

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Die Hemmung von Transforming growth factor (TGF) aggraviert
Mortalität und linksventrikuläre Dilatation
nach Myokardinfarkt**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Abed Sallam
aus
Palästina**

Würzburg, Februar 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz

Koreferent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2009

Der Promovend ist Arzt

Diese Arbeit widme ich meiner Familie, Anke Zink und Samer Mahfouz.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung und Arbeitshypothese	1
1.1. Myokardinfarkt	2
1.1.1. Definition und Ursachen des Myokardinfarktes	2
1.1.2. Patho- und Histopathologie des Myokardinfarktes	3
1.1.3. Remodeling	4
1.1.4. Auswirkungen auf die Herzfunktion	5
1.1.5. Komplikationen nach Myokardinfarkt	6
1.2. Herzinsuffizienz	8
1.2.1. Kompensationsmechanismen des insuffizienten Herzens	10
1.3. Arteriosklerose	14
1.3.1. Definition der Arteriosklerose	14
1.3.2. Pathophysiologie der Arteriosklerose	15
1.4. Koronare Herzkrankheit	15
1.5. Zytokine	17
1.5.1. Transforming Growth Factor β	17
1.5.1.1. Mitglieder der TGF- β Superfamilie	19
1.5.2. TGF- β Signalweg	19
1.5.2.1. Smad-Proteine	19
1.5.3. Funktionen von TGF- β	21
1.5.3.1. TGF- β im Immunsystem	22
1.5.3.2. TGF- β in der Embryogenese	23
1.5.3.3. TGF- β in der Tumorentstehung	23

1.6. Matrixmetalloproteinasen	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Tiere und Chirurgie	26
2.2. Echokardiographische Analyse	27
2.3. Hämodynamische Untersuchung	28
2.4. Probengewinnung und Infarktgrößenberechnung	29
2.5. Kollagengehalt	29
2.6. Biochemische und molekulare Messungen	30
2.6.1. RNA-Isolierung	30
2.6.2. RNA-Quantifizierung	31
2.6.3. cDNA-Synthese iScript von BioRad	31
2.6.4. Das Prinzip der real-time Polymerasekettenreaktion	32
2.6.5. Die Bestimmung der Gewebskonzentration von Matrixmetallproteinase 9	34
2.6.6. Bestimmung der Neutrophilenzahl durch die Immunohistochemie	35
2.7. Statistische Analyse	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Mortalität	36
3.2. Organgewichte	36
3.3. Echokardiographische und hämodynamische Messungen	37

3.4. Kollagenstoffwechsel und Inflammation nach Myokardinfarkt	40
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung	49
6. Referenzen	50
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
AMH	Anti muellerian hormone
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Anti-TGF-AK	Antikörper, die sich an TGF-Rezeptoren binden und hemmen
Atriale MLC	Atriale Myosin Light Chain
BMP	Bone morphogenetic protein
β -MHC	beta-Myosin Heavy Chain
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CSF	Kolonie – stimulierender – Faktor
Da	Dalton
dP / dt min.	minimaler Druckabfall im linken Ventrikel
dP / dt max.	maximaler Druckanstieg im linken Ventrikel
Dpp	Decapentaplegic
EF	Ejektionsfraktion
FS	fraktionelle Verkürzungsfraction

GDNF	Glial derived growth factor
GDF	Growth differentiation factor
HDL	high density lipoprotein
ICAM-1	Intracellular Adhesion molecule-1
IL	Interleukin
INF	Interferon
KG	Körpergewicht
K	Kilo
LAP	Latency associated peptide
LDL	low-density lipoprotein
LTBP	Latent TGF- β binding protein
LV	Linker Ventrikel
LVEDA	linksventrikuläre enddiastolische Fläche
LVEDD	linksventrikuläre enddiastolischer Durchmesser
LVESA	linksventrikuläre endsystolische Fläche
LVESD	linksventrikuläre endsystolischer Durchmesser
MAD	Mothers against decapentaplegic
MH1, MH2	Mad homology domains
MHz	Megahertz

MI	Myokardinfarkt
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
MCP	Monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SBE	Smad-binding Element
SMA	Smaller worms
SMAD	Smaller mothers against decapentaplegic
TF	Tissue factor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1

1. Einleitung

Arbeitshypothese

Der Myokardinfarkt führt zu komplexen strukturellen Veränderungen des infarzierten und nicht-infarzierten Myokardgewebes des linken Ventrikels, das so genannte linksventrikuläre Remodeling (20, 21). Zahlreiche Prozesse tragen zum linksventrikulären Remodeling bei, wie zum Beispiel die neurohumorale Aktivität und Veränderungen der Extrazellulärmatrix (6). In der Tat spielt die Kollagenmatrix eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der linksventrikulären Geometrie und der strukturellen Anordnung der Kardiomyozyten. Die Regulierung von abgelagertem Kollagen könnte eine effektive und therapeutische Strategie zur Hemmung des schädlichen Prozesses der linksventrikulären Dilatation darstellen.

Transforming growth factor (TGF)- β ist ein lokal erzeugtes Zytokin mit Einfluss auf Heilungsprozess und Gewebsfibrose (1). TGF stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und die Produktion der Extrazellulärmatrix (22). Die Expression von TGF ist sowohl bei myokardialer Ischämie als auch bei Myokardhypertrophie erhöht (4, 13). Die funktionelle Rolle von TGF beim linksventrikulären Remodeling ist unklar. Während TGF die Kardiomyozyten in vitro gegen die Ischämie-Reperfusion-Verletzung schützt (15), werden in zwei Modellen mit vorübergehender Überexpression von TGF-Inhibitoren bezüglich des linksventrikulären Remodelings sowohl protektive als auch schädliche Einflüsse von TGF beschrieben (12, 19).

Um die weitere Rolle und das therapeutische Potential der Anti-TGF-Behandlung zu erklären, behandeln wir Mäuse mit einem monoklonalen Antikörper (1D11), der alle drei Subformen von TGF neutralisiert (3). Die Antikörper werden entweder vor oder nach der Induktion eines Myokardinfarktes intraperitoneal appliziert, um den Effekt von TGF im linksventrikulären Remodeling zu untersuchen.

1.1. Myokardinfarkt

1.1.1. Definition und Ursachen

Bei einem Myokardinfarkt handelt es sich um eine Nekrose eines umschriebenen Herzmuskelbezirkes, welche durch eine längerfristige Ischämie entsteht (49). Die auslösende Ursache für eine akute Myokardischämie ist in der Regel eine Thrombose auf dem Boden der Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques einer Koronararterie. In Ausnahmefällen können koronare Embolien, Koronaranomalien, Vasospasmen und Gerinnungsstörungen (erworben oder angeboren) ursächlich sein (51). Ein akuter Myokardinfarkt bildet sich durch einen thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes mit folgender Unterbrechung der Blutversorgung (52). Die Zeitdauer des Koronarverschlusses, das Ausmaß der koronaren Herzkrankheit, der Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt des Verschlusses und der Kollateralisierungsgrad bestimmen die Infarktgröße. Der Beginn des Infarktes ist subendokardial im Zentrum des Versorgungsgebietes der Koronararterie, danach findet eine Ausbreitung in den Innenschichten und anschließend zum Epikard statt. Seine endgültige Größe wird erst nach einigen Stunden erreicht (49). Myokardinfarkte kommen praktisch nur im linken Ventrikel vor. 50% sind anteroseptal (Vorderwandinfarkte), 30% posteroseptal (Hinterwandinfarkte), 10% in der Seitenwand und 1% isoliert im Kammerseptum lokalisiert. In 9% der Fälle liegt eine Kombination der oben genannten Formen vor (54).

Unter Berücksichtigung der Ausdehnung unterscheidet man folgende Infarktformen:

- Zirkumferenzinfarkte umfassen die gesamte Wand des linken Ventrikels und entstehen durch einen Dreigeäßverschluss (beide Äste der linken und die rechte Koronararterie)
- Transmurale Infarkte reichen vom Endokard bis zum Epikard
- Subendokardiale Infarkte, das heißt nur die Innenschicht ist betroffen

Je nach Größe spricht man von einem:

- Makroinfarkt: > als 2,5 cm Durchmesser
- Mikroinfarkt: < als 2,5 cm Durchmesser (54)

Die Herzmuskelnekrose zeigt verschiedene Zell- und Gewebeveränderungen in einem bestimmten zeitlichen Ablauf.

1.1.2. Patho- und Histopathologie des Myokardinfarktes

- Frischer Myokardinfarkt: In der ersten 30 bis 60 Minuten nach Ischämiebeginn entwickeln sich die ersten morphologischen Zeichen einer Zellschädigung in Form eines Myokardfaserödems.
- Koagulationsnekrose: Nach 4 Stunden kommt es zur Bildung einer Koagulationsnekrose, die Kardiomyozyten zeigen ein homogenes eosinrotes Zytoplasma, im Zwischengewebe finden sich zunächst Granulozyten und später Makrophagen.
- Nekrosebildung: Nach 6 Stunden ist die Nekrose voll entwickelt, das Zytoplasma weist eine sehr ausgeprägte Azidophilie auf. Ferner kommt es zu einem Verlust der Querstreifung und zu einem Zerfall der Muskelfasern. Die Kerne sind zunächst hyperchromatisch, später liegt eine Fragmentierung und Auflösung der Kernstruktur vor. Es entwickelt sich im Nekrosebereich innerhalb von 24 Stunden ein hämorrhagischer Randsaum, der aus blutreichen Kapillaren und Hämorrhagien besteht. Anschließend kommt es zum Austritt von Leukozyten, der die nächste Phase anzeigt.
- Myokardinfarkt in Organisation: Im Verlauf von 2 bis 3 Wochen wird die Nekrose abgebaut und durch Granulationsgewebe ersetzt. Im Zentrum erkennt man Reste von zerfallenen Myokardnekrosen, die von einem kapillarreichen Granulationsgewebe (nach dem 10. Tag) eingeschlossen werden. Zwischen den Kapillaren findet man reichlich Histozyten, die Pigment (Hämosiderin, Lipofuszin) speichern.

Neu gebildete kollagene Fasern sind in dieser Phase nur spärlich vorhanden.

- Herzmuskelschwiele: Nach Monaten wird das Granulationsgewebe durch eine unregelmäßig begrenzte, zell- und kapillararme sowie kollagenfaserreiche Narbe ersetzt. Die Größe der Narbe hängt von der Ausdehnung der ursprünglichen Myokardnekrose ab. Zunächst erkennt man zarte, leicht gewellt verlaufende, kollagene Fasern, die später in verdickte und hyalinisierte Fasern umgewandelt werden.

Nach Jahren schließen sich die alten Narben in kleinen Ansammlungen von Fettzellen ein (55). Nach dem pathologischen Erscheinungsbild werden akute (6 Stunden bis zu 7 Tagen), sich in Heilung befindende (7 bis zu 28 Tagen) und abgeheilte (29 Tage und älter) Infarkte unterschieden (53).

1.1.3. Remodeling

Sofort nach dem Auftreten des Myokardinfarktes beginnen sich Größe, Form und Struktur des infarzierten, sowie später des nicht-infarzierten Bereiches des Ventrikels zu verändern. Es wird vom myokardialen Remodeling gesprochen, welches nach Infarkt asymmetrisch verläuft (56). Der segmentale Verlust an kontraktile Masse, die meistens durch eine Koagulationsnekrose ersetzt wird, führt in der Regel bei großen transmuralen Infarkten innerhalb der 1. Woche zur Dehnung und Ausdünnung des Infarktgebietes, was auch als Expansion bezeichnet wird (57, 58). Patienten, die eine Infarktexpansion aufweisen, besitzen eine höhere Prädisposition für das Auftreten von Aneurysmen, Myokardrupturen und zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz (59, 60, 61). An eine Infarktexpansion schließt sich eine fortschreitende Erweiterung des nicht infarzierten Ventrikelabschnittes an, die abhängig von der Größe des Infarktes, von der Infarktteilung und von der ventrikulären Wandbelastung ist (57). Im infarzierten Ventrikel liegt die größte Wandbeanspruchung an der Grenze zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Myokard (62). Die Dilatation des Ventrikels kann als Kompensationsmechanismus im Hinblick auf die Dysfunktion des Ventrikels verstanden werden, um das Schlagvolumen trotz abnehmender Ejektionsfraktion aufrechtzuerhalten (57).

Außerdem setzt eine Hypertrophie des verbleibenden, nicht infarzierten Restmyokards ein. Dadurch wird zunächst die Kontraktionskraft gesteigert und entsprechend dem Laplace-Gesetz, die Wandspannung gemindert. Trotzdem kann die Hypertrophie später zur Maladaptation führen und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz begünstigen, indem durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Relation zur Kardiomyozytenmasse eine Ischämie und eine Verminderung der Koronarreserve eintritt (63, 64). Das anfänglich bestehende Gleichgewicht zwischen der kompensatorischen Dilatation und der Hypertrophie des Ventrikels gerät schnell ins Wanken, was Auswirkungen auf das Füllungsvolumen des Herzens hat und die ventrikuläre Erweiterung und Dysfunktion vorantreibt (57). Neben der kardiomyozytären Hypertrophie kommt es im nicht infarzierten Myokard zu Nekrosen und Apoptosen, die eine weitere Progression der Herzinsuffizienz fördern (65, 66). Die nekrotischen Herzmuskelzellen des Infarktgebietes bewirken schon während der ersten 24 Stunden eine Komplementaktivierung, eine Zytokinfreisetzung, die Entstehung von freien Radikalen, die Anlockung von Neutrophilen und Makrophagen sowie die Bildung von Wachstumsfaktoren. Am 1. Tag nach Infarkt beginnen die Neutrophilen einzuwandern und am 4. Tag beginnt das Granulationsgewebe in das Infarktgebiet einzusprossen. Die Histiozyten, Fibroblasten und Kapillaren sind daran beteiligt, die Nekrose zu beseitigen. Matrixmetalloproteinasen bauen unter anderem die interzelluläre Matrix ab. Der Zeitraum für die Eliminierung der Nekrose beträgt ca. 4 - 6 Wochen. Narbengewebe, das vorwiegend aus parallel angeordneten Kollagenfasern besteht, ersetzt die Nekrose. Die Infarktnarbe ist gegenüber dem nicht-infarzierten Myokard sehr dünn (49).

1.1.4. Auswirkungen auf die Herzfunktion

Ein linksventrikulärer Infarkt beeinträchtigt die linksventrikuläre Funktion, so dass das linksventrikuläre Schlagvolumen abfällt und der linksventrikuläre Füllungsdruck ansteigt. Wiederum führt eine starke Verminderung des linksventrikulären Schlagvolumens zum Absinken des Aortendruckes und des koronaren Perfusionsdruckes.

Dieser Prozess kann weitere myokardiale Ischämiezustände hervorrufen. Außerdem bedingt ein vermindertes Schlagvolumen die Erhöhung der Nachlast, was sich negativ auf das Schlagvolumen auswirkt und den myokardialen Sauerstoffverbrauch anhebt. Die Unfähigkeit des linken Ventrikels sich regelrecht zu entleeren, erhöht die Vorlast des Herzens, es besteht die Möglichkeit der Entwicklung eines Lungenödems. Gleichzeitig wird durch die erhöhte Vorlast das verbleibende nicht-infarzierte Myokard gedehnt und das Schlagvolumen normalisiert sich für einen gewissen Zeitraum auf Kosten einer reduzierten Ejektionsfraktion, wenn die Infarktnekrose nicht zu groß ist (67).

1.1.5. Komplikationen nach Myokardinfarkt

Die ersten 48 Stunden nach Infarkt ist die gefährlichste Zeitphase, 40% der Patienten überleben den ersten Tag nach Infarkt nicht.

I. Herzrhythmusstörungen

- Ventrikuläre Extrasystolen
- Ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern
- Vorhofflimmern mit absoluter Tachyarrhythmia und der Gefahr von arteriellen

Embolie

- Bradykarde Herzrhythmusstörungen (AV-Block, Sinusbradykardie)

II. Linksherzinsuffizienz und deren Folgen

- Lungenstauung und Lungenödem
- Kardiogener Schock

III. Komplikationen bei ausgedehnter Nekrose

- Herzwandruptur mit Herzbeutel tamponade (häufig gedeckte Perforation)
- Ventrikelseptumruptur
- Papillarmuskelnekrose sowie –abriss mit akuter Mitralklappeninsuffizienz

IV. Herzwandaneurysma

V. Frühperikarditis „ Perikarditis epistenocardiaca“

VI. Postmyokardinfarktsyndrom „Dressler-Syndrom“ mit Spätperikarditis / Pleuritis

VII. Persistierende oder rezidivierende Angina pectoris oder Infarktrezidiv

1.2. Herzinsuffizienz

Unter Herzinsuffizienz versteht man einen Zustand, bei dem das Herz trotz ausreichendem venösen Rückfluss nicht in der Lage ist, den unterschiedlichen metabolischen Bedürfnissen des Körpers gerecht zu werden. Die Inzidenz und die Prävalenz der Herzinsuffizienz sind in Europa in den letzten Jahrzehnten bedingt durch die demographische Veränderung der Altersstruktur und die Verbesserung der Akutbehandlung kardiovaskulärer Erkrankungen stark angestiegen.

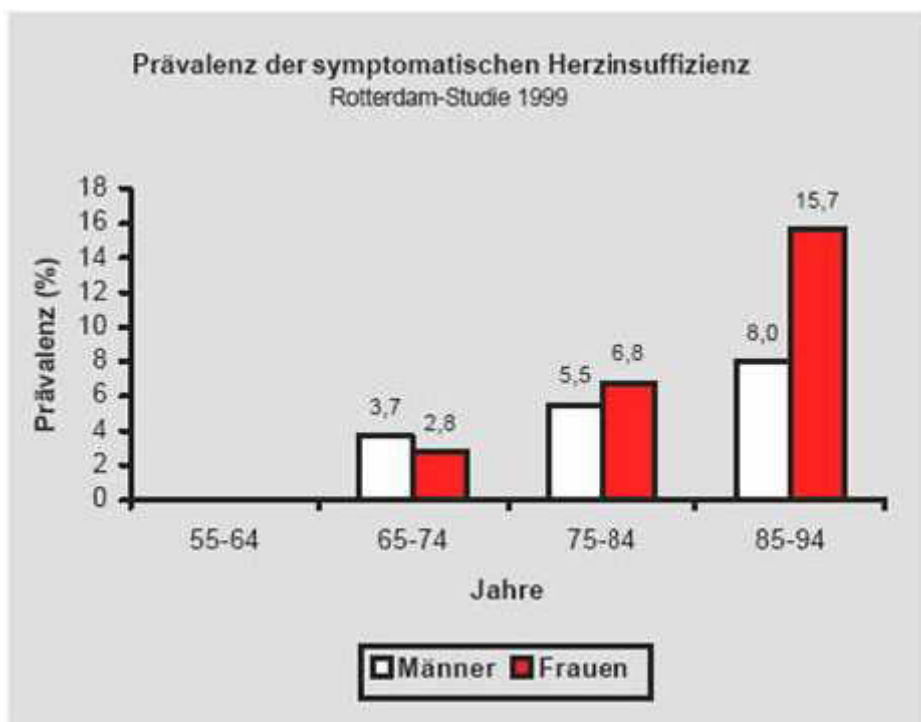


Abbildung I: Die Abbildung zeigt die Prävalenz der Herzinsuffizienz in der Allgemeinbevölkerung Hollands, Rotterdam-Studie 1999 (33).

Die chronische Herzinsuffizienz hat stadienabhängig nach einem Krankheitsverlauf über Wochen und Monate eine hohe Letalität von 20-30% pro Jahr (34). Je nach Beteiligung des rechten oder des linken Ventrikels am Pumpversagen des Herzens wird zwischen einer Rechtsherz-, Linksherz- und einer Globalinsuffizienz unterschieden.

Nach dem Zeitverlauf differenziert man zwischen der akuten, meist schnell, binnen weniger Minuten bis Stunden entstehenden, sowie der chronischen Herzinsuffizienz, die sich innerhalb von Wochen bis Monaten entwickelt.

Ursachen der akuten Herzinsuffizienz:

- Erkrankung des Myokards, z. B. myogenes Pumpversagen bei Infarkt, Septumruptur bei Infarkt, Myokarditis, Intoxikation z.B. Kalziumantagonisten und β -Blocker
- Erkrankung des Klappenapparats, z. B. Papillarmuskelruptur bei Infarkt, Klappendestruktion bei Endokarditis, dekompensierte Aortenstenose/ Mitralstenose, Sehnenfadenabriss (idiopathisch, Mitralklappenprolaps, Endokarditis), Prothesenfehlfunktion
- Erkrankung des Perikards, z. B. Herzbeuteltamponade infolge Ruptur der freien Ventrikelwand bei Infarkt, Perikarditis, Typ-A-Aortendissektion, traumatisch
- Bradykarde / tachykarde Herzrhythmusstörungen
- Massive Lungenembolie
- Hypertensive Krise (35)

Die akute Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz ist die häufigste Ursache einer akuten Herzinsuffizienz und eine der häufigsten Diagnosen unter den internistischen Notfällen. Die intrinsische Kontraktilität des Myokards, die Vorlast, die Nachlast und die Herzfrequenz determinieren die Pumpfunktion des Herzens (35).

Es wird zwischen der systolischen Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion und Ventrikeldilatation und der diastolischen Herzinsuffizienz mit verminderter Relaxationsfähigkeit des Ventrikels und/oder erhöhter Kammersteifigkeit und Behinderung der Ventrikelfüllung in der Diastole unterschieden (108).

Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz:

- Chronische systolische Herzinsuffizienz
 - Koronare Herzkrankheit, z.B. ischämische Kardiomyopathie
 - Erkrankung des Klappenapparats , z.B. Aortenstenose, Aorteninsuffizienz und Mitralklappeninsuffizienz
 - Kardiomyopathien, z.B. dilatative, inflammatorische, toxische, metabolische, hypertrophe, tachykardieinduzierte, peripartale und immunologische Kardiomyopathie
 - Arterieller Hypertonus, sekundäre Dilatation des hypertrophierten linken Ventrikels
- Chronische diastolische Herzinsuffizienz
 - Koronare Herzkrankheit
 - Arterieller Hypertonus
 - Erkrankung des Klappenapparats z.B. Mitralstenose
 - Perikarditis constrictiva z.B. idiopathisch, nach aortokoronarem Bypass, Tuberkulose, bestrahlungsinduziert, immunologisch
 - Hypertrophe Kardiomyopathie
 - Restriktive/infiltrative Kardiomyopathie (35)

Die koronare Herzkrankheit steht als Hauptursache der systolischen Herzinsuffizienz und die arterielle Hypertonie als Hauptursache der diastolischen Herzinsuffizienz im Vordergrund (34).

1.2.1. Kompensationsmechanismen des insuffizienten Herzens

Aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen kommt es zu Druck- und Volumenbelastungen am Herzen, welche im Verlauf zu myokardialer Schädigung und Funktionsbeeinträchtigung hervorrufen. Um die Herzfunktion aufrechtzuerhalten, werden verschiedene pathophysiologische Mechanismen aktiviert, die zunächst eine ausreichende Versorgung aller Organe und Gewebe sicherstellen und später beim Überschreiten kritischer Grenzen der Myokardhypertrophie zur Progression der Herzinsuffizienz führen.

Das Herz antwortet auf die erhöhte Arbeitsbelastung mit den folgenden Kompensationsmechanismen

- Mechanische Anpassungsreaktion

Eine wichtige Anpassung an die vermehrte Druck- oder Volumenbelastung des Herzens sowie an den Verlust von kontraktile Muskelmasse nach Myokardinfarkt stellen die ventrikuläre Dilatation und Hypertrophie dar (36). Dieser adaptive Prozess verändert die Dimensionen und die Form des Herzens (37). Nach dem Laplace-Gesetz kommt es somit bei einer primären Erhöhung des Ventrikeldurchmessers durch eine Volumenbelastung zu einer Hypertrophie mit einem unveränderten oder sogar erhöhten Verhältnis zwischen Radius und Wanddicke des Ventrikels (exzentrische Hypertrophie). Bei einer primären Druckbelastung stellt sich eine Verminderung des Verhältnisses zwischen Radius und Wanddicke ein. Dies ist charakteristisch für eine konzentrische Hypertrophie (49). Nach dem Laplace-Gesetz ist die Wandspannung proportional zum Druck und Radius sowie umgekehrt proportional zu

Wanddicke. Die Wanddickenzunahme durch eine Myokardhypertrophie senkt die Wandspannung. Die Kontraktilität ist umgekehrt proportional zur systolischen Wandspannung. Die Wanddickenzunahme führt initial zu einer Aufrechterhaltung der systolischen Myokardfunktion und einer Herabsetzung der Wandspannung (49). Chronische Druckbelastung bzw. Volumenbelastung führen zu einer Erhöhung der Wandspannung. Bei inadäquater Zunahme der Wandspannung reicht die Hypertrophie nicht aus und dieser Vorgang geht in eine kontraktile Dysfunktion über (39, 40).

Bei Volumenbelastung des Myokards kommt es zu einem seriellen, nacheinander geschalteten Wachstum der Sarkomere. Im Gegensatz dazu, führt die primäre Druckbelastung zu einem parallelen Zuwachs der Sarkomere. Es ist bekannt, dass eine große Anzahl neurohumoraler Aktivatoren, wie z.B. Noradrenalin, Schilddrüsenhormone, Angiotensin II, Wachstumsfaktoren, Radikale und mechanische Reizung, eine Myokardhypertrophie induzieren kann (109, 110, 111, 112). Diese Stimuli verursachen Veränderungen in der Genexpression und in der Proteinsynthese, es erfolgt eine überproportionale Zunahme bestimmter Gene bzw. Proteine, so genannter Hypertrophiemarker. Zu diesen zählen u.a. ANP, β -Tropomyosin, atriales MLC, β -MHC und skelettales Muskel- α -Aktin (113).

Neben der kardiomyozytären Hypertrophie findet auch eine Zunahme des Kollagenvolumens statt, insbesondere bei chronischer Druckbelastung (118). Aldosteron, Angiotensin II, Superoxidationradikale und Wachstumsfaktoren regen das Fibroblastenwachstum mit einer vermehrten Bildung von Kollagen an (114, 115, 116, 117). Zu Beginn der Herzhypertrophie verhindert die Einlagerung des zugfesten und wenig dehnbaren Kollagens eine weitere Ventrikeldilatation. Das Fortschreiten der Kollageneinlagerung bedingt aber nachfolgend eine Relaxationsstörung und Füllungsstörung des Ventrikels (119). Die Umkehr der anfangs positiven Wirkungen der Hypertrophie wird vor allem durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Bezug auf die entstandene kontraktile Masse verursacht. Energieangebot und Energiebedarf stehen dann im Widerspruch zueinander, Myozytennekrosen setzen ein, und die interstitielle Fibrose schreitet voran. Außerdem entwickeln die intramyokardialen Koronararterien eine Mediazunahme sowie eine perivaskuläre Fibrose, die durch die hypertrophiebedingte Druckbelastung erzeugt werden. Weitere Myokardischämien und damit verbundene Myozytenverluste können die Folge sein.

- Neurohumorale Anpassungsreaktion

Die neurohumorale Aktivierung ist ein wichtiger Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion. Die körperliche Anstrengung gilt als stärkster Stimulus für die Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Dieses antwortet mit einer erhöhten Freisetzung von Katecholaminen, v.a. Noradrenalin (38). Das Myokard wird durch kardiale sympathische Nervenfasern aktiviert und wirkt selbst als endokrines Organ, indem es zu erhöhten NoradrenalinKonzentrationen im Plasma beiträgt (121). Über vaskuläre α -Rezeptoren steigert Noradrenalin die peripheren Gefäßwiderstände mit anschließender Erhöhung des diastolischen und systolischen Blutdrucks (122). Vorwiegend über β_1 -Rezeptoren beeinflusst Noradrenalin die Kontraktionskraft und die Frequenz des Herzens (120). Dadurch wird für eine gewisse Zeitspanne die Durchblutung der lebenswichtigen Organe, wie z.B. von Herz und Gehirn, aufrechterhalten, jedoch führt eine ständige Stimulation mit Katecholaminen zur Desensibilisierung bis hin zum Abbau der β -Adrenozeptoren am Herzen, es kommt zu einer Abnahme der β -Rezeptoren (Downregulation) (120). Der positiv inotrope und positiv chronotrope Effekt von β -Agonisten wird vermindert.

Die arterielle Vasokonstriktion erhöht die Nachlast, so dass sich das Schlagvolumen reduziert und der Energiebedarf des Myokards ansteigt. Die venöse Vasokonstriktion hat eine Vorlasterhöhung mit konsekutiver Ödembildung zur Folge (123). Weitere Auswirkungen der Noradrenalinfreisetzung sind Kardiomyozytenhypertrophie und Apoptose, die das Fortschreiten der Herzinsuffizienz fördern (124, 125). Eine Abnahme der Herzauswurfleistung aktiviert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (49). Allgemein bewirkt es eine Vasokonstriktion, die anfänglich wiederum die Perfusion der lebenswichtigen Organe sicherstellt und eine Wasserretention, welche die Vorlast erhöht und damit die Kontraktionskraft des Myokards durch Dehnung der Herzmuskelfasern steigert. In Anlehnung an den Frank-Starling-Mechanismus ist ein dilatierter Ventrikel in der Lage mit geringerer Faserverkürzung ein unverändertes Schlagvolumen zu erreichen (38). Es gelingt einem erweiterten Ventrikel jedoch nur bis zu einem gewissen Radius ein ausreichendes Schlagvolumen zu erzeugen.

Die renale Reninfreisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen geschieht bei einem Abfall des intrarenalen Perfusionsdruckes, bei einer Reduktion der Natriumkonzentration in den proximalen Anteilen des distalen Tubulus und durch Stimulation der β_1 -Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen. Renin wandelt das in der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin I um. Das Angiotensin I wurde mit Hilfe des Angiotensin-Converting-Enzyms in Angiotensin II umgesetzt. Angiotensin II wirkt über AT1- und AT2-Rezeptoren, wobei die meisten Organe AT1-Rezeptoren besitzen, welche Effekte wie Vasokonstriktion, Katecholaminausschüttung, Hypertrophie und Hyperplasie vermitteln. AT2-Rezeptoren verhelfen zu antiproliferativen Wirkungen (120). Angiotensin II aktiviert die Aldosteronfreisetzung durch die Bindung an AT1-Rezeptoren in der Nebenniere, es bewirkt eine renale und systemische Vasokonstriktion, eine Freisetzung von Noradrenalin aus dem sympathischen Nervensystem sowie eine Myozytenhypertrophie und eine Myozytenapoptose (126, 111, 127). Die Herzauswurfleistung wird aufgrund der von Angiotensin II vermittelten vasokonstriktorischen Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur und der direkten Katecholaminfreisetzung, die eine Nachlast- und Vorlasterhöhung als auch eine kardiale Desensibilisierung von β -Rezeptoren verursacht, letztendlich negativ beeinflusst.

Die Kontraktilität verschlechtert sich, der Sauerstoff- und der Energiebedarf des Myokards erhöht sich. Die Vorlasterrhöhung durch Aldosteronwirkung trägt im Laufe der Zeit zu Stauungen im großen und später kleinen Kreislauf bei. Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor, Interleukine und TGF- β , sind bedeutsam für die Entwicklung der Herzinsuffizienz. Diese Moleküle werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet und vor allem von Makrophagen sezerniert. Zytokine können in Kardiomyozyten synthetisiert werden. Stimuli für die Synthese von Zytokinen in Kardiomyozyten sind mechanische Dehnung, Hypoxie, oxidativer Stress, Angiotensin II, Katecholamine und Endotoxin. Im gesunden Myokard werden keine Zytokine freigesetzt. Zytokine tragen chronisch zum Myokardumbau bei. Über eine Freisetzung freier Sauerstoffradikale und eine Aktivierung des MAP-Kinase- Signaltransduktionsweges bewirken Zytokine eine Myokardhypertrophie, die myokardiale Expression fetaler Gene, eine interstitielle Fibrose und einen Untergang von Kardiomyozyten durch Apoptose (49). Ein wesentlicher Mechanismus für den myokardialen Gefügeverlust ist dabei eine TNF-induzierte Aktivitätsänderung von Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren mit konsekutivem Strukturverlust des myokardialen Bindegewebes. Teilweise sind diese Effekte über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und eine Freisetzung von TGF- β vermittelt.

1.3. Arteriosklerose

1.3.1 Definition der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose stellt einen systemischen Prozess der größeren und mittleren muskulären und elastischen Arterien dar. Laut WHO handelt es sich um eine variable Kombination von Veränderungen der Intima im Sinne herdförmiger Ansammlungen von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (28). Die Entstehung der Arteriosklerose erstreckt sich über Jahrzehnte und kann besonders in industrialisierten Ländern bereits im Kindesalter beginnen.

1.3.2 Pathophysiologie der Arteriosklerose

Arteriosklerotische Läsionen entstehen an bevorzugten Stellen im Kreislaufsystem und führen dann in Abhängigkeit des betroffenen Gefäßbettes und Ausmaß der Veränderungen zu charakteristischen klinischen Manifestationen. Betrifft die Arteriosklerose die Herzkranzgefäße, dann kommt es typischerweise zu den Symptomen einer Angina pectoris bis hin zu einem Myokardinfarkt. In den letzten Jahren wurden zahlreiche experimentelle Modelle entwickelt, die jedoch stets nur einen Teilaspekt der komplexen Vorgänge der Arterioskleroseentwicklung beschreiben. Entsprechend konkurrieren die verschiedenen Hypothesen nicht miteinander, sondern betonen die verschiedenen Aspekte der Pathogenese (47). Der arteriosklerotische Prozess muss als ein hoch komplexer und aktiver Vorgang betrachtet werden, bei dem die Lipidakkumulation nur einen Teilaspekt neben der endothelialen Dysfunktion und einer inflammatorischen Reaktion darstellt. Im Zentrum der Entwicklung einer arteriosklerotischen Läsion steht auf der einen Seite das Endothel, als die Gefäßinnenwand auskleidende Schicht und auf der anderen Seite ein lokaler, wie auch systemischer inflammatorischer Prozess (29, 30, 31). Bluthochdruck, Diabetes mellitus, und Hypercholesterinämie, sowie Rauchen, Bewegungsmangel, Übergewicht, fettreiche Ernährung, Stress, höheres Alter und das Geschlecht fördern die Entstehung von Arteriosklerose, ebenso wie eine genetische Disposition und Hyperhomozysteinämie (48). Die Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzgefäßen führt zur koronaren Herzkrankheit mit den Folgen von stabiler/instabiler Angina pectoris und ihren Komplikationen.

1.4. Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien. Es handelt sich hierbei um eine chronische Erkrankung, die sich durch den schleichenden Prozess der Arteriosklerose im Verlauf von Jahrzehnten fortschreitend verschlechtert.

Obwohl wesentliche Fortschritte in Diagnostik und Therapie der durch Arteriosklerose verursachten Krankheiten gemacht werden, ist sie die derzeit häufigste Erkrankungs- und Todesursache besonders bei Männern über dem 40. und bei Frauen über dem 50. Lebensjahr. Es gibt große Unterschiede von Land zu Land in der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit und den kardialen Todesfällen, wie die MONICA-Studie anhand von Untersuchungen in 21 Ländern auf 4 Kontinenten zeigt (27). Bei der koronaren Herzkrankheit handelt es sich um Ablagerungen in den Gefäßwänden, die zu einer Verringerung des Gefäßinnendurchmessers und einer Versteifung der Gefäße führen. Infolgedessen kann die Durchblutung der Herzmuskulatur (Myokard) beeinträchtigt werden, so dass die Sauerstoffversorgung unter Umständen nicht ausreichend ist. Es entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, welches als Koronarinsuffizienz bezeichnet wird. In Folge des Sauerstoffmangels im Herzmuskelgewebe kommt es zu einer Myokardischämie und den hieraus resultierenden klinischen Bildern der Angina pectoris und des Myokardinfarkts mit den Komplikationen wie z.B. Herzinsuffizienz, malignen Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod. Obwohl Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung typischerweise erst nach dem 40. Lebensjahr Symptome entwickeln, sind arteriosklerotische Veränderungen schon sehr viel früher nachweisbar, wie in histopathologischen Untersuchungen an Leichenherzen jüngerer Individuen gezeigt werden kann (42, 43, 44, 45, 46). Mit einer Sauerstoffunterversorgung eines Areals, welches von einem stenosierten Gefäß versorgt wird, ist erst ab einer Koronarstenose von mehr als 50% des Gefäßlumens zu rechnen. Sind mehr als 75% des Gefäßlumens eingeengt („kritische Stenose“), tritt ohne ausreichende Kollateralisierung (Bildung von den Herzmuskel mit Sauerstoff versorgenden Nebengefäßen) eine belastungsabhängige Angina pectoris auf. Bei einem akuten Verschluss von 100% tritt meist ein Infarkt mit einer absoluten Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskelgewebes auf, welche ein Absterben des entsprechenden Herzmuskelareals zur Folge hat (49, 50). Allerdings führen arteriosklerotische Veränderungen nicht zwangsweise zu einer klinischen Symptomatik.

1.5. Zytokine

Bei den Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe kleiner Proteine, die zwar strukturelle Unterschiede zeigen, aber wegen ihrer vergleichbaren physiologischen Wirkungen zusammengefasst werden können. Zur Gruppe der Zytokine zählen unter anderem Interleukine (IL), Interferone (IFN), Chemokine, Kolonie-Stimulierende-Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF). Zytokine erreichen ihr Ziel durch ein Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Zielgenen im Zellkern, welches schließlich zur DNA-Synthese, Zellteilung oder aber zur Expression differenzierungsspezifischer Proteine führt.

1.5.1. Transforming Growth Factor β

Bei TGF- β handelt es sich um ein multifunktionelles Zytokin, welches in fünf verschiedenen Isoformen (TGF- β 1-5) bekannt ist. TGF- β wurde ursprünglich als ein Faktor identifiziert, der das Wachstum von Fibroblasten in Kulturen unterstützt (76). Die Mitglieder der TGF- β -Familie sind Homodimere und weisen untereinander eine 60-80%ige Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen auf. Dabei sind fünf Isoformen bekannt, TGF- β 1-3 in Säugetieren, TGF- β 4 im Huhn und TGF- β 5 im Krallenfrosch, wobei die kodierenden Gene dieser Isoformen auf verschiedenen Chromosomen liegen. Das Gen für TGF- β 1 liegt in der Region 19q13, das für TGF- β 2 in der Region 1q41 und das für TGF- β 3 in der Region 14q24 (68). TGF- β wird wie auch die anderen Mitglieder der Superfamilie von verschiedensten Zellen in Form eines inaktiven Vorstufen-Proteins synthetisiert (70). Hierbei ist ein sog. LAP (latency associated peptide), ein aus 278 Aminosäuren bestehendes Propeptid, mit dem eigentlichen bioaktiven TGF- β Peptid assoziiert. LAP hält TGF- β in einer latenten und inaktiven Form, die dann nicht an Membranmoleküle oder Rezeptoren binden kann. Der latente TGF- β Komplex beinhaltet außerdem eine dritte Komponente, ein großes Glycoprotein, das als LTBP (latent TGF- β binding protein) bezeichnet wird und über Disulfidbrücken mit dem LAP verbunden ist.

LTBP wird für die Latenz des TGF- β Komplexes nicht benötigt, spielt aber bei Sekretions- und Aktivierungsprozessen eine wichtige Rolle. LTBP assoziiert sehr stark mit der Extrazellulärmatrix und vermittelt somit eine Speicherung von latentem TGF- β in derselben. Latentes TGF- β wird *in vitro* mittels Säure, Alkali, Hitze oder Proteolyse aktiviert. An physiologischen Aktivierungsmechanismen sind vermutlich Plasmin oder Thrombospondin beteiligt (77, 78). Die aktivierte TGF- β Isoform entspricht dem C-terminalen Ende des jeweiligen Vorläufermoleküls und besteht aus 112 Aminosäuren (71). Die Abbildung II zeigt die TGF- β 1- Struktur mit den zysteinreichen Monomeren (32, 74, 75).

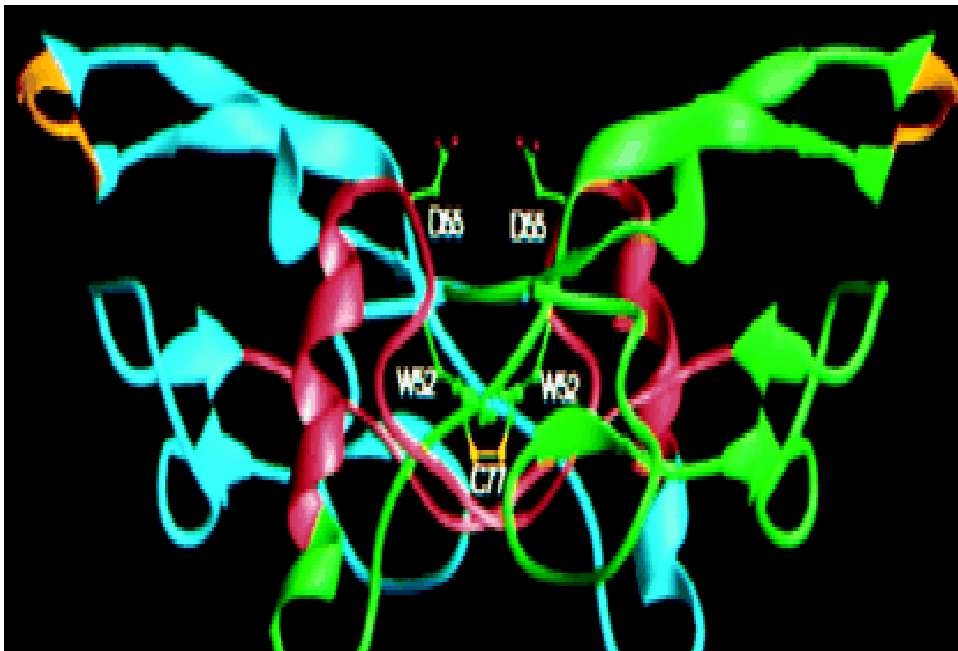


Abbildung II: Von der NMR-Struktur des humanen TGF- β 1 abgeleitetes Ribbon-Diagramm (Protein-Datenbank Eintrag 1KLC). In grün und blau sind die beiden TGF- β Monomere dargestellt, die verbindende Disulfidbrücke in der Mitte ist gelb markiert (32).

1.5.1.1. Mitglieder der TGF- β Superfamilie

Die TGF- β Superfamilie umfasst neben den TGF- β Isoformen insgesamt über 30 Proteine, die strukturell ähnliche, aber dennoch funktional unterschiedliche Wachstumsfaktoren repräsentieren und eine Vielzahl zellulärer Verhaltensweisen regulieren. Zu nennen sind hier unter anderen die BMPs (bone morphogenetic proteins), Dpp (decapentaplegic), die GDFs (growth/differentiation factors), GDNF (glial derived growth factor), Aktivine und Inhibine, AMH (anti muellerian hormone) und Nodal (72, 73). Diese Moleküle treten in der Regel als ca. 25 kDa große Dimere auf, die durch eine einzelne Disulfidbrücke zwischen den Monomeren stabilisiert sind. Die Monomere besitzen eine cysteinreiche Knotenstruktur, die ihnen extreme Kompaktheit verleiht (74, 75).

1.5.2. TGF- β -Signalweg

Die Wirkung von TGF- β auf die Zielzelle wird über Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt, welche eine extrazelluläre Domäne zur Bindung des Liganden, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische, Serin/Threonin-Kinase tragende Domäne besitzen. TGF- β bindet zuerst an den Typ II Rezeptor, welcher dann durch seine Kinasedomäne den Typ I Rezeptor (in seiner GS-Domäne) phosphoryliert und somit aktiviert. Es entsteht vorübergehend ein Komplex aus Rezeptor I und II. Ohne den Typ II Rezeptor ist eine Bindung des Liganden an den Typ I Rezeptor offenbar nicht möglich (69).

1.5.2.1. Smad - Proteine

Eine Reihe von zytoplasmatischen Proteinen können mit den Rezeptoren in Interaktion treten. Die Familie der Smad-Proteine ist hier als die wichtigste Gruppe zu nennen. Der Name SMAD leitet sich von MAD, einem Drosophila-Protein (mothers against decapentaplegic) und von SMA (smaller worms), einem Gen aus Caenorhabditis ab. Smads sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 42 kDa und 60 kDa.

Charakteristisch für die Smad-Proteine ist das Vorhandensein von zwei homologen Domänen, jeweils am Amino- und Carboxy-Ende, welche als MH1 bzw. MH2 (mad homology domains) bezeichnet werden (285). Nach ihren funktionellen Eigenschaften werden die Smads in drei Gruppen eingeteilt:

- Rezeptor-aktivierte „R-Smads“ (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8)
- Co-Smads (Smad4)
- Inhibitorische Smads „I-Smads“ (Smad6, Smad7) (79)

Aus der Gruppe der R-Smads sind für den TGF- β Signalweg vor allem Smad2 und Smad3 von Bedeutung. Die Aktivierung der R-Smads durch den Typ I Rezeptor erfolgt durch Phosphorylierung von zwei Serinresten am Carboxy-Ende. Smad2 und Smad3 bilden über ihre MH2 Domäne einen Komplex mit dem Membranassoziierten Protein SARA (smad-anchor for receptor activation), wodurch die Annäherung der R-Smads an die Kinase des Typ I Rezeptors vermittelt wird (79, 80). Die phosphorylierten R-Smads (Smad2 und Smad3) oligomerisieren dann mit dem Co-Smad4 und bilden einen Smad-Proteinkomplex, welcher in den Zellkern geht, um dort auf DNA-Ebene die Genexpression zu beeinflussen. Interessanterweise kann Smad4 nur im Komplex mit R-Smads in den Zellkern gelangen, wohingegen die R-Smads auch ohne Smad4 in den Nukleus translokieren können. Smad4 ist dennoch weniger als Transporter anzusehen, sondern eher an der Regulation der Genexpression beteiligt (79). Angesichts der komplexen Interaktionen der TGF- β -aktivierten Smads ist es deshalb gut nachvollziehbar, dass TGF- β über verschiedene Signalwege die Genexpression beeinflussen kann. Die I-Smads (Smad6/7) antagonisieren den TGF- β - Signalweg, indem sie die Phosphorylierung der R-Smads bzw. die Bindung an den Rezeptorkomplex verhindern (80). So lässt sich durch Überexpression von Smad7 in der Zelle die TGF- β -Signaltransduktion über die Smad-Proteine blockieren und somit auch einige typische TGF- β -Effekte, wie z.B. die Wachstumsinhibition (81) oder die SBE (smad-binding Element)-Aktivierung induzieren. Dabei wird die Transkription der I-Smads durch TGF- β selbst induziert, so dass hier ein negativer Feedback-Regulationsmechanismus vorliegt.

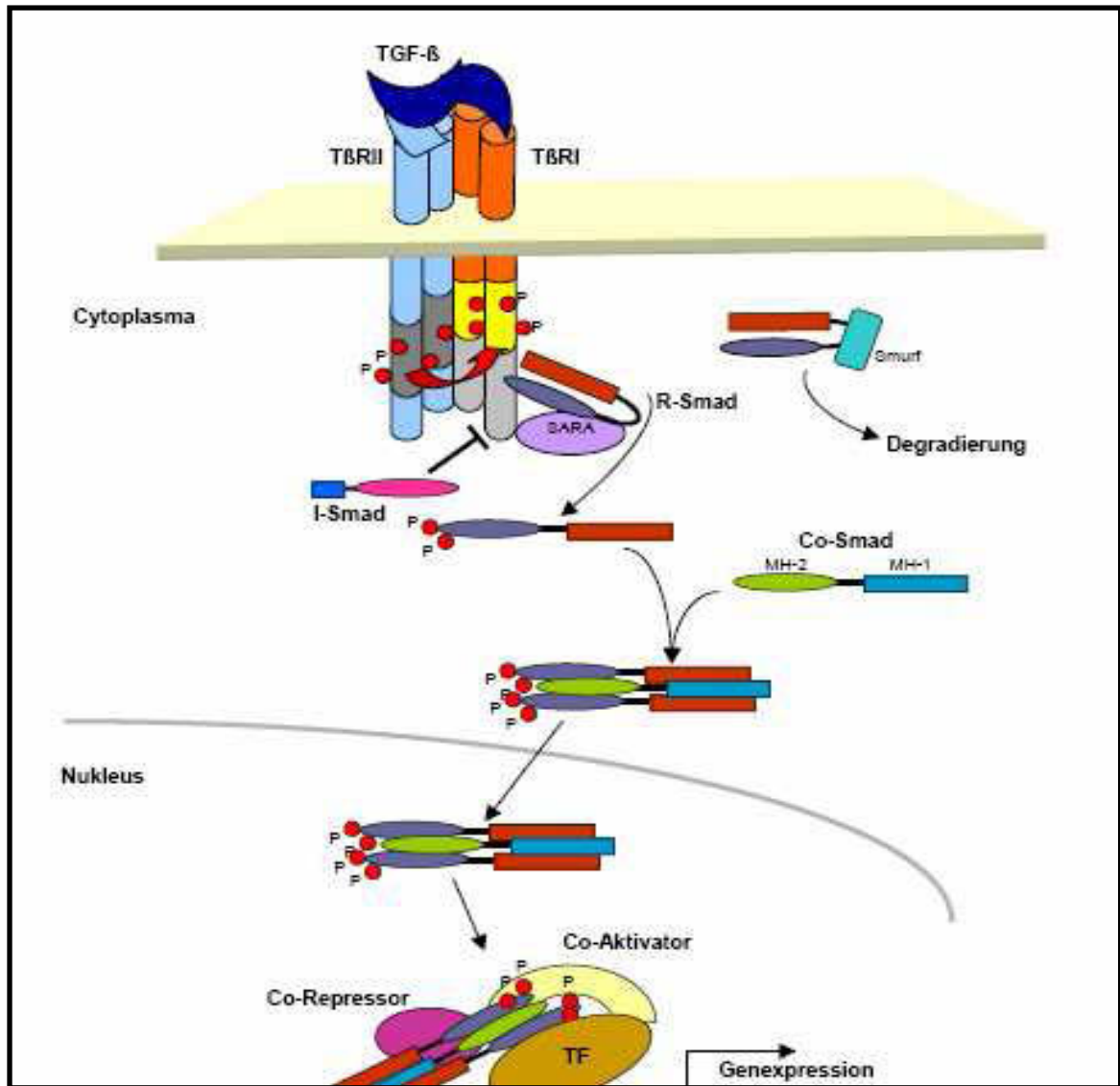


Abbildung III: Schematische Darstellung der TGF- β -Rezeptoren und der Smad-Proteine.

1.5.3. Funktionen von TGF - β

Bei der ersten Entdeckung von TGF- β dachte man, dass TGF- β ausschließlich eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielt. Heute weiß man, dass TGF- β eine Vielzahl von Wirkungen auf fast alle Zellen hat und viele physiologische Prozesse reguliert (84, 85, 86, 87, 89, 91).

Verschiedene Zellen können auf das gleiche TGF- β Protein auf völlig unterschiedliche Weise reagieren:

- Stimulierung der Zellproliferation
- Inhibition der Zellproliferation und der Differenzierung einiger Zellen
- Stimulation der Differenzierung einiger anderer Zellen
- Stimulation der Zellmigration
- Potenter Wachstumsregulator z.B. im Bindegewebe

Die Effekte von TGF- β auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung haben wahrscheinlich mehrere Wirkungsmechanismen (96, 97):

- Induktion der Synthese und Sekretion vieler Proteine der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Fibronectin, Thrombospondin, Tenacin, Osteopontin, Osteonectin und Proteoglykane)
- Durch die Erhöhung der Expression vieler Integrine (Zell-Adhäsions-Rezeptoren) kommt es zu vermehrter Zelladhäsion und zu Genexpression. Durch Integrin vermittelte intrazelluläre Signalgebung kommt es zur Zelldifferenzierung.
- Abnahme der Proteasen-Aktivatoren und Zunahme der Proteasen-Inhibitoren
- Durch die chemotaktische Wirkung, vor allem auf Monozyten und Fibroblasten, beeinflusst TGF- β insbesondere die Wundheilungs- und Gewebsregenerationsprozesse, sowie das Immunsystem und die Organ- und Gewebsentwicklung (83, 98).

1.5.3.1. TGF - β im Immunsystem

TGF- β besitzt eine immunmodulatorische Funktion. Fast alle Immunzellen, wie Monozyten und Lymphozyten synthetisieren TGF- β 1. Zielzellen dieser latenten Form des TGF- β sind nicht nur Immunzellen, sondern auch Gewebszellen, wie Endothelzellen oder Tumorzellen.

Die Lymphozyten und besonders die Monozyten besitzen wahrscheinlich die benötigten Proteasen, um die latente Form des TGF- β zu aktivieren (84, 86, 89, 99, 100, 101, 102). Die potenteste Wirkung des TGF- β auf Lymphozyten ist der antiproliferative Effekt. TGF- β inhibiert die Proliferation von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Thymuszellen, Granulozyten und NK-Zellen (89, 91, 93, 94, 95, 98). Ferner verringert TGF- β die Expression vieler Zytokine, die eine potentielle Wirkung auf die aktivierten Zellen haben. So inhibiert TGF- β die Effekte und/oder Produktion von $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TNF-}\beta$, IL-1, IL-2, IL -3 und die Expression des IL-2 Rezeptors (88).

1.5.3.2. TGF- β in der Embryogenese

Die Funktionen von TGF- β sind in der Embryogenese sicherlich vielfältig. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β an der Differenzierung von undifferenzierten Mesenchymalzellen in z.B. Chondrozyten oder Osteoblasten mitwirkt (83, 103). Ferner wird TGF- β während der Embryogenese auch in Epithelzellen synthetisiert, so dass angenommen werden kann, dass TGF- β auch bei der Entwicklung von komplexen epithelialen Strukturen, wie Lunge oder Brustdrüse eine wichtige Rolle spielt (87).

1.5.3.3. TGF- β in der Tumorentstehung

In der Tumorentstehung scheint der Effekt von TGF- β weniger in der Tumorentwicklung zu liegen, als in der Beschleunigung des Tumorwachstums. Dieser Effekt beruht hauptsächlich auf der durch TGF- β induzierten Synthese der Extrazellulärmatrix (85, 99, 104, 105, 106, 107). TGF- β gilt allerdings als der wirksamste fibrogene Mediator und ist wichtig für die Synthese vieler Proteine.

1.6. Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen gehören zur Familie der Zink-beihaltenden Endopeptidasen. Sie benötigen Calcium für ihre Stabilität. Diese Enzyme bewirken den Abbau der Extrazellulärmatrix. Über 25 verschiedene Mitglieder, die bis heute identifiziert sind, werden nach Substratspezifität in bestimmte Klassen eingeteilt. Es existieren Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Elastasen. Die meisten Matrixmetalloproteinasen stellen zunächst Proenzyme dar, die per Sekretion in den Extrazellulärraum gelangen und anschließend durch enzymatische Spaltung aktiviert werden. Im Gegensatz dazu stehen die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen, welche schon im aktiven Zustand vorliegen. Die Synthese der MMPs im Herz erfolgt dort in allen vorhandenen Zellen, wie in Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Entzündungszellen (128, 129). Die Zusammensetzung der kardialen Extrazellulärmatrix besteht aus Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Chondroitinsulfat als auch aus Basalmembranproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und bioaktiven Signalmolekülen (130, 131). Sie unterstützt die Anordnung und Ausrichtung der Kardiomyozyten, so dass eine Kraftübertragung zwischen benachbarten Kardiomyozyten erfolgen kann und damit eine optimale Herzarbeit möglich ist (132). Eine Kontaktaufnahme der Matrix mit kardialen Zellen findet über Integrinrezeptoren statt (133). Kardiale Fibroblasten regulieren den Zustand der Extrazellulärmatrix durch Synthese und Platzierung von Matrixmolekülen, durch den Abbau der Matrix per Sekretion von Matrixmetalloproteinasen sowie durch die Erhaltung der mechanischen Spannung des Kollagennetzwerkes (134). Die Synthese und der Abbau der Extrazellulärmatrix befinden sich normalerweise im Gleichgewicht, jedoch kann diese Balance im Rahmen einer Herzinsuffizienz oder nach Myokardinfarkt zerstört werden. Mit zu den Hauptverursachern für die Änderung der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix zählen die Matrixmetalloproteinasen. Eine umfangreiche Studie mit Ratten protokolliert zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt diverse MMP-Spiegel, dabei liegen MMP-2, MMP-9 und MMP-13 zu jedem Zeitpunkt über den Kontrollwerten (135). Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigen erhöhte Plasmaspiegel von MMP-9 (136).

Die Plasmaspiegel von herzinsuffizienten Personen weisen, im Vergleich zu Gesunden, Erhöhungen von MMP-8 und MMP-9 auf (137). Die pharmakologische Ausschaltung von MMPs in Mäusen und Kaninchen erzielt auch eine reduzierte ventrikuläre Dilatation nach Myokardinfarkt (140, 138). Die zahlreich durchgeführten tierexperimentellen MMP-Inhibitorbehandlungen nach Myokardinfarkt zeigen eine Reduktion des kardialen Remodelings, die Kardiomyozytenhypertrophie und die Wanddickenabnahme nehmen wenig zu, die linksventrikuläre Dilatation begrenzt sich und damit wird die linksventrikuläre Pumpfunktion nur leicht eingeschränkt (138, 139).

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Chirurgie

Wir haben C57B16 Mäuse von Harlan Winkelmann mit Körpergewicht von 20 - 25g und im Alter von 8-12 Wochen behandelt. Die Tiere werden in einzelnen, belüfteten Käfigen unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten. Standardisierte Umweltparameter heißt man hält eine Raumtemperatur von $20 \pm 1^\circ\text{C}$, eine Luftfeuchtigkeit von $60 \pm 5\%$, Lichtphasen mit 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit ein, sowie Käfige mit Futterraufe, maximal 5 Mäuse pro Käfig und Holzgranulat als Einstreu. Der Myokardinfarkt wird durch die Ligatur der Arterie coronaria sinistra induziert (11). Nach endotrachealer Intubation und Isofluran - Narkose werden die Mäuse über einen Kleintier-Respirator (Rodent Ventilator UB 7025) beatmet. Die Narkose wird mit einem Isofluran-Verdampfer aufrechterhalten. Zunächst wird die linke Throaxhälfte enthaart, die Haut mit einer Schere durchtrennt und die Pektoralismuskulatur stumpf präpariert. Die Interkostalmuskulatur und das Perikard werden durchtrennt. Nach der Perikarderöffnung wird der absteigende Ast der linken Koronararterie, der schräg über die freie linksventrikuläre Wand verläuft, kurz nach dem Erscheinen unterhalb des linken Herzohres mit einem 6-0 Prolene-Faden unterbunden. Letztlich werden die Lungen durch kurzfristige Überdruckbeatmung entfaltet. Die Anti-TGF- β -Behandlung (5mg/kg Körpergewicht 1D11) wird entweder 1 Woche vor (Anti-TGF vor MI) oder 5 Tage nach (Anti-TGF nach MI) Myokardinfarkt durch intaperitoneale Injektionen, jeden zweiten Tag vorgenommen. Der Antikörper 1D11 neutralisiert alle 3 Isoformen (Subtypen) des TGF's. Die Kontrollgruppe wird mit dem Isotyp kontroll-monoklonalem Antikörper 13C4 (5mg / kg Körpergewicht) behandelt. Die Antikörper stellte freundlicherweise Genzyme Corporation zur Verfügung.

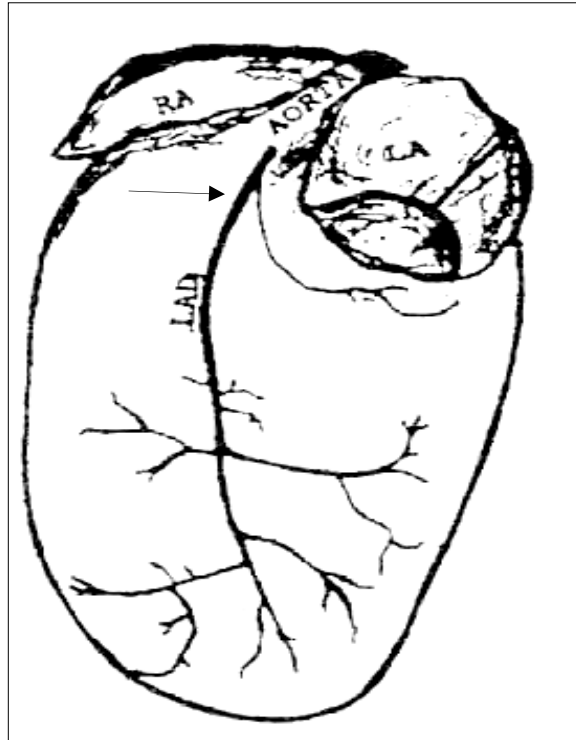


Abbildung IV: Der Pfeil zeigt die Ligaturstelle des Herzkranzgefäßes.

2.2. Echokardiographische Analyse

Die echokardiographischen Untersuchungen werden in leichter Anästhesie mit Isofluran unter Spontanatmung durchgeführt (7, 10). Für die Echokardiographie verwenden wir den Toshiba PowerVision 6000 mit einem linearem 15 MHz Schallkopf. Der Thorax wird geschert, die Tiere in eine 45° Linksseitenlage gebracht und in dieser Position mit Pflasterstreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Ein gewärmtes Ultraschallgel wird auf den Thorax im Bereich des Herzens aufgebracht. Die in der kurzen Achse und in 2-Dimensionen durchgeführten echokardiographischen Bilder enthalten sowohl das papilläre als auch apikale Segment des linken Ventrikels und werden als digitale Schleife gespeichert. In denselben anatomischen Segmenten können M-Mode-Bilder der kurzen Achse mit der Geschwindigkeit von 100 mm/s gewonnen werden. Die echokardiographischen Untersuchungen werden am 1., 21. und 56. Tag nach Infarkt durchgeführt. Im Anschluss werden die hämodynamischen Messungen erhoben. Alle echokardiographischen Aufnahmen werden ohne Wissen über die Behandlung des jeweiligen Tieres off-line analysiert (9).

Für die Auswertung wird ein Prototyp eines Off-line Analyse Systems (NICE, Toshiba Medical Systems) verwendet. Die Ergebnisse werden jeweils als Mittelwert aus drei Messungen ermittelt. Die Merkmale für das Remodeling im B-Mode sind die linksventrikuläre endsystolische Fläche (LVESA) und die linksventrikuläre enddiastolische Fläche (LVEDA), im M-Mode der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVESD) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD). Aus den 2D M-Mode-Bildern wird der enddiastolische (LVEDD) und der endsystolische (LVESD) Durchmesser bestimmt. Mit diesen Werten wird die fraktionelle Ventrikelverkürzung $[FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \cdot 100]$ berechnet.

2.3. Hämodynamische Untersuchung

Die hämodynamischen Messungen werden acht Wochen nach Infarkt durchgeführt. Die Mäuse werden mit Isofluran über einen Kleintier-Respirator narkotisiert. Der Katheter wird durch die rechte Arterie carotis in den linken Ventrikel vorgeschoben und dessen korrekte Lage anhand der Druckkurve kontrolliert. Die linksventrikuläre Druckkurve wird nach Platzierung des Katheters im linken Ventrikel aufgezeichnet. Während der Messungen werden kontinuierlich der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck sowie die maximale Druckentwicklung über die Zeit gemessen (8). Als ein Parameter der Kontraktionsphase wird die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve, $+dP/dt$) berechnet. Sie wird in der Literatur als gut geeigneter Parameter zur Beschreibung der Kontraktilität genannt, da sie bei erhöhter myokardialer Kontraktilität ansteigt und bei verminderter Kontraktilität abfällt (146, 147). Zur Charakterisierung der Relaxationsphase des Herzens wird die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve, $-dP/dt$) herangezogen. Der Zeitpunkt von $-dP/dt$ stellt also den Beginn der isovolumetrischen Relaxationsphase dar. Von diesem Punkt an ähnelt der Verlauf der Druckkurve einer Exponentialfunktion.

2.4. Probengewinnung und Infarktgrößenberechnung

Nach der hämodynamischen Untersuchung wird den Tieren in tiefer Narkose das Herz entnommen. Der linke und der rechte Ventrikel werden voneinander getrennt. Der linke Ventrikel wird in drei transversale Abschnitte, Apex, mittlerer Ring (quer durch die Mitte des linken Ventrikels) und Basis, aufgeteilt. Der mittlere Teil wird in 5µm große Scheiben geschnitten und mit Picosiriusrot gefärbt. Die Größe des Infarkts wurde durch die Planimeter-Messung berechnet. Hierfür wurden die histologischen Schnitte mit Hilfe eines digitalisierten Computerprogramms (Sigma Scan Pro, Jandel Software) vermessen. Die Infarktgröße wird durch die Teilung der Summe von dem endo- und epikardialen Umfang der Infarktfläche durch die Summe des totalen endo- und epikardialen Umfanges berechnet. Für die weiteren Analysen untersuchen wir nur Mäuse mit histologisch gesicherter Infarktgröße von über 30%. Ein Teil der Mäuse wird 3 Tage nach Myokardinfarkt getötet.

2.5. Kollagengehalt

Für die morphologische Analyse wird die Kollagenablagerung mit Picosiriusrot gefärbt, die Quantität wird computergestützt durch die Benutzung von ChromaVision (automated imaging scanning system) und Metamorph Programm (an imaging analysis program, Molecule device) bestimmt. ChromaVision erlaubt das Erfassen einer Teilmenge eines histologischen Schnittes. Durch die computergestützte und kontrollierte Integration aller Teilmengen entsteht ein intaktes histologisches Bild. Alle Gewebeschnitte werden mit Picosiriusrot gefärbt. Die erfassten hellen Felder der Bilder werden in einer Serie von Bildelementen digitalisiert. Das Benutzen von Gestaltumwandler, dem Volumen und den optischen Dichten der Farberzeuger wird durch mathematische Manipulation der Bildelemente quantitativ erfasst. Das Programm misst automatisch die Pixel und stellt den Prozentsatz der positiv gefärbten Fläche für Kollagenfasern fest (14).

2.6. Biochemische und molekulare Messungen

2.6.1. RNA-Isolierung

Anders als DNA ist RNA durch die zusätzliche 2'Hydroxylgruppe der Ribose besonders unter alkalischen Bedingungen sehr instabil. Zudem ist RNA sehr anfällig gegen RNase Kontaminationen, da dieses Enzym aufgrund seiner Häufigkeit und enormen Stabilität in einem biochemischen Labor allgegenwärtig ist. Zudem benötigen RNasen keine Cofaktoren wie bivalente Kationen. Ein schnelles und sauberes Arbeiten ist daher unabdingbar. Intakte Gesamt-RNA wird nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi mit Trizol gewonnen (141). Trizol, ein ready-to-use Reagenz bestehend aus einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin Isothiocyanat, zerstört Zellen und löst Zellkomponenten auf. Gleichzeitig gewährleistet die chaotrope Wirkung des Guanidin Isothiocyanats durch Denaturierung von RNasen die Stabilität der RNA. Anschließend wird durch die Gabe von Chloroform eine Phasentrennung in eine phenolische und eine wässrige Phase erreicht. Letztere enthält die gesuchte RNA, die nach Abnahme der Phase mit Isopropanol ausgefällt wird. Die RNA wird mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich mit RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA-Isolierung erfolgt in 4 Schritten. Die Proben müssen homogenisiert werden, dazu stellt man sie mit dem Homogenisierungsstab von Ultra Turrax ca. 10 min in 3%-ige H₂O₂-Lösung. Danach wird das Rundboden-Röhrchen von Sarstedt, beschriftet und je 1 ml Trizol-Reagenz von Sigma auf 50-100mg Gewebestückchen dazu gegeben. Diese Mischung wird unter Benutzung von Ultra Turrax ca. 30-40 Sekunden homogenisiert. Die Proben lässt man 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Falls Brocken oder Fett in den Proben vorhanden sind, werden sie 10 min. bei 12 000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Probe 200 µl Chloroform hinzugefügt und das Rundboden-Röhrchen mit Parafilm verschlossen und 15 Sekunden geschüttelt, dann lässt man die Proben 3 Minuten inkubieren und wiederholt 15 min bei 10 000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Homogenisierung erfolgt die Phasenseparation.

Es entstehen 3 Phasen von oben nach unten, die wässrige Phase, welche die Gesamt-RNA enthält, die weiße Phase mit der DNA und die rote Phase, welche die Proteine beinhaltet. Nach der Phasenseparation kommt die RNA-Präzipitation d.h. der wässrige Überstand muss abpipettiert und in ein frisches Gefäß überführt und mit 200 µl Chloroform gewaschen werden. Danach wird 1,5 ml Isopropanol hinzugefügt. Die Proben werden gründlich geschwenkt, 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und hinterher 10 min. bei 10 000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA-Aufbereitung erfolgt in dem man den Überstand der Proben vorsichtig abnimmt und verwirft. Daraufhin wird 1 ml 75%ige Ethanol-DEPC-Lösung (10 ml DEPC-H₂O + 30 ml Ethanol 100 %) zum Pellet pipettiert und 10 min bei 13 000 U/min. und 4°C zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand vorsichtig abgenommen und noch einmal kurz zentrifugiert, sowie der letzte Überstand abpipettiert. Das so gewonnene RNA-Pellet bleibt zum Trocknen ca. 10-20 min. bei Raumtemperatur im Abzug offen stehen. Das RNA-Pellet ist erst trocken, wenn es durchsichtig ist. Das Pellet wird in 10-30 µl DEPC-H₂O (10 ml DEPC in 1000 ml destilliertem H₂O) aufgelöst und bei -80 °C eingefroren.

2.6.2. RNA-Quantifizierung

Die RNA-Konzentrationen und die Reinheit von RNA-Proben können durch UV-Spektroskopie bei 260 nm und 280 nm untersucht werden. Das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 betragen. Es ist jedoch vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängig. Die Quantifizierung der RNA-Proben wird folgendermaßen durchgeführt. Die Proben werden ca. 10 min. auf einen Wärmeblock bei 50°C gestellt. 1 µl RNA wird mit 69 µl Wasser verdünnt und in eine Photometer Küvette überführt und die Extinktion im Biophotometer bestimmt.

2.6.3. cDNA-Synthese iScript von BioRad

Initial wird die möglicherweise noch vorhandene chromosomale DNA nach der RNA-Isolierung durch ein DNase-Verdau mit AMP-D1 von Sigma entfernt. Dies geschieht wie folgt, zur 1 µl RNA-Lösung (1 µg RNA müssen jeweils eingesetzt werden) wird 1 µl Puffer, 1 µl DNase und 10 µl destilliertes H₂O hinzugefügt.

Man lässt sie 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend pipettiert man 1 µl Stop-Solution dazu und lässt es noch mal 10 min. bei 70 °C inkubieren. Zu 11 µl DNase-Lösung wird dann 1 µl Primer, 4 µl Puffer, 4 µl H₂O sowie 1 µl Reverse Transkriptase dazugegeben und bei PCR Bedingungen, d.h., 5 min. 25 °C, 30 min. 42 °C, 5 min. 85 °C erwärmt und anschließend auf 4 °C gehalten. Die entstandene cDNA wird für die real time RT-PCR direkt verwendet oder bis zu seinem Einsatz bei -20 °C eingefroren.

Für die quantitative mRNA Bestimmung mittels RT-PCR (real time Polymerase chain reaction) muss die RNA zunächst in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden, da RNA nicht als Matrize für die Taq-Polymerase (*thermophilus aquaticus*) verwendet werden kann. Dies geschieht mit Hilfe von reversen Transkriptasen (RT), Primer, Hexanukleotiden mit statistischer Basenzusammensetzung, die folglich an den verschiedensten Stellen eines mRNA Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten.

2.6.4. Das Prinzip der real-time Polymerasekettenreaktion

Die quantitative real-time PCR ist eine relativ neue Technik, die zu Beginn der 90er Jahre entwickelt wurde. Sie ist seit ca. zehn Jahren für den kommerziellen Markt verfügbar. Die Technologie kombiniert die DNA-Amplifikation mit der Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß vom Ansatz bis zur Auswertung. Durch das Wegfallen der zeitaufwendigen Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese bietet diese Methode ferner eine immense Zeitersparnis. Real-time PCR Systeme stellen eine Kombination zweier Geräte dar: zum einen ein Thermocycler zum Durchführen der eigentlichen PCR, zum anderen ein optisches Detektionsmodul zum Messen der entstehenden Fluoreszenz (144). Beide Geräte werden dabei räumlich miteinander verknüpft, um PCR-Reaktion und Fluoreszenzmessung zeitgleich durchführen zu können.

TaqMan-Sonden-Prinzip

Das Double Dye Sonden-Prinzip ist das Älteste und das zurzeit meist genutzte Prinzip. Es wurde von den Firmen Roche und Applied Biosystems entwickelt und war zunächst radioaktiv markiert (142). Die Auswertung war allerdings sehr zeitaufwendig. Daher wurde zu Sonden mit Fluorochromen gewechselt. Double Dye Sonden tragen, wie der Name sagt, zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Der Reporterfarbstoff befindet sich hier am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Zusätzlich befindet sich am 3'-Ende der Sonde noch eine Phosphatgruppe, damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann (143). Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtstärke bei E1 gering, da fast die gesamte Lichtenergie (E1), die nach der Anregung des Reporters (F1) bei Wellenlänge A1 entsteht, aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher (F2) aufgenommen und in die Wellenlänge E2 umgeformt wird. Das emittierte Licht des Reporterfarbstoffes wird „gequenched“, d.h. gelöscht. Dieser FRET-Effekt bleibt auch erhalten, nachdem die Sonde an den komplementären DNA-Strang gebunden ist (143). Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie. Man bezeichnet die Fähigkeit der Polymerase, ein Oligonukleotid (bzw. eine Sonde) während der Strangsynthese zu hydrolysieren, als 5'-3' Exonukleaseaktivität. Als Erstes wurde dieses Prinzip für die Taq-Polymerase beschrieben. Da das Verhalten der Taq-Polymerase bei der Strangverlängerung einer Comicfigur aus einem Computerspiel der 80er, genannt PacMan, gleicht, wurde dieses Prinzip in Anlehnung daran TaqMan-Prinzip genannt (145). Nach der Hydrolyse der Sonde befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher. Die emittierte Fluoreszenz E1 wird jetzt nicht mehr umgeformt, dieser Fluoreszenzanstieg wird gemessen. Nach Synthese der cDNA (iScript von BioRad, München) wird entsprechend der Firmenprotokolle eine Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) mit kommerziell erhältlichen TaqMan Proben für 18S, Kollagen I, Tumor Nekrose Faktor (TNF), α -MC und β -MHC durchgeführt. Die RNA wird mit 18S rRNA standardisiert, um die unterschiedlichen cDNA-Ausgangswerte zu korrigieren.

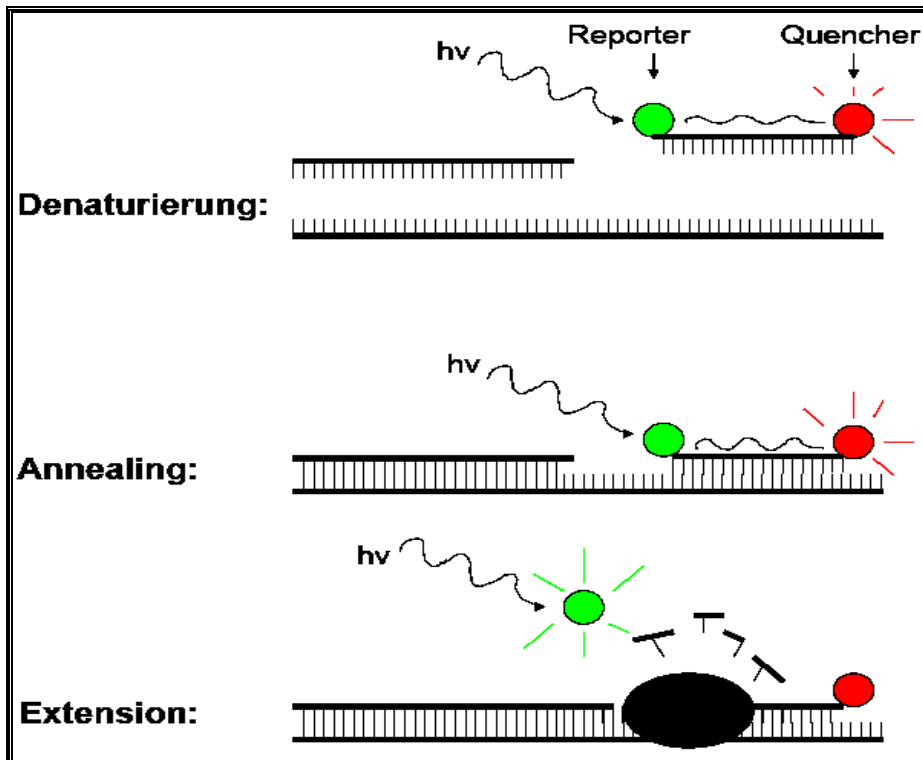


Abbildung V, Schematische Darstellung des TaqMan-Prinzips: Double Dye Sonden tragen zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Ein Reporterfarbstoff befindet sich am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtstärke des Reporters gering, da fast die gesamte Lichtenergie aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher aufgenommen wird. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie. Nach der Hydrolyse befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher. Die emittierte Fluoreszenz E1 kann jetzt gemessen werden.

2.6.5. Die Bestimmung der Gewebekonzentration von Matrixmetalloproteinase 9

Die Bestimmung der Gewebekonzentration von MMP-9 erfolgt nach der zweistufigen Sandwich-ELISA-Methode, die unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des gleichen Matrixmetalloproteinase-Moleküls durchgeführt wird. Zur Farbentwicklung kommt es durch Hinzugabe eines Enzymsubstrates zu dem MMP-Antigen-Antikörper-Komplex.

Die hierfür verwendeten ELISA-Kits (R & S Systems, Abingdon, UK) beinhalten eine Mikrotiterplatte, deren Vertiefungen mit einem gegen MMP-9 gerichteten Antikörper beschichtet sind, enzymmarkierte Antikörperlösung, Farbreagenz, lipophilisierten Assay-Puffer, lipophilisierten MMP-9-Standard und konzentrierte Waschlösung (16). Die Bestimmung wird laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die mit diesem Kit bestimmte Konzentration repräsentiert die MMP-9-Konzentration. Durch die optische Dichtemessung im Bereich von 450 nm wird die MMP-9-Gewebskonzentration mit Hilfe eines Photometers anhand der Extinktion bestimmt.

2.6.6. Bestimmung der Neutrophilenzahl durch die Immunohistochemie

Der linke Ventrikel wird in drei transversale Abschnitte, Apex, mittlerer Ring und Basis, aufgeteilt. Der basale Teil wird in 5-7 µm große Scheiben geschnitten und in Paraffin eingebettet. Die Präparate werden entparaffiniert und 10 min. in Unmasking-Lösung bei 95 °C inkubiert und danach in frischer Unmasking-Lösung abgekühlt. Die Präparate werden danach 3 Mal für 5 min. in PBS gewaschen. Die Schnitte werden mit ImmunoEdgeStift umrandet. Direkt danach werden Sie 3 Mal für 5 min. in PBS gewaschen. Die mikroskopischen Schnitte werden auf den Rechner übertragen und die Neutrophilen mittels High Power Fields ausgezählt.

2.7. Statistische Analyse

Alle Daten werden unter Berücksichtigung des Mittelwertes und Standardfehlers präsentiert. Die Mortalitätsrate wird mittels eines log rank- Testes berechnet. Absolute Unterschiede zwischen den Gruppen werden durch Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wird als signifikant betrachtet. Die statistischen Analysen werden durch StatView Statistics Program (Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA) ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Mortalität

Die postoperative Sterblichkeit im Behandlungsverlauf ist zwischen den verschiedenen Gruppen eindeutig verschieden. Das Überleben der Mäuse ist nach der Ligatur der Arteria coronaria sinistra in der Kontrollgruppe signifikant besser als in den beiden Anti-TGF-Gruppen (Abbildung VI, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI vs. Anti-TGF nach MI, 84% vs. 49% vs. 42%, $p=0.03$).

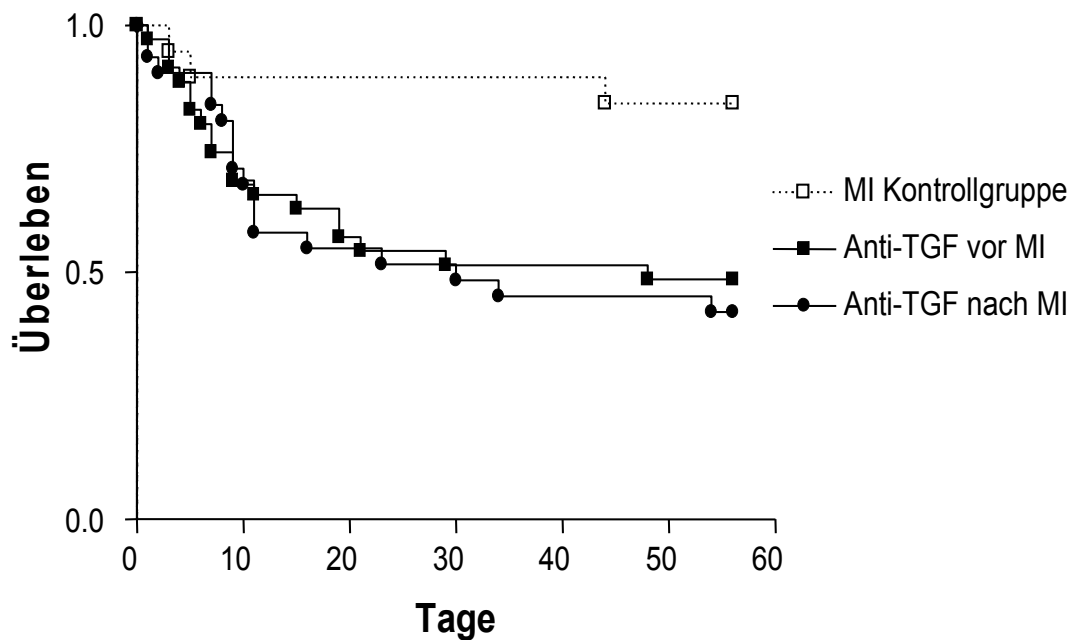


Abbildung VI: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Mäuse nach Myokardinfarkt der verschiedenen Gruppen.

3.2 Organgewichte

Die Infarktgrößen werden 8 Wochen nach Infarkt bestimmt. Es werden vergleichbare Infarktgrößen in allen 3 Gruppen (Tabelle II, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI vs. Anti-TGF nach MI, $p= n.s.$) gefunden. Das Herzgewicht/Körpergewicht ist in den Gruppen mit Anti-TGF-Behandlung höher als in der Kontrollgruppe.

Das Herzgewicht/Körpergewicht ist bei Mäusen mit Anti-TGF-Behandlung vor Myokardinfarkt höher als bei Mäusen mit Anti-TGF-Behandlung nach Myokardinfarkt.

	Kontrollgruppe nach MI	Gruppe von Anti-TGF vor MI	Gruppe von Anti- TGF nach MI
Myokardin- farktgröße in [%]	52.9±4.2	55.2±5.0	43.3±1.0
LV-Gewicht / Körper-gewicht [mg/g]	5.0±0.2	6.2±0.3**	5.2±0.4 [†]
dP/dt [mmHg/s]	max 8552±613	5944±378**	4057±605** [†]
dP/dt [mmHg/s]	min -6293±578	-4622±375*	-3351±585**

Tabelle I: Organgewichte und hämodynamische Messungen, *p<0.05 vs. Kontrollgruppe, **p<0.01 vs. Kontrollgruppe, [†]p<0.05 anti-TGF vor MI vs. anti-TGF nach MI.

3.3. Echokardiographische und hämodynamische Messungen

Die nicht invasive und zweidimensionale Echokardiographie eignet sich besonders für serielle Verlaufsbeobachtungen der linksventrikulären Durchmesser und somit der Beobachtung des Remodelings. In beiden Mode-Varianten werden die echokardialen Grenzen in der Systole und Diastole bestimmt. Diese Messungen werden vom mittleren Papillarmuskellevel und dem apikalen Drittel des Ventrikels durchgeführt. Die Remodelingparameter im B-Mode sind die linksventrikuläre, endsystolische Fläche und die linksventrikuläre, enddiastolische Fläche und im M-Mode der linksventrikuläre, endsystolische Durchmesser und der linksventrikuläre, enddiastolische Durchmesser. Die echokardiographischen Messungen erfolgen an den Tagen 1, 21 und 56 nach Infarkt. Die infarzierten Ventrikel der Anti-TGF-Mäuse zeigen von Tag 1 bis Tag 56 eine progrediente Dilatation.

Im B- und M-Mode zeigen sich signifikant größer werdende Remodelingparameter. Wie erwartet sind im Vergleich zur Kontrollgruppe die infarzierten Ventrikel in den beiden mit Anti-TGF-Antikörpern behandelten Gruppen, signifikant dilatiert (Abbildung VII A+B, Tabelle III). Die linksventrikuläre Dilatation wird bei den behandelten Mäusen mit Anti-TGF-Antikörpern signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe verschlechtert (die linksventrikuläre endsystolische Fläche, die linksventrikuläre enddiastolische Fläche, $p < 0.05$, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF-Antikörper). Die Infarktgrößen und die Herzfrequenzen sind zwischen den verschiedenen Gruppen vergleichbar (Tabelle II und III). Übereinstimmend mit echokardiographischen Daten verschlechtert sich bei den mit Anti-TGF-Antikörpern behandelten Mäusen der Rückgang in dem dp/dt max und dp/dt min deutlich (Tabelle II).

	Kontrollgruppe nach MI	Anti-TGF vor MI	Anti-TGF nach MI
n	6	10	7
Herzfrequenz / Min.	543±15	597±8	510±6
Papillär			
Endsystolische Fläche	11.2±1.5	21.7±4.3*	21.4±4.6*
[mm ²]			
Enddiastolische Fläche	14.3±1.5	25.0±4.2*	25.2±4.6*
[mm ²]			
2D FS [%]	22.8±3.3	16.3±3.0	17.5±4.7
Apikal			
Endsystolische Fläche	14.3±2.8	22.7±4.2	23.3±4.0
[mm ²]			
Enddiastolische Fläche	16.6±2.0	25.0±4.3	26.3±4.1*
[mm ²]			
2 dimensionale Verkürzungsfraction (2D FS) [%]	15.6±2.5	10.9±2.0	13.2±3.2

Tabelle II: Echokardiographische Messungen in der achten Woche nach Infarkt, n Zahl der Tiere, 2D zwei Dimension, FS Fractional shortening, * $p < 0.05$ vs. Kontrollgruppe.

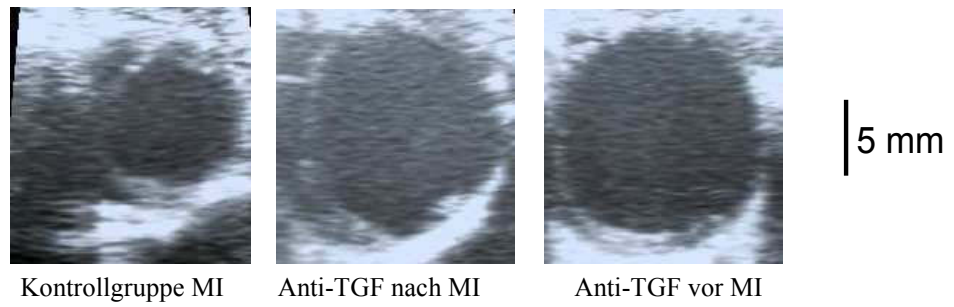


Abbildung VII A, 2 D-Echokardiographie, Vergleich der Ventrikeldilatation zwischen den verschiedenen Gruppen in der kurzen Achse (Kontrollgruppe vs. Anti-TGF-Antikörper)

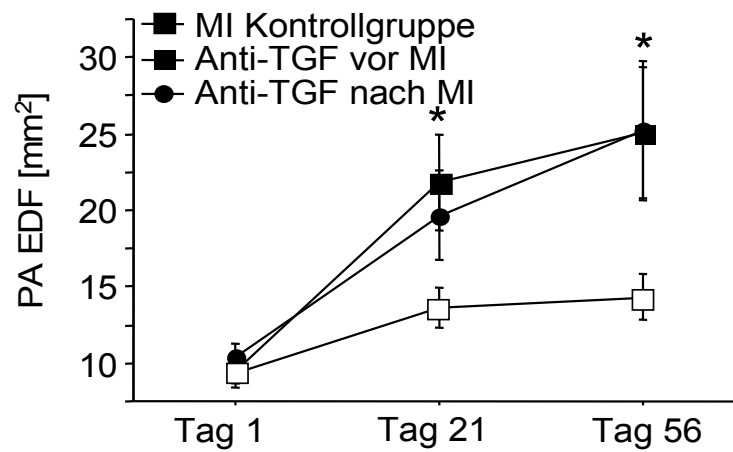
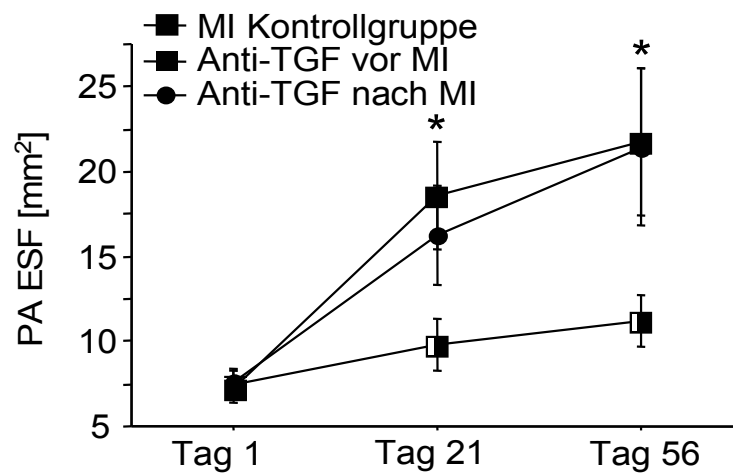


Abbildung VII B, Entwicklung der linksventrikulären Dilatation (LVESF, LVEDF, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF-Antikörper)

3.4. Kollagenstoffwechsel und Inflammation nach Myokardinfarkt

Die Kollagenmessung zeigt acht Wochen nach Myokardinfarkt zwischen den verschiedenen Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Fraktion des Kollagenvolumens wird in der Infarktregion der verschiedenen Behandlungsgruppen bestimmt (Fraktion des Kollagenvolumens, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 12.0 ± 4.7 , vs. $11.9 \pm 2.4\%$, $p=n.s.$). Bei einer kleinen Gruppe der Tiere wird die Behandlung mit Anti-TGF-Antikörpern und Plazebo für drei Tage durchgeführt, es zeigt sich eine signifikant niedrige mRNA-Expression von Kollagen I bei den mit Anti-TGF-Antikörpern behandelten Tieren (Infarktregion, Kollagen/18S, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 0.9 ± 0.1 vs. 0.3 ± 0.1 , $p=0.005$).

Die MMP-9-Gewebekonzentration wird drei Tage nach Myokardinfarkt in den verschiedenen Gruppen bestimmt. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte MMP-9-Konzentration in den mit Anti-TGF-Antikörpern behandelten Mäusen (Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 0.3 ± 0.2 vs. 1.3 ± 0.4 ng/ μ g Protein, $p=0.08$).

Die Hypertrophiemarker (β -MHC/ α -MHC) werden mit realtime PCR bestimmt. Die Konzentration von den Hypertrophiemarkern in den mit TGF β behandelnden Mäusen ist signifikant höher als in der Kontrollgruppe (β -MHC/ α -MHC, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 0.08 ± 0.02 vs. 0.12 ± 0.03 , $p=n.s.$).

Die TNF mRNA-Expression wird mittels realtime PCR ermittelt. Es zeigt sich 3 Tage nach Infarkt eine signifikant erhöhte TNF mRNA-Expression in den mit TGF β behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (TNF, real time PCR, Plazebo vs. Anti-TGF pre MI, 0.04 ± 0.004 vs. 0.1 ± 0.01 , $p=0.08$).

8 Wochen nach Infarkt zeigt die TNF mRNA-Expression keinen Unterschied (TNF, real time PCR, Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 0.1 ± 0.02 vs. 0.1 ± 0.02 , $p=n.s.$).

Die Infiltration von Neutrophilen wird immunhistochemisch bestimmt, es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Gruppen (Kontrollgruppe vs. Anti-TGF vor MI, 69 ± 17 vs. 53 ± 8 pro Feld, $p=n.s.$).

4. Diskussion

Als entscheidendes Resultat unserer Arbeit lässt sich festhalten, dass die Hemmung von TGF- β , sowohl vor als auch nach Ligatur der linken Herzkranzarterie, durch den Einfluss auf die extrazelluläre Matrix die Mortalität erhöht sowie eine Verschlechterung der linksventrikulären Dilatation und der Kontraktilitätsdysfunktion bewirkt. Die TGF- β -Isoforme zeigen verschiedene Expressionsmuster im Infarktgebiet. TGF- β 1 und TGF- β 2 sind in der Frühphase des Infarktes induziert, während TGF- β 3 verzögert und andauernd exprimiert ist (151, 152, 172). In der vorliegenden Arbeit sind alle Subtypen des TGF's effektiv entweder eine Woche vor oder eine Woche nach Myokardinfarkt für 8 Wochen gehemmt. Auf der molekularen Ebene zeigen sich acht Wochen nach Myokardinfarkt bei vergleichbarer Infarktgröße keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Kollagenvolumens im Infarktgebiet, TNF mRNA-Expression und Neutrophileninfiltration in den verschiedenen Gruppen. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration von Hypertrophiemarkern bei den mit TGF behandelten Mäusen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Bei einer kleinen Gruppe von Tieren wird die Behandlung mit Anti-TGF-Antikörpern oder Plazebo für drei Tage durchgeführt. Es zeigt sich eine signifikant niedrige mRNA-Expression von Kollagen I und eine signifikant erhöhte TNF mRNA-Expression sowie eine signifikant erhöhte MMP-9-Konzentration der mit Anti-TGF-Antikörpern behandelten Tiere.

Pathophysiologisch kommt es nach Myokardinfarkt zu strukturellen Veränderungen des Herzens, die allerdings nicht nur auf das eigentliche Infarktareal begrenzt sind. Sie umfassen zugleich Adaptationsmechanismen des nicht-infarzierten Myokards, des Interstitiums und der Peripherie, um ein bedarfsgerechtes Schlagvolumen aufrechtzuerhalten und eine ausreichende Blutversorgung des Körpers sicherzustellen. Zum größten Teil ereignet sich der Wundheilungsprozess am Herzen nach Myokardinfarkt in Analogie zu dem anderer Gewebe mit den Besonderheiten, dass die Kardiomyozyten nicht teilungs- und regenerationsfähig sind und die rhythmischen Kontraktionen einen ständigen wiederkehrenden Zug auf das Wundgebiet ausüben. Der Heilungsprozess umfasst mehrere Phasen.

Die Entzündungsphase ist durch die Aktivierung des Komplementsystems, Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 sowie die Immigration von neutrophilen Granulozyten charakteristisch. Zwei bis drei Tage nach Infarkt werden zunächst in der Grenzzone zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Gewebe und später auch im zentralen Infarktbereich neu gebildete Matrixproteine abgelagert. Nach Bildung des Granulationsgewebes kommt es zur Abwanderung der Entzündungszellen aus dem Infarktareal und anschließend zur Bildung eines Narbengewebes mit kompletter Vernetzung der Kollagenfibrillen und Hypertrophie der Kardiomyozyten. Nach der Ischämie mit dem Untergang von Kardiomyozyten kommt es nach einigen Stunden zum Zerfall von Sarkomeren und somit von Myofibrillen. Da die Mehrzahl der apoptotischen Zellen von benachbarten Zellen nicht abgebaut werden kann, kommt es, ausgelöst durch Komplementaktivierung, in der Zeit von 12 Stunden bis 4 Tage nach Myokardinfarkt zunehmend zu Nekrose und Freisetzung von Zytokinen. Arachnoidonsäure wird durch die Membranphospholipase zu Leukotrienen und Prostaglandinen umgesetzt, die wiederum zu Leukozytose, Leukotaxis und Fieber beitragen. Die Entzündungszellen werden durch die chemotaktischen Zytokine in den Infarktbereich gelockt. Die Makrophagen und die anderen eingewanderten Entzündungszellen sezernieren wiederum Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor (212, 213, 214). Für die beim Myokardinfarkt zunehmende Expression von Zytokinen scheint die Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Voraussetzung zu sein. Diese Transkriptionsfaktoren werden durch freie Radikale, aber auch durch die Zytokine selbst im Sinne eines Circulus vitiosus aktiviert. Die Ausschüttung weiterer Zytokine erfolgt hiernach kaskadenartig. TNF- α induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6, was wiederum zur Induktion von Cyclo- und Lipoxygenasen sowie zur Aktivierung von B- und T-Zellen führt. Das aktivierte Komplementsystem, die freien Radikalmetabolite und die Chemotaxine sind durch Aktivierung von TGF- β im infarzierten Myokard von Bedeutung (173, 175). TGF- β fordert die Migration der Entzündungszellen und die Freisetzung von TNF- α . Durch den Effekt von TGF- β auf die Entzündungszellen kommt es zu einem Circulus vitiosus mit Verstärkung der Entzündungsreaktion.

Verschiedene Studien, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen, zeigen, dass das Ausmaß der Infarktschäden zum Teil von der Entzündungsreaktion abhängig ist. TGF- β scheint pathophysiologisch negative Auswirkung auf die Entzündungsreaktion zu haben. Beim postischämischen kardialen Infarkt bei Hunden erscheint TGF- β als wichtiger Faktor für die Vermittlung von Monozytenrekrutierung während der ersten 5 Stunden nach Reperfusion (173). Die TNF- α -mRNA-Expression korreliert mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion. TGF- β verstärkt die Entzündungsreaktion und es kommt zu einer verstärkten TNF- α -mRNA-Expression. Verschiedene Studien berichten unter der Behandlung mit TGF- β Inhibitoren über eine reduzierte Entzündungsreaktion mit reduzierter TNF- α -mRNA-Expression. Wir erwarten durch die Behandlung mit TGF- β AK eine schwache Entzündungsreaktion mit einer verminderten TNF- α -mRNA-Expression und infolgedessen einer positiven Auswirkung auf den Heilungsprozess. Durch die Behandlung mit TGF- β AK dokumentieren wir keine Reduktion der Entzündungszellen und damit der gebundenen Expression von TNF- α . Es kommt in der Entzündungsphase des Myokardinfarktes zur signifikanten Erhöhung der Expression von TNF- α in den mit TGF- β AK behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe, das spricht für eine starke Entzündungsreaktion und einen negativen Einfluss der TGF- β AK in der akuten Entzündungsphase bei den Mäusen mit TGF- β AK Behandlung. Nach 8 Wochen sind die TNF- α -mRNA-Expression und die neutrophilen Granulozyten in beiden Gruppen identisch niedrig. Die zellulären Wirkungen von TGF- β hängen nicht nur vom Zelltyp, sondern auch vom Zustand der Zelldifferenzierung, vom Zytokinenumfeld und von der Konzentration des TGF's ab (164). Das könnte diese Diskrepanz zu den anderen Studien erklären. Der Effekt von TGF- β AK könnte eine Rolle in der akuten Entzündungsphase des Heilungsprozesses spielen. Über den gesamten Heilungsprozess könnte das Ausmaß der Entzündungsreaktion mitentscheidend für die Entwicklung der Herzinsuffizienz sein. Kollagen bildet die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix des Herzens und ermöglicht ein synergistisches Kontraktionsverhalten, indem es die Myozyten miteinander vernetzt (216, 217). Bereits geringe Erhöhungen des Kollagengehaltes beeinflussen die physiologische Herzmechanik, indem sie die kardiale Elastizität einschränken und dadurch die ventrikuläre Pumpfunktion herabsetzen (217).

Die kardialen Fibroblasten regulieren den Zustand der extrazellulären Matrix durch Synthese und Platzierung von Matrixmolekülen, durch den Abbau der Matrix per Sekretion von Matrixmetalloproteinasen sowie durch die Erhaltung der mechanischen Spannung des Kollagennetzwerkes. Die Synthese und der Abbau der extrazellulären Matrix befinden sich normalerweise im Gleichgewicht, jedoch wird diese Balance, z.B. nach Myokardinfarkt zerstört, kommt es zur Dysregulation der Kollagensynthese und zur Einlagerung der Kollagenfasern, diese sind von Infarktgröße und anderen Kompensationsmechanismen abhängig. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix determiniert daher die mechanische Pumpfunktion des Herzens. Sie gibt dem Herzgewebe eine Struktur und gewährleistet, dass auch während der Kontraktion die Myozyten und Gefäße ihre Position behalten. Sie überträgt während der Systole die Kontraktionskräfte gleichmäßig und bewirkt die Steifigkeit während der Diastole und sorgt so durch passive Rückstellkräfte für die Ausdehnung des Herzens während der Diastole. In den ersten Tagen nach Infarkt werden zunächst in der Grenzzone zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Gewebe und später auch im zentralen Infarktbereich neu gebildete Matrixproteine abgelagert, wodurch die Zugfestigkeit des geschädigten Infarktareals erhöht und einer Herzwandruptur vorgebeugt wird. Myofibroblasten wandern ein und produzieren interstitielles Kollagen, wobei vorwiegend Kollagen Typ III und in etwas geringeren Mengen Kollagen Typ I gebildet wird. Die Folge dieser Kollagenbildung ist die Stabilisierung und Festigung der geschädigten Herzwand. Zusätzlich wird in der ersten Woche nach Infarkt zugleich die kollagenolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinasen gesteigert, welche interstitielles Kollagen spalten und dadurch zum Abbau von Kollagen beitragen (190, 191). Nach ungefähr zwei bis drei Wochen stellt sich ein Gleichgewicht im Kollagenstoffwechsel ein. Die abgelagerten Kollagene sind entscheidend für das kardiale Remodeling (157, 158, 159, 169). Die Matrixmetalloproteinasen tragen zum ventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt bei (205, 207, 210). Die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen kann durch eine Reihe von Stimuli u.a. durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden (206, 209).

Die Auswahl der zu untersuchenden Matrixmetalloproteinasen fiel auf Matrixmetalloproteinase-9, da sie in diversen tierexperimentellen Studien nach Myokardinfarkt induziert ist und das ventrikuläre Remodeling zu fördern scheint (202, 203, 204, 208, 211). Durch die Erhöhung der Matrixmetalloproteinase-9-Synthese versucht der Organismus der zunehmenden Kollagenablagerung entgegen zu wirken. TGF- β zeigt verschiedene Effekte auf die gleichen Zellarten und -typen. Untersuchungen in vitro demonstrieren die potenten und konstanten Wirkungen von TGF- β auf die kardialen Fibroblasten. TGF- β fördert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und scheint in der Infarktgrenzzone lokalisiert zu sein. TGF- β kann die Expression von extrazellulären Matrixproteinen bei den lokalen Fibroblasten verstärken. TGF- β verstärkt die TIMP-Synthese durch Fibroblasten und fördert die fasrige Ablagerung in der extrazellulären Matrix des funktionstüchtigen Myokards der Grenzzone. Verschiedene experimentelle Studien berichten durch die Behandlung mit TGF- β Inhibitoren über Beeinflussung der Fibroblastendifferenzierung und des Fibroblastenwachstums sowie der Kollagensynthese und der Metallomatrixproteinase-Aktivität im Tiermodell. Durch die Behandlung erwarten wir ein vermindertes Fibroblastenwachstum mit verminderter Kollagensynthese und demzufolge eine Verbesserung des kardialen Remodelings. In unserer Studie kommt es unter TGF- β AK Behandlung in den ersten Tagen nach Myokardinfarkt zur Reduktion der Kollagensynthese Typ I und zur Steigerung der MMP-9-Synthese. Sie könnten sich in der frühen Heilungsphase positiv auf das linksventrikuläre Remodeling auswirken. Der Einfluss der TGF- β AK Behandlung bezüglich der Kollagen- und Matrixmetalloproteinasensynthese scheint eine wichtige Rolle in den ersten Tagen zu sein. In der vorliegenden Studie kann allerdings bezüglich der Kollagenanalyse im Infarktgebiet kein Unterschied 8 Wochen nach Myokardinfarkt zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Die TGF- β AK Behandlung kann das Fibroblastenwachstum und die Fibroblastendifferenzierung über den gesamten Heilungsprozess nicht effektiv beeinflussen. Es kommt zur Aggravierung des kardialen Remodelings und zur Steigerung der Mortalitätsrate.

Die Myokardhypertrophie ist als Kompensationsmechanismus nach Verlust von kontraktile Masse zu sehen. Durch die Muskelhypertrophie kommt es zur Steigerung der Kontraktionskraft nach dem Gesetz von Laplace. Zusätzlich entstehen neben der myozytären Hypertrophie bei der pathologischen Hypertrophie Veränderungen im Interstitium. Die vermehrt eingelagerten, zugfesten und wenig dehnbaren Kollagene führen durch die Steifigkeit der Ventrikel und somit nach dem Laplace'schen Gesetz zur weiteren Ventrikeldilatation. Durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Bezug auf die kontraktile Masse entsteht ein Missverhältnis zwischen Energieangebot und Energiebedarf. Es kommt zu weiteren Myozytennekrosen und zum Fortschreiten der interstitiellen Fibrose. Letztendlich kommt es durch die Kammersteifigkeit zur diastolischen Funktionsstörung und Progression der Herzinsuffizienz. Verschiedene Studien zeigen, dass es beim Übergang von der kompensierten zu der dekompenzierten Form der Myokardhypertrophie zu einer vermehrten Expression von TGF- β kommt. Manche Studien berichten von Vorbeugung und Rückgang der Myokardhypertrophie durch die Applikation von TGF-Inhibitoren (177, 178, 199, 200, 201). In unserer Arbeit dokumentieren wir eine signifikant höhere Konzentration von Hypertrophie markern in den mit TGF- β AK behandelten Mäusen. Im Rahmen der zunehmenden Kollagenablagerung mit der verstärkten Ventrikelsteifigkeit und der konsekutiven Verstärkung der Hypertrophie intakter Kardiomyozyten könnte dies nach dem Laplace'schen Gesetz erklärt werden. Es handelt sich um einen Circulus vitiosus mit den Folgen des negativen kardialen Remodelings und Zunahme der Kardiomyozytenhypertrophie und anschließender Ventrikeldilatation und Progression der Herzinsuffizienz. Verschiedene Studien mit Ischämie-Reperusionsmodell berichten über die starke Korrelation der Herzfunktion mit der Infarktgröße (215). Je kleiner der Infarkt ist, desto besser sind die Kompensationsmechanismen. In der vorliegenden Studie wird sowohl vor als auch nach der Infarktoperation mit der Behandlung begonnen. Die Infarktgrößen aller Tiere werden am 1., 21. und 56. postoperativen Tag echokardiographisch gemessen. Die Effekte durch die TGF- β AK Behandlung auf die Myokardinfarktgröße können somit ausgeschlossen werden. Die mit TGF- β -AK behandelten Mäuse zeigen 8 Wochen nach Myokardinfarkt ähnliche Infarktgrößen wie die Kontrollgruppe.

Die schlechtere Herzfunktion der mit TGF- β -AK behandelten Mäuse kann also nicht durch die ausgedehnte Infarktgröße erklärt werden, sondern durch das schlechte kardiale Remodeling mit ausgeprägter Kardiomyozytenhypertrophie und damit gebundenen Ventrikeldilatation. Die Gruppe von Okada et al. und Ikeuchi et al. berichten nach Hemmung von TGF- β im ischämischen Mausmodell eine Verbesserung des linksventrikulären Remodelings (178, 179). Sie weisen darauf hin, dass die Effekte der Anti-TGF- β -Behandlung von der Interventionszeit abhängen (178, 179). Laut Ikeuchi et al. verstärkt die Anti-TGF- β -Behandlung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Myokardinfarkt die Synthese von Zytokinen und Chemokinen, erhöht die Infiltration von Neutrophilen und führt zu linksventrikulärer Dysfunktion und erhöhter Mortalitätsrate (177). Im Gegensatz dazu schwächt die spätere Anti-TGF- β -Behandlung die kardiale Hypertrophie ab, vermindert die interstitielle Fibrose im Bereich des kardialen Remodelings und reduziert die linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion (177). Die Gruppe von Ikeuchi hemmt TGF mit Hilfe viraler Überexpression der extrazellulären Domäne des humanen TGF- β Typ II Rezeptors (12), welcher aktives TGF- β binden kann und dadurch seine Signale hemmt. Okada et al. zeigt in seinen Untersuchungen am Mausmodell einen protektiven Effekt nach Hemmung von TGF zwischen der ersten und dritten Woche nach Myokardinfarkt. Die Überexpression von Anti-TGF-Inhibitoren zeigt vier Wochen nach der Ligatur der Herzkranzarterie keinen Effekt auf das linksventrikuläre Remodeling, wenn bereits eine solide Narbe entstanden ist. Diese protektiven Effekte von Okada et al. und Ikeuchi et al. bezüglich der abgeschwächten, linksventrikulären Dilatation und dem nicht ausgeprägten, kardialen Remodeling können wir in unseren Untersuchungen sowohl vor als auch nach Induktion von Myokardinfarkt nicht nachweisen. Wir dokumentieren schädliche Effekte bezüglich der verstärkten akuten Entzündungsreaktion, der kardialen Hypertrophie und der extrazellulären Matrix mit der gebundenen Aggravierung des kardialen Remodelings sowie der verstärkten Mortalitätsrate. Es bestehen allerdings deutliche Unterschiede zu unserer Studie: So werden z.B. verschiedene Mausarten verwendet. Die vorliegende Studie verwendet C57B16 Mäuse von Harlan Winkelmann, während in den anderen CD-1 Mäuse bei den anderen Gruppen eingesetzt werden.

Diesem Unterschied zufolge könnten Anti-TGF- β -Effekte art- bzw. speziesspezifisch sein. Ein weiterer Unterschied betrifft die Verabreichungsart und -ort von TGF- β Inhibitoren. In unserer Studie werden regelmäßig TGF- β -AK intraperitoneal verabreicht, bei Okada et al. und Ikeuchi et al. werden virale TGF- β -Rezeptor II Inhibitoren in die hinteren Gliedmaßen intramuskulär appliziert, dieses könnte zu unterschiedlichen Spitzen- und Steady-State-Konzentrationen führen. Als letztes unterscheiden sich die Behandlungszeitpunkte. Bei Okada et al. findet die Behandlung nach der Intervention und bei Ikeuchi et al. sowohl vor als auch nach der Intervention statt, in der vorliegenden Arbeit findet die Behandlung wie bei Ikeuchi et al. statt.

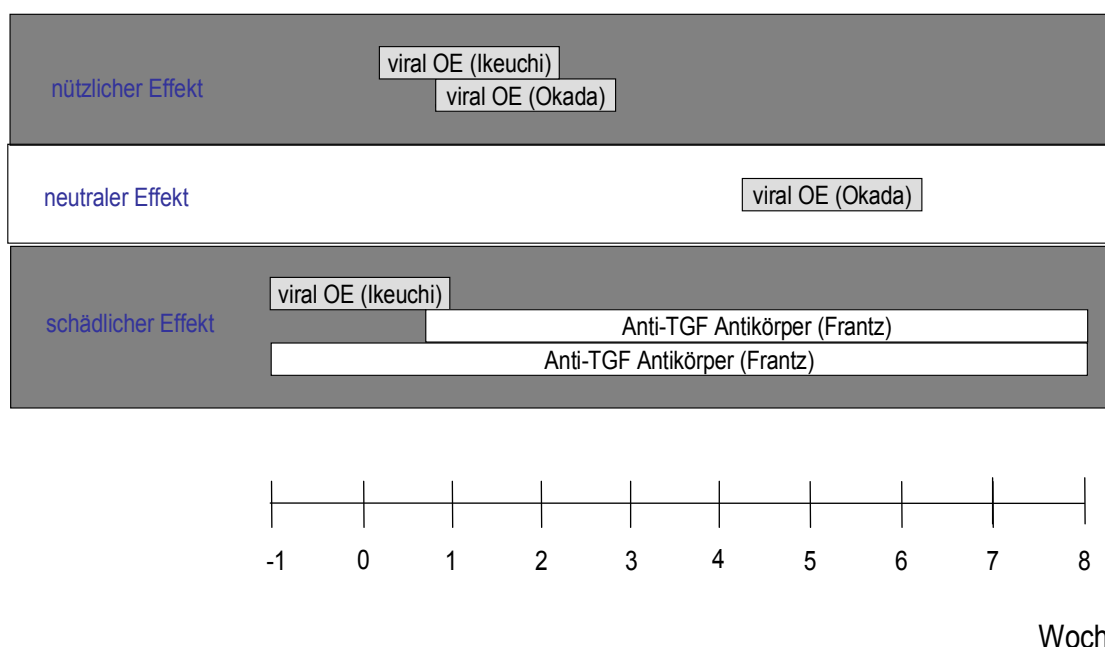


Abbildung VIII, Darstellung der Effekte von Anti-TGF- β -Behandlung der verschiedenen Studien.

Klinische Einschätzung

Durch die Behandlung mit TGF- β -Antikörpern im Mausmodell nach Myokardinfarkt zeigen sich negative Auswirkungen auf die extrazelluläre Matrix und dementsprechend auf das postmyokardiale Remodeling. In den ersten Tagen nach Myokardinfarkt scheint die TGF- β AK Behandlung eine Rolle zu spielen. Weitere experimentelle Studien sind nötig, um diese Effekte auf die Herzinsuffizienz zu klären.

5. Zusammenfassung

Bei dem Transforming growth Faktor (TGF)- β handelt es sich um ein lokales Zytokin, das im Zusammenhang mit Heilungsprozessen und Fibrosierung von Gewebe sowie mit relevanter Bedeutung beim kardialen Remodeling und beim Herzversagen nach Myokardinfarkt steht. Die derzeitige Datenlage bezüglich der Funktion von TGF- β ist nach Ischämie unklar. Infolgedessen haben wir den Effekt der Hemmung von TGF- β durch Verabreichung von blockierenden Antikörpern bei Mäusen nach Induktion eines Myokardinfarkts getestet. Die Mäuse wurden mittels einer intraperitonealer Injektion von Anti-TGF- β -Antikörpern (5mg/kg Körpergewicht 1d11, Genzyme) oder Plazebo entweder eine Woche vor oder 5 Tage nach der Ligatur der Arteria coronaria sinistra behandelt. Es wurden regelmäßig Echokardiographien am 1., 21. und 56. Tag nach Myokardinfarkt durchgeführt. Die linksventrikuläre Dilatation war signifikant verschlechtert bei Mäusen mit Anti-TGF- β -Antikörper Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Mortalität war bei Mäusen mit Anti-TGF- β -Antikörper Behandlung nach acht Wochen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Expression von Kollagen und Matrixmetalloproteinase bei den mit Anti-TGF- β -Antikörpern behandelten Mäusen wurde reduziert. Die Expression vom proentzündlichen Zytokin TNF wurde durch die Behandlung jedoch nicht beeinflusst. Die Behandlung mit Anti-TGF- β -Antikörpern vor oder nach einem Myokardinfarkt erhöht also die Mortalität und aggraviert das linksventrikuläre Remodeling, möglicherweise durch Veränderungen der Extrazellulärmatrix.

6. Referenzen

1. **Border W.A. and Noble N.A.**, Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-1292, 1994.
2. **Brooks W.W. and Conrad C.H.**, Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta (1) heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol* 32: 187-195, 2000
3. **Dasch J.R., Pace D.R., Waegell W., Inenaga D. and Ellingsworth L.**, Monoclonal antibodies recognizing transforming growth factor-beta. Bioactivity neutralization and transforming growth factor beta 2 affinity purification. *J Immunol* 142: 1536-1541, 1989.
4. **Deten A., Holzl A., Leicht M., Barth W. and Zimmer H.G.**, Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1191-1207, 2001
5. **Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L.E., Schoen F.J., Kelly R.A., Werb Z., Libby P. and Lee RT**, Targeted deletion of Matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and Collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 106: 55-62, 2000
6. **Ertl G. and Frantz S.**, Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 66: 22-32, 2005.
7. **Frantz S., Ducharme A., Sawyer D., Rohde L.E., Kobizik L., Fukazawa R., Tracey D., Allen H., Lee R.T. and Kelly R.A.**, Targeted deletion of caspase-1 reduces early mortality and left ventricular dilatation following myocardial infarction. *JMCC* 35: 685-694, 2003
8. **Frantz S., Fraccarollo D., Wagner H., Behr T.M., Jung P., Angermann C.E., Ertl G. and Bauersachs J.** Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 57: 749-756, 2003
9. **Frantz S., Hu K., Bayer B., Gerondakis S., Strotmann J., Adamek A., Ertl G. And Bauersachs J.**, Absence of NF-kB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *Faseb J*, 2006.

10. **Frantz S., Hu K., Widder J., Bayer B., Witzel C.C., Schmidt I., Galuppo P., Strotmann J., Ertl G. and Bauersachs J.**, Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 141: 9-14, 2004
11. **Frantz S., Kobizik L., Kim Y.D., Fukazawa R., Medzhitov R., Lee R.T. and Kelly R.A.**, Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 104: 271-280, 1999.
12. **Ikeuchi M., Tsutusi H., Shiomi T., Matsusaka H., Matsushima S., Wen J., Kubota T. and Takeshita A.**, Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early Cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res* 64: 526-535, 2004
13. **Kuwahara F , Kai H , Tokuda K , Kai M , Takeshita A , Egashira K and Imaizumi T.**, Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diasolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106: 130-135, 2002
14. **Mackey A.L., Donnelly A.E., Turpeenniemi-Hujanen T. and Roper H.P.**, Skeletal muscle collagen content in humans after high-force eccentric contractions. *J Appl Physiol* 97: 197-203, 2004
15. **Mehta J.L., Chen H.J. and Li D.Y.**, Protection of myocytes from hypoxia-reoxygenation injury by nitric oxide is mediated by modulation of transforming growth factor-beta. *Circulation* 105: 2206-2211, 2002.
16. **Nahrendorf M., Hu K., Frantz S., Jaffer F.A., Tung C.H., Hiller K.H., Voll S., Nordbeck P., Sosnovik D., Gattenlohner S., Novikov M., Dickneite G., Reed G.L., Jakob P., Rosenzweig A., Bauer W.R., Weissleder R. and Ertl G.**, Factor XIII deficiency causes cardiac rupture, impairs wound healing, and aggravates cardiac remodeling in mice with myocardial Infarction. *Circulation* 113: 1196-1202, 2006.
17. **Nakajima H., Nakajima H.O., Salcher O., Dittie A.S., Dembowsky K., Jing S. and Field L.J.**, Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res* 86: 571-579, 2000.

18. **Nwogu J.I., Geenen D., Bean M., Brenner M.C., Huang X. and Buttrick P.M.**, Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Circulation* 104: 2216-2221, 2001.
19. **Okada H., Takemura G., Kosai K., Li Y., Takahashi T., Esaki M., Yuge K., Miyata S., Maruyama R., Mikami A., Minatoguchi S., Fujiwara T. and Fujiwara H.**, Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation* 111:2430-2437, 2005.
20. **Pfeffer J.M., Pfeffer M.A. and Braunwald E.**, Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 57:84-95, 1985.
21. **Pfeffer M.A., Braunwald E., Moye L.A., Basta L., Brown E.J., Jr. Cuddy T.E., Davis B.R., Geltman E.M., Goldman S., Flaker G.C. and et al.**, Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327: 669-677, 1992.
22. **Rosenkranz S.**, TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 63: 423-432, 2004.
23. **Sanderson N., Factor V., Nagy P., Kopp J., Kondaiah P., Wakefield L., Roberts A.B., Sporn M.B. and Thorgeirsson S.S.**, Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2572-2576, 1995.
24. **Schultz Jel J., Witt S.A., Glascock B.J., Nieman M.L., Reiser P.J., Nix S.L., Kimball T.R. and Doetschman T.** TGF-beta1 mediates the hypertrophic Cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest* 109: 787-796, 2002.
25. **Vanhoutte D., Schellings M., Pinto Y. and Heymans S.**, Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 69: 604-613, 2006.
26. **Wang J., Xu N., Feng X., Hou N., Zhang J., Cheng X., Chen Y., Zhang Y. and Yang X.**, Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 97: 821-828, 2005.

27. **Tunstall-Pedoe H., Kuulasmaa K., Amougel P. et al.**, Myocardial infarction and coronary deaths in the world Health Organisation MONICA-Project. *Circulation* 90: 583-612, 1994.
28. **Roessner A., Schneider I., Kirkpatrick C.J., Böcker W., Böcker W., Denk H. And Heitz PhU**, eds. *Pathologiegefäße*. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 437-452, 1997.
29. **Libby P.**, Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol.*, 86:3-8, 2000.
30. **Badimon L., Badimon J.J., Vilahur G., Segales E. and Llorente V.**, Pathogenesis Of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol Haemost Thromb.*, 32: 225-231, 2002.
31. **Ross R.**, Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med.*, 340: 115-126, 1999.
32. **Huang S.S., Zhou M., Johnson F.E., Shieh H.S. and Huang J.S.**, An active site of transforming growth factor-beta(1) for growth inhibition and stimulation, *J Biol Chem*, 274 (39), 27754-27758, 1999.
33. **Mosterd A., Hoes A.W. and de Bruyne M.C.**, Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study, *Eur Heart J.*, 20, 447-455, 1999.
34. **Ho K.K., Anderson K.M. and Kannel W.B.**, Survival after the onset of congestive heart failure in Frammingham heart study subjects, *circulation* 88, 107-115, 1993.
35. *Die Inneren Medizin*, **Gerok W., Huber C., Meinertz T. und Zeidler H.**, 11 Auflage, Schattauer, 101-117, 2007.
36. **Linzbach A.J. et. al.**, funktionelle Morphologie der chronischen Herzinsuffizienz, *deutsche Gesllschaft für Pathol.* 51, 124-137, 1967.
37. **Baig M. K., Mahon N., Mckenna W. J., Caforio A. L., Bonow R. O., Francis G.S. and Gheorghiade M.**, The pathophysiology of advanced heart failure, *Am. Heart J.* 135, S216-230, 1998.
38. **Fuchs M. und Drexler H.**, Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz, *Internist* 41, 93-104, 2000.

39. **Cohn J. N., Ferrari R. and Sharpe N.**, Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling, Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 569-582, 2000.
40. **Katz A. M.**, Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure, *N. Engl. J. Med.* 322, 100-110, 1990.
41. **Campeau L.**, Grading of angina pectoris. *Circulation.*, 54:522-523, 1976.
42. **McGill H.C. and Jr., McMahan C.A.**, Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Am J Cardiol.*, 82:30T-36, 1998.
43. **McNamara J.J., Molot M.A., Stremple J.F. and Cutting R.T.**, Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. *JAMA.*, 216:1185-1187, 1971.
44. **Enos W.F., Holmes R.H. and Beyer J.**, Coronary disease among United States soldiers killed in action in Korea; preliminary report. *J Am Med Assoc.* 152:1090-1093, 1953.
45. **Berenson G.S., Wattigney W.A. and Tracy RE.**, Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 70:851-858, 1992.
46. **Velican D. and Velican C.**, Atherosclerotic involvement of the coronary arteries of adolescents and young adults. *Atherosclerosis.*, 36:449-460, 1980.
47. Vaskuläre Medizin systematisch/**Peter Nawroth und Hans Gotthard Lasch.**
1 Auflage 77-79, 1999.
48. Vaskuläre Medizin systematisch/**Peter Nawroth und Hans Gotthard Lasch.**
1 Auflage 72-73, 1999.
49. Klinische kardiologie/ **Erland Erdmann**, 6 Auflage 2006, 27-143 und 205-336.
50. **Kellermann J.J. and Braunwald E.**, Silent myocardial ischemia: A critical appraisal, Karger, Basel, 1990
51. Vaskuläre Medizin systematisch/**Peter Nawroth und Hans Gotthard Lasch.**
1 Auflage 1999, 233-244.
52. Lexikon der Veterinärmedizin. **Wiesner E. and Ribbeck R.** , 4. Auflage, Enke im Hippokrates, Verlag Stuttgart, 642, 2000

53. **ANON**, Myocardial infarction redefined--a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 21, 1502-1513, 2000.
54. Makropathologie/ **Thomas C.**, 9 Auflage, Schattauer Verlag, 18-19, 2003.
55. Histopathologie/ **Thomas C.**, 14 Auflage, Schattauer Verlag, 106-107, 2006.
56. **Swynghedauw B.** , Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev.* 79, 215-262, 1999.
57. **Pfeffer M. A. and Braunwald E.**, Ventricular remodeling after myocardial Infarction. Experimental observations and clinical implications, *Circulation* 81, 1161-1172, 1990.
58. **Hutchins G. M. and Bulkley B. H.**, Infarct expansion versus extension, Two different complications of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 41, 1127-1132, 1978.
59. **Schuster E. H. and Bulkley B. H.**, Expansion of transmural myocardial infarction, A pathophysiologic factor in cardiac rupture. *Circulation* 60, 1532-1538, 1979.
60. **Jugdutt B. I. and Michorowski B. L.**, Role of infarct expansion in rupture of The ventricular septum after acute myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study, *Clin. Cardiol.* 10, 641-652, 1987.
61. **Erlebacher J. A., Weiss J. L., Eaton L. W., Kallman C., Weiseldt M. L. and Bulkley B.H.**, Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two Dimensional echocardiographic study, *Am. J. Cardiol.* 49, 1120-1126, 1982.
62. **Bogen D. K., Rabinowitz S. A., Needleman A., McMahon T. A. and Abelmann W.H.**, An analysis of the mechanical disadvantage of Myocardial infarction in the canine left ventricle, *Circ. Res.* 47, 728-741, 1980.
63. **Breisch E. A., White F. C. and Bloor C. M.**, Myocardial characteristics Of pressure overload hypertrophy. A structural and functional Study, *Lab. Invest.* 51, 333-342, 1984.

64. **Cannon R. O., 3RD, Cunnion R. E., Parrillo J. E., Palmeri S. T., Tucker E.E., Schenke W. H. and Epstein S. E.**, Dynamic limitation of Coronary vasodilator reserve in patients with dilated cardiomyopathy and Chest pain. *J. Am. Coll. Cardiol.* 10, 1190-1200, 1987.
65. **TAN, L. B., Jalil J. E., Pick R., Janicki J. S. and Weber K. T.**, Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ. Res.* 69, 1185-1195, 1991.
66. **Olivetti G., Ab. A., Krajewski S., Reed J. C. and Anversa P.**, Apoptosis in the failing human heart, *N. Engl. J. Med.* 336, 1131-1141, 1997.
67. **Braunwald E., Zipes D. P. and Libby P.**, *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 6. Aufl., Bd. 2, Verlag W.B. Saunders Company, Philadelphia, London 1124, 2001.
68. **Dooley S. und Berger F.**, Unterschiede in der TGF- β -vermittelten Signaltransduktion in aktivierten hepatischen Sternzellen unterhalb der Smad2-Phosphorylierung, 10-18, 2002.
69. **Heldin, C.H., Miyazono, K. and Tendijke, P.**, TGF-beta signalling from cellmembrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471, 1997.
70. **Roberts A.B., Flanders K.C., Heine U.I., Jakowlew S., Kondaiah P., Kim S.J. and Sporn M.B.**, Transforming growth factor-beta, multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 327, 145-154, 1990.
71. **Miyazono K., Ichijo H. and Heldin C.H.**, Mini-Review TGF- β , Latent Forms, Binding Proteins and Receptors, *Growth Factors*, 8, 11-22, 1993.
72. **Lawrence D.A.**, Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*, 7(3), 363-74, 1996.
73. **Miyazono, K., K. Kusanagi, and H. Inoue**, Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187(3), 265-76, 2001.
74. **Daopin, S., K.A. Piez, Y. Ogawa, and D.R. Davies**, Crystal structure of Transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, 257(5068), 369-73, 1992.
75. **Daopin, S., M. Li, and D.R. Davies**, *Crystal structure of TGF-beta 2 Refined At 1.8 A resolution.* *Proteins*, 17(2), 176-92, 1993.

76. **Roberts A.B.**, *TGF*-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect*, 1(15), 1265-73, 1999.
77. **Munger J.S., J.G. Harpel, P.E. Gleizes, R. Mazziere, I. Nunes, and D.B. Rifkin**, Latent transforming growth factor-beta: structural features and Mechanisms of activation. *Kidney Int*, 51(5), 1376-82, 1997.
78. **Murphy-Ullrich, J.E. and M. Poczatek**, Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1, mechanisms and physiology, *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(1-2), 59-69, 2000.
79. **De Caestecker M. P., Piek, E. and Roberts, A. B.**, Role of Transforming Growth faktor- β Signaling in Cancer. *J. of the National Cancer Institute*, Vol. 92, 17, 1388-1402, 2000.
80. **Wrana J. L. and Attiasano, L.**, the Smad pathway, *Cytokine and Growth Factor Reviews* 11: 5-13, 2000. 81. Itho, S., Landström, M., Hermansson, A., Itho, F., Heldin, C. H. and Ten Dijke, P., Transforming Growth Factor β 1 Induces Nuclear Export of Inhibitory Smad7, *J Biol Chem* 273, 29195-29201, 1998.
82. **Heldin, C.H., Miyazono, K. and Tendijke, P.**, TGF-beta signalling from Cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471, 1997.
83. **Roberts A.B. and Sporn M.B.** , Mini Review: Physiological Actions and Clinical Applications of TGF- β , *Growth Factors*, 8, 1-9, 1993.
84. **Fontana A., Constam D.B., Frei K., Malipiero U. and , Pfister H.W.**, Modulation Of The Immune Response by TGF- β , *Int Arch Allergy Immunol.* 99, 1-7, 1997.
85. **Lahm H. and Odartchenko N.**, Mini Review: Role of TGF- β in Colorectal Cancer, *Growth Factors*, 9, 1-9, 1993.
86. **Assoian R.K., Fleurdelys B.E., Stevenson H.C., Miller P.J., Madtes D.K., Raines E.W., Ross R. and Sporn M.B.**, Expression and Secretion of Type Transforming Growth Factor by Activated Human Macrophages. *Proc Natl Acad Sc* 84, 6020-6024, 1987.
87. **Nath R.N., LaRegina M., Markham H., Ksander G.A. and Weeks P.M.**, The Expression of TGF- β in Fetal and Adult Rabbit Skin Wounds. *J Ped Surg*, Vol 29, 416-421, 1994.

88. **Coupes B.M., Newstead C.G., Short C.D. and Brenchley P.E.C.,** TGF- β 1 in Renal Allograft Recipients, *Transplantation*, 57, 1727-1731, 1994.
89. **Hooper W.C.,** The Role of TGF- β in Hematopoiesis. A Review. *Leukemia Research*, 15,179-184, 1991.
90. **Castilla A., Prieto J. and Fausto N.** TGF- β 1 and in Chronic Liver Disease Effects of Interferon Alpha Therapy. *New Eng. J. Med.*, 324,933-940, 1991.
91. **Lee G., Ellingsworth L.R., Gillis S., Wall R. and Kincade P.W.,** Transforming Growth Factors are Potential Regulators of B Lymphopoiesis, *J. Exp. Med.*, 166, 1290-1299, 1987.
92. **McCartney-Francis N.L. and Wahl S.M.,** TGF- β : A Matter of Life and Death, *J. Leukocyte Biololy*, 55, 401-409, 1994.
93. **Yamamoto T., Noble N.A., Miller D.E. and Border W.A.,** Sustained Expression Of TGF- β 1 underlies development of Progressive Kidney Fibrosis, *Kidney Int.*, 45, 916-927, 1994.
94. **Holter W., Kalthoff F.S., Pickl W.F., Ebner C., Majdic O., Kraft D. and Knapp W.,** TGF- β Inhibits IL-4 and IFN- Production by Stimulated Human T Cells, *Int. Immunol.*, 6, 469-475, 1994.
95. **Fox F.E., Ford H.C., Douglas R., Cherian S. and Nowell PC.** Evidence That TGF- β Can Inhibit Human T-Lymphocyte Proliferation through Paracrine and Autocrine Mechanisms. *Cell. Immunol.* , 150, 45-58, 1993.
96. **Chen R.H., Ebner R. and Derynck R.,** Inactivation of the Type II Receptor Reveals Two Receptor Pathways for the Diverse TGF- β Activities. *Science*, 260, 1335-1338, 1993.
97. **Kondo S., Isobe K., Ishiguro N., Nakashima I. and Miura T.,** TGF- β 1 Enhances the Generation of Allospecific Cytotoxic T Lyphocytes. *Immunology*, 79, 459-464, 1993.
98. **Wahl S.M., McCartney-Francis N. and Mergenhagen S.E.,** Inflammatory roles Of TGF-beta. *Immunol Today*, 10(8), 258-261, 1989.
99. **Fontana A., Constam D.B., Frei K., Malipiero U. and Pfister H.W.,** Modulation of the Immune Response by TGF- β , *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 99, 1-7, 1992.

100. **Mokhtarian F., Shi Y., Shirazian D., Morgante L., Miller A. and David G.**
Defective Production of Anti-Inflammatory Cytokine, TGF- β by T Cell Lines
of Patients with Active Multiple Sclerosis. *J. Immuno*, 152:6003, 1994.
101. **Christ M., McCartney-Francis N.L., Kulkarni A.B., Ward J.M., Mizel D.E.,
Mackall C.L., Gress R.E., Hines K.L., Tian H., Karlsson S. and Wahl S.M.,**
Immune Dysregulation in TGF- β 1-Deficient Mice, *J. Immuno*, 153:1936, 1994.
102. **Gaciong Z., Koziak K., Religa P., Lisiecka A., Morzycka-Michalik M., Rell K.,
Kozłowska B. and Lao M.,** Increased Expression of Growth Factors During
Chronic Rejection in Human Kidney Allograft Transplantation Proceedings.
Vol 27, 928-929, 1995.
103. **Rehmann J.A. and LeBien T.W.** TGF- β regulates normal human pre-B cell
Differentiation, *Int. Immunol.* 6,315-322, 1994.
104. **Baldwin R.L. and Korc M.,** Growth Inhibition of Human Pancreatic Carcinoma
Cells by TGF- β 1, *Growth Factors*, 8, 23-34, 1993.
105. **Shirai Y., Kawata S., Tamura S., Ito N., Tsushima H., Takaishi K., Kiso S.,
Matzuzawa Y.,** Plasma TGF- β 1 in Patients with Hepatocellular Carcinoma,
Cancer, 73, 2275-2279, 1994.
106. **Ivanovic V., Melman A., Davis-Joseph B., Valcic M., Geliebter J.,**
Elevated Plasma Levels of TGF- β 1 in Patients with Invasive Prostate Cancer.
Nature Medicine, 1: 282-284, 1995.
107. **Murray P.A., Barrett-Lee P., Travers M., Luqmani Y., Powles T. and
Coombes R.C.,** The Prognostic Significance of Transforming Growth Factors in
Human Breast Cancer. *Br. J. Cancer*, 67, 1408-1412, 1993.
108. **BÖHM, M.,** Pathophysiologie der Herzinsuffizienz heute, *Herz* 27, 75-91, 2002.
109. **Schlaich M. P., Kaye D. M., Lambert E., Sommerville M., Socratous F., Esler
M. D.,** Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left
ventricular hypertrophy. *Circulation* 108, 560-565, 2003.
110. **Briest W., Rassler B., Deten A. and Zimmer G.,** Norepinephrine-induced
cardiac hypertrophy and fibrosis are not due to mast cell degranulation, *Mol.
Cell. Biochem.* 252, 229-237, 2003.

111. **Sadoshima J. and Izumo S.**, Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* 73, 413-423, 1993.
112. **Nakagami H., Takemoto M. and Liao J. K.**, NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac J. *Mol. Cell. Cardiol.* 35, 851-859, 2003.
113. **Black F. M., Packer S. E., Parker T. G., Michael L. H., Roberts R., Schwartz R. J. and Schneider M. D.**, The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J. Clin. Invest.* 88, 1581-158, 1991.
114. **Brilla C. G., Matsubara L. S. and Weber K. T.**, Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25, 563-575, 1993.
115. **Brilla C. G. and Maisch B.**, Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heartfailure., *Eur. Heart J.* 15 Suppl D, 45-52, 1994.
116. **Siwik D. A. and Colucci W. S.**, Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species inthe myocardium, *Heart Fail. Rev.* 9, 43-51, 2004.
117. **Yamamoto K., Mano T., Yoshida J., Sakata Y., Nishikawa N., Nishio M., Ohtnai T., Hori M., Miwa T. and Masuyama T.**, ACE inhibitor and angiotensin II type 1 receptor blocker differently regulate ventricular fibrosis in hypertensive diastolic heart failure, *J. Hypertens.* 23, 393-400, 2005.
118. **Swynghedauw B.**, Molecular mechanisms of myocardial remodeling, *Physiol. Rev.* 79, 215-262, 1999.
119. **Katz A. M.**, Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure, *N. Engl. J. Med.* 322, 100-110, 1990.
120. **Böhm M.**, Pathophysiologie der Herzinsuffizienz heute. *Herz* 27, 75-91, 2002.
121. **Kaye D. M., Lefkovits J., Jennings G. L., Bergin P., Broughton A. and Esler M. D.**, Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart, *J. Am. Coll. Cardiol.* 26, 1257-1263, 1995.

122. **Löscher W., Ungemach F. R. und Kroker R.**, Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 4. Aufl., Parey Buchverlag im Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 49-51, 1999.
123. **Schrier R. W. and ABRAHAM W. T.**, Hormones and hemodynamics in heart failure, *N. Engl. J. Med.* 341, 577-585, 1999.
124. **Clark W. A., Rundnick S. J., Lapres J. J., Andersen L. C. and Lapointe M. C.**, Regulation of hypertrophy and atrophy in cultured adult heart cells, *Circ. Res.* 73, 1163-1176, 1993.
125. **Communal C., Singh K., Pimentel D. R. and Colucci W.S.**, Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway, *Circulation* 98, 1329-1334, 1998
126. **Millane T., Jackson G., Gibbs C.R. and Lip G. Y.**, ABC of heart failure, Acute and chronic management strategies, *Bmj.* 320, 559-562, 2000.
127. **Kajstura J., Cigola E., Malhotra A., Li P., Cheng W., Meggs L. G. and Anversa P.**, Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in Vitro, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 859-870, 1997.
128. **Lindsey M. L.**, MMP induction and inhibition in myocardial infarction, *Heart Fail. Rev.* 9, 7-19, 2004.
129. **Spinale F. G.**, Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart, *Circ. Res.* 90, 520-530, 2002.
130. **Weber K.T.**, Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation, *Circulation* 96, 4065-4082, 1997.
131. **Aumailley M. and Gayraud B.**, Structure and biological activity of the extracellular matrix, *J. Mol. Med.* 76, 253-265, 1998.
132. **Weber K.T., Sun Y., Tyagi S.C. and Cleutjens J.P.**, Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory Mechanisms, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 279-292, 1994.
133. **Boudreau N. and Bissell M.J.**, Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 640-646, 1998.

134. **Kanekar S., Hirozanne T., Terracio L. and Borg T.K.**, Cardiac fibroblasts, Form and function, *Cardiovasc Pathol.* 7, 127-133, 1998.
135. **Peterson J. T., Li H., Dillon L. and Bryant J.W.**, Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat, *Cardiovasc. Res.* 46, 307-315, 2000.
136. **Inokubo Y., Hanada H., Ishizaka H., Fukushi T., Kamada T. and Okumura K.**, Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome, *Am. Heart J.* 141, 211-217, 2001.
137. **Wilson E.M., Gunasinghe H.R., Coker M.L., Sprunger P., Leejackson D., Bozkurt B., Deswal A., Mann D.L. and Spinale F.G.**, Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure, *J. Card. Fail.* 8, 390-398, 2002.
138. **Lindsey M.L., Gannon J., Aikawa M., Schoen F. J., Rabkin E., Loprestimorrow L., Crawford J., Black S., Libby P., Mitchell P.G. and Lee R.T.**, Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction, *Circulation* 105, 753-758, 2002.
139. **Rohde L.E., Ducharme A., Arroyo L.H., Aikawa M., Sukhova G.H., Lopez-Anaya A., McClure K.F., Mitchell P.G., Libby P. and Lee R.T.**, Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice, *Circulation* 99, 3063-3070, 1999.
140. **Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L.E., Schoen F.J., Kelly R.A., Werb Z., Libby P. and Lee R.T.**, Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction, *J. Clin. Invest.* 106, 55-62, 2000.
141. **Chomczynski P. and Sacchi, N.**, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* 162:156-159, 1987.

142. **Holland P., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H.**, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7276-7280, 1991.
143. **Lie Y.S. and Petropoulos C.J.**, Advances in quantitative PCR technology, 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol*, 9, 43-48, 1998.
144. **Bustin S.A.**, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29, 23-39, 2002.
145. **Leutenegger C.M.**, The Real-time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Veterinary Science Tomorrow* , Issue 1, 2001.
146. **Gleason W. and E. Braunwald**, Studies on the first derivate of the ventricular pressure pulse in man, *J Clin Invest* 41- 80, 1962.
147. **Mason D., E. Braunwald, J. Covell, E. Sonnenblick and Jr. J. Ross**, Assessment of cardiac contractility. The relation between the rate of pressure rise and ventricular pressure during isovolumic systole, *Circulation* 44, 47-58, 1971.
148. **Ertl G. und S. Frantz S**, Healing after myocardial infarction, *Cardiovasc Res*, 66:22–32, 2005.
149. **Frangogiannis N.G.**, Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts, *Curr Med Chem*, 13:1877–93, 2006
150. **Thompson N.L., K.C. Flanders, J.M. Smith, L.R. Ellingsworth, A.B. Roberts and M.B. Sporn**, Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol*, 108:661–9, 1989.
151. **Deten A., A. Holzl, M. Leicht, W. Barth and H.G. Zimmer**, Changes in extracellular matrix and intracellular transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 33:1191–207, 2001.
152. **Dewald O., G. Ren, G.D. Duerr, M. Zoerlein, C. Klemm and C. Gersch**, Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, 164:665–77, 2004.
153. **Lefer A.M., P. Tsao, N. Aoki and M.A. Jr. Palladino**, Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta, *Science*, 249:61–4, 1990.

- 154. Lefer A.M., X.L. Ma, A.S. Weyrich and R. Scalia**, Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:1018–22, 1993.
- 155. Baxter G.F., M.M. Mocanu, B.K. Brar, D.S. Latchman and D.M. Yellon**, Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK, *J Cardiovasc Pharmacol*, 38:930–9, 2001.
- 156. Behfar A., L.V. Zingman, D.M. Hodgson, JM Rauzier, G.C. Kane and A. Terzic**, Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart, *Faseb J*, 16:1558–66, 2002.
- 157. Li T.S., M. Hayashi, H. Ito, A. Furutani, T. Murata and M. Matsuzaki**, Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells, *Circulation*, 111:2438–45, 2005.
- 158. Dickson M.C., J.S. Martin, F.M. Cousins, A.B. Kulkarni, S. Karlsson and R.J. Akhurst**, Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice, *Development*, 121:1845–54, 1995.
- 159. Kulkarni A.B., C.G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght and K.C. Flanders**, Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:770–4, 1993.
- 160. Sanford L.P., I. Ormsby, A.C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman and G.P. Boivin**, TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes, *Development*, 124:2659–70, 1997.
- 161. Bartram U., D.G. Molin, L.J. Wisse, A. Mohamad, L.P. Sanford and T. Doetschman**, Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice. *Circulation*, 103:2745–52, 2001.

- 162. Ignotz R.A. and J. Massague**, Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix, *J Biol Chem*, 261:4337–45, 1986.
- 163. Murphy-Ullrich J.E. and M. Poczatek**, Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1, mechanisms and physiology, *Cytokine Growth Factor Rev*, 11:59–69, 2000.
- 164. Letterio J.J. and A.B. Roberts**, Regulation of immune responses by TGF-beta, *Annu Rev Immunol*, 6:137–61, 1998.
- 165. Fava R.A., N.J. Olsen, A.E. Postlethwaite, K.N. Broadley, J.M. Davidson and L.B. Nanney**, Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia, *J Exp Med*, 173:1121–32, 1991.
- 166. Smith W.B., L. Noack, Y.Khew-Goodall, S. Isenmann, M.A. Vadas and J.R.Gamble**, Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium, *J Immunol*, 157:360–8, 1996.
- 167. Celada A and R.A. Maki**, Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages, *J Immunol*, 148:1102–5, 1992.
- 168. Wahl S.M., D.A. Hunt and L.M. Wakefield**, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:5788–92, 1987.
- 169. Lijnen P.J., V.V. Petrov and R.H. Fagard**, Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta (1), *Mol Genet Metab*, 71:418–35, 2000.
- 170. Desmouliere A., A. Geinoz, F. Gabbiani and G. Gabbiani**, Transforming growth factor-beta 1 induces alphasmooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts, *J Cell Biol*, 122:103–11, 1993.
- 171. Schiller M., D. Javelaud and A. Mauviel**, TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing, *J Dermatol Sci*, 35:83–92, 2004.

- 172. Dean R.G., L.C. Balding, R. Candido , W.C. Burns, Z. Cao and S.M. Twigg,** Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction, *J Histochem Cytochem*, 53:1245–56, 2005.
- 173. Birdsall H.H., D.M. Green, J. Trial, K.A. Youker, A.R. Burns and C.R. MacKay,** Complement C5a, TGFbeta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion, *Circulation*, 95:684–92, 1997.
- 174. Frangogiannis N.G., G. Ren, O. Dewald, P. Zymek, S. Haudek and A. Koerting,** The critical role of endogenous Thrombospondin (TSP)-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts, *Circulation*, 111:2935–2942, 2005.
- 175. Dewald O., P. Zymek, K. Winkelmann, A. Koerting, G. Ren and T. Abou-Khamis,** CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts, *Circ Res*, 96:881–9, 2005.
- 176. Matsumoto-Ida M., Y. Takimoto, T. Aoyama, M. Akao, T. Takeda and T. Kita,** Activation of TGF- β 1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005
- 177. Ikeuchi M., H. Tsutsui, T. Shiomi, H. Matsusaka, S. Matsushima and J. Wen,** Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction, *Cardiovasc Res*, 64:526–35, 2004.
- 178. Okada H., G. Takemura, K. Kosai, Y. Li, T. Takahashi and M. Esaki,** Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure, *Circulation*, 111:2430–7, 2005.
- 179. Liao R.,** Yin and Yang of myocardial transforming growth factor-beta 1: timing is everything, *Circulation*, 111:2416–7, 2005.
- 180. Pepper M.S.,** Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity, *Cytokine Growth Factor Rev* 8:21–43, 1997.

181. **Yu C.M., G.L. Tipoe, K. Wing-Hon Lai and C.P. Lau**, Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol*, 38:1207–15, 2001.
182. **Sun Y., J.Q. Zhang, J. Zhang and F.J. Ramires**, Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol*, 30:1559–69, 1998.
183. **Hao J., B. Wang, S.C. Jones, D.S. Jassal and I.M. Dixon**, Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279:H3020–30, 2000.
184. **Gray M.O., C.S. Long, J.E. Kalinyak, H.T. Li and J.S. Karliner**, Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 40:352–63, 1998.
185. **Campbell S.E. and L.C. Katwa**, Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts, *J Mol Cell Cardiol*, 29:1947–58, 1998.
186. **Azhar M., J. Schultz Jel, I. Grupp, G.W. Dorn, P. Meneton and D.G. Molin**, Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function, *Cytokine Growth Factor Rev*, 14:391–407, 2003.
187. **Parker TG, SE Packer and M.D. Schneider**, Peptide growth factors can provoke fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes, *J Clin Invest*, 85:507–14, 1990.
188. **Brooks A., V. Schinde, A.C. Bateman and P.J. Gallagher**, Interstitial fibrosis in the dilated non-ischaemic myocardium, *Heart*, 89:1255–6, 2003.
189. **Nagueh S.F., I. Mikati, D. Weilbaecher, M.J. Reardon, G.J. Al-Zaghrini and D. Cacula**, Relation of the contractile reserve of hibernating myocardium to myocardial structure in humans, *Circulation*, 100:490–6, 1999.
190. **Cleutjens JPM, Verluyten M, Smits JFM, Daemen MJAP**, Collagen Remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.*, 1995. 147: p. 325-338.

191. **Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ**, Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*, 1996. 155: p. 13-21.
192. **Swynghedauw B**, Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Am Physiol Soc*, 1999. 79(1): p. 215-262.
193. **Cohn JN**, Structural basis for heart failure: ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation*, 1991. 91: p. 2504-2507.
194. **Erdmann E.**, *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 5. Auflage, Springer, 2000: p. 539ff.
195. **Classen M., Diehl, V. und K. Kochsiek**, *Innere Medizin*. 5. Auflage, Urban & Fischer, 2004, p. 210ff.
196. **Chien K.R.**, Stress pathways and heart failure. *Cell*, 1999. **98**(5): p. 555-8.
197. **Boheler KR**, Schwartz K. Gene expression in cardiac hypertrophy trends. *Cardiovasc Med*, 1992. 2: p. 176-182.
198. **Frantz S, Hu K, Widder J, Bayer B, Witzel CC, Schmidt I, Galuppo P, Strotmann J, Ertl G, Bauersachs J.**, Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *Br J Pharmacol*, 2004. 141: p. 9-14.
199. **Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, Engler S, Kossamehl P, Hoher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker HJ, Paul M**, Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor beta(1) attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 Rat. *Hypertension*, 36(5):747-54, 2000.
200. **Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD, Bohm M.**, Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;283(3):H1253-62, 2002.
201. **Rosenkranz S, Amann K, Caglayan E.**, β -adrenoceptor blockade prevents cardiac hypertrophy and failure in TGF β transgenic mice, *Eur J Heart* 24, p. 665, 2003.

202. **Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L. E., Schoen F.J., Kelly R. A., Werb Z., Libby P. and R.T. Lee**, Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 106, 55-62, 2000
203. **Hayashidani S., Tsutsui H., Ikeuchi M., Shiomi T., Matsusaka H., Kubota T., Imanaka-Yoshida K., Itoh T. and A. Takeshita**, Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H1229-1235, 2003
204. **Peterson J.T., Li H., Dillon L. and J.W. Bryant**, Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc. Res.* 46, 307-315, 2000.
205. **Peterson J.T., Hallak H., Johnson L., Li H., O'brien P.M., Sliskovic D.R., Bocan T.M., Coker M.L., Etoh T. and F.G. Spinale**, Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* 103, 2303-2309, 2001.
206. **Nakamura R., Egashira K., Machida Y., Hayashidani S., Takeya M., Utsumi H., Tsutsui H. and A. Takeshita**, Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation* 106, 362-367, 2002.
207. **Rohde L.E., Ducharme A., Arroyo L.H., Aikawa M., Sukhova G.H., Lopez-Anaya A., McClure K.F., Mitchell P.G., Libby P. and R.T. LEE**, Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 99, 3063-3070, 1999.
208. **Romanic A.M., Burns-Kurtis C.L., Gout B., Berrebi-Bertrand I. and E.H. Ohlstein**, Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci.* 68, 799-814, 2001.
209. **Siwik D.A., Pagano P.J. and W.S. Colucci**, Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280, C53-60, 2001.

210. **Spinale F.G., Coker M.L., Krombach S.R., Mukherjee R., Hallak H., Houck W.V., Clair M.J., Kribbs S.B., Johnson L.L., PETERSON J.T. and M.R. Zile,** Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart Failure effects on left ventricular dimensions and function. *Circ. Res.* 85, 364-376, 1999.
211. **Tao Z.Y., Cavaasin M.A., Yang F., Liu Y.H. and X.P. Yang,** Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci.* 74, 1561-1572, 2004.
212. **Tracey K.J., Vlassara H. and A. Cerami,** Cachectin/ tumor necrosis factor. *Lancet* 20, 1122-1126, 1989.
213. **Matthews N.,** Tumor-necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits. *Br J Cancer*; 44: 418-424, 1981.
214. **Mannel D.N., Moore R.N. and S.E. Mergenhagen,** Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* , 30: 523-530, 1980.
215. **Degabriele N.M., Griesenbach U., Sato K., Post M.J., Zhu J., Williams J., Jeffery P.K., Geddes D.M. and E.W. Alton,** Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp. Physiol.* 89, 497-505, 2004.
216. **Weber K.T.,** Cardiac interstitium in health and disease, the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* , 1637-1652, 1989.
217. **Weber K.T., C.G. Brilla and J.S. Janicki,** Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors, *Cardiovasc Res* , 341-348, 1993.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Im Besonderen ein großes Dankschön an meinen Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Frantz für die ganz hervorragende Betreuung und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.

Vielen Dank an Helga Wagner und Barbara Bayer, die mir bei meinen Experimenten jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.

Ebenso meinen herzlichen Dank an Anna Adamek, Jürgen Wolf und Kai Hu für die hervorragende Unterstützung während dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich beim ganzen Team für die gute Zusammenarbeit und die entspannte und freundliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich für die Förderung der DFG (SFB 688, TP A 10) und die Unterstützung der Genzyme Corporation, Framingham, MA, USA bedanken.

