter: <https://www.jax.org/personalized-medicine/why-mouse-genetics> (Stand: 23.03.2019)*.
149. Sucov, H.M., et al., *RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis*. *Genes & development*, 1994. 8(9): p. 1007-1018.
150. Feil, S., Valtcheva, N., Feil, R., *Inducible Cre mice*. *Methods Mol Biol*, 2009. 530: p. 343-63.
151. Andras, N., *Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring*. *genesis*, 2000. 26(2): p. 99-109.
152. Greenhalgh, S.N., K.P. Conroy, and N.C. Henderson, *Cre-ativity in the liver: Transgenic approaches to targeting hepatic nonparenchymal cells*. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2015. 61(6): p. 2091-2099.
153. Chen, J., S.W. Kubalak, and K.R. Chien, *Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis*. *Development*, 1998. 125(10): p. 1943-1949.
154. Whitfield, J., T. Littlewood, and L. Soucek, *Tamoxifen administration to mice*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015. 2015(3): p. 269-71.
155. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. *Nature*, 1997. 385: p. 640.
156. Imai, T., et al., *Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX3CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion*. *Cell*, 1997. 91(4): p. 521-530.
157. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. *Immunity*, 2013. 38(1): p. 79-91.
158. Li, M., et al., *Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(41): p. 14795-14800.
159. Gomez Perdiguero, E., et al., *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. *Nature*, 2014. 518: p. 547.
160. Joo, P.E., et al., *System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the Foxa2*

locus in mice. *Developmental Dynamics*, 2008. 237(2): p. 447-453.

161. Claudia, K., et al., *Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate*. *genesis*, 2007. 45(1): p. 11-16.

162. Lossau, H., *Dynamik der Fluoreszenz aus photosynthetischen Reaktionszentren und grün fluoreszierendem Protein (GFP): Untersuchung ultraschneller Energie-, Elektron- und Protontransferprozesse*. 1998, Utz, Wiss. p. 7-8.

163. Jung, S., et al., *Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. 20(11): p. 4106-4114.

164. Zhang G, G.V., Kain SR., *An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells*, in *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996. p. 707-11.

165. Kuhn, R., et al., *Inducible gene targeting in mice*. *Science*, 1995. 269(5229): p. 1427-1429.

166. Mucenski, M.L., et al., *A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis*. *Cell*, 1991. 65(4): p. 677-689.

167. Mukoyama, Y.-s., et al., *Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb*. *Current Biology*, 1999. 9(15): p. 833-S2.

168. Sumner, R., et al., *Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor*. *Oncogene*, 2000. 19: p. 3335.

169. Lang-Roth, T.K.u.R., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2016, Thomas Karow: Pulheim. p. 507, 519, 581-596, 1021-1022.

170. Erhardt, W. and P. Kölle, *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2004, Schattauer: Stuttgart. p. 25-28.

171. Löscher, W., F.R. Ungemach, and R. Kroker, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 2006, Parey Verlag: Stuttgart. p. 137-138.

172. Xu, Z., et al., *A Murine Model of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury through Ligation of the Left Anterior Descending Artery*. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2014(86): p. 51329.

173. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. Zugänglich unter: <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf> (Stand: Dezember 2002).

174. Gompf, A., *Grundlagen der Durchflusszytometrie*. In *Zelluläre Diagnostik und Therapie*. 2015, Walter de Gruyter GmbH: Berlin, Boston. p. 1-28.

175. Sanderson, M.J., et al., *Fluorescence Microscopy*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014. 2014(10).

176. *An Introduction to Compensation for Multicolor Assays on Digital Flow Cytometers*. Zugänglich unter:

Literaturverzeichnis

https://www.bdbiosciences.com/documents/Compensation_Multicolor_TechBulletin.pdf
(Stand: August 2009).

177. *pHrodo™ Red and Green BioParticles® Conjugates for Phagocytosis*. Zugänglich unter: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp35361.pdf> (Stand: 30.05.2013).

178. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. Journal of Cell Science, 2001. 114(6): p. 1061-1077.

179. Peake, I., *The polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Pathology, 1989. 42(7): p. 673-676.

180. Bromham, L., *An Introduction to Molecular Evolution and Phylogenetics*. 2016, Oxford University Press. p. 105.

181. *SYBR® Green Master Mix*. Zugänglich unter: <http://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-master-mix.html> (Stand: 10.6.2018).

182. Ulla Wollenberger, R.R., Frank F. Bier, Frieder W. Scheller, *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*. 2003, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. P6.2.3.

183. Joachim Rassow, R.D., Roland Netzker, Karin Hauser *Biochemie*. 2012, Thieme: Stuttgart. p. 484-485.

184. Bengel, F.M., et al., *Cardiac Positron Emission Tomography*. Journal of the American College of Cardiology, 2009. 54(1): p. 1-15.

185. Schelbert, H.R., *Metabolic imaging to assess myocardial viability*. Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 1994. 35(4 Suppl): p. 8S-14S.

186. Maximilian Resier, F.-P.K., Jürgen Debus, *Duale Reihe Radiologie*. 2017, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 144-145.

187. *Thoracic positron emission tomography*. Zugänglich unter: <https://www.uptodate.com/contents/thoracic-positron-emission-tomography> (Stand: 14.06.2018).

188. *Assessment of myocardial viability by nuclear imaging in coronary heart disease*. Zugänglich unter: <https://www.uptodate.com/contents/assessment-of-myocardial-viability-by-nuclear-imaging-in-coronary-heart-disease> (Stand: 14.06.2018).

189. Rischpler, C., et al., *Prospective Evaluation of 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Postischemic Myocardium by Simultaneous Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging as a Prognostic Marker of Functional Outcome*. Circulation: Cardiovascular Imaging, 2016. 9(4): p. e004316.

190. *Education in Microscopy and Digital Imaging*. Zugänglich unter: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html> (Stand: 08.08.2018).

191. *Direct vs indirect immunofluorescence*. Zugänglich unter: <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence> (Stand: 08.08.2018).

Literaturverzeichnis

192. Liener, I., *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. 2012, Elsevier. p. 103.
193. Sharon, N., *Lectins*. 2012, Springer Netherlands. p. 16.
194. Nagata, Y. and M.M. Burger, *Wheat germ agglutinin molecular characteristics and specificity for sugar binding*. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(10): p. 3116-3122.
195. Peter C. Heinrich, M.M., Lutz Graeve (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Springer: Berlin Heidelberg. p. 30-32, 633, 931, 941-43.
196. Emde, B., et al., *Wheat Germ Agglutinin Staining as a Suitable Method for Detection and Quantification of Fibrosis in Cardiac Tissue after Myocardial Infarction*. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 2014. 58(4): p. 2448.
197. *ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit*. Zugänglich unter: http://www.merckmillipore.com/DE/en/product/ApopTag-Fluorescein-In-Situ-Apoptosis-Detection-Kit,MM_NF-S7110?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.de%2F&bd=1#anchor_BRO (Stand: 11.08.2018).
198. Li, X., et al., *Application of Biotin, Digoxigenin or Fluorescein Conjugated Deoxynucleotides to Label DNA Strand Breaks for Analysis of Cell Proliferation and Apoptosis Using Flow Cytometry*. *Biotechnic & Histochemistry*, 1995. 70(5): p. 234-242.
199. *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array*. Zugänglich unter: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary028.pdf> (Stand: 11.08.2018).
200. *Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array: Assay Procedure*. Zugänglich unter: https://www.rndsystems.com/products/proteome-profiler-mouse-xl-cytokine-array_ary028#assay-procedure (Stand: 21.12.2019)
201. Li, M., et al., *Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis*. *Nature*, 2000. 407: p. 633.
202. Seropian, I.M., et al., *Anti-Inflammatory Strategies for Ventricular Remodeling Following ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014. 63(16): p. 1593-1603.
203. Szanto, A. and L. Nagy, *Retinoids Potentiate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Action in Differentiation, Gene Expression, and Lipid Metabolic Processes in Developing Myeloid Cells*. *Molecular Pharmacology*, 2005. 67(6): p. 1935-1943.
204. *An overview of the innate immune system - Efferocytosis*. Zugänglich unter: https://www.uptodate.com/contents/an-overview-of-the-innate-immune-system?search=efferozytose§ionRank=1&usage_type=default&anchor=H7688590&source=machineLearning&selectedTitle=4~5&display_rank=4#H7688590 (Stand: 02.10.2019).
205. *An overview of the innate immune system - Pattern recognition receptors linked to phagocytosis*. Zugänglich unter: https://www.uptodate.com/contents/an-overview-of-the-innate-immune-system?search=phagocytosis§ionRank=1&usage_type=default&anchor=H9420986&source=mac

hineLearning&selectedTitle=1~150&display_rank=1#H9420986 (Stand: 02.10.2019).

206. Cochain, C., K.M. Channon, and J.-S. Silvestre, *Angiogenesis in the Infarcted Myocardium. Antioxidants & Redox Signaling*, 2013. 18(9): p. 1100-1113.
207. Kobayashi, K., et al., *Dynamics of angiogenesis in ischemic areas of the infarcted heart. Scientific Reports*, 2017. 7: p. 7156.
208. Zhao, T., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: Role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. Microvascular Research*, 2010. 80(2): p. 188-194.
209. Degos, L. and Z.Y. Wang, *All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. Oncogene*, 2001. 20: p. 7140.
210. Shiohara, M., et al., *Effects of Novel RAR- and RXR-Selective Retinoids on Myeloid Leukemic Proliferation and Differentiation In Vitro. Blood*, 1999. 93(6): p. 2057-2066.
211. Vyas, J.M., A.G. Van der Veen, and H.L. Ploegh, *The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol*, 2008. 8(8): p. 607-18.
212. Lee, S.-O., et al., *The Orphan Nuclear Receptor NR4A1 (Nur77) Regulates Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer Cells. Molecular cancer research : MCR*, 2014. 12(4): p. 527-538.
213. Bortz, J., et al., *Testmethoden für Kardinaldaten, in Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung: Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 227-255.*

XI. Danksagung

Ganz herzlich danke ich Herrn Professor Christian Schulz für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Tobias Weinberger, welcher mir während der ganzen Zeit unterstützend zur Seite gestanden hat.

Bei Frau Dr. Vanessa Schneider und Frau Dr. Denise Messerer bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und dem Umgang mit den Tieren.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Michael Lorenz, Frau Anna Titova, Frau Elisabeth Raatz und Herrn Cuong Tieu sowie den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Schulz und Herrn Professor Massberg für die Ratschläge im Rahmen der Versuchsdurchführung.

Herrn Dr. Sven Reese danke ich für die Beratung hinsichtlich der statistischen Auswertung.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums. Danke, dass ihr in jeder Phase für mich da wart und an mich geglaubt habt.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Saskia Janina Räuber

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand