

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Bedeutung einer verstärkten herzspezifischen Autoimmunantwort
nach einem experimentellen Myokardinfarkt bei Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Charlotte Carola Regina Koch

geboren am 30.07.1993 in Berlin

Betreuer: Prof. Dr. med. Michel Noutsias

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Andreas Simm
2. Prof. Dr. med. Thomas Kerkau (Würzburg)

16.06.2020

08.12.2020

Für meine Mama

Referat

Immunologische Prozesse im Rahmen der Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt gewinnen immer mehr an Bedeutung in der gegenwärtigen Forschung. In vorangegangenen Studien konnte bereits bewiesen werden, dass autoimmunologische Prozesse nach einem Myokardinfarkt gegen herzspezifische Antigene eine bedeutende Rolle spielen. Erst vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die alpha-Myosin Schwerekette eines der Hauptantigene nach einem Myokardinfarkt darstellt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer verstärkten herzspezifischen Autoimmunantwort auf die Heilungsphase des Myokards nach einem experimentellen Myokardinfarkt bei Mäusen zu untersuchen.

Um eine verstärkte herzspezifische Autoimmunantwort zu induzieren, wurden männliche Balb/c Wildtyp Mäuse 7 Tage vor einem experimentellen Myokardinfarkt mit dem kompletten Herzextrakt oder mit kardialem Myosin subkutan immunisiert. An Tag 6 nach dem Myokardinfarkt erfolgte eine Echokardiographie zur Beurteilung der linksventrikulären Pumpfunktion. Anschließend wurden an Tag 7 die Mäuse getötet und Folgendes entnommen: das Blut, das Herz und u.a. die mediastinalen Lymphknoten. Daraufhin wurde der herzspezifische Immunglobulin-Titer, die Infarktgröße, die Infiltration des Infarktgebietes und der mediastinalen Lymphknoten mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems und die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren sowie von Mediatoren der Heilungs- und Remodelingphase im Infarktgebiet bestimmt. Die Immunisierung sowohl mit dem Herzextrakt als auch mit Myosin induziert die Bildung von herzspezifischen Immunglobulinen. Dies konnte mittels eines ELISA und einer Immunofluoreszenzfärbung bewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Infarktgröße bei den mit Herzextrakt immunisierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ($73,56 \pm 8,66$ % vs. $36,53 \pm 7,55$ %; $p < 0,01$). Die mit Myosin immunisierten Tiere weisen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Zunahme der Infarktgröße auf. Außerdem konnte eine signifikant erhöhte Expression der Gene *MMP2*, *MMP9* und *Col1a1* im Infarktgebiet der mit Herzextrakt immunisierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden, was auf einen verstärkten und damit ungünstigen kardialen Remodeling-Prozess hindeutet.

Die Immunisierung von männlichen Balb/c Wildtyp Mäusen mit dem Herzextrakt führt zu einer Zunahme der Infarktgröße und verstärkt das ungünstige kardiale Remodeling. Die Immunisierung mit Myosin hat hingegen keinen nachteiligen Effekt auf die Heilungsphase nach einem Myokardinfarkt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die koronare Herzkrankheit als Ursache des Myokardinfarktes	1
1.2 Chronische Herzinsuffizienz durch Remodeling nach einem MI	1
1.3 Immunologische Prozesse im Infarktgebiet	2
1.4 Aktivierung des adaptierten Immunsystems und T-Zell vermittelte Immunantwort.....	3
2 Zielstellung	4
3 Material und Methoden.....	5
3.1 Versuchsaufbau.....	5
3.2 Tiere	6
3.3 Immunisierung	6
3.3.1 Titermax	6
3.3.2 Myosin.....	6
3.3.3 Herzextrakt.....	6
3.4 MI Operation	7
3.5 Echokardiographie.....	7
3.6 Organentnahmen.....	8
3.7 FACS-Analyse	9
3.8 ELISA	12
3.9 Histologie.....	12
3.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	12
3.9.2 Immunofluoreszenz-Färbung für Autoantikörper.....	13
3.10 Quantitative PCR	14
3.11 Statistik	15
4 Ergebnisteil	16
4.1 Validierung der Immunisierung	16
4.1.1 Myosin-ELISA.....	16
4.1.2 Immunofluoreszenz-Färbung.....	17
4.2 Echokardiographie.....	18
4.3 Infarktgröße	19
4.4 FACS Daten	21
4.4.1 Anzahl der gesamten Leukozyten in den mediastinalen Lymphknoten und im Infarktgebiet.....	21
4.4.2 Gating der Herzproben	22

4.4.2.1 Leukozyteninfiltration im Infarktgebiet	23
4.4.3 Gating der mediastinalen Lymphknoten	28
4.4.3.1 Leukozyteninfiltration in den herzdrainierenden Lymphknoten	28
4.5 qPCR	29
4.5.1 Pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Mediatoren.....	30
4.5.2 Mediatoren der Heilungs- und Remodelingphase nach einem MI	31
5 Diskussion.....	35
5.1 Immunisierung mit Herzextrakt.....	35
5.1.1 Die Immunisierung mit Herzextrakt induziert eine Autoimmunantwort	35
5.1.2 Infarktexpansion durch erhöhte Antikörperproduktion und Aktivität der Matrixmetalloproteasen	35
5.2 Immunisierung mit Myosin	37
5.2.1 Das kardiale Myosin induziert eine Autoimmunantwort.....	37
5.2.2 Myosin-spezifische T-Zell-Antwort nach einem MI	38
5.2.3 Protektiver Effekt der Myosin-spezifischen Immunantwort auf die Heilung des Myokards.....	40
6 Zusammenfassung.....	42
Literaturverzeichnis	43
7 Thesen	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 FACS-Antikörper der Herzproben	10
Tabelle 2 FACS-Antikörper der Lymphknotenproben	10
Tabelle 3 Taqman Sonden für die qPCR	15
Tabelle 4 Ergebnisse der Echokardiographie	19

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Versuchsaufbau.....	5
Abbildung 2 Linker Ventrikel in der Diastole	8
Abbildung 3 Linker Ventrikel in der Systole	8
Abbildung 4 HE-Färbung, 12 µm, Myo+MI	13
Abbildung 5 Analyseschema mit ZEN 2.3 lite	13
Abbildung 6 Myosin-spezifischer Ig-Titer	16
Abbildung 7 Myosin-spezifischer Ig-Titer an Tag 7 nach MI.....	17
Abbildung 8 Nachweis Myokard-spez. IgG- und IgM-Antikörper.....	18
Abbildung 9 Fraction Area Change nach MI	19
Abbildung 10 HE-Färbung, 12 µm, Tit+MI	20
Abbildung 11 HE-Färbung, 12 µm, Myo+MI.....	20
Abbildung 12 HE-Färbung, 12 µm, HE+MI	20
Abbildung 13 Infarktgröße in Prozent nach MI.....	20
Abbildung 14 Anzahl CD45 ⁺ -Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nach MI	21
Abbildung 15 Anzahl der CD45 ⁺ -Zellen im Infarktgebiet	22
Abbildung 16 FACS-Gating-Strategie der Herzproben	23
Abbildung 17 Anteil der kard. Monozyten an den Leukozyten nach MI	24
Abbildung 18 Absolute Zellzahl der kard. Monozyten an den Leukozyten nach MI	24
Abbildung 19 Anteil der kard. neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten nach MI	25
Abbildung 20 Absolute Zellzahl der kard. neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten nach MI	25
Abbildung 21 Anteil der kardialen T-Zellen an den Lymphozyten nach MI	26
Abbildung 22 Absolute Zellzahl der kard. T-Zellen an den Lymphozyten nach MI	26
Abbildung 23 Anteil der kardialen B-Zellen an den Lymphozyten nach MI.....	27
Abbildung 24 Absolute Zellzahl der kard. B-Zellen an den Lymphozyten nach MI	27
Abbildung 25 FACS-Gating-Strategie der Lymphknoten-Proben	28
Abbildung 26 Anteil der CD4 ⁺ T-Zellen an den vitalen Leukozyten nach MI.....	29
Abbildung 27 Anteil der Foxp3 ⁺ Zellen an den CD4 ⁺ T-Zellen nach MI	29
Abbildung 28 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Tnf</i> nach MI	30
Abbildung 29 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Il10</i> nach MI.....	30
Abbildung 30 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Mrc1</i> nach MI.....	31
Abbildung 31 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Col1a1</i> nach MI	31
Abbildung 32 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Mmp2</i> nach MI.....	32
Abbildung 33 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Mmp9</i> nach MI.....	32
Abbildung 34 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Vwf</i> nach MI.....	33
Abbildung 35 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Vim</i> nach MI.....	33
Abbildung 36 mRNA-Expressionslevel des Gens <i>Acta2</i> nach MI.....	34

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
abs.	absolut
ACE	angiotensin converting enzyme
Acta 2	alpha acta 2
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNS
CO	Kohlenstoffmonoxid
Col1a1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
EDA	endiastolic area
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESA	endsystolic area
EZM	Extrazellularmatrix
FAC	fractional area change
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS-A	forward scatter area
Foxp3	forkhead-box-protein p3
FSC-H	forward scatter height
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gran.	Granulozyten

HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	Herzextrakt
HRP	horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kard.	kardial
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior descending artery
LK	Lymphknoten
med. LK	mediastinale Lymphknoten
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHC II	Major Histocompatibility Complex II Molekül
MI	Myokardinfarkt
min.	Minute
mind.	mindestens
MMP	Matrixmetalloprotease
Mono.	Monozyten
Mrc1	Mannose-Rezeptor C-Typ 1
Myo	Myosin
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PDGF	platelet-derived growth factor
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.c.	subcutan
SEM	standard error of the mean
SPF	specific-pathogen-free
SSC-A	side scatter area
tgl.	täglich
Tit	Titermax
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	T-Regulatorzelle
u.a.	unter anderem
Vgl.	Vergleich
Vim	Vimentin
vol.	Volumen
vs.	versus
Vwf	von-Willebrand-Faktor
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die koronare Herzkrankheit als Ursache des Myokardinfarktes

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Im Jahr 2016 machten sie ca. 30% der Todesfälle aus, wovon 85 % durch einen Myokardinfarkt (MI) oder Schlaganfall bedingt waren (Cardiovascular diseases (CVDs)). Die Koronare Herzkrankheit (KHK) zählt zu den kardiovaskulären Erkrankungen und ist durch die Manifestation der Arteriosklerose in den Koronararterien definiert (Herold 2015, S. 237). Der akute MI beginnt mit einem thrombotischen Verschluss einer Koronararterie, entwickelt sich über mehrere Stunden und endet schließlich, wenn die Nekrose des Myokards ihre größte Ausbreitung erreicht hat (Ertl und Frantz 2005b). Die Ausdehnung des Infarktes ist davon abhängig, wie groß das Versorgungsgebiet der verschlossenen Koronararterie ist und ob es einen Kollateralkreislauf gibt (Ertl und Frantz 2005b). Medizinische Fortschritte in der Akutbehandlung von MI haben die Mortalität gesenkt und das Outcome der Patienten verbessert (Dargie 2005). Die zeitnahe Reperfusion des verschlossenen Gefäßes ist heutzutage Standardtherapie (Frantz et al. 2009). Zudem erhalten die Patienten anschließend eine medikamentöse kardioprotektive Therapie bestehend aus β -Blockern, ACE-Hemmern, Thrombozytenaggregationshemmern und Statinen (Herold 2015, S. 259f.). Dennoch ist die Prognose bei den MI-Patienten schlecht (Krum und Teerlink 2011).

1.2 Chronische Herzinsuffizienz durch Remodeling nach einem MI

Menschliche adulte Herzen haben generell ein schlechtes Potential zur Regenerierung nach einem MI (Keppner et al. 2018). Das zugrunde gegangene vitale Myokard wird anschließend weitgehend durch eine kollagene Narbe ersetzt (Keppner et al. 2018). Wird die Reperfusion der verschlossenen Koronararterie zu spät durchgeführt, kann sich ein großer transmuraler Infarkt entwickeln (Ertl und Frantz 2005b). Obwohl die Patienten eine angemessene Behandlung nach einem MI erhalten, kommt es bei vielen MI-Überlebenden zum pathologischen Remodeling-Prozess des Ventrikels (O'Donohoe et al. 2016). Die Standard-Therapie heutzutage versucht, das ungünstige kardiale Remodeling zu verhindern, indem man die Vor- und Nachlast des Herzens reduziert (Ertl und Frantz 2005b). Dennoch bleibt die Prognose bei Patienten mit großen Infarkten und ausgeprägter linksventrikulärer Dysfunktion ernst (Pfeffer et al. 2003). Ein entscheidender Faktor für das kardiale Remodeling nach einem MI ist die Infarktgröße (McKay et al. 1986). Große Infarkte induzieren den Remodeling-Prozess des Myokards, was große morphologische, histologische und molekulare Veränderungen der Infarktzone und des umliegenden vitalen Myokards mit sich bringt

(Pfeffer et al. 1991). Das ungünstige kardiale Remodeling nach einem MI führt zu einer Dilatation des Ventrikels und begünstigt die Entstehung einer progredienten Herzinsuffizienz (Gaudron et al. 1993). Somit ist das ungünstige kardiale Remodeling ein starkes prognostisches Kriterium und steht in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Arrhythmien und dem plötzlichen Herztod (Gaudron et al. 2001). Heilt das Infarktgebiet jedoch ohne eine Expansion auf das umliegende Myokard, bleibt die ursprüngliche Form des Herzens bestehen und die Prognose des Patienten ist gut (Ertl und Frantz 2005b).

1.3 Immunologische Prozesse im Infarktgebiet

Immunologische Prozesse haben einen großen Einfluss auf die Entzündungs-, Heilungs- und Remodelingphase nach einem MI (Keppner et al. 2018). Die Heilung ist ein komplexer Prozess, bestehend aus der Invasion, Transformation und Apoptose verschiedener Zelltypen (Ertl und Frantz 2005a). In der frühen Phase des Heilungsprozesses dominiert die Entzündungsphase, welche den Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren beinhaltet (Frantz et al. 2009). Darauf folgt der Wiederaufbau, der durch die Zunahme der Matrixsynthese, der Proliferation von Fibroblasten und die Bildung einer Narbe charakterisiert ist (Frantz et al. 2009).

Nach einem MI wird das angeborene Immunsystem durch die Verletzung des Myokards aktiviert (Blankesteyn et al. 2001; Taqueti et al. 2006) und es kommt zur Infiltration des Infarktgebietes mit pro-inflammatorisch differenzierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Ertl und Frantz 2005a; Nahrendorf et al. 2010). Diese induzieren inflammatorische Prozesse und fördern den Abbau von Zellresten (Frantz et al. 2009) sowie der EZM (Nahrendorf et al. 2010) über die Synthese von Matrixmetalloproteasen (MMP) (Ertl und Frantz 2005a). Somit entsteht eine sterile Entzündung im Infarktgebiet (Yan et al. 2013). Die Dauer und das Ausmaß der Entzündungsphase hat einen bedeutenden Einfluss auf die Infarktgröße und das ventrikuläre Remodeling (Henson 2005).

Nach ca. einer Woche klingt die Entzündungsphase ab und die Heilungsphase beginnt (Sattler und Kennedy-Lydon 2017, S. 227). Während der Heilungsphase überwiegen die anti-inflammatorisch differenzierten Makrophagen (Nahrendorf et al. 2007). Sie induzieren die Heilung des Myokards u.a. durch die Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten (Harel-Adar et al. 2011) und die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL-) 10 (Yan et al. 2013). Außerdem vermitteln die anti-inflammatorisch differenzierten Makrophagen die Heilung über die

Akkumulation von Myofibroblasten, die Angiogenese und die Ablagerung von Kollagen im Infarktgebiet (Nahrendorf et al. 2007). Die Myofibroblasten sind an dem Aufbau eines neuen Kollagennetzwerkes beteiligt (Ertl und Frantz 2005a). Um eine Ventrikelruptur zu verhindern, ist die Formation einer stabilen Narbe essentiell (Sattler und Kennedy-Lydon 2017, S. 227). Wohingegen eine exzessive Fibrose und das ungünstige kardiale Remodeling die Kontraktilität des Myokards beeinträchtigen und letztendlich zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen (Frangogiannis 2015).

1.4 Aktivierung des adaptierten Immunsystems und T-Zell vermittelte Immunantwort

In der Vergangenheit konnte bereits nachgewiesen werden, dass Bestandteile des Myokards eine Autoimmunreaktion triggern können (Scheerder et al. 1991; Störk et al. 2006; Kaya et al. 2010; Lindahl et al. 2010; O'Donohoe et al. 2016; Rieckmann et al. 2019). Nach einem MI werden die herzspezifischen Antigene von zugrunde gegangenen Kardiomyozyten freigesetzt und in den herzdrainierenden Lymphknoten (LK) gegenüber den CD4⁺ T-Zellen präsentiert (Hofmann et al. 2012). CD4⁺ T-Zellen erkennen ihre Antigene auf Major Histocompatibility Complex II Molekülen (MHC II), welche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert werden. (Sattler und Kennedy-Lydon 2017, S. 235). Neben der Antigenerkennung ist auch eine Kostimulation erforderlich, um die T-Zelle zu aktivieren (Hofmann und Frantz 2016). Die aktivierten T-Zellen proliferieren in den herzdrainierenden LK und infiltrieren daraufhin einige Tage nach dem MI das Infarktgebiet (Hofmann et al. 2012). CD4⁺ T-Zellen tragen zur Auflösung der Entzündungsphase im Infarktgebiet bei und fördern die Heilung des Myokards (Hofmann und Frantz 2016). Insbesondere Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen (=T-Regulatorzelle=Treg) fördern die Bildung einer stabilen Narbe (Weirather et al. 2014).

Nicht nur T-Zellen, sondern auch autoreaktive B-Zellen werden durch das Erkennen von herzspezifischen Autoantigenen nach einem MI aktiviert (Zougari et al. 2013; O'Donohoe et al. 2016; Keppner et al. 2018). Eine Kostimulation der B-Zellen durch spezifische T-Zellen gegen dasselbe Antigen ist für eine Immunglobulin (Ig) Produktion notwendig (Parker 1993). Die aktivierten B-Zellen sezernieren nun Igs, die gegen Bestandteile des Myokards gerichtet sind (O'Donohoe et al. 2016).

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer verstärkten herzspezifischen Autoimmunantwort auf die Heilungsphase des Myokards nach einem experimentellen Myokardinfarkt bei Mäusen darzustellen. Dafür soll genauer untersucht werden, ob die Immunisierung mit dem kardialen Myosin oder dem kompletten Herzextrakt eine Woche vor einem experimentellen Myokardinfarkt

1. eine verstärkte herzspezifische Autoimmunantwort bei den Mäusen triggert
2. Einfluss auf die linksventrikuläre Pumpfunktion nach dem Myokardinfarkt hat
3. Einfluss auf die Infiltration des Infarktgebietes mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine Woche nach dem Myokardinfarkt hat
4. die Infarktgröße und das kardiale Remodeling beeinflusst

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Die Funktion der Myosin-spezifischen T-Helfer-Zellen während der Entzündungs- und Heilungsphase nach einem MI ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Da vermutet wird, dass das freigewordene Myosin aus dem ischämischen Myokard nach einem MI eine T-Zell-spezifische Autoimmunantwort hervorruft, wurden männliche Balb/c Wildtyp (Wt) Mäuse zunächst mit Myosin immunisiert, um bereits vor der MI-Operation eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion zu triggern. Ergänzend wurde einer Versuchsgruppe auch das vollständige Herzextrakt (HE) der gleichen Mauslinie injiziert. Die unten stehende Abbildung verdeutlicht den Versuchsaufbau und dessen zeitlichen Ablauf (Abbildung 1 Versuchsaufbau)

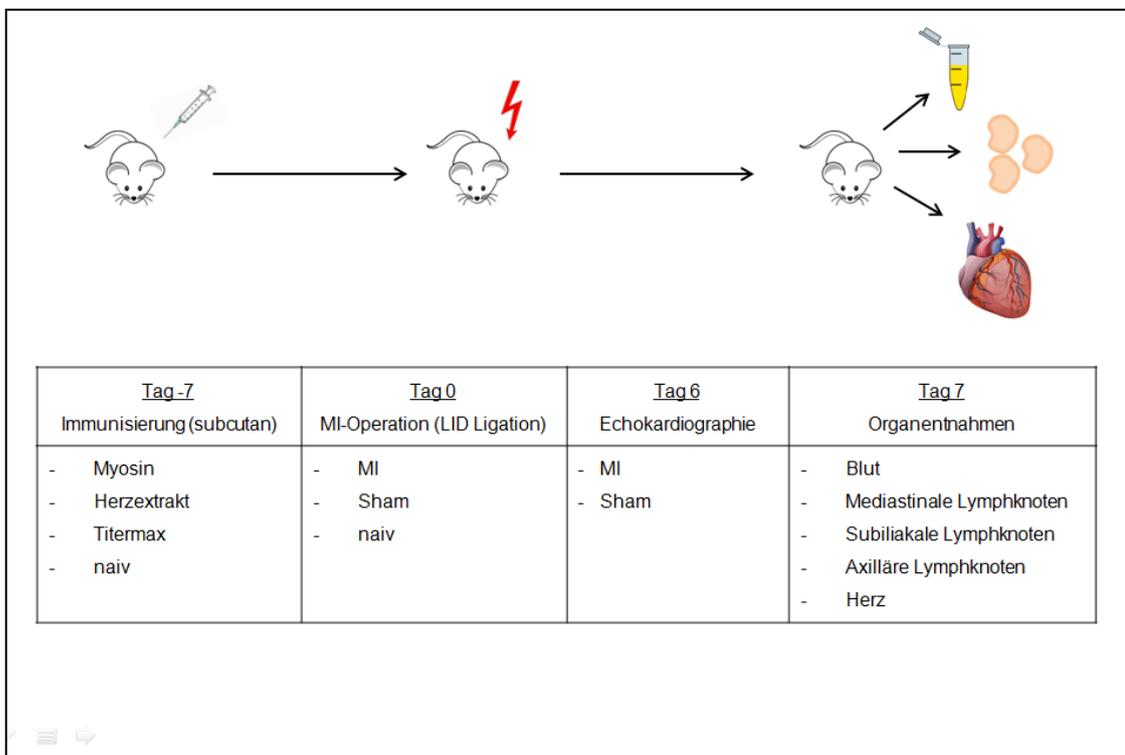


Abbildung 1 Versuchsaufbau

Die Mäuse wurden drei verschiedenen Gruppen zugeordnet. An Tag -7 wurde Gruppe 1 das Adjuvant Titermax Gold injiziert, Gruppe 2 wurde mit Myosin immunisiert und Gruppe 3 wurde das HE injiziert. Gruppe 4 erhielt keine Injektion.

Nach einer Woche (Tag 0) wurden die Mäuse erneut in drei verschiedene Gruppen eingeteilt, je nachdem, welche Art von Operation sie erhielten. Einen MI erhielten sowohl Myosin- und HE-immunisierte Mäuse (Myosin- und HE-Gruppe), als auch Tiere,

die nur Titermax Gold (Titermax-Kontrollgruppe) injiziert bekommen hatten. Sham-operiert wurden nur Mäuse, die entweder mit Myosin oder Titermax Gold immunisiert wurden (Sham-Myosin- und Sham-Titermax-Gruppe). Eine geringe Anzahl der Myosin-immunisierten Mäuse wurde keiner Operation unterzogen. An Tag 7 nach der MI-Operation wurden alle Mäuse mittels Genickbruch getötet und Folgendes entnommen: das Herz, mediastinale, subiliakale und axilläre LK, sowie das Blut und wurde für die weiteren Experimente aufbewahrt.

3.2 Tiere

Es wurden ausschließlich männliche Balb/c Wt Mäuse im Alter von 6 bis 12 Wochen von Charles River für die Experimente verwendet. Die Tiere wurden unter speziellen pathogen-armen Bedingungen (SPF) und einem geregelten Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten eine Standard-Diät. Alle Tiere hatten den gleichen genetischen Hintergrund.

3.3 Immunisierung

3.3.1 Titermax

Die Titermax-Injektion diente als Kontrolle, um ausschließen zu können, dass die alleinige Gabe von Titermax Gold (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) vor der MI-Operation bereits eine Immunantwort triggert. Pro Maus wurden 100 µl Titermax Gold in PBS 1:1 v/v (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} , Merck, Darmstadt, Deutschland in 1l Milli-Q-Wasser, pH 7,4) s.c. injiziert.

3.3.2 Myosin

Zunächst wurde die Myosin-Stammlösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in sterilem PBS 1:3 v/v verdünnt und anschließend wurden den Mäusen 200 µg Myosin pro Tier in Titermax Gold 1:1 v/v s.c. injiziert.

3.3.3 Herzextrakt

Zur Herstellung des HE wurden zunächst Balb/c Wt Mäuse einem MI unterzogen und an Tag 3 nach der Operation wurden die Herzen entnommen. Die entnommenen Herzen wurden zunächst in Milli-Q-Wasser 1:10 w/v mit dem Dispergiergerät T 10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde die physiologische Osmolarität wieder hergestellt, indem eine 0,9 % NaCl-Lösung hinzugefügt wurde. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte anhand der Anleitung des BCA Assay Kit (Pierce, Darmstadt, Deutschland). Es wurde 1 mg pro Tier HE verdünnt in Titermax Gold 1:1 v/v s.c. injiziert.

3.4 MI Operation

An Tag 0 wurden die Versuchstiere der MI Operation unterzogen. Hierfür wurde die Narkose durch Isofluran-Inhalation (ca. 4,0 vol. %) und unter Opioid-Analgesie eingeleitet. Sobald die Narkose eingetreten war, erfolgten die Intubation und eine kontrollierte Beatmung mittels eines Beatmungsgerätes. Um die Augen der Mäuse vor dem Austrocknen zu schützen, wurde Bepanthen-Augensalbe hineingegeben. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels 2,0 bis 2,3 vol. % Isofluran. Gelagert wurden die Mäuse auf einer temperaturregulierten Arbeitsplatte (39° C) und zum Messen der Körperkerntemperatur wurde eine Rektalsonde verwendet. Die Operation wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Thorakotomie mit anschließender permanenter Ligatur der linken Herzkranzarterie (LAD). Verschlossen wurde der Thorax schichtweise mittels chirurgischer Nähte und anschließend erfolgte die Extubation, nachdem die Spontanatmung wieder eingesetzt hatte. Zur Analgesie wurde den Tieren regelmäßig ein hochpotentes und gleichzeitig lang wirksames Opioid-Analgetikum (Buprenorphin 0,1 mg/kg, s.c. mind. 2 x tgl.) unmittelbar vor der Operation und bis drei Tage postoperativ injiziert.

Die Sham-Operation erfolgte nach dem selben Protokoll, nur dass die LAD nicht ligiert wurde.

3.5 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde an Tag 6 mit dem Gerät Vevo 1100 (VisualSonics, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Narkose mittels Isofluran-Inhalation (ca. 4,0 vol. %). Nun konnte die Maus auf der vorgewärmten Platte (39° C) in Rückenlage mit der Schnauze in der Isofloranmaske positioniert werden. Das Isofluran wurde auf 0,5 bis 1 vol. % angepasst, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Nun wurden die Pfoten mit Leitgel benetzt und mit Klebestreifen auf den Elektrodenflächen der Platte fixiert, um ein EKG ableiten zu können. Währenddessen wurde das Ultraschallgel auf 35° C aufgewärmt und nach dem Rasieren des Thorax aufgetragen. Die durchschnittliche Dauer der Echoaufnahmen betrug ca. 10 Minuten. Die Körperkerntemperatur wurde auch hier überwacht und bei einem Abfall unter 36° C mittels einer Rotlichtlampe erhöht. Die Daten wurden mit der Analysesoftware Vevo LAB 1.7.1 am Computer ausgewertet (Abbildung 2, Abbildung 3).

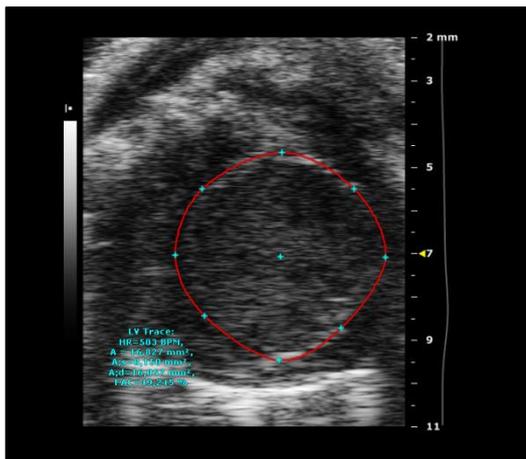


Abbildung 2 Linker Ventrikel in der Diastole

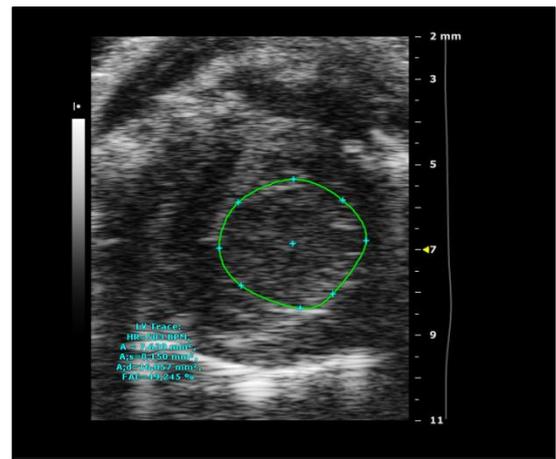


Abbildung 3 Linker Ventrikel in der Systole

3.6 Organentnahmen

Die Tiere wurden mittels Genickbruch getötet und anschließend der Thorax eröffnet. Zunächst wurde das rechte Atrium mithilfe eines Schnittes geöffnet, um das kardiale Blut mit einer Spritze besser entnehmen zu können. Das Blut wurde in ein Eppendorf Röhrchen gefüllt, welches anschließend für 10 Minuten, 5000 x g zentrifugiert wurde. Das Serum wurde aspiriert und in einem Röhrchen bei -80° C aufbewahrt.

Als nächstes erfolgte die Perfusion des Herzens mit PBS für 2-3 Minuten, bevor es aus dem Thorax entnommen wurde. Das Herz wurde in der Mitte der Infarkt Narbe mit einer Schere halbiert. Die Herzbasis wurde sofort mit PolyFreeze Tissue Freezing Medium (Polysciences, Inc, Hirschberg an der Bergstraße, Deutschland) bedeckt und bei -80° C eingefroren, um später Kryoschnitte des Gewebes anfertigen zu können. Der übrige Teil der Infarkt Narbe des Herzapex wurde in drei weitere Teile zerschnitten. Das erste diente der FACS-Analyse und wurde in ein Falcon Tube, welches mit HBSS/BSA (Hank's balanced Salt Solution, Merck, Darmstadt, Deutschland angereichert mit 1 % BSA Albumin Fraktion V w/v, proteasefrei, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefüllt war, transferiert und bei 4° C gelagert. Ein weiteres Stück der Infarkt Narbe inkubierte für 24 Stunden, 4° C in RNA^{later} (RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Hilden, Deutschland) und wurde anschließend ebenso bei -80° C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde es zur Bestimmung des mRNA-Expressionslevels verschiedener Gene aufbereitet.

Zuletzt erfolgte die Entnahme der mediastinalen, subiliakalen und axillären LK und diese wurden ebenfalls in Falcon Tubes transferiert, welche HBSS/BSA enthielten. Bis zur Weiterverarbeitung lagerten sie bei 4° C.

3.7 FACS-Analyse

Die entnommenen LK sowie ein Stück der Infarkt Narbe wurden noch am selben Tag der Organentnahmen für die FACS-Analyse aufbereitet. Zunächst inkubierte das Herzgewebe im Wasserbad für 35 Minuten, 37° C in 3000 IU Kollagenase Typ II (Worthington, Troisdorf, Deutschland) pro Herz gelöst in RPMI w/v (VLE RPMI 1640 Medium, Merck, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurden die Gewebestücke in einem 70 µm Filter (MACS® SmartStrainers, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zermahlen und durch das Hinzugeben von HBSS/BSA auf den Filter konnten die freigewordenen Zellen in einem neuen Falcon Tube aufgefangen werden. Das Volumen wurde bis auf 5 ml ergänzt. Die mediastinalen, subiliakalen und axillären LK wurden in einem 30 µm Filter (MACS® SmartStrainers, MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zermahlen. Die subiliakalen und axillären LK wurden in einem Falcon Tube zusammengefügt und als drainierende LK bezeichnet.

Im Anschluss wurden die Falcon Tubes zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4° C) und der Überstand aspiriert. Das Zellpellet wurde in FACS Puffer (1 % BSA; 0,1 % Natrium Azid, Merck, Darmstadt, Deutschland; 1 mM EDTA, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland verdünnt in PBS w/v) gelöst. Zu jeder Herzprobe und jedem mediastinalen LK (med. LK) wurden 200 µl des FACS-Puffers hinzugefügt und die subiliakalen und axillären LK wurden in 1000 µl FACS-Puffer gelöst, da hier eine deutlich höhere Zellzahl zu erwarten war. Nun konnten die Zellen auf eine 96 Well Platte (Mikrotestplatte 96 Well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die FACS-Färbung transferiert werden.

Zunächst wurden 10 µl/Well von jeder Probe auf eine Mikrotestplatte pipettiert und der CD45 Rezeptor gefärbt (Tabelle 1), um die Zellzahl der Leukozyten bestimmen zu können. Die 123count eBeads™ Counting Beads (eBioscience, Darmstadt, Deutschland) wurden in einer Verdünnung von 1:10 v/v zu jedem Well hinzugefügt. Anhand der 123count eBeads™ Counting Beads konnte in der nachfolgenden FACS-Analyse die Zellzahl jeder Probe berechnet werden.

Auf eine zweite Mikrotestplatte wurden 150 µl/Well von jeder Herzprobe und 100 µl/Well von jedem med. sowie den drainierenden LK transferiert. Anschließend wurde die Platte für 3 Minuten, 400 x g, 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun konnten 25 µl/Well einer Blockierungslösung hinzugefügt werden, die den Antikörper mAb gegen den Fc-Rezeptor CD 16/32 (Tabelle 1) enthielt. Der Antikörper wurde in FACS Puffer 1:500 v/v verdünnt. Die Platte inkubierte für 15 Minuten, 4°C. In der

Zwischenzeit konnte die Antikörperlösung (Tabelle 1) für die Färbung der Oberflächenrezeptoren vorbereitet werden.

Tabelle 1 FACS-Antikörper der Herzproben

Rezeptor	Fluorophor	Hersteller	Wirt	Klon	Verdünnung
mAb against Fc- Rezeptor CD16/32	-	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland	Ratte	2.4G2	1:500
CD45	Buv 395	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland	Ratte	30-F11	1:100
CD11b	PE	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	m1/70	1:200
Ly6G	APC/Cy7	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	1A8	1:300
CD206	A488	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	C068C2	1:200
TCR β	PE/Cy7	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Hamster	H57-597	1:200
B220	APC	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	RA3-6B2	1:200
CD4	Brillant Violet 421	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	rm4-5	1:200

Die Antikörperlösung für die Lymphknotenproben (Tabelle 2) enthielt ausschließlich Antikörper gegen T-Zell-spezifische Marker.

Tabelle 2 FACS-Antikörper der Lymphknotenproben

Rezeptor	Fluorophor	Hersteller	Wirt	Klon	Verdünnung
mAb against Fc- Rezeptor CD16/32	-	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland	Ratte	2.4G2	1:500
CD4	BrillantViolet 421	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	rm4-5	1:200
TCR β	PE/Cy7	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Hamster	H57-597	1:200
CD62L	A488	BioLegend [®] , Koblenz, Deutschland	Ratte	MEL-14	1:200

CD44	APC fire 750	BioLegend®, Koblenz, Deutschland	Ratte	IM7	1:200
CD25	PE	BioLegend®, Koblenz, Deutschland	Ratte	PC61	1:200
Foxp3	A660	ThermoFisher Scientific, Darmstadt, Deutschland	Ratte	FJK16s	1:50

Beide Antikörperlösungen wurden in 25 µl/Well FACS-Puffer v/v verdünnt. Dieser wurde zu jeder Probe direkt im Anschluss an die 15 Minuten Inkubationszeit hinzugefügt. Die Platte inkubierte erneut für 15 Minuten, 4° C und wurde anschließend zentrifugiert (3 min, 400 x g, 4° C). Der Überstand wurde verworfen.

Da Foxp3 ein intrazellulärer Marker ist, war ein weiterer Schritt für die Färbung notwendig. Zu allen Proben wurden zunächst 100 µl/Well von dem Fixation/Permeabilization Buffer (True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set, BioLegend®, Koblenz, Deutschland, Verdünnung 1:4 v/v) hinzugefügt, um die Zellen zu fixieren. Die Platte inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nun wurden die Proben mittels Permeabilization Buffer (100 µl/Well; True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set, BioLegend®, Koblenz, Deutschland, Verdünnung in Milli-Q-Wasser 1:10 v/v) gewaschen und anschließend zentrifugiert (3 min, 400 x g, 4° C). In der Zwischenzeit konnte die Foxp3-Antikörperlösung, verdünnt in Permeabilization Buffer 1:50 v/v, vorbereitet werden.

Der Überstand wurde verworfen und 25 µl/Well der Foxp3-Antikörperlösung zu jeder Lymphknotenprobe hinzugefügt. Die Herzproben wurden nur in FACS-Puffer resuspendiert. Erneut inkubierte die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Abschließend wurden die Proben erneut mit Permeabilization Buffer (100 µl/Well) gewaschen und zentrifugiert (3 min, 400 x g, 4° C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 µl/Well FACS-Puffer gelöst. Nun war die Platte bereit für die anschließende FACS-Analyse mit dem Gerät BD Fortessa (BD Bioscience Heidelberg, Deutschland).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo™ Single Cell Analysis Software v10.

3.8 ELISA

Um den Myosin-Antikörper-Titer zu bestimmen, wurde ein Myosin-ELISA angewandt. Die high binding 96 Well Platte (flacher Boden, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) inkubierte zunächst mit 2 µg/100 µl Myosin, verdünnt in Carbonat Puffer v/v (3,03 g Na²CO₃, Merck, Darmstadt, Deutschland; 6,0 g NaHCO₃, Merck, Darmstadt, Deutschland in Milli-Q-Wasser w/v, pH 9,6) bei 4° C über Nacht. Hierfür wurden 100 µl/Well der hergestellten Lösung hinzugefügt und die Platte daraufhin abgedeckt. Am nächsten Tag wurde die Platte 5 x mit PBS-T (0,05 % Tween 20, Sigma-Aldrich, München, Deutschland in 1 x PBS v/v; 200 µl/Well) gewaschen (HydroFlex™ microplate washer for 96-well format, TECAN, Crailsheim, Deutschland) und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 2 % not-fat dry milk (Cell Signaling Technology®, Frankfurt am Main, Deutschland) in PBS-T w/v (200 µl/Well) geblockt.

Im Anschluss wurde die Blockierungslösung verworfen und die Verdünnungsreihe der einzelnen Sera wie folgt pipettiert: 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 und 1:6400. Die Sera wurden mit 2 % not-fat dry milk in PBS-T w/v (100 µl/Well) verdünnt. Die Platte inkubierte für eine Stunde bei 37° C.

Anschließend folgten erneut fünf Waschschriffe mit PBS-T (200 µl/Well). Nun wurden 100 µl/Well des zweiten Antikörpers (goat anti-mouse IgG, IgM, IgA; Verdünnung 1:10000; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verdünnt in 2 % not-fat dry milk in PBS-T v/v hinzugegeben. Die Platte inkubierte für eine Stunde bei 37° C.

Ein weiterer Waschschriff folgte (7 x mit 200 µl/Well PBS-T). Letztendlich inkubierte die Platte mit HRP substrate solution (100 µl/Well; BioLegend®, Koblenz, Deutschland) für ca. 20 bis 30 Minuten im Dunkeln. Die Inkubationszeit kann je nach der Intensität der Farbentwicklung variieren. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen der ZN sulphuric stop solution (100 µl/Well; BioLegend®, Koblenz, Deutschland) gestoppt. Nun wurde die Absorption bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Spectra Fluor Fluorescence and Absorbance Instrument, Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Für jede Serumverdünnung wurde die optische Dichte bestimmt und die einzelnen Werte für jedes Tier addiert. Die Summe ergab den Myosin-Antikörper-Titer.

3.9 Histologie

3.9.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst wurden die Herzen mittels des Leica CM1850 Kryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) in 12 µm dicke Kryoschnitte geschnitten und auf einen

Objektträger (Objektträger Super Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Nach 24 Stunden Trocknen bei Raumluft erfolgte die Färbung der Kryoschnitte, um die Infarktgröße bestimmen zu können. Die HE-Färbung wurde nach folgendem Protokoll angewandt: Hämatoxylin sauer nach Mayer (10 min, Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland); Entfärbung unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten, 2 x Eintauchen in dH₂O; Eosin (5 min, 1 % wässrig, Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland); 2 x Eintauchen in dH₂O; 2 x Eintauchen in Ethanol 96 % (vergällt, Roth, Karlsruhe, Deutschland); 2 x Eintauchen in Ethanol 96 %; Xylol (Isomere, Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt in Ethanol 1:1 v/v für 5 Minuten; Xylol (5 min.); Roti-Histol (5 min, Roth, Karlsruhe, Deutschland); Roti-Histol (5 min.) Anschließend wurde ein Tropfen Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf den Schnitt hinzugegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden eingescannt (Abbildung 4) und die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte eigenhändig mit dem Programm ZEN 2.3 lite (Abbildung 5).

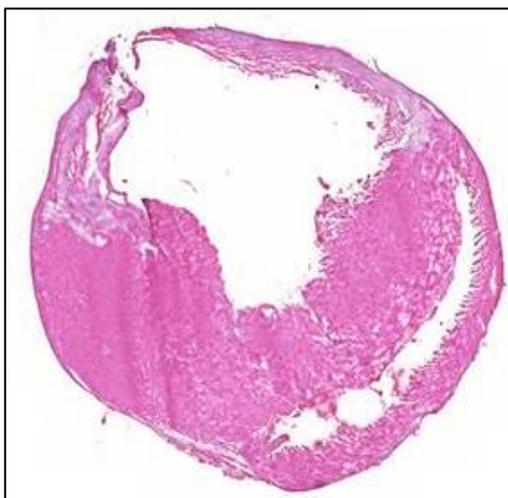


Abbildung 4 HE-Färbung, 12 µm, Myo+MI

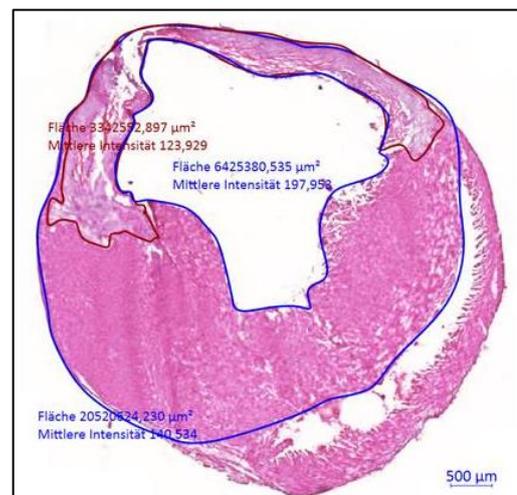


Abbildung 5 Analyseschema mit ZEN 2.3 lite

3.9.2 Immunofluoreszenz-Färbung für Autoantikörper

Zunächst wurden 12 µm Herzgewebeschnitte der AID^{-/-}/µS^{-/-}-Linie (aus eigener Zucht) aufgetaut und für 15 Minuten luftgetrocknet. Anschließend inkubierten sie für 10 Minuten in Azeton (99,5 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und wurden dann für 3 x 5 Minuten in PBS-T (0,05 % v/v) gewaschen. Die Blockierung der Schnitte erfolgte mit 50 µl pro Schnitt Blockierungslösung (Carbo-Free Blocking Solution 10 x Concentrate, Vector Laboratories, Inc. Bulingame, Eching, Deutschland) verdünnt in 1 x PBS-T 1:10

v/v) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Nach der Blockierung wurden die Schnitte erneut für 3 x 5 Minuten in PBS-T gewaschen.

Nun wurden die Herzgewebeschnitte mit den Sera der HE-immunisierten Mäuse inkubiert. Das Serum wurde in Blockierungspuffer 1:5 v/v verdünnt und 50 µl der Serumverdünnung auf einen Herzgewebeschnitt hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die Schnitte wurden anschließend für 3 x 5 Minuten in PBS-T gewaschen.

Als zweite Antikörper wurden ein goat anti-mouse IgG Antikörper (Alexa Fluor 488, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und ein goat anti-mouse IgM Antikörper (Alexa Fluor 555, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Diese wurden in Blockierungspuffer 1:200 v/v verdünnt und 50 µl pro Schnitt aufpipettiert. Die Schnitte inkubierten für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer. Nach 25 Minuten Inkubationszeit wurden zu jeder Probe noch 5 µl Hoechst 33342 (DAPI, in PBS 1:1000 v/v, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Abschließend wurden die Schnitte für 3 x 5 Minuten in PBS-T gewaschen und mit Entellan bedeckt. Nun konnten die Herzgewebeschnitte mit dem Axioskop 2 plus (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mikroskopiert werden.

3.10 Quantitative PCR

Für die gesamte Versuchsreihe wurde das TaqMan™ Probe System (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) für die qPCR verwendet. Diese Methode sollte Aufschluss über die mRNA-Expressionslevel verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Gene (*Tnfa*, *Il-10*, *Mrc1*), sowie über Gene, die für den Matrixumbau und die Angiogenese verantwortlich sind (*Mmp2*, *Mmp9*, *Col1a1*, *Vim*, *Acta2* und *Vwf*), geben (Tabelle 3).

Die RNA-Isolierung aus dem Infarktgewebe des Herzens erfolgte nach Anleitung des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde die cDNA aus 300 ng RNA mithilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio Rad Laboratories, München, Deutschland) synthetisiert. Die Proben wurden in Triplikaten auf eine 96-Well PCR-Platte (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) pipettiert. Die Zusammensetzung pro Well lautet wie folgt: 12,5 µl TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland); 1,25 µl ABI Sondemix (Tabelle 3); 6,25 µl Nuclease-free Water (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 5 µl der Probe. Anschließend wurde die Platte abgedeckt und für 3 Minuten, 400 x g, 4° C

zentrifugiert. Nun konnte die qPCR durchgeführt werden. Der Treshold wurde auf 0,1 festgelegt.

Tabelle 3 TaqMan™ Sonden für die qPCR

TaqMan™ Sonde	Katalognummer	Hersteller
Gapdh	Mm 99999915	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Tnfa	Mm99999068_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Il-10	Mm00439614_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mrc1	Mm00485148_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mmp2	Mm00439498_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Mmp9	Mm00442991_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Col1a1	Mm00801666_g1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Vwf	Mm00550376_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Acta2	Mm00725412_s1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Vim	Mm01333430_m1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

3.11 Statistik

Die Graphen repräsentieren den Mean \pm SEM der Titermax-Kontrollgruppe, der Myosin-Gruppe und der HE-Gruppe von n Tieren. Die genaue Anzahl der Tiere wird für jede Abbildung separat angegeben. Zur Erstellung der Graphen wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet und als statistischer Test das one-way ANOVA und der Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert einen p-Wert $<0,05$ und ** markiert einen p-Wert von $<0,01$ und geben somit eine Signifikanz an.

4 Ergebnisteil

4.1 Validierung der Immunisierung

4.1.1 Myosin-ELISA

Eine Zunahme des Myosin-spezifischen Ig-Titers im Myosin-ELISA bestätigte eine erfolgreiche Immunisierung mit dem Antigen Myosin. Ausschließlich Mäuse, dessen Ig-Titer oberhalb des errechneten Wertes des Median $- 2 \times$ Standardabweichung lagen, zeigten nach unserer Definition eine positive Immunantwort auf die Immunisierung mit Myosin und wurden in die weiteren Analysen der Gewebeproben mit einbezogen. Mäuse mit einem Titer unterhalb des berechneten Wertes wurden als Impfversager definiert und von der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen. Die Werte dieser Tiere werden in den folgenden Graphen nicht gezeigt.

Um zu beweisen, dass die alleinige Immunisierung mit Myosin ohne anschließenden MI bereits eine Myosin-spezifische Immunantwort triggert, wurden Balb/c Wt Mäuse nach dem beschriebenen Immunisierungsprotokoll mit Myosin immunisiert. Diese Tiere erhielten allerdings keine MI- oder Sham-Operation an Tag 0. Die Organentnahmen fanden ebenfalls an Tag 7 (14 Tage nach der Immunisierung) statt. Der Myosin-ELISA zeigte einen Myosin-spezifischen Ig-Titer Anstieg um das 15-fache der Myosin-immunisierten Mäuse im Vergleich zu naiven Balb/c Wt Mäusen (Abbildung 6).

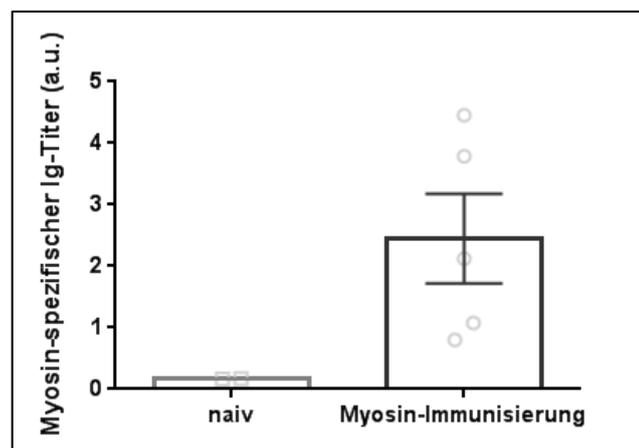


Abbildung 6 Myosin-spezifischer Ig-Titer an Tag 7 ohne MI: $n=2$ naiv und 5 mit Myosin-Immunsierung; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM

Abbildung 7 zeigt den Myosin-spezifischen Ig-Titer nach der Myosin-Immunsierung und anschließender Operation an Tag 0. Bei den Sham-operierten Tieren gibt es keinen Unterschied des Ig-Titers zwischen der Sham-Myosin- und Sham-Titermax-

Gruppe ($0,32 \pm 0,15$ vs. $0,34 \pm 0,01$). Vergleicht man die Tiere, welche einem MI unterzogen wurden, sieht man einen Myosin-spezifischen Ig-Titer Anstieg um das Vierfache zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und Myosin-Gruppe ($0,3 \pm 0,05$ vs. $1,14 \pm 0,13$).

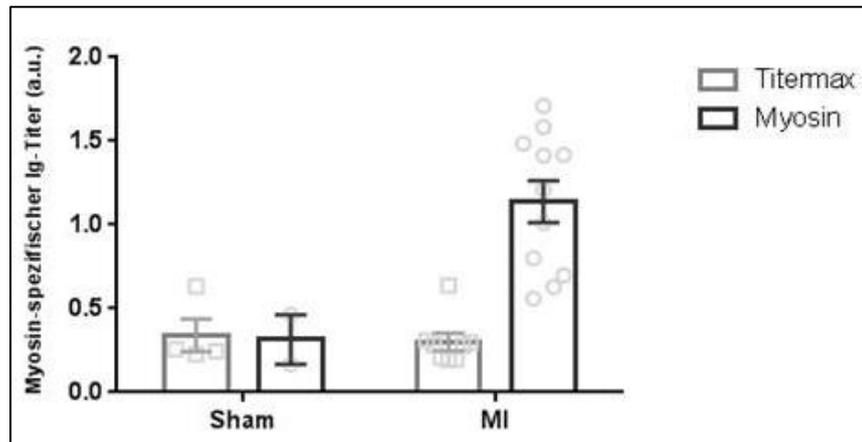


Abbildung 7 Myosin-spezifischer Ig-Titer an Tag 7 nach MI: $n=4$ Sham-Tit, 2 Sham-Myo, 8 MI-Tit und 11 MI-Myo; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM

4.1.2 Immunofluoreszenz-Färbung

Der Nachweis Myokard-spezifischer IgM- und IgG-Antikörper der HE-immunisierten Mäuse mit anschließendem MI erfolgte anhand der Immunofluoreszenz-Färbung.

Die Aufnahmen der Immunofluoreszenz-Färbung zeigen ein deutlich stärkeres Fluoreszenz-Signal der HE-immunisierten Mäuse nach Färbung gegen IgM (Balb/c Wt HE+MI) im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe (Balb/c Wt Tit+MI) (Abbildung 8). Der Unterschied nach Färbung gegen IgG ist eher weniger stark ausgeprägt zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und der HE-Gruppe. Bei allen mit HE-immunisierten Mäusen konnte eine Zunahme des Fluoreszenz-Signals nach Färbung gegen IgM beobachtet werden. Abbildung 8 zeigt beispielhaft jeweils 3 Tiere der HE-Gruppe sowie der Titermax-Kontrollgruppe.

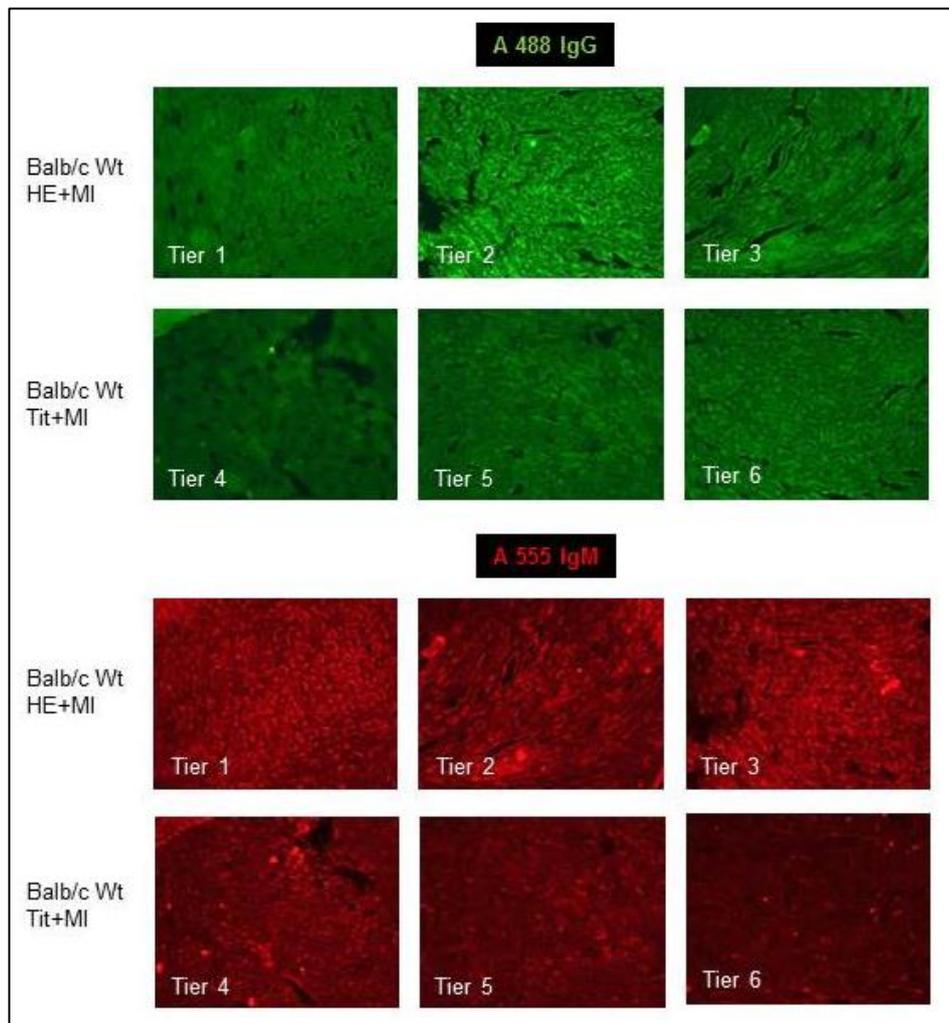


Abbildung 8 Nachweis Myokard-spez. IgG- und IgM-Antikörper

4.2 Echokardiographie

Die operierten Versuchstiere jeder Gruppe erhielten an Tag 6 nach der Operation eine Echokardiographie auf der Papillarmuskelebene. Analysiert wurden der Fractional Area Change (FAC), die Endiastolic Area (EDA) und die Endsystolic Area (ESA). Die Ergebnisse der Echokardiographie zeigen einen signifikanten Unterschied des FAC zwischen der Myosin- und HE-Gruppe (Myosin-Gruppe $32,53 \pm 2,80$ % vs. HE-Gruppe $49,42 \pm 4,16$ %; $p < 0,05$) (Abbildung 9). Der FAC der Sham-Myosin-Gruppe betrug $63,71 \pm 2,50$ %. Die Werte des FAC, der EDA und der ESA werden in Tabelle 4 gezeigt. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der EDA oder ESA zwischen den Versuchsgruppen.

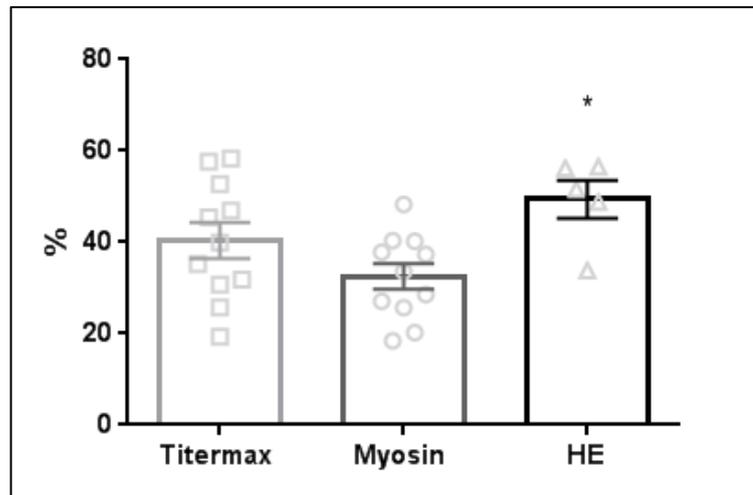


Abbildung 9 Fractional Area Change nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den $\text{mean} \pm \text{SEM}$; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und der Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Myosin-Gruppe

Tabelle 4 Ergebnisse der Echokardiographie

Versuchsgruppe	FAC in %	EDA in mm^2	ESA mm^2
Titermax-Kontrollgruppe	$40,37 \pm 3,92$	$13,48 \pm 0,67$	$8,33 \pm 0,88$
Myosin-Gruppe	$32,53 \pm 2,80$	$13,62 \pm 0,74$	$9,48 \pm 0,84$
HE-Gruppe	$49,42 \pm 4,16$	$15,53 \pm 0,89$	$7,93 \pm 0,96$
Sham-Titermax-Gruppe	$59,53 \pm 3,93$	$9,97 \pm 0,28$	$4,22 \pm 0,46$
Sham-Myosin-Gruppe	$63,71 \pm 2,50$	$9,05 \pm 0,53$	$3,27 \pm 0,03$

FAC=Fractional Area Change; EDA=Endiastolic area; ESA=Endsystolic area

4.3 Infarktgröße

Abbildung 13 zeigt die Infarktgröße der 3 Versuchsgruppen in Prozent. Es ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied in der Infarktgröße zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und der Myosin-Gruppe an Tag 7 gibt. Jedoch zeigt der Vergleich der Titermax-Kontrollgruppe mit der HE-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($36,53 \pm 7,55$ % vs. $73,56 \pm 8,66$ %; $p < 0,01$). Der Mittelwert der Infarktgröße hat sich mehr als verdoppelt.

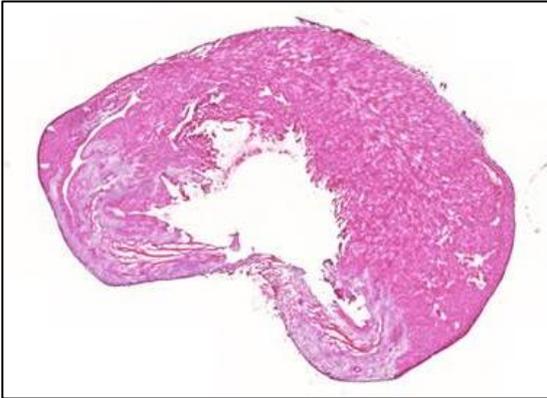


Abbildung 11 HE-Färbung, 12 μ m, Myo+MI

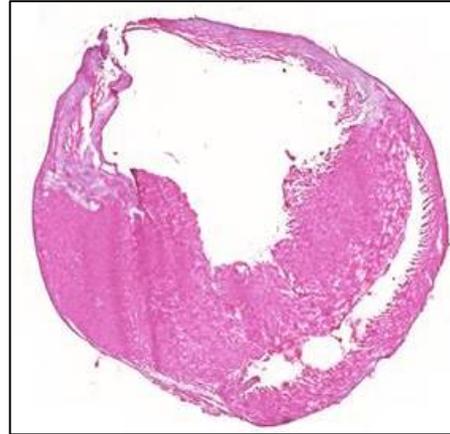


Abbildung 10 HE-Färbung, 12 μ m, Tit+MI

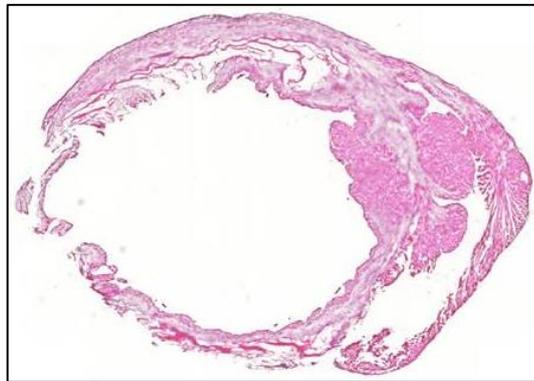


Abbildung 12 HE-Färbung, 12 μ m, HE+MI

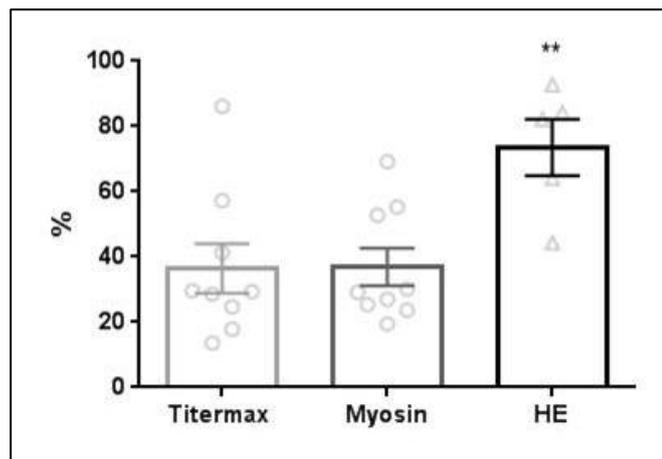


Abbildung 13 Infarktgröße in Prozent nach MI: $n=9$ Tit, 9 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; ** markiert $p<0,01$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

4.4 FACS Daten

Die nachfolgenden Graphen zeigen ausschließlich die Daten von MI-Tieren. Punktuell werden die Daten der Sham-operierten Tiere im Text erwähnt.

4.4.1 Anzahl der gesamten Leukozyten in den mediastinalen Lymphknoten und im Infarktgebiet

Die absolute Zellzahl der Leukozyten (CD45⁺) in den mediastinalen Lymphknoten ist in allen Gruppen ähnlich (Abbildung 14). Der Vergleich zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und HE-Gruppe ergibt einen p-Wert von 0,094 ($0,462 \times 10^6 \pm 0,191 \times 10^6$ Zellen pro LK vs. $1,695 \times 10^6 \pm 11,290 \times 10^6$ Zellen pro LK).

In der Infarktnarbe ist ein signifikanter Unterschied der Zellzahl der kardialen CD45⁺ Zellen zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und Myosin-Gruppe (876 ± 196 Zellen pro Milligramm Gewebe vs. 2484 ± 246 Zellen pro Milligramm Gewebe, $p < 0,05$) zu erkennen. Die Infarktnarbe in der Myosin-Gruppe wurde mit fast der dreifachen Anzahl an Leukozyten infiltriert (Abbildung 15).

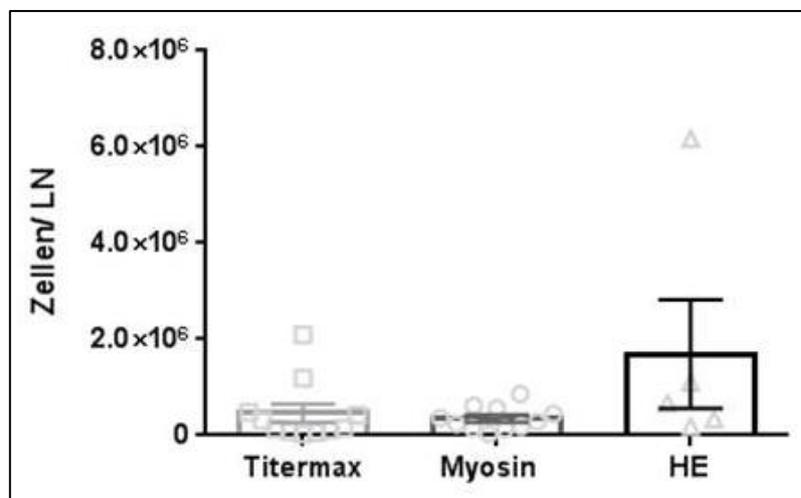


Abbildung 14 Anzahl CD45⁺ Zellen in den mediastinalen Lymphknoten nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

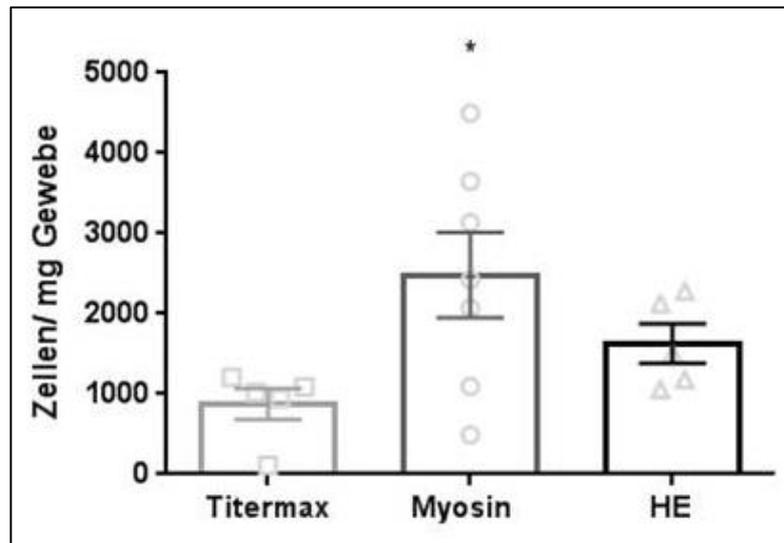


Abbildung 15 Anzahl der CD45⁺-Zellen im Infarktgebiet: n=5 Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean ± SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert p<0,05 im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

4.4.2 Gating der Herzproben

Die Abbildung 16 zeigt die FACS-Gating-Strategie der Herzproben. Zunächst wurden die Einzelzellen mithilfe des FSC-H und FSC-A ermittelt. Um die kardialen Leukozyten von den restlichen Zellen unterscheiden zu können, wurde der CD45-Rezeptor gefärbt. Die CD45⁺-Zellen wurden als kardiale Leukozyten definiert. Als nächstes konnte anhand des CD11b- und Ly6G-Oberflächenmarkers zwischen den kardialen Monozyten (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻), den neutrophilen Granulozyten (CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺) und den restlichen Leukozyten (CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻) unterschieden werden. Diese Zellen wurden weiter in T- und B-Zellen unterteilt (T-Zellen: CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ TCRβ⁺, B-Zellen: CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ B220⁺).

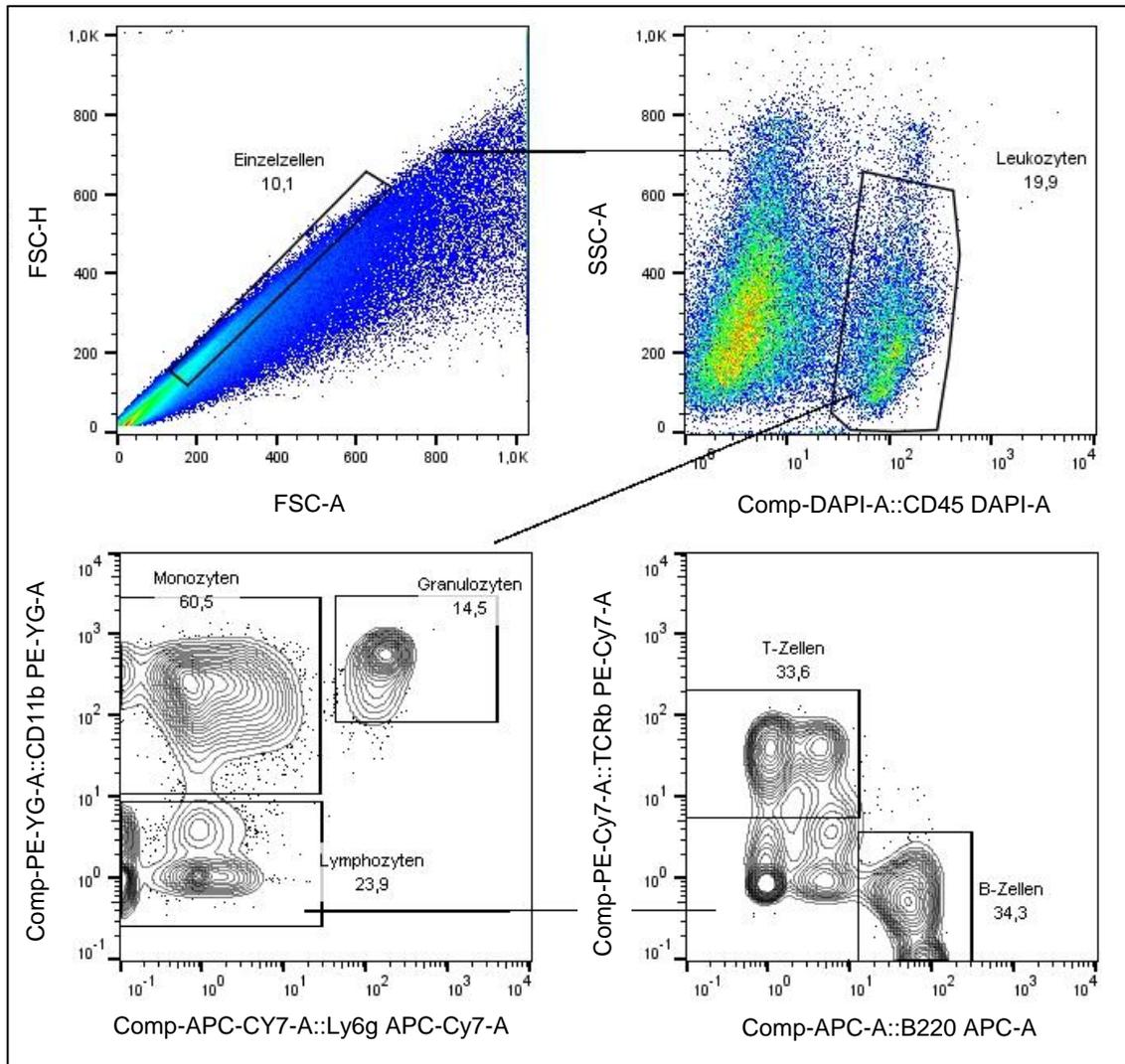


Abbildung 16 FACS-Gating-Strategie der Herzproben

4.4.2.1 Leukozyteninfiltration im Infarktgebiet

Die nachfolgenden Graphen zeigen zum einen den relativen Anteil der einzelnen Zellpopulationen an den gesamten kardialen Leukozyten, sowie die absoluten Zellzahlen mancher Zellpopulation zum Vergleich. Die Daten der Sham-operierten Tiere werden in den Graphen nicht gezeigt, sondern werden gesondert im Text erwähnt.

Betrachtet man den relativen Anteil der kardialen Monozyten an den kardialen Leukozyten, sieht man einen signifikanten Unterschied von ca. 25 % zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und HE-Gruppe ($46,56 \pm 6,48 \%$ vs. $72,56 \pm 4,99 \%$, $p < 0,05$) (Abbildung 17). Im Vergleich zu der Sham-Titermax- und Sham-Myosin-Gruppe

(33 ± 11 % vs. 36 ± 22 %) sieht man in allen 3 Gruppen eine Zunahme der Monozyteninfiltration.

Berechnet man hingegen die absolute Anzahl der Monozyten pro Milligramm Gewebe, verschiebt sich das Verhältnis der 3 Versuchsgruppen zugunsten der Myosin-Gruppe (Titermax-Kontrollgruppe 431 ± 139 Zellen pro mg Gewebe vs. Myosin-Gruppe 1513 ± 239 Zellen pro mg Gewebe, $p < 0,05$; Vgl. Sham-Titermax-Gruppe 174 ± 64 Zellen pro mg Gewebe) (Abbildung 18).

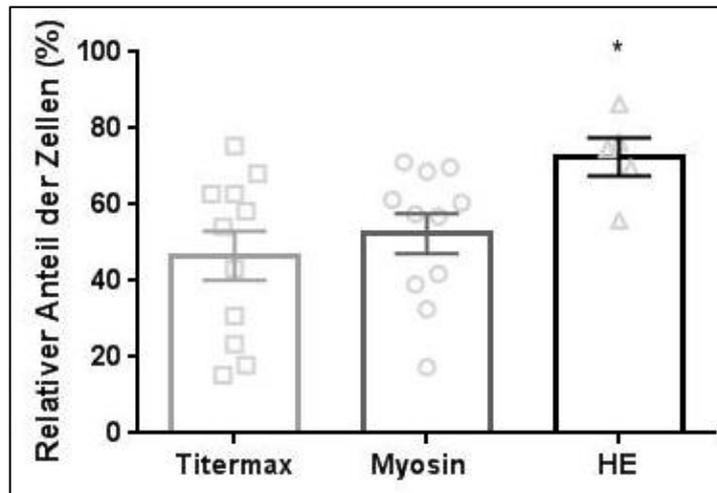


Abbildung 17 Anteil der kard. Monozyten an den Leukozyten nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

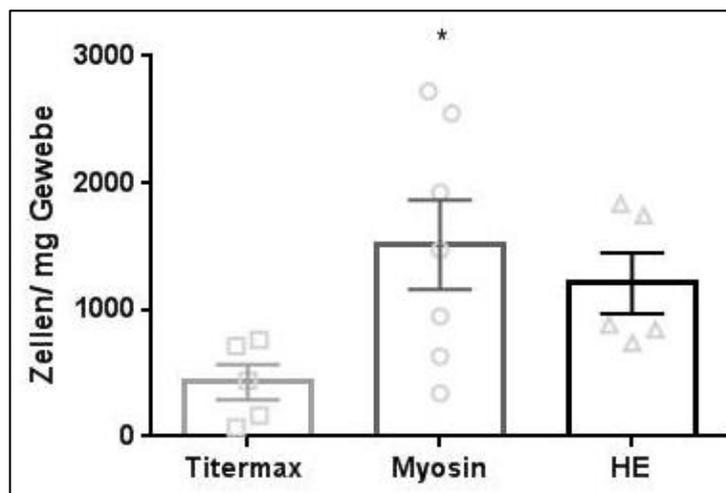


Abbildung 18 Absolute Zellzahl der kard. Monozyten an den Leukozyten nach MI: $n=5$ Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

Die kardialen neutrophilen Granulozyten zeigen keinen Unterschied in ihrem relativen Anteil an den kardialen Leukozyten (Abbildung 19), wohingegen auch hier sich die absoluten Zellzahlen zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und Myosin-Gruppe signifikant unterscheiden (56 ± 20 Zellen pro mg Gewebe vs. 131 ± 25 Zellen pro mg Gewebe, $p < 0,05$; Vgl. Sham-Titermax-Gruppe 33 ± 13 Zellen pro mg Gewebe) (Abbildung 20).

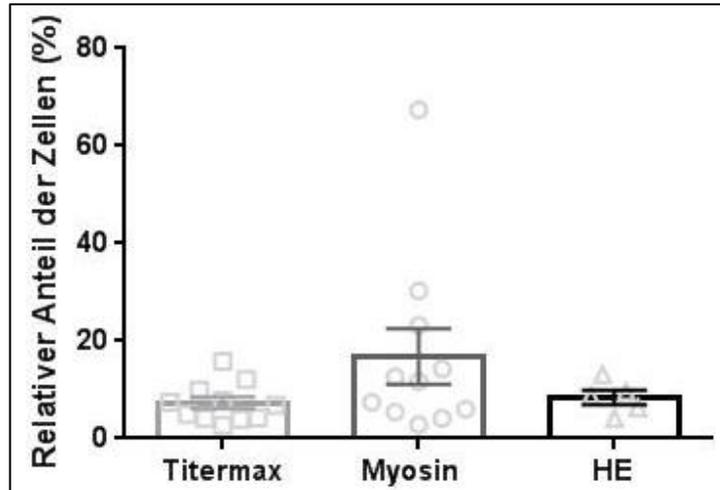


Abbildung 19 Anteil der kard. neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

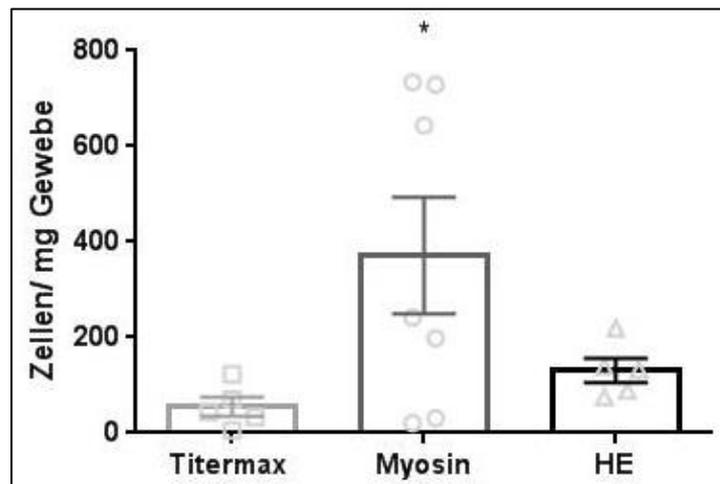


Abbildung 20 Absolute Zellzahl der kard. neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten nach MI: $n=5$ Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

Sowohl bei dem relativen Anteil der kardialen T- und B-Zellen, sowie bei der absoluten Zellzahl pro Milligramm Gewebe der beiden Zellpopulationen an den kardialen Lymphozyten sind keine Unterschiede zwischen den 3 Versuchsgruppen zu beobachten. Es sind lediglich leichte Trends erkennbar (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24).

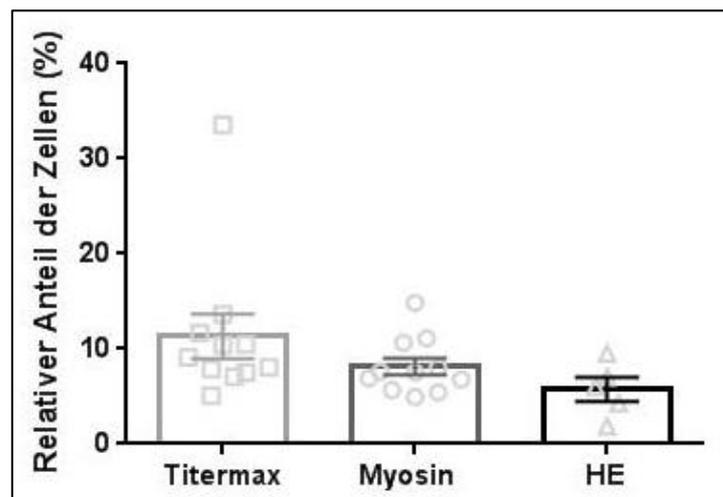


Abbildung 21 Anteil der kardialen T-Zellen an den Lymphozyten nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

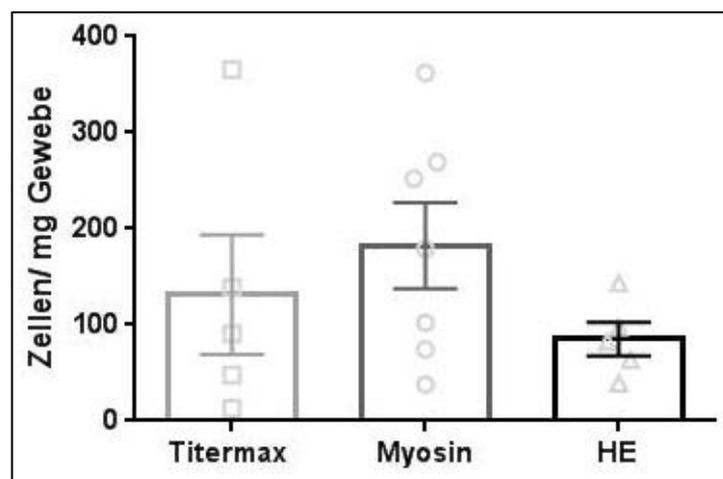


Abbildung 22 Absolute Zellzahl der kard. T-Zellen an den Lymphozyten nach MI: $n=5$ Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

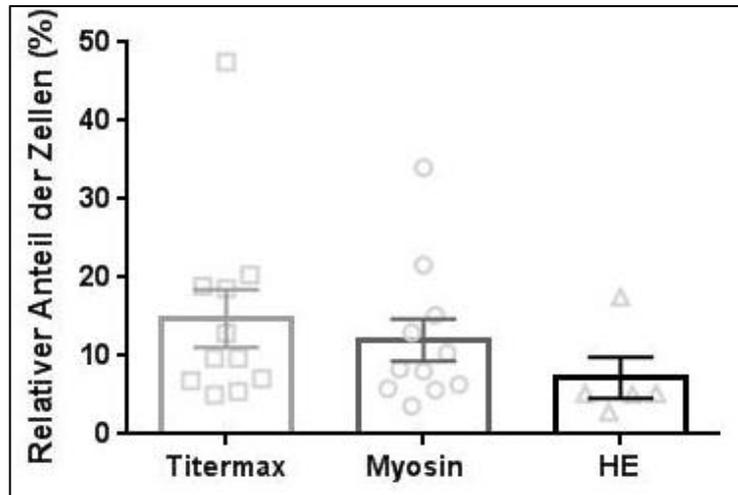


Abbildung 23 Anteil der kardialen B-Zellen an den Lymphozyten nach MI: $n=11$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

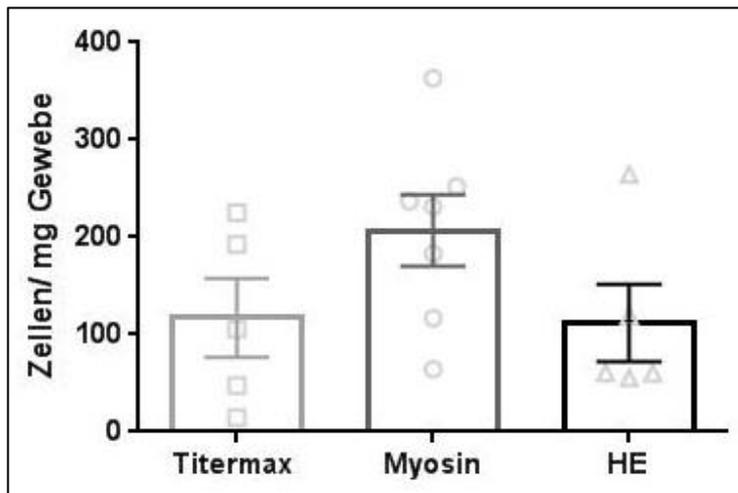


Abbildung 24 Absolute Zellzahl der kard. B-Zellen an den Lymphozyten nach MI: $n=5$ Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

4.4.3 Gating der mediastinalen Lymphknoten

Zunächst wurden auch hier die Einzelzellen von den übrigen Zellen mithilfe des FSC-A und FSC-H getrennt und anschließend die vitalen Leukozyten mit dem SSC-A und FSC-A von den toten Zellen separiert. Diese wurden weiter in CD4⁺T-Zellen (CD4⁺ TCRβ⁺) und CD8⁺T-Zellen (CD4⁻ TCRβ⁺) unterteilt. Der Anteil der Tregs an den CD4⁺T-Zellen wurde mithilfe des intrazellulären Markers Foxp3 ermittelt (CD4⁺ TCRβ⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) (Abbildung 25).

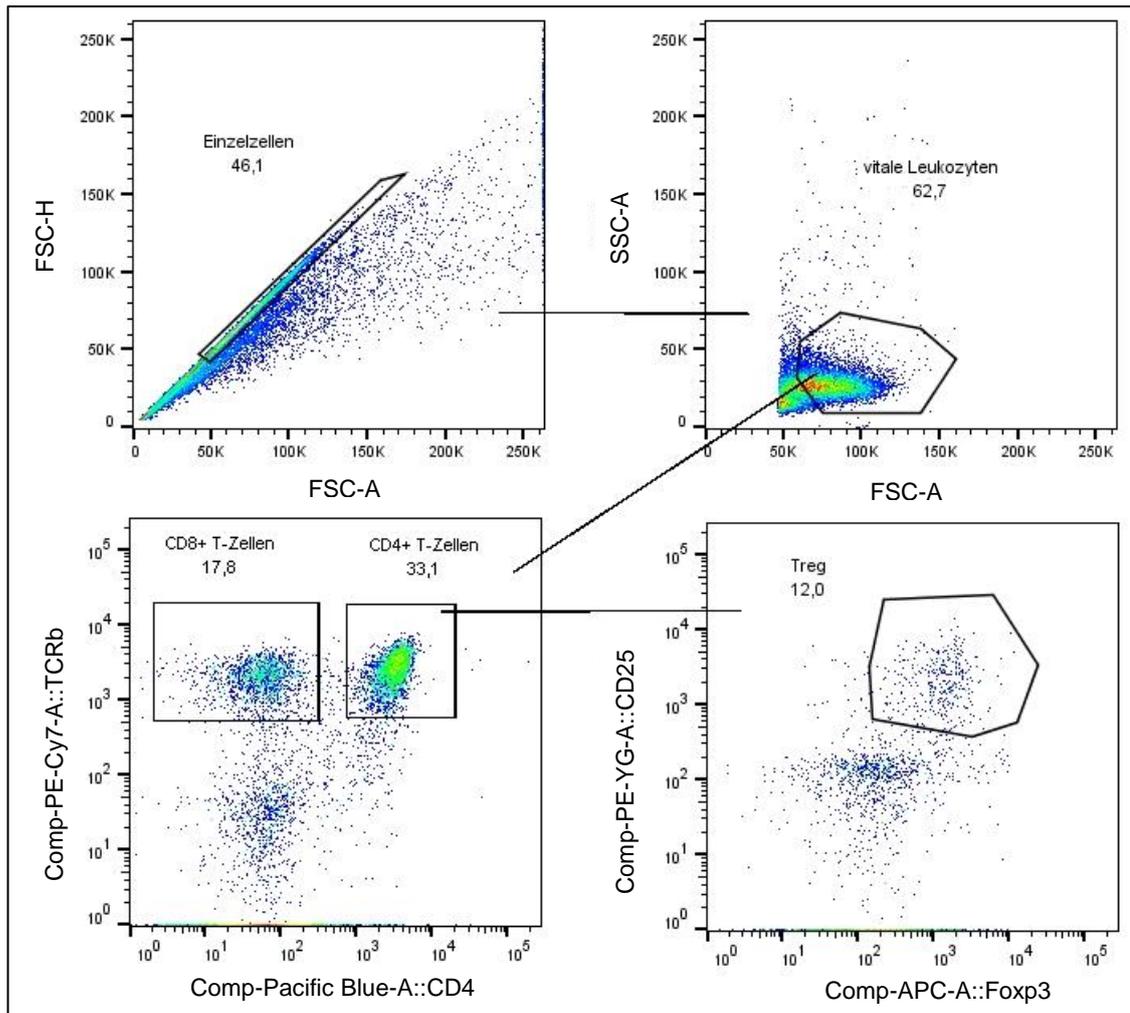


Abbildung 25 FACS-Gating-Strategie der Lymphknoten-Proben

4.4.3.1 Leukozyteninfiltration in den herzdrainierenden Lymphknoten

Die FACS-Analyse des relativen Anteils der CD4⁺ T-Zellen an den vitalen Leukozyten, sowie der Foxp3⁺ T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten ergab keinen Unterschied zwischen der Titermax-Kontrollgruppe und den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 26, Abbildung 27).

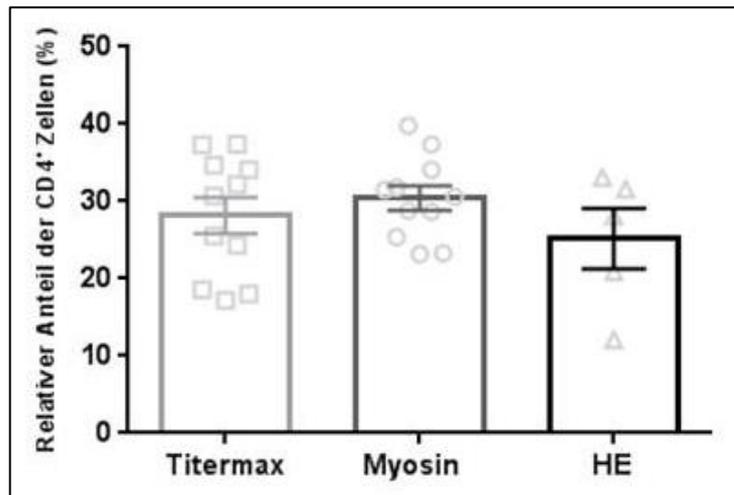


Abbildung 26 Anteil der CD4⁺ T-Zellen an den vitalen Leukozyten nach MI: n=11 Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean ± SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

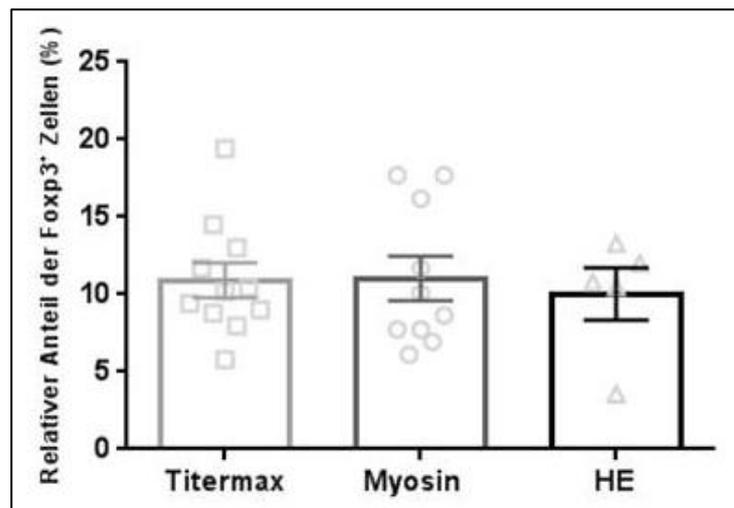


Abbildung 27 Anteil der Foxp3⁺ Zellen an den CD4⁺ T-Zellen nach MI: n=11 Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean ± SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

4.5 qPCR

Die mRNA-Expressionslevel der untersuchten Gene wurden an das Expressionslevel des Haushaltsgens *Gapdh* angeglichen und mithilfe der qPCR gemessen. Die nachfolgenden Graphen zeigen nicht die Werte der Sham-operierten Tiere, sondern ausschließlich der Tiere nach erleiden eines MI.

4.5.1 Pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Mediatoren

Es zeigen sich keine relevanten Unterschiede des mRNA-Expressionslevels des untersuchten pro-inflammatorischen Gens *Tnfa* und des anti-inflammatorischen Gens *Il10* in den 3 Versuchsgruppen (Abbildung 28, Abbildung 29). Jedoch ist eine leichte Hochregulierung der *Mrc1* mRNA-Expression in der HE-Gruppe im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe zu erkennen ($0,018 \pm 0,004$ vs. $0,008 \pm 0,002$; $P=0,016$) (Abbildung 30). *Mrc1* ist das dazugehörige Gen des Oberflächenrezeptors CD206 und ist daher ein Marker der anti-inflammatorisch differenzierten Makrophagen.

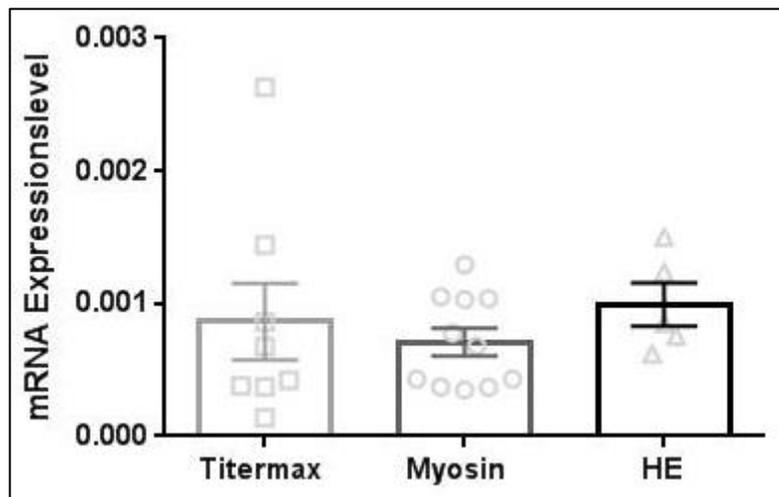


Abbildung 28 mRNA-Expressionslevel des Gens *Tnfa* nach MI: $n=8$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den $\text{mean} \pm \text{SEM}$; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

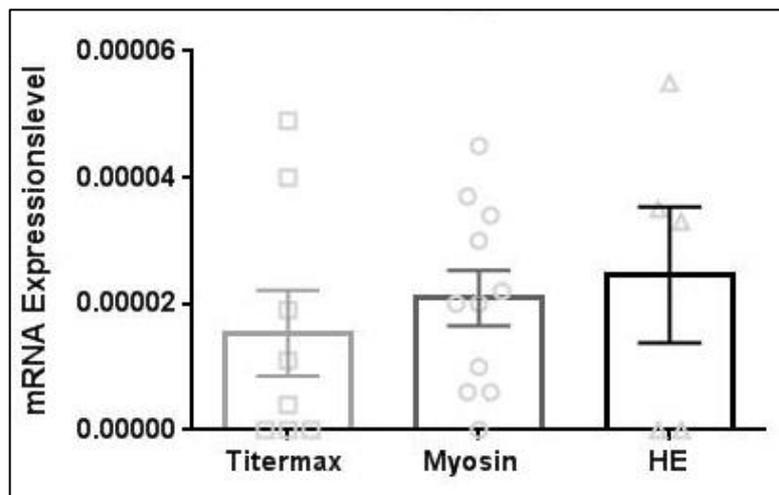


Abbildung 29 mRNA-Expressionslevel des Gens *Il10* nach MI: $n=8$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den $\text{mean} \pm \text{SEM}$; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

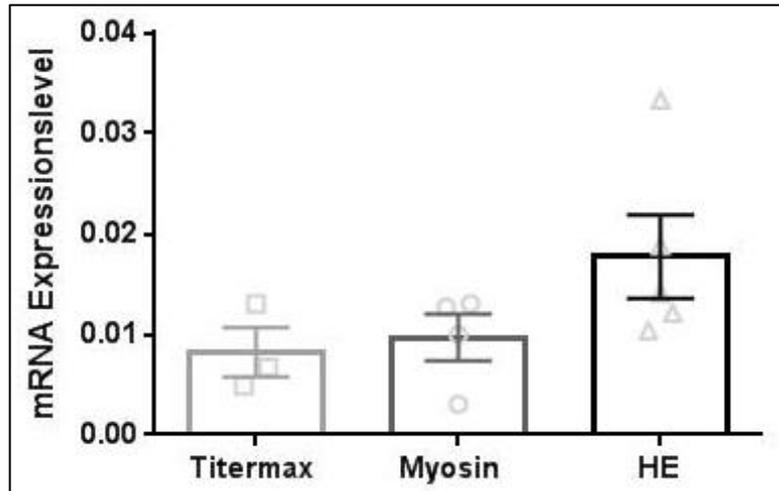


Abbildung 30 mRNA-Expressionslevel des Gens *Mrc1* nach MI: $n=3$ Tit, 4 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

4.5.2 Mediatoren der Heilungs- und Remodelingphase nach einem MI

Die Expression des Gens *Col1a1* der HE-Gruppe ist gegenüber der Titermax-Kontrollgruppe um mehr als das Zweifache signifikant hochreguliert ($10,9 \pm 2,4$ vs. $4,0 \pm 1,3$; $p < 0,01$) (Abbildung 31). Zum Vergleich liegt das Expressionslevel der Sham-Titermax-Gruppe bei $0,08 \pm 0,03$.

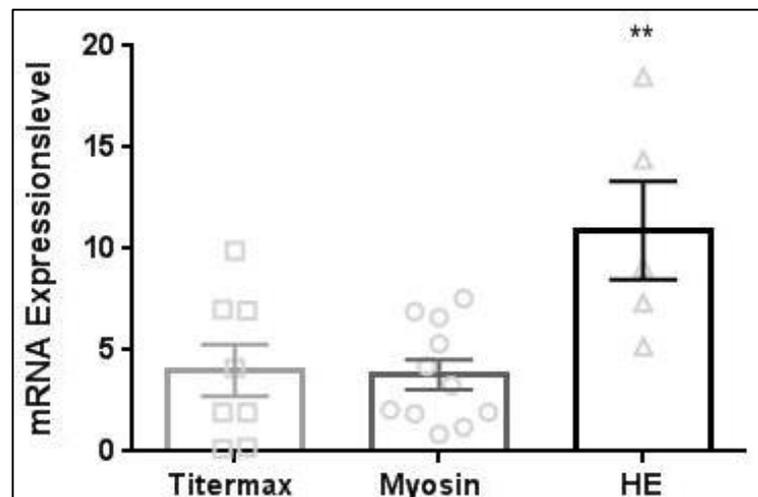


Abbildung 31 mRNA-Expressionslevel des Gens *Col1a1* nach MI: $n=8$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; ** markiert $p < 0,01$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

Die Expressionslevel der Matrixmetalloproteasen *Mmp2* (Abbildung 32) und *Mmp9* (Abbildung 33) zeigen ebenfalls eine signifikante Hochregulierung der Gene in der HE-Gruppe im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe (*Mmp2*: $0,07 \pm 0,01$ vs. $0,03 \pm 0,01$; $p < 0,05$ und *Mmp9*: $0,04 \pm 0,02$ vs. $0,01 \pm 0,003$; $p < 0,05$). Wohingegen das Expressionslevel der Sham-Titermax-Gruppe sich im Bereich $0,003 \pm 0,0007$ für *Mmp2* und $0,00006 \pm 0,00002$ für *Mmp9* befindet.

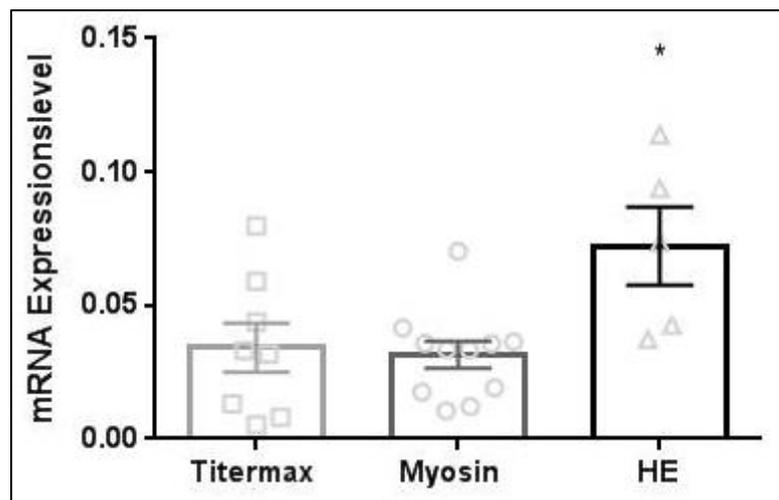


Abbildung 32 mRNA-Expressionslevel des Gens *Mmp2* nach MI: $n=8$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

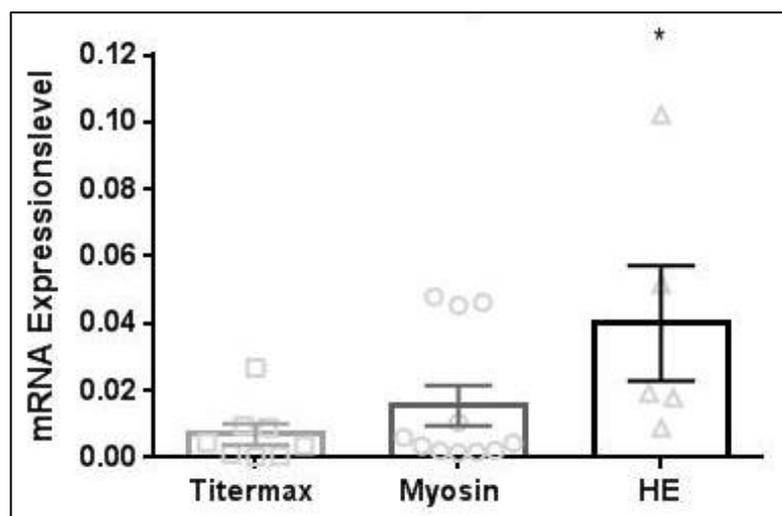


Abbildung 33 mRNA-Expressionslevel des Gens *Mmp9* nach MI: $n=8$ Tit, 11 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt; * markiert $p < 0,05$ im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe

Das Gen *Vwf* dient als Marker der Angiogenese. Zwischen den 3 Versuchsgruppen konnte kein Zusammenhang zwischen der Immunisierung mit Myosin oder HE und einer gesteigerten Expression von *Vwf* erkannt werden (Abbildung 34).

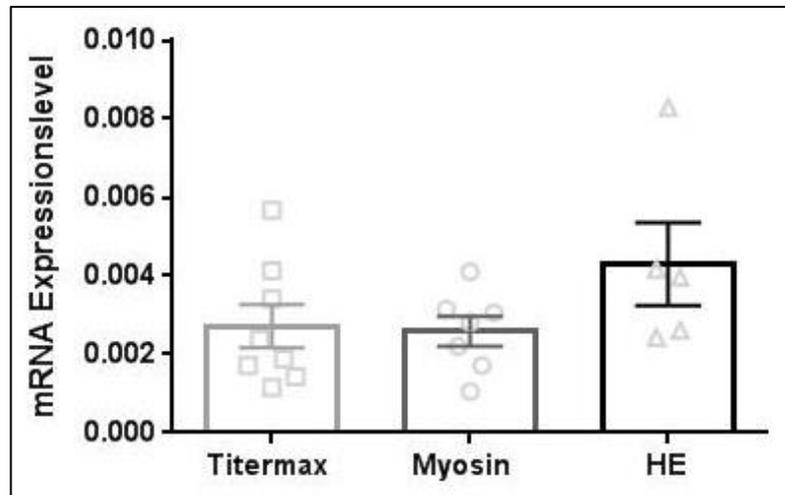


Abbildung 34 mRNA-Expressionslevel des Gens *Vwf* nach MI: $n=8$ Tit, 7 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den $\text{mean} \pm \text{SEM}$; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

Die Expressionslevel der Gene *Vim* (Abbildung 35) und *Acta2* (Abbildung 36) zeigen ebenfalls keine Korrelation zwischen der Myosin- oder HE-Immunisierung und einer gesteigerten Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es ist lediglich ein Trend erkennbar, ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen (*Vim* $p=0,09$).

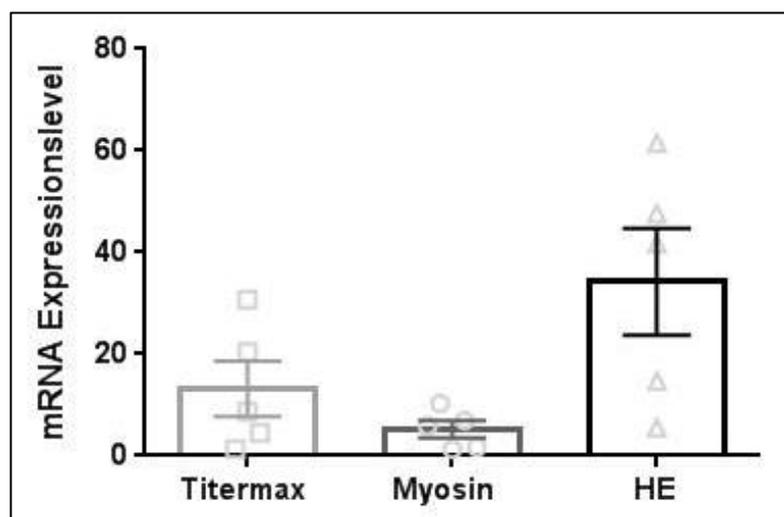


Abbildung 35 mRNA-Expressionslevel des Gens *Vim* nach MI: $n=5$ Tit, 5 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den $\text{mean} \pm \text{SEM}$; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

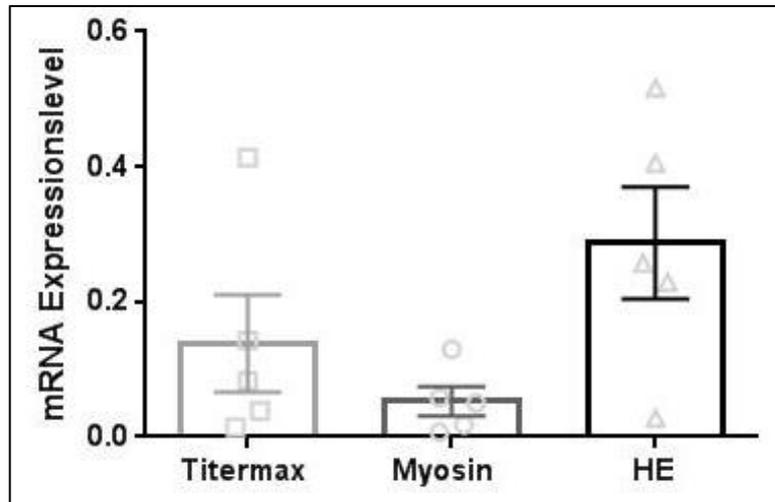


Abbildung 36 mRNA-Expressionslevel des Gens *Acta2* nach MI: $n=5$ Tit, 5 Myo, 5 HE; die Graphen repräsentieren den mean \pm SEM; als statistischer Test wurde das one-way ANOVA und Dunnett's multiple comparisons Test angewandt

5 Diskussion

5.1 Immunisierung mit Herzextrakt

5.1.1 Die Immunisierung mit Herzextrakt induziert eine Autoimmunantwort

Durch die Immunisierung mit dem kompletten HE wird eine adaptive T- und B-Zell Immunantwort mit Antikörperbildung gegen Bestandteile des Myokards ausgelöst. Dies beweist der IgM- und IgG-Nachweis mittels der Immunofluoreszenz-Färbung in Abbildung 8. Gegen welche Bestandteile des Myokards die Igs gerichtet sind, konnte mit dieser Methode nicht geklärt werden. Aus einigen bisherigen Studien geht hervor, dass bestimmte Proteine des Myokards als Autoantigene vom Immunsystem erkannt werden, wie u.a. das kardiale Myosin (Pummerer et al. 1996; Dangas et al. 2000), insbesondere die alpha-Myosin Schwerekette (Rieckmann et al. 2019), Troponin (Kaya et al. 2010; Lindahl et al. 2010), Aktin (Scheerder et al. 1991) und der kardiale Anti- β 1-adrenerger Rezeptor (Störk et al. 2006). Das HE beinhaltet alle Bestandteile des Myokards und liefert somit viele Antigene für eine Autoimmunreaktion.

5.1.2 Infarktexpansion durch erhöhte Antikörperproduktion und Aktivität der Matrixmetalloproteasen

MMPs sind Enzyme, die Bestandteile der EZM spalten. Eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und PDGF (platelet-derived growth factor) sollen die Synthese von MMPs stimulieren (Dollery et al. 1995). MMP9 macht den größten Anteil an den MMPs im Infarktgebiet aus und wird von infiltrierenden Leukozyten in den ersten Tagen nach einem MI sezerniert (Hofmann et al. 2012). Eine erhöhte MMP Aktivität steht in Zusammenhang mit ungünstigem linksventrikulären Remodeling (Ducharme et al. 2000). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz konnte eine verstärkte MMP Aktivität nachgewiesen werden und war mit einer progressiven linksventrikulären Dilatation assoziiert (Janicki et al. 1995; Gunja-Smith et al. 1996). Theoretisch würde eine erhöhte MMP Aktivität den Abbau von Kollagen in der EZM bewirken (Li et al. 2000). Es passiert aber das Gegenteil: ein Anstieg der MMP Aktivität geht mit einer verstärkten Fibrose einher, wohingegen die Hemmung der MMP Aktivität mit einer verminderten Bildung von fibrotischem Gewebe assoziiert ist (Dixon et al. 1997; Cowan et al. 1999). Dies ist anhand dessen zu erklären, dass es ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau der EZM gibt (Li et al. 2000). Der Abbau von Matrixproteinen stimuliert die Kollagensynthese (Li 2000) und daraufhin kommt es zu einer verstärkten Bildung eines instabilen, fibrotischen Gewebes im Myokard (Li et al. 2000). Nicht nur die MMPs sondern auch das Kollagen I (Gen: *Col1a1*), sollen das myokardiale Remodeling fördern (Keppner et al. 2018). Im Myokard von Erwachsenen

sind verschiedene Kollagentypen zu finden, wobei das Kollagen I den größten Anteil ausmacht (Weber 1989).

Unter Zusammenschau der Ergebnisse der vorangegangenen Studien ist davon auszugehen, dass eine vermehrte Aktivität der MMPs, insbesondere der MMP9, sowie eine Zunahme der Kollagen I Expression im Infarktgebiet zum ungünstigen myokardialen Remodeling beitragen und somit eine Infarktexpansion bewirken.

Die Analyse der Infarktgröße an Tag 7 nach einem MI zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der HE-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe. Die Infarktgröße, gemessen an der histologisch bestimmten Fläche der bindegewebigen Narbe, hat sich im Gegensatz zur Myosin-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe mehr als verdoppelt (Abbildung 13).

Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Expression der Gene *Col1a1* (Abbildung 31), *MMP2* (Abbildung 32) und *MMP9* (Abbildung 33) in der HE-Gruppe im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe.

Keppner et al. beschrieben, dass eine Agammaglobulinämie zu einer signifikanten Abnahme der Infarktgröße führt, was vermuten lässt, dass herzspezifische Igs nach einem MI schädlich sind. Somit wäre die Bildung herzspezifischer Igs nach der Immunisierung mit HE eine Erklärung für die signifikant erhöhte Infarktgröße der Mäuse der HE-Gruppe.

Wie bereits erläutert, sind u.a. die MMPs und das Kollagen I an dem ungünstigen Remodeling-Prozess im Myokard beteiligt und führen somit zur Infarktexpansion. Daher würde die Hochregulierung der Gene *MMP9* und *Col1a1* die signifikant erhöhte Infarktgröße durch Infarktexpansion in der HE-Gruppe erklären. Die Studie von Keppner et al. konnte einen Zusammenhang zwischen einer Agammaglobulinämie und einer verminderten Expression von MMP9 und Kollagen I herstellen, was darauf hindeutet, dass eine adaptive B-Zellantwort das ungünstige kardiale Remodeling fördert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine herzspezifische B-Zellantwort nach einem MI mit Bildung von Igs gegen Bestandteile des Myokards schädlich ist und eine Zunahme der Infarktgröße bedingt. Zudem steigern die herzspezifischen Igs die MMP9 Aktivität und Kollagen I Sekretion im Infarktgebiet und fördern daher das ungünstige kardiale Remodeling und die Infarktexpansion auf das umliegende vitale Myokard. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den nachteiligen Effekt einer adaptiven B-Zell-Antwort mit Bildung herzspezifischer Igs bestätigen. Die

Autoimmunreaktion gegen das Myokard nach der Immunisierung mit HE und anschließendem MI führt zu einer Zunahme der Infarktgröße und fördert das ungünstige kardiale Remodeling.

Der Vergleich der Ergebnisse von Keppner et al. und dieser Arbeit wird jedoch durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Analyse der Infarktgröße nach einem MI limitiert. Keppner et al. untersuchten die Infarktgröße an Tag 56 nach einem MI, wohingegen bei dieser Arbeit die Organentnahmen bereits an Tag 7 nach einem MI stattfanden. Neben dem Effekt auf die Bindegewebebildung in der Narbe kann nicht ausgeschlossen werden, dass in Abwesenheit herzspezifischer Autoantikörper möglicherweise auch der initiale Schaden nach einem MI und damit die Infarktgröße geringer ist.

Normalerweise geht eine große Infarktnarbe mit einer verminderten linksventrikulären Pumpfunktion einher. Der FAC ist ein geeigneter Parameter zur Beurteilung der systolischen Pumpfunktion. Erstaunlicherweise zeigt die HE-Gruppe einen signifikant erhöhten FAC bei einer signifikant erhöhten Infarktgröße im Vergleich zur Myosin-Gruppe (Abbildung 9), was eine gute linksventrikuläre Pumpfunktion bedeutet. Eine eingeschränkte Wandbewegung des Ventrikels würde man am ehesten auf der apikalen Schnittebene durch den Ventrikel erwarten, da hier die Infarktausdehnung am größten ist. Bei dieser Arbeit wurde jedoch die Schnittebene auf der Papillarmuskelebene untersucht und dies würde daher den widersprüchlich guten FAC in der HE-Gruppe erklären. Diese wichtige Limitation muss bei der Betrachtung der diskrepanten Ergebnisse berücksichtigt werden.

5.2 Immunisierung mit Myosin

5.2.1 Das kardiale Myosin induziert eine Autoimmunantwort

Es wird angenommen, dass das kardiale Myosin nicht von den Epithelzellen im Thymus gegenüber den naiven T-Zellen präsentiert wird (Lv et al. 2011). Somit werden autoreaktive T-Zellen gegenüber Myosin nicht negativ selektiert und können eine Autoimmunreaktion triggern (Lv et al. 2011). Das kardiale Myosin ist ein normalerweise intrazellulär gelegenes Protein (O'Donohoe et al. 2016). Eine Studie konnte jedoch nachweisen, dass bei gesunden Mäuseherzen, ohne Verletzung des Myokards, kardiale APZ Myosin über MHC II Moleküle exprimieren, ohne dass eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird (Smith und Allen 1992). Aufgrund dieser Erkenntnisse kann die Hypothese formuliert werden, dass grundsätzlich eine

Autoreaktivität gegen Myosin besteht, diese jedoch durch periphere Toleranz supprimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eindeutig, dass es 14 Tage nach der Immunisierung von Balb/c Wt Mäusen mit kardialem Myosin zu einem Anstieg des Ig-Titers gegen Myosin kommt (Abbildung 6). Dies beweist, dass Myosin eine humorale Immunantwort bei den Mäusen auslöst. Wenn die Tiere nicht nur mit Myosin immunisiert wurden, sondern auch einen MI erlitten, kann ein Ig-Anstieg um das Vierfache im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 7). Jedoch bleibt der Ig-Titer weit unterhalb der Werte der nur immunisierten Tiere in Abbildung 6. Warum es bei der MI-Versuchsgruppe zu einer geringeren Ig-Produktion im Vergleich zu den Tieren, die nur immunisiert und keinem MI unterzogen wurden, kommt, kann nicht mit Sicherheit erklärt werden. Eine Hypothese wäre, dass die Antigenfreisetzung im Rahmen des MI eine Toleranz gegen das Autoantigen Myosin induziert hat und somit weniger Anti-Myosin-Igs gebildet wurden.

Das kardiale Myosin ist schon seit längerer Zeit im Fokus der Forschung. Die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen verdeutlichen, dass Myosin eine Autoimmunreaktion sowie bei Nagetieren als auch bei Menschen auslösen kann (Neu et al. 1987; Pummerer et al. 1996; Dangas et al. 2000). In der Vergangenheit konnte bereits bewiesen werden, dass ein erhöhter Anti-Myosin-Titer langfristig einen schädlichen Einfluss auf das Myokard hat. Pummerer et al. konnten nachweisen, dass es 3 Wochen nach der Immunisierung mit kardialem Myosin zu einer Autoimmunmyokarditis bei den Mäusen kam. Dangas et al. demonstrierten, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Anti-Myosin-Titer und erhöhten Troponin-I Werten bei Patienten während und bis 3 Monate nach einem kardiovaskulären Ereignis gab. Zudem konnte eine Korrelation zwischen einem erhöhten Anti-Myosin-Titer und einer schlechteren Prognose bei Patienten mit einem MI beobachtet werden (O'Donohoe et al. 2016). Somit wurde eine Autoimmunreaktion gegen Myosin mit Bildung autoreaktiver Igs bisher als schädlich angesehen. Jedoch war bislang unklar, was für einen Einfluss die Immunisierung mit Myosin eine Woche vor einem MI auf die Entzündungs-, Heilungs- und Remodelingphase des Myokards hat.

5.2.2 Myosin-spezifische T-Zell-Antwort nach einem MI

Vorangegangene Studien konnten belegen, dass die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen nach einem MI die Heilung des Myokards fördern (Hofmann et al. 2012; Weirather et al. 2014). Hofmann et al. bewiesen zum ersten Mal, dass CD4⁺ T-Zellen nach einem MI aktiviert werden und einen positiven Effekt auf die Heilung des Myokards haben. Sie

konnten nachweisen, dass es in der ersten Woche nach einem MI zu einer T-Zell-Rezeptor abhängigen Aktivierung von konventionellen $\text{Foxp3}^- \text{CD4}^+$ und regulatorischen $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen durch Antigenpräsentation in den herzdrainierenden LK kam.

Die Ergebnisse einer neuen Studie unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass das kardiale Myosin, insbesondere die alpha-Myosin Schwereketten, ein Hauptantigen nach einem MI darstellt und die Aktivierung von T-Helferzellen triggert. Diese tragen dann im Infarktgebiet zu einer protektiven Immunantwort bei, indem sie einen Treg-Zell-Phänotyp entwickeln (Rieckmann et al. 2019).

Da man nun davon ausgehen kann, dass Myosin-spezifische CD4^+ T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Heilungsphase nach einem MI spielen, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen von CD4^+ und $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen in den med. LK nach der Immunisierung mit Myosin und anschließendem MI näher untersucht.

Der relative Anteil der CD4^+ T-Zellen an den gesamten vitalen Leukozyten weist nur kleine Unterschiede zwischen der Myosin-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe auf (Abbildung 26). Die Frequenz der CD4^+ T-Zellen in der Myosin-Gruppe ist leicht erhöht im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe. Die HE-Gruppe weist sogar die niedrigste Frequenz auf. Generell ist die Frequenz von Antigen-spezifischen T-Zellen eher gering (Rieckmann et al. 2019). Daher ist es wahrscheinlich, dass es zu einer Proliferation von Myosin-spezifischen CD4^+ T-Zellen in den med. LK kam und diese daraufhin das Infarktgebiet infiltrieren, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen der Myosin-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe zu erreichen.

Der Anteil der $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen an den gesamten CD4^+ Zellen ist bei der Myosin-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe annähernd gleich, wobei die HE-Gruppe die geringste Frequenz aufweist (Abbildung 27). Eine Hypothese, warum es kaum einen Unterschied zwischen den Frequenzen der $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen in den med. LK gibt, wäre, dass die $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen das Infarktgebiet bereits infiltriert haben. Diese Hypothese stärken die Ergebnisse von Hofmann et al, da sie bereits an Tag 3 nach einem MI einen Anstieg der Frequenz der $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen an den gesamten CD4^+ T-Zellen in den med. LK nachweisen konnten. Somit haben die $\text{Foxp3}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen die med. LK an Tag 7 nach einem MI wahrscheinlich schon zum Großteil verlassen, um das Infarktgebiet zu infiltrieren.

Eine weitere Hypothese lautet, dass es nach der Immunisierung mit Myosin zu einer Aktivierung und Proliferation von Myosin-spezifischen CD4^+ T-Zellen in anderen

drainierenden LK der Immunisierung kam, die hier nicht untersucht wurden. Dies könnte ebenso die niedrige Frequenz der CD4⁺ und Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen in den med. LK erklären.

Des Weiteren konnte eine unerwartet hohe Leukozytenzahl im Infarktgebiet bei der Myosin-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 15). Die Studie von Rieckmann et al. konnte hingegen nachweisen, dass Myosin-spezifische T-Zellen keinen Einfluss auf die absolute Zellzahl der kardialen Leukozyten im Infarktgebiet an Tag 5 nach einem MI hatten. Somit hätte man nach der Immunisierung mit Myosin und der darauf folgenden adaptiven Autoimmunantwort keinen Anstieg der kardialen Leukozyten im Infarktgebiet erwartet.

5.2.3 Protektiver Effekt der Myosin-spezifischen Immunantwort auf die Heilung des Myokards

Offensichtlich führt die Myosin-spezifische Immunantwort zu keiner Zunahme der Infarktgröße. Die Infarktgröße der Myosin-Gruppe ist im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe annähernd gleich (Abbildung 13). Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Echokardiographie. Die Myosin-Gruppe weist im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe einen leicht verminderten FAC auf, was auf eine verminderte systolische Pumpfunktion hindeutet. Jedoch erreicht der Unterschied keine Signifikanz (Abbildung 9).

Auch die Expression von MMP2, MMP9 und des Kollagen I, die eine Infarktexpansion und das ungünstige kardiale Remodeling fördern, zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Myosin-Gruppe und Titermax-Kontrollgruppe (Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33).

Anhand dieser Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Myosin-spezifische Immunantwort nach einem MI nicht schädlich ist. Sie bewirkt keine Zunahme der Infarktgröße und fördert auch nicht das ungünstige kardiale Remodeling. Die Autoimmunreaktion gegen Myosin scheint im Kontext einer Immunisierung mit Myosin und anschließendem MI eher neutral zu sein oder sogar eine protektive Immunantwort zu induzieren.

Diese Hypothese stützen die Ergebnisse der Studie von Rieckmann et al. Der Transfer von Myosin-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Empfängermäuse, die einem MI unterzogen wurden, hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße. Jedoch konnte die Echokardiographie an Tag 7 nach einem MI eine verbesserte FAC bei den Herzen

nachweisen, die mit autoreaktiven T-Zellen infiltriert wurden. Dieser positive Effekt konnte bei den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden.

Aktivierte Tregs tragen nach einem MI zur Heilung des Myokards bei, indem sie die Auflösung der Entzündung beschleunigen und zur Bildung einer stabilen EZM in der Infarkt Narbe beitragen (Weirather et al. 2014; Tang et al. 2011). Rieckman et al. zeigten, dass Myosin-spezifische T-Helferzellen einen Treg-Zell-Phänotyp im Infarktgebiet entwickelten und somit eine protektive Autoimmunantwort auf das heilende Myokard nach einem MI bewirken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Immunisierung mit Myosin eine adaptierte T- und B-Zell-Antwort auslöst. Dies beweist der signifikant erhöhte Anti-Myosin-Ig-Titer nach der Immunisierung (Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass ein erhöhter Anti-Myosin-Ig-Titer keinen negativen Effekt auf die frühe Heilungsphase des Myokards nach einem MI hat. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Immunisierung mit Myosin vermehrt Myosin-spezifische CD4⁺ T-Zellen induziert und diese einen protektiven Effekt auf das geschädigte Myokard nach einem MI haben.

6 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Trotz einer adäquaten Therapie der MI-Patienten kommt es bei vielen MI-Überlebenden zum pathologischen Remodeling-Prozess des Ventrikels. Die immunologischen Prozesse während der Heilungsphase nach einem MI sind Gegenstand der heutigen Forschung und gewinnen immer mehr an Bedeutung. Autoimmunologische Prozesse gegen Bestandteile des Myokards wurden in der Vergangenheit bereits nachgewiesen. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe zeigt, dass Myosin-spezifische T-Zellen die Heilung des Myokards nach einem MI fördern. Welchen Einfluss jedoch die Immunisierung mit dem kompletten HE oder kardialen Myosin auf die Heilungsphase nach einem MI hat, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit.

Um zu untersuchen, ob es bei den immunisierten Tieren mit HE oder Myosin und anschließendem MI zu Veränderungen in der Heilungsphase des Myokards kam, wurden an Tag 7 nach dem MI u.a. das Herz und die med. LK entnommen und anschließend untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Tiere der HE-Gruppe eine signifikant erhöhte Infarktgröße im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe aufweisen. Außerdem exprimieren die mit HE immunisierten Mäuse signifikant erhöhte Level der Gene *MMP2*, *MMP9* und *Col1a1* im Vergleich zur Titermax-Kontrollgruppe, welche das ungünstige kardiale Remodeling induzieren. Die Immunisierung mit Myosin hat hingegen keinen nachteiligen Effekt auf die Heilungsphase des Myokards.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit das Endergebnis einer verstärkten herzspezifischen Immunantwort. Von der Immunisierung mit HE kann geschlussfolgert werden, dass eine adaptive T- und B-Zell Immunantwort insgesamt schädlich ist. Die Immunisierung mit Myosin scheint jedoch eine protektive Immunantwort über die Aktivierung von Myosin-spezifischen T-Zellen zu induzieren. In der Zukunft sollte ein Weg gefunden werden, selektiv die Immunreaktion nur der CD4⁺ T-Zellen zu verstärken und die Immunreaktion der B-Zellen zu unterdrücken.

Literaturverzeichnis

Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, Smits JF (2001) Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta physiologica Scandinavica* 173:75–82. doi:10.1046/j.1365-201X.2001.00887.x

Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Zugegriffen: 03. September 2019

Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M (1999) Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis. *Circulation research* 84:1223–1233. doi:10.1161/01.res.84.10.1223

Dangas G, Konstadoulakis MM, Epstein SE, Stefanadis CI, Kymionis GD, Toutouza MG, Liakos C, Sadaniantz A, Cohen AM, Chesebro JH, Toutouzas PK (2000) Prevalence of autoantibodies against contractile proteins in coronary artery disease and their clinical implications. *The American journal of cardiology* 85:870-2, A6, A9. doi:10.1016/s0002-9149(99)00883-8

Dargie H (2005) Heart failure post-myocardial infarction: a review of the issues. *Heart (British Cardiac Society)* 91 Suppl 2:ii3-6; discussion ii31, ii43-8. doi:10.1136/hrt.2005.062018

Dixon IMC, Ju H, Reid NL, Scammell-La Fleur T, Werner JP, Jasmin G (1997) Cardiac Collagen Remodeling in the Cardiomyopathic Syrian Hamster and the Effect of Losartan. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29:1837–1850. doi:10.1006/jmcc.1997.0420

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM (1995) Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circulation research* 77:863–868. doi:10.1161/01.res.77.5.863

Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT (2000) Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 106:55–62. doi:10.1172/JCI8768

Ertl G, Frantz S (2005a) Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 66:22–32. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.011

Ertl G, Frantz S (2005b) Wound model of myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288:H981-3. doi:10.1152/ajpheart.00977.2004

Frangogiannis NG (2015) Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Cardiology* 30:240–245. doi:10.1097/HCO.000000000000158

Frantz S, Bauersachs J, Ertl G (2009) Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular research* 81:474–481. doi:10.1093/cvr/cvn292

Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G (1993) Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87:755–763. doi:10.1161/01.cir.87.3.755

- Gaudron PD, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C, Ertl G (2001) Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *undefined*
- Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF (1996) Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *The American Journal of Pathology* 148:1639–1648
- Harel-Adar T, Ben Mordechai T, Amsalem Y, Feinberg MS, Leor J, Cohen S (2011) Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:1827–1832. doi:10.1073/pnas.1015623108
- Henson PM (2005) Dampening inflammation. *Nature immunology* 6:1179–1181. doi:10.1038/ni1205-1179
- Herold G (Hrsg) (2015) *Innere Medizin 2015; Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Selbstverl., Köln
- Hofmann U, Frantz S (2016) Role of T-cells in myocardial infarction. *European heart journal* 37:873–879. doi:10.1093/eurheartj/ehv639
- Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S (2012) Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 125:1652–1663. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164
- Janicki JS, Brower GL, Henegar JR, Wang L (1995) Ventricular remodeling in heart failure: the role of myocardial collagen. *Advances in experimental medicine and biology* 382:239–245. doi:10.1007/978-1-4615-1893-8_24
- Kaya Z, Katus HA, Rose NR (2010) Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 134:80–88. doi:10.1016/j.clim.2009.04.008
- Keppner L, Heinrichs M, Rieckmann M, Demengeot J, Frantz S, Hofmann U, Ramos G (2018) Antibodies aggravate the development of ischemic heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 315:H1358-H1367. doi:10.1152/ajpheart.00144.2018
- Krum H, Teerlink JR (2011) Medical therapy for chronic heart failure. *The Lancet* 378:713–721. doi:10.1016/S0140-6736(11)61038-6
- Li Y (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular research* 46:214–224. doi:10.1016/S0008-6363(00)00003-1
- Li YY, Feng YQ, Kadokami T, McTiernan CF, Draviam R, Watkins SC, Feldman AM (2000) Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12746–12751. doi:10.1073/pnas.97.23.12746

- Lindahl B, Venge P, Eggers KM, Gedeborg R, Ristiniemi N, Wittfooth S, Pettersson K (2010) Autoantibodies to cardiac troponin in acute coronary syndromes. *Clinica Chimica Acta* 411:1793–1798. doi:10.1016/j.cca.2010.08.005
- Lv H, Havari E, Pinto S, Gottumukkala RVSRK, Cornivelli L, Raddassi K, Matsui T, Rosenzweig A, Bronson RT, Smith R, Fletcher AL, Turley SJ, Wucherpfennig K, Kyewski B, Lipes MA (2011) Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 121:1561–1573. doi:10.1172/JCI44583
- McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W (1986) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 74:693–702. doi:10.1161/01.cir.74.4.693
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 204:3037–3047. doi:10.1084/jem.20070885
- Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010) Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121:2437–2445. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346
- Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW (1987) Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 139:3630–3636
- O'Donohoe TJ, Schrale RG, Ketheesan N (2016) The role of anti-myosin antibodies in perpetuating cardiac damage following myocardial infarction. *International journal of cardiology* 209:226–233. doi:10.1016/j.ijcard.2016.02.035
- Parker DC (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology* 11:331–360. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.001555
- Pfeffer MA, McMurray JJV, Velazquez EJ, Rouleau J-L, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM (2003) Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *The New England journal of medicine* 349:1893–1906. doi:10.1056/NEJMoa032292
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E (1991) Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *The American journal of physiology* 260:H1406-14. doi:10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1406
- Pummerer CL, Luze K, Grässl G, Bachmaier K, Offner F, Burrell SK, Lenz DM, Zamborelli TJ, Penninger JM, Neu N (1996) Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *The Journal of clinical investigation* 97:2057–2062. doi:10.1172/JCI118642
- Rieckmann M, Delgobo M, Gaal C, Büchner L, Steinau P, Reshef D, Gil-Cruz C, Ter Horst EN, Kircher M, Reiter T, Heinze KG, Niessen HW, Krijnen PA, van der Laan AM, Piek JJ, Koch C, Wester H-J, Lapa C, Bauer WR, Ludewig B, Friedman N, Frantz S, Hofmann U, Ramos GC (2019) Myocardial infarction triggers cardioprotective antigen-

specific T helper cell responses. *The Journal of clinical investigation* 130.
doi:10.1172/JCI123859

Sattler S, Kennedy-Lydon T (Hrsg) (2017) *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*. Springer International Publishing, Cham

Scheerder IK de, Buyzere M de, Delanghe J, Maas A, Clement DL, Wieme R (1991) Humoral immune response against contractile proteins (actin and myosin) during cardiovascular disease. *European heart journal* 12 Suppl D:88–94.
doi:10.1093/eurheartj/12.suppl_d.88

Smith SC, Allen PM (1992) Expression of myosin-class II major histocompatibility complexes in the normal myocardium occurs before induction of autoimmune myocarditis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9131–9135. doi:10.1073/pnas.89.19.9131

Störk S, Boivin V, Horf R, Hein L, Lohse MJ, Angermann CE, Jahns R (2006) Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *American heart journal* 152:697–704. doi:10.1016/j.ahj.2006.05.004

Tang T-T, Yuan J, Zhu Z-F, Zhang W-C, Xiao H, Xia N, Yan X-X, Nie S-F, Liu J, Zhou S-F, Li J-J, Yao R, Liao M-Y, Tu X, Liao Y-H, Cheng X (2011) Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic research in cardiology* 107:232. doi:10.1007/s00395-011-0232-6

Taqueti VR, Mitchell RN, Lichtman AH (2006) Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Annual review of physiology* 68:67–95.
doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.124611

Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 13:1637–1652.
doi:10.1016/0735-1097(89)90360-4

Weirather J, Hofmann UDW, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, Ertl G, Kerkau T, Frantz S (2014) Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303895

Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M (2013) Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 62:24–35. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.023

Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, Dumeau E, Kotti S, Bruneval P, Charo IF, Binder CJ, Danchin N, Tedgui A, Tedder TF, Silvestre J-S, Mallat Z (2013) B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature medicine* 19:1273–1280. doi:10.1038/nm.3284

7 Thesen

1. Grundsätzlich besteht eine Autoimmunität gegen das kardiale Myosin.
2. Nicht nur Myosin, sondern auch andere Bestandteile des Myokards werden als Autoantigene vom Immunsystem erkannt.
3. Diese Arbeit soll untersuchen, welche Auswirkungen eine verstärkte herzspezifische Immunantwort auf die Heilungsphase des Myokards nach einem MI hat.
4. Die Immunisierung von männlichen Balb/c Wt Mäusen mit dem kompletten Herzextrakt oder mit kardialem Myosin induziert eine Autoimmunantwort.
5. Die Immunisierung mit Herzextrakt 7 Tage vor einem experimentellen MI bedingt eine Zunahme der Infarktgröße an Tag 7 nach dem MI.
6. Die Immunisierung mit Herzextrakt 7 Tage vor einem experimentellen MI induziert eine signifikant erhöhte Expression der Gene *MMP2*, *MMP9* und *Col1a1* im Infarktgebiet an Tag 7 nach dem MI, welche das kardiale Remodeling fördern.
7. Die Immunisierung mit Myosin scheint eher eine protektive Immunantwort über die Aktivierung von Myosin-spezifischen T-Zellen zu induzieren.

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Bedeutung einer verstärkten herzspezifischen Autoimmunantwort nach einem experimentellen Myokardinfarkt bei Mäusen“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Berlin, 22.06.2020

Charlotte Koch

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch an einer anderen Fakultät oder Universität unternommen habe und dass kein anderer Promotionsversuch an einer anderen Universität läuft.

Berlin, 22.06.2020

Charlotte Koch

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Hofmann sowie Herrn PhD Gustavo Ramos, die mir die Arbeit anvertraut haben. Ich erhielt jederzeit wertvolle Ratschläge und in ihnen habe ich hilfsbereite Ansprechpartner gefunden. Die Zeit im Labor werde ich stets in guter Erinnerung behalten.

Weiterhin danke ich Herrn Max Rieckmann, Frau Susanne Koch und Frau Claudia Pilowski für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Oma Uschi, sowie meinem Freund Jannes, die mich immer während meines Studiums bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.