

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Die Rolle des α V-Integrins bei der Entwicklung einer
kardialen Hypertrophie am Mausmodell, nach
Aortenkonstriktion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von Cornelia Joha
aus Stuttgart

Würzburg, April 2008

Referent: Privatdozent Dr. med. J. Strotmann

Koreferent: Professor Dr. med. G. Ertl

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Sep. 2008

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1. Einleitung	1
1.1. Herzkrankheiten in der Gesellschaft	1
1.2. Hypertrophie und Insuffizienz.....	2
1.3. Signalwege in der kardialen Hypertrophie:.....	8
1.4. Rolle der Integrine und der Extrazellulären Matrix	15
1.5. Aufgabenstellung.....	22
2. Materialien	24
2.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungen.....	24
2.2. Allgemeine Geräte	25
2.3. Transversales Aortic-Banding	26
2.4. Herzechokardiographie	27
2.5. Hämodynamik und Morphologie.....	27
2.6. Proteinanalyse	28
2.7. Immunhistologie:.....	34
2.8. Antikörper.....	36
2.9. Histologie	39
2.10. Versuchstiere	40
2.11. alpha.v-Integrininhibitor, ALZA-Pumpen.....	40
2.12. Herzechokardiographie	42
3. Methoden	44
3.1. Zeitpunkte und Versuchsgruppen	44
3.2. ALZET-Pumpen	44
3.3. Transversales Aortic-Banding	45
3.4. Organentnahme und Gewebepreparation.....	46
3.5. Proteinanalyse	48
3.6. Immunhistologie	56
3.7. Histologie	58
3.8. Statistik.....	60
4. Ergebnisse	62
4.1. Morphologie	62
4.2. Herzechokardiographie	66
4.3. Histologie	77
4.4. Proteinanalyse (Western Blot und Immunhistologie).....	84

4.5. Mortalitätsstatistik	93
5. Diskussion	95
5.1. Herzechokardiografie	97
5.2. Histologie	100
5.3. Proteinanalyse	101
5.4. Mortalitätsstatistik	107
6. Zusammenfassung.....	108
7. Literaturverzeichnis	109

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

α	Alpha
°C	Grad Celsius
A	Ampere
AB	Aortic-Banding
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BSA	bovine serum albumin
Ctrl	Control-
CyTM2	Carbocyanin 2
d	Tag(e)
Da	Dalton
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Methylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
ECL	enhanced chemiluminescence
EtOH	Ethanol
F	French
FAK	focal adhesion kinase
Fc	fragment crystalline
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FN	Fibronektin
g	Gramm
G	Nadelgröße
h	Stunde(n)
HE	Hämalaun-Eosin
HR	heart rate
HRP	Horse raddish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IVS	Interventrikularseptum
k	Kilo-, 10 ³

kDA	Kilo-Dalton
KO	Knock Out
l	Liter
LVDP	left ventricular diastolic pressure
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure
LVSP	left ventricular systolic pressure
m	Milli-, 10^{-3}
M	Molar
max.	Maximal
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
min.	Minimal
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
pAK	Primärantikörper
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PSR	Pikro-Sirius-Rot
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris buffered saline
TBSA	Tris buffered saline & bovine serum albumin
TBST	Tris buffered saline & Tween®20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Temp.	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
V	Volt
β	Beta
ε	Epsilon; Extinktionskoeffizient

λ

Lambda; Wellenlänge

μ

Mikro-, 10^{-6}

1. Einleitung

1.1. Herzkrankheiten in der Gesellschaft

Die Erkrankungen des Herzens und des Herzkreislaufsystems stellen die häufigsten Todesursachen in den Industrienationen dar, und sind damit ein bedeutender Faktor im Gesundheitswesen. Sie liegen noch vor den Tumorleiden.

Nach Angaben des Statistischen Bundesamts verstarben 2004 insgesamt 818 271 Personen (383 388 Männer und 434 883 Frauen), bei fast der Hälfte der Verstorbenen (45%) wurde der Tod durch eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems verursacht, (152 468 Männer und 216 004 Frauen).

Zu den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems werden unter anderem die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt, die arterielle Hypertonie und die Herzinsuffizienz subsumiert.

Allerdings ist unter dem Gesichtspunkt des sozioökonomischen Faktors nicht nur die Mortalität der Herzkreislaufkrankungen für eine Gesellschaft von Bedeutung, sondern auch die Morbidität, immerhin liegt die Prävalenz der Herzinsuffizienz altersabhängig zwischen 1% ab dem 50. und 10% ab dem 80. Lebensjahr (Herold 2003) und stellt somit auch einen enormen Kostenfaktor dar.

Dabei versteht man unter der chronischen Herzinsuffizienz ein klinisches Syndrom, welches sich auf dem Boden unterschiedlicher Herzleiden entwickelt, wie z.B. koronare oder valvuläre Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Myokarditis, aber auch auf Grund einer arterielle Hypertonie und als Unfähigkeit des Herzens den Organismus ausreichend mit Blut zu versorgen definiert ist. Hieraus resultiert eine verminderte körperliche Belastbarkeit, die mit Atemnot (Dyspnoe), peripheren Ödemen und einer sympathikotonen Überaktivität (mit Tachykardie, evtl. Rhythmusstörungen, feuchtkalte Haut) einhergeht. Des Weiteren kommt es zu einem Blutrückstau in die Organe, in Folge dessen sich Organschäden entwickeln.

Auf Grund dieser Komplikationen, meist noch in Kombination mit anderen schwerwiegenden internistischen Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, liegt, trotz adäquater Herzinsuffizienz-Therapie, die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium (NYHA III-IV) bei nur 25-30%.

Wenn man also bedenkt, dass in einem fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz mehr Menschen versterben, als an einem vergleichbar fortgeschrittenen Tumorleiden, wird klar, wie wichtig es ist die genauen Mechanismen zu verstehen, die bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle spielen.

1.2. Hypertrophie und Insuffizienz

Kardiale Hypertrophieentwicklung ist ein Prozess, der sowohl Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, das Koronargefäßsystem, als auch die Extrazelluläre Matrix umfasst. In den letzten Jahren sind mehr und mehr intrazelluläre Signalkaskaden ins Zentrum der Forschung gerückt. Dabei eröffnete sich ein äußerst komplexes System an Signalkaskaden, die sich gegenseitig beeinflussen und regulieren.

Diese Arbeit hat in erster Linie die so genannten integrin-abhängigen Signalwege zum Schwerpunkt, bzw. die Möglichkeiten einer gezielten Inhibition durch den Einsatz eines speziellen Inhibitors, mit der Aussicht auf einen systematischen Einsatz zur Prävention und Behandlung einer kardialen Hypertrophie.

Hypertrophie

Ursächlich für eine Hypertrophieentwicklung können sowohl physiologische, als auch pathologische Auslöser sein. Ähnlich, wie Skelettmuskulatur wächst auch das Herz unter Training. Bei einem Sportler allerdings bleibt dies in einem physiologischen Rahmen – das kritische Herzgewicht von 500g wird in der Regel nicht überschritten. Bei einer Gewichtszunahme auf Werte über 500g kommt die autologe Blutversorgung in einen kritischen Bereich, was bedeutet, dass das Herz nicht mehr in der Lage ist sich selbst genügend mit Blut zu versorgen – Ischämie und Nekrosen sind die Folge. Auf Grund der relativen Koronarinsuffizienz kommt es zu einer Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) bzw. ischämischen Veränderungen in deren Folge Zelltod und Umbauvorgänge der Extrazellulären Matrix stehen. Den Endpunkt dieser Prozesskette stellt eine Gefügedilatation des Herzens dar.

Eine Hypertrophieentwicklung ansich bedeutet aber nicht zwangsläufig die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, im Gegenteil, sie ist eine Anpassungsreaktion an erhöhte Anforderungen.

Aus vorangegangenen Studien weiß man allerdings, dass eine Hypertrophie, die auf dem Boden pathologischer Bedingungen entstand (wie zum Beispiel hypertensive

und/oder valvuläre Herzkrankheit oder ein vorausgegangener Myokardinfarkt) das Risiko zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz deutlich erhöht [1] [2]. Es müssen also andere Mechanismen und Signalwege aktiv sein, damit unter gegebenen pathologischen Bedingungen eine gestörte Anpassung erfolgt. Selvetella et al [3] differenziert dabei die Begriffe *maladaptive und adaptive Hypertrophy*.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen einem physiologisch hypertrophierten und einem pathologisch hypertrophiertem Herz ist die Kollagenvermehrung, die unter pathologischen Bedingungen verstärkt einsetzt und dabei auch zu einer stärkeren Dickenzunahme der Ventrikelwände führt, wie Medugorac schon 1980 belegen konnte[4]. Während das physiologische Wachstum eine geordnete und homogene Struktur der Kardiomyozyten, wie auch der extrazellulären Elemente aufweist [5], dominieren bei der Hypertrophieentwicklung unter pathologischen Bedingungen, Fibrosierungsvorgänge, ähnlich wie in Narbengewebe [6]. In Folge dessen nimmt die Rigidität des Myokards zu, somit wiederum können sich die Ventrikel während der Diastole nur vermindert füllen [7]. Die genauen Mechanismen allerdings, die dazu führen, dass Fibroblasten in diesem Ausmaß aktiviert werden, sind noch nicht hinreichend geklärt.

Wie schon erwähnt, umfassen die Vorgänge, die eine Hypertrophieentwicklung bewirken, auch eine Reorganisation des Zytoskeletts, sowie ein Umbau der „Extrazellulärmatrix“ (EZM) [8] [9] [10]. Dabei konnte vor allem eine Zunahme der Extrazellulärmatrixproteine wie Kollagen und Fibronectin nachgewiesen werden. Weiterhin ist auch eine Zunahme der kardiozytären Zellsteifheit sowie der Mikrotubuli des Zytoskeletts bei Hypertrophie beschrieben [11] [12].

Um Missverständnisse zu vermeiden muss man die Begriffe Hypertrophie und Hyperplasie eng umschrieben definieren: die Physiologie versteht unter Hypertrophie die Volumenzunahme einer Zelle, was sich deutlich vom Begriff der Hyperplasie abgrenzt. Hierbei kommt es zu einer Vermehrung der Zellzahl, beide Mechanismen werden dabei vom Organismus eingesetzt um Gewebe zu vermehren. Die einst strikte Trennung der Zelltypen, die postembryonal zur Zellvermehrung oder Hypertrophieentwicklung in der Lage waren, ist heute überholt. Mittlerweile ist es sehr umstritten, ob Kardiomyozyten tatsächlich nur zum Zellwachstum in der Lage sind [13].

Bei der *konzentrischen Hypertrophie* kommt es durch Wachstum der Kardiomyozyten zu einer Zunahme der Dicke der Ventrikelwand, wie auch des Septums. Die Herzmuskelzellen vermehren dabei die Sarkomere und strukturieren sie in einer parallelen Anordnung. Damit steigt dementsprechend auch die Kraftentwicklung, zu der das Herz in der Lage ist. Es resultiert ein vermindertes Kammervolumen. Die *dilatative Hypertrophie* entsteht durch Dehnung der Herzmuskelzellen, dabei werden die neugebildeten Sarkomere nicht parallel, sondern in Reihe angeordnet – ein größeres Kammervolumen ist die Folge. Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Kontraktilität. Zu einer Dilatation kommt es z.B. auf Grund eines vermehrten Blutvolumens (beispielsweise bedingt durch eine Klappeninsuffizienz und das damit verbundene Pendelvolumen) oder auch bei Verlust von Herzmuskelzellen durch Nekrose oder Apoptose.



Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hypertrophieprozesse: initial kommt es zu einer Dickenzunahme „hypertrophic remodelin“, anschließend, bei längerem Bestehen des mechanischen Stress, durch Nekrose/Apoptose zu einer Dilatation. Aus Wakatsuki, 2004, the biochemical response of the heart to hypertension and exercise.

Dabei wird das Wachstum vom Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Wandstress auf der einen Seite, sowie inhibierenden Faktoren reguliert. Zwei wichtige hypertrophiefördernde Faktoren sind zweifellos die Stimulation α -adrenerger Rezeptoren sowie die Wirkung von Angiotensin II [14] [15]

Weitere gesicherte Daten über wachstumsfördernde Mechanismen sind bei folgenden Punkten bekannt:

1. Mechanischer Wandstress [16] [17]
2. Zytokine, bekanntermaßen IGF-1 und -2 [18], TNF- α [19] Fibroblasten-Growth-Faktor [20]

G-Protein-gekoppelte Signalwegskaskaden:

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgt die Signal-Übertragung nach

Aktivierung durch den entsprechenden Liganden über die so genannten G-Proteine; darunter versteht man eine Reihe von Guanin-Nucleotid-bindenden Proteinen, die z.B. aktivierend oder hemmend auf die Adenylatcyclase wirken (G_s , G_i), bzw. Einfluss auf die Proteinkinase C haben (G_q).

Über G-Proteine wirken:

- α_{1A} -Adrenozeptor [14]
- β_1 -Adrenozeptor [21]
- β_2 -Adrenozeptor [22]
- Calcitonin
- Angiotensin II [15]
- Endothelin [23]
- Neuropeptid-Y [24]
- Parathormon [25]

Zu einer vermehrten Proteinsynthese, führt dabei die Stimulation von α -Rezeptoren (G_q) (über die Aktivierung der Proteinkinase C), der PI 3-Kinase und p70, sowie die Stimulation von β_1 -Rezeptoren über die Aktivierung der Adenylatcyclase (G_s) [26], [27], [21]

Interessanterweise führt die kombinierte Stimulation von α -Adrenozeptoren und β -Rezeptoren zu einer geringeren Hypertrophieentwicklung, als die isolierte Stimulation von α -Rezeptoren. Dieser Effekt ist auf eine gegenseitige Hemmung der Signalkaskaden zurückzuführen: die Aktivierung der β -Rezeptoren führt zu einer cAMP-abhängige Inhibition der Proteinkinase C und gleichzeitig führt die Aktivierung der α -Rezeptoren (über G_i und PKC) zu einer Inhibition der Adenylatcyclase [26]. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, wie ein Auslöser (in diesem Fall Noradrenalin) einen Prozess (Hypertrophieentwicklung) aktiviert, und gleichzeitig begrenzt. Bestehen nun allerdings sehr lange hohe Spiegel an Katecholaminen, wie es bei einer manifesten Herzinsuffizienz der Fall ist, kommt es zur so genannten *downregulation* der β -Rezeptoren [27]; damit wird gleichzeitig die Hemmung der Proteinkinase C aufgehoben – es überwiegen also die hypertrophiefördernden Signalkaskaden. Genau an diesem Punkt setzt eine inzwischen etablierte Therapieoption ein – der Einsatz von β -Blockern. Sie verhindern die Downregulation und senken gleichzeitig die Herzfrequenz, was sich natürlich positiv auf den Sauerstoffbedarf der Herzmuskelzellen auswirkt.

Die COPERNICUS-Studie konnte eine Mortalitätssenkung um 35% nachweisen.

3. Kokain [28], Metamphetamine [29]

Insuffizienz und Kompensationsmechanismen

Die Definition der Herzinsuffizienz erfolgte bereits in obigen Abschnitt, im Nachstehenden möchte ich auf die Kompensationsmechanismen eingehen: Das verminderte Herzzeitvolumen führt zu einer Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens und damit auch zu einem herabgesetzten Glomerulumfiltrat. Die nun im Folgenden aktivierten neurohumoralen Kompensationsmechanismen sind initial durchaus hilfreich, allerdings kommt es bei längerem Bestehen der pathologischen hämodynamischen Situation zu einer Verschlechterung der Herzleistung und zu Etablierung eines Circulus vitiosus, den es zu unterbrechen gilt. Die gesteigerte Natrium- und Wasserretention sowie die einsetzende Vasokonstriktion führt zu einer inadäquaten Erhöhung von Vor- und Nachlast, die über kurz oder lang in einer Dekompensation mündet.

Die Aktivierung des sympathischen Systems (Katecholaminausschüttung) spielt dabei eine zentrale Rolle. Initial kommt es zu einer Steigerung der Kontraktilität und Herzfrequenz, im weiteren Verlauf allerdings bedeutet dies eine Prognoseverschlechterung. Es setzt eine downregulation der kardialen Betarezeptoren ein, der positiv-inotrope Effekt der Katecholamine nimmt zusehends ab, während gleichzeitig der Arteriolentonus steigt – die Folge ist eine Erhöhung des peripheren Widerstands (Afterloads).

Des Weiteren erfolgt die Ausschüttung von Vasopressin (ADH), was zu einer verstärkten Salz- und Wasserretention führt. Die Ursache liegt in der durch die Herzinsuffizienz bedingte Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens.

Renin-Angiotensin-AldosteronSystem:

Mittlerweile ist der Einsatz von ACE-Hemmern, bzw. AT-Rezeptorantagonisten bei der Therapie der Herzinsuffizienz fest etabliert. Sie greifen dabei in das so genannte RAAS ein, ein komplexes Netzwerk von Hormonen und Enzymen, dessen Aufgabe in der Regulation des Blutdrucks, aber auch in s.g. Remodelingprozessen des Myokards z.B. nach einem Infarkt, besteht. Schon Mitte der 80-er Jahre wurden entsprechende Studien durchgeführt, die die Zusammenhänge cardialer Ischämien

und einer Renin-Plasma-Aktivität darlegen. Dabei führt eine myokardiale Ischämie zu einer verstärkten renalen Ausschüttung von Renin; so beschreibt z.B. Ertl. et al einen verminderten Anstieg der Plasma-Renin-Aktivität bei nephrektomierten Hunden, denen künstlich eine myokardiale Ischämie gesetzt wurde[30].

Des Weiteren konnte durch die Arbeitsgruppe um Pfeffer er al der protektive Effekt von ACE-Hemmern bezüglich einer linksventrikulären Hypertrophieentwicklung nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von Captopril bei Ratten, die unter einer spontan aufgetretenen Form der arteriellen Hypertonie litten, konnte eine cardiale Hypertrophieentwicklung erfolgreich verhindert werden [31].

Angiotensin II entsteht durch eine zweimalige enzymatische Spaltung aus Angiotensinogen, welches in der Leber synthetisiert wird. Zunächst erfolgt unter Einfluss von Renin die Umwandlung in Angiotensin I, anschließend erfolgt die Bildung von Angiotensin II durch den Einfluss des *Angiotensin-converting-enzyme* (ACE).

AT II wirkt auf zweierlei Weise: es führt zu einer Blutdrucksteigerung, durch Vasokonstriktion und sorgt für eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron seinerseits bewirkt bekanntermaßen durch eine verstärkte Natrium- und Wasserretention ebenfalls eine Erhöhung der Vorlast. Ausgangspunkt dieser Kaskade stellt Renin dar: es wird bei Hypovolämie, Natriummangel und eben auch bei einer verminderten Nierendurchblutung (wie es ja bei einer Herzinsuffizienz der Fall ist) aus den Juxtaglomerulären Zellen der Niere ausgeschüttet. Nachfolgendes Schaubild verdeutlicht noch einmal die Zusammenhänge.

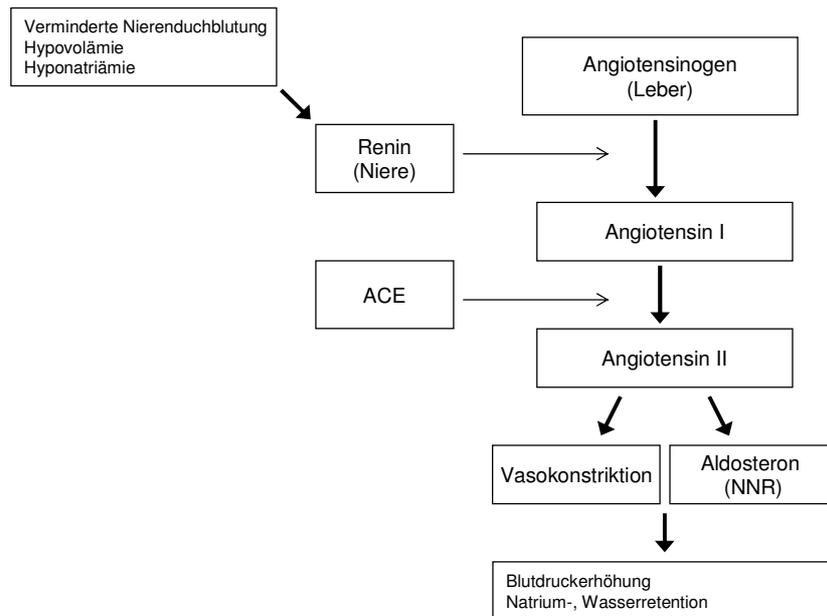


Abbildung 2 Zusammenhänge des RAA-Systems

Eine mögliche Alternative zu ACE-Hemmern stellen AT_2 -Rezeptorantagonisten, z.B. bei ACE-Hemmer-Unverträglichkeit, dar. Durch die CHARM-Studie 2003 - konnte eine Senkung der Mortalität um 9% bei manifester Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [32]. Besonders langwirksame Sartane scheinen dabei günstig zu sein – sie konnten effektiv durch Angiotensin II hervorgerufene Kontraktionen isolierter Blutgefäße unterbinden.

1.3. Signalwege in der kardialen Hypertrophie:

Nach der Darstellung einiger hypertrophiefördernder Mechanismen, soll nun im Folgenden das Augenmerk auf die intrazellulären Signalwegskaskaden gelenkt werden. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von molekularbiologischen Mechanismen entdeckt und beschrieben, die in einem regelrechten Netzwerk interagieren und keinesfalls isoliert zu betrachten sind.

Es folgt eine kurze Übersichtsdarstellung der Wichtigsten.

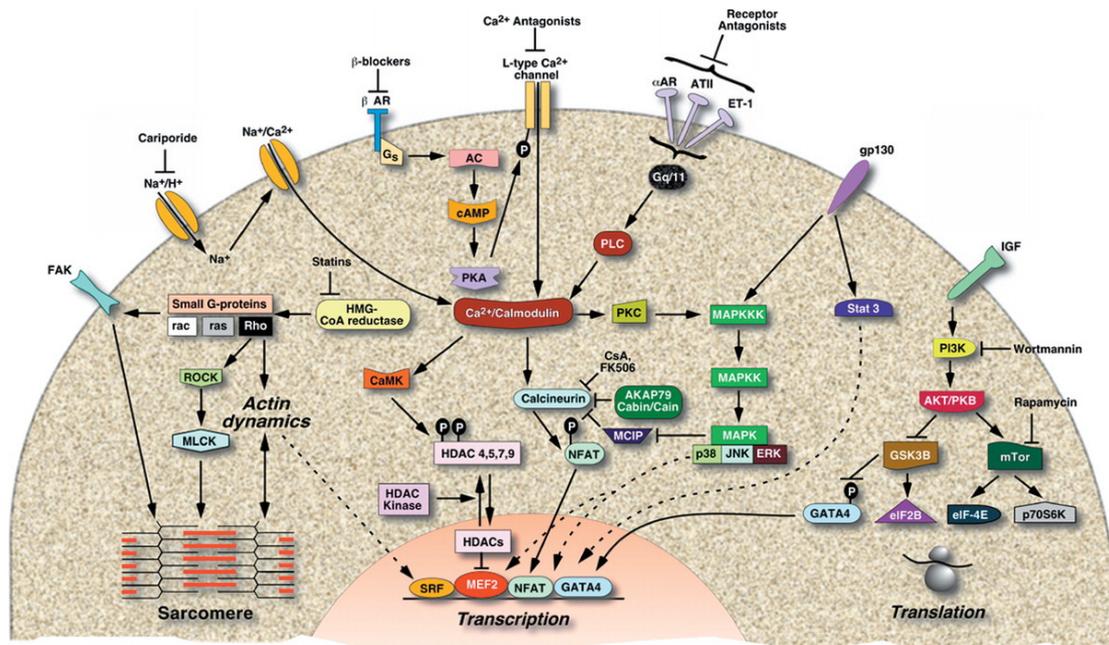


Abbildung 3 Übersicht wichtiger Signalwegskaskaden aus „Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly“, *Annu Rev Physiol.*, 2003. **65**: p. 45-79.

Der Calcineurin-NFAT-Signalweg

Die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin, bestehend aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit verbindet sich bei erhöhter intrazellulärer Kalziumionenkonzentration mit Calmodulin. Sie wird dadurch aktiviert. Im weiteren Verlauf dephosphoryliert Calcineurin wichtige Transkriptionsfaktoren, (insbesondere vom Typ NFAT). Diese wiederum wandern in den Zellkern und aktivieren bestimmte Gene

Eine wichtige Bedeutung kommt diesem Enzym in humanen T-Zellen zu. Dort kommt es nach oben beschriebener Kaskade zu einer vermehrten Produktion von Interleukin 2 [33]. Auch in Kardiomyozyten konnte dieser Signalweg nachgewiesen werden, bei transgenen Mäusen führte die Aktivierung von Calcineurin zu einer massiven Dilatation der Herzen und infolge dessen zu einem Herzversagen [34].

Der PI3-Kinase/Akt/GSK-3-abhängige Signalweg

Phosphoinositol 3-Kinasen zählen zu eine Familie von Enzymen, die sowohl Protein-, als auch Lipid-Kinase-Aktivität besitzen und mit vielen Signaltransduktionsprozessen verbunden sind. Aktiviert werden sie durch verschiedene Rezeptoren mit einer Thyrosin-Kinase-Aktivität, wie z.B. IGF-1 aber auch durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren, wie α - [35] und β_2 -Adrenozeptoren [36] [37]. Ihre Funktion umfasst

Zellwachstum, -Überleben und -Proliferation [38]. Sie sind ebenfalls an der druckinduzierten Hypertrophieentwicklung in Mäuseherzen beteiligt, wie Prasad et al. zeigen konnte [39].

Eines der wichtigsten Ziele der PI3-Kinase ist Akt, eine Serin-Threonin-Kinase, (auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet), diese wiederum beeinflusst eine Vielzahl weiterer Überträgermoleküle, zwei wichtige nachgeschaltete sind GSK-3 und mTor, („mammalian target of rapamycin“). In Skelettmuskulatur ruft die Aktivierung von Akt ebenfalls eine Hypertrophieentwicklung hervor, wie Bodine et al. belegen konnte [40]. Akt ist dabei durch die Isoformen (α , β , γ) aktivierbar – allerdings regulieren die PI3-K- α und β (ihrerseits insbesondere aktiviert durch Wachstumsfaktor-Stimuli) eine kompensatorische Hypertrophie, während die Aktivierung der γ -Form (aktiv als Folge der adrenergen Stimulation) zu Maladaptation führt [41].

Rapamycin zählt zu den Immunsuppressiva und bildet zusammen mit mTor und seinem intrazellulären Rezeptor FKBP12 einen Komplex. mTor ist eine ubiquitär vorkommende Serin-Threonin-Kinase, deren Aufgabe auch im Bereich der Proteintranslation liegt [42].

Eine weitere Möglichkeit, ist die Aktivierung von GSK-3 β , ebenfalls eine Serin-Threonin-Kinase. Diese phosphoryliert Proteine im N-terminalen Bereich, insbesondere vom NFAT-Typ [43]. Dadurch wird die Migration in den Zellkern unterbunden und somit Transkriptionsprozesse gestoppt. Gleichzeitig ist die Proteinkinase B auch in der Lage GSK-3 β durch eine Phosphorylierung zu inhibieren, so dass (durch Aufhebung der Hemmung) die Transkriptionsvorgänge wieder überwiegen, und damit auch die nachfolgende Proteinsynthese. Es gibt Hinweise, dass diese Prozesse ebenfalls an einer Hypertrophieentwicklung beteiligt sind [44].

Regulationsmechanismen durch den Transkriptionsfaktor MEF2/HDAC

Es ist bekannt, dass viele verschiedene, zum Teil kalzium-abhängige Faktoren, wie Calcineurin, MAP-Kinasen und die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMK in der Lage sind eine kardiale Hypertrophieentwicklung zu bewirken. Auf Grund dessen ist es sehr wahrscheinlich, dass bei vielen unterschiedlichen Signalwegskaskaden eine gemeinsame Endstrecke vorliegt. Der Transkriptionsfaktor MEF2 scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. [45] Obwohl MEF2 reichlich

exprimiert wird, ist die Basalaktivität des Transkriptionsfaktors recht gering, erst nach Stimulation steigt die Aktivität [46]. Diese wird dabei durch die Kopplung (Assoziation) an Histon-Deazetylasen (HDAC) kontrolliert. HDACs deacetylieren Histon-Proteine und bewirken dadurch eine verstärkte Kondensation der DNA, sodass Transkriptionsprozesse vermindert stattfinden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass hypertrophiefördernde Stimuli, wie eine vermehrte Druckbelastung zu einer Aktivierung bestimmter Kinasen führt, und diese wiederum Einfluss auf die Aktivität und Funktion von HDACs und MEF2 haben [47].

G-Protein-vermittelte Signalwege:

Auf die G-Protein-vermittelten Signalwege wurde bereits eingegangen, vgl. Abschnitt *Hypertrophie*

Kleine GTP-bindende Proteine:

Die Familie der kleinen g-bindenden Proteine stellt eine Gruppe an Molekülen dar, die sich in Molekulargewicht (alle umfassen ein Gewicht von ca. 21 kDa) und Funktion ähneln. Sie steuern Zellwachstum- und Teilung, die Organisation des Zytoskeletts, sowie die zelluläre Motilität, und besitzen die Eigenschaft einer GTPase, d.h. sie werden durch die Bindung von GTP aktiviert, hydrolysieren GTP zu GDP und kehren dadurch wieder in ihren Ruhezustand zurück. Zu jener Familie zählen „Rho, Ras, ARFs, Rab, Ran“, jeweils mit noch weiteren Subformen [48]. Hunter et al konnte 1995 die Bedeutung von *ras* im hypertrophierten Myokard klären. Bei transgenen Mäusen kam es zu einem deutlicher Anstieg von *ras*, wie auch der Herzmasse [49]. Auch die kleinen G-Proteine sind in einem Netzwerk mit anderen Signalwegskaskaden gebunden, insbesondere *raf*, PI3K, *Ral-GDS/rac* und MAP-Kinasen.

MAP-Kinasen:

Die Signalwegskaskaden über die so genannten MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase) stellen durch die Phosphorylierung und Regulation von Transkriptionsfaktoren ein wichtiges Bindeglied zwischen externen Reizen und den Prozessen im Zellkern dar. Sie werden ihrerseits durch aktivierte Rezeptoren oder Wachstumsfaktoren (EGF1) aktiviert. Es folgt eine Reihe von Phosphorylierungen

durch vorgeschaltete Kinasen, wobei am Ende die Migration in den Zellkern und dort die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steht.

Die Signaltransduktionswege, die mittels mitogen-aktivierten Proteinkinasen erfolgen sind evolutionsbiologisch betrachtet ein sehr altes Signaltransduktionssystem. Sie sind schon in einfachen Lebensformen wie Hefen nachweisbar; es ist demnach nicht verwunderlich, dass elementare Prozesse wie zelluläre Proliferation und Differenzierung, Überleben oder der programmierten Zelltod in den Aufgabenbereich der MAP-Kinasen fällt.

Die Familie der MAP-Kinasen gliedert sich dabei in drei Hauptgruppen: ERKs (extracellularly responsive kinases), JNKs (c-Jun N-terminal kinases), und p38-MAP-Kinasen; die beiden letzt genannten, werden dabei nicht nur durch anabole Reize (wie EGF, PDGF (platelet derived growth factor) oder FGF (fibroblast growth factor)) aktiviert, sondern auch durch Stressfaktoren wie Ischämie oder Azidose [50]. Unter Stressfaktoren im weiteren Sinne versteht man auch Hitze einwirkung, oxidativer Stress, UV-Strahlung, DNA schädigende Chemikalien (alkylierende Agenzien), mechanischer Stress, inflammatorische Zytokine [51] [52] Außerdem haben auch vasoaktive Peptide wie Endothelin und Angiotensin II [53] einen starken aktivierenden Effekt auf JNK/SAPK [51] [54] [55].

Die Rolle der ERK-Map-Kinasen bei der Hypertrophieentwicklung ist noch nicht hinreichend geklärt, allerdings gibt es Hinweise dafür, dass ERK Einfluss auf physiologische Wachstumsprozesse hat [56].

Erwähnenswert ist hierbei noch die Rolle von p38: Liang et al. zeigte, dass die Überexpression der p-38 aktivierenden Kinase [mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) MKK3 oder MKK6) zu einem vorgeburtlichen Tod der transgenen Tiere führte – ihre Herzen zeigten keine signifikante Hypertrophie, allerdings eine deutliche interstitielle Fibrosierung. (Demnach ist also nicht nur die Hypertrophie ein Marker einer Kardiomyopathie.) [57]

Protein-Kinase-C-vermittelte Signalwege

Protein-Kinase-C (PKC) ist eine ubiquitär vorkommende Serin-Threonin-Kinase. Sie wird insbesondere durch Gq-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Die Beteiligung dieser Proteinkinase an der Entwicklung einer Herzhypertrophie konnte bereits in einigen Studien belegt werden [58] [59]

Bowman konnte über dem hinaus zeigen, dass eine Überexpression der PKC in transgenen Ratten zu einer Hypertrophieentwicklung des Herzens, sowie zum plötzlichen Herztod führt [60].

Gp130/STAT3-Signalwege

Der Gp130-Rezeptor ist ein Rezeptor für eine Vielzahl von Liganden, so z.B. für die Zytokine Interleukin 6 und 11, wie auch Kardiotrophin-1 (CT-1). CT-1 löst in Herzmuskelzellen eine Hypertrophieentwicklung aus, zumindest in vitro, wie Pennica et al. Belegen konnte [61]. Auch hier spielt Angiotensin II wieder eine wichtige Rolle: es induziert die up-regulation von Interleukin 6 und CT-1 [62].

Der Gp-130-Rezeptor wirkt über die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwegkaskade, wie auch über STAT [63]. Insbesondere STAT3 wandert nach der Aktivierung durch den Gp130- Rezeptor in den Zellkern und ruft dort eine verstärkte Expression der Gene hervor, deren Produkte an der Hypertrophieentwicklung beteiligt sind [64].

Auch weitere Studien belegen die Bedeutung von STAT, so z.B. konnte Kunisada et al. nachweisen, dass eine Überexpression von Gp10 in transgenen Mäusen zu einer Hypertrophieentwicklung in vitro und in vivo führt [65],[66].

MMP und TNF-Beteiligung

Die Matrixmetalloproteinasen (MMP) zählen zu einer Familie von Enzymen, die extrazelluläre Prozesse regulieren. Sie werden insbesondere nach einem Myokardinfarkt verstärkt exprimiert und spielen eine bedeutende Rolle bei den so genannten Remodelingprozessen, bei denen auch die extrazelluläre Matrix verändert wird. Möglicherweise sind sie auch bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt [67]. Es konnte in mehreren tierexperimentellen Studien zumindest gezeigt werden, dass sich eine medikamentöse Hemmung der MMPs günstig auf den Verlauf auswirkt [68],[69, 70]

Zusammenfassung:

Worin liegen die Unterschiede zwischen den physiologischen und pathologischen Signalwegskaskaden?

Natürlich sind die Vorgänge nicht isoliert voneinander zu betrachten, da wie oben schon angedeutet ein ganzes Netzwerk aktiv ist und einige Mechanismen additiv

wirken. Dennoch sollen hier noch einmal die wichtigsten Signalwegskaskaden aufgeschlüsselt dargestellt werden.

Am Anfang der physiologischen Hypertrophie-Entwicklung steht ein (intermittierender) Dehnungsreiz (episodic mechanical stress), wie es z.B. im Rahmen eines Trainings vorkommt oder die Aktivierung über IGF (Insulin growth factor) [71]. Über FAK oder Melusin kommt es dann im weiteren Verlauf zur Aktivierung der Phosphoinositol 3-Kinase, bzw. einer Subform – die p110 α -Isoform. Die PI3- α stellt bei den physiologischen Entwicklungsprozessen das Schlüsselenzym dar; es deaktiviert die GSK3 β (Glycogen-synthase-kinase) über Akt und initiiert damit eine Hypertrophieentwicklung, die mit einer gesteigerten Kontraktilität einhergeht, ohne Apoptosemechanismen zu aktivieren. (Vgl. a) Dieser Signalweg wurde von McMullen [72] beschrieben. Interessanterweise ist GSK3 β normalerweise aktiv und schützt vor pathologischen Prozessen: die physiologischen Auslöser verschieben das Gleichgewicht zu Gunsten der deaktivierten Form.

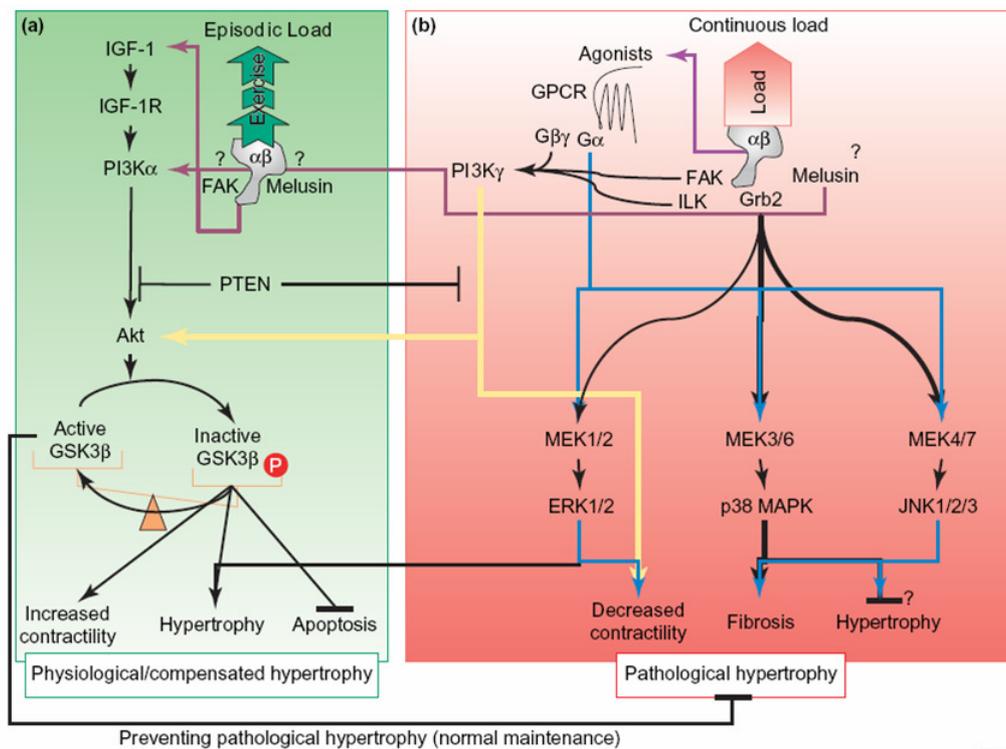
Der IGF-1–PI3K α –Akt – Signalweg gilt als physiologische Kaskade, dennoch kann eine Überexpression von IGF-1 oder Akt „pathologische Folgen“ nach sich ziehen: Matusi et al. zeigte, welche phänotypische Bandbreite eine Überexpression von Akt haben kann – sie reicht von Hypertrophie mit eingeschränkter systolischer Funktion bis hin zur Dilatation und Tod [73].

Bei den pathologischen “remodelling”-Prozessen hingegen liegt eine dauerhafte Belastung oder die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vor. Dazu zählen, wie in Punkt 1.2 (G-Protein-gekoppelte Signalwegskaskaden) schon dargestellt insbesondere Angiotensin II, Endothelin-1 und Katecholamine. Die Untereinheit der G-Protein-Rezeptoren G α_q aktiviert die nachgeschalteten Kinasen ERK1/2, p38-MAPK und JNK (via den MAP-Kinase-Kinasen MEK1/2, MEK3/6 und MEK4/7). Die p38 MAPK wird dabei für den Prozess der Fibrosierung verantwortlich gemacht, wobei JNK die Fibrosierung und Hypertrophieentwicklung induziert. Interessanterweise gibt es auch Arbeiten, die p38 einen gewissen hemmenden Einfluss bezüglich der Hypertrophie zusprechen [74] [75] Dieser Effekt ist abhängig von der jeweiligen Isoform α oder β .

Des Weiteren ist hier die γ -Isoform (bei den physiologischen Prozessen im Gegensatz dazu die α -Isoform) der PI3-Kinase aktiv. Sie kann sowohl durch FAK, als auch durch die „integrin-linked-kinase (ILK) aktiviert werden [76]. Als Antwort auf die β -adrenergen Über-Stimulation kommt es nicht nur zu einer verminderten

Kontraktilität [77], sondern auch zu einer maladaptiven Hypertrophieentwicklung und Herz-Insuffizienz [78].

Der dauerhafte mechanische Wandstress, ausgelöst z.B. durch eine Aortenstenose, veranlasst FAK (Fokaler Adhäsions Komplex) sein adaptor-protein Grb2 zu binden und die MAP-Kinasen ERK1/2, p38 MAPK and JNK zu aktivieren, wobei die Aktivierung von ERK1/2 geringer ausfällt [79] [80] [74].



T/BS

Abbildung 4 die wesentlichen Kaskaden und Aktivierungen. Aus Wakatsuki, 2004, the biochemical response of the heart to hypertension and exercise.

1.4. Rolle der Integrine und der Extrazellulären Matrix

Integrin-vermittelte Signalwege und die Rolle des mechanischen Wandstress:

Während man in den letzten Jahren sehr genau die Wachstumsfaktor-assoziierten intrazellulären Signalwegskaskaden erforscht hat, weiß man über die Zusammenhänge und Mechanismen mechanischer Reize in Kardiomyozyten, sowie deren Signaltransduktion ausgesprochen wenig. Als mögliche „Dehnungs-Reiz-

Sensoren“ wurden sowohl mechanosensitive Ionenkanäle postuliert, als auch Oberflächen-Adhäsions-Moleküle, sprich Integrine.

Die „remodelling-Prozesse“, die das Herz als Reaktion auf einen Dehnungsreiz oder einer dauerhaften Drucküberbelastung erfährt, sind Folge des Interagierens mechanischer und biochemischer Signale. Die Zusammenhänge konnte Tarone et al. [81] darlegen, die Signalübertragung erfolgt dabei über Integrine – Proteine, die eine Transmembranverbindung zwischen extrazellulärer Matrix und dem Zytoskelett darstellen. Lange Zeit galten diese als rein strukturvermittelnde Elemente, deren Funktion es sei, Zellen in der ECM zu verankern. In den letzten Jahren allerdings konnte der Funktionsbereich und die Bedeutung dieser Moleküle deutlich erweitert werden. So zählt zu den zentralen Aufgaben der Integrine mechanische Reize in Signale umzuwandeln, in deren Folge adaptiven Mechanismen der Zellen stehen („outside-in-signaling“). Jedoch erstreckt sich ihr Aufgabenbereich noch weiter: die Regulation des Zellzyklus, Apoptose [82], Tumorstadium bzw. Angiogenese [83], aber auch Modulation des ECM, via „inside-out-signaling“ [84],[85],[86], sowie die Interaktion mit MMP (Matrix-Metallo-Proteinase) [87] [88], Regulation der Genexpression, Zellproliferation und Differenzierung, sowie Zellmigration zählen dazu [89].

Inside-out-signaling: dabei kommt es zu Konformationsänderungen der Integrine als Antwort auf intrazelluläre Signale, sodass eine verstärkte Interaktion mit Liganden der ECM erfolgt [90] [91].

Extrazelluläre Matrix:

Unter der ECM versteht man ein dreidimensionales Netzwerk, welches die ansässigen Zellen, sowohl Kardiomyozyten, als auch Fibrozyten, umgibt und verankert. Es besteht aus einer Reihe von verschiedenen Komponenten, die zum Teil strukturmittelnd sind, wie Kollagen und Elastin, aber auch Adhäsions-Proteine wie Laminin, Fibronectin Typ IV und Typ VI-Kollagen. Weitere Bestandteile sind Tenascin, Thrombospondin oder Osteopontin, sowie Proteoglycane [92] [93]. Diese Proteine werden zum Grossteil, aber nicht ausschließlich durch kardiale Fibroblasten produziert, dazu zählen Kollagen Typ I und III, Fibronectin und Metalloproteinasen. Typ IV and VI-Kollagen, Laminin und Proteoglykane werden von Myozyten gebildet. Die Funktion der ECM geht weit über eine reine Skelett-Funktion hinaus – Umbauvorgänge und Veränderungen, wie die einsetzende Fibrosierung im Rahmen

einer pathologischen Hypertrophieentwicklung gehen mit deutlichen Funktionseinschränkungen und der Manifestation der Herzinsuffizienz einher [6] [7], Insbesondere die Expression von Kollagen, Fibronektin, Vitronektin, Osteopontin und Tenascin ist beschrieben [8] [9] [94-97]. vgl. dazu 1.2.

Integrine:

Aufbau und Funktion:

Integrine stellen eine komplexe Familie an heterodimeren Transmembranproteinen dar, die in einer nicht-kovalenten Bindung miteinander verknüpft sind. Sie bestehen aus jeweils einer α - und β -Untereinheit, in der Größe zwischen 120-180 kDa (α), bzw. 90-110 kDa bei den β -Untereinheiten. Die Integrin-Proteine bestehen aus einem großen extrazellulären Teil, zwischen 700-1000 Aminosäuren, einem transmembranen Abschnitt und einer kleinen intrazellulären Einheit, bestehend aus c.a. 20-60 Aminosäuren [98]. (Eine Ausnahme stellt dabei allerdings $\beta 4$ dar – die cytoplasmatische Seite ist c.a. 1000 Aminosäuren groß).

Die N-terminale Seite des Proteins befindet sich auf der extrazellulären Seite, auf der zytoplasmatischen Seiten entsprechend die C-terminale. Die Liganden, die gebunden werden, zeigen, neben anderen Motiven, insbesondere eine so genannte RGD-Sequenz auf, ein Muster aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Aspartat. Fibronektin, Vitronektin und eine Reihe anderer Adhäsionsmoleküle weisen diese Sequenz auf. Die Funktion als Adhäsionsmolekül erfüllen die Integrine durch ihre Bindung der cytoplasmatischen Domäne via Talin und Vinculin an Actin; eine weitere Möglichkeit besteht in dem Paxillin - Integrin-linked-Kinase - Parvin-Komplex.

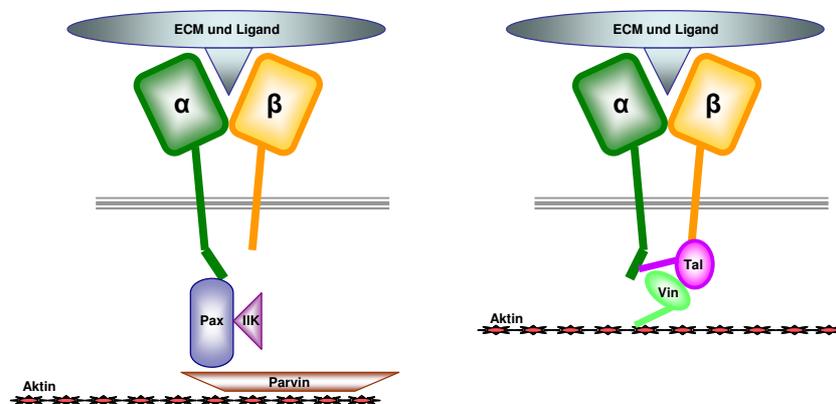


Abbildung 5

Schematische und vereinfachte Darstellung einer Integrin-Actin-Verbindung: links: via Paxillin und Parvin, rechts: via Talin und Vinculin. Die separate Darstellung, auch in Bezug auf Abbildung 6, dient

der besseren Übersicht – normalerweise interagieren die Faktoren miteinander. ILK: Integrin-linked-Kinase, Pax: Paxillin, ECM: Extrazelluläre Matrix, Vin: Vinculin, Tal: Talin,

Da Integrine keine eigene enzymatische Aktivität zeigen, müssen sie um ihre Funktion als Signalüberträger zu erfüllen nachgeschaltete Moleküle regulieren. Insbesondere FAK, Melusin, Src, p130Cas, kleine GTPasen wie Rho, Rac, die zu einer Aktivierung, von AKT/GSK3 und ERK1/2, [99-102] führen. Die Zusammenhänge wurden zum Teil in 1.3 dargestellt.

FAK (fokaler Adhäsionskomplex):

Eines der wichtigsten und am besten untersuchten nachgeschalteten Proteine stellt die fokale Adhäsions-Kinase Fak dar [103] [104] [105]. Sie ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase und mit der β -Untereinheit der Integrinrezeptoren verbunden.

Die Aktivierung der Integrinrezeptoren durch Bindung extrazellulärer Liganden führt im weiteren Verlauf zur Bildung des s.g. fokalen Adhäsionskomplexes FAK, bestehend aus Extrazellulärmatrixproteinen, Integrinen und Proteinen des Zytoskeletts. Zunächst kommt es zu einer Ausrichtung der intrazellulären Aktinfilamente in die s.g. stress-fiber-Formation. Über einen positiven Feedbackmechanismus kommt es im Weiteren zu einer verstärkten Bindung an die ECM. Angestoßen wird der Prozess durch Phosphorylierungs- und Autophosphorylierungs-Prozesse der Tyrosinkinase Fak (an Position Tyr397).

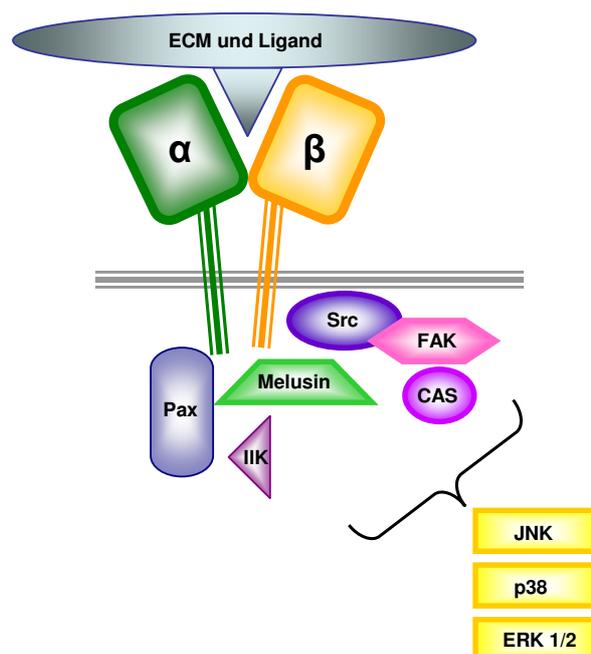


Abbildung 6 vereinfachte Darstellung der Signalfunktion von Integrinen:

FAK and Melusin regulieren beide die Phosphorylierung von AKT/GSK3 und ERK1/2 Diese Signalwegskaskaden sind bekanntermaßen an Hypertrophieprozessen beteiligt. Fak: Fokale Adhäsions-Kinase, Src: Src-Kinase

Gleichzeitig entsteht eine Bindungsstelle für Src. Src, ebenfalls eine Kinase, verstärkt die FAK-Aktivierung ihrerseits durch weitere Phosphorylierung an Tyr925 [106]. Diese nun hoch aktive Stelle ist in der Lage die PI3-Kinase zu aktivieren. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung MAP-Kinasen, vorrangig ERK, allerdings auch JNK und p38. Wie zuvor schon dargestellt werden die eher pathologischen Entwicklungen über diese MAP-Kinasen reguliert [107] [108].

Kombinationen und Formen:

Integrine stellen eine direkte Verbindung zwischen der ECM und zytoskelettalen Strukturen dar, dabei sind sie beides: Adhäsionsmoleküle, die Zellen verankern und Signalüberträger [109] [90]. Sie werden von allen Zelltypen exprimiert und dabei können die Zellen eine ganze Bandbreite an unterschiedlichen „Integrin-Rezeptoren“ bilden, so ist es ihnen möglich mit vielen extrazellulären Matrix-Bestandteilen zu interagieren.

Wie schon zuvor beschrieben bestehen Integrine aus zwei Untereinheiten: α und β , diese „subunits“ sind bei Vertebraten äußerst heterogen (18 α und 8 β -Formen [100]), so wurden aus Kombinationen der verschiedenen Isoformen, beim Menschen mehr als 24 verschiedene Heterodimere nachgewiesen [109], diese Vielgestaltigkeit ermöglicht es Zellen spezifische Bindungen zu ECM-Proteinen aufzunehmen, dazu zählen Fibronectin, Collagen, Laminin, Vascular-Cell-Adhesion-Molecule-1 (VCAM-1), Intercellular-Adhesion-Molecule-1 (ICAM-1), Vitronectin, Tenascin, Osteopontin; aber auch die Plasmabestandteil Thrombin und Fibrinogen, sowie der von-Willebrand-Factor. Obwohl, determiniert durch die α -Untereinheit, bei jedem Integrinrezeptor eine Bindungsspezifität vorliegt, binden viele Integrin-Rezeptoren die gleichen Liganden, gleichzeitig kann ein Ligand von unterschiedlichen Integrinrezeptoren gebunden werden [100] [110] [111].

Die Konfiguration, wann eine Zelle welche Integrin-Subtypen aufweist, kann auch durch Aktivierung anderer Rezeptoren reguliert werden: so zeigen sich in Folge dessen ein höherer Aktivierungszustand oder Affinität der Zellen [112]. Insbesondere das Zusammenwirken von Integrinen und Wachstumsfaktoren ist dabei eingehend untersucht worden [113].

Etablierter Einsatz einer suffizienten Hemmung von Integrinen findet sich in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen: als zusätzliche Gerinnungshemmer nach durchgeführten kardiovaskulären Eingriffen (PTCA), bzw. nach Stent-Implantation. Die verwendeten Wirkstoffe Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid sind $\alpha_2\beta_3$ (Glykoprotein IIb/IIIa) –Inhibitoren. Insbesondere Tirofiban (Integrelin) findet dabei breite Anwendung als zusätzliche Thrombozytenaggregationshemmer.

Auch für die embryonale Entwicklung des Herzens, sind die Interaktionen zwischen Kardiomyozyten und der ECM von elementarer Bedeutung. Humane fetale Kardiomyozyten benötigen für ihre Proliferation die Anwesenheit von β_1 -Integrinen; insbesondere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ [114], wie Studien an humanen fetalen ventrikulären Kardiomyozyten (in Zellkulturen) belegen konnten.

Versuche an β_1 -Integrin-Knock-out-Tieren verliefen letal für die Embryonen [115, 116]; ebenfalls von Interesse ist der zeitliche Verlauf, wann welche Form an Integrinen exprimiert wird – daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Liganden der ECM, mit welchen die Integrine interagieren, ziehen [117, 118].

Weitere tierexperimentelle Studien an β_1 -Knock-out-Mäusen, konnten zeigen zu welcher Funktionseinschränkung des Herzens bis hin zu Insuffizienz, eine Verminderung der β_1 -Integrinexpression führt [119], es zeigte sich im Alter von sechs Monaten eine myokardiale Fibrosierung, sowie die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie.

Integrin-Expression im Myokard:

Im Herzkreislaufsystem werden Integrine von Gefäßwandzellen, Thrombozyten, Kardiomyozyten und weiteren herzansässigen Zellen gebildet.

Kardiomyozyten exprimieren vorrangig folgende Subformen: α_1 , α_3 , α_5 , α_7 , α_9 , α_{10} , β_1 , β_3 , β_5 , [89]. Dabei sind einige Formen nur abschnittsweise in der embryonalen Entwicklung aktiv – so z.B. $\alpha_1\beta_1$, welches postnatal „runter reguliert“ wird. Diese Integrinkombinationen sind für die Bindung der Kardiomyozyten an Kollagen Type I, III, und IV, Laminin, und Fibronectin nötig, adulte Myozyten hingegen, die vorrangig $\alpha_3\beta_1$ exprimieren sind nur in der Lage Laminin and Typ-IV-Kollagen, sowie in geringem Umfang auch andere Kollagentypen und Fibronectin zu binden [120, 121]. Zwei Drittel der kardialen Zellpopulation sind Fibroblasten, diese spielen wie oben schon beschrieben bei dem Prozess der Fibrosierung im Rahmen von Remodeling-

Prozessen eine Schlüsselrolle und bilden vorrangig $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_1$, diese binden in erster Linie Fibronectin, nachgewiesenermaßen eines der Proteine, welches im Rahmen einer Hypertrophieentwicklung vermehrt exprimiert wird [122].

Während Myozyten hypertrophieren, steigt bei Fibroblasten ihre Gesamtzahl und die Menge der von ihnen produzierten ECM [89]. Carver, Hsueh und MacKenna untersuchten in ihren Studien das Verhalten von Fibroblasten unter Einwirkung von mechanischem Stress und konnten Integrine als Signalträger ermitteln [123-125].

Durch weitere Untersuchungen konnte genauer aufgeklärt werden, welche Subformen der α -Integrine von Kardiomyozyten oder Fibroblasten exprimiert werden und welche nicht. Beispielsweise produzieren Fibroblasten keine α_6 und α_7 – Formen; Kardiomyozyten nicht die Formen α_2 und α_8 [120] [126] [127].

Unter den Isoformen der β -Integrine wird β_1 im Herzen bevorzugt exprimiert; wobei β_1 wieder eine weitere Unterteilung in verschiedene Subgruppen zulässt: β_1A und β_1D spielen dabei eine zentrale Rolle. Bei Mäusen wird während der embryonalen Entwicklung zunächst β_1A exprimiert – später überwiegt die β_1D .

β_1D wird daneben auch in großen Umfang von der Skelettmuskulatur exprimiert; insbesondere unter Druckbelastung wird β_1D hochreguliert, wie Babbitt et al. zeigen konnte [110].

Des Weiteren werden unter hämodynamischen Stress viele embryonale Gene wieder aktiviert, wie Ross et al. 2001 zeigen konnte [100].

Die Rolle von α_V , β_1 und β_3

Kuppuswamy et al. konnte die Rolle des β_3 -Integrin-Subtyps bei Rechtsherzbelastung und die Bedeutung von FAK und Src am Katzenmodell ermitteln: dabei wurde eine pulmonalarterielle Hypertonie durch ein „Banding“ der Pulmonalarterie erzeugt (chronische PAH), bzw. durch einen partiellen Verschluss der Pulmonalarterie durch einen transvenösen Ballonkatheter (akute PAH).

Es zeigte sich eine Komplexbildung aus FAK, Src und β_3 -Integrin nach frühestens 4 Stunden mit einem Maximum innerhalb von 48 Stunden und eine Normalisierung nach einer Woche [128]. Weitere Versuche mit isolierten Kardiomyozyten zeigten auf, dass es nach einer Stimulation von β_3 mittels eines Arg-Gly-Asp-Peptides, ebenfalls zu einer Aktivierung von c-SRC (zytoplasmatisch) und im weiteren Verlauf zu einer Phosphorylierung von FAK (an der Position Tyr925) und damit Aktivierung,

kommt [129]. Das interessante an beide Studien ist, dass einmal ein mechanischer Reiz, (Druckbelastung des rechten Ventrikels durch Einengung der Pulmonalarterie) und bei der zweiten Studie ein biochemischer Reiz gesetzt wurde – beide Wege führten zu einer Aktivierung der FAK-Src-Kaskade.

Bei Untersuchungen an infarzierten Rattenherzen wurde die Isoform $\beta 3$ in erster Linie bei glatten Gefäß-Muskelzellen der Perinfarktzone nachgewiesen [130], gleichzeitig konnte eine verstärkte Genexpression der $\beta 1$ und $\beta 3$ -Gene nachgewiesen werden. Diese verstärkte Aktivierung läuft dabei parallel zu den vorbeschriebenen Änderungen der ECM (vermehrte Expression von Kollagen, Fibronectin, Osteopontin) ab. Die Synchronität der Entwicklung ist dabei nicht zufällig, es ist durchaus möglich, dass die verstärkte Expression von $\beta 3$ -Integrin im Rahmen der Remodeling-Prozesse und der damit verbundenen Änderungen der Extrazellulären Matrix zu sehen ist; immerhin dienen die Strukturen der ECM als Liganden für die Integrine. Vitronectin und Osteopontin beispielsweise, beides Liganden von $\beta 3$ und $\beta 5$, finden sich bei druckbelasteten insuffizienten Herzen in verstärktem Maße [122, 131, 132].

Der entscheidende Partner der Formen $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 5$ stellt dabei αV dar. Osteopontin beispielsweise interagiert bevorzugt mit den Kombinationen $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ [133]. Zhonglin Xie et al. untersuchte die Rolle von Osteopontin und die verstärkte Expression dieses Proteins an OPN-KO-Mäusen nach einem Myokardinfarkt, als Initiator cardialer Remodeling-Prozesse. Des Weiteren wurde, wie auch in unserer Studie, das Aortic-Banding-Modell verwendet. Nach einem Zeitraum von 40 Tagen kam es zu einem deutlichem Anstieg der Osteopontinexpression.

1.5. Aufgabenstellung

Die zentrale Frage unserer Arbeit war, in wie weit eine in-vivo-Hemmung von αV und assoziierten Integrinen (in erster Linie $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$) Einfluss auf eine cardiale Hypertrophieentwicklung hat. Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich in erster Linie auf in vitro-Daten von $\beta 1$ und $\beta 3$.

Eine gezielte Inhibierung war durch den Einsatz des αV -Integrin-Inhibitors EMD 270179 der Fa. Merck möglich.

Wir untersuchten dabei den Einfluss auf die Hypertrophieentwicklung, Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, morphologische Veränderungen, Pumpleistung, sowie auf die Sterblichkeitsrate. Die Frage, die es dabei also zu beantworten galt, war demnach folgende:

Führt die Hemmung der Integrin- α V-Rezeptoren durch Einsatz eines spezifischen Inhibitors zu einer verminderten Hypertrophieentwicklung, nach mechanisch induzierter Drucküberbelastung?

Wir verwendeten das Model der druckinduzierten Myokardhypertrophie via Aortenkonstriktion an Mäusen. Vorarbeiten mit diesem Model konnten zeigen, dass innerhalb von 48h bis 1 Woche eine Hypertrophieentwicklung einsetzt [134].

Tiermodel:

Zur Erforschung von Pathomechanismen bei der Entstehung von Krankheiten oder aber auch zur Erforschung neuer Therapieoptionen bzw. Medikamente stehen der Forschung unterschiedlichste Methoden zur Verfügung.

Darunter fallen insbesondere Studien an lebenden Tieren, wie auch Zellkulturen. Beide Methoden zeigen eine Reihe an Vor- und Nachteilen. Allerdings stößt die isolierte Betrachtung reiner Zellkulturen oft an ihre Grenzen, insbesondere wenn es gilt erhobenen Daten und Thesen auf einen lebenden Organismus zu übertragen. Dies macht den Einsatz von Tieren oft unvermeidlich. Vor allem bei „Systemischen Erkrankungen“ wie z.B. einer arteriellen Hypertonie reicht die Betrachtung isolierter Zellen nicht aus.

Wir verwendeten zur Erforschung cardialer Hypertrophiemechanismen das Modell der Aortenkonstriktion an Mäusen. Die druckinduzierte Myokardhypertrophie via Aortenkonstriktion, ist nicht nur international etabliert, auch durch eigene Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe lies sich die Hypertrophieentwicklung nach Aortenkonstriktion, mit Zunahme des Herzgewichts auf 40-60% in Relation zum Körpergewicht, belegen. Es wurden 12 Wochen alte Tiere verwendet um eventuell auftretende wachstumsbedingte Effekte auszuschließen.

2. Materialien

2.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungen

0,9%-NaCl-Lösung	(Fresenius, Bad Homburg)
20% SDS (20g/100ml H₂O)	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Acrylamid 40%	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.
Aluminiumkaliumsulfat	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
APS	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Avertin	(Tribromoethanol) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
Bis-Solution	(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)
BSA	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Chloralhydrat	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Diethylether	(Riedel-de-Haën®, Seelze, Germany)
DMSO (Methylsulfoxid)	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
DTT (Dithiotreitol)	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
EDTA	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Entellan®	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Eosin	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Esel Normalserum	(Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.)
Ethanol	(Hausapotheke der Universitätsklinik Würzburg)
Forene® Isofluran 0,6%	(Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.)
Formalin	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Glycine	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Hämatoxylin	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany)
KCl	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

KH₂PO₄	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Methanol	(Hausapotheke der Universitätsklinik Würzburg)
Na₂HPO₄	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
NaCl	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
NaN₃	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Natriumjodat	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Parafin	
Paraformaldehyd	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Pikrinsäure	
Roti®-Histol	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany)
SDS	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Sirius Red	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Sodiumazide (NaN₃)	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
TEMED	(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)
Tert-Amyl Alkohol	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
Trisma® Base	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Trisma® HCl	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Triton-X 100	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Tween-20	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
Zitronensäure	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

2.2. Allgemeine Geräte

Cutfix® Surgical Disposable Scalpel	(AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany)
DIM 11, DIM 22,	
ddH₂O Wasserfilter	
Deckgläschen	
Eppendorf Röhrchen 1,5 ml, 2 ml,	(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
Heizplatte BBA 1,	(Grant Boekel, Cambridgeshire, G.B.)
Mini Eppendorf Cups 0,5 ml,	(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Objektträger Superfrost®-Plus₁	(Erie Scientific Company, Portsmouth, U.S.A.)
Objektträgerständer	
pH Messgerät inoLab pH Level 1, Pico Fuge	(WTW, Weilheim, Germany)
Pinzetten	
Pipetten Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl,	(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl,	(Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany)
Vortex	
Waage Kern 440-33,	(Gottl. KERN & Sohn GmbH, Albstadt, Germany)
Zentrifuge Universal 32 R,	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)
Zentrifugenröhrchen 2 ml,	(Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

2.3. Transversales Aortic-Banding

Beheizte Arbeitsplatte (37 °C konstant)	(Föhr Medical Instruments, Seeheim, Germany)
Kugelkopfschere BC030R	(AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany)
Rodent Ventilator 7025,	(Ugo Basile, Comerio VA, Italy)
Operationsmikroskop (Vergrößerung 20x),	(Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany)
Perma Hand Seide 6-0 (0,7 metric), schwarz, geflochten, nicht resorbierbar,	(Ethicon, Cornelia, U.S.A.)
Nadeln Sterican® 27 G,	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

2.4. Herzechokardiographie

2.4.1. Chemikalien und Reagenzien

Avertinlösung (400 ml)

Avertin	10 g
Tert-Amylalkohol	12,5 ml
Auffüllen mit ddH ₂ O auf 400 ml	

2.4.2. Geräte und sonstige Materialien

Wärmekissen

Ultraschallgerät Toshiba Power Vision 6000 SSA-370 A, (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, Netherlands)

Linearschallkopf 15 MHz

TOSeBase NICE – Software mit DICOM™ Standard, (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, Netherlands)

Spritze

2.5. Hämodynamik und Morphologie

Aria™1, Pressure-Volume Conductance System,	(Millar® Instruments, Inc., Houston, U.S.A.)
Beheizte Arbeitsplatte (37 °C konstant),	(Föhr Medical Instruments, Seeheim, Germany)
Chart™ and Scope™ software,	(ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, U.S.A.)
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD,	(Schott Glas, Mainz, Germany)
Mantis® Stereo Optical Inspection System (Vergrößerung 2x-10x),	(Vision Engineering, Emmering, Germany)
Millar® 1,4 F Katheter,	(Millar® Instruments, Inc., Houston, U.S.A.)
PowerLab/4SP data acquisition system,	(ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, U.S.A.)

Rodent Ventilator 7025,	(Ugo Basile, Comerio VA, Italy)
SPR-839 P-V Catheter 1,4 F,	(Millar® Instruments, Inc., Houston, U.S.A.)
Ultra-miniature Single Pressure Sensor	(Millar® Instruments, Inc., Houston, U.S.A.)
Intravascular Mikro-Tip Pressure	
Catheter SPR-835 (671) 1,4 F,	

2.6. Proteinanalyse

2.6.1. Allgemeine Lösungen

20% SDS

SDS	20 g
dest. H ₂ O	100 ml

2% Tris-Triton-Lysis-Puffer

Triton-X 100	2 ml
10 mM EGTA	380 mg
NaVO ₃	200 µl
Tris-HCl (100 mM)	1.21 g
H ₂ O auf 100 ml	_____
auffüllen	
	100 ml

pH 7,4 Aufbewahrung bei 4°C

2% SDS-Sample-Puffer

dest. H ₂ O	19 ml
Glycerol	12 ml
20% SDS	4 ml
Tris/EDTA	5 ml
DTT	617 mg

Total	40 ml

Aufbewahrung bei -20°C

Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, U.S.A.)

Fertiglösung zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

ECL-Reagenz ChemiGlow™ West, (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, U.S.A.)

2.6.2. Protease- und Phosphatase- Inhibitoren:

EGTA (10mM) (Sigma Aldrich, Steinheim):

Metalloproteasen-Inhibitor, Ca-spezifisch
als Lösung in destilliertem Wasser
pH > 10, Aufbewahrung bei -20°C

EDTA (Sigma Aldrich, Steinheim):

Metalloproteasen-Inhibitor, unspezifisch
als Lösung in destilliertem Wasser
pH > 10, Aufbewahrung bei -20°C

NaVO₃ Sodium-Vanadate (1000x) (Sigma Aldrich, Steinheim):

Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor
als Lösung in destilliertem Wasser
Aufbewahrung bei -20°C

Ocadaic Acid (sodium salt, Calbiochem)

Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor
als Lösung in DMSO, Aufbewahrung bei -20°C

Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Set II (Calbiochem)

Aufbewahrung bei -20°C

Protease-Inhibitor-Cocktail Set III (Calbiochem)

Aufbewahrung bei -20°C

2.6.3. Western-Blot - Chemikalien und Lösungen

10x TBST

Tris-Base 12,1g

NaCl 58.4g

Tween-20 15 ml

Mit dest. H₂O auf 1 Liter auffüllen

pH 7,5

Gebrauchslösung in einer Verdünnung von 1:10 (100ml 10xTBST in 900 ml H₂O)

0,5 M Tris

Trisma®-Base 60,5 g

mit dest. H₂O auf 1 Liter auffüllen

pH 6,8

1,5 M Tris

Trisma®-Base 181,6 g

mit dest. H₂O auf 1 Liter auffüllen

pH 8,6

10% APS

APS 1,0 g

dest. H₂O 10 ml

Größenstandard

High-Marker: Rainbow RPN 800
Amersham, mit 2xSDS 1:1 verdünnt,
Gesamtvolumen: 15µl Bandenmuster
bei 250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25,
15, 10 kDa
Aufbewahrung bei -20°C

Low-Marker: Magic Mark Invitrogen
Gesamtvolumen 2µl
Bandenmuster bei 120, 100, 80, 60, 50,
40, 30, 20 kDa
Aufbewahrung bei -20°C

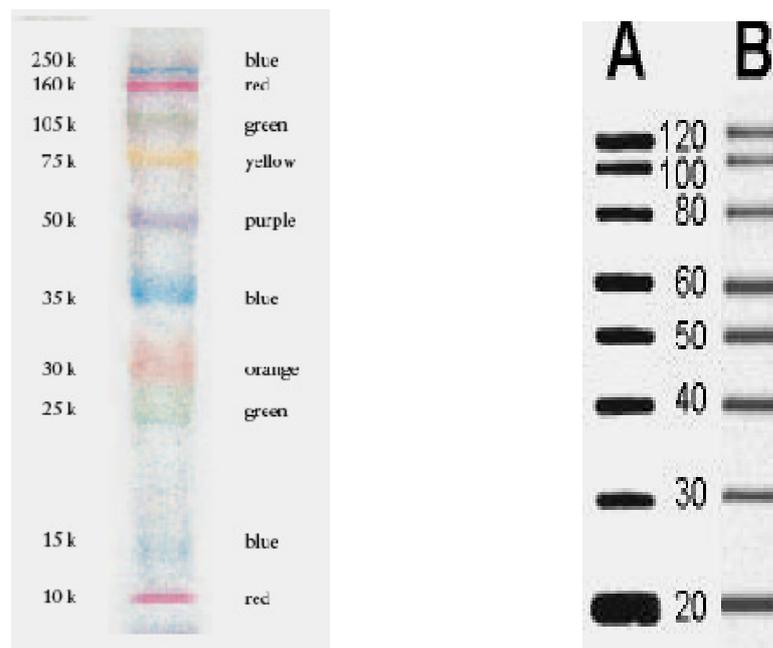


Abbildung 7 verwendeter High-marker, durch die Verwendung zweier Marker lassen sich detektierte Proteine ihrer Größe nach besser zuordnen.

Bei Verwendung von selbst-erstellten 7,5% Gelen

Running-Buffer

Tris-Base	24 g
Glycerin	116 g
20% SDS	20 ml
Mit dest. H ₂ O auf 4 Liter auffüllen	

Transfer-Puffer

Tris-Base	12 g
Glycerin	58 g
Methanol	800 ml
Mit dest. H ₂ O auf 4 Liter auffüllen	

Western-Blot-Gel, 7.5%

dest. H ₂ O	16 ml
1,5 M Tris	11,3 ml
20% SDS	280 µl
40% Acrylamid (Biorad)	10,5 ml
2% Bis-Solution (Biorad)	4,1 ml
Temed (Biorad)	14 µl
APS 10%	315 µl
Total	42 ml

Sammelgel, 4%

Dest. H ₂ O	9 ml
0,5 M Tris	1,75 ml
20% SDS	90 µl
40% Acrylamid (Biorad)	1,8 ml
2% Bis-Solution (Biorad)	1,05 ml
Temed (Biorad)	14 µl
APS 10%	210 µl
Total	14 ml

Bei der Verwendung der XCell *SureLock* Elektrophoresis Cell™ (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

NuPage-Running-Buffer (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

NuPage-Transfer-Buffer (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

Nu-Page 4-12% Bis-Tris Gel (10-12 well) (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

2.6.4. Geräte

Chemi-Imager™ 5500	(Alpha Innotech Corporation, San
chemiluminescence imaging system,	Leandro, U.S.A.)
Dounce Kolben,	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
	Germany)
Einmalküvetten REF 67.742,	(Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany)
Einschweisgerät	
Elektrophoresis Power Supply EPS	(Amersham Biosciences UK Limited,
301, EPS 601,	Buckinghamshire, England)
Hofer Elektrophoresis Unit SE 600,	(Amersham Biosciences UK Limited,
	Buckinghamshire, England)
Insulinspritzen Omnifix®-F 1ml,	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
	Germany)
Laborrührwerk Eurostar digital,	(IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen,
	Germany)
Nadeln Sterican® 20G,	(B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
	Germany)
PVDF-Membranen	
Schwenktische	
Semiphor Transphor Unit,	(Amersham Biosciences UK Limited,
	Buckinghamshire, England)
Sonopuls Homogenisator HD 70,	(Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin,
	Germany)
Spectrophotometer Ultrospec 3000,	(Amersham Biosciences UK Limited,
	Buckinghamshire, England)
XCell II™ Blot Module,	(Invitrogen® Corporation., Carlsbad,
	U.S.A.)

2.7. Immunhistologie:

2.7.1. Chemikalien und Lösungen

10x PBS

KCl	2,0g
KH ₂ PO ₄	2,0g
NaCl	80,0g
Na ₂ HPO ₄	11.5g

Mit dest. H₂O auf ein Liter auffüllen und bei Raumtemperatur aufbewahren.

Bei einer Verdünnung von 1:10 (1xPBS), pH auf 7,4 einstellen, Aufbewahrung bei 4 °C

2% PFA-Lösung

Paraformaldehyd	10g
dest. H ₂ O	450ml
10x PBS	50ml
Total	500ml

Unter Rühren bei 60 °C so lange erwärmen, bis die Lösung klar ist. Nach dem Abkühlen pH auf 7,4 einstellen

Aufbewahrung bei 4 °C

TBS

NaCl	150 mM
Tris-HCl	20 mM
NaN ₃	0,05%

pH 7,6

Aufbewahrung bei 4 °C

0,1% Triton-Lösung

TBS	150ml
-----	-------

Triton-X-100 150µl

Bei Raumtemperatur so lange rühren, bis Triton-X-100 in Lösung gegangen ist.

1% TBSA-Lösung

TBS 10ml

BSA 0,1g

Aufbewahrung bei 4 °C

10%-Donkey-Serum (100µl pro Schnitt)

TBSA 100µl

Donkey-Serum 10µl

Aufbewahrung bei 4 °C

2.7.2. Geräte und Verbrauchsstoffe

Argon Laser 161C-030, (Spectra-Physics, Mountain View, U.S.A.)

Luftgekühlt, Output 488 nm,

Confocal Microscope C1, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)

Helium-Neon Laser 1674P, Output (JDS Uniphase, San Jose, U.S.A.)

543 nm,

Kryotom CM 1850, (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)

Microtome Blades C35, (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)

Mikroskop Nikon Eclipse ME 600, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)

Objektiv Plan Apo 60xa 1.40 Oil (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)

DIC H,

PAP Pen, (Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)

Prolong Antifade Kit, (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.)

Software EZ C1, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)

Tissue-Tec, (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands)

2.8. Antikörper

2.8.1. Primärantikörper

FAK mouse anti-FAK, monoklonal Antibody (IgG1),
BD Transduction Laboratories (BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

Verwendete Konzentration 1:1000

FAK-P-925 Rabbit polyclonal Anti.FAK [pY⁹²⁵] Phosphospecific antibody,
unconjugated (BioSource Europe, Nivelles, Belgien)

Aufbewahrung bei -80 °C

Verwendete Konzentration 1:500

SRC mouse anti-SRC, monoclonal antibody (Upstate cell signaling solutions U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

Verwendete Konzentration 1:1000

SRC-P416 mouse Anti-SRC [pY⁴¹⁶] monoclonal phosphospecific antibody,
(Calbiochem®)

Aufbewahrung bei -20 °C

Verwendete Konzentration 1:500

GAP-DH Mouse Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
monoclonal Antibody, (CHEMICON International, Inc., Temecula, U.S.A.)

Aufbewahrung bei 4 °C

Verwendete Konzentration 1:8000

Inkubationszeit eine Stunde bei Raumtemperatur

Integrin-β-1 Mouse IgG₁ Anti-b1-Integrin antibody (BD Transduction Laboratories™,
Kentucky, U.S.A.) Verdünnung 1:2500; -20 °C

ERK 1/2 Rabbit (polyclonal) Anti-ERK1&2 pan Antibody, Unconjugated (BioSource

Europe, Nivelles, Belgien)

Aufbewahrung bei -80 °C

Verwendete Konzentration 1:8000

ERK ½-P Rabbit (polyclonal) Anti-ERK1&2 [pTpY185/187] Phosphospecific Antibody, Unconjugated (BioSource Europe, Nivelles, Belgien)

Aufbewahrung bei -80 °C

Verwendete Konzentration 1:1000

p-38 mouse monoclonal IgG1 Anti-p-38 (A-12): sc-7972, (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)

Aufbewahrung bei 4 °C

Verwendete Konzentration 1:500

p-38-P Rabbit (polyclonal) Anti-p38 [pTpY180/182 Phosphospecific Antibody, Unconjugated (BioSource Europe, Nivelles, Belgien)

Aufbewahrung bei -80 °C

Verwendete Konzentration 1:1000

Sekundärantikörper

Donkey Anti-Mouse IgG HRP

Donkey Anti-Rabbit IgG HRP

(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.), Verdünnung 1:1000

2.8.2. Antikörper für die Immunhistologie

2.8.2.1. Primärantikörper

FAK: Rabbit (polyclonal) Anti-Mouse FAK, (Biosource, Camarillo, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

p-FAK 925: Affinity purified rabbit polyclonal antibody p-FAK (Tyr 925), (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)

Aufbewahrung bei 4 °C

c-Src: Affinity purified rabbit polyclonal antibody c-Src (SRC 2), (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)

Aufbewahrung bei 4 °C

p-Src 418: Rabbit (polyclonal) Anti-Src [pY⁴¹⁸] Phosphospecific Antibody Unconjugated, (Biosource, Camarillo, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

FN: Mouse Anti-Fibronectin monoclonal Antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, U.S.A.)

Aufbewahrung bei 2-8 °C

2.8.2.2. Konjugierte Antikörper

Integrin β 1: Armenian hamster monoclonal IgG Integrin β 1 (HM \square 1-1) FITC, (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei 4 °C

2.8.2.3. Sekundärantikörper

Anti Rabbit IgG: CyTM2- conjugated AffiniPure F(ab¹)₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C

Anti Mouse IgG: CyTM2- conjugated AffiniPure F(ab¹)₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C

2.8.2.4. Weitere Farbstoffe

Phalloidin: Alexa Flour 546 phalloidin, (Molecular Probes, Eugene, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C, zur Anfärbung des Aktins

Farbstoff CyTM2:

Absorptionsmaximum: 492 nm; Emmisionsmaximum: 510 nm; Emissionsfarbe: grün

Farbstoff Alexa Fluor 546:

Absorptionsmaximum: 556 nm; Emmisionsmaximum: 573 nm; Emissionsfarbe: orange

2.9. Histologie**2.9.1. Chemikalien****Eosin**

Eosin 1g

ddH₂ 100 ml

Lichtgeschützte

Aufbewahrung bei RT

Hämalaun nach Mayer

Hämatoxylin 6 g

Natriumjodat 1 g

Aluminiumkaliumsulfat 250 g

Chloralhydrat 250 g

Zitronensäure 5 g

Auffüllen auf 5 l mit ddH₂O

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei RT

Pikro-Sirius-Red (nach Puchtler)

Pikrinsäure 90ml

Sirius Rot 10 ml

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei RT

2.9.2. Geräte

3CCD Color Video Camera (Sony Corporation, Japan)

Camera Adaptor CMA-D2 (Sony Corporation, Japan)

Gewebeeinbettautomat	(Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Germany)
Microtome Blades S22	(Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)
Mikroskop Laborlux S (Vergrößerung 10x) mit Objektiv Plan 1,6 (<u>Gesamtvergrößerung 16x</u>)	(Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)
Schlittenmikrotom Hn 40	(Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)
SigmaScan Pro Image Analysis Version 2.0	(Jandel Scientific, San Rafael, U.S.A.)
Trockenschrank	(Temp. 70 °C konstant, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany)

2.10. Versuchstiere

Für die Versuchsreihen wurden C57/Black 6 Mäuse verwendet, mit einem Gewicht zwischen 22–25 g und in einem Alter von mind. 12 Wochen, um wachstumsbedingte Einflüsse zu vermeiden.

2.11. alpha.v-Integrininhibitor, ALZA-Pumpen

Der alpha.v-Integrininhibitor wurde von der Firma Merck, (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese Substanz stammt ursprünglich aus der Krebsforschung und kommt als Angiogenese-Hemmer insb. bei der Therapie des Glioblastoms oder Pankreas-Ca zum Einsatz. Dabei wird die Entwicklung neuer Blutgefäße, die den Tumor versorgen sollen unterbunden. Der zugrunde liegende molekularbiologische Mechanismus stellt die Hemmung der Funktion des alphaV-Integrins, durch Blockade der Liganden- bindung am Rezeptor dar. Somit werden die Interaktionen der Endothelzellen mit der ECM unterbunden.

Neben Endothelzellen sind auch Kardiomyozyten mit α_V -Integrinen ausgestattet; dort spielen sie eine wichtige Rolle bei der Hypertropieentwicklung.

Wie bedeutend dieser Aktivierungsweg der Zellen zur Hypertrophieentwicklung wirklich ist, sollte in dieser Versuchsreihe durch eine suffiziente Inhibition dargelegt werden.

Eine elegante und etablierte Methode ist dabei der Einsatz von ALZET- Pumpen (Fa. Alza, Palo Alto, USA). Dies sind osmotische Mini-Pumpen, die subkutan implantiert werden und kontinuierlich Substrat (Inhibitor oder eine Kontroll-Lösung) freisetzen.

Funktionsweise:

Die Pumpen bestehen aus vier Hauptkomponenten:

- einem Reservoir,
- einer osmotischen Brücke,
- einer semipermeablen Membran und
- einem Flussmoderator.

Das Substrat-Reservoir ist ein zylindrischer Hohlraum, in welchen der Inhibitor, bzw. die Kontrolllösung gefüllt wird. Es folgt eine undurchlässige, aber elastische Reservoir-Wand, die verhindert, dass es zu einem Flüssigkeitsaustausch kommt. Anschließend eine osmotische Brücke und schließlich eine durchlässige Semipermeable Membran.

In dem Substrat-Reservoir befindet sich eine hohe Konzentration an NaCl-Ionen, so dass es, nachdem die Pumpe implantiert wurde zu einem osmotischen Gefälle kommt. Das einströmende Gewebe-Wasser kann allerdings die Reservoir-Wand nicht durchdringen; es folgt ein Druckanstieg, welcher für die Substratfreisetzung verantwortlich ist. Die Freisetzungsrate ist somit abhängig von der Durchlässigkeit der semipermeablen Membran, sowie dem osmotischen Gradienten zwischen Reservoir und Gewebe.

Nach dem Befüllen der Pumpe, was unter sterilen Bedingungen zu erfolgen hat, um mögliche Infektionen der Tiere zu vermeiden, wird der Flussmoderator, dabei handelt es sich um eine Hohlraumnadel, im Reservoir versenkt und die Pumpe damit verschlossen.

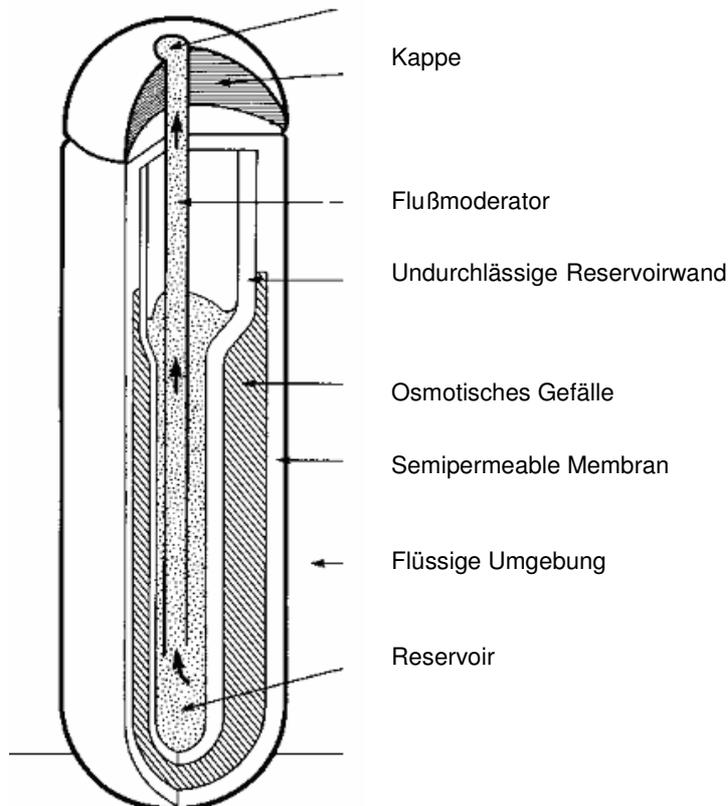


Abbildung 8 Schematischer Aufbau einer osmotischen Minipumpe

2.12. Herzechokardiographie

Zur Erhebung der Daten bezüglich Herzkontraktion und -physiologie wurde ein Ultraschallgerät mit einer Frequenz von 15 MHz verwendet die Bewegungsabläufe aufgezeichnet. Auch diese Methode ist seit einiger Zeit in der Forschung etabliert [135]. Insgesamt wurden für diese Arbeit 32 Tiere aus allen Gruppen echokardiographisch untersucht.

Dazu werden die Tiere zuvor rasiert und mit Pentobarbital betäubt. Zur Erfassung der Kontraktionsvorgänge am Herzen in bewegten Bildern verwendet man den B-Mode, während man für die Darstellung des Querschnittes mit Wanddicke und Herzvolumen den M-Mode gebraucht. Beide Modi werden sowohl in AP- (ante-posterior) als auch in PA- (papillär) Aufnahme durchgeführt.

Zur Erhebung der Daten wurde ein spezielles Programm der Firma Toshiba verwendet und folgende Parameter aus ausgesuchten Standbildern ermittelt, jeweils in Systole und Diastole: Fläche, Umfang, Wanddicke von Septum und freier Wand, sowie Durchmesser (Diameter) im linken Ventrikel. Des Weiteren ließen sich

Ejektionsfraktion EF des Herzens in Prozent sowie die FS berechnen In einem weiteren Schritt wurden diese Rohdaten mittels Stat-View statistisch verarbeitet.

3. Methoden

3.1. Zeitpunkte und Versuchsgruppen

Die Versuchsreihe erfolgte am Modell der linksventrikulären Hypertrophieinduktion durch transversale Aortenkonstriktion an der Maus, („aortic-banding“).

Den so genannten Aortic-banding-Tieren wird dabei die Aorta derart verengt, dass ein Druckgradienten (δP) von > 30 mmHg erreicht wird. Aus der erhöhten Druckbelastung wiederum, resultiert innerhalb von zwei bis sieben Tagen die linksventrikuläre Hypertrophieentwicklung.

Um die Auswirkungen einer Integrin-Inhibition zu dokumentieren, war es notwendig Kontroll-Gruppen einzuführen, so dass folgende Gruppen zustande kamen:

AB (2d, 7d)

- Control-DMSO
- Control-Inhibitor
- AB-DMSO
- AB-Inhibitor

Da die frühen Signalwege von besonderem Interesse waren, betrug die Untersuchungs-Zeitpunkte jeweils zwei und sieben Tage;
Pro Gruppe wurden jeweils mind. 3 Tiere untersucht.

3.2. ALZET-Pumpen

Eine elegante Methode, um konstante Plasma-Spiegel (von 2-6 μmol) zu erreichen, ist die Verwendung von osmotisch wirksamen Minipumpen. Diese wurden mit dem Inhibitor, sowie auch mit der Control-DMSO-Lösung gefüllt, und zwei Tage vor der Aortenkonstriktion subcutan implantiert.

Der α_v -Integrininhibitor wurde dabei in 0,9% NaCl-Lösung und mit der maximal löslichen Konzentration von 100 mg/ml, zur Erzielung suffizienter Plasmaspiegel (1-10 μmol) verabreicht.

Der Einsatz dieser Pumpen stellte dabei die optimale Lösung zur Stressminimierung der Versuchstiere dar, um mögliche Einflüsse auf die zu untersuchenden Signalwege

zu vermeiden. Gleichzeitig konnte damit eine kontinuierliche Substrat-Freisetzung in kontrollierter Dosis gewährleistet werden.

Vorgang der Implantation:

Die Versuchstiere werden unter Verwendung von Pentobarbital betäubt und rasiert. Anschließend erfolgt die Bildung einer subkutanen Tasche, vorzugsweise interskapulär. Die Pumpe wird implantiert und der erforderliche Schnitt mit einer Klammernat verschlossen. Die Implantation erfolgt unter möglichst sterilen Bedingungen um eventuellen Infektionen vorzubäugen.

Zur Funktionsweise der Pumpen siehe 2.11

3.3. Transversales Aortic-Banding

Da die Fragestellung unserer Untersuchungsreihe die Auswirkungen einer Inhibition integrinvermittelter Signalwege bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie war, benötigten wir nach der Implantation der osmotischen Minipumpen eine Methode, um eben diese zu erzeugen.

Ein etabliertes Verfahren hierfür ist die Aortenkonstriktion. [136]

Die künstliche Einengung der Aorta stellt ein Hindernis der Ausstrombahn dar und es kommt zu einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels. Dies wird durch eine hochgradige linksventrikuläre konzentrische Hypertrophie, die sich innerhalb von zwei bis sieben Tagen entwickelt, zu kompensieren versucht. Dabei kommt es zu einer Zunahme des Herzgewichtes von 40 – 60% bezogen auf das Körpergewicht der Versuchstiere.

Durchführung:

Zwei Tage nach der Implantation der Pumpen wurde den Mäusen ein Aortic-Banding gesetzt. Dabei wird die Aorta im Bereich der *Aorta transversalis* mittels einer Ligatur eingeeengt, so dass ein Druckgradient, vor und hinter der Einengung, von mind. 30 mmHg entsteht.

Zunächst werden die Tiere mit Ether betäubt und anschließend mit Isofluran in eine Intubations-Narkose versetzt. Durch die nur gering ausgeprägte kardiodepressive Wirkung, eignet sich Isofluran besonders gut dafür.

Nun eröffnet man mittels einer Kugelkopfschere den Thorax im Bereich des Sternums und sucht Aorta transversalis auf. Sowohl die Aorta als auch eine 27 G Nadel, die an das Gefäß angelegt wird, werden mit einem nicht resorbierbaren Faden

umschlagen. Der Faden wird verknotet und die Nadel wieder entfernt; sie dient als Größenstandard, so dass jede Ligatur gleich weit ist.

Als Kontrollgruppe dienten Tiere, bei denen nur eine Scheinoperation, aber keine Aortenkonstriktion erfolgte, sowie eine Pumpenimplantation.

3.4. Organentnahme und Gewebepräparation

Direkt anschließend an die hämodynamische Untersuchung erfolgt die Organentnahme. Die Tiere werden im narkotisierten Zustand gewogen und mittels Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Thorax wird das noch schlagende Herz entnommen und sofort in eiskalter NaCl-Lösung gewaschen. Dabei ist genaues und schnelles Arbeiten notwendig, um ein Fortschreiten biochemischer Prozesse zu unterbinden.

Den gewaschenen Herzen werden die Vorhöfe, sowie die Herzohren entfernt und das verbleibende Gewebe anschließend gewogen.

Aus dem mittleren Drittel werden transversal ein bis zwei Ringe geschnitten, die für die Histologie bzw. Immunhistologie verwendet werden. Für die Histologie wird der Ring in 20% Formalinlösung aufbewahrt; Das Gewebe für die Immunhistologie wird in Eppendorf-Cups bei -80 °C gelagert. Zuvor wird der Ring in Isopentanlösung auf Trockeneis schockgefroren.

Das für die Proteinanalyse bestimmte Gewebe wird ebenfalls in Eppendorf-Cups gegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Weiterverarbeitung, wird es bei -80 °C aufbewahrt.

Des weiteren wird den Mäusen die Lunge entnommen und gewogen. Das Gewicht der Lunge ist hinweisend auf ein mögliches Lungenödem, welches sich auf dem Boden einer Herzinsuffizienz entwickeln kann.

Ein weiterer Parameter zur Hypertrophiebestimmung war die Tibialänge; sie ist ein Maß für den Entwicklungsstand des Tieres.

Es wurden also Mausgewicht, Herzgewicht, Gewicht der Lunge und die Tibialänge in Relation gesetzt, um das Ausmaß der Herzhypertrophie zu ermitteln.

3.4.1. Gewebepräparation:

Um das Gewebe einer Western-Blot-Analyse zugänglich zu machen, war zuvor die die Verarbeitung zu einer SDS-haltigen Probe notwendig.

Dazu berechnet man in einem ersten Schritt die Menge an Puffer, die benötigt wird; pro 100 mg Gewebe, werden 2,5 ml Tris-Triton-Lysis-Puffer veranschlagt, (siehe 2.6.1).

Dem Puffer werden nun die Inhibitoren (Ocadaic Acid, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Set II, Protease-Inhibitor-Cocktail Set III und EDTA) zugegeben; 10µl Inhibitor / 1ml Puffer.

Der fertige Puffer und die Homogenisatorröhrchen werden auf Eis gelagert. In jedes dieser Röhrchen wird vorab 1ml Puffer gegeben und schließlich das gefrorene und erneut gewogene Herzgewebe.

Da die Menge des Puffers sich nach dem Gewicht richtet, wird der noch fehlende Teil errechnet und zugegeben. Pro 100 mg Gewebe werden 2 ml Pufferlösung verwendet. Der restliche Puffer findet in einem späteren Schritt als Waschlösung Verwendung.

Der nächste Schritt stellt die Homogenisierung dar, die mit Hilfe eines rotierenden Glaskolbens, der in dem Röhrchen versenkt wird, erfolgt (Dounce homogenizer). Das Gewebe wird dabei so lange bearbeitet, bis keine Gewebestückchen mehr sichtbar sind. Auch dieser Vorgang hat auf Eis zu erfolgen, da durch die Reibung Wärme entsteht.

Nach der Homogenisierung folgt für 20 min. die Inkubation auf Eis. In der Zwischenzeit werden die nötigen Eppendorf-Cups beschriftet, und die Zentrifuge auf 4°C gekühlt.

Das Homogenisat wird nun in die Eppendorf-Cups gefüllt und bei 4°C für 10 min. bei 14 000g zentrifugiert.

Dem Überstand werden zunächst 50µl abgenommen, in Mini-Eppendorf-Cups gefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Diese Probe wird später zur Protein-Konzentrations-Bestimmung verwendet. Weitere 800µl werden in neue Eppendorf-Cups gefüllt, in denen zuvor die gleiche Menge an 2xSDS gegeben wurde. Solange die Probe nicht gekocht wurde, ist sie weiterhin auf Eis zu lagern. Restlicher Überstand wird verworfen.

In dem Zentrifugen-Röhrchen befindet sich nunmehr nur noch das Pellet (Zytoskelett-Anteile). Diesen festen Bestandteilen wird der restliche Puffer zugegeben, 1 ml pro

Röhrchen. Mit einer Nadel (Sterican® 20G gelb) und einer 1ml Insulin-Spritze wird das Pellet wieder in Lösung gebracht und damit gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei den gleichen Bedingungen wie zuvor.

Der nun entstehende Überstand wird verworfen und dem pellet 1xSDS zugefügt; die Menge ergibt sich aus dem zu Beginn gemessenen Gewicht des Gewebes. (5µl pro mg Gewebe). Das pellet wird erneut mit einer Nadel und einer 1ml-Insulin-Spritze aufgelöst und anschließend mit Ultraschall (Sonopuls Homogenisator HD 70) bearbeitet, um noch letzte Gewebestückchen in Lösung zu bekommen.

Im letzten Schritt werden beide Fraktionen (Solid und Pellet) im Heizblock bei 95°C für fünf, bzw. drei Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen werden sie bei -80°C gelagert

3.5. Proteinanalyse

Mittels proteinanalytischer Methoden können Aussagen über Qualität und Quantität bestimmter Proteine getroffen werden, und damit auch über Signal- und Aktivierungswege. Dies erfolgt durch Western-Blots. Zuvor ist jedoch die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben notwendig, um gleiche Ladungsmengen zu gewährleisten.

3.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration, nach dem Bradford-Assay:

Die 1976 von M.M. Bradford veröffentlichte Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung basiert auf der Messung der Blaufärbung, die bei der Komplexbildung zwischen Protein (insbesondere Arginin und aromatische Reste) und Coomassie Brilliant Blue G-250 (einem Farbstoff) entsteht. Das Absorptionsmaximum der gebundenen Form liegt bei 595 nm und zeigt in dem Konzentrationsbereich von 0,2 – 1.4 mg/ml Protein einen linearen Verlauf. Da die Blaufärbung proportional zur Proteinkonzentration ist, kann mittels eines Photometers, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$, die Absorption bzw. Extinktion gemessen, und anhand einer zuvor erstellten Standardkurve die Probenkonzentration ermittelt werden.

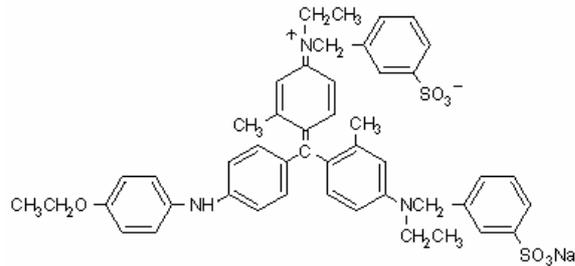


Abbildung 9 chemische Struktur des Coomassie Brilliant Blue G-250-Farbstoff

Durchführung

Zunächst legt man die Standardkurve fest: dazu wird eine vorgefertigte Proteinlösung (BSA-Lösung in der Konzentration von 1g/ml) in aufsteigender Menge (0, 2, 4, 6, 8, und 10 μ l) in Einmal-Küvetten gegeben, auf 800 μ l mit Wasser aufgefüllt (also jeweils 798 μ l, 796 μ l, usw.) und schließlich 200 μ l **BioRad-Reagenz** (Bio-Rad Protein-Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.) zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 1ml entsteht. Von den Proben, (vgl. 3.4.1, abgenommen nach dem ersten Zentrifugieren) werden jeweils nur 2 μ l abgenommen, ansonsten verfährt man genauso. Um genauere Ergebnisse zu erlangen, werden die Proben doppelt bestimmt.

Vor dem Messen im Photometer müssen die Lösungen noch gut durchgemischt werden (Vortex).

Bei der Standardkurve wird die Extinktion (y-Achse) gegen die Proteinkonzentration (X-Achse) aufgetragen und eine Ausgleichsgerade gelegt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz können nun aus den anschließend gemessenen Extinktionswerten der Proben die Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Lösung

Der gesamte Vorgang erfolgt automatisch über ein Programm des Photometers.

Die so ermittelten Ergebnisse müssen noch umgerechnet werden, da ja pro Ansatz 2µl Proteinlösung zugegeben wurde. Anschließend wird das Volumen errechnet, welches später beim Western-Blot geladen werden soll;

Zielvorgabe: 32µg Protein.

In der Regel ergab dies ein Volumen von 16-18µl.

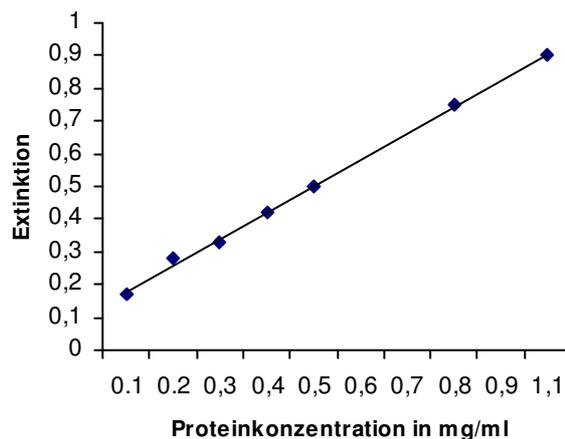


Abbildung 10 Standardkurve

3.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Western-Blot

Allgemeines zur Auftrennung von Proteinen:

Das Western-Blot-Verfahren dient der Auftrennung eines Proteingemisches nach der Größe (in kDa) der einzelnen Proteine. Wie auch bei anderen Gelelektrophoresen nutzt man dabei das Wanderungsverhalten der Makromoleküle in einem elektrischen Feld. Dieser Vorgang ist einerseits abhängig von der Konzentration des Polyacrylamidgels, andererseits von der Größe der Proteine, und damit der elektrischen Ladung. Durch die Denaturierung und Assoziation mit vielen stark negativ-geladenen SDS-Molekülen wandern die Proteine auf Grund ihrer Größe durch das Gel, da die Anzahl der sich anlagernden SDS-Moleküle proportional zur Proteingröße ist.

Die zu Grunde liegende Reaktion bei der Entstehung des Gels stellt die Polymerisierung dar. Hierbei erfolgt eine Vernetzung der N,N`-Methylenbisacrylamid-Moleküle, so dass ein dreidimensionales Maschenwerk mit definierter Porengröße entsteht; diese wiederum, kann durch unterschiedliche Konzentrationen an Bis-Solution und Acrylamid variiert werden. In unserem Fall war eine Gelkonzentration des Trenngels von 7,5% gut geeignet, da die zu bestimmenden Proteine zwischen 220kDa (z.B. Fibronectin) und 3 kDa (z.B. ANP) liegen.

Das SDS-PAGE-Gel besteht dabei aus zwei Komponenten, dem eigentlichen Trenngel und dem Sammelgel. Das Sammelgel hat eine geringere Konzentration an Acrylamid und damit `größere Poren`, so dass der „Stacker“ schnell durchwandert ist. Er dient zum Laden und Fokussieren der Proben, bis diese auf das eigentliche Trenngel treffen. Erst hier findet die Auftrennung statt, wobei ein Protein umso weiter wandert, je kleiner es ist.

Die selbstgegossenen Gele kamen dabei beim Screening nach bestimmten Proteinen zum Einsatz, während für die Abbildungen Nu-Page-Bis-Tris-Fertiggele verwendet wurden; insbesondere 4-12%. Diese haben den Vorteil, dass unterschiedliche Gelkonzentrationen in den einzelnen Abschnitten vorliegen und somit jeweils eine optimale Auftrennung der Proteine, passend zu ihrer Größe erfolgt. Die Elektrophorese erfolgt dabei in der XCell *SureLock* Elektrophoresis Cell™.

Durchführung

Die Rezepte für zwei Gele, sowie für den Stacker sind bereits in 2.6.3 aufgeführt. Erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele wird APS und TEMED zugefügt, da APS als Starter des Polymerisationsvorgangs dient. Die noch flüssige Gel-Lösung wird nun zwischen Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Es ist wichtig darauf zu achten, dass die Halterungsvorrichtung dabei auf ebenem Untergrund steht.

Nach 45 min. ist das Gel ausgehärtet und die Wasserschicht, die ein Austrocknen des Gels verhindern soll, kann verworfen werden. Mit einem Stück Filterpapier wird der verbleibende Hohlraum gut abgetrocknet und die Stackerkämme eingesetzt. Die vorbereitete Sammelgel-Lösung wird wie zuvor das Trenngel mittels einer elektrischen Pipette zugegeben. Der Stacker benötigt zum Aushärten nur c.a. 15 min, anschließend werden die Kämme vorsichtig entfernt und die entstandenen Geltaschen mit Running-Buffer gefüllt.

Nun werden die zu ladenden Proben im Heizblock bei 92 °C für 5 min. (Solid-Probe) bzw. 3 min. (Pellet-Probe) erhitzt. Nach dem Abkühlen werden das errechnete Volumen (vgl.3.5.1), sowie die Größenmarker in Geltaschen geladen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt über Nacht, bei einer Maximal-Spannung von 200V und einer Stromstärke von 9mA. Zu Beginn kann auch eine höhere Stromstärke angelegt werden (35 mA), bis das Proteingemisch den Stacker (Sammelgel) durchwandert hat. Die langsame Auftrennung hat den Vorteil, dass die entstehenden Bandenmuster sehr gerade verlaufen.

Elektroporeseprotokoll: 7,5%-Gel

Stromstärke	9 mA
Spannung	200 V
Gesamtdauer	16 h

Bei der Verwendung der Novex-Mini-Cell und der dazugehörigen Fertig-Gele verfährt man im Grunde genommen genauso. Die bei 4 °C aufbewahrten Gele werden in die vorgesehene Kammer gesetzt, und der dabei entstehende Innen- und Außenraum mit NuPage-Running-Buffer gefüllt.

NuPage SDS Running Buffer (20x)	20 ml
ddH ₂ O	<u>380 ml</u>
Gesamtvolumen	400 ml

Nach dem Beladen, auch hier wird das gleiche Probenprotokoll verwendet, wird die Kammer gut verschlossen und die Elektrophorese nach folgenden Angaben gestartet

Elektroporeseprotokoll: Nu-Page-Bis-Tris-

Fertiggele	
Stromstärke	80 mA

Spannung	200 V
Gesamtdauer	90 min

Transfer:

Bei dem anschließenden Transfer werden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Auch hier ist die treibende Kraft die angelegte Spannung, da die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern und dabei auf der PVDF-Membran gebunden und immobilisiert werden.

Bei den Fertig-Gelen erfolgt der Transfer in einem speziellen Blot-Modul, das in die gleiche Kammer gesetzt werden kann. Es handelt sich hierbei um die Wet-Transfer-Methode.

Zuvor ist es jedoch notwendig die PVDF-Membranen zu aktivieren. Dafür gibt man sie kurz in Methanol und wäscht sie anschließend in Transferpuffer.

Währenddessen werden die Gele aus der Elektrophorese-Kammer entnommen und die Plastikumkleidung vorsichtig aufgebrochen.

Der Stacker wird entfernt und das Gel anschließend in den Transfer-Puffer gegeben, so dass es gut benetzt wird.

Schaumstoffauflagen und Filterpapier werden ebenfalls gut mit Puffer befeuchtet und nach folgendem Schema, möglichst luftblasenfrei, geschichtet.

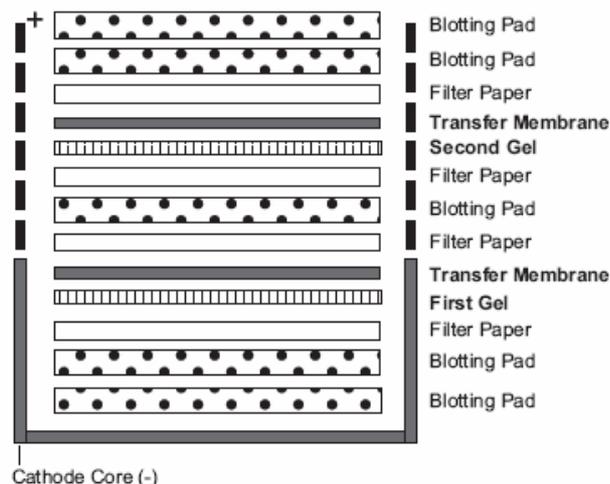


Abbildung 11 Anordnung der Schichten beim WetTransfer im XCell II Blot-Module™ von Invitrogen®

Anschließend wird das Blot-Modul vorsichtig verschlossen und in die *Elektrophoresis Cell™* eingesetzt. Wie auch schon bei der Elektrophorese entstehen wieder Innen- und Außenkammer, die mit dem zugehörigen NuPage-Transfer-Buffer gefüllt werden.

NuPage Transfer-Buffer (20x)	20 ml
ddH ₂ O	<u>380 ml</u>
Gesamtvolumen	400 ml

Schließlich wird die Kammer verschlossen und der Transfer nach folgendem Protokoll gestartet.

Transferprotokoll: Nu-Page-Bis-Tris-Fertiggele

Stromstärke	230 mA
Spannung	30 V
Gesamtdauer	60 min

Bei den selbst-gegossenen Gelen wird der Transfer in der **Semiphor Transphor Unit**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England) durchgeführt. Der verwendete Transferpuffer ist in 2.6.3 aufgeführt. Auch hier werden Filterpapiere, Gele und Membranen nach folgendem Schema luftblasenfrei geschichtet, und gut mit Puffer befeuchtet. Es handelt sich bei diesem Verfahren um einen so genannten Semi-dry-Transfer.

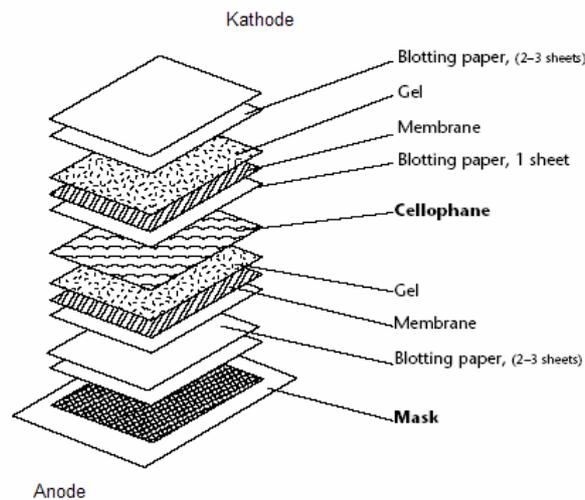


Abbildung 12 Anordnung der Schichten beim Semi-dry-Transfer in der Semiphor Transphor Unit, von Amersham

Transferprotokoll: 7,5%-Gel

Stromstärke 150mA

Spannung 50 V

Gesamtdauer 90 min

Immunologische Detektion

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgt unter Verwendung zweier Antikörper: dem Primärantikörper, der an das (auf der PVDF-Membran fixierte) Protein bindet, und einem mit dem Enzym HRP (engl. Horse raddish peroxidase) – gekoppelten Zweitantikörper, der seinerseits am Erstantikörper bindet.

Sobald das geeignete Substrat zugegeben wird, findet eine enzymatische Reaktion statt, deren Reaktionsprodukte mittels einer Digitalkamera nachgewiesen werden.

Als Substrat wurde CHEMIGLOW™ verwendet, bestehend aus einer Luminol- und einer Wasserstoffperoxid –Lösung, die kurz vor dem Gebrauch zusammen gegeben werden.

Zur Immundetektion wurde folgendes Protokoll angewandt

1. Blocken der Membranen bei Raumtemperatur, 60 min

Nach Abschluss des Transfers werden die Membranen in 10%ige Milch oder 2%ige BSA-Lösung gegeben. Durch die Milch- oder Serumproteine werden die unspezifischen Muster blockiert, so dass die Antikörper, die anschließend zugegeben werden, vorzugsweise an den zu detektierenden Strukturen binden.

2. Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C

Die Antikörper werden dafür in 5%-Milch oder 1%-BSA gelöst. Schließlich wird noch Natriumazid 1% zugegeben, um ein Bakterienwachstum zu vermeiden.

3. Waschen mit TBST

Die Membranen werden 3 x 10 min gewaschen

4. Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur

Der Sekundärantikörper wird dazu in TBST gelöst

5. Waschen der Membran mit TBST

3 x 10 min

6. Zugabe von CHEMIGLOW™

Zunächst beide Komponenten nach Herstellervorschrift miteinander vermischen und auf die Membranen geben. Diese luftblasenfrei in Frischhaltefolie einpacken. Es folgt eine Chemilumineszenz-Reaktion zwischen dem Zweitantikörper, an den das Enzym HRP gekoppelt ist und der Substrat-Lösung. Dadurch werden die Banden sichtbar und können digital erkannt werden.

7. Aufzeichnung der Signale mittels (Digitalkamera Chemilimage 5500)

Alle Vorgänge finden dabei auf dem Schwenktisch statt

3.6. Immunhistologie

Die Immunhistologie ist eine Methode, die dazu dient Proteine in ihrem strukturellen Zellverband abzubilden. Dazu verwendet man spezifische Antikörper, die an die zu detektierenden Strukturen binden und in einem zweiten Schritt selbst durch Zweitantikörper dargestellt werden. Durch den Einsatz eines Lasermikroskops und einer Digitalkamera können gezielt Strukturen dargestellt und aufgezeichnet werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Bilder zu erreichen, ist es wichtig die Aufnahmen möglichst innerhalb gleicher Zeiträume zu erstellen, da Fluoreszenz-Antikörper nur für einen begrenzten Zeitraum eine starke Signalgebung aufweisen.

3.6.1. Erstellung von Gefrierschnitten (Immunhistologie)

Wie in 3.6 beschrieben, wird ein Teil des Herzgewebes für die Immunhistologie verwendet.

Die bei -80°C gelagerten Ringe werden dazu im Kryotom in $6\mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Zunächst ist es jedoch notwendig, das Kryotom mind. 4-5h auf eine Arbeitstemperatur von -25°C vorzukühlen. Die gefrorenen Ringe (die auf Trockeneis zwischengelagert werden) werden mittels eines speziellen Gewebeklebers (TissueTek) auf dem Gewebeblock fixiert und in das Kryotom gegeben, bis der Kleber, incl. Gewebe, gefroren ist.

Werden die Schnitte gleich weiterverarbeitet, lässt man sie für 20 min. bei Raumtemperatur trocknen, ansonsten können sie luftdicht verschlossen bei -20°C aufbewahrt werden.

3.6.2. Fixierung und Weiterverarbeitung

Die luftgetrockneten und auf Zimmertemperatur erwärmten Schnitte werden nun in einem nächsten Schritt fixiert. Dafür werden sie für 15 min. in 2%-ige PFA-Lösung gegeben. Um lösliche Proteine aus dem Gewebe zu lösen, folgt ein Bad in 0,1 % Triton Lösung à 20 min. Damit die Schnitte nicht austrocknen werden sie anschließend in TBS-Lösung gegeben. Die Objektträger werden nun einzeln aus der Lösung genommen, abgetrocknet und das Gewebe mit einem speziellen Kleber (PapPen) umkreist; so können die einzelnen Tropfen, die im Folgenden auf das Gewebe gegeben werden nicht auslaufen.

Als nächstes wird für einen Zeitraum von einer Stunde 10%-Donkey-Serum auf das Gewebe gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nach dem Blocken folgt die Inkubation mit einem Primärantikörper ($100\mu\text{l}$ pro Schnitt und in einer Standardverdünnung von 1:20), den man über Nacht bei 4°C einwirken lässt. Um ein Verdunsten zu verhindern gibt man die Objektträger in eine flache und mit gut befeuchtetem Zellstoff ausgelegte Schale, die abschließend noch mit Aluminiumfolie abgedeckt wird.

Nicht gebundener Primärantikörper wird nun durch dreimaliges Waschen mit TBSSA-Lösung wieder entfernt, und das Gewebe mit dem passenden Zweitantikörper inkubiert. Es werden $90\mu\text{l}$ pro Schnitt in einer Verdünnung von 1:500 veranschlagt. Die Einwirkzeit beträgt 2h.

Beim Sekundärantikörper handelt es sich um einen fluorochromkonjugierten Ak, der an die Fc-Domäne des Primärantikörpers bindet. Später sind genau diese Immunkomplexe auf Grund des Farbstoffs Cy2 sichtbar.

Nach der Inkubation, wird auch der Zweitantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBSA wieder entfernt. Um zu veranschaulichen, dass es sich um Kardiomyozyten handelt folgt schließlich noch eine Aktinfärbung mittels Phalloidin. Dafür werden die Schnitte mit je 100 µl Phalloidinlösung, in einer Verdünnung von 1:10, versetzt. Die Einwirkzeit beträgt 30 min. Danach werden die Schnitte erneut 3 x 5min mit TBSA gewaschen.

Zum Abschluss werden die Schnitte mit einem speziellen Zwei-Komponenten-Klebstoff (Prolong Antifade) eingedeckt und mit Deckgläschen verschlossen. Nach dem Trocknen des Klebers werden die Ränder noch mit herkömmlichem Nagellack versiegelt, dadurch verhindert man ein Austrocknen der Schnitte, sowie auch ein Ausbleichen der Farbstoffe.

Die Schnitte lassen sich in einer lichtundurchlässigen Box bei 4°C einige Zeit aufbewahren.

Da die Farbstoffe sehr lichtempfindlich sind, müssen alle Vorgänge unter Lichtschutz erfolgen.

3.6.3. Bildgebung und Analyse der Gefrierschnitte

Die Analyse der erstellten Gefrierschnitte erfolgte mittels eines confocalen Lasermikroskopes und der dazugehörigen Computersoftware. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff wird in einer ausgesuchten Ebene durch den Laser punktförmig angeregt. Dieser Farbstoff emittiert nun seinerseits energieärmere Strahlung, die von einem Detektor aufgefangen, und zu einem Bild verrechnet wird. Durch den Einsatz von Spiegeln, können gezielt Ebenen ausgewählt und auftretende Streustrahlung minimiert werden.

3.7. Histologie

Mittels der Histologie werden die adaptiven Mechanismen, insb. die Hypertrophieentwicklung, aber auch pathologische Veränderungen wie eine Ventrikeldilatation anschaulich gemacht. Gleichzeitig können auch bestimmte

Parameter wie Durchmesser, Wanddicken von Septum und der Freien Wand ermittelt werden.

3.7.1. Entwässerung und Einbettung in Paraffin

Durchführung:

Die in 20%-Formalin eingelegten Herzringe, vgl. dazu 3.4, werden im weiteren Verlauf entwässert und in Paraffinblöcke überführt.

Dabei kommt ein spezieller Einbettungsautomat zum Einsatz. Er besteht aus einer runden beheizten Plattform, auf der sich neun Gefäße befinden, gefüllt mit jeweils unterschiedlichen Substanzen, sowie einer rotierbaren und vertikal beweglichen Scheibe darüber.

Die Herzringe werden zunächst in kleine beschriftete Kunststoff-Kassetten gegeben und diese wiederum werden in einem Metallgitter gesetzt. Dieses Metallgitter wird nun an der Scheibe fixiert. Die Scheibe senkt sich und der Metallkorb wird für einen bestimmten Zeitraum in eines der Gefäße gegeben. Mittels einer eingebauten Zeitschaltuhr kann die Verweildauer automatisch reguliert werden. Der Einbettungsautomat arbeitet dabei nach folgendem Protokoll:

1. Gefäß	70 % Ethanol	30 min
2. Gefäß	80 % Ethanol	30 min
3. Gefäß	100 % Ethanol	30 min
4. Gefäß	Roti-Histol / Ethanol 1:1	30 min
5. Gefäß	Roti-Histol	30 min
6. Gefäß	Roti-Histol	30 min
7. Gefäß	Roti-Histol / Paraffin 1:1	30 min
8. Gefäß	Paraffin 60 °C	60 min
9. Gefäß	Paraffin 60 °C	

Nach Ablauf der vorgegebenen Zeit hebt sich die Scheibe incl. Korb, dreht sich und versenkt den Metallkorb im nächsten Gefäß.

Der nächste Schritt stellt die Einbettung der Herzen in Paraffin dar. Dazu werden die entwässerten Herzringe möglichst zügig aus dem 9. Gefäß entfernt und in vorbereitete, mit heißem Paraffin gefüllte Förmchen gegeben. Schließlich werden etwaige Luftblasen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Nach ein bis zwei Tagen

sind die Parafinblöcke vollständig ausgehärtet und können aus den Förmchen entfernt werden.

3.7.2. Erstellung der Parafin-Schnitte

Die ausgehärteten Parafin-Würfel werden in das s.g. Schlittenmikrotom eingespannt und Scheiben mit einer Schichtdicke von 5 μm geschnitten.

Die Schnitte werden anschließend vorsichtig mit zwei Pinsel in ein 44°-49°C warmes Wasserbad gegeben, aus dem sie auf einen sauberen und fettfreien Objektträger aufgezogen werden können. In der Regel verwendet man einen Objektträger à zwei Schnitte. Die Präparate werden anschließend in einem Trockenschrank bei 70°C aufbewahrt.

3.7.3. Färbungen:

Um Zellstrukturen im Lichtmikroskop überhaupt sichtbar zu machen, sind Färbungen notwendig. Dabei kamen folgende Färbungen der Parafinschnitte zum Einsatz:

Pikro-Sirius-Red Bei der PSR-Färbung wird Collagen rot, Muskulatur und Zytoplasma hingegen gelb angefärbt.

Hämalaun-Eosin Blaue Anfärbung aller basophilen Zell- und Gewebsstrukturen, wie z.B. Zellkerne
Rote Anfärbung aller azidophilen Bestandteile, wie z.B. Zytoplasma oder Kollagenfasern

Alle Färbetechniken werden dabei unter dem Abzug durchgeführt

3.8. Statistik

Die erhobenen Messwerte und Daten wurden mittels StatView verarbeitet, dabei fand da Analyseverfahren ANOVA und als Korrektur die Bonferroni/Dunn-Korrektur Anwendung. Bei den erstellten Schaubildern wurde der Mittelwert und entsprechende Standardabweichung dargestellt (error bar). Ein Signifikanzniveau $p <$

0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. Die erstellten Schaubilder wurden mittels *Microsoft PowerPoint* bearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie

Um das Ausmaß einer möglichen Hypertrophieentwicklung zu bestimmen wurde von uns Mausgewicht, Herzgewicht, Gewicht der Lunge und die Tibiallänge bestimmt und in Relation gesetzt. Die erhobenen Daten wurden mit ANOVA und Bonferroni-Korrektur statistisch ausgewertet. Eine Signifikanz liegt bei einem p-Wert von $< 0,0033$ vor. Untersucht wurden insgesamt 102 Tiere. Da sich bei den Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede untereinander ergaben, werden diese im Folgenden zusammengefasst.

Übersicht der erhobenen Daten der Kontroll-Gruppen:

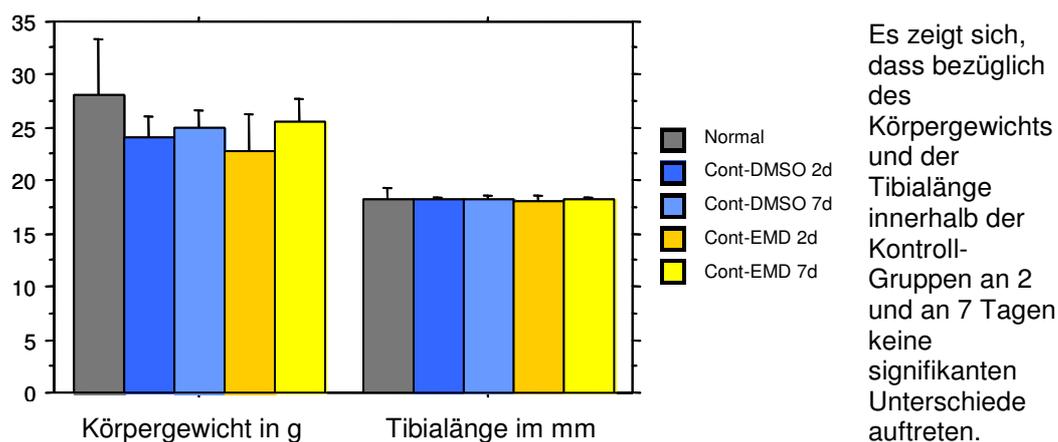


Abbildung 13 Körpergewicht und Tibiallänge jeweils in g bzw. mm

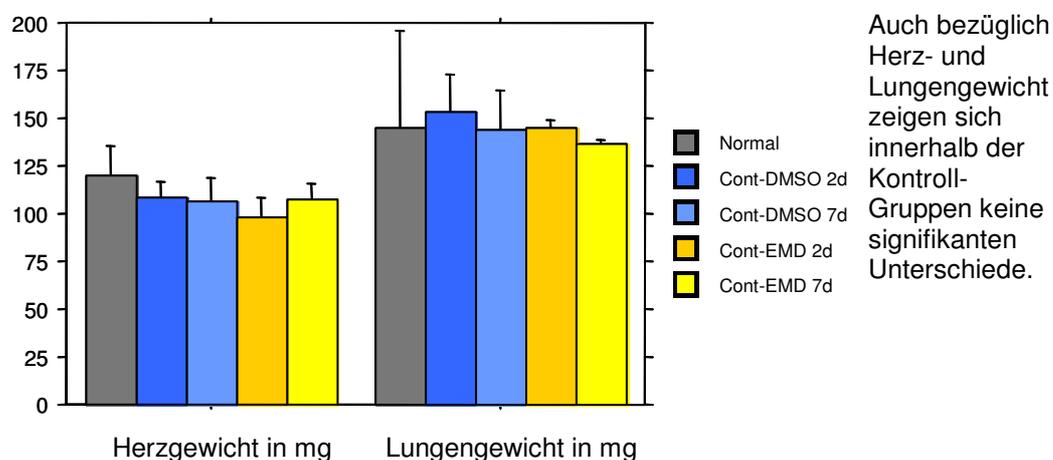
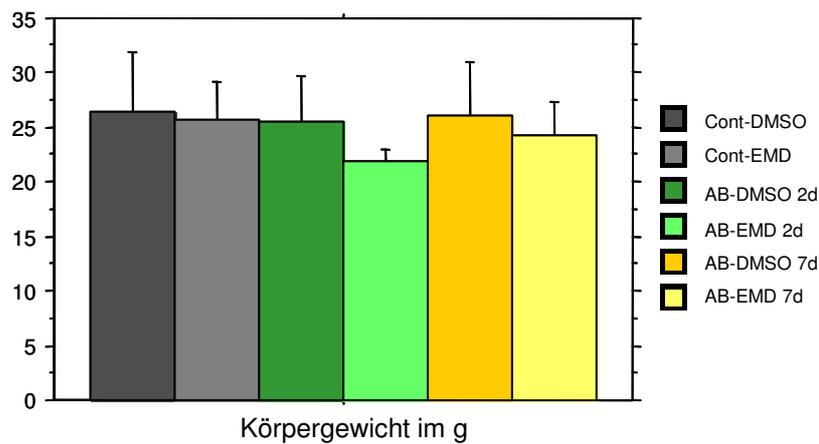
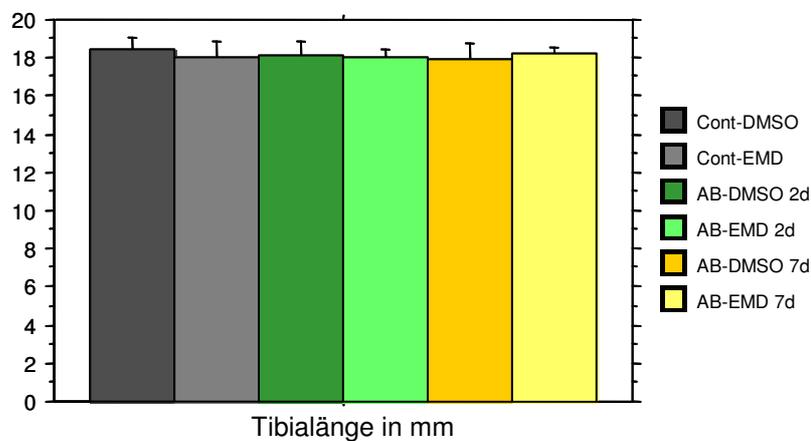


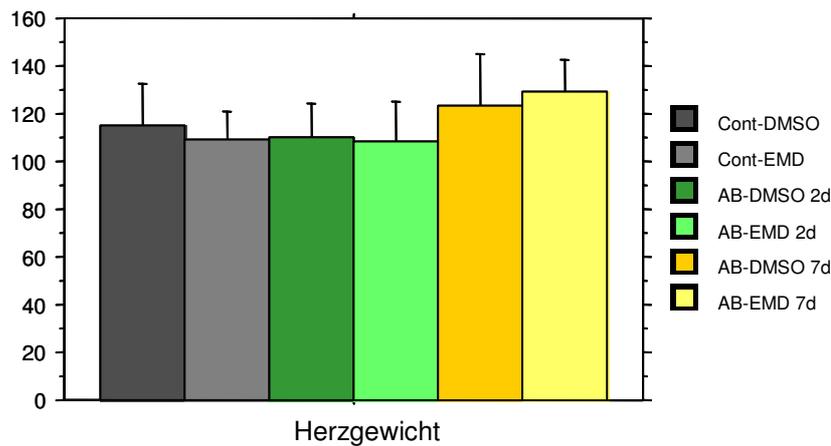
Abbildung 14 Herz- und Lungengewicht in mg

Körpergewicht:**Abbildung 15** totales Körpergewicht der Mäuse in g

Nach zwei und sieben Tagen traten keine signifikanten Differenzen bzgl. des Körpergewichts innerhalb der Gruppen auf. Die vermeintliche Gewichtsabnahme in der Gruppe der AB-Inhibitorgruppe ist nicht signifikant.

Tibiallänge:**Abbildung 16** Darstellung der Tibiallänge

Die Tibialängen zeigen innerhalb der verschiedenen Gruppen keinerlei Unterschiede, demnach befinden sich Tiere alle im gleichen Entwicklungszustand.

Herzgewicht:**Abbildung 17** Darstellung des Herzgewichtes in mg

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen des Herzgewichtes im Vergleich der Gruppen. Allerdings ist eine gewisse zunehmende Tendenz zu verzeichnen. Es kommt zu einer Zunahme des Herzgewichtes von durchschnittlich 109 mg in der Gruppe der Cont-EMD-Tiere auf 129 mg in der Gruppe der AB-EMD-Gruppe, ein Zuwachs von 18%.

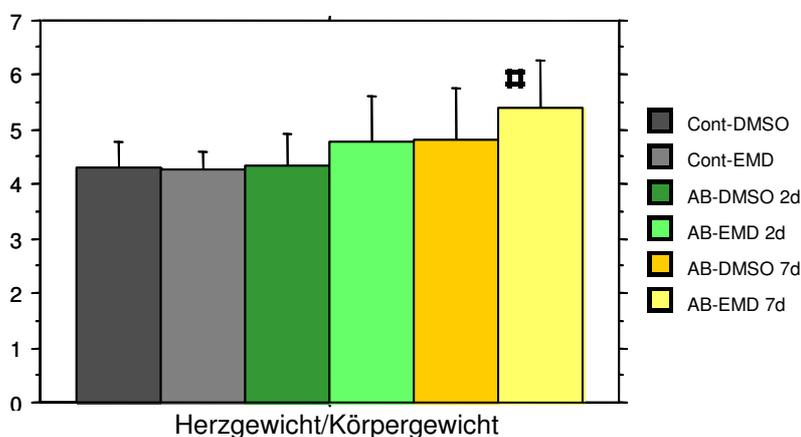
Herzgewicht/Körpergewicht:**Abbildung 18** Herzgewicht in mg zu Körpergewicht in g

Abbildung 18 zeigt den Quotienten aus Herzgewicht zu Körpergewicht.

■ Es findet sich eine signifikante Erhöhung im Vergleich Cont-EMD vs. 7d-AB-EMD bei einem p-Wert von 0,0002. Der Quotient steigt von 4,2 (Cont-EMD) auf 5,3 (7d-AB-EMD)

Herzgewicht/Tibiallänge

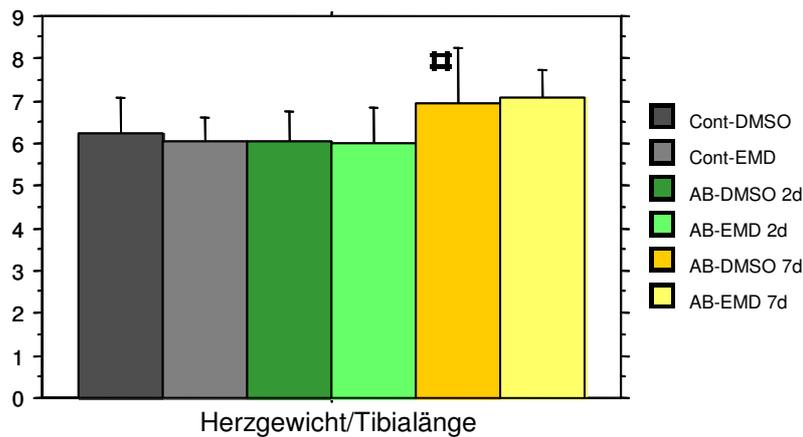
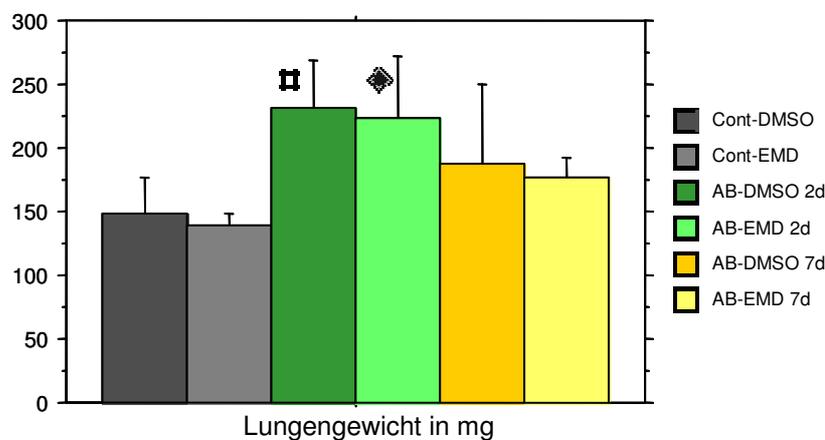


Abbildung 19 Herzgewicht in mg zu Tibiallänge in mm

Im Vergleich der Gruppen 2d-AB-DMSO vs. 7d-AB-DMSO kommt es zu einer signifikanten Zunahme des Quotienten von 6,032 auf 6,931, bei einem p-Wert von 0,0007 dies entspricht einer Zunahme von 15,5%

Lungengewicht:

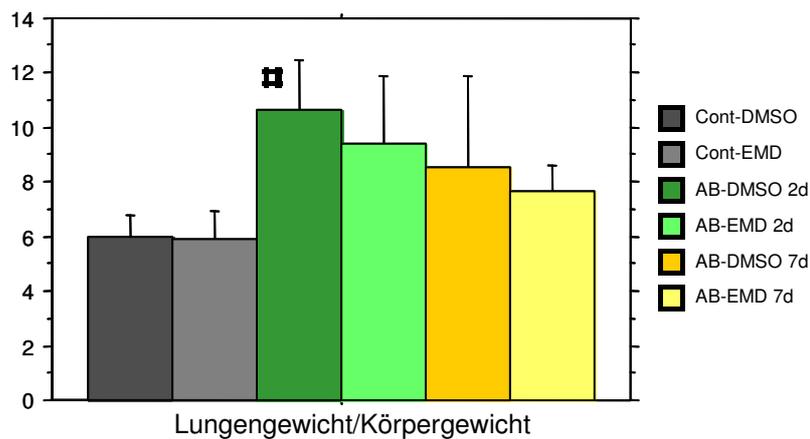


Bei der Entwicklung des Lungengewichts an zwei und sieben Tagen zeigt sich eine signifikante Zunahme im Vergleich der Cont-DMSO-Gruppe vs. 2d-AB-DMSO, bzw. Cont-EMD vs. 2d-AB-EMD. Es kommt zu einem Anstieg von 148,4 mg (Cont-DMSO) auf 231,5 mg (2d-AB-DMSO), dies entspricht einer Zunahme um 56%, bzw. von 138,6 mg (Cont-EMD) auf 223,3 mg (2d-AB-EMD), Zunahme um 61%.

■ Cont-DMSO-Gruppe vs. 2d-AB-DMSO p-Wert 0,0008

◆ Cont-EMD vs. 2d-AB-EMD p-Wert 0,0024

Lungengewicht/Körpergewicht:



In Relation gesetzt, Lungengewicht zu Körpergewicht zeigt sich eine signifikante Zunahme des Quotienten (mg/g) im Vergleich 2d-AB-DMSO vs. Cont-DMSO, von 5,9 mg/g auf 10,7 mg/g. Dies ist eine Zunahme von 81%

4.2. Herzechokardiographie

Mittels der Herzechokardiographie lassen sich Aussagen über morphologische Veränderungen und die Funktionstüchtigkeit der Herzen am lebenden Tier treffen, zu Durchführung vgl. 2.12. Dabei wurden folgende Parameter bestimmt: Septumdicke, Dicke der freien Wand, der Ventrikeldurchmesser und die Ejektionsfraktion, bzw. fractional Shortening.

Der folgende Abschnitt beinhaltet eine Gegenüberstellung der wichtigsten Signifikanzen an 2 und an 7 Tagen.

Die untersuchten Gruppen waren:

Gruppe		Anzahl der Versuchstiere
Control-DMSO	eine Kontrollgruppe, der mittels der subcutan implantierten Pumpen DMSO-Lösung verabreicht wurde	5
Control-Inhibitor	ebenfalls eine Kontrollgruppe, die nur Inhibitor bekam,	4
Aortic-banding-	die Versuchsgruppe, bei denen ein	

DMSO	Banding gesetzt wurde, unter DMSO-Gabe	bei 2 Tagen 3 bei 7 Tagen 8
Aortic-banding-Inhibitor (AB-EMD)	in dieser Gruppe wurde ein Aortic-Banding unter Inhibitor-Gabe gesetzt.	bei 2 Tagen 5 bei 7 Tagen 7

Tabelle 1

Die Schaubilder wurden mittels StatView erstellt und die Signifikanzen mittels Varianz-Analyse (Anova) und Bonferroni-Korrektur berechnet. In die Statistik gingen insgesamt 32 Tiere ein, eine genaue Aufgliederung zeigt Tabelle 1 Die Angaben sind jeweils in mm.



Abbildung 20 Control-DMSO

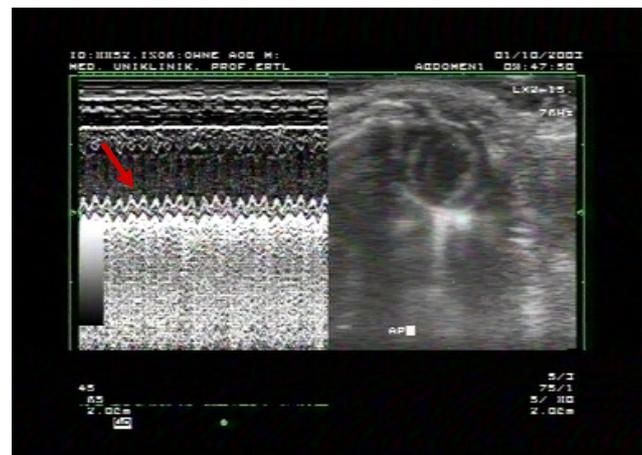


Abbildung 21 Control-EMD

Abbildung 20 und Abbildung 21 sind Beispiele für die Aufnahme im m-mode (links) und eine ap-Aufnahme (anterior-posterior). Im Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander zeigen sich keine morphologischen (oder strukturellen) Veränderungen und man erkennt eine regelhafte Herzaktion. (Regelmässige Wellenbewegung durch Systole und Diastole, vgl. roter Pfeil.) Das Septum, die freie Wand und der Ventrikeldurchmesser sind normal konfiguriert. Stellt man diesen Kontrollgruppen nun die AB-Gruppen an sieben Tagen gegenüber, so ergeben sich folgende Veränderungen:

Abbildung 22 und Abbildung 23 sind beide in pa-Aufnahme (Ebene der Papillar-Muskeln) angefertigt und damit zwar nicht mit den Kontrollgruppen direkt

vergleichbar, aber man erkennt doch deutlich die Tendenz. Während AB-DMSO-Gruppe eine Zunahme der Wand- und Septumdicke aufweist, wirken die genannten Strukturen in der Gruppe der Inhibitor-Tiere vermindert und das Lumen (Ventrikeldurchmesser) erweitert.

Wesentlich bedeutender ist jedoch die eingeschränkte Pumpleistung der Gruppe der Inhibitor-Tiere: erkennbar an der deutlich abgeflachten Wellenlinie im m-mode, es finden nur spärliche Kontraktionsbewegungen statt. (vgl. auch hier den roten Pfeil)

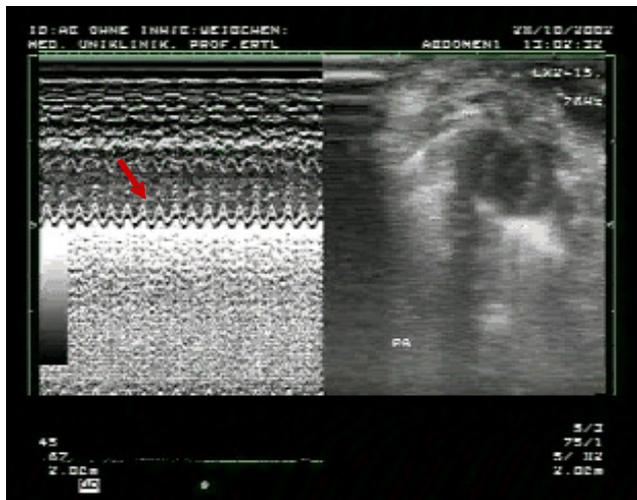


Abbildung 22 AB-DMSO 7d

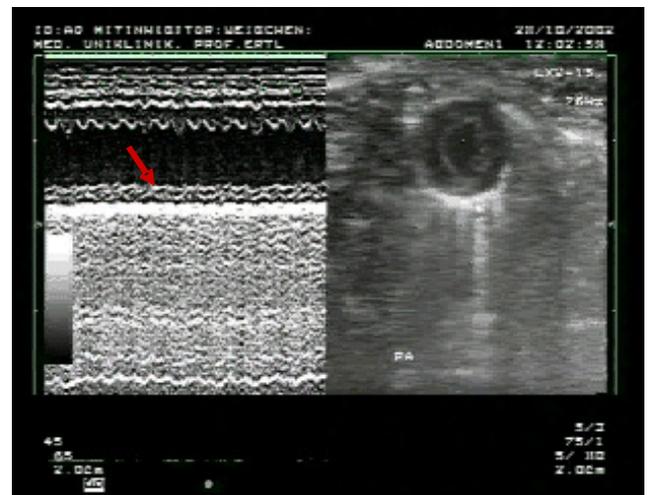


Abbildung 23 AB-EMD 7d

Aus den erstellten Echokardiographiebildern wurden die oben genannten Parameter mittels eines Computer-Programms ausgemessen. Die statistische Verarbeitung der Rohdaten weist nun folgende Ergebnisse auf.

Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der Durchschnittswerte wieder. Die Werte sind auf die zweite Stelle nach dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Gruppen	Septum in mm		Freie Wand in mm		Durchmesser in mm		Fractional Shortening in %
	Sys	Dia	Sys	Dia	Sys	Dia	
Cont-DMSO	11	8	12	9	23	32	28,04
Cont-EMD	12	8	13	9	21	34	36,20
AB-DMSO 2d	13	11	12	11	23	29	20,70
AB-EMD 2d	6	6	9	7	29	32	10,20
AB-DMSO 7d	15	13	17	13	19	26	26,78
AB-EMD 7d	8	6	10	7	34	38	9,70

Tabelle 2 Darstellung der Rohdaten, ermittelte Durchschnittswerte

Sie stellt die Grundlage für die folgenden Schaubilder dar. Es wurde, insbesondere um den Verlauf zu veranschaulichen zwei und sieben Tage zusammengefasst und nach Systole und Diastole unterschieden. Die Angaben erfolgen in cm.

4.2.1. Septum

Systole:

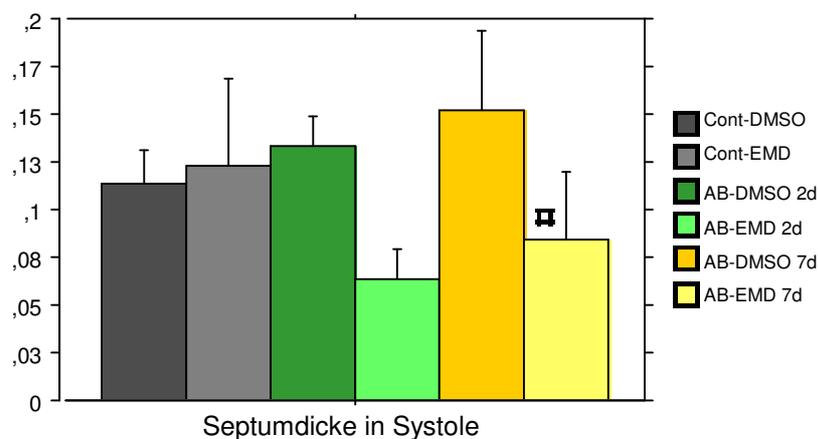


Schaubild zur Darstellung der Septumdicke der verschiedenen Gruppen an zwei und sieben Tagen mit Standardabweichung. Auffallend ist die deutliche Ausdünnung in der Gruppe der Inhibitor-Tiere, sowohl an zwei, als auch an sieben Tagen.

Abbildung 24

Abbildung 24 zeigt die durchschnittliche Septumdicke der einzelnen Gruppen incl. Standardabweichung während der Systole. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied: $p < 0,0033$

■ der Vergleich AB-DMSO-7-d vs. AB-EMD-7-d ergibt einen p-Wert von 0,0005.

Des Weiteren ist ersichtlich, wenn auch nicht signifikant, dass

1. beide Kontrollgruppen gleich konfiguriert sind und damit weder die alleinige Gabe der DMSO-Lösung, noch die Gabe des Alpha-V-Beta-5- Inhibitors einen Einfluss auf die Wanddicke haben. Auf eine gesonderte Darstellung einer Normal-Gruppe wurde verzichtet, da sich keine morphologischen Unterschiede ergaben; vgl auch Abschnitt Histologie.
2. in der Gruppe der 2-Tages-Tiere kommt es zu einer geringen Zunahme der Septumdicke von 0,11 cm in der Gruppe der Control-DMSO-Tiere auf 0,13 cm in der Gruppe der AB-DMSO-Tiere; es setzt also eine kompensatorische Hypertrophieentwicklung ein. Diese Tendenz kann man auch in der Gruppe der 7-Tages-Tiere beobachten, es kommt zu einer Zunahme auf 0,15 cm.
3. in der Gruppe der Inhibitor-Tiere, sowohl an zwei, als auch an sieben Tagen, eine Verschmälerung der Septumdicke auf 0,06 in der Gruppe der AB-EMD-2d-Tiere bzw. auf 0,08 in der Gruppe AB-EMD-7d-Tiere der einsetzt.

Diastole:

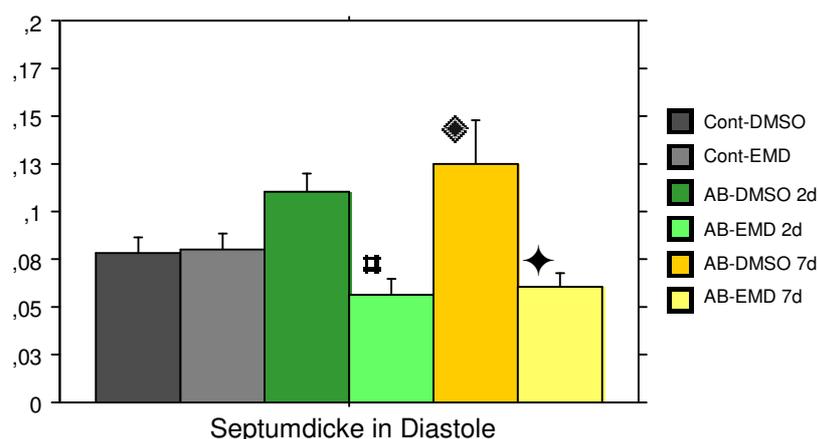


Schaubild zur Darstellung der Septumdicke der verschiedenen Gruppen an zwei und sieben Tagen mit Standardabweichung in Diastole. Auch hier fällt die deutliche Ausdünnung des Septums in der Gruppe der Inhibitor-Tiere auf.

Abbildung 25

Die für die Systole gemachten Aussagen treffen weitergehend auch auf die Diastole zu. Man erkennt auch hier zwei konforme Kontrollgruppen und eine deutlich verminderte Septumdicke in der Gruppe der Inhibitor-Tiere mit 0,06 cm an zwei

Tagen und 0,06 cm an sieben Tagen, während bei der Gruppe der DMSO-Tiere eine Dickenzunahme auf 0,11 in der Gruppe der 2-Tages-Tiere bzw. auf 0,13 cm in der Gruppe der 7-Tages-Tiere zu verzeichnen ist.

Es ergaben sich folgende signifikante Unterschiede: nach Bonferroni $p < 0,0033$

■ Im Vergleich von AB-DMSO-2d vs. AB-EMD-2d ergibt sich ein p-Wert von $< 0,0001$

◆ Im Vergleich von Cont-DMSO vs. AB-DMSO-7d ergibt sich ein p-Wert von $< 0,0001$

✦ Im Vergleich von AB-DMSO-7d vs. AB-EMD-7d ergibt sich ein p-Wert von $< 0,0001$

4.2.2. Dicke der freien Wand

Unter der freien Wand versteht man dem Septum gegenüberliegenden Teil der Herzwand, also die posterolaterale Wand des linken Ventrikels.

Systole:

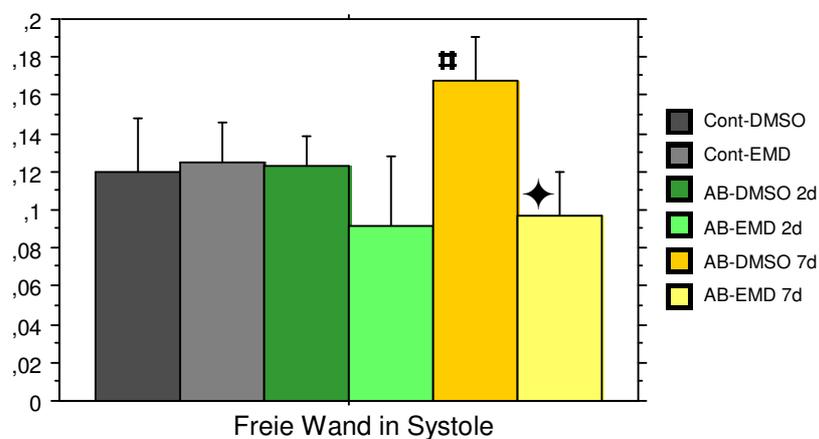


Schaubild zur Darstellung der Wandstärke der verschiedenen Gruppen an zwei und sieben Tagen mit Standardabweichung in Systole. Es fällt die deutliche Ausdünnung der freien Wand in der Gruppe der Inhibitor-Tiere auf, sowie die deutliche Zunahme der Wandstärke in der 7-d-DMSO-Gruppe.

Abbildung 26

Abbildung 26 beschreibt die Wanddicke der freien Wand während der Systole. Man kann erkennen, dass es schon nach zwei Tagen in der Gruppe der Inhibitor-Tiere zu einer Verschmälerung kommt, wenn auch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu nimmt die Wanddicke in der Gruppe der AB-DMSO-7d deutlich von 0,12 cm (Kontroll-Gruppe) auf 0,17cm zu, damit liegt beim Vergleich von AB-DMSO-7d vs. Control-DMSO ein signifikanter Unterschied von $\blacksquare p = 0,0031$ vor.

◆ Eine weitere Signifikanz tritt bei Vergleich von AB-EMD-7d und AB-DMSO-7-d bei einem p-Wert von $p < 0,0001$ auf: Es zeichnet sich also die gleiche Tendenz, wie auch bei dem Interventrikular-Septum ab.

Diastole:

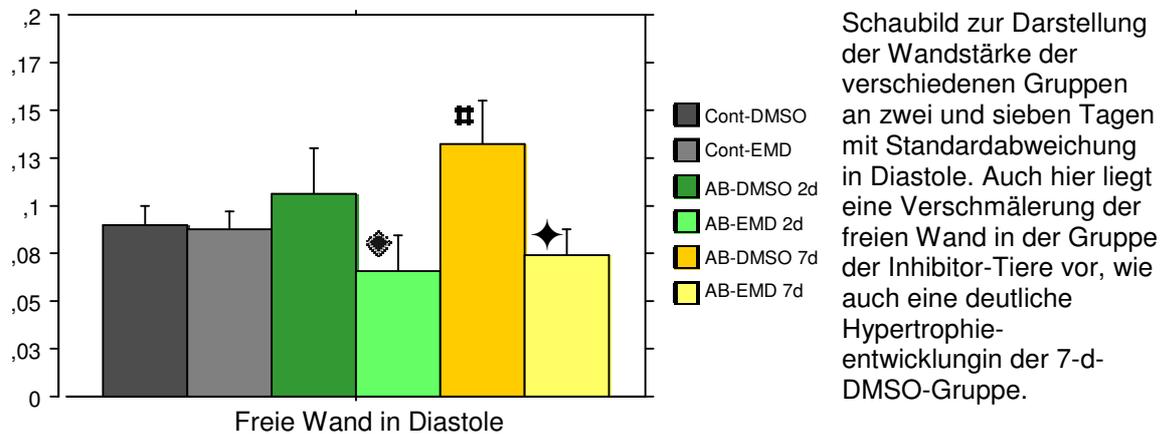


Abbildung 27

Noch deutlicher zeichnet sich dies in der Diastole ab. Die Wanddicke nimmt in der Gruppe der AB-EMD-2d auf 0,07 cm ab und ist damit erkennbar schmaler als in der Gruppe der 2-Tages-DMSO-Gruppe mit 0,11 cm s ergibt sich ein p-Wert von

◆ $p = 0,0031$ im Vergleich der Gruppen AB-DMSO-2d vs. AB-EMD-2d

■ $p = 0,0002$ Control-DMSO vs. AB-DMSO-7d: nach sieben Tagen steigt die Dicke der freien Wand auf 0,13 cm und ist somit im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe mit 0,09 cm signifikant verbreitert.

◆ $p < 0,0001$ AB-DMSO-7d vs. AB-EMD-7d: auch im Vergleich mit der Inhibitor-Gruppe, die mit einer Wanddicke von 0,07 cm deutlich vermindert ist, zeigt sich ein signifikanter Unterschied.

4.2.3. Ventrikeldurchmesser

Der Ventrikeldurchmesser, ermittelt in Systole und Diastole kann als Parameter zur Beurteilung der Kontraktilität verwendet werden. Je insuffizienter ein Herz ist, desto größer ist der Durchmesser, insbesondere, wenn es im weiteren Verlauf zur einer Dilatation des Ventrikels kommt.

Systole:

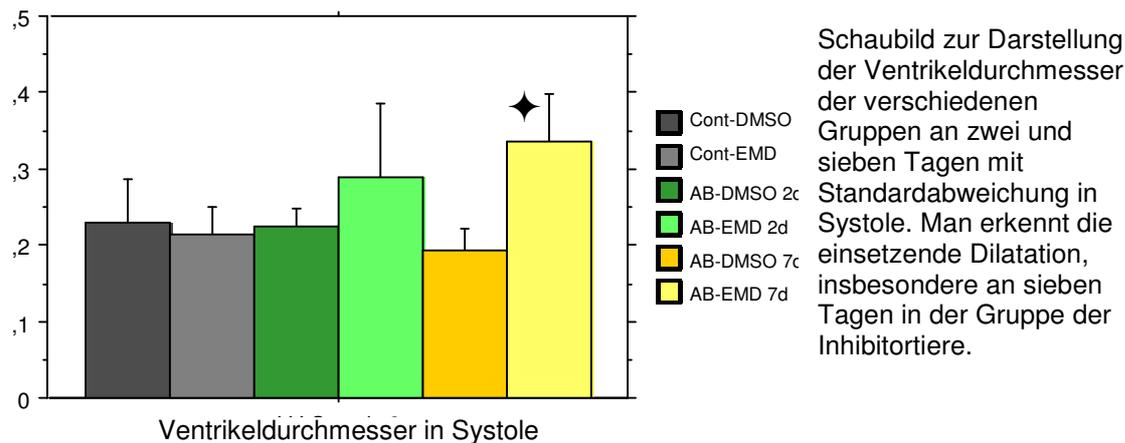


Abbildung 28

In Abbildung 28 sind zwei Tendenzen klar erkennbar:

1. der Ventrikeldurchmesser nimmt in der Gruppe der Inhibitor-Tiere im Verlauf von zwei, mit 0,29 cm, nach sieben Tagen zu, ♦ im Fall der AB-EMD-7-d-Gruppe auf 0,34 cm und damit im Vergleich zur AB-DMSO-7d-Gruppe mit durchschnittlich 0,19 cm sogar signifikant.
2. der Durchmesser nimmt in der Gruppe der DMSO-Tiere im gleichen Zeitraum ab – dies spricht für eine gegebene Kontraktilität und eine Hypertrophieentwicklung. Von 0,23 cm in der Gruppe der 2-Tages-Tiere auf 0,19 cm in der Gruppe der 7-Tages-Tiere.

Diastole:

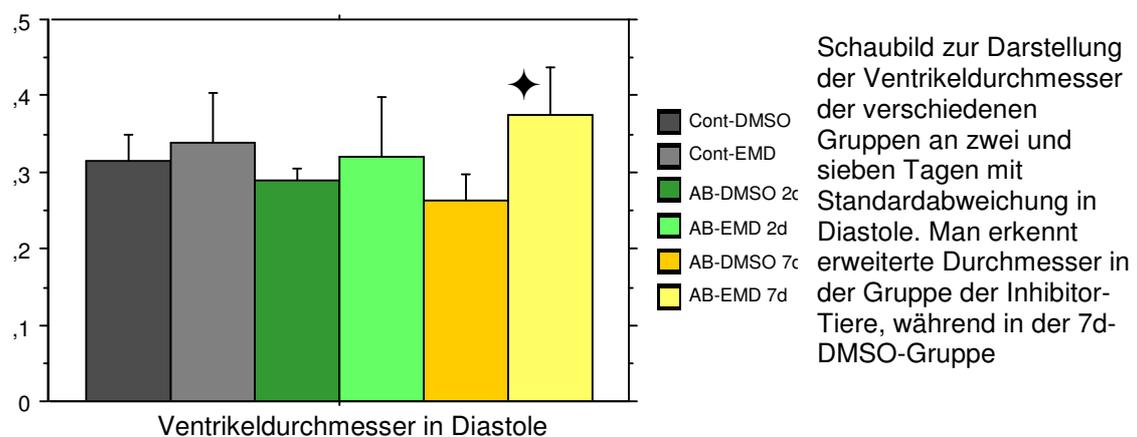


Abbildung 29

Abbildung 29 zeigt den Ventrikeldurchmesser in der Diastole; es zeigen sich dieselben Tendenzen, wie auch schon in der Systole: der verminderte Durchmesser

in der Gruppe der DMSO-Tiere, sowohl an zwei, als auch an sieben Tagen auf 0,29 cm bzw. 0,26 cm, spricht für eine einsetzende Hypertrophieentwicklung, bzw. für eine bestehende Kontraktilität der Myozyten. Andererseits zeigt sich in der Gruppe der Inhibitor-Tiere eine Zunahme des Durchmessers, und somit eine einsetzende Dilatation der Mauseherzen. Von 0,34 in der Gruppe der Kontroll-Tiere auf 0,32 an zwei und 0,38 an sieben Tagen.

✦ Ein signifikanter Unterschied findet sich beim Vergleich der AB-DMSO-7d-Gruppe mit der AB-EMD-7d-Gruppe, bei einem p-Wert von $p = 0,0032$.

4.2.4. Fractional Shortening – Ejektionsfraktion

Wie schon erwähnt, lassen sich mit der Echokardiographie auch Aussagen über die Funktionstüchtigkeit und Leistung der Mäuseherzen treffen. Fractional Shortening ist ein Parameter zur Beurteilung der Pumpfunktion. Fractional Shortening bezeichnet die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges. Berechnet wird sie aus dem größten und kleinen Durchmesser der linken Herzkammer und als relativer Wert angegeben. Normalerweise verkleinert sich der linke Ventrikel um mehr als 25-30%. LVEDD = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels, LVESD = systolischer Durchmesser des linken Ventrikels

$$FS(\%) = \frac{LVEDD-LVESD}{LVEDD}$$

Die Angaben erfolgen in %.

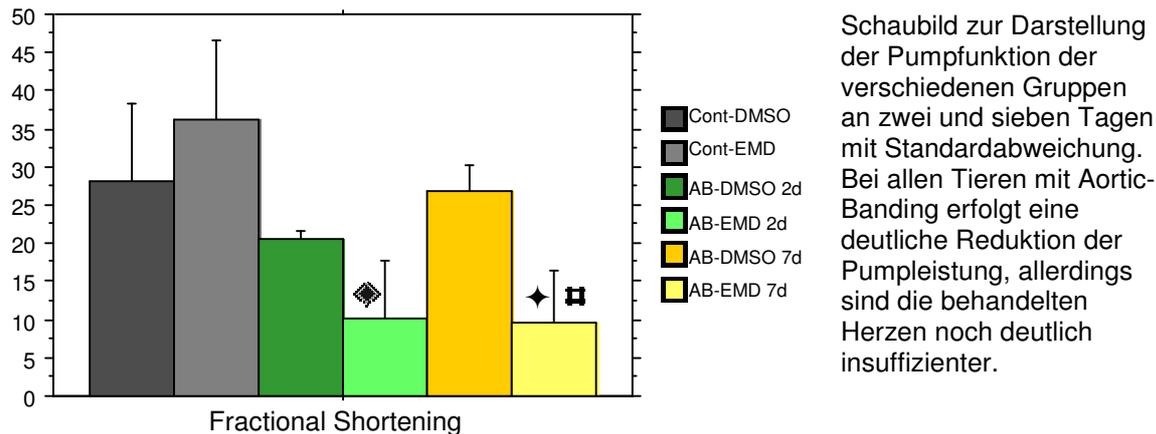


Schaubild zur Darstellung der Pumpfunktion der verschiedenen Gruppen an zwei und sieben Tagen mit Standardabweichung. Bei allen Tieren mit Aortic-Banding erfolgt eine deutliche Reduktion der Pumpleistung, allerdings sind die behandelten Herzen noch deutlich insuffizienter.

Abbildung 30

Signifikanter Veränderungen nach Bonferroni bei einem p-Wert von $p < 0,0033$ beim Vergleich von:

- ◆ AB-EMD-2d vs. Cont-EMD $p = 0,0004$
- ★ AB-EMD-7d vs. AB-DMSO-7d $p = 0,0027$
- AB-EMD-7d vs. Cont-EMD $p < 0,0001$

Abbildung 30 zeigt einige interessante Entwicklungen:

1. Es kommt zu einer, wenn auch nicht signifikanten, verstärkten Pumpleistung in der Kontroll-Inhibitor-Gruppe. Allerdings lies sich kein molekularbiologisches oder morphologisches Korrelat dazu finden – die weiteren Parameter wiesen im Vergleich der Kontrollgruppen keine Unterschiede auf.
2. zeigt sich, dass im Vergleich zu den Kontrollgruppen, bei allen Gruppen zu einer Verminderung der FS kommt, somit zu einer Verminderung der Kontraktilität und damit zu einer zunehmenden Einschränkung der Pumpleistung.
3. vermindert sich die FS in der Gruppe der mit dem Integrin-Inhibitor behandelten Tiere stärker, als in der mit der DMSO-Lösung behandelten; dabei kommt es zu einem Absinken auf 20,70%, bzw. 26,78% in der Gruppe der DMSO-Tiere an zwei bzw. sieben Tagen, sowie auf 10,20% und 9,7% in der Gruppe der Inhibitor-Tiere an zwei und an sieben Tagen. Im Vergleich zur EMD-Kontrollgruppe bedeutet das im Fall der AB-EMD-2d-Gruppe eine signifikante Verminderung um 71,8% und in der Gruppe der 7-Tages-Tiere

eine Verminderung um 73%, bei einem p-Wert von $p = 0.0004$ bzw. $p < 0,0001$

4. kann man erkennen, dass es im Verlauf von zwei nach sieben Tagen in der Gruppe der mit DMSO-Lösung behandelten Tiere ein Wideranstieg der FS eintritt. Dieser Anstieg von 29% ist zwar nicht signifikant, zeigt dennoch, dass in dieser Gruppe die Kompensationsmechanismen greifen, während in der Gruppe der EMD-Tiere die EF erniedrigt bleibt. Dieses Ergebnis deckt sich durchaus mit den beobachteten morphologischen Veränderungen im Zuge der Hypertrophie-Entwicklung

Zusammenfassung:

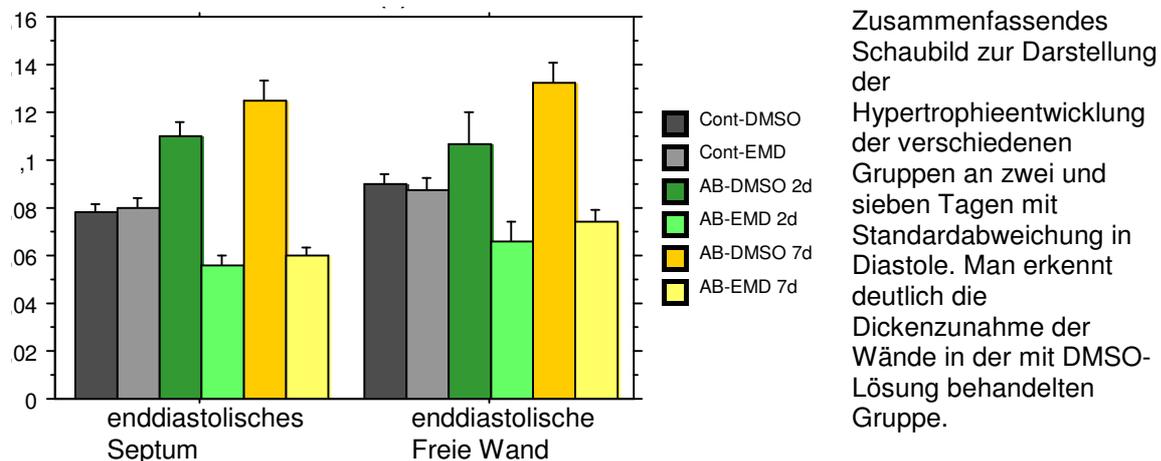


Abbildung 31

Abbildung 31 zeigt noch mal eine Zusammenfassung obiger Ergebnisse, sowohl beim Septum, als auch bei der freien Wand kommt es in der Gruppe der AB-DMSO-Tiere zu einer Dickenzunahme, während sie bei der Gruppe der Inhibitor-Tiere ausbleibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

1. Innerhalb des untersuchten Zeitraums von zwei und sieben Tagen hypertrophieren alle Wandschichten in der Gruppe der AB-DMSO, während
2. die Wandstärken in der Gruppe der Inhibitor-Tiere abnehmen.

3. ähnlich verhält sich die Ejektionsfraktion und damit die Funktonalität der Mäuseherzen; die Tiere, die mit dem α V-Inhibitor behandelt wurden zeigen eine deutlich schlechtere Leistung.

4.3. Histologie

Die Histologie ist eine weitere Möglichkeit strukturelle Veränderungen aufzuzeigen, allerdings sind es nur Momentaufnahmen – differenzierte Aussagen über die Herzfunktion in Systole und Diastole lassen sich nicht treffen. Dennoch sind dieselben Tendenzen wie in der Echokardiographie erkennbar.

Hier wurden folgende Parameter erhoben: Freie Wand, Septumdicke und Ventrikeldurchmesser. Die Angaben sind in cm und mm.

Insgesamt gingen 52 Tiere in die Statistik ein. Folgende Tabelle zeigt die genaue Aufgliederung,

die untersuchten Gruppen waren auch hier:

Gruppe	Anzahl der Versuchstiere
Normal	9
Control-DMSO	9
Control-Inhibitor	10
Aortic-banding-DMSO	bei 2 Tagen 8 bei 7 Tagen 4
Aortic-banding-Inhibitor (AB-EMD)	bei 2 Tagen 8 bei 7 Tagen 4

Tabelle 3

Die folgenden Abbildungen, Abbildung 32 bis Abbildung 34, zeigen histologische Gewebeschnitte der zwei Kontroll-Gruppen und eines normalen Mäuseherzens. Man

kann drei normal konfigurierte Herzen erkennen. Strukturelle Unterschiede sind nicht erkennbar.

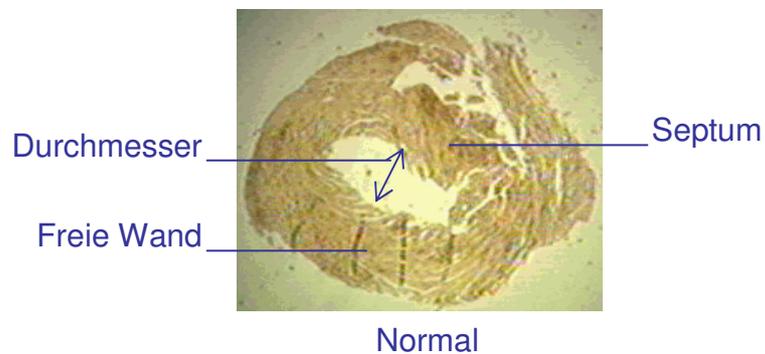


Abbildung 32 Histologische Darstellung eines gesunden, unbehandelten Mäuseherzens

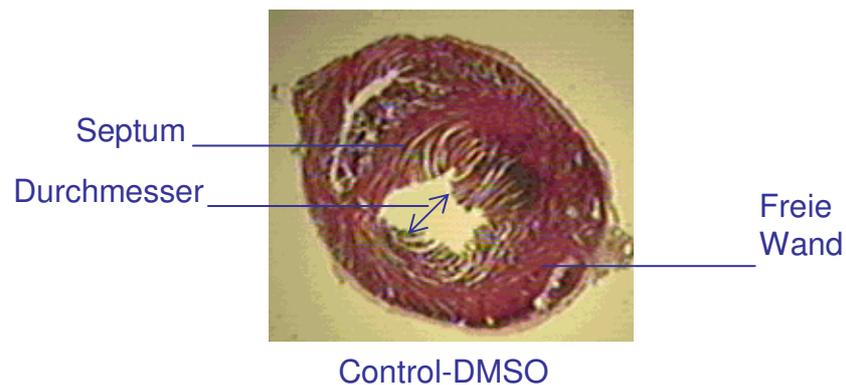


Abbildung 33 Histologische Darstellung eines Herzens aus der Control-DMSO-Gruppe

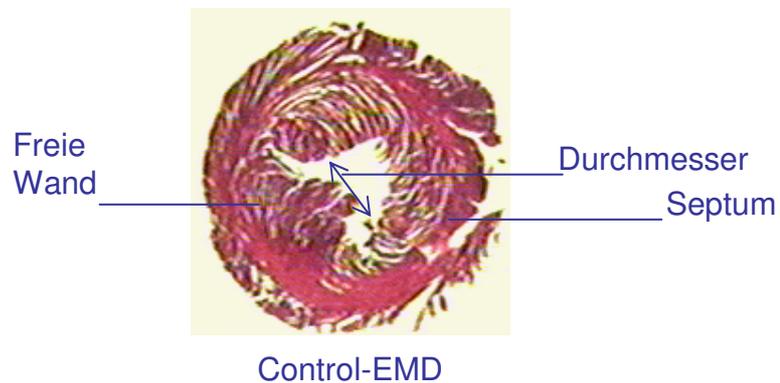


Abbildung 34 Histologische Darstellung eines Herzens aus der Control-EMG-Gruppe

Wie auch in Echokardiographie wurde auch hier auf die gesonderte Darstellung einer „Normal-Gruppe“ verzichtet, da keine morphologischen Unterschiede zu erkennen

waren, was folgendes Schaubild deutlich macht. Im weiteren Verlauf, wurde somit die Normal-Gruppe nicht weiter berücksichtigt. Tabelle 4 zeigt zugehörige Rohdaten:

Gruppen	Durchmesser in cm	Freie Wand in mm	Septum in mm
Normal	1,08	10,8	7,8
Cont-DMSO	1,01	10,1	7,3
Cont-EMD	1,02	10,1	7,6

Tabelle 4 zeigt die ermittelten Durchschnittswerte für die Gruppen Normal, Control-DMSO und Control-EMD

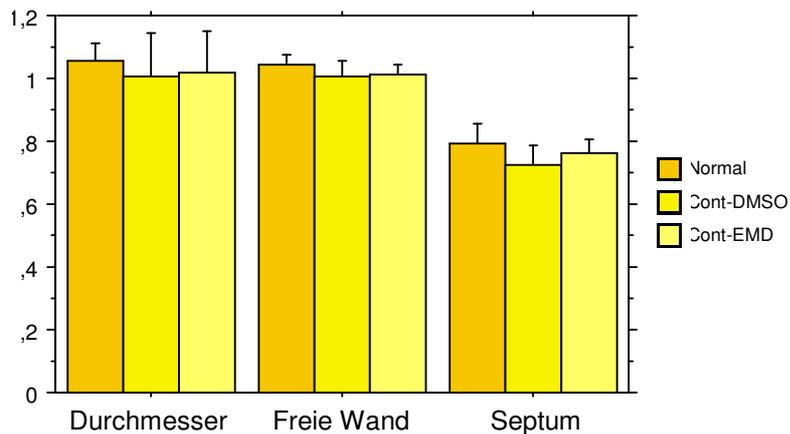


Abbildung 35 die statistische Darstellung der ermittelten Daten zeigt, dass sich in den verschiedenen Gruppen (Normal, Cont-DMSO, Cont-EMD) keine Unterschiede der Wanddicken ergeben.

Tabelle 5 gibt die gemessenen Durchschnittswerte wieder, diese Werte sind Grundlage für die weiteren Schaubilder. Die Daten der Normal-Gruppe wurden auf die Cont-DMSO- und Cont-EMD-Gruppen verteilt.

Gruppen	Durchmesser in cm	Freie Wand in mm	Septum in mm
Cont-DMSO	1,03	10,0	7,6
Cont-EMD	0,99	10,1	7,2
AB-DMSO 2d	0,93	12,1	8,1
AB-EMD 2d	1,73	9,5	6,1
AB-DMSO 7d	0,93	13,6	10,7
AB-EMD 7d	1.35	9,5	7,0

Tabelle 5 gemessenen Durchschnittswerte, Grundlage der folgenden Schaubilder

4.3.1. Septum

Das folgende Schaubild zeigt oben genannte Daten als Balkendiagramm, signifikante Unterschiede ergaben sich keine, allerdings sind durchaus Tendenzen ersichtlich:

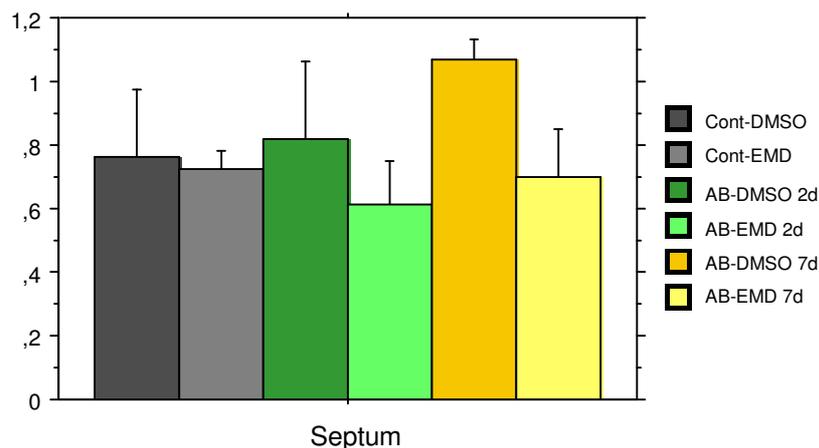


Abbildung 36 Wanddicke des Septums der einzelnen Gruppen in cm

Sowohl im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen, als auch im Vergleich 2 und 7 Tage zeigt sich eine Zunahme der Wanddicke von 0.76 cm in der Gruppe der Cont-DMSO

auf 1,07 cm in der Gruppe der AB-DMSO-7d. Dies entspricht einer Zunahme von 40%.

4.3.2. Freie Wand

Abbildung 37 zeigt das Balkendiagramm für die freie Wand:

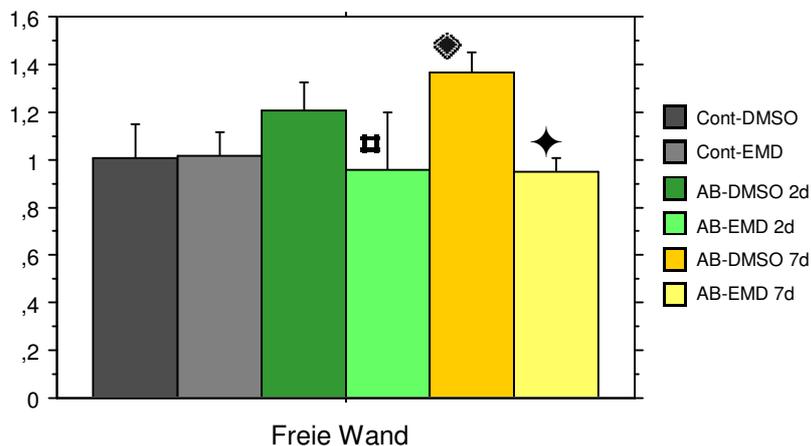


Abbildung 37

Hier ergaben sich signifikante Unterschiede: $p < 0,0033$

■ Im Vergleich der AB-DMSO 2d vs. AB-EMD-2 d liegt ein P-Wert von 0,0017, und damit ein signifikanter Unterschied vor. Während es bei der Gruppe der DMSO-Tiere zu einer Zunahme der Wanddicke kommt, bleibt diese bei den Inhibitor-Tieren aus; dies gilt auch für 7 Tage:

◆ Im Vergleich AB-DMSO-7d vs. AB-EMD-7d kommt es zu einem p-Wert von 0,0004. Vgl. auch Tabelle 5.

◆ Des Weiteren findet sich im Vergleich von Cont-DMSO vs. AB-DMSO-7d ein p-Wert von 0,0003, es kommt also zu einer Zunahme der Wandstärke von 1,00 cm in der Gruppe der Cont-DMSO-Tiere auf 1,36 cm in der Gruppe der 7d-DMSO-Tiere, dies entspricht einer Zunahme von 36%.

4.3.3. Ventrikeldurchmesser

Abbildung 38 stellt ein Balkendiagramm der Ventrikeldurchmesser dar. Auffallend sind zwei signifikante Unterschiede:

◆ Control-EMD vs. AB-EMD-2d mit einem p-Wert von 0,0011, es kommt also zu einer deutlichen Zunahme des Ventrikeldurchmessers um 74% in der Gruppe der Inhibitortiere im Vergleich zur Kontrollgruppe

■ AB-DMSO-2d vs. AB-EMD-2d, während der Ventrikeldurchmesser in der Gruppe der DMSO-Tiere sogar leicht abnimmt (von Cont-DMSO 1,03 cm auf 0,93 cm in der Gruppe der DMSO-Tiere), vergrößert sich der Ventrikeldurchmesser in der Gruppe der Inhibitor-Tiere deutlich. Es liegt ein p-Wert von 0,0007 vor.

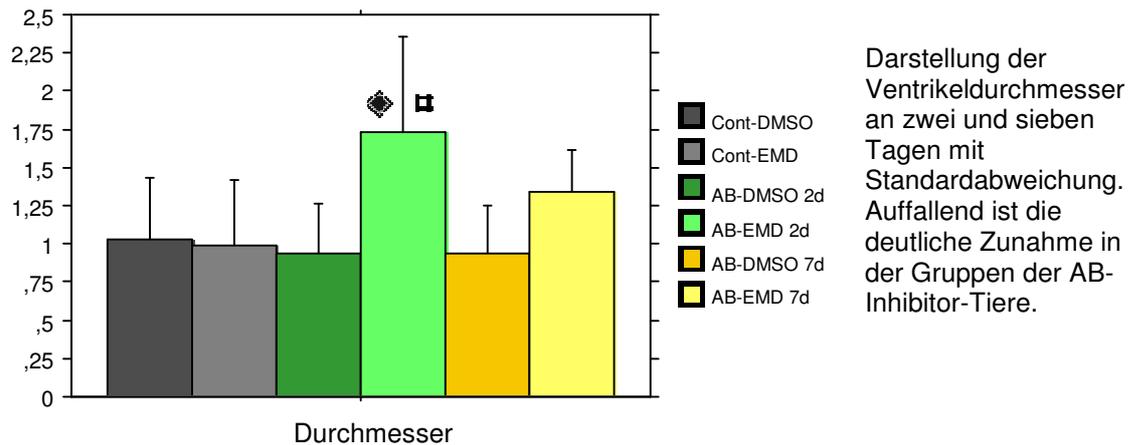


Abbildung 38

Im Gegensatz zu den histologischen Daten liegt echokardiographisch in der 7d-Inhibitor-Gruppe ein geringerer Ventrikeldurchmesser vor. Allerdings sind beide Methoden nicht uneingeschränkt miteinander vergleichbar; in der Histologie ist es nicht möglich die Herzen tatsächlich in der Diastole abzubilden, so sind z.B. „Kontraktionen“ möglich, die die Messergebnisse beeinflussen. Allerdings lassen sich gut tendentielle Entwicklungen darstellen.

Die Abbildungen, Abbildung 39 und Abbildung 40 stellen repräsentative Beispiele der angegebenen Gruppen dar. Man kann die Wandverschmälerung und die Zunahme des Ventrikeldurchmessers deutlich erkennen. Insbesondere beim Vergleich der 7-Tages-Gruppen in Abbildung 42 und Abbildung 41.

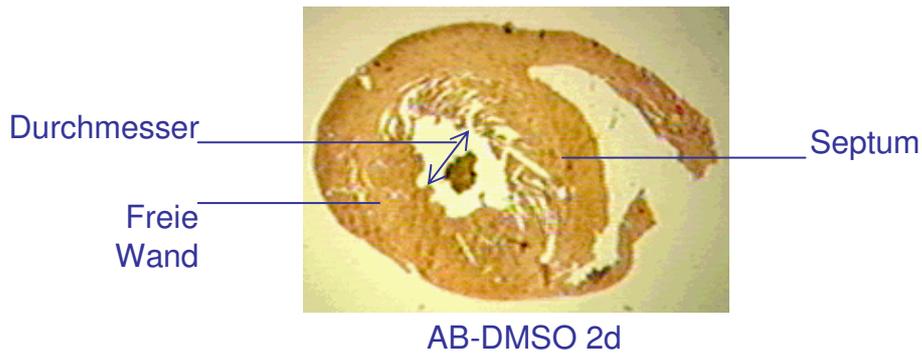


Abbildung 39 Darstellung nach zwei Tagen: signifikante Unterschiede zu denn Kontroll-Gruppen sind nicht erkennbar.

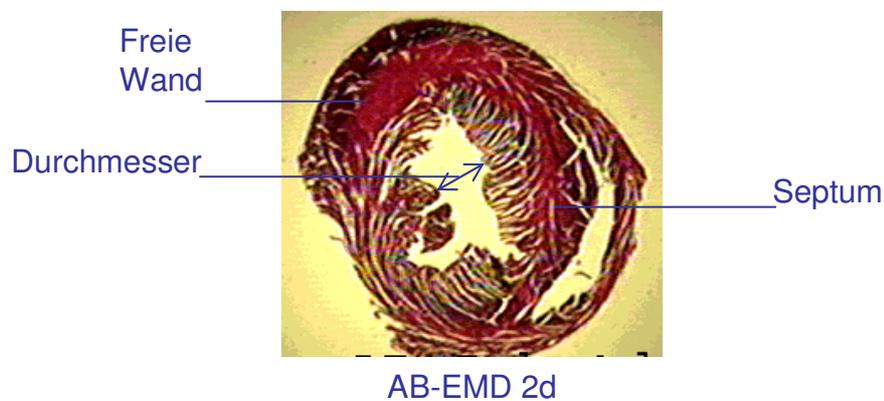


Abbildung 40 nach zwei Tagen sind morphologisch noch keine großen Veränderungen im Vergleich zur AB-DMSO-Gruppe erkennbar

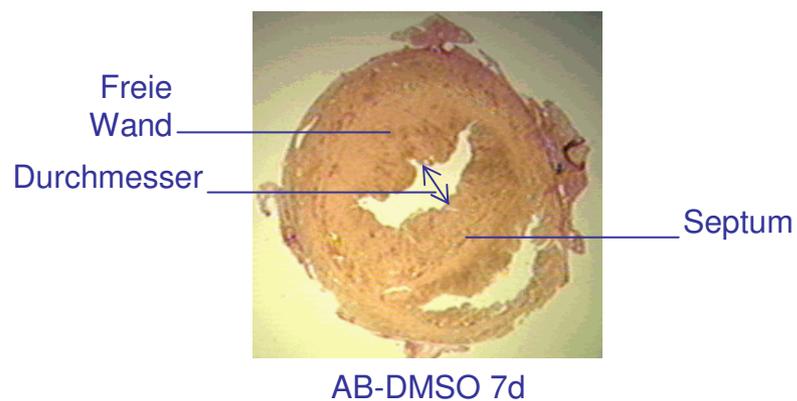


Abbildung 41

Es zeigt sich eine deutliche Hypertrophieentwicklung. Septum und freie Wand haben an Dicke zugenommen und der Ventrikeldurchmesser ist deutlich verkleinert

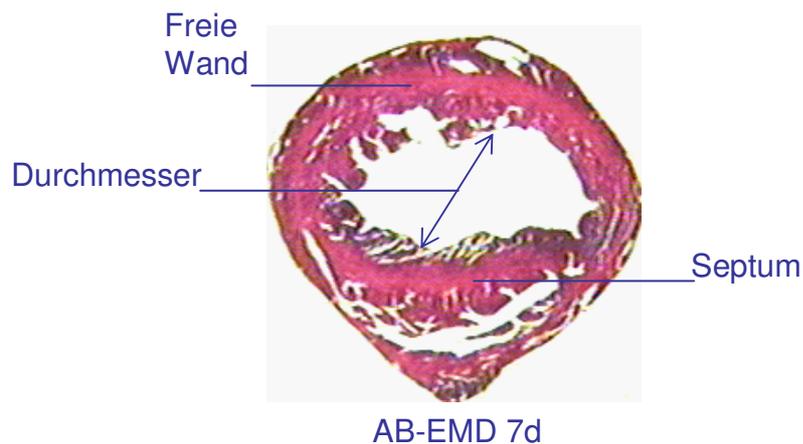


Abbildung 42

Nach sieben Tagen ist die einsetzende Dilatation deutlich zu erkennen, es zeigen sich eine ausgedünnte Wand und eine Zunahme des Ventrikeldurchmessers.

Zusammenfassend:

die Ergebnisse der Histologie decken sich mit den Aussagen, die bereits in der Echokardiographie gemacht wurden:

Die alleinige Gabe des alpha-V-beta-5-Inhibitors bzw. der Kontroll-DMSO-Lösung hat keinen Einfluss auf die strukturellen Gegebenheiten der Mäuseherzen. Septum, Freie Wand und Ventrikeldurchmesser sind gleich konfiguriert.

In der Gruppe der Inhibitor –Tiere kommt es zu einer Verschmälerung der Wanddicken, sowohl von Septum, als auch bei der Freien Wand und zu einer Vergrößerung des Ventrikeldurchmessers

4.4. Proteinanalyse (Western Blot und Immunhistologie)

Neben der Darstellung beobachtbarer Veränderungen in Morphologie und Funktion ist es natürlich auch von Interesse zu ermitteln, welche molekularbiologischen Signalwege bei eben diesen Veränderungen eine Rolle spielen. Unser Augenmerk war auf die bereits bekannte Signalkaskade FAK - ERK gerichtet.

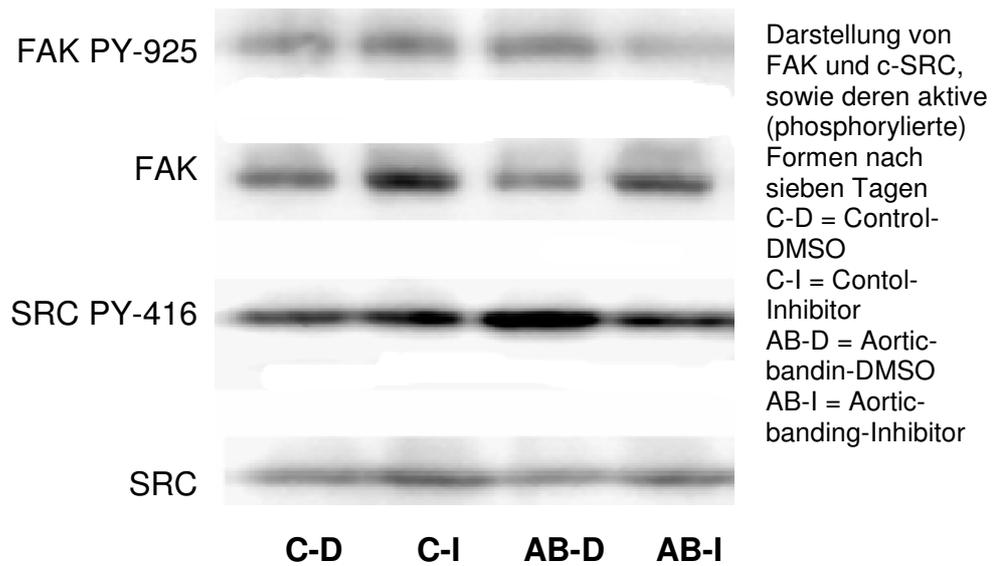


Abbildung 43

FAK und c-SRC:

Die Inhibierung des α .V-Integrins führt zu einer verminderten Aktivierung von FAK und c-SRC; beide Proteine weisen in der Gruppe der Inhibitor-Tiere bei der Phosphorylierten Form (FAK PY-925 und SRC PY-416) ein schwächeres Signal als bei der AB-DMSO-Gruppe auf.

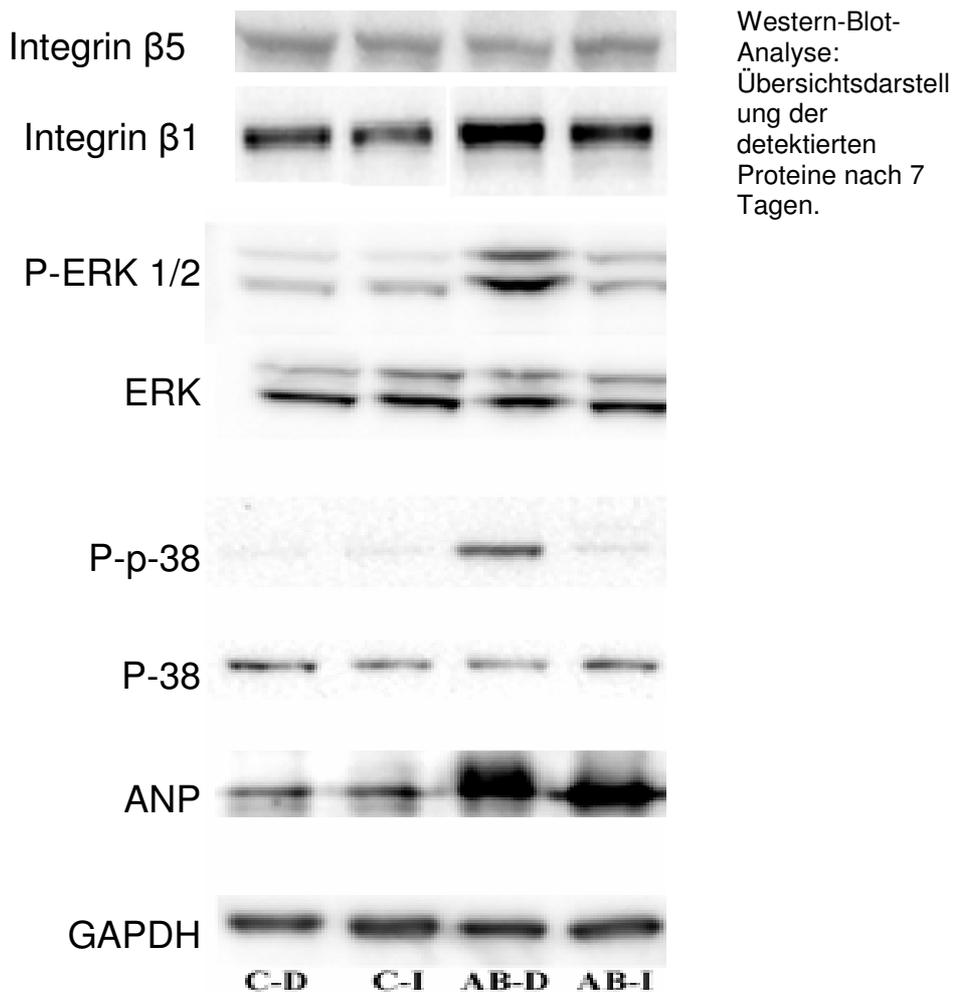


Abbildung 44

Abbildung 44 stellt eine übersichtliche Zusammenstellung der untersuchten Proteine dar, im Weiteren werde ich auf die einzelnen Ergebnisse eingehen:

Integrin β -1:

Nach einem Zeitraum von sieben Tagen kommt es zu einer verstärkten Signalgebung in der Gruppe der AB-DMSO-Tiere wie auch der Inhibitor-Tiere. Die deckt sich mit Vorarbeiten, die unter „Stress“ (Hypertrophieentwicklung) eine verstärkte β 1-Expression nachweisen konnten [99].

Erk 1/2 und p-ERK1/2:

Die Darstellung der normalen Form von ERK zeigt in allen Gruppen eine weitgehend gleiche Signalstärke, demnach ist dieses Protein in jeder Gruppe im gleichen

Ausmaß vorhanden, anders verhält es sich mit der phosphorylierten (und damit aktiven) Form von Erk. In der Gruppe der AB-DMSO-Tiere ist eine deutliche Signalzunahme zu erkennen. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass eben diese Signalwegkaskade aktiv, und mit dem Einsatz des verwendeten Integrin-Inhibitors (Alpha.V) supprimierbar ist, schließlich zeigt die Gruppe der AB-Inhibitor-Tiere eine Signalstärke im Ausmaß der Kontrollgruppen.

p-38 und P-p-38:

Eine konforme Aussage lässt sich auch über das Protein p-38 und seine aktive Form, P-p-38 machen, auch hier zeigen sich oben beschriebene Tendenzen.

ANP:

Das atriale natriuretische Peptid ist ein Polypeptid, welches vor allem von Myozyten des linken Herzvorhofs gebildet und insbesondere durch eine Vorhofdehnung in den Blutkreislauf sezerniert wird. Eine verstärkte Dehnung der Vorhöfe findet sich im Rahmen einer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz, bedingt durch eine erhöhte Druck und/oder Volumenbelastung. ANP stellt somit ein verlässlicher Marker für das Ausmaß einer Hypertrophie oder Insuffizienz dar. Deutlich erhöhte Werte finden sich in beiden Gruppen der Aortic-Banding Tiere, während in beiden Kontrollgruppen eine gleichermaßen normale Signalstärke erkennbar ist.

In unserer Studie wurden die Vorhöfe entfernt, demnach stammt das ANP aus den Ventrikeln.

GAPDH:

Die Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, von welchem keine Konzentrationsschwankungen zu erwarten sind. Es eignet sich somit ausgezeichnet zur Ladekontrolle, also zum Beweis, dass die aufgetretenen Unterschiede der Signalintensitäten tatsächlich auf eine vermehrte Expression oder Aktivität der Proteine zurückzuführen ist, und nicht auf eine fälschlicherweise zu hohe Gesamtproteinkonzentration der Probe. Da das Signal bei allen Gruppen gleich stark ist, wurde auch tatsächlich jeweils die gleiche Gesamtproteinkonzentration geladen.

Immunhistologie:

Die Immunhistologie ist eine weitere Möglichkeit der Proteinanalyse; weniger die Quantifizierung, als vielmehr die Qualität der Proteine steht hier im Vordergrund. Im Folgenden sind nun einige Abbildungen zu sehen, die die Proteine FAK und SRC, sowie deren aktive Formen zeigen. Die Analyse der erstellten Gefrierschnitte erfolgte mittels eines confocalen Lasermikroskopes und der dazugehörigen Computersoftware. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff wird in einer ausgesuchten Ebene durch den Laser punktförmig angeregt.

Hierbei hat man die Möglichkeit einen Zellzusammenhang als Ganzes zu beurteilen, insbesondere in Hinblick auf *wo* detektierte Proteine und Strukturen ansässig sind. Besonders deutlich wird das an FAK – wie schon in der Einleitung beschrieben findet durch die Aktivierung eine Komplexbildung statt, assoziiert an der Zellmembran, wie folgende Bilder deutlich machen. Dabei stellt sich das Aktin der Zellen rot, das gesuchte Protein jeweils grün dar. Der weiße Pfeil stellt jeweils die Lokalisation von FAK an der Gefäßwand, der gelbe Pfeil die Zellmembran dar.

FAK und p-FAK:

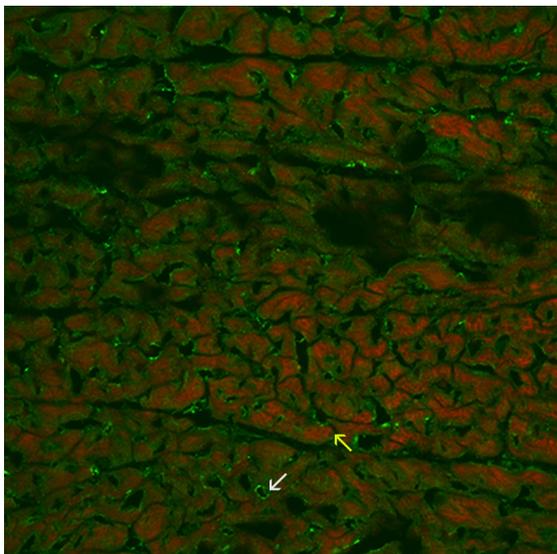


Abbildung 45 Cont-DMSO-FAK

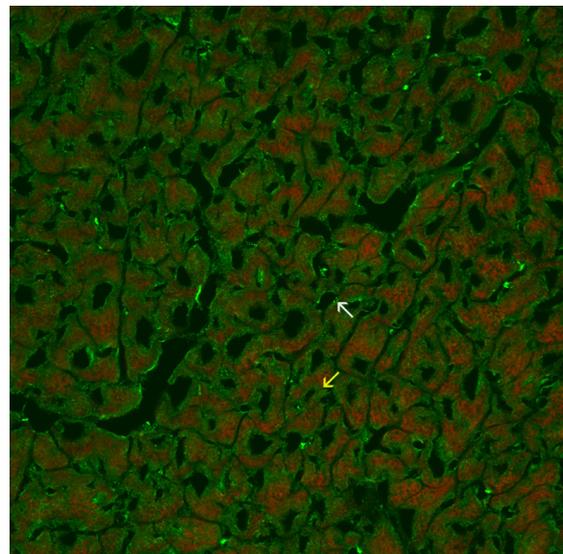


Abbildung 46 Cont-EMD-FAK

Wie man erkennen kann, ist die Signalstärke bei beiden Kontrollgruppen gleichermaßen schwach ausgeprägt. Signifikante Unterschiede sind zwar nicht zu erkennen, dennoch ist das Signal in der Control-Inhibitor-Gruppe (cont-emd-FAK),

wenn auch gering, stärker ausgeprägt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Western-Blot-Analysen, die in dieser Gruppe ebenfalls ein verstärktes Signal nachweisen. Beim Vergleich der phosphorylierten Form von FAK, fällt allerdings auf, dass sich dieser Unterschied nicht fortsetzt. Nachfolgende Bilder zeigen dies deutlich, die Signalstärke ist in beiden Aufnahmen gleich.

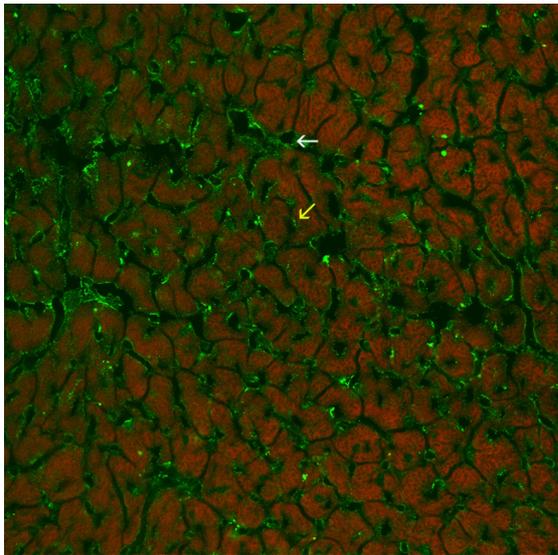


Abbildung 47 Cont-DMSO-FAK-P

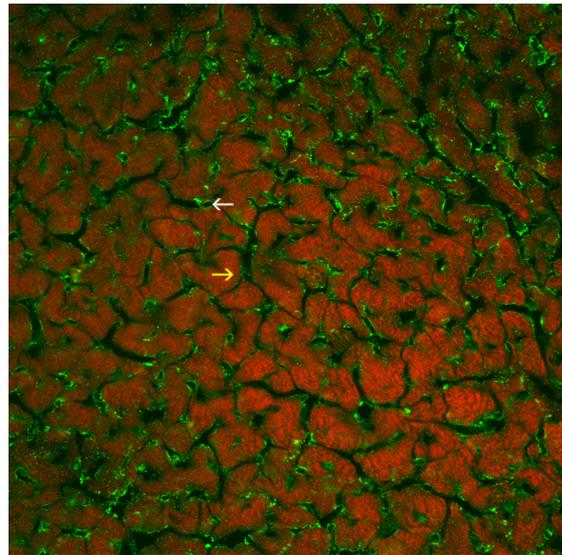


Abbildung 48 Cont-EMD-FAK-P

Die Abbildungen 47 und 48 zeigen die phosphorylierte Form von Fak bei den jeweiligen Kontroll-Gruppen, man erkennt zum einen die wandständige Position von Fak und ein gleichermaßen schwach ausgeprägtes Signal.

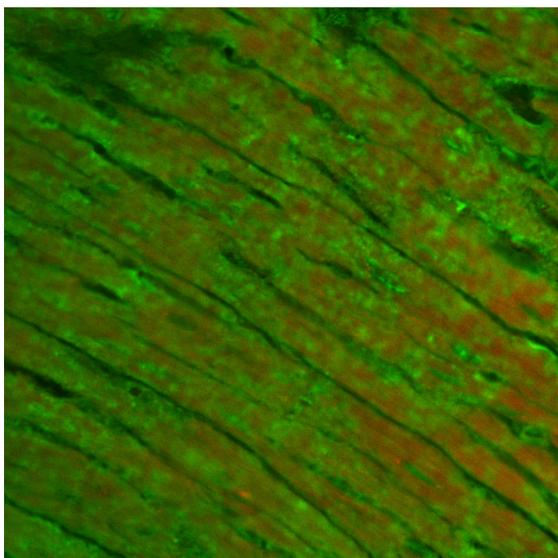


Abbildung 49 AB-DMSO-FAK

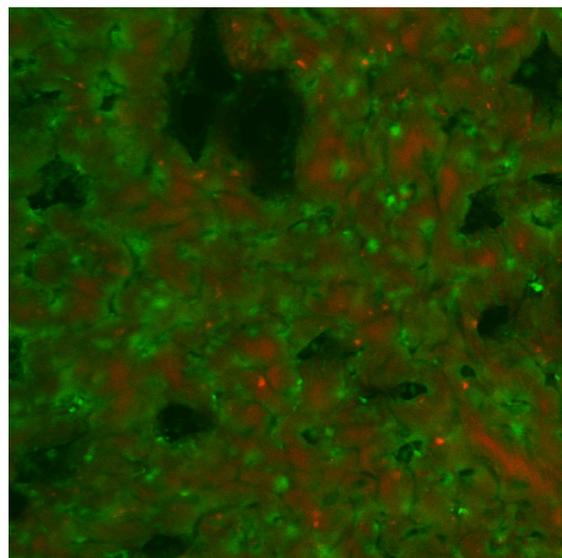


Abbildung 50 AB-EMD-FAK

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die Aortic-Banding-Tiere, auch hier kann man gut die wandständige Position von Fak erkennen. Des Weiteren kann man den Eindruck eines stärkeren Signals in der Gruppe der DMSO-Tiere gewinnen, allerdings deckt sich dieses Ergebnis nicht mit den Ergebnissen der Western-Blots.

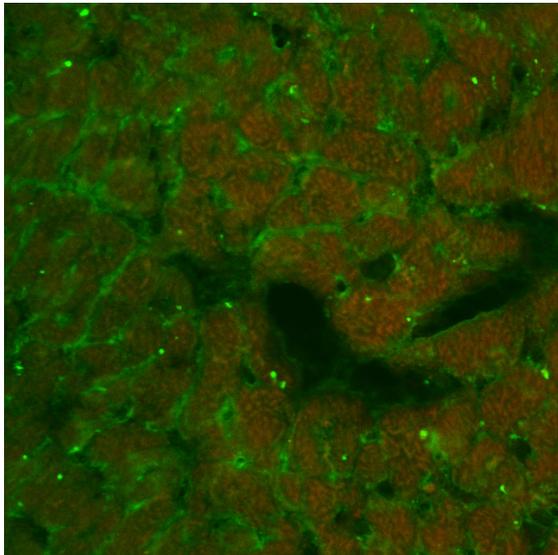


Abbildung 51 AB-DMSO-FAK-P

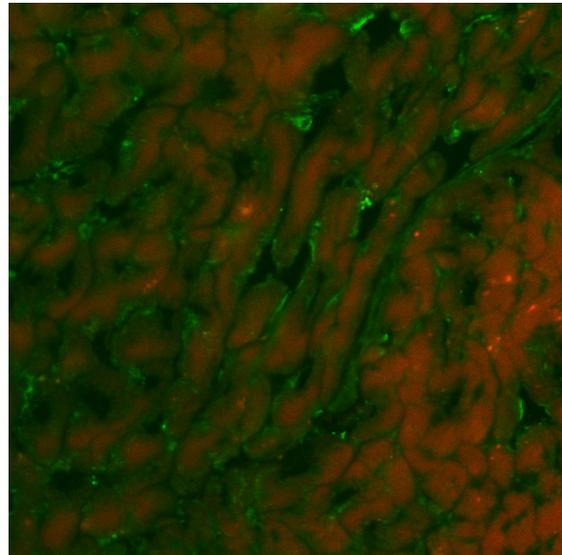


Abbildung 52 AB-EMD-FAK-P

Die Abbildungen 51 und 52 zeigen die phosphorylierte und damit aktivierte Form von Fak. Es zeigt sich in der Gruppe der DMSO-Tiere ein stärkeres Signal. Diese Tendenz war auch mit den Western-Blot-Analysen zu verzeichnen. Fak ist dabei an kardiomyozytärer Zytoplasmamembranen und Gefäßwänden nachweisbar.

SRC und p-SRC:

Ebenfalls von Interesse war die Darstellung von SRC, während in der Western-Blot-Analyse ein geringfügig stärkeres Signal von SRC in der Kontroll-Inhibitor-Gruppe erkennbar ist, konnte das in der Immunhistologie nicht bestätigt werden. Die Signalintensität ist in beiden Kontroll-Gruppen gleich stark. Das Verteilungsmuster entspricht dem von Fak, insbesondere die an kardiomyozytären Zellmembranen (gelbe Pfeile) und Gefäßwänden (weiße Pfeile).

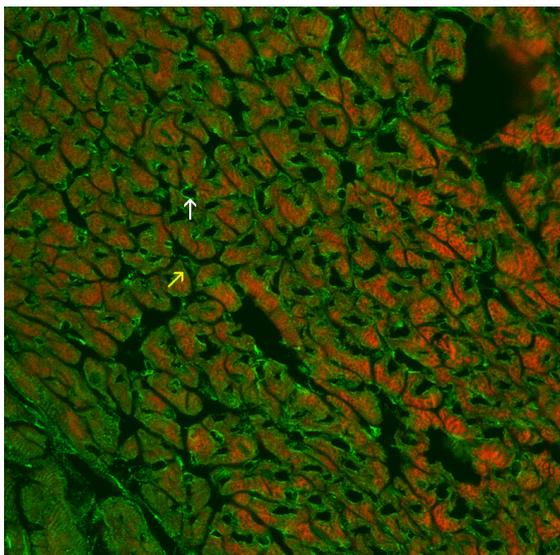


Abbildung 53 Cont-DMSO-Src

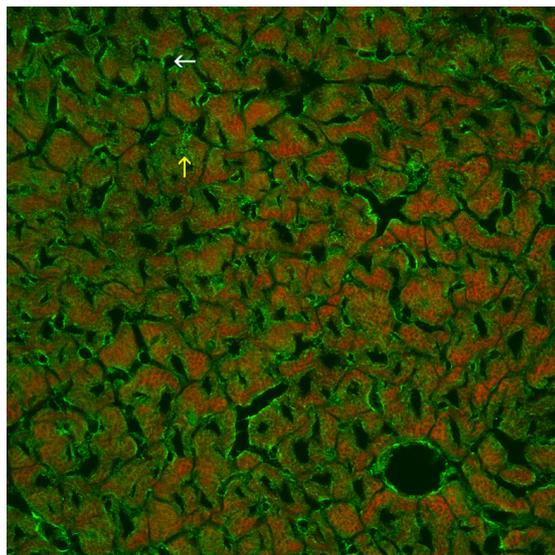


Abbildung 54 Connt-EMD-Src

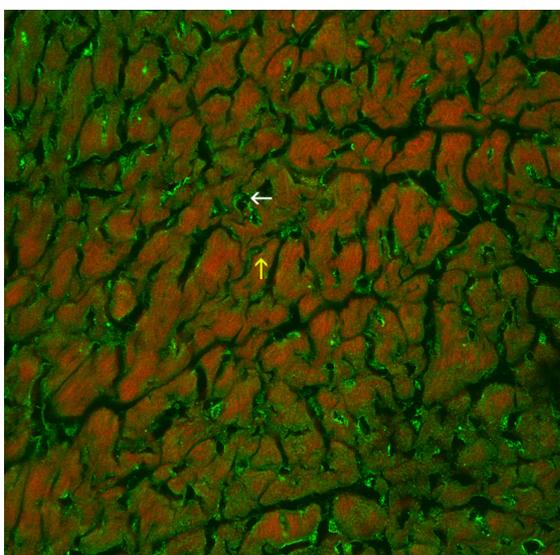


Abbildung 55 Cont-DMSO-Src-p

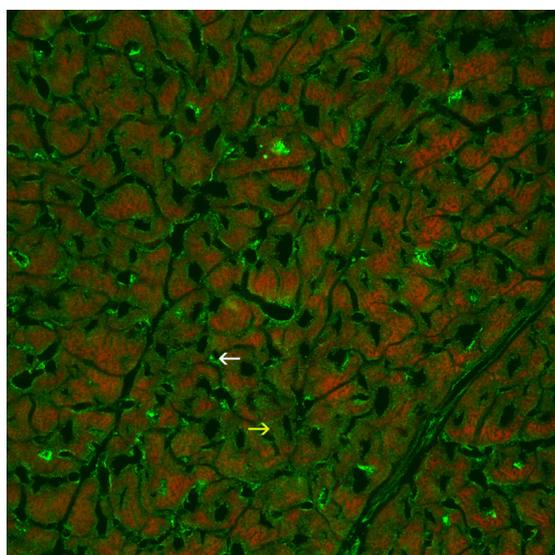
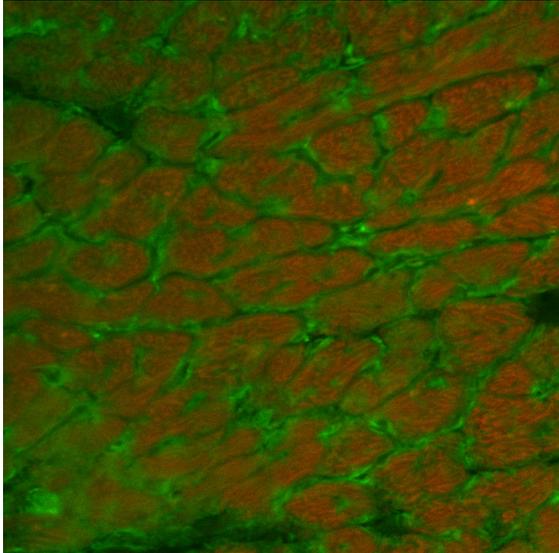
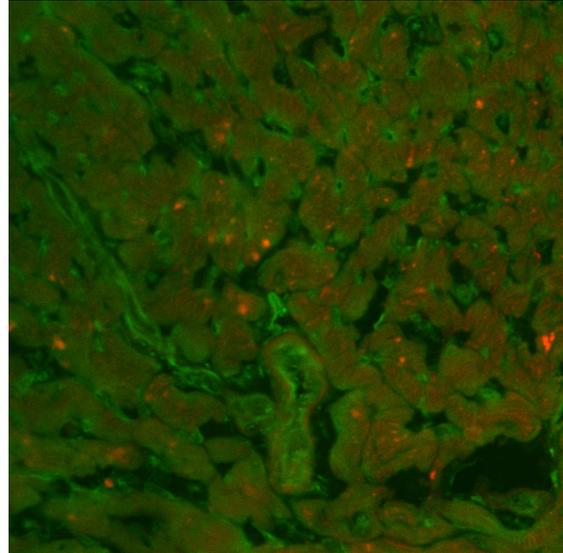
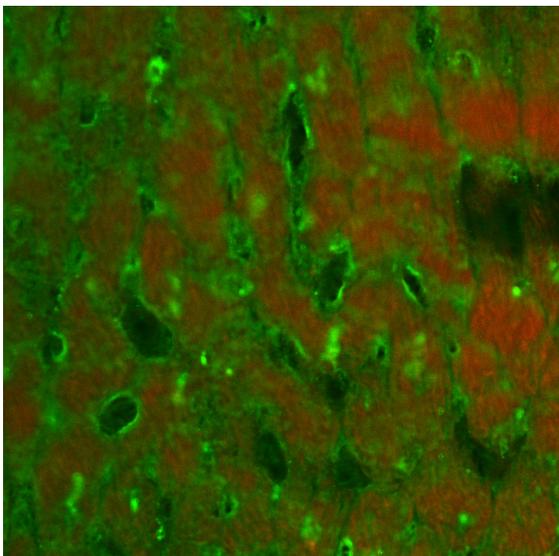
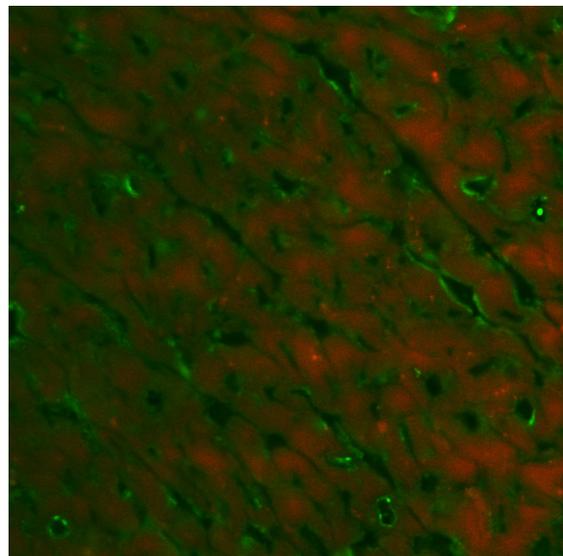


Abbildung 56 Cont-EMD-Src-p

Die phosphorylierte Form von Src zeigt im Western-Blot im Vergleich der Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede – ebenso verhält es sich in der Immunhistologie

**Abbildung 57 AB-DMSO-SRC****Abbildung 58 AB-EMD-SRC**

In den Gruppen der Aortic-Banding-Tiere zeigt sich sowohl in der Gruppe der DMSO-Tiere, als auch in der Gruppe der mit Inhibitor behandelten Tiere ein weitgehend gleiches Ausmaß an Signalintensität bezüglich Src. Die phosphorylierte und damit aktive Form allerdings ist in der Gruppe der DMSO-Tiere deutlicher signalintensiver. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Westernblott-Analysen. Auch im Vergleich mit den Kontroll-Gruppen, ist in der Gruppe der AB-DMSO-Tiere eine verstärkte Signalgebung zu verzeichnen.

**Abbildung 59 AB-DMSO-SRC-P****Abbildung 60 AB-EMD-SRC-P**

4.5. Mortalitätsstatistik

Ebenfalls von Interesse ist die Frage nach der Sterblichkeit. Folgende Tabelle verdeutlicht die Resultate.

Interessanterweise verstarb in der Gruppe der mit dem Integrininhibitor behandelten Tiere nahezu die Hälfte, (43,5 %), während in der Gruppe der nur mit DMSO behandelten Tiere 17,6% verstarben. (Die %-Angaben sind jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl nach dem 1. postoperativen Tag.)

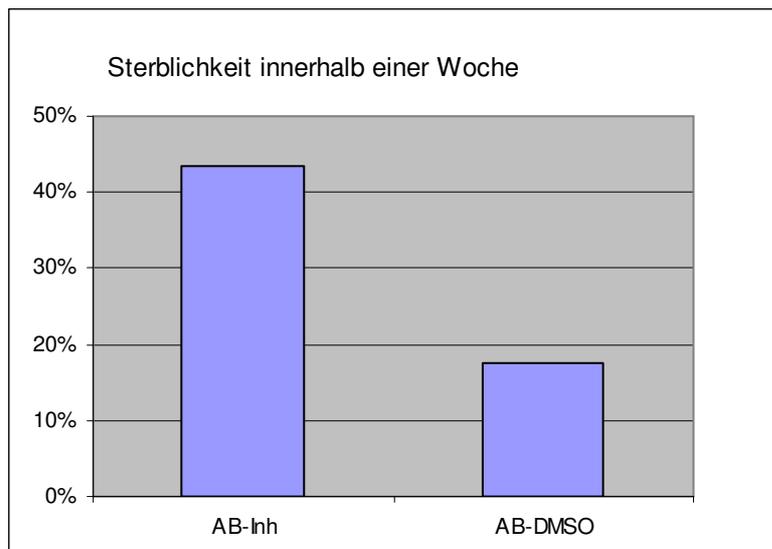


Abbildung 47 zeigt eine s.g. Mortalitätsstatistik. 43,5% der mit dem Integrininhibitor behandelten Tiere verstarben innerhalb einer Woche

Abbildung 61

Nicht aufgeführt sind die Kontrollgruppen, da der alleinige Einsatz des Inhibitors, bzw. der DMSO-Lösung mit einer Mortalitätsrate von 0% einherging.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibierung des Integrins α_V zu folgenden Punkten führt:

1. die kompensatorische Hypertrophieentwicklung des linken Ventrikels bleibt aus, bzw. sie wird deutlich reduziert
2. die Echokardiographie-Befunde weisen eine deutliche Einschränkung der linksventrikulären Kontraktilität auf.
3. deutliche Zunahme der postoperativen Mortalität
4. es liegt eine α_V -Integrinabhängige Aktivierung bzw. Deaktivierung von Fak, Src, p-ERK1/2, p-38 vor.

5. Diskussion

Die zentrale Frage unserer Studie war, welchen Einfluss die suffiziente Hemmung der α V-Integrin-Fraktion auf Morphologie, Funktion und aktive Signalwegskaskaden bei einer Aortenkonstriktion hat. Das verwendete Modell, war ein Mausmodell und ist somit natürlich nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar, dennoch liefert es wichtige Hinweise um grundlegende Mechanismen zu erfassen. Es lies sich nachweisen, dass eine suffiziente Blockade der α V-Integrine (bzw. der mit α V assoziierten Integrin-Rezeptoren) zu einer deutlich verminderten Hypertrophieentwicklung und zu einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion führt. Des Weiteren stand die Frage, welche Signalwegskaskaden bei der Hypertrophieentwicklung aktiv sind, im Mittelpunkt unseres Interesses.

Morphologie:

Um das Ausmaß einer einsetzenden Hypertrophieentwicklung zu erfassen, erfolgte von uns die Erhebung morphologischer Daten. Dabei wurden Herzgewicht, Körpergewicht, Tibialänge und daraus resultierende Quotienten bestimmt, (Herzgewicht/Körpergewicht und Herzgewicht/Tibialänge). Diese Parameter können als indirekte Marker für eine Hypertrophieentwicklung gewertet werden und fanden auch in anderen Studien Anwendung [110] [136] [137].

Wie erwartet zeigte sich bezüglich der Tibialänge keine signifikante Änderung innerhalb des untersuchten Zeitraums von sieben Tagen, demnach sind alle Tiere im gleichen Entwicklungsstand. Eine mögliche Änderung der Tibialänge wäre bei einer Untersuchung über einen längeren Zeitraum zu erwarten.

Bezüglich des Körpergewichts der Tiere treten innerhalb der untersuchten Gruppen keine signifikanten Änderungen auf, eine scheinbare Gewichtsabnahme in der Gruppe der 2d-AB-EMD-Tiere ist nicht signifikant.

Teilweise überraschend ist die tendentielle Entwicklung des Herzgewichtes in der Gruppe der 7d-Tiere; es kommt zu einer, wenn auch nicht signifikanten Zunahme. Dies ist vorbeschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen von z.B. Rockman, der eine Zunahme von bis zu 41% sieben Tage nach Aortic-Banding Allerdings wäre, auch in Hinblick auf die folgenden Ergebnisse, in der Inhibitorgruppe mit einer verminderten Zunahme oder sogar Reduktion des Herzgewichtes zu rechnen, da Echokardiographisch und histologisch verminderte Wanddicken nachgewiesen werden konnten. Bei unserer Untersuchung kam es zu einer Zunahme des

Herzgewichtes von durchschnittlich 109 mg in der Gruppe der Cont-EMD-Tiere auf 129 mg in der Gruppe der AB-EMD-Gruppe, ein Zuwachs von 18%.

Auch bei den sich daraus ableitenden Quotienten HW/BW

(Herzgewicht/Körpergewicht) und HW/Tibia (Herzgewicht/Tibiallänge) ist eine entsprechende Erhöhung zu verzeichnen. In der Gruppe der 7d-AB-EMD-Tiere kommt es im Vergleich zur Cont-EMD-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des HW/BW-Quotienten auf durchschnittlich 5,38, dies macht eine Steigerung um 26% aus.

Choi konnte sieben Tage nach Druckbelastung durch Aortic Banding bei Mäusen eine Zunahme des Quotienten aus linkem Herzventrikel und Körpergewicht von 34 % verzeichnen. Die beschriebenen Unterschiede dieser Arbeiten zu unseren Ergebnissen ist teilweise auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden zurückzuführen, so betrachtete Choi isoliert den linken Ventrikel, während wir das totale Herzgewicht bestimmten.

Die signifikante Erhöhung des HW/BW-Quotienten in der Gruppe der Inhibitortiere ist überraschend und deckt sich nicht mit den Ergebnissen der Histologie und Echokardiographie, die eine deutliche Abnahme der Wandstärken beschreiben.

Nun muss man relativierend erwähnen, dass es zu einem Anstieg des Quotienten nicht nur durch die Zunahme des Herzgewichts möglich ist, sondern auch durch die Abnahme des Körpergewichts. Bei unserer Untersuchung zeigte sich eine, wenn auch nicht signifikante Abnahme des Körpergewichtes, sodass eine Zunahme des Quotienten auch teilweise darauf zurück zu führen ist. Ein vermindertes Körpergewicht der Tiere nach sieben Tagen könnte z.B. durch „postoperativen Stress“ (Pumpenimplantation, Aortic-Banding) bedingt sein. Insbesondere unter Berücksichtigung des HW/Tibia-Quotienten bzw. dessen Entwicklung während des gegebenen Zeiraums von sieben Tagen, zeigt sich, wie anfällig der HW/BW-Quotient bezüglich postoperativen Gewichtsveränderungen gegenüber ist. Eine „echte“ Zunahme des Quotienten durch eine myokardiale Hypertrophieentwicklung würde sich in einer entsprechenden Entwicklung des HW/Tibia-Quotienten widerspiegeln. In unserer Versuchsreihe zeigte sich keine signifikante Zunahme des HW/Tibia-Quotienten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen. Allerdings ist eine signifikante Zunahme des Quotienten im Vergleich der DMSO-Tiere an zwei und an sieben Tagen zu verzeichnen. Diese Entwicklung ist durchaus mit einer isolierten

kardialen Gewichtszunahme zu erklären, da die Tibialängen bei allen Gruppen konstant blieben.

Zur Erfassung einer möglichen Herzinsuffizienz wurde das Lungengewicht bestimmt. In der Gruppe der DMSO-Tiere, wie auch in der Gruppe der Inhibitor-Tiere an zwei Tagen steigt das Lungengeicht signifikant von 148,4 mg (Cont-DMSO) auf 231,5 mg (2d-AB-DMSO), dies entspricht einer Zunahme um 56%, bzw. von 138,6 mg (Cont-EMD) auf 223,3 mg (2d-AB-EMD), Zunahme um 61%.

Diese Entwicklung kann im Rahmen einer akuten kardialen Dekompensation mit der Entwicklung eines Lungenödems interpretiert werden. Im weiteren Verlauf (sieben Tage) sind wieder geringere Lungengewichte zu verzeichnen. Auch der entsprechende Quotient aus Lungengewicht zu Körpergewicht zeigt eine entsprechende Tendenz auf, die auf eine Zunahme des Lungengewichtes zurückzuführen ist, da das Körpergewicht der Tiere der unterschiedlichen Gruppen relativ konstant ist. Es zeigt sich eine Zunahme des Quotienten um 82 % in der Gruppe der 2d-AB-DMSO-Tiere im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Weitere signifikante Änderungen sind nicht festzustellen. Des Weiteren zeigt sich eine tendentielle Abnahme des Quotienten im Verlauf der sieben Tage – demnach könnte von einer „natürlichen Rekompensation“ nach Überstehen der Akutphase ausgegangen werden.

5.1. Herzechokardiographie

Wie schon in Punkt 2.12 erläutert, stellt diese Methode einen sehr eleganten Weg dar, um Ergebnisse über Funktion und Morphologie am schlagenden Herzen zu erheben. Auch hat man in der Zwischenzeit genügend Erfahrung mit dem Einsatz dieser Methode um verlässliche Aussagen über Funktion und Morphologie treffen zu können. Kanno und Gao [135, 138] untersuchten dabei die Entwicklungen an infarzierten Mäuseherzen. Kanno konnte zeigen, dass die echokardiographisch erhobenen Daten bezüglich Ventrikeldurchmesser, Wanddicke und Infarktgröße konform zu den konventionell histologisch erhobenen Werten sind.

Gao et al untersuchten Mäuse echokardiographisch nach 1, 2½, 6 und 9 Wochen nach Setzen eines Infarktes durch Verschluss der linken Koronararterie. Es wurde dabei verschiedene Wanddicken (Freie Wand, Septum, usw.) enddiastolisch und

endsytolisch betimmt, wie auch das sogenannte *fractional shortening* (FS). Als Vergleichsgruppe dienten scheinoperierte Tiere, welchen lediglich der Torax eröffnet, aber kein Infarkt gestetzt wurde. Die Postinfarkt-Mortalität war dabei groß, 46% der Versuchstiere verstarben, in erster Linie an akutem Herzversagen oder Ventrikelruptur. Bei den scheinoperierten Tieren blieben die linksventrikulären Parameter (Wanddicke, Septum, FS) stabil, während in der Gruppe der Infarkttiere eine deutliche Einschränkung der linksventrikulären Funktion (Rückgang des FS), sowie eine ausgeprägte Dilatation des linken Ventrikels zu verzeichnen war. Später, zu den Zeitpunkten 2½ - 9 Wochen kam es zu einer Zunahme der linksventrikulären Wanddicken (in der Diastole zwischen 50% - 66% und in der Systole 124% - 171%) bei weiterhin eingeschränkter Funktion.

Natürlich sind diese Ergebnisse nur bedingt mit unseren zu vergleichen, zum einen auf Grund der unterschiedlichen Modelle, wie auch auf Grund der unterschiedlichen Zeiträume. Dennoch zeigt sich die gleiche Tendenz zur Dilatation nach einer Woche.

Im Vergleich dazu untersuchte die Arbeitsgruppe um Liao et al. [139] echokardiographisch die linksventrikuläre Hypertrophieentwicklung, sowie Funktion am Mausmodell nach Aortenkonstriktion (TAC transverse aortic constriction). In diesem Modell wurde echokardiographisch der Verlauf der Hypertrophieentwicklung über einen Zeitraum von 4 – 11 Wochen beobachtet, und morphologische Parameter, wie z.B. Lungengewicht/Körpergewicht bestimmt. Die Gesamt-Mortalitätsrate betrug 30,32% und war in erster Linie auf ein akutes bis subakutes Herzversagen zurück zu führen, was sich in einem deutlichen Anstieg des LW/BW-Quotienten zeigte. In unserer Studie (wobei die Zeiträume allerdings geringer sind) zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Quotienten, wie bereits zuvor beschrieben.

Wie auch bei uns wurden die verschiedenen Wandparameter (Dicke der posterolateralen Wand, Septumdicke und Ventrikeldurchmesser in Systole und Diastole) bestimmt: Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg auf durchschnittlich 0,11 cm in der Diastole und 0,135 in der Systole nach einem Zeitraum von 2–11 Wochen. In unserer Studie waren ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen. Während zunächst die Wanddicke an zwei Tagen weitgehend konstant bleibt (bzw. in der Gruppe der Inhibitor-Tiere sogar eine Verschmälerung eintritt) kommt es nach einer Woche zu einem signifikanten Anstieg; sowohl in Diastole, als auch in Systole im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe (Systole: Cont-DMSO = 0,12 cm, AB-DMSO-7d =

0,17cm; Diastole: Control-DMSO = 0,09, AB-DMSO-7d = 0,13 cm). Es zeigt sich sehr deutlich, dass der Einsatz des Inhibitors mit einer reduzierten Hypertrophieentwicklung, bzw. sogar mit einer „Ausdünnung“ im Rahmen einer Dilatation einhergeht.

Konforme Aussagen lassen sich auch über die weiteren Parameter Septumdicke und linksventrikulärer Durchmesser in Systole und Diastole machen: bei den mit DMSO-Lösung behandelten Tieren kommt es schon nach zwei Tagen zu einer Dickenzunahme des Septums, sowohl in Systole, als auch in Diastole, während dieser Effekt bei den Inhibitor-Tieren ausbleibt, bzw. sogar noch eine Verschmälerung im Vergleich mit entsprechender Inhibitorgruppe eintritt. Die durchschnittliche Septumdicke an sieben Tagen in Diastole beträgt bei den Inhibitor-Tieren 0,06 cm, in der Gruppe der DMSO-Tiere 0,13 cm. Dies entspricht einem Plus von 62,5% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ein Parameter, der zur Bestimmung der linksventrikulären Funktion verwendet werden kann, ist der linksventrikuläre Durchmesser in Diastole und Systole. Ein geringer Durchmesser in der Endsystole und Enddiastole spricht für eine Hypertrophie, während ein großer Durchmesser, wie er z.B. im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie zu sehen ist, eher für ein dilatiertes Herz und eine schlechte Pumpleistung spricht. Liao et al beschreibt z.B. eine initiale Abnahme des linksventrikulären Durchmessers in Sys- und Diastole zu dem Zeitpunkt von zwei Wochen. Später kommt es zu einem signifikanten Anstieg des LV-Durchmessers auf 0,45 cm in der Diastole bzw. 0,4 cm in der Systole. Wir konnten eine ähnliche Tendenz, wenn auch nicht signifikant in der Gruppe der 7d-AB-DMSO verzeichnen, auch bei uns liegt nach einer Woche ein verminderter Ventrikeldurchmesser vor. Interessant ist allerdings die Entwicklung der Inhibitor-Tiere – hier kommt es zu einer deutlichen Zunahme des Durchmessers. Der durchschnittliche Wert beträgt 0,34 cm systolisch und 0,38 cm in der Diastole. Dies kann durchaus im Rahmen einer mangelnden Hypertrophieentwicklung, bzw. sogar als Dilatation interpretiert werden.

Deutlich wird diese Entwicklung insbesondere in Hinblick auf die verminderte Pumpleistung. Das Fractional Shortening sinkt auf 9,7% nach 7d und Inhibitor-Behandlung; normal: 28-36%. Insgesamt konnte eine Verminderung um bis zu 73% festgestellt werden (EMD-Kontrollgruppe vs. AB-EMD-7d).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Aktivierung der α V-Fraktion bei den Prozessen einer Hypertrophieentwicklung durchaus eine bedeutende Rolle spielt, da eine Hemmung von α V mit einer kardialen Funktionseinschränkungen und morphologischen Veränderungen einhergehen.

5.2. Histologie

Die Erstellung histologischer Bilder ist schon lange eine beliebte und etablierte Methode Strukturen und morphologische Veränderungen darzustellen. Wir konnten die echokardiographisch erhobenen Daten histologisch verifizieren. Wie erwartet kam es im Bereich des Septums und der freien Wand zu einer Zunahme der Wandstärke in der Gruppe der mit DMSO-Lösung behandelten Tiere. Interessanterweise setzt die Hypertrophieentwicklung schon recht früh ein – bereits nach einer Woche sind signifikante Unterschiede im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen nachweisbar, beispielsweise eine Zunahme der Wandstärke der „Freien Wand“ um 36% in der Gruppe der 7d-DMSO-Tiere. Echokardiographisch konnten wir sogar eine Zunahme um 44% der Wandstärke der „Freien Wand“ nachweisen. Damit sind folgende Schlussfolgerungen zulässig: echokardiographisch erhobene Daten decken sich mit den konventionell erhobenen histologischen Daten, die Echokardiographie ist somit als Methode durchaus verwertbar. Zweitens besitzt die Echokardiographie den Vorteil, Aussagen über schlagende Herzen und damit die Funktion machen zu können, denn so anschaulich histologische Bilder auch sind, sie sind statisch und technik-bedingt mitunter reich an Artefakten. Gerade bei Organsystemen, die physiologischer Weise Unterschiede bezüglich bestimmter Parameter aufweisen (wie z.B. der linksventrikuläre Durchmesser in Sys- und Diastole), können mitunter Abweichungen gegenüber anderen Untersuchungsergebnissen auftreten. So liegt histologisch in der Gruppe der 7d-AB-Inhibitor-Tiere ein geringerer Durchmesser als bei der 2d-AB-Inhibitor-Gruppe vor; echokardiographisch verhält es sich umgekehrt. Zurück zu führen ist dieses Ergebnis auf die Einschränkungen der Technik, dennoch kann die Histologie als abschließende Methode verstanden werden, ein gezeichnetes Bild zu vervollständigen.

5.3. Proteinanalyse

Westernblotanalyse:

Neben der Darstellung beobachtbarer Veränderungen in Morphologie und Funktion ist es natürlich auch von Interesse zu ermitteln, welche molekularbiologischen Signalwege bei eben diesen Veränderungen eine Rolle spielen. Unser Augenmerk war auf die bereits bekannte Signalkaskade FAK - ERK gerichtet, bzw. welche Entwicklungen sich bei einer suffizienten Hemmung der α V-Integrine ergeben.

Fak und c-SRC

Wie schon in der Einleitung dargestellt spielt die Fokale Adhäsionskinase Fak (bzw. der im Folgenden entstehende Komplex FAK) eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion, wie auch bei der Entwicklung einer Hypertrophie. Zahlreiche Arbeiten haben sich bereits damit beschäftigt: [128] [122] [103] [140] nachgewiesener Maßen kommt es durch unterschiedlichste Faktoren zu einer Aktivierung von Fak, dazu zählen Mechanischer Wandstress durch (Rechts)herzbelastung [128] [122], integrin-aktivierende Liganden [129] sowie einige nicht-ECM-Bestandteile wie Endothelin, Gastrin, Bombesin und Angiotensin II [141-143].

Vorarbeiten von Laser et al. [122] beinhalteten zwei Modelle: zum einen wurde ein Zellkulturmodell angewandt, wobei adulte Kardiozyten von Katzen auf einer lamininhaltigen Matrix kultiviert wurden („zwei-dimensionales Model“), sowie ein „drei-dimensionales Model“, in welchem die Zellen in eine Typ-I-Kollagen-Matrix eingebettet wurden.

Beim ebenfalls verwendeten Tiermodell wurden Katzen die Pulmonalarterie teilweise eingeeengt, (banding) sodass sich eine Rechtsherzbelastung ergab. Die Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten, nach 4h, 48h und einer Woche zeigten einen deutlichen Anstieg von Fibronektin und Vitronektin im rechten Ventrikel gegenüber dem linken. (Beide ECM-Proteine interagieren bekanntermaßen bevorzugt mit α 5 β 1 und α V β 3). Auch hier kam es zu einem deutlichen Anstieg von FAK, bzw. dem Ausmaß der Phosphorylierung, wie auch von Src und p130Cas. Das interessante ist der zweite Teil des Versuchs: die Zellkulturen wurden mit einem künstlichen RGD-Peptid behandelt, welches die Fibronektin/Vitronektin-Sequenz Arg-

Gly-Asp beinhaltet. Die zwei-dimensionale Zellkultur zeigte auf die Behandlung mit diesem Peptid eine nur sehr geringe Aktivierung der Signalwegskaskade, im Gegensatz zu der 3-dimensionalen (in Kollagen eingebetteten) Zellkultur. Hier konnten ähnliche Ergebnisse wie in den in vivo-Untersuchungen gefunden werden. Bei unseren Untersuchungen wurde, wie schon mehrfach erwähnt ein spezifischer α V-Inhibitor eingesetzt: Die Frage ist nun, in wie weit diese bedeutende und mehrfach beschriebene Signalwegskaskade „FAK-Src-MAP-Kinasen“ durch den Einsatz eben diesen unterdrückt werden kann. Wir verwendeten, wie in den Vorarbeiten auch einen für die phosphorylierte Form von FAK spezifischen Antikörper (FAK PY-925). Wir konnten zeigen, dass es unter dem Einsatz des Inhibitors in der Gruppe der Aortic-banding-Tiere zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von FAK kommt. Ebenso verhält es sich mit der Kinase Src. In der direkten Vergleichsgruppe hingegen, also in der Gruppe AB-DMSO (DMSO-Lösung anstelle des Inhibitors) war die Signalkaskade wie vorbeschrieben aktiv. Demnach ergibt sich folgende Schlussfolgerung: α V-Integrine sind durchaus an der Entwicklung einer Hypertrophie beteiligt, und spielen eine ebenso bedeutende Rolle wie β 1 oder β 3 [89].

Eine interessante Entwicklung ist allerdings in der Gruppe der Control-Inhibitor-Tiere zu sehen: es zeigen sich bei FAK und Src, wie auch bei den phosphorylierten Formen eine deutliche Signalzunahme im Vergleich zur DMSO-Gruppe. Dieser Umstand könnte durch eine teilagonistische Wirkung [144] des Inhibitors bedingt sein, da die blockierende Sequenz dem Ligandenmuster entspricht (RGD-Sequenz Arg-Gly-Asp) Dieser Trend setzt sich bei den nachfolgenden Signalmolekülen ERK, p38 nicht fort – der isolierte Einsatz des Inhibitors geht also nicht mit einer weiteren Aktivierung der Signalkaskaden einher. Schließlich fehlt in dieser Gruppe ja auch der mechanische Stress, wie es bei einer Aortenkonstriktion der Fall ist, als weiterer „Aktivator“.

Erk 1/2 und p-ERK1/2, p-38 und P-p-38:

Bekanntermaßen entwickelt sich als Folge hämodynamischen Stress eine cardiale Hypertrophie, denn durch Zunahme der Masse reduziert sich der Wandstress. Dieser Prozess mündet allerdings früher oder später in einem Herzversagen. Man geht heute davon aus, dass ein ganzes Netzwerk an Signalkaskaden bei der Entwicklung

cardialer Dysfunktion, Zelltod und Fibrosierung aktiv ist. ERK scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen:

ERK (extracellularly regulated kinases) wird infolge der FAK-Aktivierung durch vorgeschaltete Kinasen aktiviert. Erk aber auch p-38 aktivieren ihrerseits intranukleäre Transkriptionsfaktoren und sind somit bedeutend für eine Hypertrophieentwicklung [145] [57].

Die Aktivierung der MAP-Kinasen kann durch eine Vielzahl von Stimuli erfolgen: über G-Protein-Rezeptoren (Angiotensin II, Endothelin-1, Adrenozeptoren), Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (Insulin-like-growth-factor, Fibroblastenwachstumsfaktor), Cardiotropin-1 und Stressfaktoren im weiteren Sinne (vgl. 1.3) [145] [50]. Zur Familie der MAP-Kinasen zählt ERK, JNK und p-38.

Die Blockade der α V-Integrin-Fraktion führte in unserer Studie erfolgreich zu einer verminderten Phosphorylierung von ERK-1/2, während in der Vergleichsgruppe die Kinase deutlich aktiv war. Die Aktivierung hypertrophieassoziiierter Signalwege läuft demnach auch über Interinrezeptoren – insbesondere auch über α V.

Wie schon angedeutet zeigt sich in der Gruppe der Inhibitor-Tiere ein vermindertes Signal, dennoch stärker als in den Kontrollgruppen – diese Entwicklung ist unter dem Hintergrund der vielfältigen Aktivierungsmöglichkeiten von ERK zu sehen.

Verschiedene Vorarbeiten konnten zeigen, dass eine akut einsetzende Druckbelastung hervorgerufen durch z.B. ein gesetztes Banding der Aorta zu einer verstärkten Aktivität der Kinasen (ERK, JNK p-38) führt [146]. Rapacciuolo et al. untersucht dabei insbesondere die Zusammenhänge zwischen Katecholaminen, bzw. deren Ausfall und MAP-Kinasen, ebenfalls an Mäusen mittels Aortic-Bandig.

Glennon et al. konnte zeigen, dass ERK für die Hypertrophieentwicklung von Kardiomyozyten in vitro und unter Einfluss von Phenyleprin notwendig ist [147].

Weitere Studien konnten zeigen, dass die selektive Blockade von ERK1/2 durch den Einsatz von U0126 eine Hypertrophieentwicklung (induziert durch Endothelin-1 bzw. Phenyleprin) verhindert, zumindest in vitro. [148]. Diese Arbeiten zeigen deutlich, welche Rolle die Erk-Aktivierung bei der Hypertrophieentwicklung einnimmt. Die erfolgreiche Hemmung dieser Kaskade bestätigt sich auch durch die erhobenen morphologischen Ergebnisse. Sowohl die Histologie, als auch die die Echokardiographie zeigt eine ausbleibende (kompensatorische) Hypertrophieentwicklung.

Analoge Aussagen lassen sich über p-38 treffen: auch hier zeigte sich unter dem Einsatz des Inhibitors eine deutlich verminderte bis aufgehobene Signalgebung bei der phosphorylierten Form. Die p-38-MAP-Kinase umfasst eine Reihe von Isoformen, darunter α , β , γ und δ . Die α -Form nimmt dabei die dominierende Rolle ein. Der Verlust von p-38- α beispielsweise führt zu Störungen bei der Plazenta-Entwicklung und damit zu Aborten [149].

Die p-38-MAP-Kinase wird, wie schon in der Einleitung erläutert, durch eine Vielzahl von (Stress)-Faktoren aktiviert [150]. Vorausgegangenen Studien konnten zeigen, dass p-38 in Kardiozyten-Zellkulturen nach entsprechender Stimulation aktiv war [151] [152], bzw. eben auch nach Aortenkonstriktion [153]. Neuere Studien an transgenen Mäusen allerdings, lassen an der Hypothese, wonach p-38 das Wachstum von Kardiomyozyten fördert, zweifeln [75] [74] [154]. Braz et al. postuliert eine vertärkte Hypertrophieentwicklung nach Aortic-Banding trotz verminderter p-38-Aktivität; ein möglicherweise aktiver Signalweg war dabei Calcineurin-NFAT [75]. Untersuchungen an herzinsuffizienten Mäusen, nach künstlich erzeugten Myokardinfarkt, lassen den Schluss zu, dass eine suffiziente Hemmung der p-38-Kinase einen gewissen Schutz vor einer Insuffizienzentwicklung bietet [155] (dies ist allerdings abhängig von der jeweiligen Isoform, die gehemmt wird) : Liu et al. setzte sowohl einen ACE-Hemmer, als auch einen spezifischen p-38-Inhibitor. Der kombinierte Einsatz zeigte allerdings keinen größeren Benefit. Die Datenerhebung erfolgte echokardiographisch.

In unserer Studie war die p-38-Kinase auch deutlich gehemmt, unsere Veruchstiere allerdings zeigten deutlich dilatierte Herzen mit eingeschränkter Pumpleistung. Erklärbar ist dies durch die Hemmung der Signalkaskade zu einem vergleichsweise frühen Zeitpunkt (schon bei der initialen Signalübermittlung durch Integrine) bei unserer Studie – die Möglichkeit einer kompensatorischen Hypertrophieentwicklung ist (auch durch die Hemmung der ERK-Kinase) nicht gegeben. Zugegebenermaßen sind auch beide Studien nur eingeschränkt vergleichbar, wir verwendeten schließlich das Model der Aortenkonstriktion zur Erzeugung einer Druck-Überbelastung.

Sehr interessante Zusammenhänge konnte die Arbeitsgruppe um Nishida et al. [156] darlegen. Die Untersuchungen erfolgten an p-38-knock-out Mäusen. Wie auch in unserer Studie bekamen die Tiere ein Aortic-banding gesetzt (TAC = Thoracic transverse aortic constriction), die Daten wurden ebenfalls mittels

Echokardiographie, Western-Blot und Histologie erhoben. Die knock-out-Mäuse entwickelten nach der gesetzten Druckbelastung ebenso eine kardiale Hypertrophie, zeigten aber auch eine cardiale Dysfunktion und Dilatation, begleitet von einer ausgeprägten Fibrosierung und Apoptosevorgängen. Nishida et al. sieht die Rolle von p-38 (bzw. der α -Subform) weniger bei dem Prozess der Hypertrophieentwicklung, sondern vielmehr beim Überleben der Zelle. Zum Zeitpunkt 1 Woche nach Aortic-Banding wurde die linksventrikuläre Funktion echokardiographisch erhoben; zu diesem Zeitpunkt waren bereits 30% der Knock-Out-Tiere verstorben, während die Mortalitätsrate bei den Kontroll-Tieren lediglich bei 8% lag. Es kam in der Gruppe der KO-Tiere zu einer signifikanten Zunahme des endsystolischen und enddiastolischen Durchmessers, und zu einer entsprechenden Abnahme des Fractional-Shortening. Die Synthese Hypertrophie-assoziiierter Proteine wie ANF, BNP und α -actin-mRNA war bei den p-38-KO-Tieren nicht beeinträchtigt (was allerdings bei der Bandbreite an unterschiedlichen Aktivierungsmöglichkeiten der nachfolgenden intrazellulären Prozesse nicht verwunderlich ist). Histologisch zeigte sich insbesondere perivaskulär in der Gruppe der TAC-KO-Tiere eine verstärkte Fibrosierung, begleitet von einer signifikant erhöhten Expression an Collagen I- und III-mRNA. In einem nächsten Schritt wurde das Ausmaß der Apoptoseentwicklung mittels Immunofluoreszenz bestimmt. Dabei war der Anteil an sg. TUNEL-positiven Zellen in der Gruppe der KO-Tiere mehr als drei mal so groß im Vergleich zur Kontrollgruppe. (mittels TUNEL lassen sich apoptosetypische Strukturen, wie kondensiertes Chromatin oder fragmentierte Zellkerne nachweisen.)

Des Weiteren lag in der Gruppe der p-38-KO-Tiere ein signifikant erhöhter Anteil der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinase) in der phosphorylierten Form vor.

ANP:

Die Konzentrationsbestimmung von ANP (bzw. das verwandte BNP) findet auch schon seit einiger Zeit in der Klinik Verwendung als Marker kardialen Stress oder Insuffizienz. ANP wird über die Dehnung der Vorhöfe freigesetzt und führt zu einer verstärkten Diurese. Mit dem zunehmenden Maß einer Herzinsuffizienz nimmt auch der Spiegel des Hormons zu.

Wir konnten, insb. in der Gruppe der Inhibitor-Tiere, deutlich erhöhte Werte feststellen. Dieses Ergebnis stimmt damit zum einen mit der beschriebenen

Hypertrophieentwicklung überein und deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Autoren. So konnte Babbit et al eine erhöhte ANP-mRNA-Expression sieben Tage nach Aortic-Banding an Mäusen nachweisen [110].

Immunhistologie:

In der immunhistologischen Untersuchung war unser Augenmerk in erster Linie auf die Lokalisation der aktivierten fokalen Adhäsionskinase (p-FAK) und der aktivierten Src-Kinase (p-Src) bei Mäuseherzen gerichtet. Dieses Verfahren eignet sich bestens zur Lokalisation bestimmter Proteine – weniger zur Quantifikation, hierfür stellt die Western-Blott-Analyse die geeignetere Methode dar. Insbesondere der Nachweis der Lokalisation der Integrine (b1 oder b5) wie in der WB-Analyse, gelang uns nicht. Oftmals sind passende Antikörper der WB nicht für die Immunhistologie geeignet, sodass wir auf eine gesonderte Darstellung verzichteten. Da man allerdings um das Zusammenspiel der Tyrosinkinase mit Integrin-Rezeptoren weiß, gehen wir auch im Myokard von einer Co-Lokalisation aus.

P-FAK und p-Src fanden sich dabei in der kardiomyozytären Zytoplasmamembran und an den Disci Intercalares. Letztere, stellen die Bereiche erhöhter Belastung dar, die in erster Linie mechanischen Wandstress verkraften und verarbeiten müssen. Demnach ist es auch sehr wahrscheinlich, dass hier Integrinrezeptoren lokalisiert sind um der Funktion des „Outside-in-Signaling“ nach zu kommen.

Wie schon beschrieben ist die Immunhistologie keine geeignete Methode zur Quantifizierung, da die Standardisierung problematisch ist, dennoch lassen sich Aussagen über Tendenzen treffen, die erhobenen Ergebnisse decken sich mit den Western-Blot-Analysen. Auch hier wird deutlich, dass die Aktivierung von FAK und Src durch den Einsatz des verwendeten Inhibitors, also durch die Blockade der $\alpha V\beta 5$ bzw. $\alpha V\beta 3$ – Rezeptoren, hemmbar ist.

Inwieweit dies eine Rolle für eine klinische Therapie spielt bleibt abzuwarten, zumal die Wirkung der $\alpha V\beta 5$ bzw. $\alpha V\beta 3$ -Blockade weit über eine einfache Hemmung der Hypertrophieentwicklung hinausging: die nachfolgende Mortalitätsstatistik zeigt deutlich, dass nahezu die Hälfte der Tiere verstarben. Es ist anzunehmen, dass eine schwere Herzinsuffizienz ursächlich dafür war. Somit ist die zu frühe Hemmung nicht unbedingt erstrebenswert.

5.4. Mortalitätsstatistik

Interessanterweise verstarb in der Gruppe der mit dem Integrininhibitor behandelten Tiere nahezu die Hälfte, (43,5 %), während in der Gruppe der nur mit DMSO behandelten Tiere 17,6% verstarben. (Die %-Angaben sind jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl nach dem 1. postoperativen Tag.)

Man könnte nun postulieren, dass der zu frühe Einsatz des Inhibitors durchaus einen negativen Effekt hat, da initiale kompensatorische Mechanismen der Hypertrophieentwicklung wirkungsvoll unterdrückt werden, die Mäuse allerdings auf Grund dieses Mangels versterben.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollen die funktionellen Zusammenhänge zwischen Integrinrezeptoren und myokardialer Hypertrophieentwicklung am Maus-Model nach aortic-banding untersucht werden.

Durch den Einsatz eines Integrin $\alpha V/\beta 3$ + $\alpha V\beta 5$ -Inhibitors (EMD 270179 der Fa. Merck) konnten gezielt diese Integrinrezeptoren gehemmt werden.

Mittels morphologischen, histologischen, immunhistochemischen, biochemischen und bildgebenden Verfahren konnten bekannte Signalwegskaskaden reproduziert und eben auch eine mangelhaft einsetzende Hypertrophieentwicklung unter Integrin-Blockade nachgewiesen werden.

Innerhalb von 2-7 Tagen (Untersuchungszeitraum) setzte in der Gruppe der behandelten Tiere eine myokardiale Dilatation ein, die mit einer deutlich eingeschränkten linksventrikulären Funktion einherging. Nahezu die Hälfte der Tiere verstarb konsekutiv, während die unbehandelten Tiere deutlich bessere Überlebenschancen zeigten. Ein zur transthorakalen Aortenkonstriktion vergleichbares Ereignis beim Menschen wäre eine langjährig bestehende, unbehandelte arterielle Hypertonie oder eine Aortenstenose. Beides sind jedoch Ereignisse, die in der Regel nicht derart akut einsetzen, sondern sich entwickeln. Demnach wäre ein möglicher Einsatz beim Menschen nach entsprechenden Studien zur Ermittlung des optimalen Therapie-Fensters zu diskutieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Levy D, et al., *Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990.
2. Vakili BA, Okin PM, and D. RB., *Prognostic implications of left ventricular hypertrophy*. Am. Heart J., 2001. **141**: p. 334–41.
3. Selvetella G, et al., *Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence*. Cardiovasc Res, 2004.
4. Medugorac, *Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium*. Cardiovasc. Res., 1980. **14**: p. 551–54.
5. Wakatsuki T, Schlessinger J, and E. EL., *The biochemical response of the heart to hypertension and exercise*. Trends Biochem Sci, 2004. **609-17**.
6. Weber, K.T., *Fibrosis and hypertensive heart disease*. Curr. Opin. Cardiol, 2000. **15**(264–272).
7. Matsubara, L.S., *Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, 2000. **279**(H1534–H1539).
8. Heling, A., et al., *Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 846-53.
9. Schaper, J. and B. Speiser, *The extracellular matrix in the failing human heart*. Basic Res Cardiol, 1992. **87**(Suppl 1): p. 303-9.
10. Pelouch, V., et al., *Role of extracellular matrix proteins in heart function*. Mol Cell Biochem, 1993. **129**(2): p. 101-20.
11. Tagawa, H., et al., *Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy*. Circ Res, 1997. **80**(2): p. 281-9.
12. Tsutsui, H., K. Ishihara, and G.t. Cooper, *Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium*. Science, 1993. **260**(5108): p. 682-7.
13. Urbanek K, T.D., Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. , 102(24):8692-7, and P.P.-i.f. MEDLINE], *Free in PMC Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8692-7.
14. Pönicke K, Schlüter K-D, and H.-H. I, *Noradrenalineinduced increase in protein synthesis in adult rat cardiomyocytes: involvement of only alpha1A-adrenoceptors*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2001.
15. Wada, H., et al., *Comparative effects of contraction and angiotensin II on growth of adult feline cardiocytes in primary culture*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 2): p. H29-37.
16. Sadoshima, J.a.I., S., *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annu. Rev. Physiol., 1997. **59**, **551–571**.
17. Kent RL, M.P., *Passive load and angiotensin II evoke differential responses of gene expression and protein synthesis in cardiac myocytes*. Circ Res, 1996.
18. Huang CY, H.L., Buetow DE., *Insulin-like growth factor-induced hypertrophy of cultured adult rat cardiomyocytes is L-type calciumchannel- dependent*. Mol Cell Biochem, 2002.
19. Yokoyama T, et al., *Tumor necrosis factor-alpha provokes a hypertrophy growth response in adult cardiac myocytes*. Circulation, 1997.
20. Kaye, D., et al., *Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and bFGF release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 1-11.

21. Schäfer M, F.K., Taimor G, Piper HM, Schlüter K-D., *Hypertrophic effect of selective beta1-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat*. Am J Physiol, 2000.
22. Zhou XJ, Schlüter K-D, and P. HM, *Hypertrophic responsiveness to beta2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes*. Mol Cell Biochem, 1996.
23. Cullen JP, B.D., Kelso EJ, McDermott BJ., *Use of A-192621 to provide evidence for involvement of endothelin ET(B)-receptors in endothelin-1-mediated cardiomyocytes hypertrophy*. Eur J Pharmacol, 2001.
24. Millar BC, et al., *Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes*. Am J Physiol, 1994.
25. Schlüter K-D and P. HM, *Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes*. Am J Physiol, 1992.
26. Barrett S, H.N., Karliner JS, *Alpha1-adrenoceptor mediated inhibition of cellular cAMP accumulation in neonatal rat ventricular myocytes*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1993.
27. Bristow, M., et al., *Decreased catecholamine sensitivity and b-adrenergic-receptor density in failing human hearts*. N Engl J Med, 1982. **307**: p. 205-211.
28. Henning RJ, L.Y., *Cocaine produces cardiac hypertrophy by protein kinase C dependent mechanisms*. J Cardiovas Pharmacol Ther, 2003.
29. Maeno Y, et al., *Methamphetamine induces an increase in cell size and reorganization of myofibrils in cultured adult rat cardiomyocytes*. Int J Leg Med, 2000.
30. Ertl G, M.M., Kochsiek K., *On the mechanism of renin release during experimental myocardial ischaemia*. Eur J Clin Invest., 1985. **6**(375-81).
31. Pfeffer JM, P.M., Mirsky I, *Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**: p. 3310–3314.
32. Pfeffer, *Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme*. Lancet, 2003.
33. Crabtree, G.R.a.E.N.O., *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*. Cell, 2002. **109**: p. 67-79.
34. Molkenstin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
35. Schlüter K-D, et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 1998.
36. Chesley A, L.M., Asai T, Xiao RP, Ohtani S, et al., *The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 30-kinase*. Circ. Res., 2000. **87**: p. 1172–79.
37. Zhu WZ, et al., *Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2001. **1607–12**.
38. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
39. Naga PrasadSV, et al., *Gβγ-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy*. J. Biol. Chem., 2000. **275**7: p. 4693–98.
40. Bodine SC, S.T., Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, et al., *Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo*. Nat. Cell Biol., 2001. **3**: p. 1014–19.
41. Patrucco E, et al., *PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and independent effects*. Cell, 2004. **118**: p. 375– 87.

42. Fingar, D.C., et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. *Genes Dev*, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
43. Zhou, P., *Solution structure of the core NFATC1/DNA complex*. *Cell*, 1998. **92**(5): p. 687-96.
44. Dufner, A., et al. Dufner, A., et al., *Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(6): p. 4525-34.
45. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(1): p. 40-7.
46. Passier R, et al., *CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 2000. **105**: p. 1395–406.
47. Zhang, T., *The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 1261-7.
48. Clerk A, S.P., *Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy*. *Circ. Res.*, 2000. **87**(86): p. 1019–23.
49. Hunter JJ, T.N., Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR, *Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice*. *J. Biol. Chem.*, 1995. **270**: p. 23173–78.
50. Sugden PH and C. A, *“Stressresponsive” mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium*. *Circ. Res.*, 1998. **83**: p. 345–52.
51. Sluss, H.K., et al., *Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(12): p. 8376-84.
52. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines*. *BioEssays*, 1996. **18** (7): p. 567-577.
53. Yano M, et al., *Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase in angiotensin II-mediated hypertension*. *Circ. Res.*, 1998. **83**: p. 752–60.
54. Pombo CM, et al., *The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion*. *J Biol Chem.*, 1994. **269**(42): p. 26546-51.
55. Zohn IE, et al., *Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(11): p. 6160-8.
56. Bueno OF, D.W.L., Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. *EMBO J.*, 2000. **19**: p. 6341–50.
57. Liang, Q. and J.D. Molkentin, *Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models*. *Mol. Cell. Cardiol.*, 2003: p. 1385–1394.
58. Henrich, C. and P. Simpson, *Differential acute and chronic response of protein kinase C in cultured neonatal rat heart myocytes to α 1-adrenergic and phorbol ester stimulation*. *J Mol Cell Cardiol*, 1988. **20**: p. 1081-1085.
59. Frey, N.a.E.N.O., *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. *Annu Rev Physiol.*, 2003. **65**: p. 45-79.
60. Bowman, J.C., et al., *Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates*. *J Clin Invest*, 1997: p. 2189-95.

61. Pennica D, et al., *Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex*. J. Biol. Chem., 1995. **270**: p. 10915–22.
62. Sano M, et al., *Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 29717–23.
63. Hoshijima M, C.K., *Mixed signals in heart failure: cancer rules*. J. Clin. Invest., 2002. **109**: p. 849–55.
64. Yamauchi-Takahara K, K.T., *A novel role for STAT3 in cardiac remodeling*. Trends Cardiovasc. Med., 2000. **10**: p. 298–303.
65. Kunisada K, et al., *Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes*. Circulation, 1998. **98**: p. 346–52.
66. Kunisada K, N.S., Tone E, Funamoto M, Osugi T, et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000. **97**: p. 315–19.
67. Lee, R.T., *Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(5): p. 202–5.
68. Rohde, L.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3063–70.
69. Spinale, F.G., *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1944–9.
70. Chancey, A.L., et al., *Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload*. Circulation, 2002. **105**(16): p. 1983–8.
71. McMullen, J.R., *Phosphoinositide 3-kinase (p110a) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2003: p. 12355–12360.
72. McMullen, J.R., *The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110a) pathway*. J. Biol. Chem, 2004: p. 4782–4793.
73. Matsui, T., *Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart*. J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 22896–22901.
74. Zhang, S., *The role of the Grb2–p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis*. J. Clin. Invest., 2003. **111**: p. 833–841.
75. Braz, J.C.e.a., *Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin- NFAT signaling*. J. Clin. Invest., 2003. **111**: p. 1475–1486.
76. Wettschureck, N.e.a., *Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gaq/Gal1 in cardiomyocytes*. Nat. Med., 2001. **7**: p. 1236–1240.
77. Crackower, M.A.e.a., *Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K–PTEN signaling pathways*. Cell, 2002. **110**: p. 737–749.
78. Oudit, G.Y., *Phosphoinositide 3-kinase g-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure*. Circulation, 2003. **108**: p. 2147–2152.
79. Domingos, P.P.e.a., *Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, 2002. **H556–H564**.

80. Franchini, K.G.e.a., *Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart*. *Circ. Res.*, 2000. **87**(558–565).
81. Tarone, G.a.L., G., *Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy*. *Trends Mol. Med.*, 2003. **9**(376–382).
82. Giancotti, F., *Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(5): p. 691-700.
83. Brooks, P.C., et al., *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. *Cell*, 1998. **92**(3): p. 391-400.
84. Wu, C., et al., *Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix*. *Cell*, 1995. **83**: p. 715-724.
85. Schwarzbauer, J.E. and J.L. Sechler, *Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly*. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(5): p. 622-7.
86. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. *Science*, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
87. Xia, M., et al., *Integrin-dependent role of human T cell matrix metalloproteinase activity in chemotaxis through a model basement membrane*. *J Cell Biochem*, 1996. **61**(3): p. 452-8.
88. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. *Cell*, 1996. **85**(5): p. 683-93.
89. Ross, R., *Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors*. *Cardiovasc Res*, 2004.
90. Giancotti FG, R.E., *Integrin signaling*. *Science*, 1999. **285**: p. 1028– 32.
91. Giancotti, F.G.a.G.T., *Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003. **19**: p. 173-206.
92. Hsueh, W.A., R.E. Law, and Y.S. Do, *Integrins, adhesion, and cardiac remodeling*. *Hypertension*, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 176-80.
93. Tryggvason, K., *The laminin family*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(877±882).
94. Burlew, B.S.a.K.T.W., *Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms*. *Cardiol Clin*, 2000. **18**(3): p. 435-42.
95. Oliviero, P., *Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 346-55.
96. Tyagi, S.C., *Physiology and homeostasis of extracellular matrix: cardiovascular adaptation and remodeling*. *Pathophysiology*, 2000. **7**(3): p. 177-182.
97. Farhadian, F., et al., *Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(4): p. 981-90.
98. Humphries, M., *Integrin structure*. *Biochem Soc Trans*, 2000. **28**: p. 311 –39.
99. Ross, R., *The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling*. *J Card Fail*, 2002. **8**(6): p. 326-31.
100. Ross, R., Borg TK., *Integrins and the myocardium*. *Circ Res.*, 2001. **88**(11): p. 1112-9.
101. Ruwhof C and v.d.L. A., *Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways*. *Cardiovasc Res.*, 2000. **47**: p. 23– 37.
102. Sugden, P., *Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte*. *Circ Res*, 2003. **93**: p. 1179– 92.
103. Heidkamp MC, et al., *GFP-FRNK disrupts focal adhesions and induces anoikis in neonatal rat ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2002. **90**: p. 1282–1289.
104. Schaller, M., *Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1540**(1): p. 1-21.
105. Mitra SK, Hanson DA, and S. DD, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**: p. 56–68.

106. Brancaccio M, et al., *Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(3): p. 422-33.
107. MacKenna DA, et al., *Extracellular signalregulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific cardiac fibroblasts*. J Clin Invest, 1998. **101**: p. 301–10.
108. Aikawa R, Nagai T, and e.a. Kudoh S, *Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation*. Hypertension, 2002. **39**: p. 233– 8.
109. Hynes, R., *Cell adhesion: old and new questions*. Trends Cell Biol, 1999. **9**: p. 33–7.
110. Babbitt CJ, et al., *Modulation of integrins and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle*. Histochem Cell Bio, 2002. **118**: p. 431– 9.
111. Laser, M., et al., *Integrin-dependent and -independent signaling during pressure overload cardiac hypertrophy, in The Hypertrophied Heart*. Kluwer Academic Publisher, 2000(Takeda, M. Nagano, and N. Dhalla Editors): p. 143-164.
112. Kim M, Carman CV, and S. TA, *Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins*. Science, 2003. **301**: p. 1720– 5.
113. Miyamoto S, et al., *Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors*. J Cell Biol, 1996. **135**: p. 1633 –42.
114. Hornberger, L.K., et al., *Synthesis of extracellular matrix and adhesion through beta(1) integrins are critical for fetal ventricular myocyte proliferation*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 508-15.
115. Fassler, R., et al., *Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 979-88.
116. Stephens, L.E., et al., *Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1883-95.
117. Carver, W., L. Terracio, and T.K. Borg, *Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart*. Anat Rec, 1993. **236**(3): p. 511-20.
118. Carver, W., et al., *Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart*. Journal Of Histochemistry And Cytochemistry, 1994. **42**(2): p. 167-75.
119. Shai, S.Y., et al., *Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 458-64.
120. Terracio L, et al., *Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy*. Circ Res., 1991. **68**: p. 734–744.
121. Borg TK, et al., *Recognition of extracellular matrix components by neonatal and adult cardiac myocytes*. Dev Biol., 1984. **104**: p. 86–96.
122. Laser M, et al., *Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 35624– 30.
123. MacKenna D, Summerour SR, and V. FJ, *Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis*. Cardiovasc Res, 2000. **46**: p. 257– 63.
124. Hsueh WA, Law RE, and D. YS, *Integrins, adhesion, and cardiac remodeling*. Hypertension, 1998. **31**: p. 176–80.
125. Carver W, et al., *Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts*. Circ Res, 1991. **69**: p. 116– 22.
126. Kawano H, Cody RJ, and Graf K, *Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts*. Hypertension, 2000. **35**: p. 273–9.
127. Maitra N, et al., *Expression of alpha and beta integrins during terminal differentiation of cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(4): p. 715-25.
128. Kuppuswamy D, et al., *Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 4500–8.

129. Willey CD, et al., *Focal complex formation in adult cardiomyocytes is accompanied by the activation of beta3 integrin and c-Src*. J Mol Cell Cardiol Clin, 2003. **35**: p. 671–83.
130. Sun M, et al., *Temporal response and localization of integrins beta1 and beta3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines*. Circulation, 2003. **107**: p. 1046– 52.
131. Graf K and S. P., *Osteopontin: a protective mediator of cardiac fibrosis?* Hypertension, 2004. **44**: p. 809– 10.
132. Rysa J, et al., *Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure*. Hypertension, 2005. **45**: p. 927– 33.
133. Zhonglin Xie, M.S.a.K.S., *Osteopontin Modulates Myocardial Hypertrophy in Response to Chronic Pressure Overload in Mice*. Hypertension, 2004(44): p. 826-831.
134. Müller, J.G., et al., *Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy*. Science, 1998. **282**: p. 1007a (Technical Comment).
135. Kanno, S., et al., *Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction*. J Am Soc Echocardiogr, 2002. **15**(6): p. 601-9.
136. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
137. Choi, D.J., et al., *Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17223-9.
138. Gao XM, et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 330-8.
139. Liao, et al., *Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1703-H1708.
140. Pham CG, et al., *Striated muscle-specific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**: p. 2916– 26.
141. Rankin S, et al., *Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin*. FEBS Lett, 1994. **354**: p. 315–9.
142. Rozengurt, E., *Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes*. Cancer Surv, 1995. **24**: p. 81 – 96.
143. Dominguez-Jimenez C, Yanez-Mo M, and e.a. Carreira A, *Involvement of alpha3 integrin/tetraspanin complexes in the angiogenic response induced by angiotensin II*. FASEB J, 2001. **15**: p. 1457–9.
144. Pasqualini R, Koivunen E, and R. E., *Peptides in cell adhesion: powerful tools for the study of integrin-ligand interactions*. Braz J Med Biol Res, 1996. **29**(9): p. 1151-8.
145. Bueno, O. and J. Molkentin, *Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death*. Circ Res, 2002. **91**(9): p. 776-81.
146. Rapacciuolo A, et al., *Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**: p. 876–882.
147. Glennon PE, et al., *Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes*. Circ Res, 1996. **78**: p. 954–961.

148. Yue TL, et al., *Extracellular signalregulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 37895–37901.
149. Adams, R.H., A. Porras, G. Alonso, M. Jones, K. Vintersten, S. Paneill, A. Valladares, I. Perez, R. Kein, and A. R. Nebreda, *Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development*. Mol. Cell. Cardiol., 2000. **6**: p. 109–116.
150. Johnson, G. L., and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**: p. 1911–1912.
151. Nemoto, S., Z. Sheng, and A. Lin., *Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy*. Mol.Cell. Biol, 1998. **18**: p. 3518–3526.
152. Clerk, A., A. Michael, and P.H. Sugden., *Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy?* J. Cell Biol., 1998. **142**: p. 523–535.
153. Wang, Y., et al., *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 2161–2168.
154. Liao, P., et al., *The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001. **98**: p. 12283–12288.
155. Liu YH, et al., *Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice with heart failure resulting from myocardial infarction*. J Card Fail., 2005. **11**(1): p. 74-81.
156. Nishida K, et al., *p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10611-20.
157. Ogawa, E., et al., *Outside-in Signalling of Fibronectin Stimulates Cardiomyocyte Hypertrophy in Cultured Neonatal Rat Ventricular Myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(5): p. 765-776.

Danksagung

Ich danke meiner Schwester, meinen Eltern und Freunden für die großartige Unterstützung, die sie mir immer zuteil werden ließen.

Herrn Privatdozent Dr. med. J. Strotmann danke ich für die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. med. G. Ertl danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Professor Dr. K. Schuh danke ich, dass er sich als Prüfer zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. med. M. Laser danke ich für die ausgezeichnete Betreuung.

Dank an die Arbeitsgruppe PD Bauersachs und PD Franz für Echokardiographie

Ich danke allen Personen unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Rong Xue Wu, Herrn Tobias Kupfer und Herrn A.Grimm für die gute Zusammenarbeit.

Curriculum vitae

Cornelia Joha, geboren am 27.11.1979 in Stuttgart

Schulausbildung

1986 – 1990 Grund und Hauptschule Stuttgart-Stammheim
1990 – 1996 Realschule Markgröningen
1996 – 1999 Wirtschaftsgymnasium an der Robert-Franck-Schule
Ludwigsburg, Note 1,0, Preis für besondere Leistungen,
Scheffelpreis für Literatur

Studium

1999 – 2001 Vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg, Erster
Abschnitt der ärztlichen Prüfung September 2001
2001 – April 2006 Klinischer Abschnitt an der Universität Würzburg
Erstes Staatsexamen August 2002, Note gut
Zweites Staatsexamen März 2005, Note gut
Mündliche Abschlussprüfung April 2006, Note sehr gut
Juni 2006 Abrobation als Ärztin

Famulaturen: Allgemeinmedizin Praxis Dr. Ruland, Dr. Widmaier,
Möglingen
Chirurgie: Julius-Spital, Würzburg
Innere Medizin: Julius-Spital, Würzburg
Innere Medizin: Medizinische Poliklinik Würzburg

Praktisches Jahr Innere Medizin: Spital Uster, Schweiz
April 05 – März 06 Chirurgie: Spital Zollikerberg, Schweiz
Pädiatrie: Kinderklinik der Universität Würzburg

Beruflicher Werdegang:

September 06 – Hegau-Bodensee-Klinikum Singen, 1. Medizinische
November 07 Klinik
Dezember 07 Spital Uster, Kanton Zürich, Schweiz, Innere Medizin