

**Entzündliche Faktoren und Blutplättchen im experimentellen
myokardialen ischämischen Schaden**

**Inflammatory factors and blood platelets in experimental
myocardial ischemic injury**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Christina Elisabeth Pachel

aus

Ludwigshafen am Rhein

Würzburg, 2014

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: **Professor Dr. Thomas Hünig**

1. Betreuer: **Professor Dr. Stefan Frantz**

2. Betreuer: **Professor Dr. Thomas Dandekar**

3. Betreuer: **Professor Dr. Manfred Gessler**

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2010 bis Dezember 2012 in der Kardiologischen Abteilung der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg, und in der Zeit von Januar 2013 bis März 2013 in der Feinberg School of Medicine der Northwestern University in Chicago, U.S.A. angefertigt.

Danken möchte ich

allen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben und zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Stefan Frantz, der mich in sein Team aufgenommen hat. Bedanken möchte ich mich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die intensive Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und die stets hilfreichen Anregungen. Auch bin ich sehr dankbar für seine großartige Unterstützung und dafür, dass er mir so viel während meiner Promotion ermöglicht hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen weiteren Betreuern der Promotion Herrn Professor Dr. Thomas Dandekar und Professor Dr. Manfred Gessler herzlich bedanken, die mich während den drei Jahren sehr hilfsbereit und fördernd unterstützten. Auch möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Hünig für die Übernahme des Vorsitzes des Promotionskomitees bedanken.

Herrn Professor Dr. Georg Ertl, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Würzburg, danke ich, dass ich meine Doktorarbeit an seiner Klinik durchführen durfte.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Arbeitskollegen der Translationalen Herzinfarktforschung für die schöne Zeit und für ihre offene und hilfsbereite Art. Für die großartige Unterstützung und Hilfe während meiner Promotion gilt mein Dank insbesondere Barbara Bayer, Charlotte Dienesch, Anna Frey, Ulrich Hofmann, Susanne Knorr, Denise Mathes, Sandra Umbenhauer und Helga Wagner.

Auch möchte ich mich sehr bei meinen Kooperationspartnern bedanken, durch deren Einsatz und Hilfe die Projekte erst möglich wurden. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Harald Wajant und seiner Arbeitsgruppe, wobei insbesondere Isabell Lang, Steffen Salzmann und Andrea Fick mir eine große Hilfe waren, sowie Herrn Professor Dr. Bernhard Nieswandt und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Viola Lorenz, Timo Vögtle und Frauke May. Auch gilt mein Dank Paula Arias aus der

Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Heinz-Theodor Pelzer und Yasmin Habbaba aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Jochen Tillmanns.

Besonders möchte ich hier auch die Arbeitsgruppe von Professor Dr. Hossein Ardehali, an der Feinberg School of Medicine, Northwestern University in Chicago, U.S.A., nennen, die mich bei meinem Forschungsaufenthalt herzlich willkommen hießen und mich bei meinen *in vitro* Experimenten unterstützen.

Für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsaufenthalts an der Feinberg School of Medicine in Chicago, U.S.A., gilt mein ausdrücklicher Dank Boehringer Ingelheim für die Gewährung eines Travel Grants.

Privat danke ich im Besonderen meinen lieben Eltern, die mir nicht nur mein Studium ermöglichten, sondern die mich bei all meinen Entscheidungen immer unterstützt haben. Ganz besonders seien hierbei meine Mutter und Martin genannt, die mir bei meinem Examen, meiner Diplomarbeit und Doktorarbeit immer zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	6
3.1. Der Myokardinfarkt	6
3.1.1. Ursachen und Pathogenese des Myokardinfarkts	6
3.1.2. Ischämie-Reperfusion (IR) und Reperfusionsschäden	8
3.1.3. Wundheilung und myokardiales Remodelling	9
3.1.4. Immunsystem und Wundheilung nach Myokardinfarkt	11
3.2. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)	13
3.2.1. TWEAK in ischämischen Erkrankungen	14
3.2.2. Aktivierung des nuclear factor kappa B-Signalwegs durch TWEAK	16
3.3. Blutplättchenproteine als Zielstrukturen im Myokardinfarkt	18
3.3.1. Blutplättchen und Hämostase	18
3.3.2. Blutplättchenhemmung nach Myokardinfarkt	21
3.3.3. Das Glykoprotein GPIb	21
3.3.4. Das Glykoprotein GPVI	22
3.3.5. STIM1 und Orai1	23
4. Problemstellung	25
5. Material	26
5.1. Chemikalien- und Reagenzienliste	26
5.2. Kits, Arrays und ELISA	28
5.3. Primärantikörper und Proteine	29
5.4. Sekundärantikörper	30
5.5. qRT-PCR TaqMan-Sonden	30
5.6. Puffer und Medium	30
5.7. Eukaryotische Zellen	31
5.8. Lösungen und Puffer	31
5.9. Geräte und Zubehör	34
6. Methoden	35
6.1. <i>In vivo</i> Experimente	35
6.1.1. Versuchstiere	35
6.1.2. Ischämie-Reperfusionsmodell und experimenteller Myokardinfarkt	35
6.1.3. Behandlungsschema	36
6.1.4. Echokardiographie	37
6.1.5. Bestimmung von kardialen Rupturen	37
6.1.6. Organentnahme	38
6.2. Histologie	39
6.2.1. Präparation des histologischen Materials	39
6.2.2. Infarktgrößenbestimmung mit Piko-Siriusrot	40
6.3. Immunhistologie	40
6.4. ELISA von TWEAK im Blutserum	42

6.5. RNA Isolation aus Mausgewebe	43
6.6. RNA-Quantifizierung und -Integritätsbestimmung	44
6.7. qRT-PCR.....	45
6.8. Infarktgrößenbestimmung mit Evans Blue/TTC-Färbung	46
6.9. Mikrozirkulationsmessung.....	47
6.10. Gelatine Zymographie	48
6.11. Zytokin Protein Array	49
6.12. Bioinformatische Analyse des Zytokin Protein Arrays	50
6.13. Durchflusszytometrie von Gewebsleukozyten.....	50
6.14. Depletion von Neutrophilen.....	51
6.15. <i>In vitro</i> Experimente.....	52
6.15.1. Zelllinien	52
6.15.2. Isolation von primären kardialen Mausfibroblasten	52
6.15.3. Isolation von primären kardialen Mausmyozyten	52
6.15.4. Zellvitalitätsbestimmung	53
6.15.5. Durchflusszytometrie von Zellen.....	54
6.15.6. TWEAK-Gaussia-Bindungsassay mit humanen kardialen Fibroblasten	54
6.15.7. Western blot Analyse.....	55
6.15.8. MTT Zellvitalitätstest.....	56
6.15.9. Kristallviolett Test	56
6.16. Statistische Analyse.....	57
7. Ergebnisse	58
7.1. TWEAK und Fn14 im Myokardinfarkt.....	58
7.1.1. Expression von TWEAK und Fn14 nach Myokardinfarkt.....	58
7.1.2. Funktionalität des Fn14-Signalweges in humanen kardialen Fibroblasten	60
7.1.3. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf das Überleben nach Myokardinfarkt.....	63
7.1.4. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf die extrazelluläre Matrix	65
7.1.5. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf die Immunreaktion nach Myokardinfarkt.....	68
7.1.6. Neutrophile und kardiale Rupturen	72
7.2. Blutplättchenhemmung im myokardialen IR-Schaden.....	74
7.2.1. Effekte von anti-GPIIb/-GPVI-Antikörpern und STIM1/Orai1 KO im IR-Modell	74
7.2.2. Wirkungen einer GPVI-Hemmung auf die Mikrozirkulation	75
7.2.3. Effekte von anti-GPIIb-/anti-GPVI-Antikörpern auf die Inflammation nach IR.....	77
8. Diskussion.....	81
8.1. Das TWEAK-Fn14-System im Myokardinfarkt	81
8.2. Blutplättchen als therapeutische Zielstrukturen im Modell der IR	86
8.3. Ausblick.....	89
9. Literaturverzeichnis	91
10. Anhang.....	103
10.1. Abkürzungen	103
10.2. Publikationsliste.....	107
10.3. Lebenslauf	108
10.4. Eidesstattliche Erklärung	109

1. Zusammenfassung

Die erfolgreiche therapeutische Beeinflussung pathophysiologischer Prozesse im Herzen nach myokardialem Infarkt stellt nicht zuletzt durch die steigenden Fallzahlen in der westlichen Welt und die vergleichsweise hohe Mortalität eine Herausforderung an Forschung und Entwicklung dar. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene therapeutische Strategien in klinisch relevanten Mausmodellen des Myokardinfarkts und des Ischämie-Reperfusionsschadens getestet.

Zunächst wird untersucht, ob sich der Einsatz des NFκB-aktivierenden Zytokins TWEAK, welches weitreichende Funktionen in physiologischen Prozessen wie Wundheilung und Entzündung besitzt, als eine mögliche Therapiestrategie eignet. Die Expression von TWEAK wird nach myokardialem Infarkt stark im Herzgewebe induziert. Das gleiche gilt für den Rezeptor von TWEAK, Fn14, der vor allem auf kardialen Fibroblasten exprimiert wird. Daher wird angenommen, dass das TWEAK-Fn14-System am kardialen Remodelling und der Wundheilung im infarzierten Herzen beteiligt sein kann.

Eine rekombinante Variante von TWEAK - HSA-Flag-TWEAK - wird im Mausmodell des Myokardinfarkts getestet. Überraschenderweise zeigt sich hierbei, dass die therapeutische Behandlung von infarzierten Versuchstieren mit diesem Protein die Mortalität im Vergleich zu Placebo-behandelten Mäusen signifikant erhöht. Dies geht mit einem vermehrten Auftreten an linksventrikulären Rupturen einher, ohne dass Defekte im kardialen Remodelling oder eine erhöhte Apoptoserate im Herzen festgestellt werden können. HSA-Flag-TWEAK bewirkt eine Erhöhung der Gewebekonzentrationen an verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen (IFN-γ, IL-5, IL-12, G-ITR, MCP-1/-5 und RANTES) und das vermehrte Einwandern von Immunzellen in das Myokard. Hierbei ist insbesondere die stark erhöhte Infiltration an neutrophilen Granulozyten auffällig. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Immunzellen und den auftretenden kardialen Rupturen kann durch die Depletion der Neutrophilen gezeigt werden: Nach der systemischen Applikation eines Ly6G-depletierenden Antikörpers ist das Auftreten von kardialen Rupturen nach TWEAK-Gabe vergleichbar mit der Placebo-behandelten Infarktgruppe. Die Tatsache, dass die Mortalität dennoch erhöht ist, deutet auf weitere negative Effekte durch TWEAK hin. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Hemmung der TWEAK-Fn14-Achse positive Effekte auf die Wundheilung nach Herzinfarkt bewirken könnte.

Als zweite Therapiestrategie wird die pharmakologische Beeinflussung verschiedener Blutplättchen-spezifischer Zielstrukturen untersucht, um das Auftreten von Mikrothromben nach Myokardinfarkt zu reduzieren. Eine Hemmung über das Blutplättchen-Glykoprotein GPVI bewirkt in dem hier eingesetzten Mausmodell der kardialen Ischämie-Reperfusion eine signifikant verbesserte Mikrozirkulation sowie verringerte Infarktgrößen. GPVI stellt somit ein vielversprechendes Ziel für eine blutplättchenhemmende Therapie nach Myokardinfarkt dar.

Zusammengefasst werden in der vorliegenden Arbeit verschiedene neuartige Therapieoptionen untersucht, die die Auswirkungen ischämischer Erkrankungen des Herzens beeinflussen können. Die Ergebnisse besitzen daher das Potenzial, zur Entwicklung neuer Therapien nach Myokardinfarkt beizutragen.

2. Summary

The successful therapeutic targeting of pathophysiological processes in the heart is of importance for the treatment of patients suffering from myocardial infarction. Due to the combination of the rising incidence of this disease in Western countries with its comparably high mortality, novel therapies need to be developed. In the work presented here, several innovative concepts are tested in clinically relevant mouse models of myocardial infarction and ischemia-reperfusion injury.

First, the feasibility of using the NF κ B-activating cytokine TWEAK as a novel drug in the treatment of myocardial infarction is assessed. TWEAK is involved in wound healing and inflammation and might therefore play a pivotal role in cardiac remodelling and the outcome after myocardial infarction. The expression of this cytokine within the infarcted heart is significantly up-regulated as is the expression of the TWEAK receptor Fn14, which is mainly expressed on cardiac fibroblasts.

A recombinant variant of this cytokine - HSA-Flag-TWEAK - is used to treat infarcted mice in order to assess whether exogenous TWEAK modulates the pathologic events following ischemic cardiac injury. Surprisingly, the treatment of infarcted test animals with HSA-Flag-TWEAK results in significantly increased mortality compared to placebo-treated mice. This is accompanied with an increased incidence in left ventricular cardiac ruptures without apparent defects in cardiac remodelling or increased rates of cardiac apoptosis. Treatment with HSA-Flag-TWEAK increases tissue levels of several pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-5, IL-12, GITR, MCP-1/-5 and RANTES) and elevates the numbers of immune cells within the myocardium. In particular, the infiltration of neutrophilic granulocytes is markedly increased. Employing Ly6G-depleting antibodies *in vivo* proves neutrophils to be a causal factor in the occurrence of cardiac ruptures following HSA-Flag-TWEAK treatment. Depletion of these cells results in a reduction of cardiac rupture incidences to baseline values. Nevertheless, mice treated with HSA-Flag-TWEAK still show increased mortalities, irrespective of being proficient or deficient for neutrophils. This implies further negative mechanisms induced by the activation of the TWEAK-Fn14 axis in this experimental setting and might pave the way for the development of therapies neutralizing or blocking TWEAK as a novel means to improve the outcome after myocardial infarction.

As a second therapeutic strategy, several platelet-specific proteins are targeted in a mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury to reduce the incidence of microthrombi after myocardial infarction. Inhibiting the platelet glycoprotein GPVI results in significantly improved microcirculation and decreased infarct sizes. Platelet inhibition by targeting GPVI might therefore be a promising novel therapeutic strategy after myocardial infarction.

In summary, a number of innovative therapeutic strategies targeting different molecular structures are tested here and the results of this study may contribute to the development of novel therapies after myocardial infarction.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Veröffentlichungen:

Pachel C, Mathes D, Barbara Bayer, Charlotte Dienesch, Gaby Wangorsch, Wolfram Heitzmann, Isabell Lang, Hossein Ardehali, Georg Ertl, Thomas Dandekar, Harald Wajant, Stefan Frantz. Exogenous Administration of a Recombinant Variant of TWEAK Impairs Healing after Myocardial Infarction by Aggravation of Inflammation. PLoS ONE. 2013 Nov 11; 8(11): e78938

Konferenzbeiträge:

Pachel C, Mathes D, Dienesch C, Bayer B, Umbenhauer S, Heitzmann W, Wagner H, Ertl G, Wajant H, Frantz S. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-induced recruitment of neutrophils after myocardial infarction is involved in cardiac ruptures.

DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie) Jahreskonferenz
Mannheim (Deutschland) April 2013

Pachel C, Mathes D, Arias P, Lorenz V, May F, Heitzmann W, Dienesch C, Bayer B, Umbenhauer S, Wagner H, Ertl G, Nieswandt B, Frantz S. Inhibition of platelet collagen receptor glycoprotein GPIIb/IIIa reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and associated inflammation in mice

DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie) Jahreskonferenz
Mannheim (Deutschland) April 2013

Pachel C, Mathes D, Dienesch C, Bayer B, Umbenhauer S, Lorenz V, Heitzmann W, Ertl G, Nieswandt B, Frantz S. Inhibiting platelet functions in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury

Retreat DZHI (Deutsche Zentrum für Herzinsuffizienz)
Staffelstein (Deutschland) Dezember 2012

Pachel C, Bayer B, Dienesch C, Mathes D, Wagner H, Umbenhauer S, Heitzmann W, Salzmann S, Ertl G, Wajant H, Frantz S. Depletion of Neutrophils Ablates Cardiac Ruptures after Treatment with TWEAK (Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis) in a Mouse Model of Myocardial Infarction

AHA (American Heart Association) Jahreskonferenz
Los Angeles (U.S.A.) November 2012

Pachel C, Wagner H, Bayer B, Dienesch C, Umbenhauer S, Mathes D, Heitzmann W, Salzmann S, Ertl G, Wajant H, Frantz S. TWEAK (Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis) impedes healing after myocardial infarction in mice.

BCVS (Basic Cardiovascular Sciences) Jahreskonferenz
New Orleans (U.S.A.) Juli 2012

Pachel C, Wagner H, Dienesch C, Bayer B, Heitzmann W, Salzmann S, Wajant H, Frantz S. Activation of cardiac Fn14 by tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in mice decreases survival following myocardial infarction due to cardiac rupture.

DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie) Jahreskonferenz
Mannheim (Deutschland) April 2012

3. Einleitung

Jährlich erleiden circa 300.000 Menschen in Deutschland einen Myokardinfarkt (MI)¹ - meist in den frühen Morgenstunden, wenn Blutplättchen eine erhöhte Aggregationsneigung aufweisen². Die Mortalität bei Patienten mit Herzinfarkt liegt zwischen 15 und 20 %¹, und die mit einem westlichen Lebensstil einhergehende steigende Inzidenz für diese Erkrankung stellt eine immense Herausforderung für die pharmazeutische Forschung und Entwicklung dar.

Der MI ist der letzte Schritt in einer pathologischen Kaskade, welche mit einer Reihe von Risikofaktoren wie etwa Bluthochdruck und Übergewicht beginnt, und sich über Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit (KHK) - und damit einer Mangelversorgung des Myokards - bis hin zur Herzschwäche erstreckt. In Deutschland leiden rund 1,8 Millionen Menschen an Herzschwäche³, und es besteht daher ein erheblicher Bedarf, was die Erforschung der Ursachen für Herzschwäche und die Entwicklung neuer Therapien anbelangt.

3.1. Der Myokardinfarkt

3.1.1. Ursachen und Pathogenese des Myokardinfarkts

Das Herz wird durch die Herzscheidewand, das Septum, in eine linke und eine rechte Herzkammer (Ventrikel) unterteilt. Die Wände des Herzens sind aus einer Reihe aufeinanderliegender Schichten aufgebaut, dem Endokard (Herzinnenhaut), bestehend aus Endothel und Bindegewebe, dem Myokard (Herzmuskulatur) mit quergestreifter Muskulatur, sowie den beiden Schichten des Herzbeutels (Epikard und Perikard)⁴. Das Herz besteht zu unterschiedlichen Anteilen aus verschiedenen strukturenbenden Zellpopulationen: Bei einer ausgewachsenen Maus sind dies vor allem Kardiomyozyten (56 %), kardiale Fibroblasten (27 %), Endothelzellen (7 %), sowie glatte Muskelzellen (10 %)⁵. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird durch die abwechselnde Kontraktion (Systole) und Erschlaffung (Diastole) der Herzmuskulatur eine Pumpwirkung erzeugt, wodurch der Organismus mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird⁶. Wird der Herzmuskel im Zuge der KHK nicht mehr ausreichend durchblutet, kommt es zum Untergang des Gewebes und einer damit einhergehenden Abnahme der Pumpleistung des Herzens, was letztendlich schädliche Folgen für den gesamten Körper bewirkt.

Verschiedene Risikofaktoren können zu KHK führen: Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Störungen des Lipidstoffwechsels, aber auch die genetische Prädisposition sowie Alter und Geschlecht spielen eine Rolle⁷.

Eine atherosklerotische Läsion beginnt mit einer Akkumulation von Plasmalipiden in der Intima, der innersten Schicht der Gefäßwand. Durch Matrixkomponenten werden diese Lipoproteine modifiziert und verweilen deshalb länger in der Intima. Als eine Antwort auf die oxidierten Low Density Lipoproteine (LDL) und die vermehrte Produktion von Chemokinen, werden endotheliale Adhäsionsmoleküle gebildet, die zu einem erhöhten Influx von Leukozyten und Monozyten in den subendothelialen Raum führen. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen und schließlich nach der Aufnahme der Lipoproteine zu Schaumzellen. Durch den Untergang dieser Schaumzellen kommt es zur extrazellulären Ablagerung weiterer Lipide, die Bestandteil des atherosklerotischen Plaques werden und somit ein ständiges Wachsen der Läsionen bewirken⁸. Die Plaques in den Blutgefäßen können instabil werden und aufbrechen. Es kommt zur Anlagerung von Blutplättchen und damit zur Bildung eines Thrombus, welcher das Blutgefäß verschließen kann (Atherothrombose)⁹. Geschieht dieser Vorgang in den Koronararterien, kommt es zu einer Minderversorgung des Myokards (myokardiale Ischämie) oder, bei einem vollständigen Verschluss der Gefäße, zum MI.

Ein zentrales Problem in der Versorgung von Patienten mit MI stellt das kurze Zeitfenster zwischen dem Beginn der Ischämiephase und dem Ende der Einsatzmöglichkeit effektiver Therapien zur Reperfusion des Myokards dar. Dies liegt vor allem daran, dass bei Ischämie das betroffene Herzgewebe durch Nekrose irreversibel zerstört wird¹⁰ und nur ein schnelles Wiederherstellen des Blutflusses ischämisches Gewebe vor dem Untergang retten kann. Ist der Schaden nicht letal, kommt es zu einem „Remodelling“ des Herzens, einem Umbau des Myokards, das den Verlust an Gewebe auszugleichen versucht. Die „Remodelling“-Phase ist stark mit einer Infarktexpansion und ventrikulärer Dilatation verbunden¹¹ (Abbildung 1). Diese Dilatation ist eine direkte Folge der Zunahme der Kardiomyozytenlänge (Hypertrophie) als kompensatorische Antwort auf den vermehrten Untergang von Myozyten¹². Letztendlich bewirkt der MI und anschließendes „Remodelling“ eine Verringerung der linksventrikulären Herzfunktion¹³. Es kommt zu einer nachlassenden Schlagkraft und Transportfähigkeit des Herzens, was bis zum Herzversagen und Tod führen kann¹⁴.

Das schmale Zeitfenster zwischen dem Beginn der Ischämie und dem Einsetzen der Reperfusion steht im Fokus der Forschung, da hier aufgrund des noch nicht weit vorgeschrittenen Gewebeschadens Therapien am effektivsten sind.

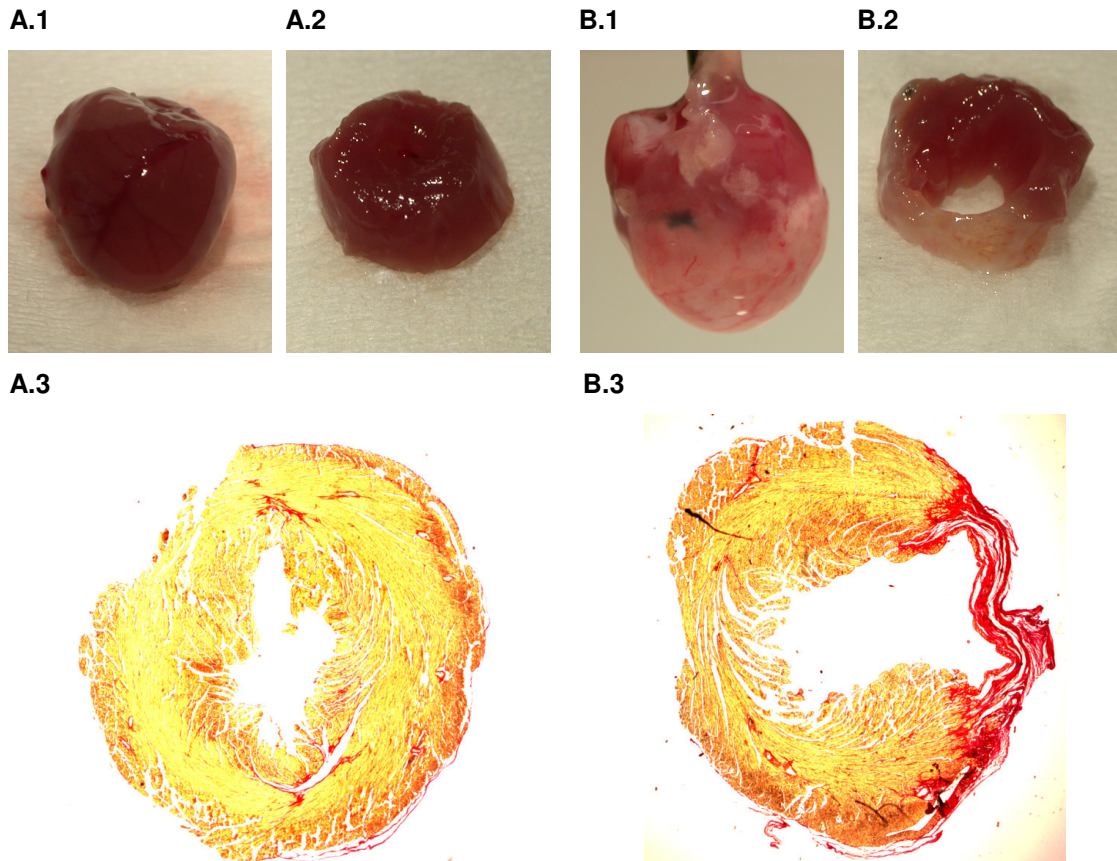


Abbildung 1. Darstellung eines normalen Mauserzes (A) und eines dilatierten Mauserzes (B) nach MI

Das intakte Herz (A.1) und dessen Querschnitt (A.2) zeigen eine normale Geometrie des Myokards ohne makroskopische Auffälligkeiten nach Kollagenfärbung mit Pikro-Siriusrot (PSR) (A.3). Das Herz einer infarzierten Maus zeigt eine starke Ausbildung von Narbengewebe (B.1) und im Bereich der Myokardnarbe ist eine Ausdünnung mit kompensatorischer sekundärer Dilatation (B.2) erkennbar. Eine PSR-Färbung zeigt in roter Farbe den Bereich des Kollagens (B.3).

3.1.2. Ischämie-Reperfusion (IR) und Reperfusionsschäden

In der Ischämiephase wird das Myokard nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt. Hierdurch kommt es nach massiven Störungen der zellulären Homöostase letztendlich zum Zusammenbruch der mitochondrialen Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese und zum Untergang der Zelle^{15,16}. Es reichen bereits 20 - 30 Minuten einer Sauerstoff-Unterversorgung des Herzens, um irreversible Gewebeschäden zu induzieren¹⁵.

Paradoxerweise führt auch die Reperfusion, also die Wiederherstellung der normalen vaskulären Versorgung, zu Gewebeschäden¹⁶. Dieses Phänomen wird als „Reperfusion injury“ bezeichnet und stellt neben der Ischämie einen weiteren ursächlichen Faktor für Herzversagen dar¹⁰. Dieser Reperfusionsschaden ist multifaktoriell bedingt und bis heute nicht abschließend aufgeklärt. Es werden lokale und systemische Entzündungsreaktionen initiiert, was unter anderem in einer Aktivierung der Blutplättchen resultiert¹⁷. Durch den plötzlich erhöhten Sauerstoffpartialdruck kommt es zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Endothelzellen und Kardiomyozyten. Diese ROS induzieren Schäden an Proteinen und DNA. Zum Einen vergrößern sie so den geschädigten Bereich des Gewebes, zum Anderen führen sie zur Infiltration von Neutrophilen und weiteren Immunzellen. Eingewanderte Neutrophile und Monozyten bzw. Makrophagen produzieren ebenfalls ROS, inflammatorische Mediatoren und Proteasen, die nun wieder selbst den kardialen Schaden verstärken^{18,19}.

3.1.3. Wundheilung und myokardiales Remodelling

An einen MI schließen sich eine Reihe von sukzessiv aufeinander folgenden Phasen an: Zunächst kommt es zu inflammatorischen Vorgängen, die durch den ischämischen Schaden ausgelöst werden, danach erfolgt die Phase der Wundheilung und als dritte Phase schließt sich die Phase des Remodellings an²⁰.

Durch den verminderten Blutfluss im Myokard während eines MI wird das Gewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt, was rasch im Tod der betroffenen Zellen resultiert - je nach Energiestatus der Zellen durch Nekrose, oder seltener durch Apoptose^{21,22}. Verschiedene Proteine, wie fatty acid binding protein (FABP), Troponin T, Kreatinkinase, skeletal-brain hybrid type (CK-MB), serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) werden beim Zelltod von Kardiomyozyten freigesetzt und können als Biomarker im Blut nach MI nachgewiesen werden. Der MI und der damit verbundene nekrotische Zelluntergang führen zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin (IL)-1 β und tumor necrosis factor (TNF), sowie Chemokinen, wie regulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES) und IL-8, die inflammatorische Prozesse provozieren, wie etwa eine Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskaden²⁰.

Die freigesetzten inflammatorischen Zytokine sind darüber hinaus für die Rekrutierung von Immunzellen in das betroffene Gewebe verantwortlich. Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen der angeborenen Immunantwort, die in den Infarktbereich einwandern. Ab Tag 2 wandern auch aus Monozyten differenzierte Makrophagen in das betroffene Myokard. Zwischen Tag 3 und Tag 5 nach MI stellen Makrophagen die größte Zellpopulation im Infarkt dar. Daran schließt sich ein Influx von Lymphozyten an²³.

Die anfänglichen inflammatorischen Prozesse, die im Falle einer Immunantwort gegen Erreger absolut essentiell sind, sorgen im Falle des MI für eine weitere Gewebsschädigung. Deshalb sind für eine optimale Wundheilung nach einer anfänglichen inflammatorischen Phase die Inhibition der Zytokinproduktion und die Beseitigung der eingewanderten inflammatorischen Zellen unabdingbar. Die infiltrierten Granulozyten gehen dann in Apoptose über. Durch die Apoptose, im Gegensatz zur Nekrose, werden anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und transforming growth factor (TGF)- β freigesetzt, die zur Initiierung der Fibrose beitragen²⁰. Durch Phagozytosen werden dann die apoptotischen Granulozyten beseitigt²⁴. Das durch den MI verwundete Herz beginnt zu heilen, die akute Entzündung klingt ab.

Da es sich bei Kardiomyozyten um terminal ausdifferenzierte Zellen handelt, haben sie die Fähigkeit zur Zellteilung verloren²⁵. Bei Säugern ist daher eine Regeneration des Myokardgewebes nicht möglich. Ein Verlust an Kardiomyozyten wird - neben der Hypertrophie verbleibender Myozyten - letztendlich durch die Bildung von Narbengewebe, welches hauptsächlich aus Kollagen besteht, kompensiert^{26,23}. Es kommt zum fibrotischen Umbau des Gewebes. Von besonderer Bedeutung für die Produktion von Kollagen im Herzen sind die kardialen Fibroblasten²⁷. Während interstitiale Fibroblasten Kollagen im intakten Myokardium synthetisieren, sind transformierte Fibroblasten, die als Myofibroblasten bezeichnet werden, bedeutend für die Prozesse der Fibrogenese nach MI^{28,29}. Myofibroblasten enthalten in ihrem Mikrofilamentenapparat Aktin und Myosin, sowie α -smooth muscle actin (α SMA)³⁰, das auch als ein Marker für Myofibroblasten gilt³¹. Die Differenzierung von Fibroblasten zu proto-Myofibroblasten wird etwa durch Zugspannung im Bindegewebe induziert³². Durch Wachstumsfaktoren und neu synthetisierte Komponenten der extrazellulären Matrix differenziert der proto-Myofibroblast zum Myofibroblast³¹.

Die normale Kollagenstruktur im Infarktareal verschwindet nach den ersten Wochen nach MI und es bildet sich über mehrere Wochen hinweg ein Narbengewebe aus. An dem Abbau der extrazellulären Matrix sind Kollagenasen, wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und aktivierte Serinproteinasen, wie Plasmin beteiligt³³. Das neu gebildete Narbengewebe besitzt eine feste Kollagenstruktur und beinhaltet nur wenige Zellen, wie Myofibroblasten²⁶. Im Langzeitverlauf kommt es nach der Narbenbildung zu Anpassungsvorgängen im ursprünglich nicht vom Infarkt betroffenen Myokard³⁴. Im Gegensatz zur Narbenbildung und zum Prozess der Ausdünnung und Dilatation des Infarktareals, das sich sehr früh, nach Tagen bis Wochen, ereignet, beginnt die Remodellingphase, die durch strukturelle Veränderungen des überlebenden Myokards charakterisiert ist, erst Monate bis Jahre später. Das kardiale Remodelling ist charakterisiert durch Myozytenhypertrophie, interstitiellen Fibrose, Kardiomyozytenapoptose und Dilatation der Herzkammer. Diese Vorgänge sind von besonderer klinischer Bedeutung: Folgen des Remodellings können eine gestörte Relaxation, Arrhythmien und kardiale Dysfunktionen sein, was mit dem vorzeitigen, häufig plötzlichen Tod der Patienten verbunden sein kann³⁵⁻³⁷.

3.1.4. Immunsystem und Wundheilung nach Myokardinfarkt

In Analogie zu Infektionen wird das Immunsystem auch nach einem kardialen Schaden aktiviert: Im Herzen wird zunächst das angeborene Immunsystem durch „Alarmsignale“ wie z.B. ROS, Fibronectin und Hitzeschockproteine (HSP) aktiviert^{38,39}. Von nekrotischen Zellen werden damage-associated molecular patterns (DAMPs) freigesetzt, die membranständige Toll-like Rezeptoren (TLR) aktivieren⁴⁰. Hierdurch bewirken die DAMPs neben einer Initiierung des Komplementsystems die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B (NFκB). Zielgene dieses Transkriptionsfaktors sind in diesem Zusammenhang unter anderem pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine⁴¹, welche in einem nächsten Schritt die Rekrutierung von inflammatorischen Leukozyten bewirken⁴².

Die Transmigration von Leukozyten in den Wundbereich benötigt eine adhäsive Interaktion mit aktivierten vaskulären Endothelzellen. Dabei werden die Leukozyten zuerst aus dem Blutstrom festgehalten und rollen dann durch Interaktionen mit Selektinen auf den Endothelzellen²⁰, bevor sie durch eine starke Adhäsion an die

Endothelzelloberfläche gebunden werden. Dies erfolgt durch eine Chemokin-induzierte Aktivierung der Integrine auf den Leukozyten, welche dann an vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 und intercellular adhesion molecule (ICAM)-1/-2 auf den Endothelzellen binden können²³. Anti-inflammatorische Programme, die etwa durch IL-10 und TGF- β initiiert werden⁴³, können die Expression von Adhäsionsmolekülen supprimieren und somit die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen reduzieren²³.

Zunächst kommt es zu einem Einwandern von Neutrophilen. Diese Zellen sind nur kurzlebig und gehen circa 3 - 7 Tage nach experimentellen MI in Mäusen und Kaninchen in die Apoptose über⁴⁴. Apoptotische Neutrophile produzieren eine Reihe von Signalmolekülen, wie Lipidmediatoren, Nukleotide, Annexin A1 und Lactoferrin, die als chemoattractants für phagozytierende Zellen dienen, aber auch die Infiltration von weiteren Neutrophilen verhindern⁴⁵. Als nächstes wandern pro-inflammatorische Monozyten in das Infarktareal ein. Diese Zellen differenzieren zu phagozytierenden Makrophagen aus und übernehmen die Beseitigung von toten Zellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix⁴⁶. In einem letzten Schritt wandern Lymphozyten in das infarzierte Gewebe ein⁴⁷.

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien beweisen, dass das Immunsystem einen integralen Bestandteil im Wundheilungsprozess darstellt, und dass einzelne Immunzellpopulationen einen Einfluss auf das Geschehen nach MI besitzen. So haben der NF κ B-⁴⁸ und der 5-Lipoxygenase-Signalweg⁴⁹, sowie Immunzellen wie CD4⁺ T Zellen⁵⁰, Makrophagen⁵¹ und Neutrophile⁵² erwiesene Effekte auf die Wundheilung nach MI. Es gilt, eine Balance zwischen der gewünschten Immunantwort und den potenziell adversen Effekten einer überschießenden Reaktion des Immunsystems zu finden. Die effektive Bildung von Narbengewebe muss gewährleistet werden, wobei eine zu stark verlaufende Inflammation zum Abbau von Matrixkomponenten führen kann, was letztendlich in kardiale Rupturen enden kann⁵³. Auch können pro-inflammatorische Mediatoren zu einer erhöhten Aktivierung von pro-apoptotischen Signalwegen in Kardiomyozyten führen²³. Die gezielte Immunmodulation kann aus diesen Gründen ein innovativer therapeutischer Ansatz in der Behandlung kardiologischer Erkrankungen darstellen.

3.2. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Das Zytokin Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) ist ein Mitglied der TNF Ligandensuperfamilie mit Funktionen in Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, und Angiogenese⁵⁴. TWEAK kommt darüber hinaus eine Beteiligung an der Wundheilung⁵⁵, der ischämischen Toleranz⁵⁶ sowie inflammatorischen Prozessen^{57,58} zu. TWEAK wird als Typ II Transmembranprotein exprimiert und durch Furin-ähnliche Proteasen in seine lösliche Form (sTWEAK) prozessiert⁵⁹. Die 249 Aminosäuren lange membrangebundene Form besteht aus einer charakteristischen C-terminalen TNF-homologen Domäne (THD), einer stalk Region, einer Transmembrandomäne sowie einem kurzen intrazellulären Teil. Wie in anderen Mitgliedern der TNF Familie ist die THD Region für die Bildung von homotrimeren Proteinen und für die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren verantwortlich, wohingegen die stalk Region als Erkennungsstelle für Proteasen dient. Die kurze N-terminale Domäne von TWEAK ist konserviert, doch die Funktion ist noch unklar⁶⁰.

Die biologischen Funktionen von TWEAK werden durch dessen Bindung an seinen Rezeptor fibroblast growth factor-inducible molecule 14 (Fn14) vermittelt. Fn14 wurde im Jahr 1999 als Transkriptionszielgen des fibroblast growth factor (FGF)-1 in NIH3T3 Fibroblasten entdeckt⁶¹ und im Jahr 2001 als ein Mitglied der TNF Rezeptorfamilie identifiziert⁶². Mit einem Molekulargewicht von 14 kDa ist Fn14 ein sehr kleines Mitglied dieser Proteinfamilie⁶². Es besitzt eine Cystein-reiche Domäne (CRD) in der Ektodomäne⁶³ und ein TNF receptor associated factors (TRAF)-bindendes Motiv in der nur 28 Aminosäurereste langen cytoplasmatischen Domäne. Fn14 wird daher zu den TRAF-interacting TNF receptors gezählt. Die Bindung von TWEAK an Fn14 aktiviert neben dem klassischen und dem alternativen NFκB-Signalweg⁶⁴ (siehe unten) auch den mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg⁶⁵.

TWEAK erhielt seinen Namen ursprünglich aufgrund seiner Zelltod-induzierenden Wirkung in mit INF-γ vorbehandelten HT29 Zellen⁵⁹. Die pro-apoptotische Wirkung von TWEAK wird dabei jedoch vermutlich nicht direkt über Fn14 vermittelt, da der Rezeptor selbst keine Todesdomäne besitzt. Als zugrunde liegender Mechanismus wird diskutiert, dass zum Einen TWEAK die Expression von TNF induziert und somit über eine Aktivierung des TNF Rezeptors Typ 1 (TNFR1) indirekt Apoptose induziert.

Zum Anderen bewirkt die Aktivierung von Fn14 eine Rekrutierung von TRAF2 und somit eine intrazelluläre Depletion dieses Proteins. Hierdurch wird die Zelle zusätzlich gegenüber TNF-induzierter Apoptose sensibilisiert^{66,67}. Der pro-apoptotische Effekt von TWEAK kann jedoch nicht in kortikalen Neuronen oder normalen menschlichen Keratinozyten^{68,69} gezeigt werden.

Die Expression von TWEAK mRNA kann in vielen Zelltypen und Zelllinien nachgewiesen werden, wobei eine Proteinexpression von TWEAK nur auf der Zelloberfläche von Monozyten, dendritischen Zellen, mit INF- γ stimulierten natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und einigen Krebszellen gezeigt werden kann⁶⁰. Eine Induktion der TWEAK-Expression wird nach Gewebeschädigungen und Hypoxie beobachtet, mit einer vermuteten Beteiligung des forkhead transcription factors FoxO3a sowie INF- γ ⁷⁰. Auch wird TWEAK nach MI stark hochreguliert⁷¹.

Die Kontrolle des TWEAK-Fn14-Systems erfolgt insbesondere durch die transkriptionelle Regulation von Fn14. Im gesunden, adulten Organismus wird dieser Rezeptor nur sehr wenig auf Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Nach Gewebsschäden durch Hypoxie, oxidativen Stress, chemischen und mechanischen Reizen, sowie im Rahmen von entzündlichen Prozessen ist die Expression von Fn14 massiv erhöht^{72,73}. Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie epidermal growth factor (EGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF), sowie Zytokine wie INF- γ , TNF und TGF- β , die von Immunzellen im Prozess der Wundheilung freigesetzt werden, können Fn14 induzieren⁷⁴⁻⁷⁶. Ferner wird Fn14 auf den meisten Tumorzelllinien nicht-lymphoiden Ursprungs exprimiert⁷⁷.

3.2.1. TWEAK in ischämischen Erkrankungen

Das Herz ist sehr sensitiv gegenüber inflammatorischen Prozessen. TNF sowie andere pro-inflammatorische Zytokine werden im normalen Herz nicht konstitutiv exprimiert⁷⁸. Die durch einen MI induzierten Vorgänge im Herzgewebe führen jedoch zu einer stark erhöhten Expression dieser Faktoren⁷⁹, was mit negativen Auswirkungen auf das kardiale Remodelling assoziiert ist^{79,80}. Am besten untersucht sind die Wirkungen des pro-inflammatorischen Zytokins TNF: Die chronische Infusion von Ratten mit TNF führt zu LV Kontraktionsstörungen und zu kardialer Dilatation⁸¹. Mäuse, die TNF im Myokard überexprimieren, weisen systolische Dysfunktionen, kardiale Inflammation, ventrikuläre Dilatation und eine erhöhte Mortalität auf⁸². Diese

Studien zeigen eindrücklich, dass TNF adverse Wirkungen im Herzen besitzt, die den Geschehnissen nach MI stark ähneln. Jedoch ist ungeklärt, ob diese Effekte direkt durch TNF, oder indirekt, etwa durch das Einwandern von Immunzellen vermittelt werden.

TWEAK und vor allem Fn14 werden beide als eine Antwort auf Gewebeverletzungen gebildet⁷³ und etwa nach experimentellem ischämischen Schlaganfall (MCAO) in Mäusen stark exprimiert^{68,83}. Dasselbe gilt für Schlaganfallpatienten, bei denen ebenfalls eine erhöhte Expression von Fn14 im Infarktareal vorzufinden ist⁸⁴. Im Mausmodell der zerebralen Ischämie werden sowohl TWEAK als auch Fn14 vermehrt an der Grenzfläche zwischen der Basalmembran von Endothelzellen und Astrozyten gebildet⁸⁵. Die bisherige Datenlage lässt keine eindeutigen Schlüsse zu, ob das TWEAK-Fn14-System adverse oder protektive Wirkungen im zerebralen Infarkt bewirkt. In Fn14 Knock-out (KO) Mäusen zeigt sich eine Reduzierung der Infarktgröße nach MCAO⁸³. Die Ursachen hierfür kann sein, dass TWEAK Zelltod in durch Ischämie gestressten kortikalen Neuronen induziert und durch eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (durch MMP9 vermittelt⁸⁶) die Infiltration von Neutrophilen verstärkt⁶⁸. Im Gegensatz hierzu bewirkt exogen appliziertes lösliches TWEAK hypoxische und ischämische Toleranz *in vitro* und *in vivo*, was in Abhängigkeit von Fn14 durch eine Verringerung an ischämischen Läsionen nach Verschluss der mittleren Zerebralarterie charakterisiert ist. Dieser Effekt ist durch TNF α , extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 und B cell lymphoma 2-associated death promoter (BAD)-Phosphorylierung vermittelt⁵⁶.

Die Funktionen von TWEAK in kardiovaskulären Erkrankungen sind noch wenig durch experimentelle Studien belegt. Niedrige TWEAK-Konzentrationen bei Patienten mit nicht-ischämischem Herzversagen sind mit einer höheren Mortalität verbunden⁸⁷. Bei chronischem, stabilem Herzversagen sind die Plasmagehalte an TWEAK ebenfalls signifikant reduziert⁸⁸. *In vitro* Studien mit neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigen, dass FGF-1, Norepinephrine und Angiotensin II, sowie mechanische Dehnung die Expression von Fn14 Expression induzieren. Die Stimulation von Kardiomyozyten mit TWEAK führt zur nuklearen Translokation von NF κ B und zur Induktion von Genen wie etwa RANTES und MCP-1⁷¹. In einer Studie von Jain und Kollegen resultierte die ektopische Überexpression von membrangebundenem TWEAK in dilatierter Kardiomyopathie und kardialen Dysfunktionen in Mäusen. Dies war mit einer Elongation der Kardiomyozyten und

kardialer Fibrose assoziiert, nicht jedoch mit vermehrter Apoptose der Kardiomyozyten⁸⁹. TWEAK kann die Proliferation und NFκB-abhängige Kollagensynthese in neonatalen kardialen Fibroblasten von Ratten stimulieren⁹⁰, was die fibrotische Wirkung dieses Zytokins in der Studie von Jain et al. erklärt. Fn14-defiziente Mäuse zeigen eine geringere Expression von Kollagen und eine geringere Differenzierung von Myofibroblasten in einem *in vivo* Modell der RV Fibrose und Dysfunktion durch das Abbinden der Pulmonalarterie⁹¹.

Für die Untersuchung einer potentiellen Wirkung von TWEAK auf die Geschehnisse nach experimentellem MI, wurde in der Arbeitsgruppe von Harald Wajant eine Proteinvariante entwickelt, die durch die Bindung von humanem Serumalbumin (HSA) an das rekombinante Flag-TWEAK-Molekül (HSA-Flag-TWEAK) eine im Vergleich zur nativen Variante 20-fach erhöhte Retentionszeit im Blutstrom *in vivo* besitzt. Die Bioaktivität der HSA-Variante, gemessen über Apoptose-Induktion und p100-Prozessierung, ist vergleichbar mit dem Protein ohne HSA-Bindung⁹².

3.2.2. Aktivierung des nuclear factor kappa B-Signalwegs durch TWEAK

Die Aktivierung von nuclear factor kappa B (NFκB) durch TWEAK kann durch den klassischen oder alternativen Signalweg erfolgen. Die lösliche Form von TWEAK kann den klassischen NFκB Signalweg nur schwach und verzögert aktivieren, wohingegen der alternative NFκB Signalweg stark aktiviert wird. Membrangebundenes TWEAK kann dagegen beide Signalwege stark aktivieren. Roos et al. zeigten, dass lösliches TWEAK, welches künstlich an einer Zelloberfläche immobilisiert ist, aus einem schwachen zu einem starken Aktivator des klassischen NFκB Signalweg mit nur geringer Aktivierungskapazität für den alternativen NFκB Signalweg wird⁶⁴. Auch kann lösliches TWEAK durch eine künstliche Dimerisierung oder Oligomerisierung in einen starken Aktivator des klassischen NFκB Signalweg umgewandelt werden⁶⁰.

In Säugerzellen besteht die Genfamilie der NFκB-Transkriptionsfaktoren aus fünf Mitgliedern, die für die Proteinuntereinheiten RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 und p52 codieren. Dabei wird p52 aus den beiden Vorläuferproteinen p105 und p100 prozessiert⁹³. NFκB ist als Dimer transkriptionell aktiv, wobei die Hetero- und Homodimere p50/p65, p50/p50, p50/c-Rel und p52/RelB durch die Inhibitoren von κB (IκB) als inaktive Formen im Cytoplasma reteniert werden⁹⁴. Die konservierte Rel

homology domain (RHD) ist für Dimerisierung, DNA-Bindung und Kernlokalisation der NFκB-Transkriptionsfaktoren verantwortlich⁹⁵.

Im klassischen NFκB Signalweg kommt es zum Beispiel nach Aktivierung verschiedener zellständiger Rezeptoren zur Rekrutierung von TNF receptor associated factors (TRAFs) und den cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)1/2 an die cytoplasmatische Domäne der Rezeptoren (Abbildung 2).

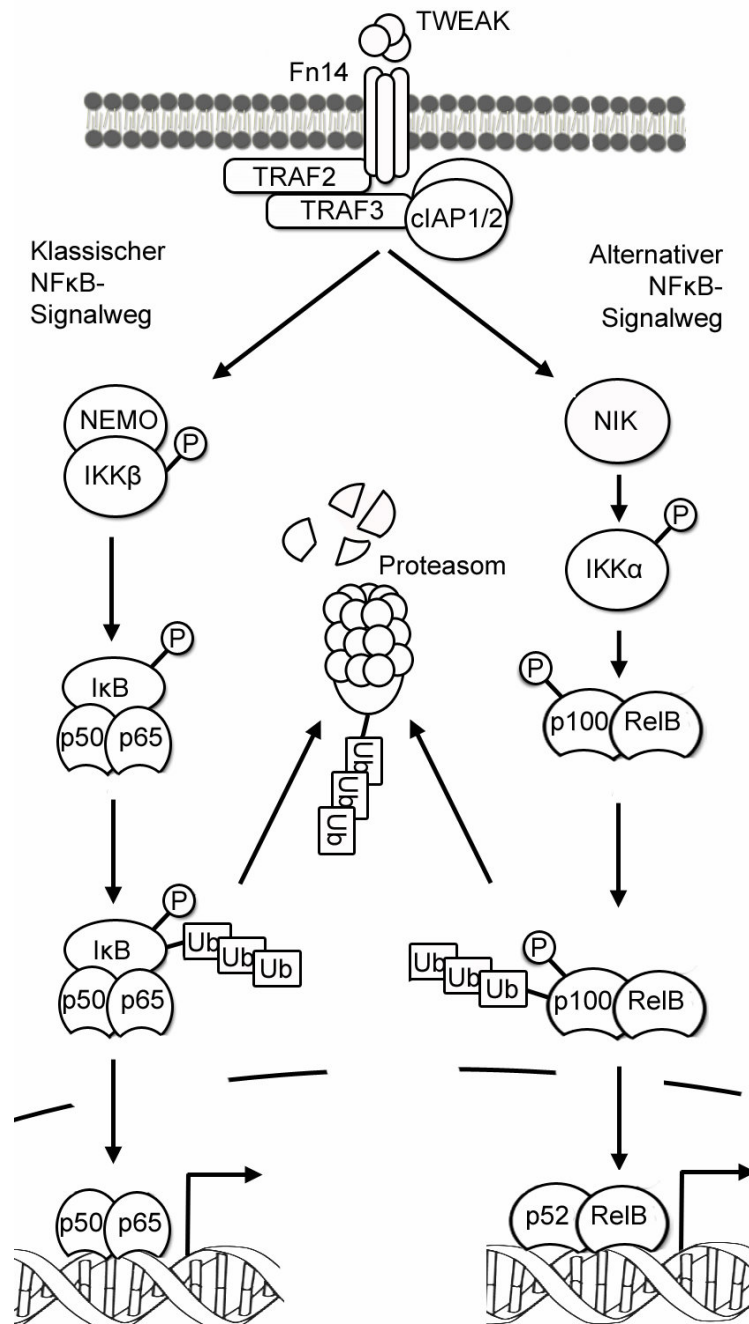


Abbildung 2. Klassischer und alternativer NFκB Signalweg.

Darstellung der Inhibition und Signalkaskade des klassischen und alternativen NFκB Signalwegs. Abbildung: Modifiziert nach Oeckinghaus et al., Nature Immunology, 2011⁹⁸.

Dies bewirkt eine Aktivierung des I κ B Kinase (IKK) Komplexes, welcher I κ B α phosphoryliert. Diese Phosphorylierung markiert I κ B α für die Ubiquitinierung und damit für den proteosomalen Abbau. Die NF κ B Dimere können nun in den Zellkern translozieren^{96,97}, an die regulatorischen Elemente ihrer Zielgene binden und deren mRNA-Expression induzieren.

Zu den klassischen NF κ B-Zielgenen zählen unter anderem pro-inflammatorische Zytokine (TNF α , IL-6, IL-1 β , B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF)), Überlebensfaktoren (B cell lymphoma-extra large, Bcl-X_L), Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM-1, E-Selektin), Chemokine (IL-8, RANTES, B lymphocyte chemoattractant (BLC)), induzierte NO-Synthase (iNOS) und Cyclooxygenase (COX)^{99,100}.

Der alternative NF κ B Signalweg wird zentral über die NF κ B inducing kinase (NIK) gesteuert, welche konstitutiv aktiv ist, im steady state aber durch TRAF3 ubiquitiniert und degradiert wird. Nach Aktivierung bestimmter Mitglieder der TNF Rezeptor-Familie wird TRAF3 rekrutiert, wodurch NIK nicht mehr abgebaut wird.

Jetzt kann NIK IKK α binden und phosphorylieren. IKK α phosphoryliert nun das p100 Protein, aus dem durch limitierte proteolytische Prozessierung das aktive p52 Protein entsteht^{94,96}. Das Heterodimer aus p52/RelB transloziert daraufhin in den Zellkern. Gene, die für das Überleben von B-Zellen, der Aktivierung von dendritischen Zellen sowie für Osteoklastogenese wichtig sind, werden durch den alternativen NF κ B Signalweg transaktiviert¹⁰¹⁻¹⁰³. Auch führt der alternative NF κ B Signalweg zur Expression von verschiedenen Zytokinen, wie solute carrier (SLC), BLC, EBI1 ligand chemokine (ELC) und stromal cell-derived factor 1 (SDF1), die an der Organogenese von lymphoiden Organen beteiligt sind¹⁰⁴.

Das NF κ B Signaltransduktionssystem ist hochkomplex. Es konnten bisher über 150 verschiedene NF κ B-aktivierende Stimuli, wie Stress, Zytokine, freie Radikale, bakterielle oder virale Antigene identifiziert werden¹⁰⁵. Die verschiedenen NF κ B-Dimere können zusammengenommen mehr als 400 Gene regulieren^{106,107}.

3.3. Blutplättchenproteine als Zielstrukturen im Myokardinfarkt

3.3.1. Blutplättchen und Hämostase

Blutplättchen spielen eine integrale Rolle in der Blutgerinnung und sind dadurch überlebenswichtig. Durch ihre Funktionen in der Hämostase sind sie auch an den

pathophysiologischen Vorgängen der arteriellen Thrombose, sowie der Ausbildung von Mikrothromben beteiligt, und spielen deshalb auch eine wichtige Rolle in der Induktion von ischämischen Schaden des Herzens und während der Reperfusionphase des Myokards.

Im Knochenmark werden Blutplättchen aus Megakaryozyten gebildet und pro μl Vollblut befinden sich circa 150.000 - 300.000 Blutplättchen, wovon täglich etwa 20 % erneuert werden. Der Abbau dieser Zellen erfolgt im retikuloendothelialen System in Leber und Milz. Blutplättchen sind anukleäre Zellen, sie besitzen keinen Zellkern und sind nur eingeschränkt zur Proteinsynthese fähig. Im nicht-aktivierten Zustand weisen Blutplättchen eine diskoide Form auf, die sich schnell durch Agonisten wie Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin ändert („shape change“). Die aktivierten Blutplättchen bilden Pseudopodien und zeigen dadurch nahezu eine Verdopplung der durchschnittlichen Oberfläche¹⁰⁸.

Blutplättchen durchlaufen im Zuge ihrer Funktion in der Blutgerinnung vier Phasen: Adhäsion, Aktivierung, Sekretion und Aggregation (Abbildung 3).

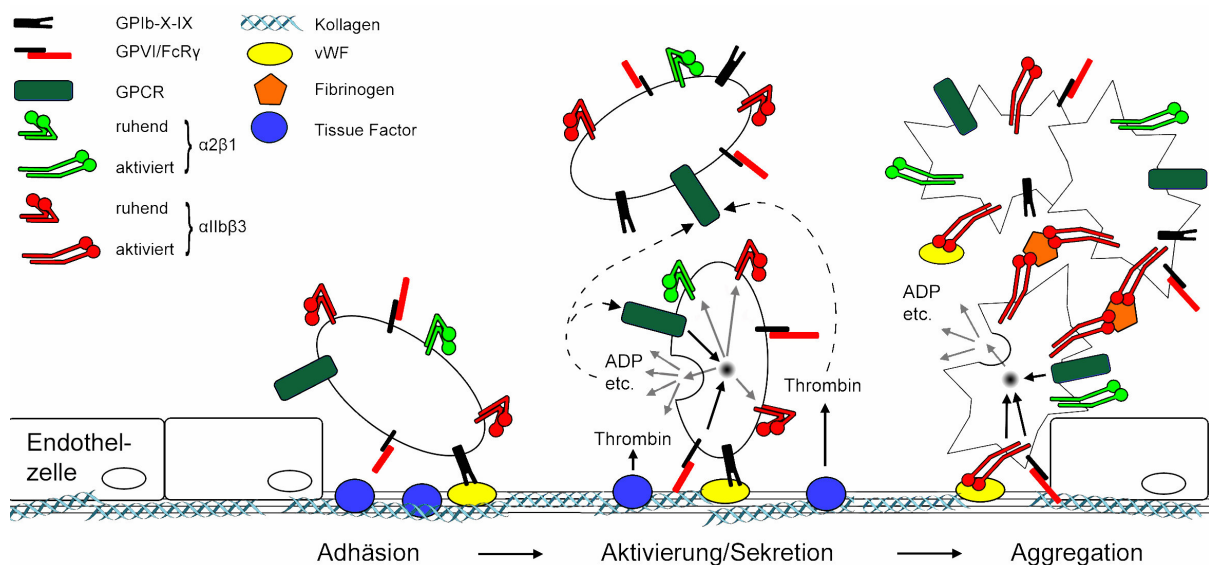


Abbildung 3. Die Stufen der Blutplättchenanheftung und -aktivierung.

Durch die Glykoprotein (GP)Ib Bindung mit vWF kommt es im ersten Schritt zu einer Anheftung des Blutplättchens an das Endothel. Im nächsten Schritt kommt es zu einer Freisetzung von ADP, Thromboxanen und der Bildung von Thrombin durch tissue factor (TF). Dies führt zu einer Aktivierung von Blutplättchen und zu einer Thrombusbildung. Abbildung: Modifiziert nach David Varga-Szabo et al., Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2008¹⁰⁹.

Die Adhäsionsphase wird als primäre Adhäsion bezeichnet, wenn sich noch ruhende Blutplättchen an verletzte Gefäßwände anheften, und als sekundäre Adhäsion, wenn

schon aktivierte Blutplättchen an das Subendothel binden. Durch GPIIb-V-IX kann das Blutplättchen über freiliegende von-Willebrand-Faktoren (vWF) an der Zellwandläsion adherieren. Aufgrund der hohen Scherkräfte im arteriellen Blutstrom sind ein fester Kontakt und eine weitere Stabilisierung durch membranständige Integrin-Adhäsionsrezeptoren wichtig. Rezeptoren wie GPIV, GPVI und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ sind für die Adhäsion von Blutplättchen an Kollagen verantwortlich. Aufgrund der Bindung des Kollagenrezeptors an Kollagen erfolgen ein „shape change“ und die Ausbildung der Pseudopodien (Aktivierungsphase).

Innerhalb der Blutplättchen kommt es zur Aktivierung von Phospholipase (PL)C, und somit zur Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3)^{110,111}.

Ein essentieller Schritt der Blutplättchen-Aktivierung ist die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Granula und durch den Ca^{2+} Influx aus dem extrazellulären Raum erfolgen kann. In Blutplättchen ist der Influx von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch store operated Ca^{2+} entry (SOCE) Kanäle besonders wichtig. Diese Kanäle öffnen sich, wenn die Konzentration von Ca^{2+} im endoplasmatischen Retikulum (ER) sinkt¹¹². Auch kommt es zu einer Freisetzung von Ca^{2+} in das Cytosol, wenn IP_3 seinen Rezeptor an der Membran der intrazellulären Ca^{2+} Kanäle bindet^{110,111}.

Stromal interaction molecule 1 (STIM1) ist der Ca^{2+} Sensor im ER, und Orai1 ist an der Bildung des Ca^{2+} Kanals beteiligt¹⁰⁸. Nachdem das Blutplättchen die Stadien der Adhäsion und Formveränderung vollzogen hat, sekretiert dieser gespeicherte Substanzen in seine Umgebung ab (Sekretionsphase). Entweder können durch Verschmelzung der Granula mit dem offenen kanalikulären System oder durch Exozytose, bei der die Granulamembran sich mit der Plasmamembran verbindet, Inhaltsstoffe abgegeben werden. Erst ab einer Schwellenkonzentration des cytoplasmatischen Ca^{2+} werden Inhaltsstoffe, wie ADP, ATP, Serotonin und Ca^{2+} aus den Granula freigesetzt. ADP dient zum Einen der Rekrutierung und Aktivierung von ruhenden Blutplättchen (Aktivierungsphase), zum Anderen der Thrombusausbildung durch Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplexes. Die Freisetzung von Ca^{2+} begünstigt die Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa. ATP wirkt anti-aggregatorisch, da es ein kompetitiver Antagonist von ADP ist. Serotonin verringert den Blutstromfluss, in dem es vasokonstriktorisch wirkt. Der entstandene Thrombus ist noch relativ instabil, daher beginnt nun die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die Thrombin- und

Fibrinbildung am Plättchenaggregat (Aggregatbildung). Fibrin kann an den Blutplättchen anlagern und ist für die Quervernetzung und Stabilisierung des Thrombus mitverantwortlich. Das Plättchen-Fibrin-Konglomerat verfestigt sich weiter und es kommt zu einer „Gerinnselreaktion“¹⁰⁸.

3.3.2. Blutplättchenhemmung nach Myokardinfarkt

Trotz erreichter Reperfusion nach MI ist ein vollständig normalisierter epikardialer Blutfluss in den Koronargefäßen des Infarktgebietes nicht immer gewährleistet, da sich durch die Anwesenheit von Mikrothromben Bereiche ohne Perfusion („no reflow“ Phänomen) bilden können¹¹³. Patienten, die dieses Phänomen erfahren, haben ein stark erhöhtes Risiko, dass es zu kongestiver Herzinsuffizienz und Arrhythmien kommt, was bis hin zum Tod führen kann^{114,115}. Ein Ziel der Blutplättchenhemmung ist es daher, das Myokard nach MI wieder ausreichend und vollständig mit Blut zu versorgen.

Antithrombäre Pharmaka, die eine Hemmung plättchenaktivierender Rezeptoren wie ADP-Rezeptor (z.B. Clopidogrel), Thrombinrezeptor (z.B. Peptidantagonisten) oder Serotoninrezeptor (z.B. Ketanserin) bewirken oder solche, die die Aggregation von Blutplättchen durch Blockierung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa) (z.B. Abciximab, Integrilin, Tirofiban, Lamifiban und Xemilofiban) hemmen, sind bereits klinisch im Einsatz. An geeigneten Inhibitoren für die Adhäsion von Blutplättchen durch Blockierung des vWF-Rezeptors (GPIb-V-IX) (z.B. rekombinantes-vWF-Fragment) oder durch Blockierung des Kollagenrezeptors ($\alpha_2\beta_1$) (Antikörper, Peptide)¹⁰⁸ wird noch geforscht. Das am häufigsten verwendete Medikament für eine Inhibition der Plättchenfunktionen ist die Acetylsalicylsäure, die durch Hemmung der Cyclooxygenase auf den Arachidonsäuremetabolismus wirkt¹⁰⁸. Bei Risikopatienten kann die Behandlung das Auftreten eines MI um 20 % reduzieren. Nach einem MI kann diese Behandlung das Wiederauftreten eines Infarktes um 30% reduzieren¹¹⁶.

3.3.3. Das Glykoprotein GPIb

GPIIb/IIIa bilden zusammen mit GPIX und GPV einen Komplex (GPIIb-IX-V Komplex), der exklusiv auf Blutplättchen und Megakaryozyten gebildet wird. Jede Untereinheit des Komplexes ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer langen N-

terminalen extrazellulären Domäne, einer einfachen Transmembran-Domäne und einem kurzen cytoplasmatischen Teil mit enzymatischer Aktivität.

Unter starken Scherkräften wird die initiale Anheftung der Blutplättchen an die extrazelluläre Matrix durch die Interaktion zwischen GPIIb α und Kollagen-gebundenem vWF vermittelt. Die weitere Anheftung wird dann über Rezeptoren wie GPVI und GPCR vermittelt. Unter sehr hohen Scherkräften ($> 10.000 \text{ s}^{-1}$) wird die Blutplättchenadhäsion und Aggregatbildung ausschließlich über die Wechselwirkungen zwischen GPIIb und vWF ohne weitere Integrinaktivierung vermittelt¹¹⁷⁻¹¹⁹. Die *in vivo* Hemmung der Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen durch Antikörper (p0p/B) schützt vor Thrombusbildung und verhindert die Blutplättchenadhäsion an der Oberfläche verletzter Koronararterien im Mausmodell¹²⁰. Bei Pavianen ist die Bildung von Blutthromben durch den blockierenden GPIIb-Antikörper 6B4 stark verringert¹²¹. Im Vergleich zu Kontrollgruppen zeigen Mäuse, die mit dem monoklonalen Antikörper p0p/B gegen GPIIb behandelt werden, eine doppelt so lange durchschnittliche Blutungszeit, wobei bei 6 von 14 Mäusen die Blutung im Untersuchungszeitraum nicht zum Erliegen kommt¹²². In Schlaganfallmodellen mit Mäusen führt die Hemmung von GPIIb 1 Stunde vor Operation zu protektiven Effekten bei den Versuchstieren. Die Tiere weisen verringerte Infarktareale im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Ebenfalls zeigt eine Behandlung von GPIIb-Antikörpern 1 Stunde nach Operation eine signifikante Reduktion der Infarktgröße bei den Versuchstieren¹²². Patienten mit Bernard-Soulier Syndrom (BSS) besitzen keinen GPIIb-IX-V Komplex auf der Blutplättchenoberfläche und so kommt es bei diesen Personen zu einer starken Blutungsneigung, Thrombocytopenie und einer Vergrößerung der Blutplättchen¹²³. Eine Verringerung der Blutthrombenbildung kann ebenfalls mit anti-vWF Antikörpern erreicht werden, wobei hier die Blutungsneigung nicht erhöht ist¹²⁴.

3.3.4. Das Glykoprotein GPVI

Ein zentraler Kollagenrezeptor auf Blutplättchen ist GPVI¹²⁵. Dieser Transmembran Typ I Rezeptor wird nur auf Blutplättchen und Megakaryozyten gebildet und ist nicht-kovalent über immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) mit der γ -Kette des Fc Rezeptor (FcR) in der Plasmamembran verbunden^{126,127}. Die Bindung von Kollagen an GPVI führt zur Phosphorylierung der FcR γ -Kette, was über eine

Aktivierung von PLC γ 2^{128,129}, Ca²⁺-Mobilisierung¹³⁰, Integrinaktivierung und Granulensekretion in der Blutgerinnung durch Plättchenaggregation endet^{129,131}. Es sind einzelne Fälle bei Patienten bekannt, bei denen GPVI-abhängige Defekte zu einer milden Blutungsstörung führen¹³². Patienten mit Mutationen im Gp6 Gen zeigen normale hämostatische Funktionen trotz mangelnder Kollagenanheftung und Aktivierung der Blutplättchen, was sich mit Ergebnissen in GPVI KO Mäusen deckt^{133,134}. Auch zeigt die Behandlung mit anti-GPVI monoklonalen Antikörpern lediglich ein moderat erhöhtes Blutungsverhalten¹²². Blutplättchen die kein GPVI besitzen, bilden *in vivo* keine arteriellen Thromben¹²⁰. Die Behandlung mit anti-GPVI Antikörper in Makaken bewirkt eine starke Inhibition der Kollagen-induzierten Thrombusbildung *ex vivo* mit nur milder Blutungsneigung¹³⁵. Im MCAO Modell führt die Blockade von GPVI 1 Stunde vor Infarkt zu einer signifikanten Reduzierung des Infarktareals bei Mäusen¹²².

3.3.5. STIM1 und Orai1

Ein integraler Bestandteil der Blutplättchenaktivierung stellt der durch STIM1 aktivierte SOCE dar, welcher für die Ausbildung eines stabilen Thrombus unter Strömungsverhältnissen wichtig sind^{136,137}. Ein weiterer Bestandteil von SOCE ist Orai1, das ebenfalls für die Thrombusbildung essentiell ist¹³⁸.

STIM1 ist ein Typ1 Transmembranprotein, welches ein Ca²⁺-bindendes EF-Hand Motiv in seinem intraluminalen Bereich besitzt. In ruhenden Zellen ist das EF-Hand Motiv mit Ca²⁺ besetzt und STIM1 ist auf dem ER und sarkoplasmatischen Retikulum (SR) verteilt. Kommt es zu einem Ca²⁺ Konzentrationsabfall, dissoziiert Ca²⁺ ab und STIM1 multimerisiert, was die Öffnung der SOCE Kanäle und somit einen Influx von Ca²⁺ bewirkt^{139,140}. An diesen SOCE Kanälen ist als Proteinuntereinheit Orai1 beteiligt¹⁴¹. Wenn sich also die intrazellulären Ca²⁺ Speicher leeren, kommt es über die Interaktion des Ca²⁺ Sensors STIM1 mit dem Ca²⁺-Kanalprotein Orai1 zum Influx von Calcium¹⁴²⁻¹⁴⁴. STIM1 und Orai1 werden außer in Blutplättchen^{138,145}, auch in Immunzellen¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, Skelettmuskelzellen¹⁴⁹, Endothelzellen¹⁵⁰ und vaskulären glatten Gefäßzellen (VSMC)¹⁵¹ exprimiert.

Blutplättchen von Orai1^{-/-} Mäusen weisen Defekte im SOCE auf, sowie veränderte Aktivierung und Thrombusbildung unter Scherkräften *in vitro*. Dies kann auch bei STIM1 defizienten Blutplättchen nachgewiesen werden. Diese Tiere sind *in vivo* vor

pulmonaren Thromboembolien, arteriellen Thrombosen und ischämischen Schlaganfällen geschützt^{137,138}. STIM1^{-/-} und Orai1^{-/-} Tiere weisen nur eine moderat erhöhte Blutungsneigung auf^{137,138}.

4. Problemstellung

In den westlichen Industrieländern stellen Herz-Kreislaufkrankungen und darunter vor allem der MI die häufigste Todesursache dar. Zwischen dem Einsetzen der Ischämie im Herzen und der Irreversibilität des entstandenen Schadens liegt ein sehr enges Zeitfenster für die mögliche Anwendung von Therapien zur Wiederherstellung der Perfusion und dem Schutz des Myokards. Verschiedene Zellen des Immunsystems sind an der Wundheilung und dem Remodelling des Herzgewebes nach MI beteiligt. Die pharmakologische Immunmodulation stellt daher eine viel versprechende Therapieoption in der Behandlung des MI dar. TWEAK ist ein Mitglied der TNF-Ligandensuperfamilie und wird vermehrt nach MI exprimiert. Dieses Protein ist beteiligt an Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Angiogenese und Inflammation, jedoch ist das Wirkungsspektrum von TWEAK bei MI und Ischämie-Reperfusion noch ungeklärt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von rekombinantem TWEAK, im Modell des MI *in vivo* zu untersuchen.

Neben inflammatorischen Zellen, spielen Blutplättchen eine essenzielle Rolle in der Entstehungs- und Reperfusionsphase des MI. Durch Mikrothromben, die sich durch Blutplättchenaggregation bilden, kann die Perfusion des Myokards reduziert sein. Die Konsequenzen sind eine Unterversorgung des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen und damit einhergehender Zelluntergang, was in einer Infarktexpansion, Herzinsuffizienz und einer erhöhten Mortalität bei Patienten enden kann. Aus diesem Grund besitzt eine pharmakologische Blutplättchenhemmung das Potenzial zur Behandlung von Patienten nach MI. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Antikörper und KO-Tiere die Phasen der Blutplättchenanheftung und -aktivierung gezielt zu hemmen, um deren Einfluss auf die Bildung von Mikrothromben zu untersuchen.

5. Material

5.1. Chemikalien- und Reagenzienliste

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Life technologies, Karlsruhe
2,2,2 Tribromoethanol	Sigma, Schnelldorf
2,3,5-Triphenyl-tetrazolium chlorid	Sigma, Schnelldorf
2,3-Butandion monoxim	Sigma, Schnelldorf
3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Schnelldorf
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Life technologies, Karlsruhe
Aceton	Sigma, Schnelldorf
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma, Schnelldorf
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, Schnelldorf
AMP-D1 (Dnase Verdau)	Sigma, Schnelldorf
Annexin V Bindungspuffer	BD Pharmingen, Heidelberg
Annexin V Fluorescein Konjugat	Life technologies, Karlsruhe
anti-Flag-Antikörper (M2)	Sigma, Schnelldorf
Bisacrylamid	Sigma, Schnelldorf
Blaue Mikrosphären 1µm, FluoSpere	Life technologies, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Schnelldorf
Brij-35	Sigma, Schnelldorf
Buprenorphin	ESSEX PHARMA, München
Calciumchlorid (10mM)	Sigma, Schnelldorf
Coomassie Blau	Sigma, Schnelldorf
Dodecyltrimethylammonium chloride (Dotmac)	Sigma, Schnelldorf
Eindeckmedium Vectashield	Vector, Peterborough, Grossbritannien
Entellan	Merck Millipore, Darmstadt
Epitop Unmasking Lösung	Vector, Peterborough, Grossbritannien
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe

Material

Evans Blue	Sigma, Schnelldorf
Fätales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Fixierungs-Permeabilisierungs-Diluent (FACS)	eBioscience, Frankfurt
Fixierungs-Permeabilisierungs-Konzentrat (FACS)	eBioscience, Frankfurt
Formaldehyd 16%	Polysciences, Eppelheim
Fungizon Amphotericin B	Life technologies, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Schnelldorf
Glucose	Sigma, Schnelldorf
Glycin	Sigma, Schnelldorf
Heparin-Natrium 2500	Ratiopharm, Ulm
Histoprime Enhancer	Linaris, Dossenheim
Immunoedge Stift	Dako, Hamburg
Insulinspritzen	BD Pharmingen, Heidelberg
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Isopropanol	Sigma, Schnelldorf
Kalium bicarbonat (KHCO_3)	Sigma, Schnelldorf
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Schnelldorf
Kaliumphosphat monobasisch (KH_2PO_4)	Sigma, Schnelldorf
Kollagenase Typ II	Worthington, Lakewood, U.S.A.
Kristallviolett	Sigma, Schnelldorf
L-Glutamin	Lonza, Köln
Liberase Blendzym	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumsulfat heptahydrat (MgSO_4)	Sigma, Schnelldorf
Methanol	Sigma, Schnelldorf
MTT	Sigma, Schnelldorf
Natrium bicarbonat (NaHCO_3)	Sigma, Schnelldorf
Natriumazid (NaN_3)	Sigma, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Schnelldorf
Natriumphosphat dibasisch (Na_2HPO_4)	Sigma, Schnelldorf

Normal Goat Serum (NGS)	Vector, Peterborough, Grossbritannien
PBS (w/o Ca, Mg)	Sigma, Schnelldorf
Penicillin – Streptomycin	Sigma, Schnelldorf
Phenazin Methosulfat	Sigma, Schnelldorf
Phenolrot	Sigma, Schnelldorf
Pikro-Siriusrot (PSR)	Polysciences Inc., Warren, U.S.A.
PMS Lösung	Promega, Mannheim
PMSF	Thermo Scientific, Waltham, U.S.A.
Propidiumjodid (PI)	Life technologies, Karlsruhe
Protease XIV	Sigma, Schnelldorf
Quant-iT Working Solution	Life technologies, Karlsruhe
Ripa Puffer	Cell Signaling, Frankfurt
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hamburg
Rnase freies Wasser	Qiagen, Hamburg
Rote Mikrosphären 0,2µm, FluoSpere	Life technologies, Karlsruhe
Rothistol	Roth, Karlsruhe
RPMI	Life technologies, Karlsruhe
Salzsäure (5N)	Sigma, Schnelldorf
Streptavidin Alexa 546	Life technologies, Karlsruhe
SYTOX-Green	Life technologies, Karlsruhe
Taurin	Sigma, Schnelldorf
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris Base	Sigma, Schnelldorf
Tris-HCL	Promega, Mannheim
Triton X-100	Sigma, Schnelldorf
Trypanblau	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,25% / 0,02%) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Wasserstoffperoxid	Sigma, Schnelldorf
Xylol	Sigma, Schnelldorf

5.2. Kits, Arrays und ELISA

ABI Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Gaussia Luciferase Assay kit	New England Biolabs, Frankfurt

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics, Mannheim
iScript cDNA Synthese kit	BioRad, München
MOM-Kit	Vector, Peterborough, Grossbritannien
Mouse TWEAK ELISA Kit	RayBiotech, Norcross, U.S.A.
Quantibody mouse cytokine array Q200	RayBiotech, Norcross, U.S.A.
Rneasy Mini kit	Qiagen, Hamburg
Vectastain ABC Kit	Linaris, Wertheim

5.3. Primärantikörper und Proteine

hamster-anti-CD3 ϵ PE/Cy7 (145-2C11)	Biolegend, London, Großbritannien
HSA-Flag-TWEAK	AG Wajant
Istoyp-Kontrolle (RTK2758)	Biolegend, London, Großbritannien
mouse-anti-Fn14 (ITEM-4)	eBioscience, Frankfurt
mouse-anti-Ly6G Alexa Fluor647 (1A8)	Biolegend, London, Großbritannien
mouse-anti-NK1.1 PE (PK136)	BD Pharmingen, Heidelberg
mouse-anti- α SA (EA-53)	abcam, Cambridge, Großbritannien
rabbit-anti-cleaved PARP (E-51)	abcam, Cambridge, Großbritannien
rabbit-anti-Fn14 (EPR3179)	Epitomics, Burlingame, U.S.A.
rabbit-anti-periostin	BioVendor, Heidelberg
rat-anti-CD11b PE (M1/70)	BD Pharmingen, Heidelberg
rat-anti-CD16/CD32 (2.4G2)	BD Pharmingen, Heidelberg
rat-anti-CD31 (SZ31)	Dianova, Hamburg
rat-anti-CD45 eFluor450 (30-F11)	eBioscience, Frankfurt
rat-anti-GPIb; p0p/B	AG Nieswandt
rat-anti-GPVI; JAQ1	AG Nieswandt

rat-anti-Ly6C&Ly6C PerCP/Cy5 (RB6-8C5)	BD Pharmingen, Heidelberg
rat-anti-Ly6G Antikörper (1A8)	Biolegend, London, Großbritannien
rat-anti-neutrophils (7/4)	Linaris, Wertheim

5.4. Sekundärantikörper

biotinylierter Antikörper anti-mouse	Vector, Peterborough, Grossbritannien
biotinylierter Antikörper anti-rat	Vector, Peterborough, Grossbritannien
goat-anti-rabbit-Alexa Fluor647	Life technologies, Karlsruhe
goat-anti-rat-Alexa Fluor488	Life technologies, Karlsruhe

5.5. qRT-PCR TaqMan-Sonden

collagen1 α 1	Applied Biosystems; Mm00801666_g1
collagen1 α 2	Applied Biosystems; Mm00442991_m1
Fn14	Applied Biosystems; Mm01302476_g1
GAPDH	Applied Biosystems; Mm99999915_g1
MMP2	Applied Biosystems; Mm00439498_m1
MMP3	Applied Biosystems; Mm00440295_m1
MMP8	Applied Biosystems; Mm00439509_m1
MMP9	Applied Biosystems; Mm00442991_m1
TIMP2	Applied Biosystems; Mm00441825_m1
TIMP3	Applied Biosystems; Mm00441826_m1
TWEAK	Applied Biosystems; Mm01302476_g1
VEGF	Applied Biosystems; Mm01281449_m1

5.6. Puffer und Medium

cardiac fibroblast growth medium	Cell Applications, San Diego, U.S.A.
----------------------------------	--------------------------------------

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Köln
Leibovitz L-15 Medium w/o L-Glutamin	Lonza, Köln
Minimum essential medium (MEM)	Life technologies, Karlsruhe
MEM ohne Phenolrot	Life technologies, Karlsruhe

5.7. Eukaryotische Zellen

Humane kardiale Fibroblasten(HCF) Cell Applications, San Diego, U.S.A.

5.8. Lösungen und Puffer

Polyacrylamidgel (10%)	
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	9,975 ml
4x Tris-HCL / SDS (pH 8,8)	7,5 ml
H ₂ O mit Gelatine	12,53 ml
APS 10%	99,9 µl
TEMED	20,04 µl
Sammelgel	
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	1,63 ml
4x Tris-HCL / SDS (pH 6,8)	3,128 ml
H ₂ O	7,636 ml
APS 10%	62,6 µl
TEMED	12,5 µl
5X Elektrophoresepuffer	
TrisBase	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ad. 2l ddH ₂ O	
Aktivierungspuffer (Gelatine Zymographie)	
Tris-HCl	50 mM
CaCl	25 mM
NaCl	0,2 M
Brij-35	0,02 %
0,5% Commassie Lösung	
Comassie	1 g
Methanol	80 ml
Essigsäure	20 ml
ddH ₂ O	100 ml

Material

Entfärbelösung		
Methanol	160	ml
Essigsäure	40	ml
ddH ₂ O	200	ml
FACS-Verdauungspuffer		
Kollagenase	100	mg/ml
Protease XIV	50	µg/ml
PBS (mit Calcium und Magensium)		
FACS-Puffer		
BSA	0,5	%
NaN ₃ in PBS	0,02	%
Lysis-Puffer Splenocyten		
NH ₄ Cl	168	mM
KHCO ₃	10	mM
EDTA	0,1	mM
PI-Working solution		
PI-Lösung (1mg/ml)	5	µl
Annexin V Bindungspuffer	45	µl
Isolationspuffer für kardiale Mausfibroblasten, pH 7.4		
Leibovitz L-15 Medium w/o L-Glutamin	485	ml
L-Glutamin (200mM)	5	ml
Penicillin / Streptomycin 100x	5	ml
Fungizon 100x	5	ml
Tissue dissociation buffer für kardiale Mausfibroblasten		
Isolationspuffer	39	ml
Vorgefilterte Kollagenase Typ II [40 mg/ml]	1	ml
Kollagenase-Inaktivierungsmedium für kardiale Mausfibroblasten		
Isolationspuffer	25	ml
BSA (35%)	357	µl
Primary cell complete medium für kardiale Mausfibroblasten, pH 7.4		
DMEM medium high glucose	440	ml
FKS (10%)	50	ml
HEPES (10mM)	5	ml
Penicillin / Streptomycin / Fungizon 100x	5	ml

Material

Stammlösung Perfusionspuffer für kardiale Mausmyozyten

NaCl	6,6	g
KCl	0,35	g
KH ₂ PO ₄	0,082	g
Na ₂ HPO ₄	0,085	g
MgSO ₄	0,3	g
Phenolrot	0,012	g
NaHCO ₃	1,01	g
KHCO ₃	1,01	g
HEPES (1M)	10	ml
Taurin	3,75	g

ad. 1l H₂O

Perfusionspuffer für kardiale Mausmyozyten, pH 7.46

Stammlösung Perfusionspuffer	490	ml
2,3-Butandion monoxim (500mM)	10	ml
Glucose	0,5	g

Myocyte Verdauungspuffer

Perfusionspuffer	50	ml
Liberase blendzym	12,5	mg
Trypsin	0,278	ml
Calciumchlorid (100mM)	6,25	µl

Myocyte Stop Puffer 1

Perfusionspuffer	9	ml
FKS	1	ml
Calciumchlorid (100mM)	12,5	µl

Myocyte Stop Puffer 2

Perfusionspuffer	28,5	ml
FKS	1,5	ml
Calciumchlorid (10mM)	37,5	µl

Myocyte plating medium

MEM	455	ml
FKS	25	ml
2,3-Butandion monoxim (500mM)	10	ml
Penicillin (10.000 U/ml)	5	ml
L-Glutamin (200mM)	5	ml

Myocyte Kultivierungsmedium

MEM	490	ml
Myocyte BSA (MC BSA)	500	µl
Penicillin (10.000 U/ml)	5	ml
L-Glutamin	5	ml

MTT Elutionslösung

Salzsäure (5N)	0,8	ml
Isopropanol	100	ml

5.9. Geräte und Zubehör

100 µm Zellsieb	BD Falcon, Heidelberg
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
24-Well-Platte	greiner bio-one, Frickenhausen
40 µm Zellsieb	BD Falcon, Heidelberg
96-Well-Platte	greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well-Platte, schwarz	greiner bio-one, Frickenhausen
Axio Imager.Z1 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
FACSCanto II Durchflusszytometer	BD, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
Hybridisierungsöfen	MWG Biotech, Ebersberg
iCycler iQ PCR Plates, 96 well	Bio-Rad, München
Kleintier-Beatmungsgerät MiniVent	Hugo Sachs Elektronik, March
Kryostat	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
LSR II Durchflusszytometer	BD, Heidelberg
Lucy 2 Luminometer	Anthos Labtec Instruments, Krefeld
Mikrotom	Reichert Jung, Unterschleissheim
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt
PCR Sealers Microseal B Film	Bio-Rad, München
Plattenreader	Tecan Spectra, Männedorf, Schweiz
qRT-PCR, iCycler	Bio-Rad, München
Qubit Fluorometer	Life technologies, Karlsruhe
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung, Wetzlar
T75-Zellkulturflaschen	greiner bio-one, Frickenhausen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
TissueRuptor	Qiagen, Hamburg
Ultraschall	Toshiba, Zoetermeer, Niederlande
Ultraschallprozessor	Hielscher, Teltow
Ultraschallgerät für Kleintiere	Toshiba Aplio system, Neuss

6. Methoden

6.1. *In vivo* Experimente

6.1.1. Versuchstiere

Männliche, 8 - 10 Wochen alte Mäuse (C57BL/6J) werden von Harlan Laboratories (Rossdorf) bezogen. Homozygote STIM1 oder Orai1 KO Mäuse sind früh lethal, weshalb für STIM1 und Orai1 KO Knochenmarkchimäre Mäuse mit normaler Viabilität durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nieswandt generiert und zur Verfügung gestellt werden¹⁵². Hierzu werden weibliche, 5 - 6 Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einer einfachen Dosis von 10 Gray (Gy) bestrahlt und intravenös (i.v.) werden Knochenmarkszellen von STIM1^{-/-}, Orai1^{-/-} oder Wildtypen (4 x 10⁶ Zellen/Tier) injiziert. Die Empfängermäuse erhalten angesäuertes Wasser mit 2 g/l Neomycinsulfat für 6 Wochen nach Knochenmarktransplantation.

Die Tiere haben freien Zugang zu Futter und Trinkwasser und werden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) gehalten. Die Studien sind entsprechend den Richtlinien "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" des U.S. National Institutes of Health durchgeführt. Alle Eingriffe an den Versuchstieren sind durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (Tierversuchsgenehmigungen: 55.2-2531.01-01/10, 55.2-2531.01-78/10, 55.2-2531.01-45/11).

6.1.2. Ischämie-Reperusionsmodell und experimenteller Myokardinfarkt

Bei einer Ischämie-Reperfusion (IR)¹⁵³ wird ein akuter Infarkt mit anschließender Wiederversorgungsphase simuliert, um im Kurzzeit-Versuch die Folgen eines Reperfusionsschadens zu untersuchen. Als Modell der Herzinsuffizienz wird ein permanenter MI¹⁵⁴ induziert. Das MI Modell ist ein Langzeit-Versuch bei dem die myokardialen Veränderungen, etwa das Remodelling nach Infarkt untersucht werden können¹⁵⁵.

Die Mäuse werden mit 0,8 % Isofluran in reinem Sauerstoff durch ein Kleintier-Beatmungsgerät MiniVent intubiert. Die Extremitäten der Tiere werden auf einer beheizbaren Operationsplattform fixiert. Als Analgetikum wird Buprenorphin verwendet. Nach einer linkseitigen Thorakotomie wird die linke Koronararterie mit

einem 6-0 Faden abgebunden. In dem Modell des chronischen MI wird die Ligatur durch einen Knoten permanent verschlossen. Bei dem Modell der IR wird ein 1 cm langer Polyethylenschlauch unter den Knoten gelegt, um diesen nach der 30-minütigen Ischämiezeit wieder öffnen zu können (Abbildung 4).

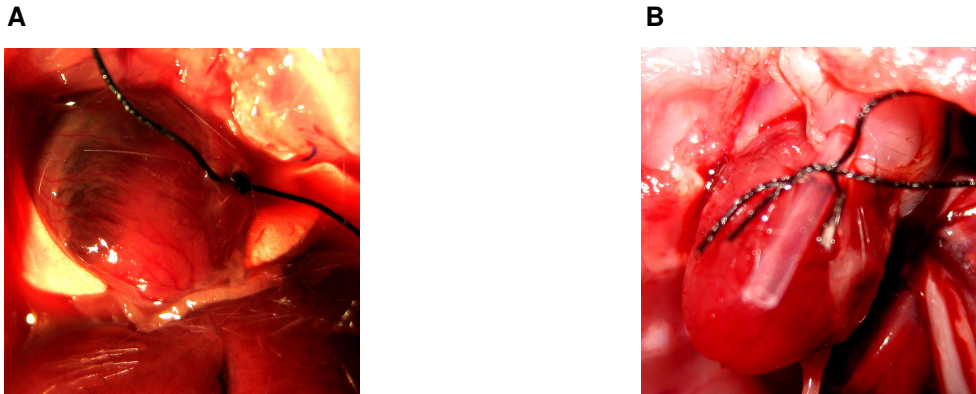


Abbildung 4. Ligatur des Myokards im Modell des chronischen MI (A) und IR (B)

Bei einem permanenten MI wird die Ligatur verschlossen und bei einem IR Versuch wird die Ligatur nach 30-minütiger Ischämiezeit wieder geöffnet.

Der Thorax wird anschließend mit 6-0 Prolenfäden verschlossen und die Haut mit 4-0 Polyesterfäden zugenäht. Bei IR-Versuchen wird die Haut mit Klammern geschlossen. Die Anästhesie mit Isofluran wird nach Beendigung der Operation eingestellt und die Tiere werden bis zum Einsetzen der Spontanatmung nur mit Sauerstoff intubiert.

Für die chronischen MI Studien werden die Versuche an den Tagen 3, 7 und 56 durch Organentnahme beendet und in IR-Studien erfolgt nach 24 Stunden Reperfusion die Organentnahme.

In sham-operierten Tieren wird die Thorakotomie ohne Ligatur des Herzens durchgeführt. Diese Arbeiten werden von Charlotte Dienesch, Barbara Bayer und Sandra Umbenhauer, Arbeitsgruppe Prof. Frantz, durchgeführt.

6.1.3. Behandlungsschema

Im chronischen MI-Modell werden C57BL6/J Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit HSA-Flag-TWEAK (32 µg/Tier) oder der Placebo Kontrolle (PBS, 200 µl/Tier) nach der Induktion des MI behandelt. Das Protein wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Wajant produziert⁹² und zur Verfügung gestellt. Die Behandlungen mit TWEAK oder der

Placebo-Kontrolle werden an den Tagen 3, 6, 9, 12, 15 und 18 nach Operation wiederholt.

Die Behandlung mit anti-GPVI Antikörpern (JAQ1, 100 µg/Tier i.p.) oder Placebo-Kontrolle erfolgt 1 Woche vor IR. Ein Tag vor Operation wird die Blutplättchenanzahl mittels Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse überprüft und nur Tiere mit normaler Blutplättchenanzahl werden in die Versuch genommen. Anti-GPIb Antikörper (50 µg, p0p/B1; 57E12Fab) oder Placebo-Kontrolle werden am Tag der Operation, vor dem Einsetzen der Reperfusion retro-orbital (r.o.) injiziert. Die anti-GPVI und anti-GPIb Antikörper werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Nieswandt hergestellt¹⁵⁶. Die Injektion und die FACS-Analyse der Blutplättchenanzahl der Versuchstiere werden von Viola Lorenz und Frauke May, Arbeitsgruppe Prof. Nieswandt, durchgeführt.

6.1.4. Echokardiographie

An den Tagen 1, 21 und 56 nach chronischem MI werden Ultraschallanalysen zur Bestimmung der Herzfunktionen an den Versuchstieren durchgeführt. Für die Untersuchung werden die Tiere mit Isofluran flach anästhesiert, um die Spontanatmung zu gewährleisten. Für die 2-dimensionale (2D) Kurzachsen-Bildgebung werden die endokardialen Grenzen im enddiastolischen (EDD) und endsystolischen (ESD) Durchmesser mit einem Analysesystem bestimmt. Die Kurzachsenansicht wird auf Höhe der Papillarmuskeln aufgezeichnet. Die ESD (kleinste) und EDD (längste) Ausbreitung wird bestimmt. Mithilfe der ESD und EDD Fläche kann die Änderung der linksventrikulären fraktionellen Flächen berechnet werden $[(\text{EDD Fläche} - \text{ESD Fläche}) / \text{EDD Fläche}]$. Im 2D-Modus werden der EDD Durchmesser und der ESD Durchmesser gemessen und daraus die linksventrikuläre fraktionelle Verkürzung errechnet. Diese Arbeiten werden von Barbara Bayer und Sandra Umbenhauer, Arbeitsgruppe Prof. Frantz, durchgeführt.

6.1.5. Bestimmung von kardialen Rupturen

An tot aufgefundenen Tieren sowie am Ende des Experiments wird eine Autopsie durchgeführt. Kardiale Rupturen werden durch das Vorhandensein von Blutgerinnseln und Einblutungen im Brustkorb und durch die Perforation des Myokards identifiziert (Abbildung 5).

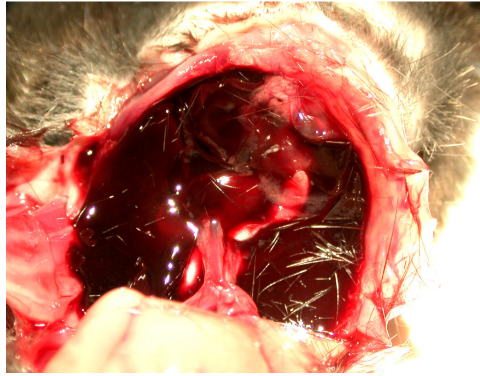


Abbildung 5. Eine infarzierte Maus mit einer kardialen Ruptur.

Die großen Mengen an geronnenem Blut im Thorax befinden sich um das Herz.

6.1.6. Organentnahme

Bei der Organentnahme wird das Vollblut der Versuchstiere entnommen, welches nach 5 min Koagulationszeit bei Raumtemperatur (RT) bei 5.000 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert wird, um das Serum zu gewinnen. Der LV des Herzens, der rechte Ventrikel (RV), die Lunge und die Milz werden entnommen und gewogen. Der LV wird in fünf parallel verlaufenden Ebenen, von Apex bis zur Basis, geschnitten. Die Herzspitze wird in zwei Teile geteilt, die jeweils repräsentativ eventuellen Narbenbereich enthalten: Eine Hälfte wird über Nacht bei 4°C in RNAlater aufbewahrt und am Folgetag in flüssigen Stickstoff für real-time-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) Versuche eingefroren. Der andere Teil wird direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren und für Western blot Analysen verwendet. Der nächste, dem Apex zugewandte Herzschnitt wird 24 Stunden in Formalin konserviert, danach in 1 M Kaliumchlorid Lösung für 1 - 7 Tage. Anschließend wird dieser Schnitt in Plastikbiopsiekörbchen in einer Entwässerungs-Maschine mit steigender Alkoholreihe entwässert und schließlich in Paraffin durchtränkt. Aus den Paraffinblöcken werden 5 µm und 7 µm dicke Schnitte am Schlittenmikrotom angefertigt. Der Folgeschnitt wird in Tissue Tek eingebettet, um daraus 5 µm Kryoschnitte anzufertigen. Die Basis wird in zwei Hälften geschnitten, wobei eine Hälfte in RNAlater bei 4°C über Nacht verwahrt wird, um dann in flüssigen Stickstoff für qRT-PCR Versuche eingefroren zu werden. Die andere Hälfte wird direkt in flüssigen Stickstoff für Western blot Analysen konserviert.

6.2. Histologie

6.2.1. Präparation des histologischen Materials

Die Paraffinschnitte für die Färbung auf Neutrophile Granulozyten werden über Nacht bei 60,5°C im Trockenschrank getrocknet. Am Folgetag erfolgt die Entparaffinierung (Tabelle 1).

Tabelle 1. Vorschrift zum Entparaffinieren von Paraffinschnitten

1.	Rothistol	5 min
2.	Rothistol	5 min
3.	Xylol	5 min
4.	Xylol/Ethanol 1:1	5 min
5.	Ethanol 96 %	5 min
6.	Ethanol 75 %	5 min
7.	Ethanol 50 %	5 min
8.	2-3 Mal Eintauchen in demineralisiertes Wasser	

Die Gewebeschnitte werden anschließend mit Epitop Unmasking Lösung 10 min bei 95°C inkubiert. In frischer, kühler Epitop Unmasking Lösung kühlen danach die Gewebeschnitte ab. Nachdem die Proben mit PBS gewaschen werden, erfolgt ein 30-minütiger Peroxidase Block (0,3 %ige Wasserstoffperoxidlösung in Methanol) und erneut ein Waschschrift mit PBS. Die Schnitte werden mit 5 % normal goat serum (NGS) (mit 4 Tropfen Avidin/ml) für 15 min inkubiert und danach mit rat-anti-neutrophils Antikörper (1:50 in 5 % NGS mit 4 Tropfen Biotin/ml) über Nacht bei 4°C behandelt. Als sekundärer Antikörper wird ein biotinylierter anti-rat Antikörper (1:100 in PBS) verwendet. 30 min vor Benutzung wird das Vectastain ABC Kit (Avidin DH und biotinylierte Horseradish Peroxidase H) angesetzt und damit die Schnitte für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS werden 1-2 Tropfen des angesetzten DAB-Reagenz auf die Schnitte gegeben und visuell die Verfärbung der Schnitte unter einem Mikroskop kontrolliert. Die Schnitte werden zwei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen und danach mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Tabelle 2) und mit Entellan eingedeckelt.

Tabelle 2. Vorschrift zum Entwässern von Paraffinschnitten

1.	2-3 Mal Eintauchen in demineralisiertes Wasser	
2.	Ethanol 50 %	2 min
3.	Ethanol 75 %	2 min
4.	Ethanol 96 %	2 min
5.	Xylol/Ethanol 1:1	5 min
6.	Xylol	5 min
7.	Rothistol	5 min
8.	Rothistol	5 min

6.2.2. Infarktgrößenbestimmung mit Pikro-Siriusrot

Zur Bestimmung der Infarktgröße werden Paraffinschnitte nach einer absteigenden Alkoholreihe für 20 min mit Pikro-Siriusrot (PSR) gefärbt. Danach erfolgen die Entwässerung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und das Einbetten mit Entellan. PSR färbt Kollagen rot an und detektiert in Muskelgewebe sehr deutlich die entstandene Infarktnarbe. Die intakten Myozyten stellen sich gelb dar. Unter 10-facher Vergrößerung werden zuerst der äußere und innere Umfang des LV entlang des Endo- und Epikards planimetrisch ausgemessen. Anschließend werden endo- und epikardial die Länge der Infarktnarbe gemessen, und in Beziehung zum Gesamtumfang des LV mit der Software Metamorph 2.0 berechnet und als prozentualer Anteil des LV angegeben.

6.3. Immunhistologie

Für die weiteren immunhistologischen Färbungen werden Kryoschnitte verwendet. Nur für die Detektion von gespaltener Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) werden Paraffinschnitte verwendet.

Doppelfärbung für Fn14 mit sarcomeric α actinin oder Periostin

Der spezifische Rezeptor für TWEAK ist Fn14. Eine Färbung auf sarcomeric α actinin wird zur Detektion von Kardiomyozyten verwendet. Der Antikörper färbt Z-Linien und Punkte von Fibrinbündeln von Muskelfasern in Skelett- und Herzmuskelzellen, nicht jedoch in nicht-sarkomeren Muskeln. Die Detektion von Periostin dient als Nachweis für Fibroblasten.

Für diese immunhistologischen Färbungen werden die Kryoschnitte zuerst bei RT für 30 min trocknen gelassen und dann mit eiskaltem Aceton (-20°C) für 10 min fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS werden die Gewebeschnitte 30 min mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS) (in PBS) bei RT geblockt. Für die Doppelfärbung mit sarcomeric α actinin werden die Schnitte nach einem Waschschriff mit PBS mit Blocking Medium (MOM-Kit) 60 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgt eine Inkubation mit Diluent (mit 4 Tropfen Avidin D/ml) für 10 min bei RT. Die Antikörper mouse-anti- α SA (1:100) und rabbit-anti-Fn14 (1:100) werden in Diluent angesetzt (mit 4 Tropfen Biotin/ml Diluent) und damit die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach werden die Schnitte fünf Mal mit PBS gewaschen und mit einem biotinylierten anti-mouse (1:100 in Diluent), sowie goat-anti-rabbit Alexa647 (1:100 in Diluent) für 60 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit Streptavidin Alexa546 (1:100 in Diluent) bei RT für 30 min werden die Schnitte nochmals mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (1:1.000) für 3 min bei RT gefärbt. Für die Doppelfärbung gegen Fn14 und Periostin werden mouse-anti-Fn14 (1:50) und rabbit-anti-osteoblast specific factor 2 (Periostin; 1:500) verwendet.

CD31

CD31 wird auch als platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) bezeichnet und dient als Marker für Endothelzellen und Gefäße.

Die Gewebeschnitte werden 30 min mit dem CD31-Antikörper (1:20 in 5 % NGS) bei RT inkubiert. Als Zweit-Antikörper wird goat-anti-rat Alexa488 (1:200 in 5 % NGS) verwendet.

Gespaltene Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)

PARP spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur, im Zuge der Apoptose wird dieses Enzym proteolytisch gespalten. Daher ist eine immunhistologische Färbung auf gespaltene PARP ein Marker für Apoptose.

Zur immunhistologischen Färbung von gespaltener PARP auf Paraffinschnitten werden die Objektträger mit den Gewebeproben über Nacht im Trockenschrank bei 60,5°C getrocknet. Am nächsten Tag erfolgt die Entparaffinierung mit einer steigenden Alkoholreihe. Danach werden die Schnitte mit einem anti-Peroxidase Komplex (0,3 %iger Wasserstoffperoxidlösung in Methanol) geblockt. Nach Waschen mit PBS werden die Schnitte mit Histoprime Enhancer für 20 min bei 95°C behandelt.

Nachdem die Schnitte in PBS abkühlen, werden die Proben für 10 min mit 0,5 % Dotmac in PBS inkubiert und nach erneutem Waschen in PBS für 30 min mit 2 % NGS bei RT inkubiert. Die Schnitte werden dann über Nacht bei 4°C mit rabbit-anti-cleaved PARP Antikörper (1:50 in 2 % NGS) behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgt die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper goat-anti-rabbit Alexa647 (1:100 in 2 % NGS) für 30 min bei RT. Nach drei Waschgängen mit PBS werden die Zellkerne mit DAPI (1:1.000) für 3 min bei RT gefärbt.

Die Kryoschnitte und die Paraffinschnitte werden in Eindeckmedium Fluoromount eingebettet. Fluoreszenzaufnahmen werden mit einer AxioCamMR3 Kamera an einem Axio Imager.Z1 Mikroskop durchgeführt. Als Programm wird AxioVision Software (Version 4.8.3.0) verwendet.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) Assay

Die Bestimmung von nukleären DNA Brüchen wird als ein weiterer Marker für Apoptose verwendet (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein). Hierzu werden Paraffinschnitte für einen terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)-Assay eingesetzt. Die Schnitte werden über Nacht im Trockenschrank getrocknet und entparaffiniert. Danach werden die Proben mit 0,1 % Triton X 100 in Citratpuffer für 8 min bei RT behandelt. Die Proben werden mehrmals in Wasser gespült, bevor sie nach Waschen mit PBS mit einer TUNEL-Lösung für 1 Stunde im Dunkeln bei 37°C behandelt werden. Als Positivkontrolle wird ein Schnitt vorher mit Dnase 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen und mit DAPI (1:1.000) für 3 min bei RT gefärbt. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Schnitte mit Vectashield fixiert. TUNEL- und gleichzeitig DAPI-positive Zellen in der Borderzone, der Zone zwischen Infarktareal und Vitalgewebe des Myokards, sowie im Septum werden ausgezählt.

6.4. ELISA von TWEAK im Blutserum

Die Bestimmung der TWEAK Konzentration in Blutserum erfolgt mittels des RayBiotech Mouse TWEAK enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kit. Eine

TWEAK Standardreihe in den Konzentrationen 66,67 pg/ml, 22,22 pg/ml, 7,41 pg/ml, 2,47 pg/ml, 0,82 pg/ml, 0,27 pg/ml und 0 pg/ml wird entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. In jedes Well der mitgelieferten 96-Well-ELISA-Platte werden 100 µl des Standards oder der Blutserumproben gegeben. Die Well-Platte wird abgedeckt und über Nacht bei 4°C unter leichter Schüttelbewegung inkubiert. Am Folgetag wird der ELISA mit einer Waschlösung gewaschen und darauf geachtet, dass die komplette Flüssigkeit nach jedem Waschschrift aus den Wells entfernt ist. Danach werden 100 µl des vorbereiteten biotinylierten anti-TWEAK Antikörpers in die einzelnen Wells gegeben und für 1 Stunde bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift werden 100 µl/Well Streptavidinlösung zu den Wells gegeben und 45 min bei RT unter leichten Schütteln inkubiert. Als nächstes wird die ELISA-Platte mit Waschlösung gewaschen und pro Well werden 100 µl TMB One-Step Substrat Reagenz den Wells hinzugefügt und für 30 min bei RT im Dunkeln unter leichtem Schütteln behandelt. Nach dieser Zeit wird 50µl Stop Solution in die Wells gegeben und die Absorption bei 450 nm an einem Mikroplattenreader gemessen.

6.5. RNA Isolation aus Mausgewebe

Die gesamte RNA der Gewebeproben wird mithilfe des Rneasy Mini Kit isoliert. Hierzu werden zuerst circa 20 mg Gewebeproben in ein Rundboden-Eppendorfgefäß mit 600 µl RLT Puffer (Rneasy Mini Kit) gegeben. Die Proben werden auf Eis mit einem TissueRuptor homogenisiert und das Homogenisat bei 1.3000 rpm für 2 min zentrifugiert. 500 µl des klaren Überstands werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das gleiche Volumen 70% Ethanol hinzugegeben. Von diesem Gemisch werden 700 µl auf eine Rneasy Säule mit Collector Tube gegeben und 15 Sekunden bei 1.0000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und 500 µl RPE (Rneasy Mini Kit) auf die Säule gegeben und 15 Sekunden bei 1.0000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird nochmals wiederholt. Die Säule wird aus dem Eppendorf-Gefäß genommen, auf ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und zum Trocknen 1 min bei 1.3000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Biopure) gesetzt und 40 µl Rnase freies Wasser werden auf die Säule pipettiert. Anschließend wird die Säule zum Eluieren 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

6.6. RNA-Quantifizierung und -Integritätsbestimmung

Zur fluorimetrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wird ein Qubit Fluorimeter verwendet. Es werden zwei Standards gemessen und dann die Proben, die 1:200 in Quant-iT Working Solution verdünnt wird. Alle Messproben werden 3 Sekunden gevortext und danach 2 min bei RT inkubiert. Auch wird die Reinheit der RNA Proben in der Microarray Core Unit, Würzburg von Margarete Göbel mit Hilfe eines BioAnalyzer überprüft. Hierzu werden 2 µl der RNA Probe (25-500 ng/µl Gesamt-RNA) zur Messung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet. Das Analyseprinzip basiert auf einer Kapillarelektrophorese im Chip-Format (Nano Series II, Agilent) und das Ergebnis wird als Chromatogramm ausgegeben (Abbildung 6).

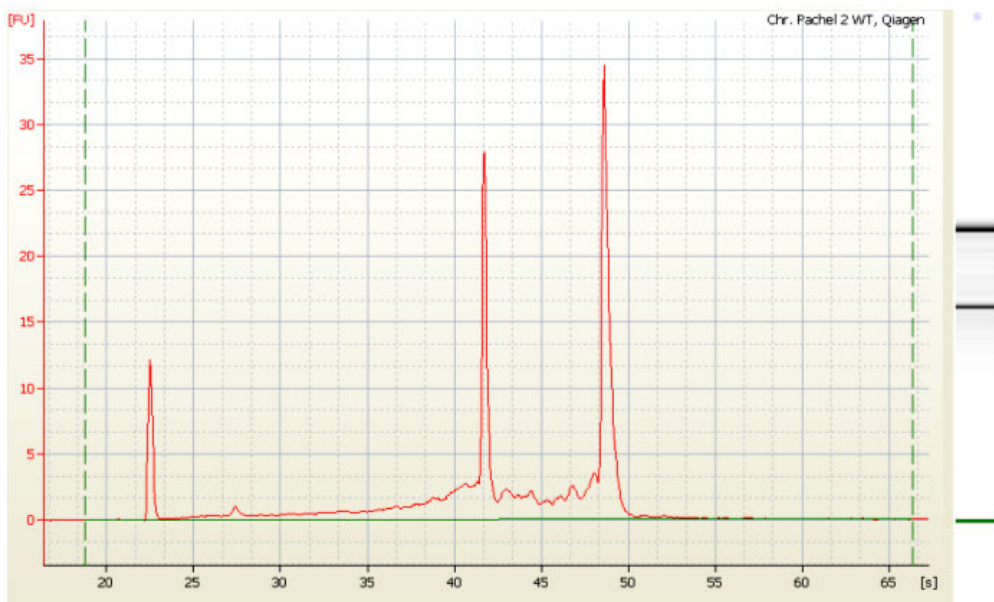


Abbildung 6. Die Ergebnisse der RNA Analyse mit Agilent Bioanalyzer.

Der erste Peak ist der interne Standard, der zweite und der dritte Peak sind 18S und 28S rRNA im Elektropherogramm. In der Gel-ähnlichen Darstellung rechts ist die obere Bande 28S, danach folgend 18S und der Marker, der als grüne Bande dargestellt ist. Ein Fronting der Banden ist ein Indiz für RNA-Fragmentierung.

Auch wird das 28S zu 18S rRNA-Verhältnis bestimmt sowie eine „RNA Integritätsnummer“ (RIN), die auf einen RIN software Algorithmus beruht und eine Klassifizierung der Gesamt-RNA bestimmt. Hierbei wird ein numerisches System von 1 bis 10 verwendet, wobei 1 bedeutet, dass die RNA stark degradiert ist und 10 bedeutet, dass die RNA zum größten Teil intakt ist.

6.7. qRT-PCR

Für die real-time-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) wird zunächst ein Dnase-Verdau der isolierten RNA mit AMP-D1 Dnase 15 min bei RT durchgeführt und mit Stop Solution beendet. Danach erfolgt eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Die RNA wird dann mit dem iScript cDNA Synthese kit umgeschrieben. Hierzu wird zu 11 µl der Lösung aus dem Schritt des Dnase-Verdau 4 µl Puffer, 1 µl Reverse Transkriptase und 4 µl demineralisiertes Wasser hinzugefügt und nach kurzem Zentrifugieren für 44 min im Thermocycler inkubiert (Tabelle 3).

Tabelle 3. PCR-Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA

5 min	25°C	
30 min	42°C	Optimum der Reversen Transkriptase
5 min	85°C	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
Hold	4°C	

Die Proben werden danach bei -20°C aufbewahrt.

Für die qRT-PCR werden folgende TaqMan Sonden verwendet: TWEAK, Fn14, Matrix Metalloproteinase (MMP)2, MMP3, MMP8, MMP9, collagen1α1, collagen1α2, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)2, TIMP3 and VEGF. Die Normalisierung der Zielgene erfolgt auf das Housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es werden 12,5 µl ABI TaqMan Gene Expression Master Mix mit 1,25 µl ABI Sondenmix, 6,25 µl Nuklease-freiem Wasser und 5 µl cDNA Probe (1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt) gemischt. In die iCycler iQ PCR 96-Well-Platten werden jeweils 25 µl des Ansatzes pipettiert und dann die Well-Platte mit PCR Sealers Microseal B Film verschlossen. Nach kurzem Zentrifugieren wird dann die Platte im iCycler vermessen (Tabelle 4).

Tabelle 4. Temperaturprogramm für qRT-PCR Expressionsmessung

Zyklus 1	2 min	50°C	1x
Zyklus 2	10 min	95°C	1x
Zyklus 3	15 sec	95°C	40x
	1 min	60°C	
Zyklus 4	Hold	15°C	1x

6.8. Infarktgrößenbestimmung mit Evans Blue/TTC-Färbung

Für die Infarktgrößenbestimmung werden die Tiere anästhesiert und mit einem Kleintierbeatmungsgerät intubiert. Der Thorax wird geöffnet und die Ligatur bei Versuchen zur IR wieder geschlossen. 500 µl einer 5 %-igen Evans Blue Lösung in PBS wird in den Apex des Myokards gespritzt (Abbildung 7A, B).

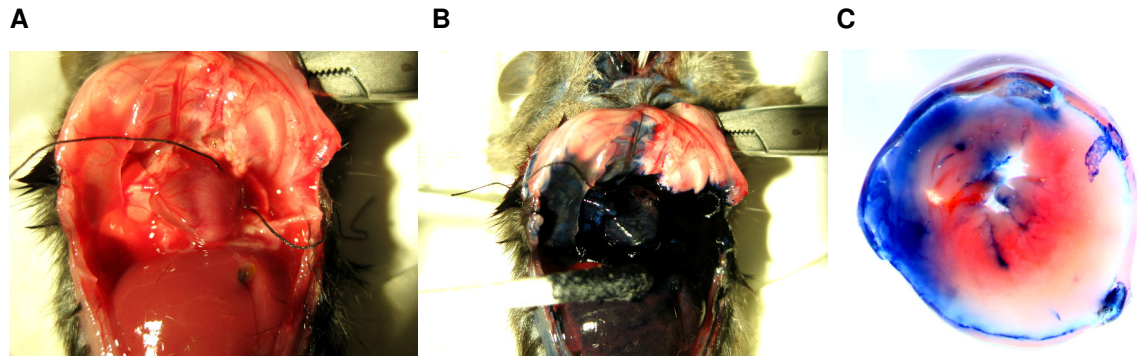


Abbildung 7. Mäuseherz mit Ligatur vor (A) und nach (B, C) Evans Blue Injektion

Für die Infarktgrößenbestimmung wird bei IR die Ligatur verschlossen. Danach erfolgt die Injektion von der Evans Blue Lösung in den Apex des Myokards.

Die Versuchstiere werden mit einer intrakardialen Injektion von 500 µl gesättigter Kaliumchlorid Lösung behandelt. Danach wird das Herz aus dem Thorax entfernt und in 0,9 %-iger Kochsalzlösung gewaschen. Über die Aorta wird das Herz nochmals mit Kochsalzlösung gespült und der RV wird entfernt. Danach wird das Herz in Tissue Tek bei -20°C für 30 min eingefroren. Das gefrorene Herz wird dann in fünf parallel verlaufende transverse Ebenen geschnitten. Die Herzscheiben werden danach bei 37°C für 10 min mit 2 % 2,3,5-Triphenyl-tetrazolium chlorid (TTC) gefärbt.

Das nicht-blau gefärbte Myokard ist der ischämische oder Risikobereich, der unterteilt wird in vitales Gewebe (rot) und infarziertes Gewebe (weiß) (Abbildung 7C). Die Herzschnitte werden gewogen (WG), fotografiert und es wird planimetrisch bestimmt, welche Bereiche des Herzens nicht mehr durchblutet sind (Area at Risk, AAR), welche Bereiche vitales Gewebe enthalten, und welche Bereiche infarziert (Infarkt, IF) sind.

Zur Berechnung des Verhältnisses von INF zu AAR, wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Infarktgröße} = (\text{IF1} \times \text{WG1}) + (\text{IF2} \times \text{WG2}) + (\text{IF3} \times \text{WG3}) + (\text{IF4} \times \text{WG4}) + (\text{IF5} \times \text{WG5}) + (\text{IF6} \times \text{WG6})$$

$$\text{Anteil Gesamt-Infarktareal [\%]} : \quad (\text{WG Infarkt}/\text{WG Herz}) \times 100$$

$$\text{Anteil Gesamt-Ischämieareal [\%]}: \quad (\text{WG Herz} - \text{WG blaue Areal})/\text{WG Herz}$$

Zur Auswertung werden VGA Planimetrie 2010 für Canon EOS5D und Planimetrie Report für Microsoft Excel 2010 genutzt.

6.9. Mikrozirkulationsmessung

Zur Bestimmung der Mikrozirkulation und der Detektion von Mikrothromben im Gewebe von IR-Tieren, werden zwei verschiedenen fluoreszierende Mikropartikel in das noch schlagende Herz injiziert. Der fluoreszierende Farbstoff ist hierbei in Mikrosphären-Partikeln eingeschlossen. Die Versuchstiere werden mit Avertin betäubt und nach Öffnen des Thorax werden in den Apex des Herzens 1 µm große blau fluoreszierende Mikrosphären (100 µl blaue Mikrosphären mit 100 µl 10 % BSA Lösung/Maus) in Insulinspritzen injiziert. Nach 1 min Wartezeit wird die Ligatur der Tiere verschlossen und 0,2 µm große rote fluoreszierende Mikrosphären (50 µl rote Mikrosphären mit 50 µl 10 % BSA Lösung/Maus) in Insulinspritzen in den Apex injiziert. Nach 1 min wird dann das Herz freipräpariert, in Tissue Tek eingebettet und bei -20°C gelagert. In den Kryoschnitten dieser Präparate werden die Zellkerne mit SYTOX-Green angefärbt und nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd und Eindeckeln mit Vectashield am Fluoreszenzmikroskop (Software BZ Observation Software) untersucht, fotografiert und ausgewertet. Die blauen Mikrosphären haben eine Fluoreszenz bei 350/440 nm und die roten Mikrosphären haben eine Fluoreszenz bei 580/605 nm (Abbildung 8).

Die Fluoreszenzen werden als Histogramm angezeigt und zur Normalisierung wird die Eigenfluoreszenz des Gewebes mit einbezogen, um mögliche Gewebssrisse bei der Berechnung der perfundierten Fläche abzuziehen. Als rot fluoreszierende Fläche erscheint der nicht-ischämische Bereich des Myokards der durch Mikrothromben begrenzt ist. Als blau fluoreszierende Fläche erscheint die erfolgreich perfundierte Fläche des Myokards, die die AAR einschließt und als schwarze Fläche (nicht fluoreszierender Bereich) erscheint das Gebiet des „no reflow“. Dieses Experiment ist

von Paula Arias, Arbeitsgruppe Prof. Pelzer, entwickelt und wird mit ihrer Hilfe durchgeführt.

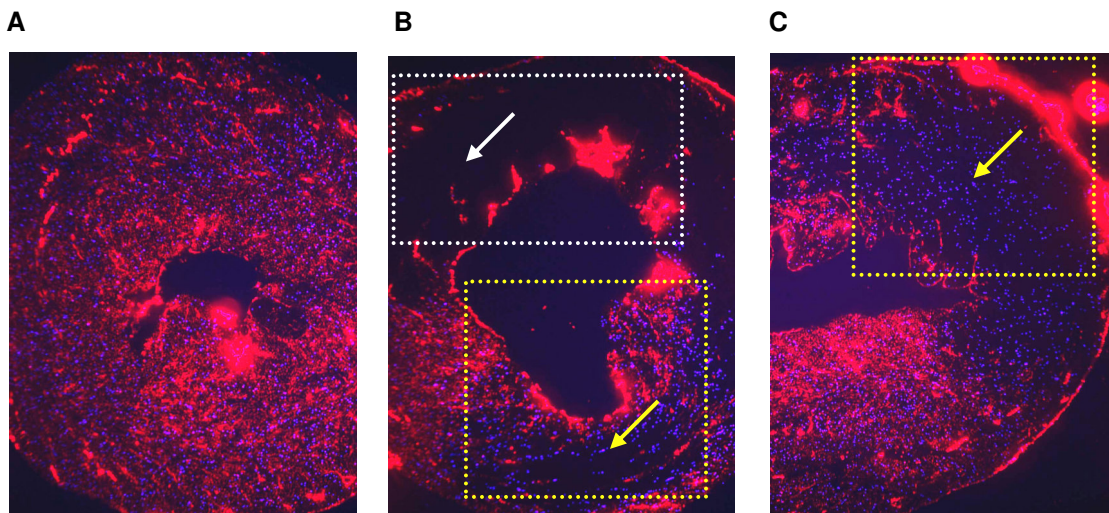


Abbildung 8. Experiment der Mikrozirkulation bei sham und MI Mäusen

Bei sham Tieren sind die blauen und roten Mikrosphären im gesamten Myokard verteilt (A). Tiere, die einen MI erfahren haben, zeigen einen Bereich im Myokard, der durch die Ligatur keine roten Mikrosphären aufweist. Blaue Mikrosphären zeigen reperfundierte Bereiche (B, C) und Areale mit keinen Mikrosphären sind Bereiche des „no reflow“ Phänomens (B).

6.10. Gelatine Zymographie

Zymographie, eine auf SDS-PAGE basierende Methode, wird zur Bestimmung der kollagenolytischen Aktivität von MMP2 und MMP9 in Herzzell-Homogenat nach Placebo- oder HSA-Flag-TWEAK Behandlung verwendet. Zur Proteinisolation wird das infarzierte Gewebe mit Ripa Puffer und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) homogenisiert. Die Proben werden in einem 10 % Polyacrylamidgel mit 2,5 mg/ml Gelatine mit einer konstanten elektrischen Spannung von 120 Volt für 2 Stunden bei 4°C aufgetrennt. Nach der Elektrophorese werden die Proteine durch Inkubation mit 2,5 % Triton X-100 für 90 min bei RT renaturiert. Die Gele werden dann für 12 Stunden bei 37°C mit Aktivierungspuffer inkubiert. Danach erfolgt eine Färbung der Gele für 1 Stunde bei RT mit 0,5 % Coomassie Blau Lösung und eine Entfärbung mit 40 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigsäure um die ungefärbten Banden im Gel aufzuzeigen, die als Maß der proteolytischen Aktivität der Enzyme betrachtet werden. Die Bandenintensität wird mittels ImageJ (Version 1.44p) bestimmt.

6.11. Zytokin Protein Array

Die Expression von Zytokinen im Infarktareal wird von TWEAK-behandelten Tieren 3 Tage nach MI, und von Tieren nach Behandlung mit Blutplättchen-hemmenden Antikörpern, sowie von STIM1^{-/-} und Orai1^{-/-} Tieren, 24 Stunden nach IR untersucht. Das Infarktareal wird aus dem Myokard präpariert und zu 500 µl Ripa Puffer mit 1 mM PMSF in ein Eppendorf-Gefäß hinzu gegeben. Das Gewebe wird mit einem Ultraturax homogenisiert und das Homogenat 10 min bei 14.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt wird mit einem Qubit Fluorimeter gemessen. Entsprechend dem Protokoll wird ein Quantibody mouse cytokine array Q2000 von RayBiotech für die Bestimmung von Zytokinen verwendet. Bei dieser Sandwich-ELISA-Methode im Microarray-Format werden Proteine durch bereits auf einem Glaschip fixierte Capture-Antikörper gebunden. Im zweiten Schritt wird der Array mit einem Cocktail an biotinylierten Antikörpern inkubiert, die wiederum an die bereits gebunden Antikörper binden. Durch die Zugabe von Cy3 markiertem Streptavidin kann dann das Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Die Glaschips werden zunächst 30 min in ihrer Verpackung bei RT equilibriert, danach nochmals für 2 Stunden ohne Verpackung, dann werden die Arrays beschriftet. In jedes Well werden jeweils 100 µl Sample diluent pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Standards werden mit Sample Diluent rekonstruiert und die Proteinproben 1:5 mit Sample Diluent verdünnt. Jedes Well wird entleert und mit jeweils 100 µl der Standards und 100 µl Probe (50 µg Protein/100 µl) gefüllt. Die Zytokin Arrays werden mit einer Folie verschlossen und über Nacht unter leichter Schüttelbewegung bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Wells entleert und zuerst mit Waschpuffer I dann mit Waschpuffer II gewaschen. In jedes Well wird dann 80 µl biotinylierter Detection Antibody Cocktail pipettiert und mit leichter Bewegung 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt werden die Wells nochmals mit Waschpuffer I gewaschen, bevor dann zu jedem Well 80 µl des Cy3-Mix pipettiert wird. Die Inkubation beträgt 1 Stunde im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Die Wells werden nach der Inkubationszeit mit Waschpuffer I gewaschen und die seitlichen Clips des Arrays können entfernt werden. Der Objektträger werden dann in ein 50 ml Falcon Gefäß mit 40 ml Waschpuffer I gegeben und unter leichter Bewegung 15 min im Dunkeln bei RT gewaschen. Dieser Vorgang wird nochmals mit Waschpuffer II wiederholt. Danach wird der Objektträger in ein neues 50 ml Falcon

Gefäß überführt und bei 1.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Fluoreszenzsignal wird dann mit einem Laserscanner mit Cy3 Wellenlänge detektiert. Als Extinktion werden 555 nm und als Emission 565 nm verwendet. Als Programm zur Auslesung des Arrays wird ScanAlyze (Version 2.5, Michael Eisen) und zur Generierung einer Standardkurve wird das Programm Origin 8.5.1 verwendet. Die Auslesung des Zytokin Arrays mit einem Laserscanner wird von Margarete Göbel, Microarray Core Unit Würzburg, durchgeführt.

6.12. Bioinformatische Analyse des Zytokin Protein Arrays

Die Daten der Proteinexpression werden normalisiert und signifikant höher exprimierte Zytokine (ANOVA t-test) werden als Interaktom-Netzwerk dargestellt. Diese Darstellung beinhaltet Kinase und phosphorylierte Substrate und wird entsprechend einer früheren Publikation der Arbeitsgruppe Prof. Dandekar erstellt¹⁵⁷. Verschiedene Proteom- und Transkriptom-Datensätze werden entsprechend ihrer Proteinknotenpunkte aus Daten von Kardiomyozytenstudien vereinigt. Informationen zu menschlichen Protein-Protein Interaktionen (PPI) wird von der Human Protein Reference Database (HPRD; Version 9.0, April 2010)¹⁵⁸ und dem Entrez Gene National Center for Biotechnology Information (NCBI) server¹⁵⁹ bezogen und mit Cytoscape (Version 2.8.3;¹⁶⁰) dargestellt. Die Daten werden mit Daten von Protein Phosphorylierungen aus HPRD (version 9.0) und PhosphoSite¹⁶¹ kombiniert sowie Vorhersagen zu Kinasen und deren Phosphoproteom Daten werden mit NetworkKIN Algorithmus^{162,163} berechnet. Interaktionsvorhersagen werden mit verschiedenen Protein-Protein Interaktionsdatenbanken, wie HPRD, generiert. Eine Liste von menschlichen Kinasen wird anhand einer Publikation von Manning et al. (2002) erstellt und als Referenz und Bewertung der HPRD Phosphorylierungsdaten verwendet¹⁶⁴. Diese Arbeit wird von Gaby Wangorsch, Arbeitsgruppe Prof. Dandekar, durchgeführt.

6.13. Durchflusszytometrie von Gewebsleukozyten

Für die Durchflusszytometrie (FACS) wird das Infarktareal des Myokards freipräpariert und mit FACS-Verdauungspuffer für 30 min bei 37°C verdaut. Die Zellen werden durch ein 40 µm-Zellsieb filtriert und 10⁶ Zellen pro Färbeschritt

werden mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungen an Fcγ RIII/II Rezeptoren werden durch Inkubation der Zellsuspension mit sättigender Menge des Zellkulturüberstandes des Klons 2.4G2 (anti-CD16/CD32) für 15 min (4°C) inhibiert. Die Oberflächenantigene der Zellsuspension werden für 15 min gefärbt und danach werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen.

Zur Kompensation der Farbstoffe werden Splenozyten aus einer Mäusemilz isoliert. Hierzu wird die entnommene Milz durch einen 40 µm Zellsieb filtriert und mit 15 ml Lysis-Puffer für 3 min inkubiert. 20 ml PBS werden zur Zellsuspension hinzugegeben und 8 min bei 1.200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf circa 3 ml abgenommen und das Pellet resuspendiert und erneut durch das Zellsieb filtriert. Es werden 7 ml PBS dazu pipettiert und 10.000 Zellen/Well für die Kompensation verwendet.

6.14. Depletion von Neutrophilen

Mäuse werden i.p. mit HSA-Flag-TWEAK (32 µg/Tier) oder der Placebo-Kontrolle (PBS) direkt nach Induktion des MI und an Tag 3 und 6 injiziert. Die neutrophilen Granulozyten werden in HSA-Flag-TWEAK/Placebo-behandelten Tieren durch eine i.p. Injektion von 250 µg eines anti-Ly6G Antikörpers oder einer Isotypkontrolle an Tag 5 und 6 depletiert. An Tag 8 nach MI werden die Tiere getötet und das periphere Blut wird per FACS auf Neutrophile untersucht. Hierzu wird das Blut mit Heparin behandelt. Nach erfolgter Färbung von Oberflächenantigenen werden die Erythrozyten durch Fixierungs-Permeabilisierungs-Konzentrat in Fixierungs-Permeabilisierungs-Diluent für 45 min bei RT lysiert. Die Zellen werden in FACS-Puffer am BD FACSCanto II Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm FlowJo (TreeStar Inc, Version 7.6.5).

Diese Arbeit wird von Denise Mathes und Susanne Knorr, Arbeitsgruppe Prof. Frantz, und Martin Chopra, Arbeitsgruppe Dr. Beilhack, durchgeführt.

Das Mausmyokard wird in 4 % Paraformaldehyd über Nacht fixiert, in Paraffin eingebettet und für histologische Färbungen auf Neutrophile verwendet.

6.15. *In vitro* Experimente

6.15.1. Zelllinien

Humane kardiale Fibroblasten (HCF) werden in cardiac fibroblast growth Medium in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. In Abhängigkeit der Konfluenz des Zellrasens werden die Zellen mit PBS gespült, danach mit Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:3 gesplittet. Die Zellzahl wird mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

6.15.2. Isolation von primären kardialen Mausfibroblasten

Den Versuchstieren wird i.p. 100 µl Heparin (2,500 IU/ml) injiziert und nach 5 min werden die Tiere mit Avertin anästhesiert. Das Herz wird aus dem Thorax entfernt und das Myokard in einer sterilen Schale mit PBS (ohne Ca/Mg) von anhaftendem Fremdgewebe und Gefäßen befreit. Nach Waschen im Isolationspuffer unter einer Sterilbank wird das Gewebe in ein neues Gefäß mit 3 ml Isolationspuffer übertragen. Das Herzgewebe wird in kleine Stücke geschnitten und mit 6 ml Tissue dissociation buffer (mit Kollagenase) für 15 min bei 37°C unter leichter Rotation (4-12 rpm) verdaut, nochmals für 5 min resuspendiert und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wird zunächst durch ein 100 µm-Zellsieb und anschließend durch ein 40 µm-Zellsieb in ein 50 ml Gefäß übertragen, welches mit 25 ml Kollagenase-Inaktivierungsmedium gefüllt ist. Die Zellen werden für 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet wird mit 20 ml primary cell complete medium aufgenommen. Die Zellen werden abschließend in T75-Flaschen ausgesät und in einen Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ gestellt.

6.15.3. Isolation von primären kardialen Mausmyozyten

Den Mäusen wird i.p. 100 µl Heparin verabreicht und nach 5 min werden die Tiere mit Avertin betäubt. Das Herz mit einschließlich circa 2 mm der Aorta wird aus dem Thorax präpariert und in 10 ml Perfusionspuffer bei RT überführt. Anhaftende Gefäße, Fett und Gewebe werden entfernt und das Herz wird mit einer feinen Spritze kanüliert. Mit einer schmalen Klammer wird das Herz an der Spritze fixiert und die Aorta wird an die Kanüle mit einem 6-0 Faden befestigt. Das Myokard wird für 4 min

bei einer Geschwindigkeit von 3 ml/min bei 37°C mit Perfusionspuffer perfundiert. Danach erfolgt eine Perfusion für 10 min bei 3 ml/min mit Myocyte Verdauungspuffer. Das Herz wird von der Kanüle befreit und in ein Röhrchen mit 2,5 ml Myocyte Verdauungspuffer überführt. Das Gewebe wird klein geschnitten und mit einer Pipette homogenisiert. Die Zellsuspension wird daraufhin in ein konisches Gefäß mit 2,5 ml Myocyte Stop Puffer 1 (RT) übertragen. Wieder wird die Suspension mit einer Pipette für 5 min homogenisiert. Nach 10 min Inkubationszeit können die Myozyten sich im Konus absetzen und der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, welches 1 min bei 180 g zentrifugiert wird. Das neu erhaltene Pellet wird mit 5 ml Myocyte Stop Puffer 2 aufgenommen und zusammen mit den vorher abgesetzten Myozyten resuspendiert. 50 µl Calciumchloridlösung (10 mM) werden hinzugefügt, gemischt und für 4 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Es werden 100µl, danach 30µl und danach 50µl Calciumchlorid hinzu gegeben und nach jedem Schritt erfolgt eine Inkubationszeit von 4 min bei RT. Die Myozytenlösung wird dann in ein neues konisches Gefäß überführt und nach einer Inkubationszeit von 10 min können sich die Myozyten im Konus absetzen. Der Überstand wird 1 min bei 180 g zentrifugiert und beide Pellets werden zusammengeführt und mit 5 ml Myocyte plating medium bei 37°C resuspendiert. Die Zellsuspension wird in T75 Flaschen ausplattiert und nach 1 Stunde wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden mit Myocyte Kultivierungsmedium gewaschen und dieses Medium wird auch für die Kultivierung eingesetzt.

6.15.4. Zellvitalitätsbestimmung

Der Gehalt an lebenden Zellen in der Zellsuspension wird mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Falls es nötig ist, werden die Zellen vorher trypsinisiert und 15 µl dieser Zellsuspension werden mit 15 µl Trypanblaulösung gemischt und davon werden 10 µl für die Zählkammer verwendet. Vier Quadrate werden ausgezählt und nur die Anzahl an lebenden, d.h. farblosen Zellen wird für die Berechnung verwendet. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und dem Verdünnungsfaktors der Zählkammer wird die Anzahl an lebenden Zellen berechnet. Das Ergebnis wird dann durch die Anzahl der gezählten Quadrate geteilt.

6.15.5. Durchflusszytometrie von Zellen

Für die Messung der Oberflächenexpression von TNF-Rezeptoren auf humanen kardialen Fibroblasten werden die Zellen nach Trypsinierung bei 1.200 rpm für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen werden in 12 ml DMEM-Medium in FACS-Gefäße überführt (1ml/Gefäß) und nochmals bei 12000 rpm für 4 min zentrifugiert. Danach werden die Zellen für 30 min mit den Antikörpern inkubiert und mit FACS-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wird zu dem Zellpellet 200 µl FACS-Puffer gegeben und die Zellen am BD FACS Calibur mit der Software Cell Quest Pro gemessen. Diese Arbeit wird von Steffen Salzmann und Isabell Lang, Arbeitsgruppe Prof. Wajant, durchgeführt.

6.15.6. TWEAK-Gaussia-Bindungsassay mit humanen kardialen Fibroblasten

Als quantitativer Nachweis des funktionellen Rezeptors Fn14 wird Gaussia princeps Luziferase (GpL)-FLAG-TNC-TWEAK, ein biolumineszierendes Fusionsprotein der löslichen Form von TWEAK, verwendet, um auf lebenden Zellen die TWEAK-Fn14 Interaktion zu untersuchen¹⁶⁵. HCF-Zellen werden hierzu über Nacht in 24-Multiwell-Platten in cardiac fibroblast growth medium bei 37°C kultiviert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung werden die Zellen mit einer hohen Konzentration (1,5 µg/ml; 4,7 nM) konventionellem Fc-Flag-TWEAK oder mit einem TNFR1-spezifischen Antikörper H398 (10 µg/ml) geblockt. Die Zellen werden dann mit einer steigenden Konzentration an GpL-Flag-TNC-TWEAK oder GpL-Flag-TNC-TNF für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Alle ungebundenen Liganden werden durch mehrmaliges Waschen mit kaltem PBS entfernt. Die Zellen werden dann in 50µl Medium (RPMI mit 0,5 % FKS, RT) in eine schwarze 96-Well-Platte überführt. Für die Bestimmung der durchschnittlichen Rezeptoranzahl pro Zelle werden die Zellen aus einem Well mit einem Hämocytometer gezählt. Zur Quantifizierung der GpL Aktivität in den Proben wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 µl Luciferase Working Solution (Gaussia luciferase assay kit) gestartet und die Lumineszenz (1 Sekunde/Probe) wird direkt mit einem Lucy 2 Luminometer gemessen. Die Lumineszenzaktivität von definierten Mengen an reinem GpL-Flag-TNC-TWEAK und GpL-Flag-TNC-TNF wird ebenfalls gemessen, um die Lumineszenz quantifizieren zu können. Als spezifische Bindung wird die Differenz der totalen Bindung (Proben ohne Antagonist-

Vorbehandlung) und zugehörige unspezifischen Bindungen (Proben mit Antagonist-Vorbehandlung) definiert. Dieser Versuch wird von Andrea Fick, Arbeitsgruppe Wajant, durchgeführt.

6.15.7. Western blot Analyse

Für die Bestimmung der Aktivierung von HCF-Zellen durch TWEAK, werden die Zellen auf Zielproteine des klassischen und alternativen NF κ B-Signalwegs untersucht.

Hierzu werden die Zellen (500.000 Zellen) für 0 min, 5 min, 15 min und 60 min mit Flag-TWEAK (200 ng/ml), Fc-Flag-TWEAK (200 ng/ml) oder TNFwt (50 ng/ml) stimuliert und mittels Western blot Analyse die Zielproteine I κ B α und phosphoryliertes I κ B α (pI κ B α) des klassischen NF κ B Signalwegs bestimmt.

Zur Bestimmung der Zielproteine p100, p52, NIK, TRAF1, TRAF2 und cIAP1 werden die HCF-Zellen (2×10^6 Zellen/Ansatz) über Nacht mit Flag-TWEAK oder Fc-Flag-TWEAK in den Konzentrationen 0 ng/ml, 20 ng/ml und 200 ng/ml stimuliert. Danach werden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von den Well-Platten entfernt und 4 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in 100 μ l Probenpuffer mit Protease-Inhibitoren (1:25) aufgenommen und für 20 Sekunden mittels einer Ultraschallsonde homogenisiert. Bei der Verwendung von phospho-spezifischen Antikörpern wird noch ein zusätzlicher Schritt verwendet: Zusätzlich zu den Proteaseinhibitoren wird zu dem Probepuffer noch Phosphataseinhibitoren beigefügt. Nach Ultraschallbehandlung wird das Zellpellet bei 95°C für 5 min aufgekocht und für 10 min bei 14.000 rpm bei RT zentrifugiert und dann für die Messung verwendet.

Für die Elektrophorese werden ein 12 %iges Trenngel und ein 6 %iges Sammelgel benutzt. Nach Beladung der Gele wird eine Spannung von 90 - 130 Volt für ca. 90 min angelegt. Die Gele werden dann im „semi-dry“ Blottingverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierbei wird die Membran und das Whatman-Filterpapier mit Blottingpuffer benetzt und wie folgend in die Blottingkammer gelegt (beginnend bei der Anode): 2 Blätter Whatman-Paper, 1 Blatt Nitrozellulosemembran, Gel und 2 Blätter Whatman-Papier. Bei einer Stromstärke von 1,5 mA/cm² Gelfläche wird bei RT für 90 - 120 min die Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulose übertragen.

Die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine können dann mit spezifischen Antikörpern gegen die Zielproteine detektiert werden. Nach 1 Stunde Inkubation mit Blockingpuffer, wird die Nitrozellulosemembran mit PBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in PBST inkubiert. Danach wird die Membran 3 x 5 min mit PBST gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper, der Peroxidase konjugiert ist, für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Proteine durch eine Chemolumineszenzreaktion mit einem luminolbasierten Substrat auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

6.15.8. MTT Zellvitalitätstest

Als Ausgangssubstanz wird 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) verwendet. Dieses Substrat wird von lebenden Zellen durch Enzyme zu Formazan reduziert und kann kolorimetrisch gemessen werden.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität, werden die Zellen in einer 96-Well-Platte mit Flachboden ausplattiert. Nach Behandlung werden 15 µl MTT Färbelösung (5 mg/ml MTT in MEM Medium ohne Phenolrot) pro Well hinzugegeben und es erfolgt eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei 5 % CO₂ und 37°C. Das Medium wird entfernt und 150 µl MTT Elutionslösung werden bei RT hinzugefügt. Die Zellsuspension wird dann für 2 Stunden auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption der Lösung wird spektrophotometrisch bei 595 nm mithilfe eines Mikrotiter Plattenreaders durchgeführt. Als Positivkontrolle wird 0,01 % SDS in Medium verwendet.

6.15.9. Kristallviolett Test

Bei der Kristallviolett-Methode wird photometrisch der Farbstoff Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin) gemessen, der sich an die DNA von Zellen anlagert. Somit kann der Anteil an lebenden Zellen quantifiziert werden.

Die Zellen werden in einer 96-Well-Platte mit Flachboden ausplattiert und mit der Testsubstanz inkubiert. Die Zellen werden zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen bevor sie mit 100 µl Kristallviolett Färbelösung (0,5 % Kristallviolett in 25 % Methanol) für 5 min bei RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird die Well-Platte luftgetrocknet. Der Rückstand in

der Platte wird mit 100 µl Kristallviolett Elutionslösung (1 % SDS in PBS) aufgenommen und über Nacht bei RT auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die optische Dichte der Lösung wird bei 650 nm mit einem Mikroplattenreader gemessen und als Programm wird easy WIN basic verwendet. Als Positivkontrolle wird 0,01 % SDS in Medium verwendet.

6.16. Statistische Analyse

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Als Programm für die statistische Analyse wird GraphPad InStat3 (Version 3.0; La Jolla, USA) verwendet. Die behandelten Gruppen werden mit der Placebo-Gruppe mithilfe eines two-tailed unpaired student's t Test verglichen. Die Mortalitätsdaten werden mit einem log rank test verglichen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

7. Ergebnisse

7.1. TWEAK und Fn14 im Myokardinfarkt

7.1.1. Expression von TWEAK und Fn14 nach Myokardinfarkt

In einem ersten Schritt werden die mRNA Expression von TWEAK und Fn14 im Herz 3 Tage und 8 Wochen nach MI untersucht. Sowohl TWEAK (Abbildung 9A), als auch sein Rezeptor Fn14 (Abbildung 9B) werden im Herzgewebe nach MI signifikant höher exprimiert, als im Herzen sham-operierter Mäuse.

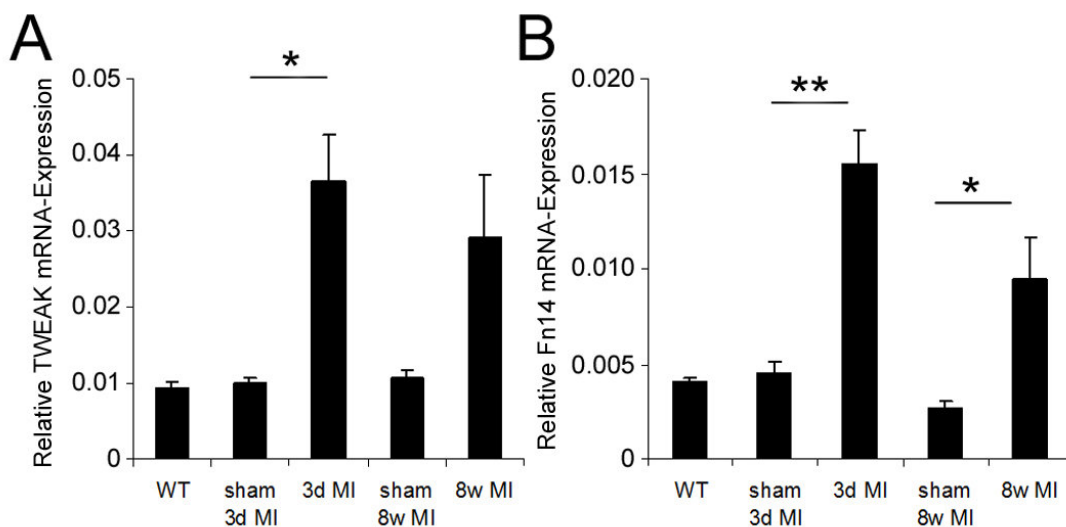


Abbildung 9. TWEAK und Fn14 sind nach MI stark im Myokard exprimiert.

Nach 3 Tage MI ist die mRNA Expression von TWEAK (A) und Fn14 (B) signifikant erhöht. Signifikant erhöht ist die Expression von Fn14 mRNA nach 8 Wochen nach MI. Abbildungen: Pachel et al., PLoS ONE, 2013¹⁶⁶.

Immunhistologische Färbungen bestätigen eine Induktion von Fn14 in der Borderzone infarzierter Herzen (Abbildung 10A).

Hierbei sind hauptsächlich kardiale Fibroblasten für die erhöhte Expression des Rezeptors verantwortlich (Abbildung 10B).

Um die zellspezifische Expression von Fn14 zu bestätigen, werden adulte Mauscardiomyozyten und -fibroblasten isoliert. Anhand dieser Zellen kann *in vitro* gezeigt werden, dass nur kardiale Fibroblasten, nicht aber Cardiomyozyten Fn14 bilden (Abbildung 10C, D).

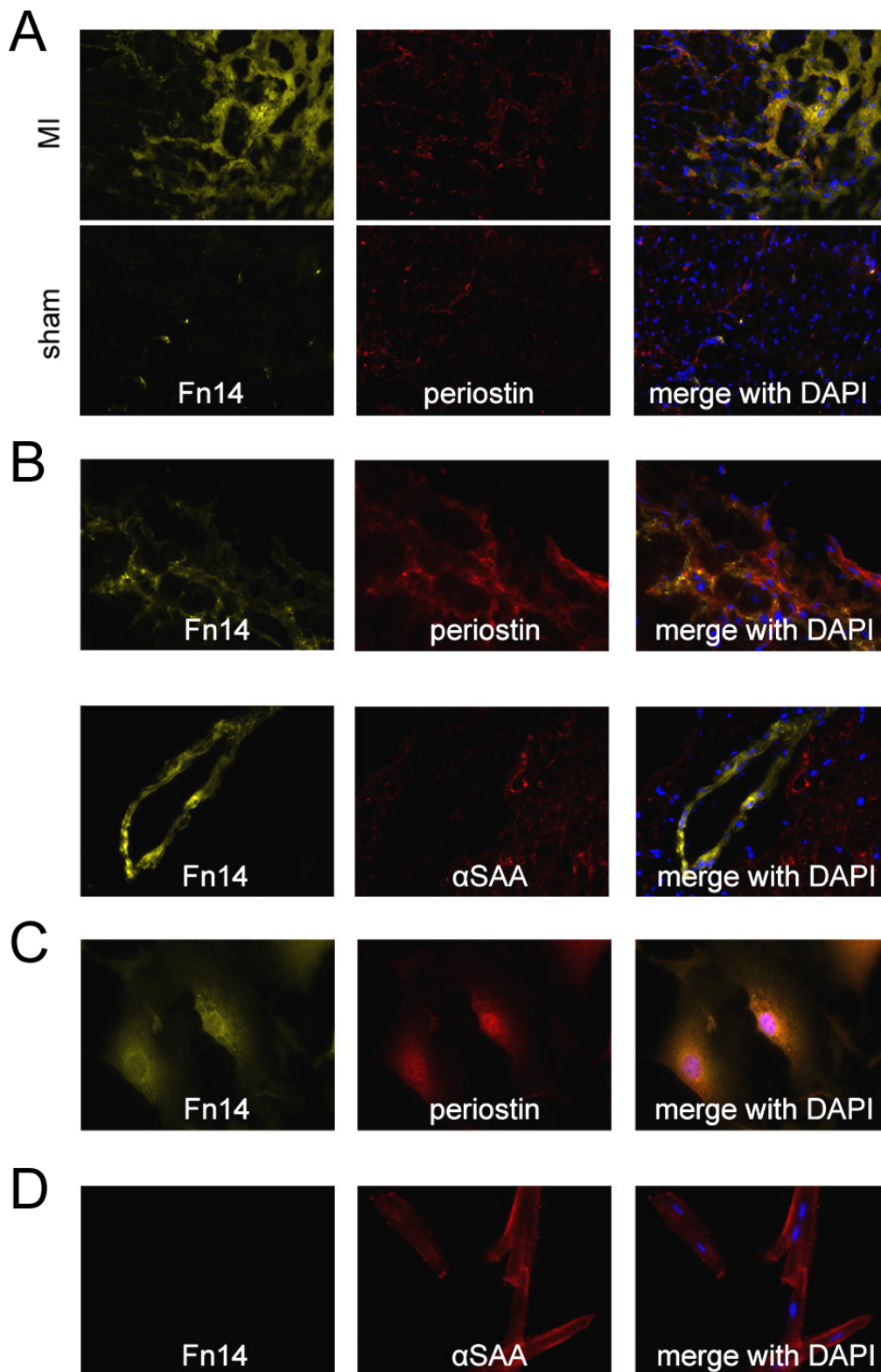


Abbildung 10. Immunhistologische Färbung von TWEAK und Fn14.

Nach 3 Tage MI ist Fn14 Protein stark in der Borderzone des Myokardiums exprimiert (A). Periostin-positive Fibroblasten sind die Hauptquelle der Fn14 Expression im infarzierten Herz (B) und α SAA positive Kardiomyozyten zeigen keine Fn14 Expression (C). Isolierte kardiale Mausfibroblasten exprimieren Fn14 (D), wohingegen isolierte Kardiomyozyten keine Fn14 Expression zeigen. Abbildungen: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

Nach experimentellem MI erhöht sich der systemische TWEAK-Level im Serum bei permanentem Infarkt und im IR (Abbildung 11). Auffällig ist, dass die Expression von TWEAK durch einen operativen Eingriff, auch bei sham Tieren nach IR bzw. 3 Tage, nicht aber 8 Wochen nach MI, stark ansteigt.

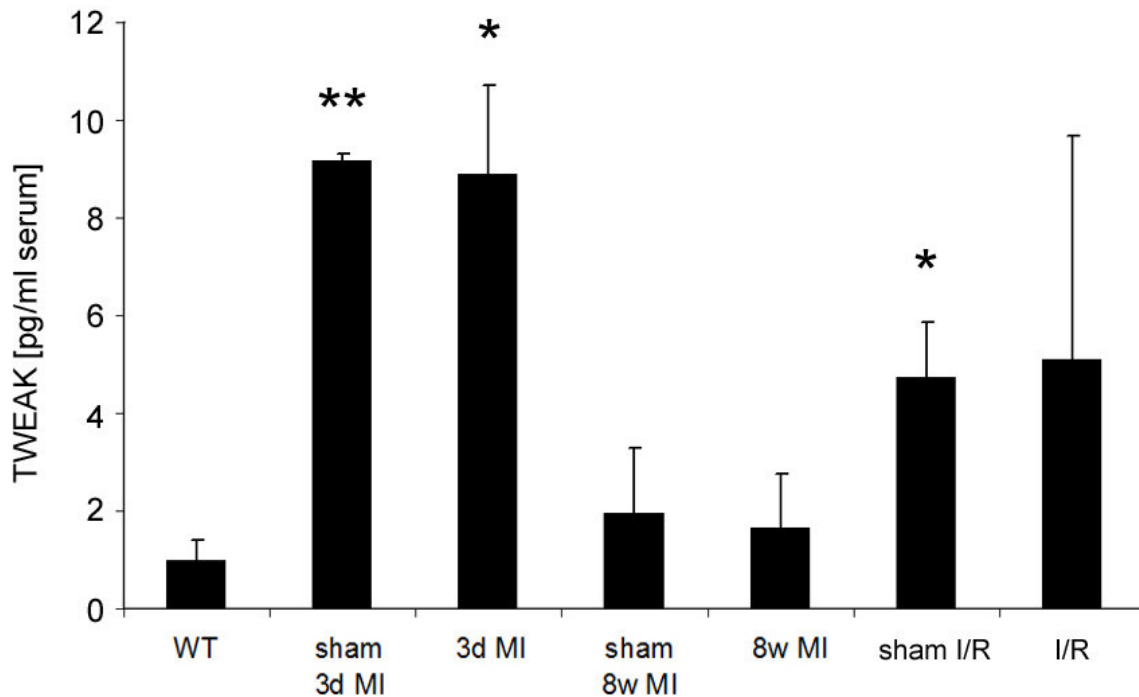


Abbildung 11. TWEAK Gehalt im Serum.

Im Serum sind in den operierten Tieren und sham Tieren gleich hohe TWEAK-Level zu detektieren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl TWEAK als auch dessen Rezeptor Fn14 im Myokard in Mäusen nach MI hochreguliert werden und dass von den unterschiedlichen Zellpopulationen im Herzen hauptsächlich Fibroblasten Fn14 exprimieren. Die Thorakotomie induziert als operativer Eingriff selbst schon systemisch die Serumkonzentration an TWEAK.

7.1.2. Funktionalität des Fn14-Signalweges in humanen kardialen Fibroblasten

Im Mauserherz sind die kardialen Fibroblasten die hauptsächlichen Produzenten von Fn14 nach MI, was eine fundamentale Rolle dieser Zellpopulation in den Wirkungen von exogenem TWEAK nach MI nahe legt. Primäre HCF exprimieren ebenfalls Fn14 (Abbildung 12), was auf eine Bedeutung des TWEAK-Fn14-Systems im Menschen hindeutet. HCF exprimieren neben Fn14 auch Fas, TRAILR2 und TNFR1.

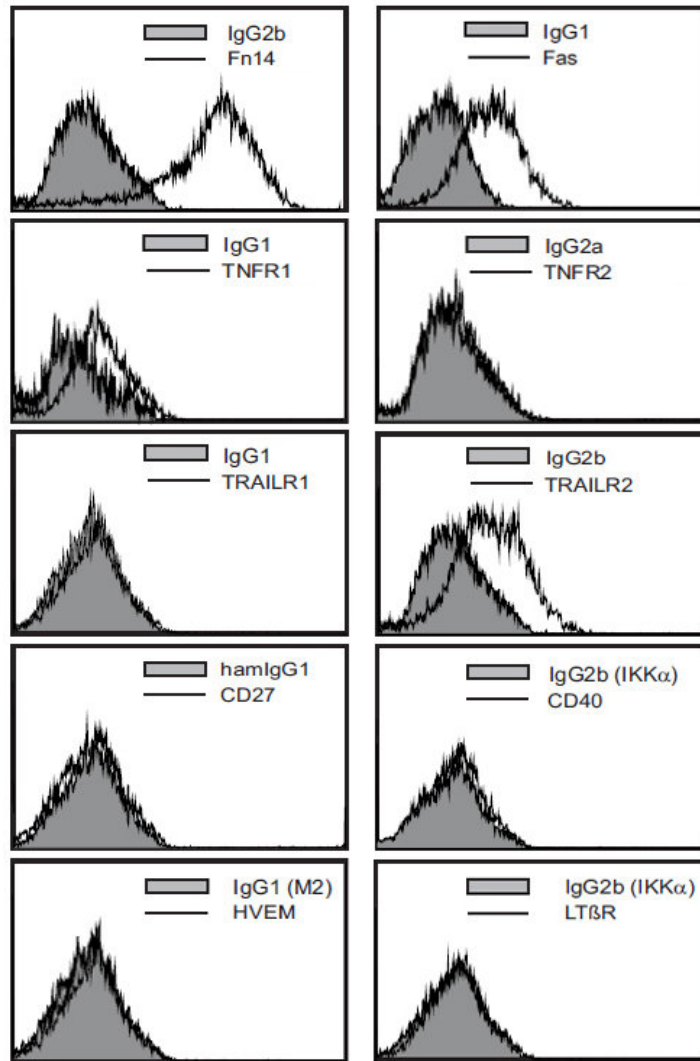


Abbildung 12. Expression von TNF-Rezeptoren auf HCF-Zellen.

Die Expression verschiedener Rezeptoren auf HCF-Zellen wird mittels FACS-Analyse bestimmt. HCF-Zellen zeigen eine starke Expression von Fn14, eine mittlere Expression von Fas und TRAILR2, eine geringe Expression von TNFR1 und keine Expression von TNFR2, TRAILR1, CD27, CD40, HVEM und LT β R.

Die Bindung von Gaussia-Luziferase-gekoppeltem Gaussia-sTWEAK an die HCF-Zellen bestätigt die Expression von funktionellem Fn14 und ergibt im Bindungsassay, dass pro Zelle 6.704 Rezeptoren exprimiert werden (Abbildung 13). HCF-Zellen können durch exogenes TWEAK zur Aktivierung des klassischen (Phosphorylierung von I κ B) und alternativen NF κ B Signalweges (p100-Prozessierung) führen (Abbildung 14). Membranständiges TWEAK (simuliert durch Fc-TWEAK) aktiviert beide Signalwege, während lösliches TWEAK nur den alternativen NF κ B Signalweg aktiviert.

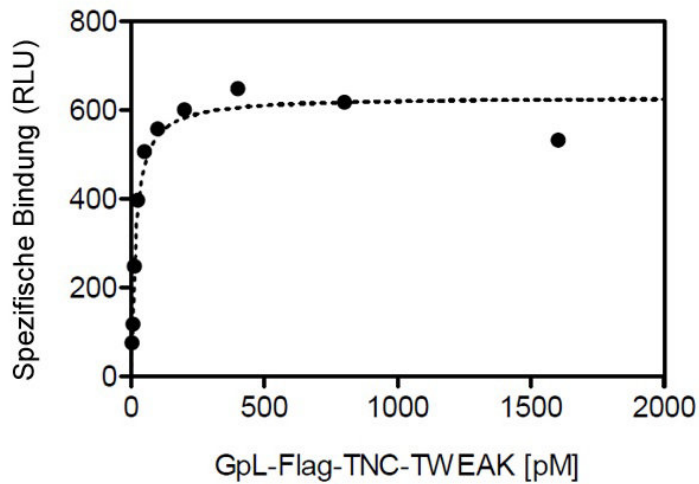


Abbildung 13. HCF-Zellen besitzen einen funktionellen Fn14 Rezeptor.

Im Gaussia-Bindungsassay zeigen HCF-Zellen eine spezifische Bindung von GpL-Flag-TNC-TWEAK.

HSA-Flag-TWEAK zeigt weder im MTT- noch im Kristallviolett-Assay zytotoxische Wirkungen auf HCF-Zellen in Konzentrationen bis 500 ng/ml (Ergebnisse nicht gezeigt).

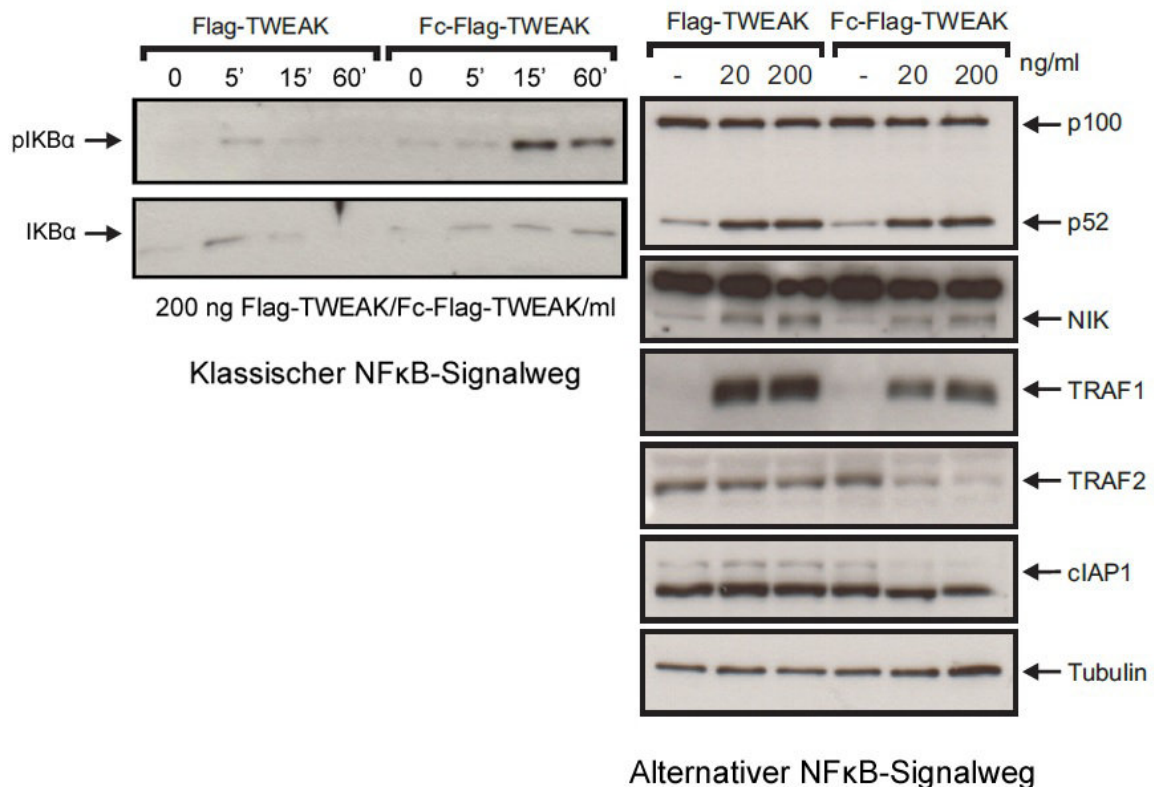


Abbildung 14. TWEAK zeigt in HCF-Zellen eine Aktivierung des klassischen und alternativen NFκB Signalwegs.

In HCF-Zellen führt TWEAK zu einer Phosphorylierung von IκBα, das ein Zielmolekül des klassischen NFκB Signalwegs ist. TWEAK führt auch zur p100 Prozessierung und Aktivierung Zielproteine wie NIK und TRAF1, die Bestandteile des alternativen NFκB Signalwegs sind.

HCF-Zellen exprimieren funktionales Fn14, welches auf die Bindung von TWEAK mit NFkB-Aktivierung reagiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TWEAK auch im Menschen das Potential besitzt, auf kardiale Fibroblasten einzuwirken.

7.1.3. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf das Überleben nach Myokardinfarkt

Die erhöhte Expression der Komponenten des TWEAK-Fn14 Systems nach experimentellem MI deutet auf eine Rolle dieser Proteine im geschädigten Herzen hin. In einem nächsten Schritt werden daher die Wirkungen von rekombinantem TWEAK im MI-Modell untersucht. Die exogene Behandlung infarzierter Versuchstiere mit HSA-Flag-TWEAK im chronischen MI-Modell resultiert in signifikant erhöhter Mortalität im Vergleich zur Placebogruppe (Abbildung 15A).

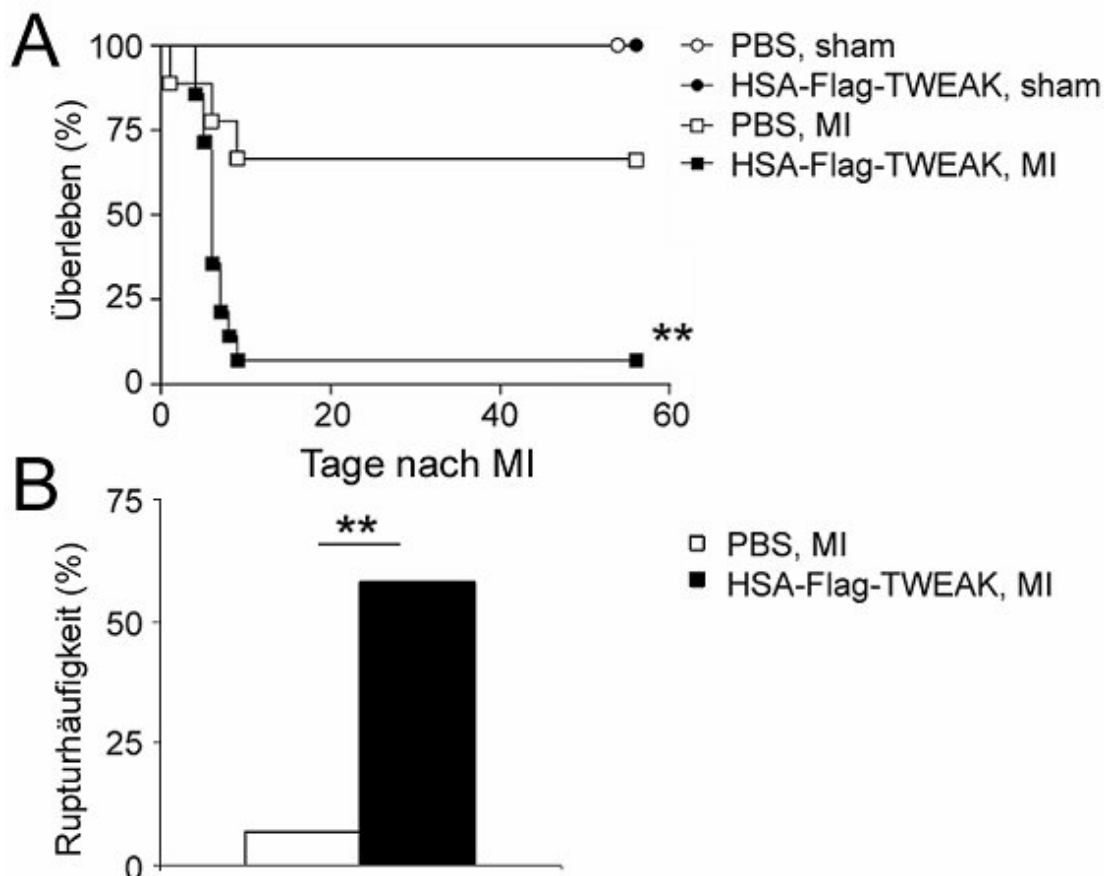


Abbildung 15. HSA-Flag-TWEAK erhöht die Mortalität und das Auftreten von kardialen Rupturen nach MI.

Das prozentuale Überleben von HSA-Flag-TWEAK behandelten Mäusen ist signifikant verringert nach MI im Vergleich zur Kontrollgruppe (A). Die meisten HSA-Flag-TWEAK behandelten Tiere sterben aufgrund von kardialen Rupturen (B). Abbildungen: Pachel et al., PLoS ONE, 2013¹⁶⁶.

Bei der Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK ist eine erste Mortalität der Versuchstiere (von 14 %) ab Tag 4 zu verzeichnen. Die Mortalität steigt bis auf 93 % bis zum Versuchsende. Die mediane Überlebenszeit dieser Tiere beträgt 6 Tage. Änderungen des relativen Körpergewichtes oder der Gewichte von Herz, RV, Lunge oder Milz zeigen keine Auffälligkeiten zwischen den Gruppen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK bewirkt ein signifikant erhöhtes Auftreten von kardialen Rupturen in den Versuchstieren (Abbildung 15B).

Mittels echokardiographischer Messung nach MI wird die kardiale Herzfunktion überprüft. In der apikalen sowie papillären Ebene wird gemessen, um Veränderungen im Infarktbereich und im nicht-infarzierten Bereich detektieren zu können. Das verminderte Überleben der Tiere in der HSA-Flag-TWEAK-Gruppe korreliert nicht mit Störungen der kardialen Herzfunktionen (Tabelle 5) oder verstärkter Dilatation im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe.

Tabelle 5. HSA-Flag-TWEAK hat keinen Effekt auf echokardiographische Parameter.Echokardiographie Tag 1 und Tag 3 nach MI. Abbildungen: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

Tag 1				
Parameter	PBS, sham	HSA-Flag-TWEAK, sham	PBS, MI	HSA-Flag-TWEAK, MI
n	3	3	9	17
Herzrate (bpm)	473,3 ± 18,56	440 ± 15,28	462,2 ± 28,57	494,7 ± 16,11
Papillär				
ESA (mm²)	7 ± 0,38	5,7 ± 0,33	12,2 ± 0,66	11,7 ± 0,53
EDA (mm²)	10 ± 0,84	7,6 ± 0,44	14,5 ± 0,54	14,2 ± 0,64
2D FS (%)	29,6 ± 3,02	25 ± 0	16,1 ± 2,5	17,4 ± 1,51
Apikal				
ESA (mm²)	7,6 ± 0,44	7 ± 0,96	13,5 ± 0,79	11,9 ± 0,67
EDA (mm²)	11,2 ± 0,73	9,9 ± 0,48	15,7 ± 0,86	14,1 ± 0,71
2D FS (%)	32,3 ± 4,87	29,8 ± 6,35	14,1 ± 1,66	15,7 ± 1,84

Tag 3				
Parameter	PBS, sham	HSA-Flag-TWEAK, sham	PBS, MI	HSA-Flag-TWEAK, MI
n	3	3	7	15
Herzrate (bpm)	473,3 ± 3,33	480 ± 47,26	562,9 ± 22,65	560,7 ± 11,27
Papillär				
ESA (mm²)	8 ± 1,15	6,4 ± 0,8	12,9 ± 1,3	12,7 ± 0,76
EDA (mm²)	10,3 ± 1,45	8,7 ± 1,15	15,4 ± 1,26	15 ± 0,78
2D FS (%)	22,7 ± 1,46	25,3 ± 3,11	17,3 ± 2,02	15,8 ± 1,24
Apikal				
ESA (mm²)	7,6 ± 0,29	8,2 ± 1,44	12,8 ± 1,38	12,7 ± 0,84
EDA (mm²)	10,8 ± 0,62	10,9 ± 1,74	15,4 ± 1,58	15 ± 0,81
2D FS (%)	29,7 ± 2,18	25 ± 2,18	17,1 ± 1,57	16,5 ± 1,76

Daten werden als Mittelwerte ± SEM dargestellt; n ist die Anzahl der Versuchstiere. EDA, end-diastolische Fläche; ESA, end-systolische Fläche; FS, Auswurfleistung; 2D, 2-Dimensional.

7.1.4. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf die extrazelluläre Matrix

Das Remodelling der extrazellulären Matrix spielt eine große Rolle für die Wundheilung nach MI und Störungen der Funktionen daran beteiligter Proteine können die Ursachen für kardiale Rupturen darstellen¹⁶⁷. Im Infarktgewebe wird 3 Tage nach MI, und daher zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine kardialen Rupturen aufgetreten sind, die Expression und Funktion verschiedener Proteine, die am Remodelling der extrazellulären Matrix beteiligt sind, untersucht (Abbildung 16A, B).

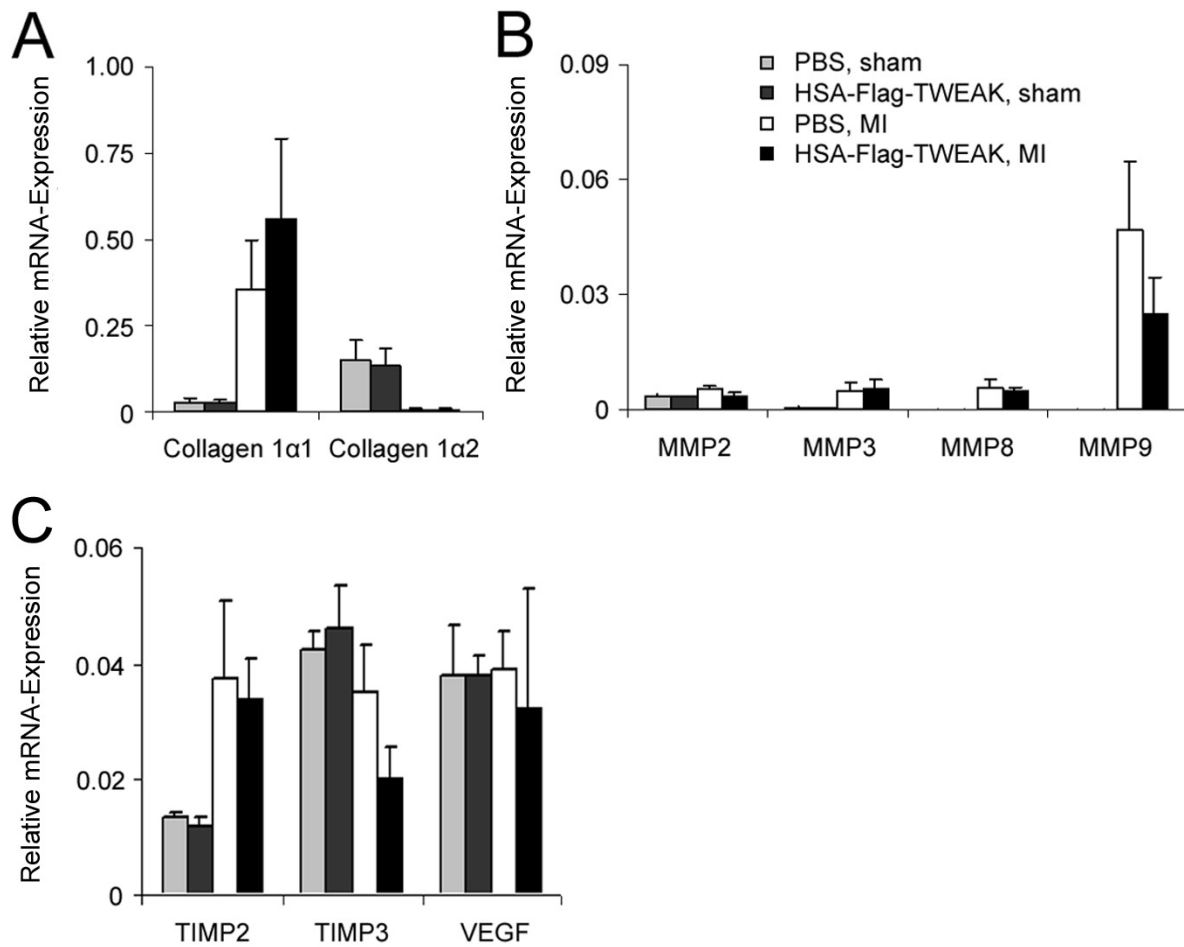


Abbildung 16. Kein Unterschied in der mRNA Expression von wichtigen Remodelling-Genen.

Die mRNA Expression von Collagen1α1 und Collagen1α2, MMP2/3/8/9, TIMP2/3 und VEGF sind durch HSA-Flag-TWEAK Behandlung nicht signifikant verändert. Abbildungen: Pachel et al., PLoS ONE, 2013¹⁶⁶.

Die mRNA-Level von Collagen 1α1, Collagen 1α2, sowie MMP2, MMP3, MMP8 und MMP9 sind nicht signifikant verändert in der Behandlungsgruppe.

Ferner sind die mRNA Expressionen von TIMP2 und TIMP3, sowie die Expression von VEGF in HSA-Flag-TWEAK behandelten Mäusen nicht verändert (Abbildung 16C).

Auch die kollagendegradierende Aktivität der Proteasen MMP2 und MMP9, gemessen mittels Gelatinezymographie, sind unverändert (Abbildung 17).

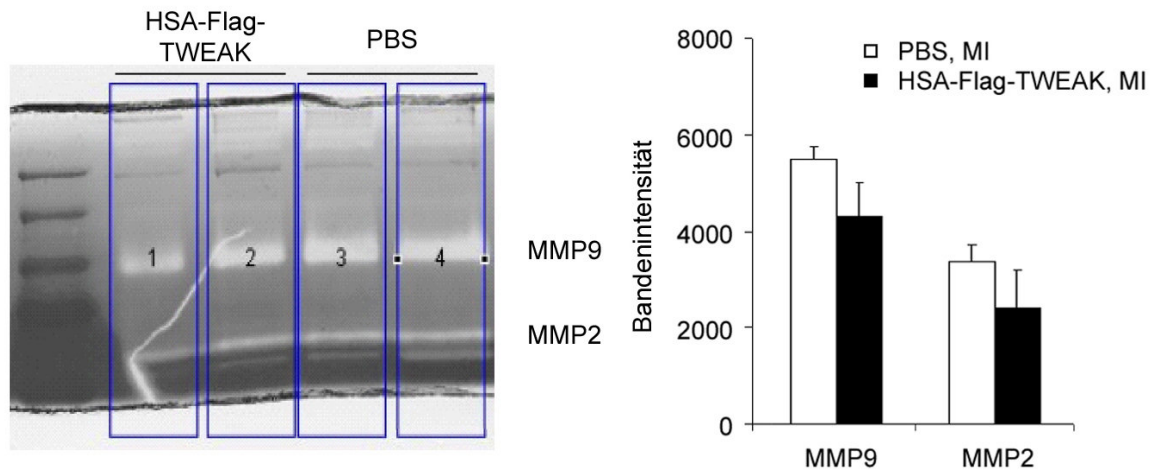


Abbildung 17. Gelatinezymographie der MMP-Aktivität zeigt keine Unterschiede zwischen HSA-Flag-TWEAK und PBS.

Eine Kollagen-Gelatinezymographie zeigt die gleiche Aktivität von MMP9 und MMP2 in HSA-Flag-TWEAK und PBS behandelten Tieren 3 Tage nach MI. Teilweise Abbildungen: Pachel et al., PLoS ONE, 2013¹⁶⁶.

Ein vermehrtes Auftreten von kardiomyozytären Apoptosen kann für das Auftreten von kardialen Rupturen verantwortlich sein¹⁶⁸. Zur Untersuchung dieser Hypothese wird das Auftreten von Apoptosen im LV durch TUNEL Färbung (Abbildung 18A) und immunhistologischer Färbung für gesplante PARP (Abbildung 18B) untersucht. Exogenes HSA-Flag-TWEAK zeigt hierbei keine Modulation der Apoptoseraten in MI oder sham-operierten Tieren.

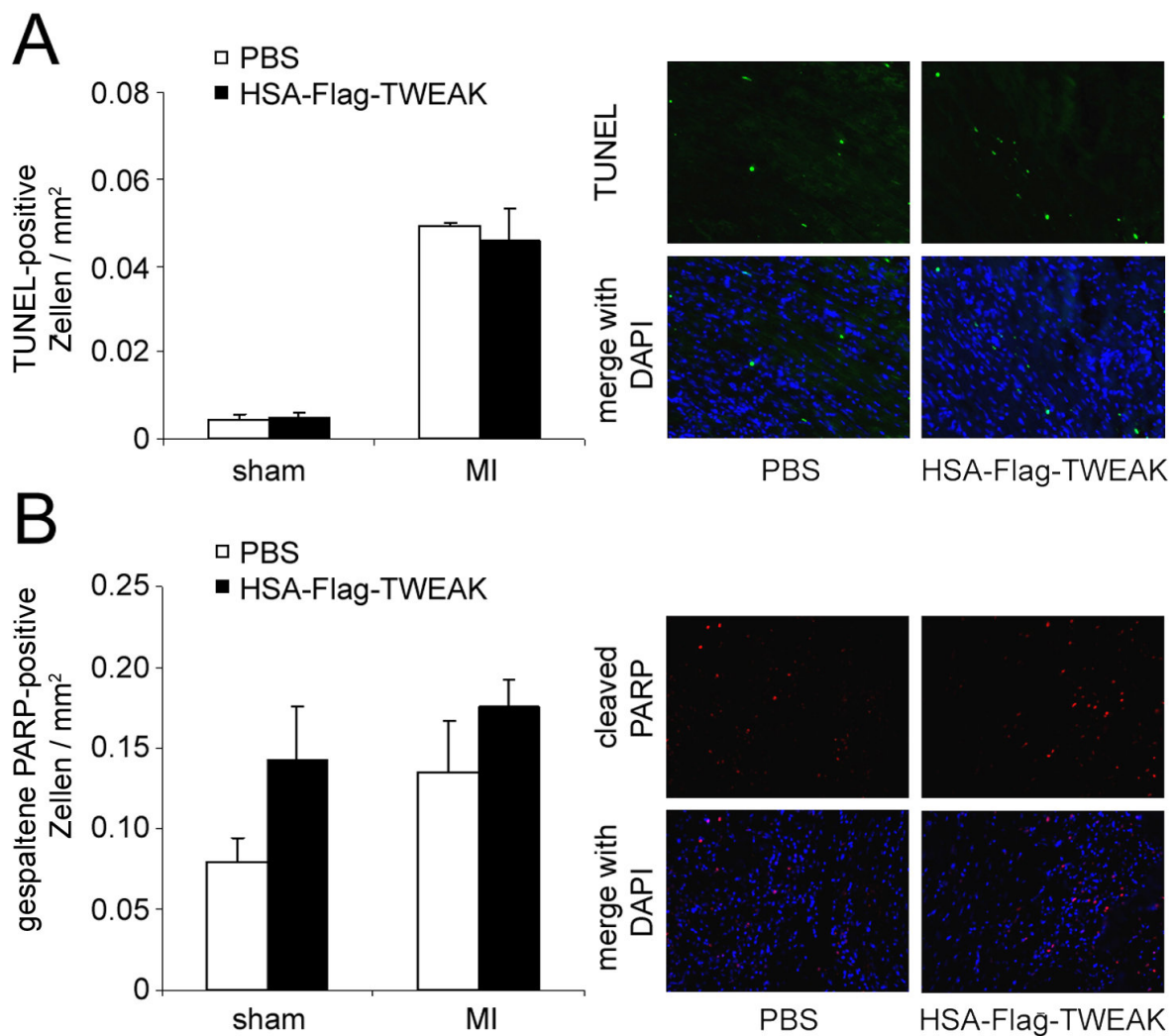


Abbildung 18. HSA-Flag-TWEAK zeigt keine Effekte auf die Apoptoserate *in vivo*.

Die Apoptoserate von HSA-Flag-TWEAK behandelten Tieren ist in der TUNEL-Färbung (A) und immunhistologischen Färbung auf gespaltene PARP nach Infarkt (B) und bei sham-operierten Tieren im Vergleich zur PBS-Kontrolle nicht signifikant verschieden. Abbildungen: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

7.1.5. Effekte von HSA-Flag-TWEAK auf die Immunreaktion nach Myokardinfarkt

Weder die Infarktgröße oder die linksventrikulären Herzfunktionen, noch Änderungen des extrazellulären Matrix-Remodellings oder das Auftreten von Apoptosen scheinen die Ursache für die erhöhte Mortalität und das Auftreten der kardialen Rupturen zu sein.

HSA-Flag-TWEAK aktiviert den alternativen NFκB Signalweg stark und schwächer den klassischen NFκB Signalweg. Diese beiden Signaltransduktionskaskaden führen

in unterschiedlichen Zelltypen unter anderem zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine⁶⁴.

Aus diesen Gründen werden unter Zuhilfenahme von Protein Mikroarrays die Expressionsmuster von Zytokinen im infarzierten Herzgewebe nach HSA-Flag-TWEAK-Behandlung untersucht. Um potentielle Verbindungen und Interaktionen der beeinflussten Zytokine darzustellen, werden die Daten des Zytokin Arrays bioinformatisch nach Normalisierung mit dem menschlichen Interaktom ausgewertet.

Die Gewebslevel einer Reihe von möglichen Mediatoren einer überschießenden Immunantwort sind nach *in vivo* HSA-Flag-TWEAK Behandlung statistisch signifikant erhöht: Interferon- γ (IFN- γ), IL-12, glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene (GITR), monocyte chemotactic protein-1/-5 (MCP-1/-5), RANTES und IL-5 (Tabelle 6).

Eine funktionale Cluster-Untersuchung zeigt, dass die Zytokine durch den Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) Signalweg verbunden sind (Abbildung 19).

Durch die Microarray Analyse sowie die bioinformatische Auswertung der Ergebnisse kann auf ein mögliches Zusammenspiel von HSA-Flag-TWEAK und dem Immunsystem geschlossen werden. Daher wird im Folgenden das Einwandern von Entzündungszellen in das infarzierte Myokard untersucht.

In den Herzen von mit HSA-Flag-TWEAK behandelten Tieren nach MI kann durchflusszytometrisch eine erhöhte Anzahl an CD45⁺ Zellen im Vergleich zur Placebo-Kontrolle detektiert werden (Abbildung 20A). Ein Großteil dieser Zellen sind myeloiden Ursprungs, bzw. neutrophile Granulozyten (CD11b⁺Ly6G⁺) (Abbildung 20B). Immunhistologische Färbungen zeigen ebenfalls eine vermehrte Infiltration von Neutrophilen in die Borderzone des Infarktareals nach HSA-Flag-TWEAK Behandlung (Abbildung 20C).

Tabelle 6. Protein-Array zeigt eine Erhöhung von Zytokinen durch HSA-Flag-TWEAK Behandlung.

Ein Zytokin-Protein-Array des infarzierten Myokards nach 3 Tage MI zeigt eine signifikante Erhöhung von Zytokinen in der HSA-Flag-TWEAK Behandlung. u.d. = unter Detektionslimit, IFN- γ : < 11pg/ml; IL-12: < 5 pg/ml; MCP-1: < 5 pg/ml; MCP-5: < 1 pg/ml; RANTES: < 3 pg/ml. Tabelle: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

Abkürzung/Gen Name	PBS		HSA-Flag-TWEAK		p
	Expression [pg/ml]	SEM	Expression [pg/ml]	SEM	
BLC / B lymphocyte chemoattractant	116,18	5,54	110,40	4,81	N.S.
CD40	10,18	0,64	12,82	1,35	N.S.
CXCL16 / Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	0,50	0,30	0,43	0,43	N.S.
Eotaxin	10,52	0,31	11,63	0,36	N.S.
Eotaxin-2	15,26	0,43	16,09	0,52	N.S.
E-Selektin	40,71	2,92	45,90	5,04	N.S.
GITR / glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene	64,45	10,41	99,69	4,95	p < 0.05
GM-CSF / Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	2,54	1,19	2,70	1,61	N.S.
ICAM-1	420,03	107,50	365,54	186,63	N.S.
IFN- γ	u.d.		7,47	5,75	p < 0.05
IL-12 / Interleukin-12	u.d.		44,51	3,23	p < 0.05
IL-12p40/70	90,43	40,35	73,85	45,21	N.S.
IL-2 / Interleukin-2	6,08	1,65	6,22	1,91	N.S.
IL-3 / Interleukin-3	0,27	0,26	1,04	0,77	N.S.
IL-5 / Interleukin-5	4,13	2,66	18,75	5,05	p < 0.05
IL-9 / Interleukin-9	241,45	16,66	291,12	16,77	N.S.
KC / keratinocyte-derived chemokine	1,29	0,72	2,89	0,58	N.S.
MCP-1 / monocyte chemotactic protein-1	u.d.		21,54	7,27	p < 0.05
MCP-5 / monocyte chemoattractant protein-5	u.d.		7,36	3,65	p < 0.05
MDC / macrophage-derived chemokine	19,18	1,99	22,49	1,54	N.S.
MIP-1 γ / macrophage inflammatory protein γ	412,09	117,66	747,38	107,42	N.S.
MIP-2 / macrophage inflammatory protein-2	1,41	0,88	7,83	3,22	N.S.
MIP-3 α / macrophage inflammatory protein-3 α	7,49	0,36	7,67	0,39	N.S.
OPG / Osteoprotegerin	39,80	2,60	49,27	3,46	N.S.
Osteopontin	17780,54	5216,12	22152,46	4037,31	N.S.
PF4 / platelet factor 4	785,01	69,99	1362,01	337,63	N.S.
P-Selektin	363,30	40,92	551,42	105,86	N.S.
RANTES / regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	u.d.		4,63	3,34	p < 0.05
Resistin	34,46	5,18	43,76	16,07	N.S.
sTNFRII	14,77	0,94	17,12	1,38	N.S.
VCAM-1 / vascular cell adhesion molecule 1	168,49	23,01	257,27	43,26	N.S.
VEGF-D / vascular endothelial growth factor D	91,54	12,95	84,96	5,79	N.S.

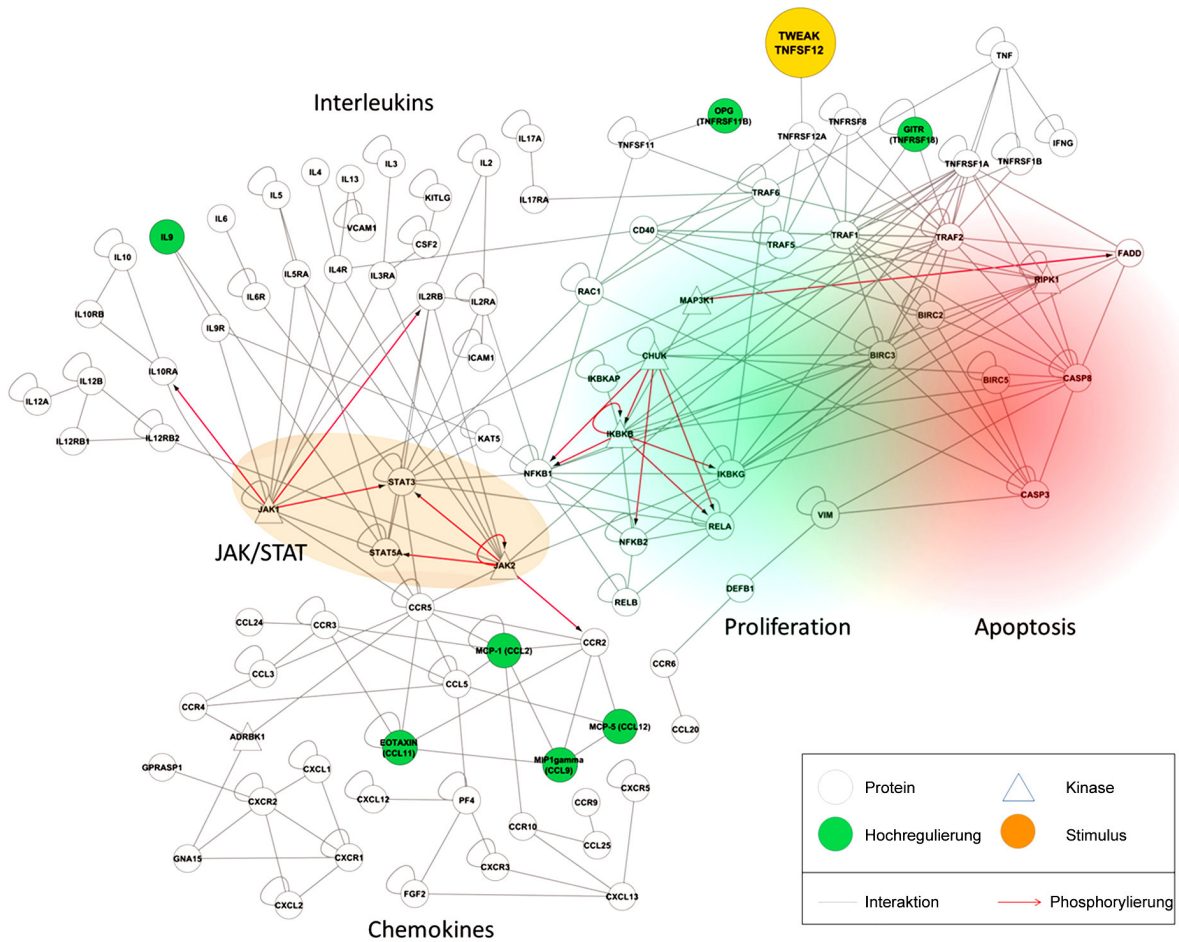


Abbildung 19. Die Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK führt zur Expression von Zytokinen und Chemokinen des NFκB und JAK/STAT Signalwegs.

Das Protein-Protein Interaktionsnetzwerk zeigt Daten von Zytokinen und Chemokinen des Protein-Arrays im menschlichen Interaktom. Die Kreise stehen für Proteine und Kinasen werden als Dreiecke dargestellt. Graue Linien zeigen Protein-Protein Interaktionen und rote Pfeile deuten Phosphorylierungsreaktionen an. Die funktionellen Einheiten werden markiert (Interleukine, Chemokine, JAK/STAT Signalweg). Grün-markierte Knotenpunkte zeigen Hochregulation nach TWEAK Stimulation (orange). Abbildung: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung infarzierter Versuchstiere mit HSA-Flag-TWEAK mit erhöhten Levels an pro-inflammatorischen Zytokinen einhergeht. Die Störungen in diesen Mediatornetzwerken korrelieren mit der vermehrten Rekrutierung von Immunzellen, vor allem von Neutrophilen, in das geschädigte Myokard.

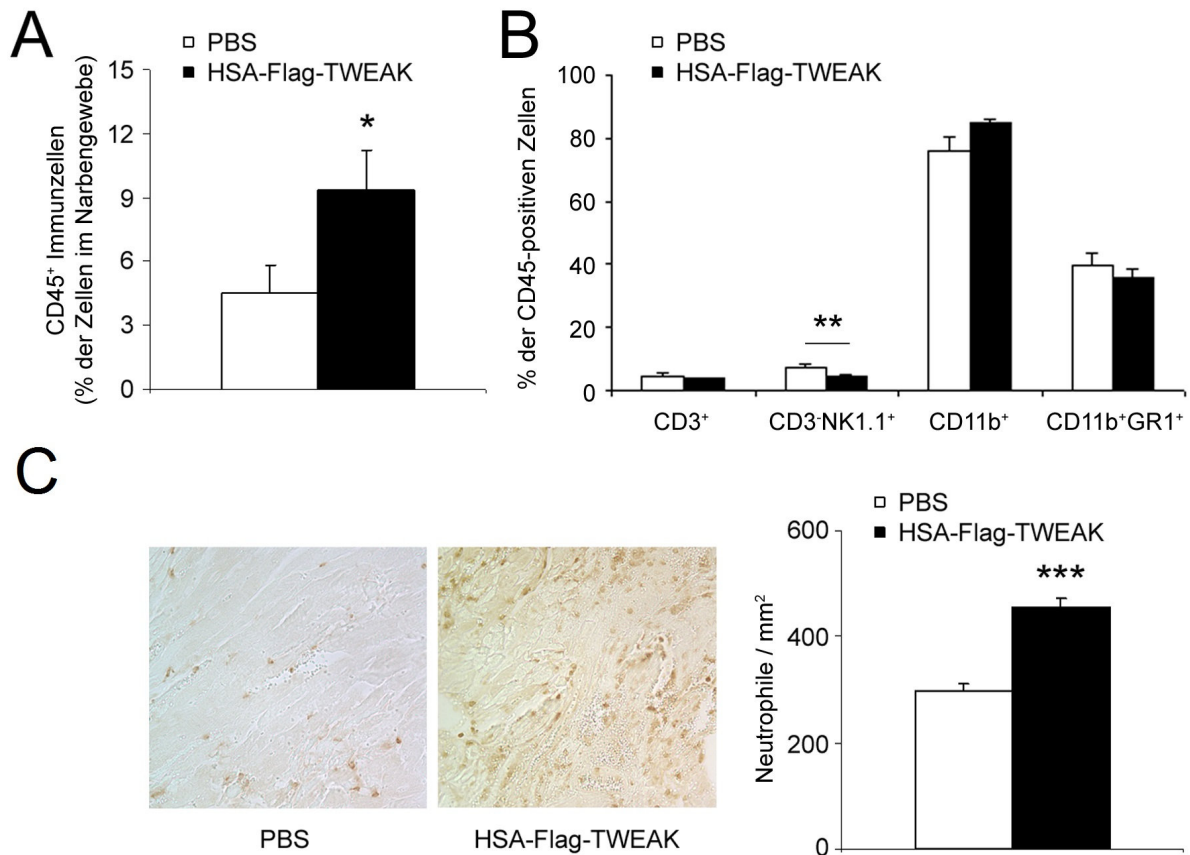


Abbildung 20. HSA-Flag-TWEAK führt zu einer erhöhten Infiltration von Immunzellen.

Nach 3 Tage MI verursacht die Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK eine signifikant erhöhte Infiltration von CD45⁺ Immunzellen (A) in das Myokard. Von den CD45⁺ Immunzellen sind CD3NK1.1⁺ Zellen signifikant verringert (B). Immunhistologisch kann eine signifikant erhöhte Infiltration von Neutrophilen in der Borderzone des Infarktareals bei HSA-Flag-TWEAK behandelten Tieren detektiert werden (C). Abbildung: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

7.1.6. Neutrophile und kardiale Rupturen

Verschiedene Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Infiltration von Neutrophilen und dem Auftreten von kardialen Rupturen hin^{52,169}. Die Behandlung infarzierter Versuchstiere mit exogenem HSA-Flag-TWEAK resultiert in einer vermehrten Infiltration von Neutrophilen in das Infarktareal und bewirkt letztendlich eine mit kardialen Rupturen assoziierte erhöhte Mortalität. Aus diesen Gründen wird ein funktioneller Zusammenhang zwischen Neutrophilen und kardialen Rupturen untersucht.

Die exogene Gabe von anti-Ly6G-Antikörper im *in vivo* MI-Mausmodell bewirkt eine effiziente Depletion von Neutrophilen im Herzgewebe (Abbildung 21A), sowie im peripheren Blut (Abbildung 21B).

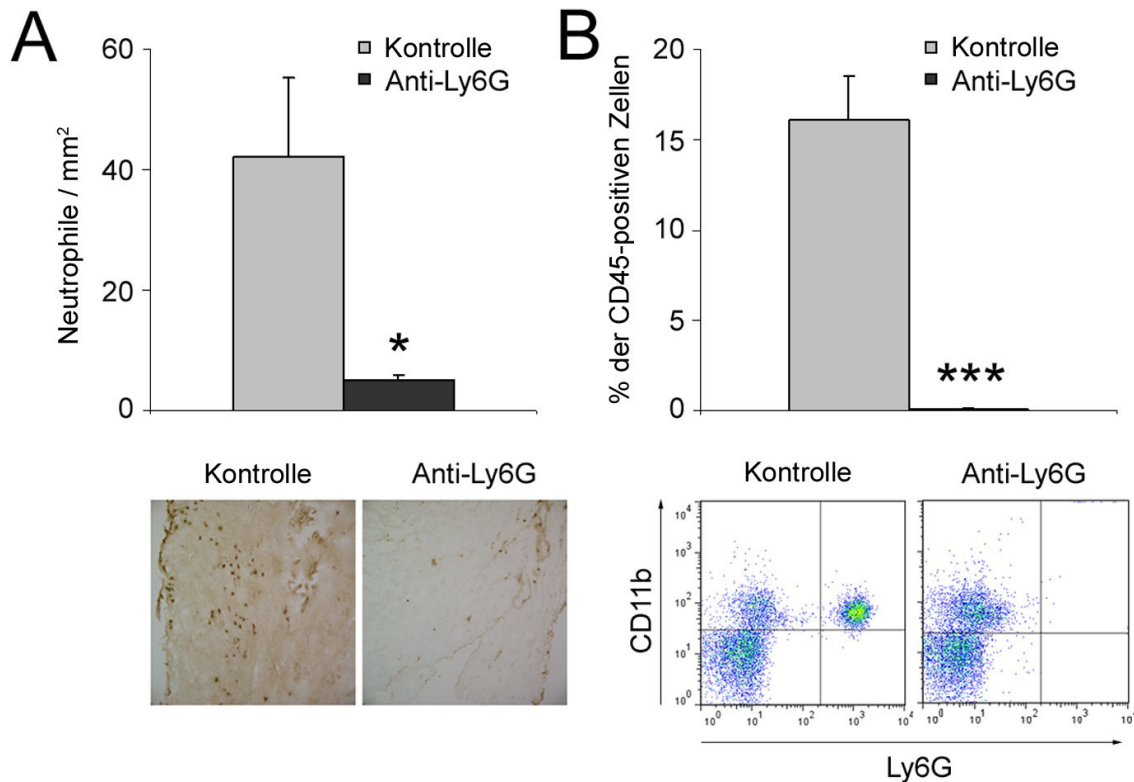


Abbildung 21. Die Depletion der Neutrophilen mit anti-Ly6G-Antikörpern ist systemisch.

Nach der Depletion von Neutrophilen mit anti-Ly6G-Antikörpern ist immunhistologisch die Neutrophilenanzahl in der Borderzone von infarzierten Tieren signifikant verringert (A) und systemisch kann mittels FACS Analyse im Serum der behandelten Tiere eine signifikante Reduktion von Neutrophilen (CD11b⁺Ly6G⁺) gemessen werden (B). Abbildung: Pachel et al., PloS ONE, 2013¹⁶⁶.

Die Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK resultiert in infarzierten Versuchstieren in erhöhter Mortalität unabhängig vom Neutrophilenstatus (Abbildung 22A). Im Vergleich zur Placebo Gruppe kommt es in der Neutrophilen-profizienten HSA-Flag-TWEAK-Behandlungsgruppe zum vermehrten Auftreten von kardialen Rupturen, nicht aber in der Neutrophilen-defizienten Behandlungsgruppe (Abbildung 22B).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das vermehrte Auftreten kardialer Rupturen durch HSA-Flag-TWEAK durch das vermehrte Einwandern von Neutrophilen in das Infarktareal vermittelt wird. Die erhöhte Mortalität nach HSA-Flag-TWEAK-Applikation scheint nicht alleine auf diesem Mechanismus zu basieren.

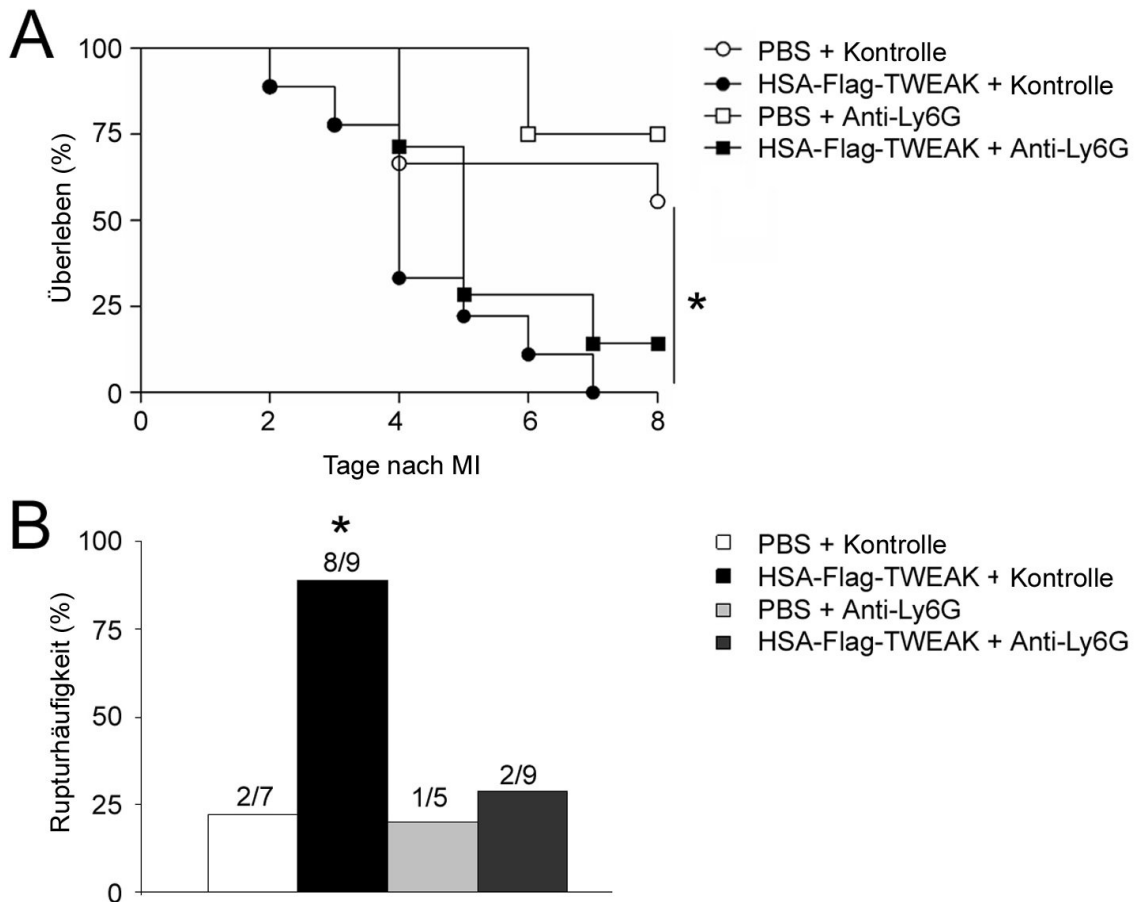


Abbildung 22. Das Auftreten von kardialen Rupturen durch HSA-Flag-TWEAK ist von Neurophilen abhängig.

Trotz Neutrophilendepletion ist das Überleben der PBS und HSA-Flag-TWEAK Tiere nach MI nicht signifikant verändert (A). Das Auftreten von kardialen Rupturen ist signifikant reduziert bei HSA-Flag-TWEAK behandelten Tieren, die zusätzlich eine anti-Ly6G-Antikörper Behandlung bekommen, im Vergleich zur Isotypkontrolle. Abbildung: Pachel et al., PLoS ONE, 2013¹⁶⁶.

7.2. Blutplättchenhemmung im myokardialen IR-Schaden

7.2.1. Effekte von anti-GPIb/-GPVI-Antikörpern und STIM1/Orai1 KO im IR-Modell

Versuchstiere werden im IR-Modell entweder mit GPIb- oder GPVI-spezifischen Antikörpern behandelt, oder die Versuche werden mit STIM1 oder Orai1 KO Knochenmarkchimären Mäusen durchgeführt (Abbildung 23).

Die Behandlung von Versuchstieren im IR-Modell mit anti-GPVI-Antikörpern bewirkt ein signifikant verringertes Infarktareal gemessen durch Evans Blue/TTC-Färbung nach IR *in vivo*.

Die Behandlungen mit anti-GPIb-Antikörpern, sowie der Einsatz von STIM1- oder Orail-KO-Knochenmark-chimären Tiere zeigen keinen Unterschied im Infarktreal nach IR.

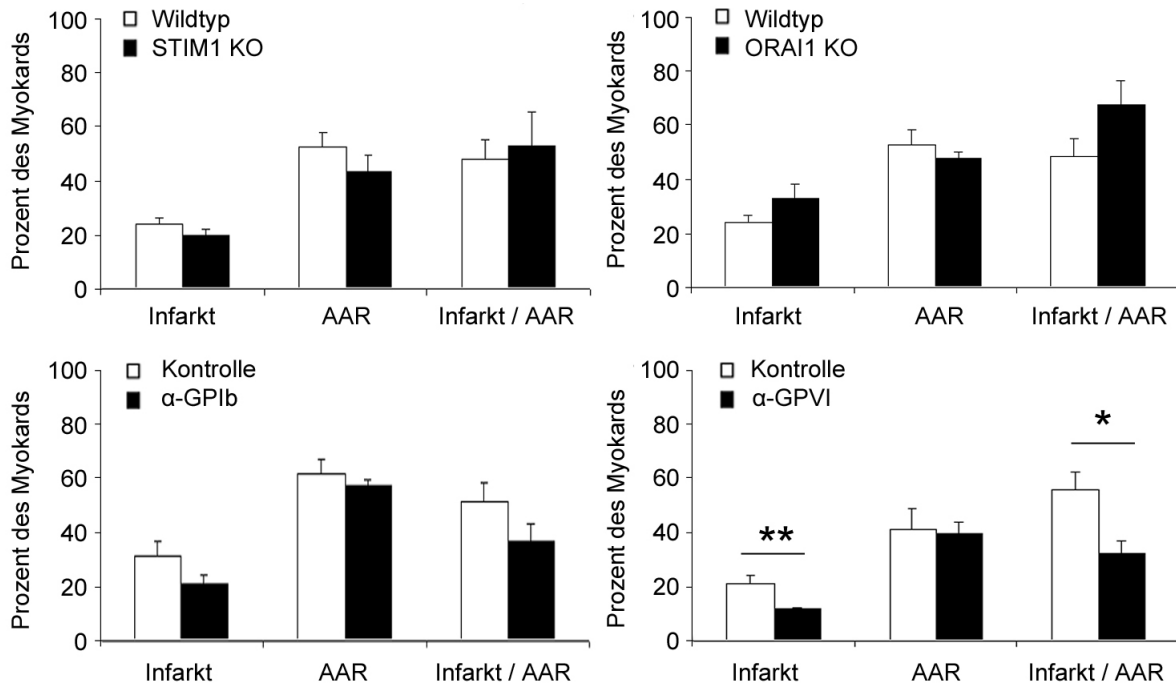


Abbildung 23. Die Behandlung mit GPVI-Antikörpern führt zu einer Reduktion des Infarktareals im Modell der IR.

STIM1-KO und Orail-KO Tiere zeigen keinen Effekt auf die Infarktgröße nach IR. Auch zeigt die Behandlung mit GPIb-Antikörpern keinen signifikanten Unterschied der Infarktgröße mit der PBS-Kontrollgruppe. Die Behandlung mit GPVI-Antikörpern führt zu einer signifikanten Reduktion des Infarktareals nach IR im Vergleich zur Kontrollgruppe.

7.2.2. Wirkungen einer GPVI-Hemmung auf die Mikrozirkulation

Um den Mechanismus der protektiven Wirkung durch die Behandlung mit den anti-GPVI-Antikörpern zu untersuchen, wird die Mikrozirkulation im Myokard nach IR mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären untersucht (Abbildung 24). Anhand einer immunhistologischen Färbung gegen CD31 zeigt sich, dass die Mikrosphären sich vor allem in den Gefäßen befinden und somit auch die Mikrozirkulation im Myokard widerspiegeln (Abbildung 24A, B).

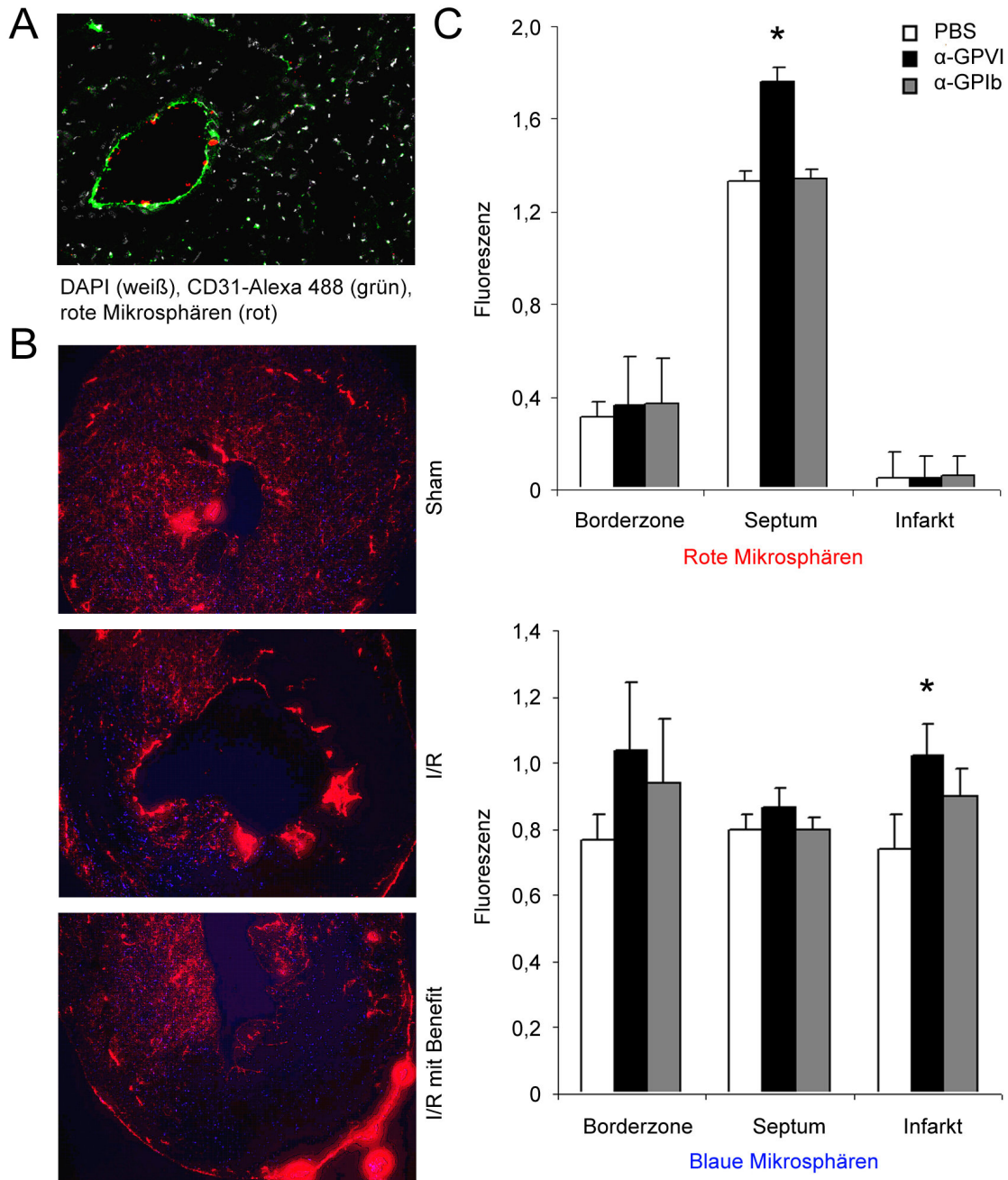


Abbildung 24. Die Behandlung mit GPVI-Antikörpern führt zu einer Verbesserung der Mikroperfusion.

In Mikroperfusionsexperimenten werden Mikroartikel injiziert. Die Mikrosphären werden in den Gefäßen (CD31 Färbung von Endothelzellen) mit dem Blutfluss verteilt (A). Blaue Mikrosphären werden vor Verschluss der Ligatur apikal in das Myokard appliziert. Rote Mikrosphären werden nach Verschluss der Ligatur injiziert. Dadurch können das Infarktareal und die Bereiche des „no reflow“ bestimmt werden (B). Die Behandlung mit GPVI-Antikörpern führt zu einer Verbesserung der Reperfusion (C).

Im Vergleich zur Behandlung mit anti-GPIb-Antikörpern und der PBS Kontrolle, resultiert die Behandlung mit anti-GPVI-Antikörpern in einer verbesserten Mikrozirkulation im Gewebe nach IR: Im Septum kann dies durch eine verstärkte rote Fluoreszenz gezeigt werden, im Infarktareal durch eine erhöhte blaue Fluoreszenz

(Abbildung 24C). Diese Ergebnisse zeigen, dass GPVI, nicht aber GPIb sich als Zielstruktur auf den Blutplättchen eignet, um die Mikrozirkulation im Myokard nach IR zu verbessern.

7.2.3. Effekte von anti-GPIb-/anti-GPVI-Antikörpern auf die Inflammation nach IR

In einem nächsten Schritt wird untersucht, ob die protektive Wirkung durch die Behandlung mit anti-GPVI-Antikörpern mit verringerter Entzündung im Infarktareal einhergeht. Hierzu wird durchflusszytometrisch der Gehalt an CD45⁺ Immunzellen im Infarktareal des Myokards untersucht. Die Behandlungen mit den anti-GPIb- und den anti-GPVI-Antikörpern zeigen beide die Tendenz zu einer Verringerung an CD45⁺ Zellen im Infarktareal (Abbildung 25A). Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant verschieden zu der Kontrollgruppe.

Die immunhistologische Untersuchung auf Neutrophile im Myokard zeigt ebenfalls eine tendenzielle Verringerung von Neutrophilen im Septum sowie im Infarktareal von mit anti-GPIb und anti-GPVI-Antikörpern behandelten Tieren nach IR (Abbildung 25B, C). Auch dieser Effekt ist nicht signifikant verschieden zur PBS-Behandlungsgruppe.

Die Untersuchung des Infarktgewebes auf den Gehalt an Zytokinen zeigt, dass die anti-GPIb-Antikörper-Behandlung im IR-Modell eine signifikante Reduzierung der Expression von IL-5 und eine signifikante Erhöhung der Expression von L-Selektin bewirkt (Tabelle 7). Bei der Behandlungsgruppe mit GPVI-Antikörper sind Eotaxin, insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) und VCAM-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Tabelle 8).

Die Testung potentieller neuer Zielstrukturen auf Blutplättchen und Immunzellen zeigt, dass STIM1 und Orai1 nicht am IR-Schaden zu beteiligt sein scheinen. Sowohl GPIb als auch GPVI sind an der myokardialen Inflammation nach IR beteiligt und die Applikation von Antikörpern gegen die Proteine moduliert die Entzündungsreaktionen im Infarktareal. Von beiden verwendeten Antikörpern bewirkt nur der anti-GPVI-Antikörper eine signifikante Protektion im IR-Modell mit einer Reduktion der Infarktgröße.

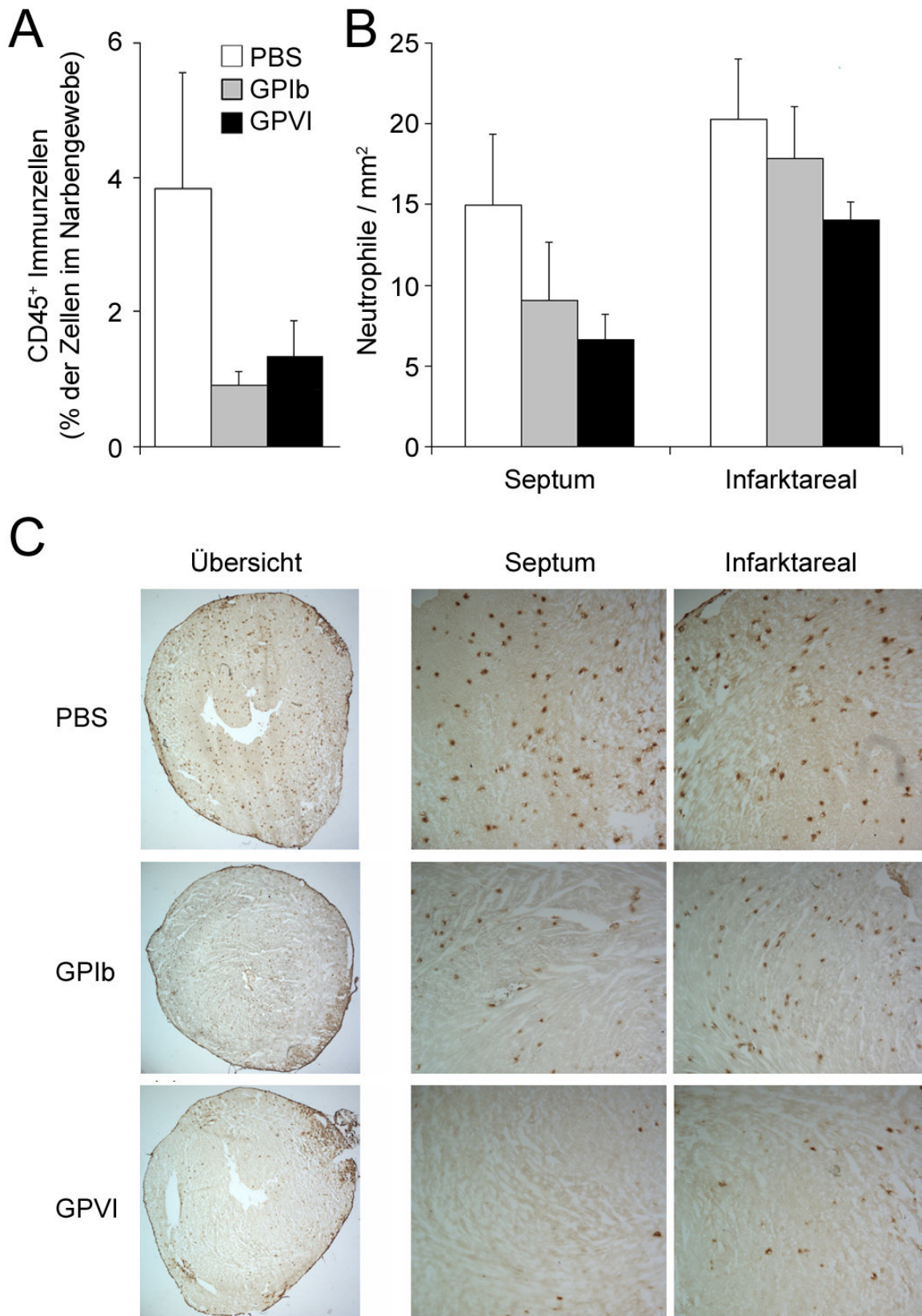


Abbildung 25. Tendenziell werden weniger Immunzellen bei GPVI- und GPIb-behandelten Tieren nach IR detektiert.

FACS-Analyse des Infarktareals nach IR zeigt bei GPVI- und GPIb-behandelten Tieren eine tendenzielle Verringerung an CD45⁺ Immunzellen (A). Immunhistologisch werden tendenziell weniger Neutrophile im Septum und Infarktareal von GPVI- und GPIb-behandelten Tieren detektiert (B, C).

Tabelle 7. Protein-Array von GPIb-behandelten Tieren nach IR.

Bei GPIb-behandelten Tieren kommt es nach IR im Infarktarea der Tiere zu einer verminderten Expression von GM-CSF und IL-5. u.d. = unter Detektionslimit, GM-CSF < 5 pg/ml.

Abkürzung/Gen Name	PBS		GPIb		p
	Expression [pg/ml]	SEM	Expression [pg/ml]	SEM	
GM-CSF / Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	1,54	0,89	u.d.		p < 0.05
IFN-γ	49,61	17,31	25,02	1,06	N.S.
IL-10 / Interleukin-10	106,91	22,77	134,73	10,21	N.S.
IL-12 / Interleukin-12	36,70	5,81	37,94	1,59	N.S.
IL-13 / Interleukin-13	20,84	20,63	53,55	27,34	N.S.
IL-17 / Interleukin-17	17,55	6,50	10,34	10,34	N.S.
IL-1a / Interleukin-1a	61,09	5,03	64,19	7,12	N.S.
IL-1b / Interleukin-1b	11,94	2,70	5,05	4,35	N.S.
IL-2 / Interleukin-2	5,36	0,94	5,15	0,57	N.S.
IL-3 / Interleukin-3	1,82	1,30	2,48	0,33	N.S.
IL-4 / Interleukin-4	3,33	0,83	4,37	0,73	N.S.
IL-5 / Interleukin-5	21,36	1,77	11,35	1,94	p < 0.05
IL-6 / Interleukin-6	63,23	35,93	14,92	9,69	N.S.
IL-9 / Interleukin-9	227,53	39,63	178,73	12,46	N.S.
KC / keratinocyte-derived chemokine	3,10	2,76	0,41	0,32	N.S.
MCP-1 / monocyte chemotactic protein-1	52,27	32,41	9,54	9,54	N.S.
M-CSF / macrophage colony-stimulating factor	72,13	25,66	50,11	28,82	N.S.
RANTES / regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	17,04	14,30	6,46	5,24	N.S.
TNFalpha / tumor necrosis factor alpha	21,56	3,08	18,12	4,04	N.S.
VEGF-D / vascular endothelial growth factor D	25,65	11,92	11,91	1,19	N.S.

Tabelle 8. Protein-Array von GPVI-behandelten Tieren nach IR.

Ein Zytokin-Protein von dem Infarktbereich GPVI-behandelten Tieren nach IR zeigt eine erhöhte Expression von KC und eine erniedrigte Expression von IL-13. u.d. = unter Detektionslimit, IL-13: < 55 pg/ml; KC: < 3 pg/ml.

Abkürzung/Gen Name	PBS		GPVI		p
	Expression [pg/ml]	SEM	Expression [pg/ml]	SEM	
GM-CSF / Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	2,99	0,17	3,37	0,28	N.S.
IFN- γ	102,04	2,86	113,77	7,08	N.S.
IL-10 / Interleukin-10	107,22	23,66	149,82	18,33	N.S.
IL-12 / Interleukin-12	8,56	3,17	19,25	7,88	N.S.
IL-13 / Interleukin-13	8,09	6,76	u.d.		p < 0.05
IL-17 / Interleukin-17	10,99	1,21	23,35	6,55	N.S.
IL-1a / Interleukin-1a	58,27	5,04	86,74	11,46	N.S.
IL-1b / Interleukin-1b	7,88	1,90	17,70	7,07	N.S.
IL-2 / Interleukin-2	4,44	0,13	6,15	0,73	N.S.
IL-3 / Interleukin-3	0,18	0,12	2,63	1,04	N.S.
IL-4 / Interleukin-4	1,34	0,52	2,98	1,12	N.S.
IL-5 / Interleukin-5	22,74	0,64	25,78	1,47	N.S.
IL-6 / Interleukin-6	70,90	4,30	110,76	26,99	N.S.
IL-9 / Interleukin-9	111,11	7,52	254,56	60,32	N.S.
KC / keratinocyte-derived chemokine	u.d.		2,28	1,33	p < 0.05
MCP-1 / monocyte chemotactic protein-1	108,92	39,15	102,36	48,06	N.S.
M-CSF / macrophage colony-stimulating factor	42,41	11,54	100,97	33,04	N.S.
RANTES / regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	0,17	0,17	43,22	25,62	N.S.
TNFalpha / tumor necrosis factor alpha	13,21	4,49	11,94	3,15	N.S.
VEGF-D / vascular endothelial growth factor D	0,12	0,12	42,62	25,29	N.S.

8. Diskussion

Der MI und ein damit assoziiertes Herzversagen, stellen eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern dar. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist multifaktoriell und die Wechselwirkungen zwischen einer Vielzahl von Zellen im Herzen beeinflussen die Geschehnisse nach Infarkt. Zwei integrale Faktoren stellen hierbei das Immunsystem und die Blutgerinnung dar, weshalb in der vorliegenden Arbeit verschiedene neuartige auf diese Mechanismen ausgerichtete Therapiestrategien untersucht werden, die die Wundheilung nach MI im Mausmodell positiv beeinflussen sollen.

8.1. Das TWEAK-Fn14-System im Myokardinfarkt

Sowohl TWEAK selbst, als auch sein Rezeptor Fn14 werden nach Infarkt im betroffenen Herzgewebe induziert. Die exogene Behandlung von infarzierten Mäusen mit HSA-Flag-TWEAK resultiert überraschenderweise im vermehrten Auftreten von LV Rupturen.

Nach einem MI kann die Apoptose von Kardiomyozyten zu einer zusätzlichen Vergrößerung des Infarktareals führen^{170,171}. TWEAK wurde das erste Mal 1997 von Chicheportiche et al. als schwacher Auslöser von Apoptose identifiziert⁵⁹. Neben verschiedenen Tumorzelllinien^{59,66,172} kann TWEAK auch in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) ohne Beteiligung von IFN- γ ¹⁷³ und in NK-Zellen, die durch TNF α , LPS oder IFN- γ vorstimuliert worden sind¹⁷⁴, Apoptose induzieren. Die Behandlung von Mäusen mit Fn14-spezifischen Antikörpern im Modell der renalen IR führt zu einer Verringerung der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie zu einer Verringerung der Apoptoseinduktion in Tubuluszellen¹⁷⁵. Nachdem HSA-Flag-TWEAK in dieser Arbeit eine erhöhte Mortalität nach MI bei den Versuchstieren verursacht, wird der Frage nachgegangen, ob HSA-Flag-TWEAK im Mausmodell des chronischen MI eventuell zu einer erhöhten Apoptoserate der Kardiomyozyten führt und so das Auftreten von LV Rupturen begünstigt. Die Behandlung bewirkt jedoch weder eine Erhöhung der Anzahl TUNEL-positiver noch gespaltener PARP-positiver Kardiomyozyten. Eine mögliche Ursache kann sein, dass TWEAK nur in wenigen sensitiven Zelllinien Apoptose induzieren kann, lange

Inkubationszeiträume, sowie relativ hohe Ligandenkonzentrationen und meist noch ein sensitivierendes Agens benötigt. Dies ist auch in Übereinstimmung damit, dass der spezifische Rezeptor von TWEAK, Fn14 keine Todesdomäne besitzt¹⁷⁶.

Strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix im Zuge des kardialen Remodellings können ebenfalls die Ursache für das Auftreten der Rupturen nach HSA-Flag-TWEAK Gabe im chronischen MI-Modell darstellen. Kollagen und kollagendegradierende Enzyme sind wichtige Faktoren beim Auftreten von kardialen Rupturen¹⁷⁷. Kollagenfasern sind für die Verbindung von Kardiomyozyten wichtig und ein Verlust an Kollagen kann zu einer Überdehnung dieser Zellen nach Infarkt und somit zu erhöhtem Druck führen¹⁷⁸. Als Folge kommt es zur Infarktexpansion und damit potenziell zu kardialen Rupturen. TNF^{-/-} Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp Tieren ein verbessertes Überleben nach MI auf und das Auftreten von kardialen Rupturen ist verringert. Dies geht mit einer verminderten Infiltration an CD45⁺ Immunzellen in das Infarktareal sowie einer verringerten Aktivität von MMP9 und somit eine verringerte Degradation von Kollagen einher¹⁷⁹. Im Gegensatz hierzu konnten Monden et al. zeigen, dass eine Neutralisation von TNF das Auftreten von kardialen Rupturen nach MI erhöht, was mit einer übermäßigen Aktivierung von MMP9 einhergeht¹⁸⁰.

Expressionsanalysen mit aus Herzgewebe isolierter mRNA können keinen Effekt von HSA-Flag-TWEAK auf die Expression von Kollagen, MMPs oder TIMPs zeigen. Daneben sind die Aktivitäten von MMPs in Mäusen nach MI zwischen den Behandlungsgruppen unverändert. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es durch TWEAK zu einer Aktivierung des NFκB Signalwegs kommt, und unsere Arbeitsgruppe bereits zeigte, dass NFκB p50 KO Tiere eine geringere MMP9-Expression nach MI besitzen⁴⁸. Auch trägt TWEAK über eine Induktion von MMP9 zum Muskelschwund bei¹⁸¹. Eine mögliche Ursache, dass es nach HSA-Flag-TWEAK-Applikation zu keiner erhöhten MMP9-Aktivität kommt, kann an der verwendeten TWEAK-Variante liegen. Es ist bekannt, dass der klassische NFκB Signalweg, der jedoch nur durch membrangebundenes TWEAK aktiviert wird, für eine Induktion der MMP9 Genexpression verantwortlich ist¹⁸². Jedoch kann bisher nur in wenigen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass der alternative NFκB Signalweg, welcher durch HSA-Flag-TWEAK aktiviert wird, ebenfalls MMP9 als Zielgen besitzt¹⁸³.

Die Angiogenese ist essentiell für die kardiale Wundheilung und Störungen in der Angiogenese können zu verzögerten Reparaturmechanismen und zu kardialen Rupturen oder zu einer unvollständigen Bildung des Narbengewebes beitragen¹⁸⁴. Bereits 3 Tage nach MI kommt es zu einer Neubildung von Gefäßen in der Borderzone zwischen nicht-infarziertem und infarziertem Bereich und später auch im Infarktbereich. Bei dieser Neoangiogenese spielt VEGF eine herausragende Rolle^{185,186}. Dieser Wachstumsfaktor wird von vielen Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind, produziert: Endothelzellen¹⁸⁷, Fibroblasten¹⁸⁸, smooth muscle cells¹⁸⁹, Blutplättchen¹⁹⁰, Neutrophile¹⁹¹ und Makrophagen¹⁹². TWEAK induziert NFκB-abhängig VEGF in HO-8910PM Ovarialkarzinomzellen¹⁹³. Darüber hinaus scheint TWEAK auch ein Wachstums- und Migrationsfaktor für Endothelzellen zu sein und kann die mitogene Aktivität von FGF-2 und VEGF-A auf Endothelzellen verstärken⁷⁶. TWEAK hat daher vermutlich nicht nur proliferative Effekte auf Endothelzellen¹⁹⁴, sondern kann auch zur Angiogenese beitragen. Dies konnten auch Lynch et al. zeigen, indem sie Pellets mit TWEAK in die Hornhaut von Ratten implantierten, was zu starken angiogenen Effekten führt¹⁹⁴. Zur Überprüfung der Hypothese, dass HSA-Flag-TWEAK einen Einfluss auf die Expression von VEGF besitzt, wird die mRNA Expression von VEGF im Infarktareal bestimmt. Die Expression von VEGF ist in der TWEAK-Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden.

Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher im Zusammenhang mit kardialen Rupturen diskutiert wird, stellen inflammatorische Prozesse im Myokard dar. Es gibt Fallstudien bei Patienten mit Myokarditis, bei denen post-mortem kardiale Rupturen festgestellt wurden¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Myokarditis ist eine Erkrankung, die durch eine Entzündung des Herzmuskels charakterisiert ist¹⁹⁹, was unter anderem durch Infektionen, Autoimmunerkrankungen, oder bestimmte Medikamente ausgelöst werden kann. Es werden verschiedene Kategorien – je nach den dominantesten inflammatorischen Zellen unterschieden: lymphozytisch (mit viralen und autoimmunen Formen), neutrophil (bakteriell, fungal und frühe Formen einer viralen Myokarditis), eosinophil (hypersensitive Myokarditis oder hypereosinophile Syndrome) und granulomatös (kardiale Sarkoidose und Riesenzellmyokarditis)²⁰⁰. Ein Fall eines 81-jährigen Mannes mit bakterieller Myokarditis (*Staphylococcus aureus*) ist bekannt, der

aufgrund starker myokardialer Nekrosen an kardialer Ruptur verstarb¹⁹⁵. Ein weiterer Fall eines 38-jährigen Mannes wurde von Stock et al. veröffentlicht. Dieser Mann verstarb an einer kardialen Ruptur, die aufgrund einer diffusen akuten Myokarditis entstand. Die Autoren vermuten eine virale Infektion als Ursache der Myokarditis¹⁹⁶. Bei einer 77-jährigen Patientin, die an einer akuten fulminanten Myokarditis litt, wurden ebenfalls als Todesursache kardiale Rupturen festgestellt. Mikroskopisch war eine starke Infiltration von inflammatorischen Zellen und Myozytennekrose im Bereich der Ruptur erkennbar¹⁹⁷.

Unsere Forschungsgruppe konnte bereits wichtige Studien zu dem Einfluss von Immunzellen auf die Wundheilung nach MI durchführen und veröffentlichen: So konnten wir unter anderem zeigen, dass CD4⁺ T Zellen wichtig für die Wundheilung nach MI sind, und dass ein Defizit an diesen Zellen mit früher Mortalität der Versuchstiere und einer hohen Inzidenz an kardialen Rupturen assoziiert ist⁶⁸.

TWEAK zeigt in verschiedenen Modellen pro-inflammatorische Eigenschaften^{57,58,72,73}. Auch in der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die systemische Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK die Induktion einer Reihe von Zytokinen, welche an der Rekrutierung und Aktivierung der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, im infarzierten Myokard bewirkt, wie IFN- γ , IL-5, IL-12, GITR, MCP-1/-5 und RANTES. IFN- γ ist an der Rekrutierung, der Aktivierung und der Apoptose von polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) beteiligt⁷⁴. Auch können PMN selbst als Quelle von IFN- γ dienen, welches sie unter dem Einfluss von IL-12 bilden und sekretieren⁷⁷, was wiederum zu einer verringerten Stabilität der Myokardwunde führen kann⁷⁸. Darüber hinaus führt die Überexpression von IFN- γ zu einer LV Dilatation und zu systolischer Dysfunktion⁷⁹. MCP-1 ist für die Rekrutierung von Monozyten, Lymphozyten²⁰¹ und Neutrophilen⁷⁵ zuständig. In Patienten ist eine erhöhte Expression von MCP-1 mit einem verminderten Remodelling nach MI assoziiert. In der sub-akuten Phase nach MI ist ein Anstieg an MCP-1 mit einem schrittweise verschlechterten LV Remodelling verbunden⁸¹. HSA-Flag-TWEAK führt auch zu einer verstärkten Expression von RANTES, welches von Endothelzellen⁸² und Lymphozyten⁸³ gebildet werden kann. RANTES wirkt während der Inflammation als chemoattractant für Monozyten⁷⁶, NK-Zellen²⁰² und Neutrophile⁸⁵. Die Behandlung mit Antagonisten gegen RANTES verringert den Reperfusionsschaden in atherosklerotischen Mäusen⁸⁶. Dieses Zytokin interagiert mit CCR1, CCR3 und

CCR5. Defizienz an CCR1, aber nicht an CCR5, beeinflusst die Infarktgröße nach MI, und CCR5 ist wichtig für das LV Remodelling^{25, 26}.

Die bioinformatische Analyse derjenigen Zytokine und Chemokine, welche durch die Behandlung der Versuchstiere mit HSA-Flag-TWEAK moduliert sind, sowie deren Einordnung in funktionelle Cluster zeigt, dass vor allem die pro-inflammatorischen NFκB- und JAK/STAT Signalwege aktiviert werden.

In Übereinstimmung mit der hohen Expression der genannten Zytokine kommt es zu einer verstärkten Infiltration von CD45⁺ Immunzellen in das Infarktareal von mit HSA-Flag-TWEAK behandelten Tieren. Innerhalb der gesamten CD45⁺ Immunzellen ist die Anzahl an CD3⁻NK1.1⁺ NK-Zellen signifikant verringert. Bereits Maecker et al. konnten bei TWEAK-defizienten Mäusen einen Anstieg an NK-Zellen feststellen. Die Ursache hierfür liegt an einer verringerten apoptotischen Elimination dieser Zellen und nicht an einer gestörten Bildung im Knochenmark¹⁷⁴. Somit kann die verringerte Anzahl an NK-Zellen in der HSA-Flag-TWEAK-Behandlungsgruppe durch eine erhöhte Elimination dieser Zellen erklärbar sein. Innerhalb der Immunzellen selbst gibt es daneben keine signifikanten Effekte durch die HSA-Flag-TWEAK-Behandlung. Einen Großteil der das Infarktareal infiltrierenden Zellen nehmen Neutrophile Granulozyten ein. Durch den massiven Anstieg an einwandernden Immunzellen insgesamt kommt es also zu einem stark vermehrten Einwandern an Neutrophilen, was neben der FACS-Analyse auch immunhistologisch bestätigt werden kann. Eine Korrelation zwischen der Infiltration von Neutrophilen und dem Auftreten von kardialen Rupturen nach MI kann bereits in einer Patientenstudie nachgewiesen werden⁵².

Nicht nur TNF^{203,204}, sondern auch TWEAK kann neutrophile Granulozyten rekrutieren, was Haile et al. in einem *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke zeigten⁸⁵. Um nun die Hypothese zu überprüfen, ob Neutrophile maßgeblich für das Auftreten von kardialen Rupturen durch TWEAK verantwortlich sind, werden diese Immunzellen vor Versuchsbeginn mit Hilfe eines Antikörpers depletiert. Dies resultiert in einer statistisch signifikanten Reduktion der Inzidenz für kardiale Rupturen nach HSA-Flag-TWEAK Behandlung auf das Niveau der unbehandelten Kontrollgruppe nach MI. Dennoch bewirkt die Neutrophilen-Depletion nicht, dass die Mortalität nach HSA-Flag-TWEAK-Behandlung wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt wird. Daher

müssen noch weitere Mechanismen für die durch TWEAK erhöhte Mortalität verantwortlich sein.

Diese Hypothese ist in Übereinstimmung mit einer Veröffentlichung von Jarr et al. (2013). Hier ist gezeigt worden, dass Mäuse, die 4 Wochen mit rekombinantem humanem TWEAK Protein behandelt werden, eine signifikant erhöhte Mortalität nach MI im Vergleich zu unbehandelten Mäusen ausweisen. Dies zeigte sich im Vergleich zur hier vorliegenden Arbeit relativ spät (ab 7 Tage nach MI). Die Tiere zeigen LV Dysfunktionen ohne Auftreten von kardialen Rupturen oder Fibrose. Und auch die Infarktgröße zwischen den Behandlungsgruppen ist nicht signifikant verschieden. Die Behandlung mit TWEAK führt zu einer verringerten Expression von Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) und peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) mRNA, sowie von Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind. Hierdurch kann der Energiestatus der Zellen gestört sein und somit die Zellen gegen Ischämienstress sensitiviert werden²⁰⁵.

Die Verwendung eines MI-Modells, wie es hier beschrieben ist, hat die Limitation, dass das Modell einen nicht-reperfundierten Infarkt abbildet. Es ist wahrscheinlich, dass es mehrere Tage dauert, bis sich neue Gefäße gebildet haben, die den infarzierten Myokardbereich wieder ausreichend mit Blut versorgen. Deshalb wird in dieser Zeit die Testsubstanz vermutlich nur bis zur Boderzone transportiert und erreicht den nicht-infarzierten Bereich nicht. Dies kann darauf hindeuten, dass im IR Modell die Behandlung mit HSA-Flag-TWEAK eventuell andere Effekte erzielt. Echeverry et al. konnten *in vitro* an isolierten Neuronen und *in vivo* an Mäusen zeigen, dass TWEAK eine hypoxische und ischämische Toleranz bewirkt. Dieser Effekt wird durch neuronales TNF- α vermittelt und es kommt zu einer Aktivierung des ERK 1/2 Signalwegs durch Phosphorylierung und Inaktivierung des BAD Proteins⁵⁶. Das Vorhandensein von TWEAK im Gewebe vor dem eigentlichen ischämischen Ereignis kann daher eventuell Toleranzmechanismen induzieren und somit protektive Effekte bewirken.

8.2. Blutplättchen als therapeutische Zielstrukturen im Modell der IR

Blutplättchen spielen eine essentielle Rolle in der Pathogenese des MI. Physiologisch dienen diese Zellen der Hämostase, damit bei Verletzungen die

Wunde durch Aktivierung und anschließende Aggregation von Blutplättchen geschlossen wird. Unter pathologischen Bedingungen kann eine unkontrollierte Thrombusbildung zu einem arteriellen Verschluss führen, der in einem Schlaganfall oder MI enden kann. Blutplättchen sind darüber hinaus nicht nur ausschlaggebend für die Thrombusformation und damit für die initialen Ereignisse des Infarkts, sondern auch in der Reperfusionphase durch ihre Beteiligung an der Bildung von Mikrothromben. Die Hemmung von Blutplättchen stellt somit eine vielversprechende Methode zur Behandlung nach MI dar.

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Proteine als mögliche Zielstrukturen einer Blutplättchenhemmung untersucht. Im Einzelnen sind dies GPIIb und GPVI, die für die Anheftung von Blutplättchen von Bedeutung sind und STIM1 und Orai1, die in der Aktivierung von Blutplättchen eine Rolle spielen. Die Glykoproteine werden mittels Antikörperbehandlungen beeinflusst, STIM1 und Orai1 werden untersucht, indem IR-Versuche mit knochenmarkschimären KO-Mäusen durchgeführt werden.

Von den untersuchten Modellen zeigt nur die Behandlung mit anti-GPVI-Antikörpern einen Benefit nach IR, wobei die Größe des Infarktareals signifikant verringert und die Mikrozirkulation im Septum und Infarktareal maßgeblich verbessert sind.

Kleinschnitz et al. zeigten, dass die Blockade von GPVI 1 Stunde vor MCAO das Infarktareal signifikant reduziert. Im Gegensatz zu den hier gezeigten IR-Daten bewirkt die Hemmung von GPIIb im MCAO-Modell ebenfalls einen protektiven Effekt. Auch ist durch eine Applikation von GPIIb-Antikörpern 1 Stunde nach Operation weiterhin eine signifikante Verkleinerung des Infarktareals erreichbar. In neurologischen Tests bewirkt nur die Behandlung mit GPIIb-Antikörper vor und nach MCAO eine Verbesserung der Parameter. Somit besitzt im Vergleich zum IR-Modell eine anti-GPIIb Behandlung protektive Effekte im MCAO-Modell und deutet auf eine wichtige Rolle dieses Proteins in der Pathogenese dieser Erkrankung hin¹²². Der hier verwendete monoklonale GPVI-Antikörper JAQ1 blockiert die Bindungsstelle von GPVI für Kollagen und inhibiert somit die Blutplättchenadhäsion an Kollagen unter geringen und hohen Scherkräften¹⁵⁶. Im Gehirn herrschen höhere Scherkräfte als im Herzen²⁰⁶. Nachdem vWF nur unter hohen Scherkräften seine Konformation ändert und die Bindung von vWF für die Funktionen von GPIIb bedeutend ist^{207,208}, kann dies auch die Ursache dafür sein, dass die Behandlung mit GPIIb-Antikörpern nicht im Herzen, aber im Gehirn protektive Effekte bewirkt. GPVI benötigt keine hohen

Scherkräfte²⁰⁷ für die Bindung an Kollagen, was die Erklärung dafür sein könnte, dass die Hemmung dieses Glykoproteins in beiden Modellen ähnliche Effekte erzielt. Bei den Behandlungen mit GPVI- und GPIb-Antikörpern werden in beiden Fällen tendenziell geringere Inflammation, gemessen an der Infiltration von Immunzellen in das ischämische Myokard, beobachtet. Während des Adhäsionsprozesses werden die Blutplättchen aktiviert und sezernieren Adhäsionsproteine (wie Fibrinogen, P-Selektin, Fibronectin und vWF), Wachstumsfaktoren (wie TGF- β , platelet-derived growth factor (PDGF) und EGF), Chemokine (wie RANTES, epithelial neutrophil-activating protein 78 und platelet factor 4), Cytokin-ähnliche Faktoren (wie IL-1 β , CD40 Ligand und β -Thromboglobulin) und Koagulationsfaktoren (wie Faktor V, Plasminogen und Protein S). Diese Proteine können auf unterschiedliche Weise biologische Funktionen, wie Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Zellüberleben und Proliferation beeinflussen, und hierüber das Einwandern von Immunzellen und das entzündliche Geschehen im Gewebe modulieren^{209,210,211}. Durch die Hemmung von GPVI wird offensichtlich der Cross-talk zwischen Blutplättchen und Immunzellen beeinflusst, was sich auch in der modulierten Expression von Zytokinen und Chemokinen äußert. Andererseits könnte die verminderte Entzündung im Myokard auch ein direktes Resultat des kleineren Infarkts sein, was durch die verbesserte Mikrozirkulation und dadurch den verringerten Myokardschaden zustande kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass eine Hemmung von GPVI auf Blutplättchen durch Antikörper protektive Effekte auf den ischämischen Schaden nach IR im Herzen besitzt. Die Mikrozirkulation nach GPVI-Hemmung ist deutlich verbessert und eine tendenziell verringerte Inflammation ist in dieser Behandlungsgruppe nachweisbar. Im Herzen herrschen geringere Scherkräfte als im Gehirn, was eine mögliche Ursache darstellen kann, weshalb eine Hemmung von GPIb im Herzen nach IR keine Rolle spielt, jedoch im MCAO-Modell.

8.3. Ausblick

In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche therapeutische Strategien für die Beeinflussung der Reaktion auf Ischämie nach MI untersucht: Dies ist zum Einen eine Behandlung der Versuchstiere mit exogenem TWEAK, einem Mitglied der TNF Familie, und zum Anderen der pharmakologische Angriff verschiedener Proteine auf und in Blutplättchen.

Nachdem die Behandlung mit TWEAK zu einer stark erhöhten Mortalität mit vermehrtem Auftreten von kardialen Rupturen nach MI führt, wäre der nächste Schritt, zu testen, ob eine Depletion von TWEAK oder die Hemmung von Fn14 protektive Effekte auf das Überleben und die Wundheilung nach MI bewirken. Verschiedene Therapiestrategien würden sich anbieten, die sich zum Teil für andere Indikationen bereits in der prä-klinischen oder klinischen Entwicklung befinden: anti-TWEAK Antikörper, anti-Fn14 Antikörper und Fn14-Fc, ein Fusionsprotein bestehend aus der Ektodomäne von Fn14 und der Fc Domäne von humanem IgG1⁶⁰.

Die i.p. Applikation eines anti-TWEAK-Antikörpers²¹² sowie die intrazerebroventrikuläre Injektion von Fn14-Fc^{83,213} bewirken jeweils eine Verringerung der Infarktgröße im MCAO-Modell. Die Blockade von Fn14 durch monoklonale Antikörper verringert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren in einem Modell der renalen IR und erhöht das Überleben der Versuchstiere¹⁷⁵. Jarr et al. (2013) zeigten, dass Fn14^{-/-} Mäuse eine verbesserte LV Funktion nach MI aufweisen. Die Behandlung von Mäusen mit einem neutralisierenden monoklonalen Antikörper gegen TWEAK verbessert die LV Funktion sowie das Überleben der Versuchstiere nach MI²⁰⁵.

Es stellt sich die Frage, ob nach MI eine Hemmung des TWEAK-Fn14-Signalsystems direkt auf die Wundheilung, oder indirekt über eine Immunmodulation wirkt. TNF-Blocker, wie Etanercept, Adalimumab und Infliximab besitzen heute breite Anwendungen in verschiedenen Autoimmunerkrankungen, doch kann bisher bei Etanercept kein Erfolg bei der Behandlung von Herzinsuffizienz verzeichnet werden²¹⁴. Es wird sich also zeigen müssen, ob und über welche Mechanismen eine Verringerung der Fn14-Aktivierung sich protektiv auf Patienten nach MI auswirken wird.

Von den untersuchten Blutplättchenproteinen verringert nur die Hemmung von GPVI durch Antikörper das Infarktareal der Versuchstiere nach IR, was mit einer verbesserten Mikrozirkulation im Myokard einhergeht.

Revacept, ein lösliches GPVI-Fc Fusionsprotein²¹⁵ reduziert die endotheliale Dysfunktion sowie die Thrombusbildung im Modell der Atherosklerose bei Kaninchen²¹⁶. In ersten klinischen Studien zeigt sich Revacept als gut verträglich, mit einem klaren Dosis-abhängigen pharmakokinetischen Profil ohne signifikante Wirkung auf die Blutungsneigung²¹⁷. Seit März 2013 wird Revacept bei Patienten mit symptomatischer Stenose der Arteria carotis, transitorischer ischämischer Attacke, Amaurosis fugax oder Schlaganfall und bei mikroembolischen Signalen (MES) in klinischen Studien getestet. Entweder wird Revacept als Monotherapie verwendet oder in Kombination mit Aspirin oder Clopidogrel mit dem Ziel MES zu verringern. Die Studie wird von AdvanceCor GmbH gesponsert und wird vermutlich Dezember 2014 beendet sein²¹⁸.

Die hier vorliegenden Ergebnisse sowie die klinische Entwicklung von Revacept für andere Indikationen versprechen Erfolg, was die Anwendung einer Hemmung von GPVI in der Therapie ischämischer Erkrankungen im Herzen anbelangt.

9. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Anstieg der todesfälle im vergleich zum vorjahr um 2%. 2013;www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/12/PD13_422_232.html [Stand: 15.12.2013]
2. Kristensen SD, Husted SE, Nielsen HK, Ravn HB, Vissinger H. [interaction between thrombocytes and blood vessel wall--significance for acute ischemic coronary syndromes]. *Ugeskr Laeger*. 1995;157:2295-2298
3. Zugck C. Versorgungsrealität in deutschland: Wird die herzfrequenz bei chronischer systolischer herzinsuffizienz ausreichend gesenkt? *Presstext DGK 04/2013*. 2013
4. Sportnitz UM. *Anatomie und physiologie: Lehrbuch und atlas für pflege- und gesundheitsfachberufe*. Springer Verlag; 2004.
5. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1883-1891
6. Aumüller G. *Duale reihe anatomie*. Georg Thieme Verlag; 2010.
7. Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag; 2006.
8. Kreuzer J. *Atherosklerose*. Georg Thieme Verlag; 2003.
9. Bhatt DL. *Atherothrombosis in clinical practice (oxford american cardiology library)*. Oxford University Press; 2013.
10. Kharbanda RK. Cardiac conditioning: A review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury. *Heart*. 2010;96:1179-1186
11. Ertl G, Frantz S. Wound model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H981-983
12. Weil J. Pathophysiologie der chronischen herzinsuffizienz. *Clin Res Cardiol*. 2006;95:1-17
13. Roskamm H, Neumann FJ, Kalusche D, Bestehorn HP. *Herzkrankheiten: Pathophysiologie diagnostik therapie*. Springer Verlag; 2004.
14. Bankl H, Ulrich W, Reiner A, Krepler R. *Arbeitsbuch pathologie. Spezielle pathologie 1. Mit rekapitulationen und prüfungsfragen*. Facultas; 2001.
15. Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Thromb Haemost*. 2009;102:240-247
16. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: A review. *Microsurgery*. 1993;14:165-175
17. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion syndrome: Cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg*. 2007;41:277-293
18. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121-1135
19. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53:31-47
20. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: Contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009;81:474-481
21. Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: Observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:75-82
22. Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*. 1999;44:232-241
23. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110:159-173
24. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1907-1939

25. Soonpaa MH, Daud AI, Koh GY, Klug MG, Kim KK, Wang H, Field LJ. Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:446-454
26. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;66:22-32
27. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 2009;123:255-278
28. Sun Y, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:851-858
29. Vracco R, Thorning D. Contractile cells in rat myocardial scar tissue. *Lab Invest.* 1991;65:214-227
30. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest.* 1990;63:21-29
31. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200:500-503
32. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-363
33. Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Hu K, Waller C, Roemer K, Wolf J, Gattenlohner S, Bauersachs J, Ertl G. A collagen alpha2(i) mutation impairs healing after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2012;180:113-122
34. Ertl G, Fraccarollo D, Gaudron P, Hu K, Laser A, Neubauer S, Schorb W. [transition of myocardial ischemia to heart failure]. *Z Kardiol.* 1998;87:667-675
35. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000;101:2981-2988
36. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: A role for de novo angiotensin ii generation. *Circulation.* 1997;96:4065-4082
37. Ganten D, Körhle J, Ruckpaul K. *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen.* Springer Verlag; 2006.
38. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999;5:1249-1255
39. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4:444-454
40. Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, Tersteeg C, Hoefler IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation.* 2010;121:80-90
41. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97:738-747
42. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res.* 2006;324:475-488
43. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:427-439
44. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: Species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;164:665-677
45. Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, Rossi AG, Gregory CD. Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest.* 2009;119:20-32
46. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:2567-2576
47. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43:860-878

48. Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, Ertl G, Bauersachs J. Absence of nf-kappab subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J.* 2006;20:1918-1920
49. Blomer N, Pachel C, Hofmann U, Nordbeck P, Bauer W, Mathes D, Frey A, Bayer B, Vogel B, Ertl G, Bauersachs J, Frantz S. 5-lipoxygenase facilitates healing after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2013;108:367
50. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of cd4+ t lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2012;125:1652-1663
51. Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schafer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, Nieswandt B, Nahrendorf M, Wagner H, Bayer B, Pachel C, Schon MP, Kneitz S, Bobinger T, Weidemann F, Ertl G, Bauersachs J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J.* 2013;27:871-881
52. Zidar N, Jeruc J, Balazic J, Stajer D. Neutrophils in human myocardial infarction with rupture of the free wall. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:247-250
53. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94:1543-1553
54. Zhu LX, Zhang HH, Mei YF, Zhao YP, Zhang ZY. Role of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (tweak)/fibroblast growth factor-inducible 14 (fn14) axis in rheumatic diseases. *Chin Med J (Engl).* 2012;125:3898-3904
55. Shi J, Jiang B, Qiu Y, Guan J, Jain M, Cao X, Bauer M, Su L, Burkly LC, Leone TC, Kelly DP, Liao R. Pgc1alpha plays a critical role in tweak-induced cardiac dysfunction. *PLoS One.* 2013;8:e54054
56. Echeverry R, Wu F, Haile WB, Wu J, Yepes M. The cytokine tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 have a neuroprotective effect in the central nervous system. *J Neuroinflammation.* 2012;9:45
57. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC. Tweak/fn14 pathway: A nonredundant role in intestinal damage in mice through a tweak/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology.* 2009;136:912-923
58. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via tweak and fn14 in mice—a pathway associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2011;141:2119-2129 e2118
59. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. Tweak, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:32401-32410
60. Wajant H. The tweak-fn14 system as a potential drug target. *Br J Pharmacol.* 2013;170:748-764
61. Meighan-Mantha RL, Hsu DK, Guo Y, Brown SA, Feng SL, Peifley KA, Alberts GF, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Richards CM, Winkles JA. The mitogen-inducible fn14 gene encodes a type i transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J Biol Chem.* 1999;274:33166-33176
62. Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, Liu H, Daniel TO, Smith CA, Fanslow WC. A novel tnf receptor family member binds tweak and is implicated in angiogenesis. *Immunity.* 2001;15:837-846
63. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The tnf and tnf receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104:487-501
64. Roos C, Wicovsky A, Muller N, Salzmann S, Rosenthal T, Kalthoff H, Trauzold A, Seher A, Henkler F, Kneitz C, Wajant H. Soluble and transmembrane tnf-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical nf-kappa b pathway. *J Immunol.* 2010;185:1593-1605

65. Stephan D, Sbai O, Wen J, Couraud PO, Putterman C, Khrestchatisky M, Desplat-Jego S. Tweak/fn14 pathway modulates properties of a human microvascular endothelial cell model of blood brain barrier. *J Neuroinflammation*. 2013;10:9
66. Schneider P, Schwenzer R, Haas E, Muhlenbeck F, Schubert G, Scheurich P, Tschopp J, Wajant H. Tweak can induce cell death via endogenous tnfr and tnfr receptor 1. *Eur J Immunol*. 1999;29:1785-1792
67. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetatos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL, Silke J. Tweak-fn14 signaling induces lysosomal degradation of a ciap1-tnfr2 complex to sensitize tumor cells to tnfr1. *J Cell Biol*. 2008;182:171-184
68. Haile WB, Echeverry R, Wu F, Guzman J, An J, Wu J, Yepes M. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and fibroblast growth factor-inducible 14 mediate cerebral ischemia-induced poly(adp-ribose) polymerase-1 activation and neuronal death. *Neuroscience*. 2010;171:1256-1264
69. Sabour Alaoui S, Dessirier V, de Araujo E, Alexaki VI, Pelekanou V, Lkhider M, Stathopoulos EN, Castanas E, Bagot M, Bensussan A, Tsapis A. Tweak affects keratinocyte g2/m growth arrest and induces apoptosis through the translocation of the aif protein to the nucleus. *PLoS One*. 2012;7:e33609
70. Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, Pasparakis M, Watson CJ. Ikkbeta/2 induces tweak and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development*. 2006;133:3485-3494
71. Chorianopoulos E, Heger T, Lutz M, Frank D, Bea F, Katus HA, Frey N. Fgf-inducible 14-kda protein (fn14) is regulated via the rhoa/rock kinase pathway in cardiomyocytes and mediates nuclear factor-kappaB activation by tweak. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:301-313
72. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. Tweak/fn14 pathway: An immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev*. 2011;244:99-114
73. Winkles JA. The tweak-fn14 cytokine-receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411-425
74. Whitsett TG, Cheng E, Inge L, Asrani K, Jameson NM, Hostetter G, Weiss GJ, Kingsley CB, Loftus JC, Bremner R, Tran NL, Winkles JA. Elevated expression of fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated egfr and promotes tumor cell migration and invasion. *Am J Pathol*. 2012;181:111-120
75. Ebihara N, Nakayama M, Tokura T, Ushio H, Murakami A. Expression and function of fibroblast growth factor-inducible 14 in human corneal myofibroblasts. *Exp Eye Res*. 2009;89:256-262
76. Donohue PJ, Richards CM, Brown SA, Hanscom HN, Buschman J, Thangada S, Hla T, Williams MS, Winkles JA. Tweak is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates fgf-2 and vegf-a mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:594-600
77. Han ES, Mekasha S, Ingalls RR. Fibroblast growth factor-inducible 14 (fn14) is expressed in the lower genital tract and may play a role in amplifying inflammation during infection. *J Reprod Immunol*. 2010;84:16-23
78. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res*. 1997;81:187-195
79. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999;99:1492-1498
80. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*. 2002;55:329-340
81. Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. 1993;92:2303-2312

82. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- α . *Circulation*. 1998;97:1375-1381
83. Zhang X, Winkles JA, Gongora MC, Polavarapu R, Michaelson JS, Hahm K, Burkly L, Friedman M, Li XJ, Yepes M. Tweak-fn14 pathway inhibition protects the integrity of the neurovascular unit during cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:534-544
84. Inta I, Frauenknecht K, Dorr H, Kohlhof P, Rabsilber T, Auffarth GU, Burkly L, Mittelbronn M, Hahm K, Sommer C, Schwaninger M. Induction of the cytokine tweak and its receptor fn14 in ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2008;275:117-120
85. Haile WB, Echeverry R, Wu J, Yepes M. The interaction between tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 promotes the recruitment of neutrophils into the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1147-1156
86. Polavarapu R, Gongora MC, Winkles JA, Yepes M. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis increases the permeability of the neurovascular unit through nuclear factor- κ b pathway activation. *J Neurosci*. 2005;25:10094-10100
87. Richter B, Rychli K, Hohensinner PJ, Berger R, Mortl D, Neuhold S, Zorn G, Huber K, Maurer G, Wojta J, Pacher R, Hulsman M, Niessner A. Differences in the predictive value of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (tweak) in advanced ischemic and non-ischemic heart failure. *Atherosclerosis*. 2010;213:545-548
88. Chorianopoulos E, Rosenberg M, Zugck C, Wolf J, Katus HA, Frey N. Decreased soluble tweak levels predict an adverse prognosis in patients with chronic stable heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:1050-1056
89. Jain M, Jakubowski A, Cui L, Shi J, Su L, Bauer M, Guan J, Lim CC, Naito Y, Thompson JS, Sam F, Ambrose C, Parr M, Crowell T, Lincecum JM, Wang MZ, Hsu YM, Zheng TS, Michaelson JS, Liao R, Burkly LC. A novel role for tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (tweak) in the development of cardiac dysfunction and failure. *Circulation*. 2009;119:2058-2068
90. Chen HN, Wang DJ, Ren MY, Wang QL, Sui SJ. Tweak/fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the nf-small κ , cyrillicb pathway. *Mol Biol Rep*. 2012;39:8231-8241
91. Novoyatleva T, Schymura Y, Janssen W, Strobl F, Swiercz JM, Patra C, Posern G, Wietelmann A, Zheng TS, Schermuly RT, Engel FB. Deletion of fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:325
92. Muller N, Schneider B, Pfizenmaier K, Wajant H. Superior serum half life of albumin tagged tnf ligands. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:793-799
93. Pavlath GK. *Myogenesis*. Elsevier; 2011.
94. Wallach D, Kovalenko A, Feldmann M. *Advances in tnf family research. Proceedings of the 12th international tnf conference, 2009*. Springer Verlag; 2011.
95. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/nf- κ b/i κ b family: Intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 1995;9:2723-2735
96. Hayden MS, Ghosh S. Nf- κ b, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012;26:203-234
97. Cancro MP. *Blys ligands and receptors*. Humana Press; 2010.
98. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in nf- κ b signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011;12:695-708
99. Karin M. Nf- κ b as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:a000141
100. Luo JL, Kamata H, Karin M. Ikk/nf- κ b signaling: Balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005;115:2625-2632
101. Weih F, Caamano J. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor- κ b signal transduction pathway. *Immunol Rev*. 2003;195:91-105
102. Sen R. Control of b lymphocyte apoptosis by the transcription factor nf- κ b. *Immunity*. 2006;25:871-883

103. Dejardin E. The alternative nf-kappab pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1161-1179
104. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two nf-kappab pathways. *Immunity.* 2002;17:525-535
105. Pahl HL. Activators and target genes of rel/nf-kappab transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6853-6866
106. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by rel/nf-kappab transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6910-6924
107. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappab signaling. *Immunol Rev.* 2006;210:171-186
108. Gawaz M. *Das blutplättchen.* Georg Thieme Verlag; 1999.
109. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:403-412
110. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:517-529
111. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:690-702
112. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005;85:757-810
113. Ito H. No reflow phenomenon in coronary heart disease. *J Cardiol.* 2001;37 Suppl 1:39-42
114. Gassler JP, Topol EJ. Reperfusion revisited: Beyond timi 3 flow. *Clin Cardiol.* 1999;22:IV20-29
115. Cura FA, L'Allier PL, Kapadia SR, Houghtaling PL, Dipaola LM, Ellis SG, Topol EJ, Brener SJ. Predictors and prognosis of suboptimal coronary blood flow after primary coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2001;88:124-128
116. Gregg D, Goldschmidt-Clermont PJ. Cardiology patient page. Platelets and cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;108:e88-90
117. Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood.* 2007;109:566-576
118. Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, Tolouei E, Mitchell A, Fu J, Carberry J, Fouras A, Jackson SP. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat Med.* 2009;15:665-673
119. Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood.* 2006;108:1903-1910
120. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein vi for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 2003;197:41-49
121. Cauwenberghs N, Meiring M, Vauterin S, van Wyk V, Lamprecht S, Roodt JP, Novak L, Harsfalvi J, Deckmyn H, Kotze HF. Antithrombotic effect of platelet glycoprotein ib-blocking monoclonal antibody fab fragments in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1347-1353
122. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: Impact of glycoprotein ib, vi, and iib/iiia blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation.* 2007;115:2323-2330
123. Howard MA, Hutton RA, Hardisty RM. Hereditary giant platelet syndrome: A disorder of a new aspect of platelet function. *Br Med J.* 1973;2:586-588
124. Wu D, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs N, Meiring M, Depraetere H, Kotze HF, Deckmyn H. Inhibition of the von willebrand (vwf)-collagen interaction by an antihuman vwf monoclonal antibody results in abolition of in vivo arterial platelet thrombus formation in baboons. *Blood.* 2002;99:3623-3628

125. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein vi is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to fcalphar and the natural killer receptors. *J Biol Chem.* 1999;274:29019-29024
126. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: Is gpvi the central receptor? *Blood.* 2003;102:449-461
127. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein vi: Its structure and function. *Thromb Res.* 2004;114:221-233
128. Pleines I, Elvers M, Strehl A, Pozgajova M, Varga-Szabo D, May F, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Nieswandt B. Rac1 is essential for phospholipase c-gamma2 activation in platelets. *Pflugers Arch.* 2009;457:1173-1185
129. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. Gpvi and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1752-1762
130. Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:187-190
131. Nieswandt B, Varga-Szabo D, Elvers M. Integrins in platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:206-209
132. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein vi-related clinical defects. *Br J Haematol.* 2007;139:363-372
133. Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J. The contribution of glycoprotein vi to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood.* 2003;102:1701-1707
134. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, Le S, Sun B, Watanabe T, Matsumoto Y, Yoshitake M, Kambayashi J, Tandon NN. Gpvi-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thromb Res.* 2006;118:371-380
135. Matsumoto Y, Takizawa H, Nakama K, Gong X, Yamada Y, Tandon NN, Kambayashi J. Ex vivo evaluation of anti-gpvi antibody in cynomolgus monkeys: Dissociation between anti-platelet aggregatory effect and bleeding time. *Thromb Haemost.* 2006;96:167-175
136. Grosse J, Braun A, Varga-Szabo D, Beyersdorf N, Schneider B, Zeitlmann L, Hanke P, Schropp P, Muhlstedt S, Zorn C, Huber M, Schmittwolf C, Jagla W, Yu P, Kerkau T, Schulze H, Nehls M, Nieswandt B. An ef hand mutation in stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest.* 2007;117:3540-3550
137. Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renne T, Stoll G, Nieswandt B. The calcium sensor stim1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med.* 2008;205:1583-1591
138. Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bosl M, Stoll G, Nieswandt B. Orai1 (cracm1) is the platelet soc channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood.* 2009;113:2056-2063
139. Feske S. Crac channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010;460:417-435
140. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA. Stim1, an essential and conserved component of store-operated ca2+ channel function. *J Cell Biol.* 2005;169:435-445
141. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in orai1 causes immune deficiency by abrogating crac channel function. *Nature.* 2006;441:179-185
142. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and stim reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem.* 2006;281:20661-20665
143. Zhang SL, Kozak JA, Jiang W, Yeromin AV, Chen J, Yu Y, Penna A, Shen W, Chi V, Cahalan MD. Store-dependent and -independent modes regulating ca2+ release-activated ca2+ channel activity of human orai1 and orai3. *J Biol Chem.* 2008;283:17662-17671

144. Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS. Oligomerization of stim1 couples er calcium depletion to crac channel activation. *Nature*. 2008;454:538-542
145. Tolhurst G, Carter RN, Amisten S, Holdich JP, Erlinge D, Mahaut-Smith MP. Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for orai1 in the store-operated ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets*. 2008;19:308-313
146. Beyersdorf N, Braun A, Vogtle T, Varga-Szabo D, Galdos RR, Kissler S, Kerkau T, Nieswandt B. Stim1-independent t cell development and effector function in vivo. *J Immunol*. 2009;182:3390-3397
147. Braun A, Gessner JE, Varga-Szabo D, Syed SN, Konrad S, Stegner D, Vogtle T, Schmidt RE, Nieswandt B. Stim1 is essential for fcgamma receptor activation and autoimmune inflammation. *Blood*. 2009;113:1097-1104
148. Gwack Y, Srikanth S, Oh-Hora M, Hogan PG, Lamperti ED, Yamashita M, Gelinas C, Neems DS, Sasaki Y, Feske S, Prakriya M, Rajewsky K, Rao A. Hair loss and defective t- and b-cell function in mice lacking orai1. *Mol Cell Biol*. 2008;28:5209-5222
149. Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P. Stim1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2008;10:688-697
150. Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M. Stim1 and orai1 mediate crac currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 2008;103:1289-1299
151. Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, Singer HA, Trebak M. Evidence for stim1- and orai1-dependent store-operated calcium influx through icrac in vascular smooth muscle cells: Role in proliferation and migration. *FASEB J*. 2009;23:2425-2437
152. Gilio K, van Kruchten R, Braun A, Berna-Erro A, Feijge MA, Stegner D, van der Meijden PE, Kuijpers MJ, Varga-Szabo D, Heemskerk JW, Nieswandt B. Roles of platelet stim1 and orai1 in glycoprotein vi- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem*. 2010;285:23629-23638
153. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: A murine model. *Am J Physiol*. 1995;269:H2147-2154
154. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998;274:H1812-1820
155. Gao E, Lei YH, Shang X, Huang ZM, Zuo L, Boucher M, Fan Q, Chuprun JK, Ma XL, Koch WJ. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res*. 2010;107:1445-1453
156. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein vi is strictly dependent on its association with the fcrgamma chain. *J Biol Chem*. 2000;275:23998-24002
157. Boyanova D, Nilla S, Birschmann I, Dandekar T, Dittrich M. Plateletweb: A systems biologic analysis of signaling networks in human platelets. *Blood*. 2012;119:e22-34
158. Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, Keerthikumar S, Kumar S, Mathivanan S, Telikicherla D, Raju R, Shafreen B, Venugopal A, Balakrishnan L, Marimuthu A, Banerjee S, Somanathan DS, Sebastian A, Rani S, Ray S, Harrys Kishore CJ, Kanth S, Ahmed M, Kashyap MK, Mohmood R, Ramachandra YL, Krishna V, Rahiman BA, Mohan S, Ranganathan P, Ramabadran S, Chaerkady R, Pandey A. Human protein reference database--2009 update. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D767-772
159. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez gene: Gene-centered information at ncbi. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:D26-31
160. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27:431-432

161. Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B. Phosphosite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics*. 2004;4:1551-1561
162. Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MA, Jorgensen C, Miron IM, Diella F, Colwill K, Taylor L, Elder K, Metalnikov P, Nguyen V, Pasculescu A, Jin J, Park JG, Samson LD, Woodgett JR, Russell RB, Bork P, Yaffe MB, Pawson T. Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell*. 2007;129:1415-1426
163. Miller ML, Jensen LJ, Diella F, Jorgensen C, Tinti M, Li L, Hsiung M, Parker SA, Bordeaux J, Sicheritz-Ponten T, Olhovsky M, Pasculescu A, Alexander J, Knapp S, Blom N, Bork P, Li S, Cesareni G, Pawson T, Turk BE, Yaffe MB, Brunak S, Linding R. Linear motif atlas for phosphorylation-dependent signaling. *Sci Signal*. 2008;1:ra2
164. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298:1912-1934
165. Fick A, Lang I, Schafer V, Seher A, Trebing J, Weisenberger D, Wajant H. Studies of binding of tumor necrosis factor (tnf)-like weak inducer of apoptosis (tweak) to fibroblast growth factor inducible 14 (fn14). *J Biol Chem*. 2012;287:484-495
166. Pachel C, Mathes D, Bayer B, Dienesch C, Wangorsch G, Heitzmann W, Lang I, Ardehali H, Ertl G, Dandekar T, Wajant H, Frantz S. Exogenous administration of a recombinant variant of tweak impairs healing after myocardial infarction by aggravation of inflammation. *PLoS One*. 2013;8:e78938
167. Unsold B, Kaul A, Sbroglio M, Schubert C, Regitz-Zagrosek V, Brancaccio M, Damilano F, Hirsch E, Van Bilsen M, Munts C, Sipido K, Bito V, Detre E, Wagner NM, Schafer K, Seidler T, Vogt J, Neef S, Bleckmann A, Maier LS, Balligand JL, Bouzin C, Clapier RV, Garnier A, Eschenhagen T, El-Armouche A, Knoll R, Tarone G, Hasenfuss G. Melusin protects from cardiac rupture and improves functional remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2013
168. Schunkert H, Riegger GAJ. *Apoptosis in cardiac biology*. Springer Verlag; 2000.
169. Tavora FR, Ripple M, Li L, Burke AP. Monocytes and neutrophils expressing myeloperoxidase occur in fibrous caps and thrombi in unstable coronary plaques. *BMC Cardiovasc Disord*. 2009;9:27
170. Webster KA. Programmed death as a therapeutic target to reduce myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:492-499
171. Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction. *Ann Med*. 2002;34:470-479
172. Nakayama M, Kayagaki N, Yamaguchi N, Okumura K, Yagita H. Involvement of tweak in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *J Exp Med*. 2000;192:1373-1380
173. Kaplan MJ, Lewis EE, Shelden EA, Somers E, Pavlic R, McCune WJ, Richardson BC. The apoptotic ligands trail, tweak, and fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus t cells. *J Immunol*. 2002;169:6020-6029
174. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, Hurst S, Danilenko D, Li J, Filvaroff E, Yang B, Daniel D, Ashkenazi A. Tweak attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*. 2005;123:931-944
175. Hotta K, Sho M, Yamato I, Shimada K, Harada H, Akahori T, Nakamura S, Konishi N, Yagita H, Nonomura K, Nakajima Y. Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int*. 2011;79:179-188
176. Burkly LC, Michaelson JS, Hahm K, Jakubowski A, Zheng TS. Tweaking tissue remodeling by a multifunctional cytokine: Role of tweak/fn14 pathway in health and disease. *Cytokine*. 2007;40:1-16
177. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of mmp-2 attenuates early lv rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1229-1235
178. Charney RH, Takahashi S, Zhao M, Sonnenblick EH, Eng C. Collagen loss in the stunned myocardium. *Circulation*. 1992;85:1483-1490

179. Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3221-3228
180. Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, Ide T, Egashira K, Tsutsui H, Sunagawa K. Soluble tnf receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2007;73:794-805
181. Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, Kumar A. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (mmp-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappa-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: A potential role of mmp-9 in myopathy. *J Biol Chem*. 2009;284:4439-4450
182. Srivastava AK, Qin X, Wedhas N, Arnush M, Linkhart TA, Chadwick RB, Kumar A. Tumor necrosis factor-alpha augments matrix metalloproteinase-9 production in skeletal muscle cells through the activation of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 (tak1)-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2007;282:35113-35124
183. Robert I, Aussems M, Keutgens A, Zhang X, Hennuy B, Viatour P, Vanstraelen G, Merville MP, Chapelle JP, de Leval L, Lambert F, Dejardin E, Gothot A, Chariot A. Matrix metalloproteinase-9 gene induction by a truncated oncogenic nf-kappa2 protein involves the recruitment of mll1 and mll2 h3k4 histone methyltransferase complexes. *Oncogene*. 2009;28:1626-1638
184. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, Ezan J, Costet P, Daret D, Deville C, Duplaa C. Frizzled a, a novel angiogenic factor: Promises for cardiac repair. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25:76-83
185. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153:347-358
186. McGrath MH, Emery JM, 3rd. The effect of inhibition of angiogenesis in granulation tissue on wound healing and the fibroblast. *Ann Plast Surg*. 1985;15:105-122
187. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:31189-31195
188. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*. 1998;152:1445-1452
189. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate vegf and bfgf gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates vegf expression only. *Circulation*. 1994;90:649-652
190. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (vegf) from platelets: Significance for vegf measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998;77:956-964
191. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*. 1997;90:4153-4161
192. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*. 1992;3:211-220
193. Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W. Tweak promotes ovarian cancer cell metastasis via nf-kappa pathway activation and vegf expression. *Cancer Lett*. 2009;283:159-167
194. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. Tweak induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:8455-8459
195. LeLeiko RM, Bower DJ, Larsen CP. Mrsa-associated bacterial myocarditis causing ruptured ventricle and tamponade. *Cardiology*. 2008;111:188-190
196. Stock E, Lubbe T. Rupture of the right ventricle in acute myocarditis. *Br Heart J*. 1968;30:135-137

197. Ito M, Tanabe Y, Suzuki K, Kumakura M, Kimura K, Masani F, Aizawa Y. Left ventricular free wall rupture in acute fulminant myocarditis during long-term cardiopulmonary support. *Jpn Circ J.* 1999;63:397-399
198. Sanders V, Misanik LF. Salmonella myocarditis. Report of a case with ventricular rupture. *Am Heart J.* 1964;68:682-685
199. Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, Katz SD, Klapholz M, Moser DK, Rogers JG, Starling RC, Stevenson WG, Tang WH, Teerlink JR, Walsh MN. Hfsa 2010 comprehensive heart failure practice guideline. *J Card Fail.* 2010;16:e1-194
200. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: Mechanisms of inflammation and cell death: Learning from the past for the future. *Circulation.* 1999;99:1091-1100
201. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-621
202. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. Alpha and beta chemokines induce nk cell migration and enhance nk-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1995;155:3877-3888
203. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science.* 1992;258:1957-1959
204. Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Widmer M, Kunkel SL. Tnf-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol.* 1995;154:5411-5417
205. Jarr K-U, Eschricht S, Burkly LC, Preusch M, Katus HA, Frey N, Chorianopoulos E. Tnf-like weak inducer of apoptosis aggravates left ventricular dysfunction after myocardial infarction in mice. *Mediators of Inflammation.* 2013
206. Gawaz M. *Blood platelets.* Georg Thieme Verlag; 2001.
207. Arthur JF, Gardiner EE, Matzaris M, Taylor SG, Wijeyewickrema L, Ozaki Y, Kahn ML, Andrews RK, Berndt MC. Glycoprotein vi is associated with gpib-ix-v on the membrane of resting and activated platelets. *Thromb Haemost.* 2005;93:716-723
208. Dayananda KM, Singh I, Mondal N, Neelamegham S. Von willebrand factor self-association on platelet gpibalpha under hydrodynamic shear: Effect on shear-induced platelet activation. *Blood.* 2010;116:3990-3998
209. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61:498-511
210. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med.* 1991;174:785-790
211. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood.* 1994;84:4242-4248
212. Potrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, Maurer MH, Rossner M, Schneider A, Schwaninger M. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 2004;24:8237-8244
213. Yepes M, Brown SA, Moore EG, Smith EP, Lawrence DA, Winkles JA. A soluble fn14-fc decoy receptor reduces infarct volume in a murine model of cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2005;166:511-520
214. Calabrese L. The yin and yang of tumor necrosis factor inhibitors. *Cleve Clin J Med.* 2006;73:251-256
215. Gruner S, Prostedna M, Koch M, Miura Y, Schulte V, Jung SM, Moroi M, Nieswandt B. Relative antithrombotic effect of soluble gpvi dimer compared with anti-gpvi antibodies in mice. *Blood.* 2005;105:1492-1499
216. Ungerer M, Li Z, Baumgartner C, Goebel S, Vogelmann J, Holthoff HP, Gawaz M, Munch G. The gpvi-fc fusion protein revacept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PLoS One.* 2013;8:e71193
217. Ungerer M, Rosport K, Bultmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Munch G. Novel antiplatelet drug revacept (dimeric glycoprotein vi-fc) specifically and

- efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123:1891-1899
218. ClinicalTrial.gov. Revacept in symptomatic carotid stenosis (revacept/cs/02). 2013;www.clinicaltrials.gov/show/nct01645306 [Stand:29.11.2013]

10. Anhang

10.1. Abkürzungen

2D	2-Dimensial
AAR	Area at Risk
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	B cell lymphoma 2-associated death promoter
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
Bcl-X _L	B cell lymphoma-extra large
BLC	B lymphocyte chemoattractant
BSA	bovines Serumalbumin
BSS	Bernard-Soulier Syndrom
CD	Cluster of differentiation
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CK-MB	skeletal-brain hybrid type
COX	Cyclooxygenase
CRD	Cystein-reiche Domäne
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDD	enddiastolisch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELC	EBI1 ligand chemokine
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESD	endsystolischen
FABP	Fatty acid binding protein
FACS	Durchflusszytometrie
FcR	Fc Rezeptor
FGF	fibroblast growth factor

FKS	Fätales Kälberserum
Fn14	fibroblast growth factor-inducible molecule 14
FS	Auswurfeistung
FSC	Vorwärtsstreulicht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITR	glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene
GP	Glykoprotein
GpL	Gaussia princeps Luziferase
Gy	Gray
HCF	humane kardiale Fibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxia-inducible factors
HPRD	Human Protein Reference Database
HSA	humanes Serumalbumin
HSP	Hitzeschockproteine
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
IF	Infarkt
IFN	Interferon
IGFBP-2	insulin-like growth factor-binding protein 2
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IMT	intramurale Blutplättchenthromben
iNOS	induzierte NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IR	Ischämie-Reperfusion
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
I κ B	Inhibitoren von κ B
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock-out
LDL	Low Density Lipoprotein
LV	linker Ventrikel

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCAO	experimenteller ischämischer Schlaganfall
MCP	monocyte chemotactic protein
MEM	Minimum essential medium
MES	mikroembolische Signal
MI	myokardialer Infarkt
MMP	Matrix Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFκB	nuclear factor kappa B
NGS	Normal Goat Serum
NIK	NFκB inducing kinase
NK	Natürliche Killerzellen
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI	Propidiumjodid
PL	Phospholipase
PMN	polymorphonukleäre Neutrophile
PMS	Phenazin Methosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPARα	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPI	Protein-Protein Interaktionen
PSR	Pikro-Siriusrot
qRT-PCR	real-time-quantitative polymerase chain reaction
r.o.	retro-orbital
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted
RHD	Rel homology domain
RIN	RNA Integritätsnummer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel

SDF1	stromal cell-derived factor 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SGOT	serum glutamic-oxaloacetic transaminase
SLC	solute carrier
SOCE	store operated Ca^{2+} entry
SPF	spezifisch pathogenfreien Bedingungen
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSC	Seitwärtsstreulicht
STIM1	Stromal interaction molecule 1
sTWEAK	lösliche Form von TWEAK
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	tissue factor
TGF	transforming growth factor
THD	TNF-homologe Domäne
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF Rezeptor
TRAF	TNF receptor associated factors
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
TWEAK	Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
TxA ₂	Thromboxan A ₂
u.d.	unter Detektionslimit
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vaskuläre glatte Gefäßzellen
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WG	Gewicht
αSMA	α-smooth muscle actin

10.2. Publikationsliste

Pachel C, Mathes D, Barbara Bayer, Charlotte Dienesch, Gaby Wangorsch, Wolfram Heitzmann, Isabell Lang, Hossein Ardehali, Georg Ertl, Thomas Dandekar, Harald Wajant, Stefan Frantz. Exogenous Administration of a Recombinant Variant of TWEAK Impairs Healing after Myocardial Infarction by Aggravation of Inflammation. PLoS ONE. 2013 Nov 11; 8(11): e78938

Chopra M, Lang I, Salzmann S, **Pachel C**, Kraus S, Bäuerlein CA, Brede C, Garrote AL, Mattenheimer K, Ritz M, Schwinn S, Graf C, Schäfer V, Frantz S, Einsele H, Wajant H, Beilhack A. Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1. PLoS One. 2013 Sep 30;8(9):e75737. doi: 10.1371/journal.pone.0075737.

Blömer N*, **Pachel C***, Hofmann U, Nordbeck P, Bauer W, Mathes D, Frey A, Bayer B, Vogel B, Ertl G, Bauersachs J, Frantz S. 5-Lipoxygenase facilitates healing after myocardial infarction. Basic Res Cardiol. 2013;108(4):367. doi: 10.1007/s00395-013-0367-8. Epub 2013 Jun 28.

** geteilte Erstautorenschaft*

Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schäfer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, Nieswandt B, Nahrendorf M, Wagner H, Bayer B, **Pachel C**, Schön MP, Kneitz S, Bobinger T, Weidemann F, Ertl G, Bauersachs J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. FASEB J. 2013 Mar;27(3):871-81. doi: 10.1096/fj.12-214049. Epub 2012 Nov 16.

Bauch C, Kolle SN, Fabian E, **Pachel C**, Ramirez T, Wiench B, Wruck CJ, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. Toxicol In Vitro. 2011 Sep;25(6):1162-8. doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.030. Epub 2011 Jun 7.

10.3. Lebenslauf

<i>Persönliche Daten</i>	Christina Elisabeth Pachel
<i>Geburtstag</i>	21.01.1985
<i>Geburtsort</i>	Ludwigshafen am Rhein
<i>Beruflicher Werdegang und Ausbildung</i>	Okt 2004 - Sep 2009 Studium Diplom-Lebensmittelchemie TU Kaiserslautern Diplomarbeit BASF SE, GV/TB Ludwigshafen am Rhein Sep 1995 - Mär 2004 Schulabschluss mit Abitur Geschwister-Scholl-Gymnasium Ludwigshafen am Rhein
<i>Berufliche Weiterbildungen</i>	Mär 2011 Ausbildung zum Projektleiter und Beauftragten für die Biologische Sicherheit gem. § 15 Abs. 4 GenTSV Feb 2011 Tierexperimenteller Kurs (FELASA - Kategorie B) Seit Okt 2010 Fortbildung zum Fachtoxikologen (DGPT)

10.4. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Entzündliche Faktoren und Blutplättchen im experimentellen myokardialen ischämischen Schaden“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Inflammatory factors and blood platelets in experimental myocardial ischemic injury“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature