

Hannes Andre Lemcke  
Dr. med.

## **Die Charakterisierung der myeloischen Immunantwort nach myokardialer Schädigung im Zebrafisch – Makrophagen als essenzieller Bestandteil kardialer Regeneration**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Florian Leuschner

Der Myokardinfarkt bleibt eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Mehr als 250.000 Menschen erleiden pro Jahr in Deutschland einen Herzinfarkt, wodurch die sozioökonomische Relevanz dieser Erkrankung unterstrichen wird. Während der letzten Jahre rückte die inflammatorische Antwort, ausgelöst durch den ischämischen Zelltod, vermehrt in den Fokus kardiovaskulärer Forschung.

Im Gegensatz zum Menschen ist der Zebrafisch in der Lage, sein Herz nach kardialer Schädigung nahezu vollständig zu regenerieren, ohne größere bleibende Substanzverluste durch wesentliche Narbenbildung. Kombiniert mit seiner Durchsichtigkeit in embryonalen Stadien und der Verwendung von transgenen Tieren bietet der Zebrafisch ein geeignetes Modell für die *in vivo* Analyse und Visualisierung des inflammatorischen Prozesses nach myokardialer Schädigung.

Bisher bestand noch keine geeignete Methodik zur Induktion einer definierten kardialen Schädigung im neonatalen Zebrafisch, sodass zur Analyse des inflammatorischen Prozesses zunächst ein geeignetes Modell etabliert werden musste. In dieser Arbeit wurden zwei neue Modelle für die Induzierung kardialer Nekrose im embryonalen Zebrafisch etabliert: a) mittels Schädigung durch reinen Alkohol und b) mittels 2-Photon-Laserablation des kardialen Apex. Die Auswertung der Daten ergab unabhängig der Methodik eine signifikante Reduktion der Herzfunktion bis 48 Stunden nach Schädigung mit fortan vollständiger *Restitutio ad integrum*.

In adulten Stadien bestanden bereits etablierte Methoden zur Schädigung von kardialem Gewebe, sodass hier auf die Methodik der Kryo-Vereisung zur Schädigung von 25% ventrikulären Gewebes zurückgegriffen wurde. Nach kardialer Schädigung mit dieser Methode konnte echokardiographisch eine signifikante Minderung der Pumpfunktion mit einer Regeneration nach 30 Tagen festgestellt werden, mit histologisch gleichzeitig fast vollständiger Resorption der temporär entstandenen Narbe im zerstörten kardialen Gewebe.

Durch die Verwendung transgener Linien, welche Neutrophile Granulozyten und Makrophagen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen, konnte *in vivo* ein hochaufgelöster zeitlicher Ablauf der Migration myeloischer Zellen im Zebrafischembryo dargestellt werden. Zeitrafferaufnahmen zeigten konservierte Elemente der inflammatorischen Zellantwort von Mammaliern, mit einer initialen passageren Neutrophilenantwort, gefolgt von einwandernden Makrophagen in das geschädigte Myokard, mit einem Verbleiben ebendieser bis zur Wiederherstellung des Gewebes.

Durch die Nutzung von a) Morpholino-oligonukleotiden gegen *irf8* und b) einer transgenen Linie in welcher selektiv Makrophagen durch Hinzugabe von Metronidazol ablatiert werden können sowie c) Clondronat Liposomen in adulten Stadien, wurde die Rolle von Makrophagen für den kardialen Regenerationsprozess näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die

Ablation von Makrophagen eine funktionelle Heilung nahezu vollständig inhibierte mit Zeichen der Herzinsuffizienz und erhöhter Mortalität in embryonalen Stadien und zudem einer persistierenden Narbenbildung in adulten Stadien ähnlich den Ergebnissen kardialer Schädigung in adulten Mäusen oder nach humanen Infarkten.

Die primäre Annahme, dass Makrophagen einen Einfluss auf die Proliferationsrate der Kardiomyozyten und darüber auf die Regeneration haben, konnte bei nicht signifikantem Unterschied der Proliferationsrate nicht bestätigt werden. In beiden Fällen, also mit und ohne Makrophagen, zeigte sich eine vergleichbare Proliferationsrate von Kardiomyozyten nach kardialer Schädigung. Allerdings zeigte sich bei depletierten Makrophagen eine gestörte Neovaskularisierung des zerstörten Bereiches, eine erhöhte Apoptoserate von Kardiomyozyten und interessanterweise konnten, trotz gesteigerter Proliferation der Kardiomyozyten in der *border zone*, keine neugebildeten Kardiomyozyten im Defektareal detektiert werden. Dies führte zu der Annahme, dass Makrophagen einen Einfluss auf die Migration von Kardiomyozyten haben könnten. Mittels Agarose Spot Assay mit neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte ein signifikanter migratorischer Stimulus durch den Überstand von M2 Makrophagen gezeigt werden mit 5-8 Fach höherer Zahl eingewanderter Kardiomyozyten. Bei deutlich erhöhter Konzentration von CCL2 in der Sekretomanalyse des Überstandes von M2 Makrophagen wurde der Einfluss von CCL2 weiter untersucht. Die Wiederholung des Agarose Spot Assays mit nun antikörper-vermittelter Blockade von CCR2, dem korrespondierenden Rezeptor für CCL2, zeigte eine signifikant verminderte Migration der Kardiomyozyten. Die Interaktion von CCL2 und CCR2 konnte somit *in vitro* als essenzieller Bestandteil für die Migration kardialer Zellen identifiziert werden. In weiteren Untersuchungen gilt es nun zu prüfen, ob die *in vitro* Ergebnisse auch auf *in vivo* übertragbar sind und somit Makrophagen auch hier eine Schlüsselrolle für die *Guidance* der neugebildeten Kardiomyozyten spielen.

Diese Arbeit unterstreicht erneut die herausragende Rolle von Makrophagen im Regenerationsprozess zerstörten Gewebes, welche über die simple Abräumung von Zelldebris hinaus geht. Die Klärung der spezifischen Funktion insbesondere der Subpopulationen von Makrophagen wird helfen den Regenerationsprozess besser zu verstehen, um das fehlende Schlüsselement zu finden, warum dem Menschen die Eigenschaft zur kardialen Regeneration verloren gegangen ist

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit zwei neue Modelle zur Induzierung einer definierten kardialen Nekrose im neonatalen Zebrafisch etabliert, die zentrale Bedeutung von Makrophagen für die kardiale Regeneration im Zebrafisch aufgezeigt und *in vitro* Makrophagen über die Interaktion von CCL2/CCR2 als Koordinatoren der Kardiomyozytenmigration identifiziert werden.