

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

Die Rolle von Integrin α_v nach akutem Myokardinfarkt am Mausmodel

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

Der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Alexander Grimm

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Strotmann

Koreferent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 2007

Der Promovend ist Arzt

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Jörg Strotmann für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates und Herrn Professor Dr. Georg Ertl für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Martin Laser für die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt darüber hinaus noch meinen Co-Doktoranden Cornelia Joha und Tobias Kupfer sowie dem gesamten Laborteam der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg für die große Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das Verständnis während meiner Arbeit bedanken.

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Hypertrophie am linken Ventrikel nach Myokardinfarkt	1
1.2 Die extrazelluläre Matrix	5
1.3 Aufgaben und Wirkung von Matrixmetalloproteasen	5
1.4 Integrine – Grundlagen	7
1.5 Einfluss von Integrin-Aktivierung auf biochemische Kaskaden.....	11
1.6 Bedeutung von Integrinen und speziell des Integrin α / β 5 beim Herzinfarkt	13
1.7 Tiermodell.....	13
1.8 Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 Herstellerfirmen für Chemikalien und Antikörper.....	16
2.1.2 Allgemeine Chemikalien alphabetisch geordnet	17
2.1.3 Lösungen und Puffer	18
2.1.4 Protease- und Phosphataseinhibitoren für Gewebepräparation	21
2.1.5 Antikörper Gefrierschnitte.....	22
2.1.6 Spezielle Materialien Western Blot	23
2.1.7 Geräte und Maschinen.....	26
2.1.7.1 Gewebeaufbereitung allgemein.....	26
2.1.7.2 Western Blot	26
2.1.7.3 Histologie.....	27
2.1.7.4 Gefrierschnitte.....	27
2.1.7.5 Echokardiographie	27
2.1.7.6 Allgemeine Software.....	28
2.1.8 Tiere	28
2.2 METHODEN	28
2.2.1 Versuchstiere	28
2.2.1.1 Einbau der Integrin α -Inhibitor-Pumpen	29
2.2.1.2 Induktion des Myokardinfarkte.....	31
2.2.2 Gewebepräparation	31
2.2.2.1 Aufbereitung des Herzgewebes	31
2.2.2.2 Weitere Gewebepräparation	33
2.2.3 Histologie.....	33
2.2.3.1 Anfertigung der Schnitte	33
2.2.3.2 Färbung der Gewebeschnitte	35
2.2.3.2.1 Grundlagen.....	35
2.2.3.2.2 Gewebefärbung	36
2.2.3.3 Auswertung und Ausmessung der Schnitte	37
2.2.4 Proteinanalyse.....	39
2.2.4.1 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	39
2.2.4.2 Gefrierschnitte - Immunhistologie	41
2.2.4.2.1 Anfertigung der Schnitte.....	41
2.2.4.2.2 Aufbereitung der Schnitte und Beschichtung mit Antikörpern.....	41
2.2.4.2.3 Analyse der hergestellten Gefrierschnitte mittels confocaler Lasermikroskopie	43
2.2.4.3 Western Blot	44
2.2.5 Herzechokardiographie	48
2.2.6 Mathematische und statistische Ausarbeitung der Ergebnisse	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN	51
3.1.1 Histologische Bilder im Vergleich.....	51

3.1.1.1	Kontrolltiere.....	51
3.1.1.2	Infarkttiere nach zwei Tagen	54
3.1.1.3	Infarkttiere nach sieben Tagen.....	57
3.1.1.4	Vergleich aller Gruppen	62
3.1.2	Echo-Bilder im Vergleich.....	66
3.1.2.1	Kontrolltiere.....	66
3.1.2.2	Infarkttiere nach zwei Tagen	70
3.1.2.3	Infarkttiere nach sieben Tagen.....	73
3.1.2.4	Vergleich aller Gruppen	79
3.2	PROTEINANALYSE.....	83
3.2.1	Western Blot.....	83
3.2.2	Antikörperbeschichtete Gefrierschnitte.....	85
3.2.2.1	Darstellung von nicht aktiviertem FAK	85
3.2.2.2	Darstellung von phosphorylierten FAK-PY 925	87
3.2.2.3	Darstellung von nicht aktiviertem Src.....	90
3.2.2.4	Darstellung von phosphoryliertem Src-PY 416.....	92
3.3	MORTALITÄTSUNTERSCHIEDE	96
4.	DISKUSSION	97
4.1	Morphologische und funktionelle Veränderungen.....	97
4.3	Einschränkungen	106
5.	ZUSAMMENFASSUNG	108
6.	LITERATURVERZEICHNIS	110
7.	ANHANG	119
7.1	Abkürzungen	119

1.EINLEITUNG

1.1 Hypertrophie am linken Ventrikel nach Myokardinfarkt

Die koronare Herzkrankheit und im Speziellen der Myokardinfarkt mit seinen Folgen stellen vor allem in den Industrieländern immer noch eine der häufigsten Todesursachen dar. Ist die Akutphase überstanden, so entwickeln mehr als 30% der Patienten eine Linksherzinsuffizienz [1]. Herzinfarkt führt zu komplexen architektonischen Veränderungen am Herzen, sowohl das kranke als auch das gesunde Gewebe betreffend [39].

Die wohl auffälligsten strukturellen Veränderungen sind die Dilatation des linken Ventrikels sowie die Verschmälerung des infarzierten Myokards [2] und die Verbreiterung des gesunden Wandanteils. Die Dilatation ist direkt vom Ausmaß des anfänglichen Schadens abhängig [3-5]. Linksventrikuläres Remodeling und daraus resultierende Hypertrophie wurden in experimentellen Studien als wichtige prognostischer Faktoren nach Herzinfarkt erkannt und sind die Hauptursache für nachfolgendes Herzversagen [6-9].

Unter Hypertrophie des Herzens versteht man die Adaption an verschiedene hämodynamische, hormonelle und mechanische Belastungen und eine daraus resultierende Vergrößerung des Herzmuskelgewebes [10]. Myozytenwachstum wird induziert von mechanischem Stress, neurohumeralen Regulatoren und parakrinen Faktoren [15]. Francis et al. beschreiben folgende Zusammenhänge : Remodeling besteht aus einem Konglomerat von Zellwachstum, induziert durch Angiotensin II, Katecholamine, Endothelin, Zytokine, Wachstumsfaktoren und mechanischem Stress, Fibrose, induziert durch Angiotensin II, Aldosteron und TGF- β , und letztendlich Apoptose durch TNF α und Fas. Gegenregulatoren sind ANP, BNP, NO und Bradykinin [159].

Man unterscheidet physiologische (bei Sportlern) und pathologische Muskelmassenzunahme am Herzen. Letztere unterteilt man in exzentrische (durch Volumenbelastung) und konzentrische (durch Druckbelastung) Hypertrophie.

Dass es nach einem Infarkt zu strukturellen Veränderungen, auch des gesunden Gewebes des linken Ventrikels, insbesondere zu Hypertrophie kommt ist einschlägig bekannt und bewiesen. Auch eine Veränderung der extrazellulären Matrix in diesem Zusammenhang steht fest [11-13]. Aus physiologischen und physikalischen Gesichtspunkten ist eine gewisse Hypertrophie als Kompensation erwünscht und auch lebensnotwendig. Nach dem Laplaceschen

Wandspannungsgesetz, ist diese proportional zu Druck und Radius und umgekehrt proportional zur Wanddicke σ (Wandspannung) = p (Druck) \times r (Radius) / $2h$ (Wanddicke).

Unter anderem durch Myokardischämien kommt es zu erhöhtem Wandstress und somit zu erhöhter Wandspannung. Diese kann durch eine gewisse Dickenzunahme des Myokards wieder reduziert werden.

Dies liegt vor allem daran, dass nach einem Herzinfarkt innerhalb kürzester Zeit eine Reihe von intrazellulären biochemischen proteinkinase-abhängigen Kaskaden in Myozyten, Fibroblasten und eingewanderten Entzündungszellen angeworfen werden, die versuchen, den eingetreten Herzwandschaden zu kompensieren. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Zytokine wie TGF- β 1 [14].

Diese reparativen Vorgänge führen aber sehr häufig zu einer stärkeren Kompensation als erwünscht, was Hypertrophie des Myokards und Herzdilatation zu Folge hat [15].

Diese Veränderungen, insbesondere die Herzdilatation führen zu einer weiteren Verschlechterung der Herzfunktion und zu einer konsekutiven Aktivierung von Kompensationsmechanismen. Auch die Herzhypertrophie führt über eine Zunahme der Wandspannung sowie eine Vermehrung des zu versorgenden Gewebes zu einer Verschlechterung der Herzdurchblutung und somit zu einer Verschlechterung der myokardialen Sauerstoffversorgung [16].

All diese morphologischen Umbauprozesse führen zu dem Syndrom der Herzinsuffizienz. Diese wird von der WHO als Unfähigkeit des Organismus, den Körper mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, bezeichnet [1].

Die Ursachen für Herzinsuffizienz sind vielfältig und zahlreich, der Myokardinfarkt ist eine Ursache der Entstehung. Man unterteilt ein akutes Herzversagen und ein chronisches. Eine weitere Unterteilung spricht von systolischer, diastolischer und gemischter Herzinsuffizienz.

Als Folge einer systolischen Dysfunktion entsteht eine verminderte Auswurfraction bei gleichzeitig erhöhtem enddiastolischem Volumen. Dies entsteht zum Beispiel bei Kontraktionsschwäche im Rahmen von Koronarer Herzkrankheit oder bei erhöhter Ventrikelspannung beispielsweise im Rahmen von Klappenstenosen. Eine diastolische Dysfunktion entsteht bei ventrikulärer Hypertrophie und daraus resultierend verminderte Füllung, unter anderem bei arterieller Hypertonie. Es folgt ein vermindertes Schlagvolumen.

Die Folgen dieses Syndroms sind zunehmend verminderte Belastbarkeit (Vorwärtsversagen) sowie Rückstau des Blutes in das venöse System und somit Anstieg von Wasser und Salz im Körper mit folgenschwerer Belastung peripherer Organe wie Leber, Nieren und

Gastrointestinaltrakt. Letztendlich erfolgt der Tod durch chronisches Pumpversagen mit seinen Folgen.

Nach einem Herzinfarkt kommt es wie oben genannt zu Kompensierungsvorgängen die eine Hypertrophie des linken Ventrikels bewirken. Konsekutiv entsteht ein gemischtes Herzversagen mit all seinen pathologischen Folgen für den Organismus.

Einen großen Anteil daran tragen intrazelluläre Signalwege sowie eine neurohumorale Aktivierung, angeregt unter anderem durch die Einwanderung von Entzündungszellen in das Infarktareal.

Das sogenannte remodeling („Wiederherstellung“) unterteilt man in eine Frühphase (innerhalb von 72 Stunden) und eine Spätphase (nach 72 Stunden) [15].

Lew et al. postulierten, dass gerade das nichtinfarzierte Areal einen entscheidenden Einfluss auf die Erhaltung des Schlagvolumens in der Frühphase hat, was sich in einer Hyperkinese der Wand äußert [16]. In dieser Phase kommt es außerdem zu einer signifikanten Wandverdünnung des Infarktmyokards auf Grund von Nekrosen.

In der Spätphase kann es teilweise zu bis zu 70% Vergrößerung einer gesunden Herzzelle kommen. [17]

Die meisten intrazellulär ablaufenden Prozesse sind bisher leider, obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, unbekannt. Dennoch weiß man, dass an den Umbauprozessen nach einem Herzinfarkt zahlreiche enzymatische Schritte beteiligt sind, stimuliert durch verschiedenste Auslösefaktoren.

Die Hypertrophie beispielsweise entsteht auf verschiedenen Wegen in Form von Enzymen (ACE), Wachstumsfaktoren (TGF- β 1), Genen (c-Myc, c-fos et cetera) und Proteasen [18-20]. Zum Beispiel kommt es nach Infarkt zu einer Hochregulation inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α oder IL-1 β . [21]. Das Ansteigen dieser Enzyme hat dann auch wieder Folge auf die Expression von Matrixmetalloproteasen, ANP und BNP im infarzierten und im nichtinfarzierten Herzen [22].

Einen wichtigen Übermittler einiger dieser Prozesse scheinen Integrine darzustellen, auf die später noch explizit eingegangen wird.

Wichtige Kompensationsmechanismen stellen auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie die Katecholamin-Produktion dar [23-24]. Das RAAS-System wird durch einen häufig eintretenden Blutdruckabfall nach Infarkt aktiviert [15] und bewirkt eine vermehrte Retention von Wasser und Natrium, wodurch es zu einer Steigerung sowohl von Vorlast als auch

Nachlast kommt. Dies wiederum führt zu einem vermehrten Wandstress im Herzen und zu einer gesteigerten Aktivierung intrazellulärer Kompensationsmechanismen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei Angiotensin II zu, wie unter anderem von Yamazaki et al. [18] beschrieben. Dieses Protein wird durch mechanischen Wandstress stark vermehrt und spielt eine entscheidende Rolle in kardialer Hypertrophie [25]. Auch die Wirkung von Angiotensin II wird über diese Tyrosinkinasen vermittelt [121].

Diese Erkenntnisse haben das therapeutische Konzept der Sekundärprävention nach kardiovaskulären Ereignissen stark modifiziert. Neben der Veränderung der Lebensweise, der strengen Einstellung von Blutzucker und Blutfettwerten, der Nikotinkarenz und der Forderung von stetiger moderater Bewegung des Koronar-Patienten, stellt die medikamentöse Therapie einen immer wichtiger werdenden Basispfeiler der Sekundärprävention dar. So haben nicht nur Betablocker, ASS und Statine eine feste Stellung in diesem Prozess gefunden, sondern auch die Regulierung des RAAS-Systems.

Sowohl die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzymes als auch des Angiotensin-II-Rezeptors haben in den letzten Jahren im klinischen Gebrauch in Form von ACE-Hemmern und AT1-Blockern eine enorme Bedeutung erhalten und gezeigt, dass sie unter anderem die Mortalität bei Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt signifikant reduzieren [HOPE- und ELITE-Studien]. Der positive Effekt von AT1-Blockern auf kardiale Fibrose konnte bereits an Rattenherzen nachgewiesen werden [26].

Inzwischen zählen die drei erstgenannten und jeweils eines der beiden letztgenannten Medikamente zur Standardtherapie eines Myokardinfarkt-Patienten.

Ein weiteres im Rahmen von Herzhypertrophie auftretendes Peptid ist das ANP (atrialess natriuretisches Peptid) [10] und neuerdings das BNP (brain natriuretisches Peptid). Letzteres dient nach neueren klinischen Forschungen zur Verlaufskontrolle einer Herzinsuffizienz im klinischen Alltag. Dies ergab eine multinationale Studie im New England Journal of Medicine [27]. Ein Test hierzu wurde von der Firma Biosite entwickelt.

Eine weitere Folge eines insuffizient arbeitenden Ventrikels ist der Anstieg von Katecholaminen, die über eine Steigerung der Herzfrequenz eine Zunahme des Schlagvolumens bewirken sollen. Dieser sogenannte Bowditch-Effekt funktioniert jedoch nur am gesunden Herzen. Am kranken Herzen bewirkt er sogar eine Verschlechterung der Pumpleistung sowie der Herzmuskeldurchblutung auf Grund einer Verringerung der Diastole und somit der Ventrikelfüllung [1, 16]. Hier liegt unter anderem ein therapeutischer Ansatzpunkt von Betablockern, die die Herzfrequenz reduzieren und die Diastolendauer verlängern und somit den Sauerstoffverbrauch des Herzens verringern. Weiterhin stimulieren

Katecholamine über α_1 Rezeptoren G_α abhängig das Wachstum von Myozyten und somit wiederum Hypertrophie [28].

All diese Prozesse stimulieren Proteinkinasen und darauf folgende Kaskaden, insbesondere Tyrosinkinasen, MAP-Kinasen und p21ras. Diese induzieren einen Hypertrophieprozess des Herzmuskels, der unter anderem durch die Reorganisation der extrazellulären Matrix mitbeeinflusst wird [29].

Die mögliche Beeinflussbarkeit dieser Prozesse durch gezielte Inhibierung einzelner Schlüsselenzyme dieser Kaskaden, im Speziellen hier des Integrins, soll in folgender Arbeit untersucht werden.

1.2 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexes Makromolekül-Geflecht, bestehend aus Glykosaminoglykanen und Faserproteinen, zum einen Strukturproteine wie Kollagen [30], zum anderen Anheftungsproteine wie Laminin und Fibronectin [31]. Die EZM ist für die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen durch aktive Teilnahme an Signalprozessen zwischen dieser und ihrer Umgebung und für die mechanische Stabilität von Geweben verantwortlich. Zellen sind in der Lage unterschiedliche Mengen einzelner Komponenten der EZM und EZM-degradierende Enzyme zu sezernieren [32]. Zusätzlich sind sie befähigt auf mechanischen Stress zu reagieren und somit die EZM neuen Anforderungen anzupassen. Bei diesem Vorgang spielen vor allem Integrine (siehe 1.4) eine wichtige Rolle [33]. Matrix und Integrine kollaborieren bei der Induktion von Wachstum, Differenzierung und Überleben einer Zelle [34].

Im hypertrophierten Herzen kommt es zu Umbauvorgängen der EZM, beispielsweise zu einer Zunahme der Proteine Kollagen und Fibronectin [29, 35, 36].

1.3 Aufgaben und Wirkung von Matrixmetalloproteasen

Matrixmetalloproteasen MMP sind eine Familie von Zink (Zn^{2+}) –abhängigen Endoproteasen, die EZM verringern [37] und durch spezifische im Gewebe vorkommende Inhibitoren gehemmt werden (TIMP's) [38]. Dadurch führen sie beispielsweise nach einem Infarkt zu einer Wandverdünnung im Nekroseareal [15].

Normalerweise findet man im Körper nur geringe Konzentrationen dieser Enzyme. Allerdings werden sie durch bestimmte Prozesse beeinflusst; unter anderem führen inflammatorische Enzyme, wie zum Beispiel TNF α , EGF und IL-6 zu einer Vermehrung, Kortikosteroide oder Heparin dagegen zu einer Verringerung dieser Proteine [39]. Allerdings bestehen unter den einzelnen Untergruppen an MMP`s Unterschiede in der Reagibilität auf verschiedene Stimuli.

Erhöhte Aktivität von MMP`s wurde in verschiedenen Krankheitsprozessen nachgewiesen, unter anderem bei Tumorwachstum und -metastasierung, Arthritis und Wundheilung.

MMP`s, vor allem MMP-9 haben aber auch eine entscheidende Funktion im Heilungsprozess kardiovaskulärer Erkrankungen, insbesondere ischämischer Herzkrankheiten [39,40]. Dieser Einfluss wurde auch von Rhode et al. nachgewiesen [41].

Die Aktivierung dieser MMP startet innerhalb von 24 Stunden nach einem Infarkt [42]. Man vermutet daher, dass MMP`s in viele Prozesse nach einem kardiovaskulären Ereignis, unter anderem Zellmigration (Entzündungszellen), Angiogenese und Remodeling involviert sind. Eine Überexpression bei ischämischen Ereignissen wurde bereits nachgewiesen [43, 44]. Jedoch sind genauere Differenzierungen der verschiedenen Metalloproteasen noch ausstehend und genaue Aussagen daher nicht zu stellen. Die Beteiligung einzelner MMP`s an bestimmten Prozessen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Diese Vermutung konnte durch verschiedene Arbeiten noch verstärkt werden.

Lee et al. zeigten, dass eine Überexpression von MMP 1 am Herzen transgener Mäuse Hypertrophie, Dilatation und systolische Dysfunktion bewirkten [45].

Die experimentelle Hemmung von MMP`s im Tiermodell beispielsweise hat gezeigt, dass dadurch linksventrikuläre Dilatation nach einem Infarkt gestoppt werden kann [46]. Auch Asakura et al. zeigten, dass die Hemmung einer MMP, im Speziellen hier ADAM12 sowohl Entstehung von Hypertrophie als auch Dilatation des linken Ventrikels verhinderte [47].

Heymans et al. zeigten, dass ein Fehlen der MMP 9 in Mäusen die Wundheilung verzögerte und den Einstrom von Leukozyten in das Nekroseareal verminderte [48]. Lee et al. zeigten darüber hinaus, dass eine Inhibierung dieser Metalloprotease die linksventrikuläre Dilatation vermindere [45].

Lindsey et al. bestätigten den Einfluss von MMP-Inhibition auf das Remodeling des Myokards nach Infarkt, fanden aber auch heraus, dass die Angiogenese und Neovaskularisation im subendokardialen Gewebe dadurch nicht beeinträchtigt wird [49].

Diese Proteasen sind ein Beispiel für die zahlreichen biochemischen Prozesse, die entscheidenden Einfluss auf pathologische Prozesse am Herzen haben. Die MMP`s stehen in

enger Kooperation mit Integrinen, weshalb sie auch im Rahmen dieser Arbeit Erwähnung finden [50].

1.4 Integrine – Grundlagen

Es gibt mehrere Proteine auf der Zelloberfläche, die imstande sind Zell-Matrix-Verbindungen herzustellen, die sogenannten Zelladhäsionsrezeptoren. Adhäsion ist neben dem Aufbau von Organen und Geweben vor allem an einer Reihe physiologischer Prozesse wie der Immunabwehr, Wundheilung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose sowie zahlreichen pathologischen Prozessen beteiligt. Man unterscheidet Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion, eine Einbindung der Zellen in die EZM (siehe 1.2).

Zu diesen Molekülen gehören neben Cadherinen, Selectinen und der Immunglobulin-Superfamilie auch die Integrine.

Es handelt sich bei Integrinen um eine Gruppe von heterodimeren transmembranösen Glykoproteinen, bestehend aus einer α - und einer β - Untereinheit, die nichtkovalent miteinander verbunden sind [51, 52].

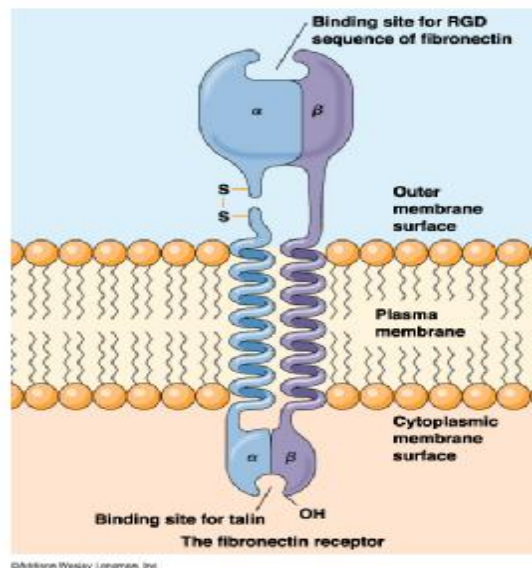


Abb. 1 Integrin-Aufbau www.mun.ca/biology
Addison Wesley Longmann [161]

Man klassifiziert Integrin-Subtypen, die auf die Anwesenheit der α v- oder β 1- beziehungsweise β 2- Untereinheit angewiesen sind. [53]. Je nach Kombination mit einer α/β -Untereinheit ergeben sich besondere Ligandenspezifitäten; zum Beispiel ergibt aus der Kombination α v/ β 5

ein Rezeptor für Vitronektin und Osteospondin [51, 53-56]. Andere Integrine weisen Bindungsstellen für viele Liganden auf; so bindet $\alpha\beta3$ Integrin unter anderem an Vitronektin, Osteospondin, von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin [53, 57-59].

Insgesamt wurden bisher zwischen 21 [53] und 24 [56, 60] verschiedene Kombinationen der Subtypen mit ihren Liganden beschrieben.

Beide Untereinheiten enthalten einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären zytoplasmatischen C-Terminus. Bei der β -Untereinheit übernimmt letztere mittels intrazellulärer Struktur-Proteine wie Vinculin und Talin Bindung zum Actinskelett der Zelle auf, dient als Ligand für Signalmoleküle wie beispielsweise FAK und Bindungs-Proteine (beispielsweise Grb-2 und p130Cas) [61].

Die Bedeutung von Integrinen für das Wachstum von Zellen wurde schon vor mehr als 30 Jahren beschrieben [62].

Die Aufgabe von Integrinen besteht also einerseits in der mechanischen Verknüpfung von extrazellulärer Matrix EZM und Zytoskelett [61], andererseits aber auch in der bidirektionalen Weiterleitung biochemischer Signale, beispielsweise mittels mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) über die Plasmamembran, das heißt von der Umgebung in die Zelle und umgekehrt [63-67]. Bekannt ist mittlerweile, dass Integrine keine eigene Enzymaktivität besitzen, sondern nur über die Signalübertragung durch Kinasen und GTPasen (beispielsweise Rho und Ras) funktionieren [68] (siehe 1.5)

So hat diese Gruppe von Zelloberflächen-Proteinen eine ganz entscheidende Bedeutung für den Zellzyklus, die Proliferation und die Apoptose [51]. Ein wichtiges Ereignis bei der Signalübertragung stellt hierbei die transmembranäre Interaktion zwischen beiden Untereinheiten dar [69].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil von Integrinen ist die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen. Die Adhäsion von Zelle zu Zelle oder EZM ist essentiell für Differenzierung und Proliferation von Gewebe. Sie dient einerseits der Bindung von Actinfasern an die EZM, andererseits der Signaltransduktion. Zu den zytoplasmatischen Proteinen der fokalen Adhäsion zählen zum einen Konstruktionsproteine wie Vinculin (siehe oben) und α -Actinin, die für die Aufrechterhaltung der Struktur des Adhäsionskomplexes sorgen, zum anderen Regulationsproteine wie Proteinkinasen, zum Beispiel FAK oder Protein-Phosphatasen und Signalmoleküle wie Src oder p130Cas [70, 71]. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Signalübertragung [56, 72].

Interessanterweise hängt ein Großteil der Wirkungen der Integrine auch von einer Interaktion mit den unter 1.3 erwähnten Matrixmetalloproteasen ab [50].

Die Signaltransduktion geht mit einem Anstieg an Tyrosin-Phosphorylierungen einher [73], vor allem von FAK. Über die Aktivierung verschiedenster Kinasen, unter anderem der MAP/ERK-Kinase kommt es letztendlich zur Aktivierung von ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase). Zusätzlich kann es zu einer Autophosphorylierung der FAK kommen, wodurch eine Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase Src frei wird, wodurch weitere Kaskaden aktiviert werden [74].

Reguliert werden Integrine entweder durch Signale aus dem Zellinneren und dadurch gesteigerte Affinität für Liganden der EZM (inside-out-signaling) [63, 75] oder durch Veränderungen der extrazellulären Matrix (outside-in-signaling). Ein Modell der dadurch entstehenden Konformationsänderung der Integrine wurde 2002 von Hynes et al. beschrieben [76].

Durch Zusammenlagerung zu sogenannten Clustern vieler Integrin-Moleküle wird die Ligandenbindung noch verstärkt (Aviditätssteigerung). Diese Bindung ist von der Anwesenheit bestimmter divalenter Kationen abhängig, wie zum Beispiel Calcium, Magnesium oder Mangan [60].

Neben den grundsätzlichen Prozessen der Adhäsion [71] sind Integrine ebenso an der Zellmigration beteiligt [77].

Integrine erhalten sehr früh in der Entwicklung der Organe einzelner Spezies ihre Bedeutung und werden daher frühzeitig exprimiert [78-80].

Wie hoch die Bedeutung von Integrinen einzuschätzen ist, kann man daran erkennen, dass zum Beispiel ein angeborener Defekt dieser Adhäsionsmoleküle auf der β -Untereinheit von Granulozyten zum sogenannten Leukozytenadhäsionsdefekt LAD führt, was zu schwersten Infektionen schon im Kindesalter führt. [81]. Ebenso finden sich häufig auf Tumorzellen Veränderungen der Integrin-Expression, was eine Ursache für Entstehung von Metastasen zu sein scheint [82]. Mizejewski et al. beschrieben die Beteiligung von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ am Wachstum von Blutgefäßen und der hämatogenen Metastasierung maligner Tumoren [83]. Hier liegt ein aktueller therapeutischer Ansatz von Inhibitoren der Integrine. [84]

Untersuchungen an Integrin-Knockout Mäusen haben gezeigt, dass Integrine für den Aufbau und den Erhalt zahlreicher Organe essentiell sind [85-88].

Mittels gezielter Ausschaltung einzelner Integrin-Untertypen konnte man so deren Beteiligung an der Entwicklung von Lunge, Niere, Haut, Herz und Nervensystem zeigen [89-92].

Durch die zahlreichen Ergebnisse hat in den letzten Jahren auch in der Klinik ein Inhibitor des Integrins $\alpha\text{2}\beta\text{3}$ (Glykoprotein IIb/IIIa) in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen Anwendung gefunden. [93]. Die Wirkstoffe Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid sind

mittlerweile als unterstützende Therapie bei Ballondilatation und PTCA bei instabiler Angina pectoris Teil der Risikoreduktion.

Ein anderes Integrin, $\alpha 2\beta 1$, wird in hoher Zahl auf Blutplättchen exprimiert und die Dichte dieses Moleküls scheint eine große Rolle in der Plättchenaggregation zu spielen [94]. Verschiedene klinische Studien zeigten, dass Veränderungen in $\alpha 2\beta 1$ mit einem erhöhten Infarktrisiko assoziiert sind. [95, 96].

Cass et al. [97] beschrieben auch eine Beteiligung von Integrin $\beta 1$ an Wundheilung und Hautregeneration.

Brooks et al. [98] erkannten eine Beteiligung von $\alpha v\beta 3$ an der Angiogenese in Granulationsgewebe der Haut.

Das in dieser Arbeit untersuchte Integrin αv wurde in engen Zusammenhang mit Pankreascarcinomen dargestellt, interessanterweise in Wechselwirkung mit Wachstumsfaktor (VEGF) [99]. Zusätzlich wurden Bedeutung bei Angiogenese [100] und Adhäsion und Migration [101] nachgewiesen.

Die Bedeutung der verschiedenen Integrine für die Zukunft, gerade auch in der Therapie und Diagnose von Neoplasien ist noch nicht absehbar. Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit von Chen et al. untersucht den Zusammenhang von Integrin $\alpha v\beta 3$ und Lungenkarzinom [102]. Nach aktuellem Stand der Forschung scheint diese Gruppe von Proteinen für die zukünftige Medizin eine enorme Rolle einzunehmen.

Die Beteiligung der Integrine an physiologischen und pathologischen Prozessen des Herzens wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben. [103-106]. Hornberger et al. beschrieben den entscheidenden Einfluss von Integrin $\beta 1$ auf das Wachstum von fetalen Kardiomyozyten [107, 108]. Interessant ist die Tatsache, dass die Ausschaltung von bestimmten Integrinen in embryonalen Knock-out-Mäusen zur Letalität dieser auf Grund massiver Herzmissbildungen führte [109]. Auch im hämatopoetischen System führte $\beta 1$ -Ausschaltung zu Störungen des Homing-Prozesses von Blutzellen [110]. Ross et al. zeigten eine Beteiligung von $\beta 1$ an Hypertrophieentstehung durch Überexprimierung dieses Proteins mittel Gentransfer über Adenoviren [68].

Kuppuswamy et al. konnten 1997 eine Beteiligung von Integrin $\alpha v\beta 3$, Src und FAK an Hypertrophieprozessen des Herzens entdecken [111]. Ebenso konnte eine deutliche Beteiligung von Integrin $\beta 5$ bei Hypertrophieprozessen am rechten Ventrikel von Katzen nach Pulmonalarterienkonstriktion nachgewiesen werden [111, 112].

Unter anderem kann man den uns interessierenden Weg über phosphoryliertes Src, FAK und ERK $\frac{1}{2}$, das wie hier ersichtlich auch durch MEK $\frac{1}{2}$ aktiviert wird, erkennen.

Zusätzlich unterliegt FAK auch der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren [122].

Für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung ist nun die Folge einer Inhibierung von Integrin αv auf die Phosphorylierung dieser Proteine. Da eine Reihe von Kinasen und Proteinen an der Kaskade beteiligt sind, beschränkten wir uns bei der Untersuchung dieses Vorganges auf einige wenige repräsentative Proteine wie FAK, Src, ERK $\frac{1}{2}$ -Kinase und p38.

FAK wird durch Aktivierung an Tyr397 autophosphoryliert und bildet so eine Bindungsstelle für Src-Kinase [51, 123]. Durch die Bindung von Src kommt es wieder zu einer weiteren Aktivierung von FAK, genauer gesagt einer Phosphorylierung an Tyr925 (FAK-PY 925) und damit zu einer weiteren Regulierung von Signalkaskaden.

Eine wichtige Rolle in der Signalübertragung kommt auch den MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte Proteinkinasen) zuteil, zu denen ERK, p38 und c-Jun (JNK/SAPK) gehören.

Bei ERK $\frac{1}{2}$ -Kinase handelt es sich um eine dieser MAP-Kinasen, die wiederum cytoplasmatische Proteine phosphoryliert oder Transkriptionsfaktoren im Zellkern induziert [124, 125].

Die Tatsache, dass diese Kinase auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung, einschließlich kardialer Myozyten, einen bedeutenden Einfluss ausübt, scheint bewiesen [126, 127]. Sadoshima et al. zeigten, dass ERK innerhalb weniger Minuten nach mechanisch induziertem Herzwandstress in Kardiomyozyten hochreguliert wird [128]. Die Ursache für einen Anstieg liegt in einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren (growth factor), Hormone (Angiotensin II) und Zytokine (unter anderem Integrin) [25].

ERK ist wichtig für die Einleitung einer Hypertrophie durch eine Induktion von Transkriptionsfaktoren und Proteinsynthese [129].

Eine Kombination von Wachstumsfaktor- und Integrinstimulation führen zu einem vermehrtem Anstieg von ERK [130, 131]

Zwischenschritte bei der Aktivierung von ERK stellen unter anderem die Phosphorylierung von FAK und Src durch Integrine dar [132]. Auch hierbei spielen wieder mehrere Proteine und Kinasen eine Übermittler-Rolle [51]. Man vermutet jedoch auch, dass es FAK-unabhängige Aktivierung von ERK gibt [117].

Auch in der Arbeit von Joner et al. konnte ein entscheidender Zusammenhang von FAK, Src und MAPK in der Regulierung von Myozytenwachstum bei Mäusen nachgewiesen werden.

Die anderen MAPK wie JNK und p38 erhalten ihren Stimulus unter anderem durch oxidativen Stress, durch osmotische Zellirritation und durch Freisetzung von Tumornekrosefaktor α und IL-6 [133, 134]

Wenn eine Beteiligung von Integrin αv an der Regulierung dieser Enzyme besteht, so müsste das Fehlen beziehungsweise die Inhibierung dieses Integrins, Einfluss auf die Aktivität dieser Kinasen haben.

1.6 Bedeutung von Integrinen und speziell des Integrin $\alpha v/\beta 5$ beim Herzinfarkt

Die Bedeutung von Integrin $\beta 1$ und $\beta 3$ auf die Entstehung von Herzhypertrophie wurde bereits ausgiebig untersucht. [10-109] Siehe 1.5

Mei Sun et al. [135] konnten einen deutlichen Anstieg dieser beiden Subtypen 3 Tage nach einem Infarkt an Rattenherzen mit einem Spitzenwert nach 7 Tagen zeigen. Dabei fanden sich einzelne Typen entweder auf Entzündungszellen, auf Myozyten ($\beta 1D$) oder auf Fibroblasten vermehrt.

Der genaue Einfluss vom Subtyp Integrin $\alpha v\beta 5$ auf Prozesse der Herzhypertrophie, vor allem nach Herzinfarkt, ist bisher weitestgehend ungeklärt. Allerdings konnte in der Arbeit von Laser et al. am Katzenherzen ein zeitgleicher Anstieg von FAK, Src und zytoplasmatischem Integrin $\beta 3$ nach Pulmonalarterienkonstriktion nachgewiesen werden. Von besonderem Interesse ist nun, wie sich das -Integrin bei Myokardinfarkt-Tieren verhält und welche Folge aus einer Inhibierung dieses Integrins sowohl auf struktureller als auch funktioneller Ebene entsteht.

Die momentane Datenlage zum Einfluss dieses Integrins auf das Wachstum von Kardiomyozyten ist jedoch von unterschiedlichen Aussagen geprägt.

1.7 Tiermodell

Die Zusammenhänge von Herzhypertrophie und molekularen Veränderungen wurden bisher an zahlreichen Tiermodellen untersucht. Laser et al. benutzten beispielsweise ein Katzenmodell nach Banding der Pulmonalarterie [112], andere Modelle arbeiteten mit Rattenherzen oder Schweineherzen. Die Unterschiede der einzelnen Modelle sind hinreichend bekannt. Eine wichtige alternative Nachweismethode zu Prozessen und Veränderungen biochemischer Zusammenhänge in Zellen ist die Anlage von Zellkulturen in vitro.

Mausmodelle haben sich in der Erforschung humaner Erkrankungen bewährt und etabliert. Dies liegt zum einen daran, dass die Erfassung von Daten auf Grund des kurzen Entwicklungszyklus dieser Tieren sehr schnell geht, zum anderen daran, dass Mäuse in ihrer genetischen Ausstattung dem Menschen sehr ähneln, beispielsweise in Größe des Genoms und Anzahl der Gene.

In einer Vorarbeit von Joner et al. wurde bereits die Eignung dieses Modells für die Untersuchung integrinspezifischer Prozesse nachgewiesen. Andere themenverwandte Arbeiten verwendeten Katzenmodelle oder Schweinemodelle [136].

Allerdings erfordert die Verwendung dieser Tiere einen wesentlichen langfristigeren Beobachtungszeitraum und verhindert somit eine rasche Gewinnung eines hohen Datensatzes.

Daher verwendeten wir für diese Arbeit das bereits erprobte Mausmodell.

Einem Teil der Versuchstiere wurde künstlich ein Myokardinfarkt induziert.

Die operative Ligierung des *ramus interventricularis anterior* (RIVA) am Mäuseherz gehört mittlerweile zu den üblichen standardisierten Verfahren zur Untersuchung morphologischer und biochemischer Folgen eines Myokardinfarktes [137, 138]. Wie bei jedem Tiermodell liegt das Augenmerk hierbei darauf, zu beweisen, dass sich als Folge dieser Operation bei den Tieren vergleichbare pathologische Veränderungen ergeben wie beim Menschen.

Die Tiere ohne Myokardinfarkt wurden scheinoperiert. Da sich bei Mäusen im Verlauf von sieben Tagen klare strukturelle Veränderungen erkennen lassen [139] wählten wir ebenso den Zeitraum von 2 und 7 Tagen zur Datenerhebung.

Sowohl den kranken als auch den gesunden Tieren musste nun noch der Integrin α v-Inhibitor appliziert werden, was mittels osmotischer Minipumpen der Firma Alzet geschah. Diese Pumpen wurden in zahlreichen Experimenten erprobt, so beispielsweise bei Arbeiten zur Untersuchung der Wirksamkeit von Betablockern [140] oder ACE-Hemmern [141].

Die Pumpen, wurden subkutan implantiert, wodurch die Substanz kontinuierlich freigesetzt wurde. Im späteren Verlauf der Arbeit wird darauf noch genauer eingegangen.

Die Konzentration der Lösung wird mittels Bioassay im Serum bestimmt, die Inhibition mittels Immunoassay.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der Zusammenhang von Integrinen und einzelner Subtypen auf morphologische Zusammenhänge des Herzens ist bisher teilweise erforscht. Genaue Veränderungen bei pathologischen Prozessen, speziell beim Herzinfarkt sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Dies liegt vor allem auch an der oben beschriebenen Fülle biochemischer Prozesse im Rahmen eines Myokardinfarktes und der konsekutiv entstehenden Herzhypertrophie. Von essentieller Bedeutung für die Zukunft der Therapiemodifizierung bei kardiovaskulärer Prävention wird die Kenntnis genauer pathologischer Mechanismen und Beteiligung einzelner Enzyme sein.

Ziele dieser Arbeit sind die Erforschung der Folgen einer gezielten Inhibierung von Integrin α_v bei Tieren mit Myokardinfarkt mit folgenden Teilprojekten:

- (1) Einfluss auf die Morphologie des Herzgewebes
- (2) Einfluss auf die Pumpfunktion des Herzens
- (3) Einfluss auf Frühmortalität kranker Tiere
- (4) Molekulare Veränderungen der Enzyminduktion und -expression von phosphorylierten Tyrosin-Kinasen und fokalen Adhäsionskomplexen

Für (1) und (2) wurden echokardiographische Aufnahmen am lebenden Objekt und histologische Untersuchungen der Mäuseherzen gemacht. Um die Dynamik der morphologischen und funktionellen Veränderungen erfassen zu können, untersuchten wir Tiere zum einen zwei Tage nach dem Infarkt ereignis beziehungsweise der Scheinoperation, zum anderen nach sieben Tagen.

Die molekularen Untersuchungen (4) wurden mittels Westernblot sowie konfokaler Lasermikroskopie immunhistochemischer Gewebeschnitte durchgeführt. Bei beiden Methoden beschränkten wir uns auf die Auswertung der Proteinexpression nach einem Zeitraum von sieben Tagen.

2.MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Herstellerfirmen für Chemikalien und Antikörper

- (1) Roche, Basel, Schweiz
- (2) Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- (3) Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
- (4) Calbiochem[®], San Diego, U.S.A.
- (5) Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.
- (6) Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.
- (7) Riedel-de-Haën[®], Seelze, Deutschland
- (8) Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
- (9) Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
- (10) Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.
- (11) Biosource, Camarillo, U.S.A
- (12) Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.
- (13) Chemicon International, Inc., Temecula, U.S.A.
- (14) Molecular Probes, Eugene, U.S.A.
- (15) Invitrogen[®] Corporation., Carlsbad, U.S.A.
- (28) B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- (29) Ethicon, Cornelia, U.S.A.
- (30) Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
- (31) Ugo Basile, Comerio VA, Italien
- (32) Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
- (33) AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
- (34) Alza, Palo Alto, USA
- (35) Upstate cell signaling solutions Biotechnology, U.S.A.
- (36) Transduction Laboratories, BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.
- (37) Cell Signaling Technologie, Inc., U.S.A.
- (38) BioSource Europe, Nivelles, Belgien
- (39) Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England
- (40) Alpha Innotech Corporation, San Leandro, U.S.A.

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

Die Zahlenangaben werden bei der weiteren Nennung von Materialien zur Erkennung der Herstellerfirma dienen.

2.1.2 Allgemeine Chemikalien alphabetisch geordnet

Acrylamid 40% (6)

Aluminiumkaliumsulfat (2)

Ammoniumpersulfat APS 10% (1g auf 10ml ddH₂O)

Bis-Acrylamid 2% (N,N'-Methylen-bis-Acrylamid) (6)

BSA Bovines Serum Albumin (3)

Chloralhydrat (2)

DTT (Dithiothreitol) (3)

Diethyl ether extra pure, stabilized (7)

DMSO (Methylsulfoxid) (3)

EDTA (3)

EGTA (3)

Entellan® (2)

Eosin (2)

Esel Normalserum 10% (10)

Ethanol absolut (Klinikapotheke der Universität Würzburg)

Flüssiger Stickstoff

Formalin (3)

Forene® (Isofluran 0,6 %) (5)

Glyzine (3)

Hämatoxylin (9)

HCl

Isopentan

KCl (3)

KH₂PO₄ (3)

Methanol (Klinikapotheke der Universität Würzburg)

NaCl (3)

NaCl-Lösung 0,9% (8)

Na₂HPO₄ (3)
 Natriumjodat (2)
 NaN₃ (Sodiumazide) (3)
 NaOH
 Paraffin
 Paraformaldehyd (3)
 Pikrinsäure,
 Roti®-Histol (9)
 Sirius Red,
 20% SDS (20g SDS/100 ml H₂O) (3)
 Temed (Tetramethyldiamid) (6)
 Tris/EDTA (3)
 Tris-HCl (100mM) (3)
 Triton-X 100 (3)
 Tris-Base (3)
 Tween®20 (3)
 Zitronensäure (2)
 ECL-Reagenz ChemiGlow™ West, (40)
 Bio-Rad Protein-Assay (41)

Die einzelne Verwendung der Substanzen ist in 2.1.3 oder in der Methodik detailliert beschrieben.

2.1.3 Lösungen und Puffer

1. Tris-Triton Lyse Puffer 2%

Triton-X 100	2ml
10 mM EGTA	380 mg
Natriumvanadat (1000x)	200µl
Tris-HCl (100mM)	1,21g
H ₂ O auffüllen auf insgesamt in pH 7,4	100ml

2. PBS (10x) Phosphatpuffer

NaCl	80g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	21,7 g
H ₂ O auffüllen auf insg. In pH 7,4	1000ml

3. PBS (1x) = PBS (10x) verdünnt mit Aqua destillata im Verhältnis 1:10

4. 2% PFA-Lösung

Paraformaldehyd	10g
10x PBS	50ml
dest. H ₂ O	450ml
bei 60°C, pH auf 7,4; bei 4°C aufbewahren	

5. SDS-Sammelpuffer (2x) 2%

SDS 20% (20g/100ml Aqua dest.)	4ml
Tris/EDTA (242mg 0,2 M Tris-Base/10ml + 74mg 0,02 M EDTA/10ml bei pH 8,0)	5ml
Aqua destillata	19ml
Glycerol	12ml
DTT	617mg
Pyronin Y	Einige Tropfen
Insgesamt	40ml

6. Tris-Puffer (1,5M)

Tris/base	181,6g
destilliertes H ₂ O auffüllen auf insgesamt in pH 8,6	1000ml

7. Tris-Puffer (0,5M)

Tris/base	60,5g
destilliertes H ₂ O auffüllen auf insgesamt in pH 8,6	1000ml

8. TBSA-Puffer

NaCl	150 mM
Tris/HCl	20 mM
NaN ₃	0,05%
BSA	1%
pH-Wert 7,6 Aufbewahrung bei 4 °C	

9. TBST (10x)

Tris/base	12,1g
NaCl	58,4g
Tween-20	15ml
Aqua destillata auffüllen auf insgesamt in pH 7,4	1000ml

10. TBST-Puffer

Tris	10mM
NaCl	0,1M
Tween-20	0,1%
Aqua destillata auffüllen auf insgesamt in pH 7,4	

11. Integrin $\alpha\beta 5$ -Inhibitor (Dr. Steiner) (1)**2.1.4 Protease- und Phosphataseinhibitoren für Gewebepräparation**

1. Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Set II (4)
2. Protease-Inhibitor-Cocktail Set III (4)
 - Leupeptin (L 9783): reversibler Trypsin/Cystein-Proteaseinhibitor (3)
 - Aprotinin: Serinproteaseinhibitor (1)
 - Pepstatin A (P 5318): Aspartatproteaseinhibitor (1)
 - P-Aminobenzamidine (A 7148) : Serinprotease-Inhibitor (1)
 - E-64: Papain/Cystein-Protease-Inhibitor (3)
3. EDTA: unselektiver Metalloprotease-Inhibitor (Ca, Mg, Mn) (3)
4. EGTA: selektiver Metalloprotease-Inhibitor (Ca) (3)
5. Natriumvanadat (S 6508): Tyrosinphosphatase-Inhibitor (3)
6. DTT (D 9163) : zur Spaltung von Disulfidbrücken (3)
7. Natriumsäure (NaN_3) : Stabilisator, antibakterielles Agens in Antikörper-Lösungen
8. Ocadaic Acid: Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor (4)
9. PMFS (P 7626): irreversibler Serin-Phosphatase-Inhibitor (3)

Die Substanzen wurden gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.1.5 Antikörper Gefrierschnitte

2.1.5.1 Primärantikörper

- (1) **FAK:** Rabbit (polyklonal) Anti-Mouse FAK, Aufbewahrung bei -20 °C, (11)
- (2) **p-FAK 925:** Affinity purified rabbit polyclonal antibody p-FAK (Tyr 925) , Aufbewahrung bei 4 °C (12)
- (3) **c-Src:** Affinity purified rabbit polyclonal antibody c-Src (SRC 2), Aufbewahrung bei 4 °C, (12)
- (4) **p-Src 418:** Rabbit (polyklonal) Anti-Src [pY⁴¹⁸] Phosphospecific Antibody Unconjugated, Aufbewahrung bei -20 °C, (11)

2.1.5.2 Sekundärantikörper

- (1) **Anti Rabbit IgG:** CyTM2- conjugated AffiniPure F(ab¹)₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C, (10)
- (2) **Anti Mouse IgG:** CyTM2- conjugated AffiniPure F(ab¹)₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), (10) Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C, (10)

2.1.5.4 Aktinfärbung

Phalloidin: Alexa Flour 546 phalloidin,
Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C, (14)

2.1.6 Spezielle Materialien Western Blot

2.1.6.1 Größenmarker

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

Aufbewahrung bei -20°C (39)

(2) **Low-Marker:** Magic Mark Invitrogen Gesamtvolumen 2 µl

Bandenmuster bei 120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20 kDa

Aufbewahrung bei -20°C (15)

2.1.6.2 Primärantikörper

(1) **Integrin β5:** monoklonaler Maus-Antikörper (12), Aufbewahrung bei -20°C, Verwendete
Konzentration 1:1000, lichtgeschützte Aufbewahrung bei 4°C

(2) **c-Src:** monoklonaler Maus-Antikörper (35), Aufbewahrung bei -20°C, Verwendete
Konzentration 1:1000

(3) **FAK:** monoklonaler Maus-Antikörper (36) IgG1, Aufbewahrung bei -20°C
Verwendete Konzentration 1:1000

(4) **p-38:** mouse monoclonal IgG1 Anti-p-38 (A-12): sc-7972, (12),
Aufbewahrung bei 4°C

(5) **Src-PY 416:** Rabbit polyclonal Anti-SRC [pY⁴¹⁶] Phosphospecific antibody, (37),
Aufbewahrung bei -20°C, Verwendete Konzentration 1:1000

(6) **FAK-PY 925:** Rabbit polyclonal Anti.FAK [pY⁹²⁵] Phosphospecific antibody (37) ,
Aufbewahrung bei -20°C, Verwendete Konzentration 1:1000

(7) **p-p38:** Rabbit (polyclonal) Anti-p38 [pTpY180/182 Phosphospecific Antibody,
Unconjugated (38), Aufbewahrung bei -80°C, Verwendete Konzentration 1:1000

(8) **ERK ½:** Rabbit (polyclonal) Anti-ERK1&2 pan Antibody, Unconjugated (38),
Aufbewahrung bei -80°C, Verwendete Konzentration 1:8000

(9) **ERK ½-P:** Rabbit (polyclonal) Anti-ERK1&2 [pTpY185/187] Phosphospecific Antibody,
Unconjugated (38), Aufbewahrung bei -80°C, Verwendete Konzentration 1:1000

(10) **ANP:** Rabbit Anti-Atrial-Natriuretic-Peptide, Affinity Purified Polyclonal Antibody,
(13), Aufbewahrung bei -20°C, Verwendete Konzentration 1:500

(11) GPDH: Mouse Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase monoclonal Antibody, (13), Aufbewahrung bei 4°C, Verwendete Konzentration 1:8000
Inkubationszeit eine Stunde bei Raumtemperatur

2.1.6.3 Sekundärantikörper

(1) Donkey anti-mouse IgG (HRP) monoklonaler Antikörper (12)

(2) Donkey anti-rabbit IgG (HRP) monoklonaler Antikörper (12)

2.1.6.4 WesternBlot Gele und Puffer

(1) Selbst-erstellte 7,5% Gele und Puffer

Running-Buffer

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

Transfer-Puffer

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

Trenngel, 7.5%

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

Sammelgel, 4%

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

(2) XCell SureLock Elektrophoresis Cell™

NuPage-Running-Buffer (15)

NuPage-Transfer-Buffer (15)

Nu-Page 4-12% Bis-Tris Gel (10-12 well) (15)

2.1.7 Geräte und Maschinen

2.1.7.1 Gewebeaufbereitung allgemein

Heizplatte BBA 1, (Grant Boekel, Cambridgeshire, G.B.)

Mini Eppendorf Cups 0,5 ml, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Objektträger Superfrost®-Plus, (Erie Scientific Company, Portsmouth, U.S.A.)

Eppendorf Röhrchen 1,5 ml, 2 ml, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Einmalküvetten REF 67.742, (Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany)

Dounce Kolben, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

Insulinspritzen Omnifix®-F 1ml, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

Nadeln Sterican® 20G, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

pH Messgerät inoLab pH Level 1, (WTW, Weilheim, Germany)

Pico Fuge

Pinzetten

Pipetten Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl, (Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany)

Sonopuls Homogenisator HD 70, (Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, Germany)

Vortex

Waage Kern 440-33, (Gottl. KERN & Sohn GmbH, Albstadt, Germany)

Zentrifuge Universal 32 R, (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany)

Zentrifugenröhrchen 2 ml, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

2.1.7.2 Western Blot

Chemi-Imager™ 5500 chemiluminescence imaging system, (40)

Elektrophoresis Power Supply EPS 301, EPS 601, (39)

Hofer Elektrophoresis Unit SE 600, (39)

PVDF-Membranen (15)

Semiphor Transphor Unit (39)

Spectrophotometer Ultrospec 3000 (39)

XCell II™ Blot Module (15)

2.1.7.3 Histologie

Trockenschrank (Temp. 70 °C konstant) (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)

Gewebeeinbettautomat (Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Deutschland)

Schlittenmikrotom Hn 40 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)

Microtome Blades S22 (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)

Mikroskop Laborlux S (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)

Objektiv Plan 1,6 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)

3CCD Color Video Camera (Sony Corporation, Japan)

Camera Adaptor CMA-D2 (Sony Corporation, Japan)

SigmaScan Pro Image Analysis Version 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, U.S.A.)

2.1.7.4 Gefrierschnitte

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

PH-Messgerät inoLab pH Level 1 (WTW, Weilheim, Deutschland)

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

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

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

Argon Laser 161C-030, Output 488 nm (Spectra-Physics, Mountain View, U.S.A.)

Helium-Neon Laser 1674P, Output 543 nm (JDS Uniphase, San Jose, U.S.A.)

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

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

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

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

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

2.1.7.5 Echokardiographie

Ultraschallgerät Toshiba Power Vision 6000 SSA-370 A, (Toshiba Medical Systems Europe, Zoetermeer, Netherlands) mit 12 MHz Schallkopf

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

2.1.7.6 Allgemeine Software

Stat View Statistikprogramm

Fast Forward Videobearbeitung

2.1.8 Tiere

Mäuse: C57/BL6, 20-25 g, ca. 12 Wochen alt, männlich und weiblich

Integrin α v-Inhibitor-Pumpen (34) (Jackson Laboratories, Bar Harbour, Me)

2.2 METHODEN

2.2.1 Versuchstiere

Als Ausgangsbasis verwendete man gleichartige Mäuse (Typ C57/B6, 20-25 g, ca. 12 Wochen alt, männlich und weiblich), um diesbezüglich gleiche Grundvoraussetzungen zu haben. Um nun die Wirkung des Integrin- α v-Inhibitors (Fa. Roche, Basel) zu untersuchen, gleichzeitig aber andere Ursachen für eventuelle Veränderungen am Mäuseherz auszuschließen, musste man unterschiedliche Gruppen festlegen:

- (1) Eine Ausgangsgruppe ohne Herzinfarkt, die weder DMSO-Lösung noch den Inhibitor erhält. Diese wurde im weiteren Verlauf als **NORMAL** bezeichnet.
- (2) Eine zweite Gruppe ohne Herzinfarkt, die allerdings die Pumpe mit Integrin-Inhibitor eingebaut bekam (vgl. 2.2.1.1). Diese Gruppe half alleinige Effekte der Substanz auf ein gesundes Tier zu untersuchen. Diese wurde **Ctrl-Inh** genannt.
- (3) Eine Gruppe ohne Herzinfarkt, die anstelle des Inhibitors lediglich DMSO/H₂O-Lösung erhielt. Zusätzlich wurde diese Maus ebenso operiert und erhielt eine Kontroll-Pumpe, um diesbezüglich gleiche Voraussetzungen zu schaffen. Diese Tiere hießen **Ctrl-DMSO**.
- (4) Eine Gruppe mit Herzinfarkt (vgl. 2.2.1.2), die eine Integrin-Inhibitor-Pumpe eingebaut bekam. Diese Gruppe war die Entscheidende für die Untersuchung des Effektes der

Substanz bei herzgeschädigten Tieren. Diese bezeichnete man als **MI-Inh**. Da man die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchte, nannte man sie entweder **MI-Inh 2d** (Untersucht zwei Tage nach Herzinfarkt sowie vier Tage nach Pumpen-Einbau) beziehungsweise **MI-Inh 7d** (Untersucht nach sieben Tagen). Diese Einteilung war wichtig für die Bestimmung zeitlicher Veränderungen bei erkrankten Tieren.

- (5) Als letzte und wichtige Vergleichsgruppe gab es noch Tiere, die einen Herzinfarkt induziert bekamen, allerdings keinen Inhibitor, sondern wieder ein DMSO/ H₂O-Gemisch erhielten. So konnte man kranke Tiere mit Inhibitor kranken Tieren ohne Behandlung mit Placebo-Substanz gegenüberstellen. Diese Tiere wurden als **MI-DMSO** bezeichnet und je nach Untersuchungszeitpunkt wieder mit **2d** oder **7d**.

2.2.1.1 Einbau der Integrin α v-Inhibitor-Pumpen

Wie erwähnt erhielten die unter 2.2.1 (2) und (4) genannten Tier-Gruppen eine Substanz, die dazu diente den Integrin α v-Rezeptor zu inhibieren. Dieser Inhibitor, auch bezeichnet als EMD 270179, musste kontinuierlich und in gleichbleibender Dosierung verabreicht werden. Dazu eigneten sich spezielle osmotische Pumpen, die sogenannten **AZLET-PUMP**, hergestellt von der Firma Alza in Palo Alto, USA. Die übrigen Tiere (3) und (5) erhielten eine Scheinoperation mit einer Pumpe, die lediglich ein Gemisch aus DMSO-Lösung und H₂O enthielt. Die Operation dieser Tiere erfolgte zwei Tage vor Induzieren des Myokardinfarkts, um sicherzustellen, dass bereits ein ausreichend hoher Plasmaspiegel der einzelnen Substanzen erreicht wurde. Dieser sollte bei 20 μ mol/l Plasma liegen. Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen erfolgte nach bewährten Methoden [113].

Mit Hilfe dieser osmotischen Miniaturapparate verringerte man die Belastung der Tiere durch ständige Medikamentenverabreichung, beispielsweise durch intramuskuläre Applikation.

Nachdem man nun den Inhibitor mit 0,9% Kochsalzlösung gemäß Herstellerangaben angereichert (100mg/ml) und aufgelöst hatte, füllte man die Pumpe damit an und positionierte diese subkutan, am geeignetsten interskapulär.

Die Pumpen stellten sich wie folgt dar:

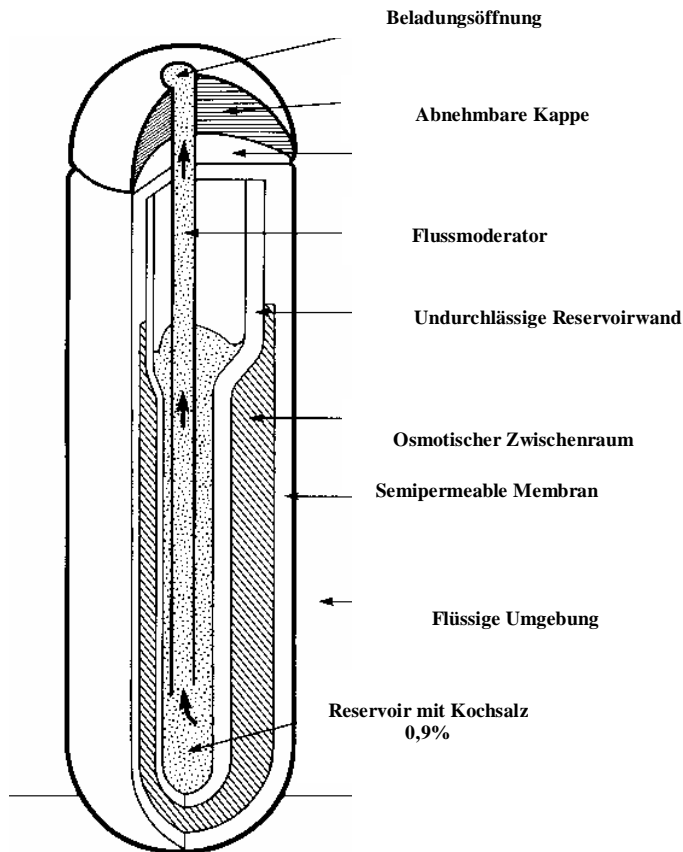


Abb.3
In dieser Abbildung ist der Aufbau
einer osmotischen ALZET-Pumpe
dargestellt.

Auf osmotischem Prinzip basierend erfolgte die Substratabgabe über Gradienten- und Druckveränderungen. Die semipermeable Membran ließ extrazelluläre Flüssigkeit aus der Umgebung passieren, wodurch sich der Druck innerhalb des Raumes zwischen Reservoir und semipermeabler Membran erhöhte und die elastische Wand des Reservoirs komprimiert wurde. Diese Wand verhinderte weiteren Flüssigkeitsaustausch. Die Kochsalzlösung innerhalb der Kammer veränderte sich in der Zusammensetzung nicht. Allerdings wurde durch die Druckerhöhung Inhibitor freigesetzt, und zwar über den Flussmoderator, eine Kanüle G21. Durch den konstanten osmotischen Transfer erfolgte eine kontinuierliche und gleichdosierte Abgabe an Substrat in die freie Umgebung.

2.2.1.2 Induktion des Myokardinfarkte

Die unter 2.2.1 erwähnten Tiere mit MI (Myokardinfarkt) bekamen diese alle künstlich induziert. Dies geschieht zwei Tage nach Pumpenimplantation. Die Tiere wurden per Intubationsnarkose mittels Isofluran betäubt. Dann eröffnete man den Thorax und unterband mittels eines kleinen Fadens (A 7-0 Prolene) den Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie (LCA) [139]. war diese Vorgang erfolgreich (MI > 35%) so galt die Maus als Infarkt tier und wurde je nach Pumpenart der Inhibitor- beziehungsweise DMSO-Gruppe zugeordnet.

2.2.2 Gewebepräparation

2.2.2.1 Aufbereitung des Herzgewebes

Für die Gewinnung der Mäuseherzen tötete man diese mit einer Überdosis an Pentobarbital, wog das Tier (Bodyweight) auf einer Waage (KERN & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland) und eröffnete den Thorax mit einer Schere. Dann präparierte man das Herz heraus, entfernte die Vorhöfe, sowie das Perikard und das perikardiale Fettgewebe. Dann wusch man es in einem Gefäß mit Natriumchlorid (NaCl), um eventuelle Blutrückstände zu vermeiden. Im Anschluss daran wog man das Herz, notierte das Bruttogewicht und gab es dann in ein Schälchen mit Trockeneis (flüssiges N₂). Dann entfernte man knapp über der Herzspitze zwei Querschnitte, die jeweils circa 2ml breit waren. Einen Ring bewahrte man in einem verschlossenen Behälter mit 20%igem Formalin für die histologische Untersuchung auf (siehe 2.2.3) , den anderen frof man für die Herstellung der Gefrierschnitte bei -80 °C (siehe 2.2.4) ein.

Das restliche Gewebe, das zuvor bei -80 °C aufbewahrt wurde, wog man erneut und versetzte es daraufhin mit 2ml Puffer Triton-X 2% pro 100mg.

Tris-Triton-Puffer:

Triton-X 100	2ml
10 mM EGTA	380 mg
Natriumvanadat (1000x)	200µl

Tris-HCl (100mM)	1,21g
H ₂ O auffüllen auf insgesamt	100ml

Zusätzlich gab man dann noch die unter Punkt 2.1.2 aufgeführten Protease- und Phosphataseinhibitoren außer Ocadaic Acid und PMSF im Verhältnis 1:100, das heißt 20µl pro 100mg beziehungsweise 20µl pro 2 ml Gesamtpuffer, hinzu. Die Protease- und Phosphataseinhibitoren sollten die Proteindegeneration im Gewebe verhindern beziehungsweise vermindern.

Im folgenden Verlauf wurden Zentrifugenröhrchen vorbereitet, beschriftet und auf Eis gelagert. Die Puffermenge wurde zusammen mit dem Gewebe in einen Glaskolben (Dounce Homogenizer) gegeben und auf Eis circa eine Minute homogenisiert, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar sind. Die Kühlung durch das Eis verminderte die im Kolben entstehende Reibungswärme. Danach legte man die Probe 20 Minuten auf Eis. Schließlich pipettierte man die Flüssigkeit in das 2ml fassende rote Röhrchen und zentrifugierte dies bei 14000 Umdrehungen und 4°C 10 Minuten lang.

800 µl des Überstandes (Supernatant S1) im roten Gefäß wurden dann, nachdem man zuvor 50µl in einen Mini-Eppendorf-Cup für den Bradford-Assay transferiert hatte (siehe 2.2.5.1), in ein blaues Röhrchen umgefüllt und dort zu gleichen Teilen mit 2xSDS-Sample Puffer versetzt und eingefroren. Das übriggebliebene Supernatant wurde verworfen.

2xSDS-Sample Puffer 2%:

SDS 20% (20g/100ml Aqua dest.)	4ml
Tris/EDTA (0,2 M Tris-Base + 0,02 M EDTA)	5ml
Aqua destillata	19ml
Glycerol	12ml
DTT	617mg
Insgesamt	40ml

Das Zentrifugat (Pellet P1) im roten Behälter wurde mit 1ml Triton-Puffer aufgefüllt und über Ansaugen mit einer Kanüle der Größe G23 und Spritze mechanisch zerkleinert. Anschließend

wurde eine erneute Zentrifugation wie zuvor beschrieben durchgeführt. Den erneut entstandenen Überstand verwarf man und erhielt nun ein Pellet, das die vorher rötliche Herzfarbe verloren hatte und sich weiß präsentierte. war dies nicht der Fall, so wiederholte man den Vorgang. Dieses vermischte man nun mit 1xSDS-Sample Puffer (= 2xSDS-Sample Puffer 1:1 verdünnt mit destilliertem H₂O), das im Verhältnis 1:4 zum Ausgangsvolumen hinzugefügt wurde, und löste das restliche Gewebe abermals mechanisch mit einer Kanüle. Der Prozess war abgeschlossen, wenn in dem Röhrchen keine festen Gewebebestandteile mehr enthalten waren. Die gewonnen Proben S1/P1 wurden nun bei 95°C gekocht, und zwar je nach Volumen für 3 (< 0,5ml) oder 5 Minuten (> 0,5ml). Dann froren sie bei -80°C ein, um sie zu konservieren, oder verarbeitete sie sofort weiter (siehe 2.2.5)

2.2.2.2 Weitere Gewebepräparation

Für die Erhebung weiterer statistischer Daten verwendete man außerdem noch das Lungengewebe, das man dem Tier entnahm und wog, sowie den Tibiaknochen, den man freipräparierte und mit einem Lineal der Länge nach ausmaß. Des Weiteren erhob man das Geschlecht der Maus. Zusammen mit dem Körpergewicht (siehe 2.2.1.1) trug man die Daten in eine Tabelle ein.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Anfertigung der Schnitte

Bei der histologischen Untersuchung wurden insgesamt 55 Tiere aus allen Gruppen untersucht. Die einzelnen genauen Zahlenangaben sind unter 3.1.1 aufgeführt.

Um die bei der Präparation der Mäuseherzen gewonnen Gewebeschnitte für die histologische Auswertung verarbeiten zu können, musste man diese vorerst in einer eigens dafür vorgesehen Maschine (Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Deutschland) entwässern. Diese Apparatur bestand aus neun Gefäßen unterschiedlicher Flüssigkeiten, die unter einer rotierenden Anrichte befestigt waren, an der einzelne Platten frei schwebten, die jeweils einen Behälter verschließen konnten. Diese enthielten der Reihenfolge nach 70, 80 beziehungsweise 100 % Ethanol, einmal ein Xylol-Ethanol-Gemisch zu gleichen Teilen, zweimal reines Xylol, einmal ein Xylol-Paraffin-Gemisch und zuletzt zwei Krüge mit Paraffin zu je 60 Grad.



Abb.4 Maschine von außen während Entwässerungsvorganges

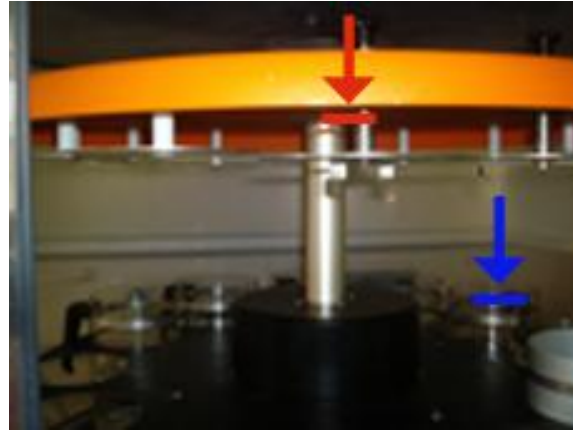


Abb.5 Maschine von innen; Pfeil rot Aufhängevorrichtung; Pfeil blau Tauchgefäße

Für die Prozedur musste man nun anfangs die Proben den formalinhaltigen Gefäßen entnehmen und unverzüglich in kleine weiße Kassetten aus Plastik geben. Diesen fügte man einen Merktzettel bei mit einer ausreichenden Beschreibung des Präparats, um mögliche Verwechslungen der einzelnen Exemplare zu vermeiden.

Im Anschluss daran konnte man nun die einzelnen Kassetten in ein für die Maschine angefertigtes Metallsieb legen, der am Rotator befestigt wurde. Nun lies man diesen jeweils 30 Minuten in die einzelnen flüssigkeitsgefüllten Behälter tauchen. Im ersten Paraffingefäß sollte die Verweilzeit bis zu 60 Minuten betragen. Sobald die Kassetten mit den Gewebeproben in das letzte Gefäß gelangt waren, entnahm man diese der Entwässerungsmaschine. Im nächsten Schritt gab man die einzelnen Proben in eine vorbestehende Schablone, um somit die Paraffinblöcke anzufertigen, die für die Gewinnung der histologischen Schnitte nötig waren. Dafür musste man vorerst 80°C heißes Wachs in die Metallform gießen und sofort den Gewebering mit einer Pinzette einfügen. Auf die noch weichen Blöcke legte man die anfangs angefertigten Merktzettel.

Nun lies man die wachsgefüllte Schablone 24 Stunden auskühlen und sich erhärten.

Hatten die Paraffinblöcke dann die richtige Konsistenz erreicht, so konnte man diese aus der Schablone nehmen, auf eine Kühlplatte mit -20 Grad legen und zwanzig Minuten abwarten. Mit dem Schlittenmikrotom Hn40 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland) wurden die Blöcke geschnitten



**Abb.6 Schlittenmikrotom Hn40 mit
Einspannvorrichtung für Klinge (blauer Pfeil) und
Befestigung für Paraffinblock (grüner Pfeil)**

Zuerst spannte man eine Klinge (Microtome Blade) der Klasse S22 (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan) in die Vorrichtung (siehe blauer Pfeil Abbildung 6). Dann erwärmte man den gekühlten Block an der beschrifteten Seite mit einem erhitzten Messer und befestigte diesen auf einem Holzklötzchen, den man wiederum an der Mikrometerschraube anbrachte (siehe grüner Pfeil Abbildung 6). Nun stellte man die Skala auf 50 μm ein und verschob so den Block langsam in Richtung Mikrotom. Sobald jener auf einer Ebene mit diesem war, schnitt man 10 Scheiben ab. Dann verstellte man die Schraube auf 5 μm , schnitt noch zweimal und nahm die nächsten Schnitte für die Auswertung. Dazu musste man die Gewebeprobe zuerst in einen Behälter mit 20 °C warmen Wasser geben. Dabei konnte man einen Pinsel zum Transport des dünnen Schnittes nehmen. Dann zog man diesen in einem Wasserbad mit 44 Grad auf einen Objektträger aus, von denen man auf diese Weise vier Stück anfertigte, zwei davon mit jeweils zwei Gewebeprobe. Hatte man so nun alle Paraffinblöcke verarbeitet, gab man die Objektträger in einen Trockenschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) mit einer konstanten Temperatur von 70°C.

2.2.3.2 Färbung der Gewebeschnitte

2.2.3.2.1 Grundlagen

Die am häufigsten verwendeten Arten der Gewebefärbung sind die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) und die Pikrinsäure-Färbung (PSR), die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzen:

HE-Färbung:

(1) Hämalan nach Mayer: auf 5000ml Aqua destillata

6 g	Hämatoxylin	Firma Roth	Art. 38162
1g	Natriumjodat	Firma Merck	Art. 6525
250g	Aluminiumkaliumsulfat	Firma Merck	Art. 1.01042
250g	Chloralhydrat	Firma Merck	Art. 1.02425
5g	Zitronensäure	Firma Merck	Art. 1.00244

Die einzelnen Reagenzien löste man der Reihe nach in H₂O auf und gab sie dann dem Ansatz hinzu. Dann lies man die Flüssigkeit mindestens vier Wochen im offenen Gefäß mit perforiertem Paraffinverschluss reifen. Wichtig war es den Behälter dunkel zu lagern.

(2) Eosin: auf 100ml Aqua destillata

1g	Eosin	Firma Merck	Art. 1.5935
----	-------	-------------	-------------

PSR-Färbung:

90ml	Pikrinsäure
10ml	Sirius-Rot

2.2.3.2.2 Gewebefärbung

Nun färbte man mit den hergestellten Flüssigkeiten die einzelnen Objektträger ein, um das µm-dicke Gewebe besser darstellen zu können. Dazu verwendete man je einen Objektträger mit einem Präparat und einen mit zwei und versetzt diesen jeweils mit einem HE-Gemisch oder mit PSR. Man gab die beiden gleichanzufärbenden Gewebeträger in eine dafür vorgesehene Halterung.

Zuerst sollte man die Objekte mit Xylol, sowie in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinieren, um eine bessere Farbaufnahme des Gewebes zu ermöglichen. Dann spülte man noch kurz mit Aqua destillata nach.

(1) HE-Färbung

Nun gab man den Behälter 15 Minuten lang in ein Hämalun-Reagenz und spülte anschließend zehn Minuten unter fließendem kaltem Wasser nach.

Dann färbte man drei Minuten mit Eosin gegen und tauchte die Gläser noch einmal kurz in Aqua destillata, sowie zweimal in 100% Alkohol.

Zum Abschluss lies man die Proben noch dreimal fünf Minuten in Xylol-Lösung durchziehen.

(2) PSR-Färbung

Ähnlich wie bei der HE-Färbung hielt man die beiden anderen Objektträger nach dem Entparaffinieren 30-40 Minuten in ein Reagenz mit PSR, spülte kurz in Aqua dest. nach und lies dann ebenso eine dreimal fünfminütige Xylol-Reihe folgen.

Die nun so angefärbten Schnitte legte man auf eine Kartonage und lies sie ungefähr einen halben Tag trocknen. Im weitem Verlauf legte man dann auf die einzelnen Gewebeschnitte ein Deckgläschen, das man mit einem speziellen Klebstoff (Entellan oder Eucid) befestigte. Die Präparate lies man nun noch einmal 24 h trocknen. Dann konnte man die Gewebeschnitte auswerten (siehe 2.2.3.3)

2.2.3.3 Auswertung und Ausmessung der Schnitte

Nun konnte man die einzelnen Gewebeschnitte unter einem Mikroskop beurteilen. Dabei dienten die unterschiedlichen Färbungen verschiedenen Bewertungsmöglichkeiten. Während die HE-Färbung zur allgemeinen morphologischen Begutachtung diente, benötigte man die PSR angefärbten Schnitte vor allem zum Ausmessen der Infarktgröße, da das infarzierte Herz sich im Gegensatz zum gesunden Restgewebe nicht rot, sondern gelb anfärbte.

Um nun genaue Angaben über die unterschiedlichen Gewebeproben zu erhalten, verwendete man ein Mikroskop, z.B. Laborlux S mit einem Objektiv 1,6 Plan (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland), das zusätzlich mit einer Kamera (3CCD Camera und Adapter) (Sony

Corporation, Japan) versehen war. Über ein daran angeschlossenes Computersystem konnte man mithilfe des Programms SigmaScanPro (Jandel Scientific, San Rafael, U.S.A.) softwaregesteuert den Schnitt als digitales Bild bearbeiten und verschiedene Flächen und Strecken berechnen. Dies sei an folgendem Beispielbild erläutert.

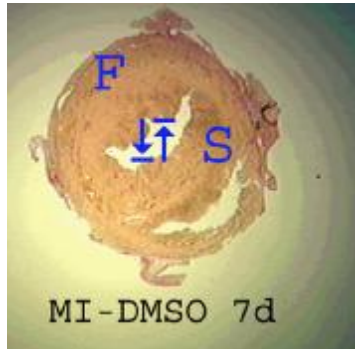


Abb.7 MI-DMSO nach 7 Tagen
Histologie

Man erkennt hier einen histologischen Schnitt, der nach oben beschriebener Methode angefertigt wurde und mit PSR angefärbt ist. Man erkennt schön die einzelnen Herzabschnitte, beide Kammern – die rechte rechts unterhalb des Septums S, die linke zwischen Septum und freier Wand des linken Ventrikels F. Das Lumen des linken Ventrikels ist mit den beiden Pfeilen markiert. Die Strecken werden im rechten Winkel ausgemessen. Das heißt man beginnt zum Beispiel bei der Bemessung der freien Wand am äußeren Punkt, zum Beispiel an der Oberkante des Fs und misst dann senkrecht dazu eine Gerade durch die Wand. Die erhaltenen Werte trägt man in ein Statistikprogramm ein, und zwar aufgeteilt nach verschiedenen Kategorien, so wie in folgendem Beispiel erläutert:

Tag	Gruppe	Septumbreite	Freie Wand	Myokardinfarktgröße	LV Fläche	LV Umfang
2. Tag	MI+Inhibitor	0,7 mm	1,0 mm	30%	23mm	13mm

Anschließend erfolgte über diese Software auch die Auswertung der Messergebnisse (siehe 2.2.6)

2.2.4 Proteinanalyse

Die proteinhaltigen Materialien, deren Auftrennung in großmolekulare (P1) und kleinemolekulare (S1) Bestandteile unter 2.2.2 beschrieben wurde, wurden nun in folgendem Verlauf analysiert und gelelektrophoretisch untersucht. Des Weiteren wurden antikörperbeschichtete Gefrierschnitte erstellt, die Proteinexpression darstellen sollten.

2.2.4.1 Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

M.M. Bradford entwickelte im Jahre 1976 eine Methode zur schnellen und einfachen Proteinkonzentrationsbestimmung. Hierbei bilden sich zwischen Aminosäuresresten, speziell Arginin-Anteilen, und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 Komplexe. Dies führt zu einer Blaufärbung der Lösung. Mit einem Photometer kann man nun bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ je nach Höhe der Proteinkonzentration die Extinktion der Blaufärbung bestimmen. Allerdings muss man vor jeder erneuten Messung eine Standardkurve ermitteln.

Hierzu erstellte man Referenzwerte aus bekannten Proteinkonzentrationen, die man mit einer Farbstofflösung (BioRad™), dem Bradford-Reagenz in Verbindung brachte. Zuvor musste dieses Bio-Rad-Protein Assay 1:5 durch Zugabe von destilliertem H₂O verdünnt werden. Dann gab man jeweils 1 ml davon zusammen mit 2 μl Protein in eine Einmal-Küvette. Man verwendete bekannte Konzentrationen von 2,5; 5,0; 7,5; und 10,0 μg Protein/ μl . Durch die Mischung entstand der anfangs geschilderte Farbumschlag, der unterschiedliche Extinktionen bei 595nm ergab. Diese trug man in einem Diagramm auf Millimeterpapier auf und zwar auf der x-Achse die Extinktion, auf der y-Achse die Proteinkonzentration in $\mu\text{l/ml}$. Die unterschiedlichen Werte wurden durch eine Ausgleichsgerade in lineare Verbindung gebracht. Mit Hilfe dieser Eichgerade konnte man nun bei unbekanntem Proteinkonzentrationen durch gleichartiges Procedere anhand der photometrisch gemessenen Extinktionen die jeweilige Menge an Protein bestimmen. Wichtig war bei dieser Vorgehensweise, die Lösungen gut mittels eines Vortex zu durchmischen, um den genauen Farbumschlag zu erhalten.

Durch einen Vergleich der Messwerte mit der Eichkurve konnten nun die unbekanntem Proteinkonzentrationen nach dem Lambert-Beer-Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$) ermittelt werden. Diese Berechnung erfolgte automatisch durch das Photometer. Da pro Ansatz 2 μl Proteinlösung zugegeben wurde, mussten die Ergebnisse noch durch 2 geteilt werden. Mit einer Zielvorgabe von 32 μg Protein pro Geltasche wurde anschließend das Ladevolumen für die Gelelektrophorese berechnet.

Somit konnten die später für die Auftrennung der Proteine in Gelen nötigen Volumina mittels Bradford-Assay berechnet werden.

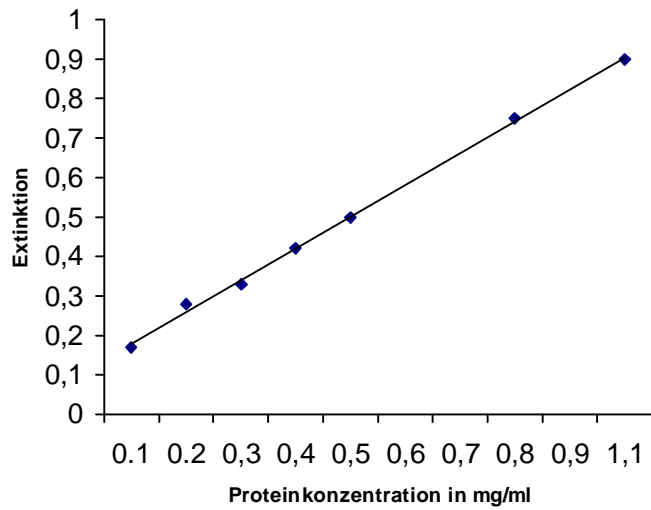


Abbildung 8 Standardkurve

2.2.4.2 Gefrierschnitte - Immunhistologie

2.2.4.2.1 Anfertigung der Schnitte

Die immunhistologische Darstellung des Herzgewebes diente der bildlichen Darstellung der einzelnen Proteine mittels Antikörperbeschichtung.

Hierzu verwendete man die unter 2.2.2.1 gewonnenen Herzringe, die nicht für die Histologie benötigt wurden und bei -80°C konserviert wurden.

Hieraus fertigte man nun ähnlich der Histologie Schnitte, die mit Hilfe eines Kryotoms (CM 1850, Leica Microsystems) hergestellt wurden, eines speziellen Messers. Um die hochsensiblen Proteinstrukturen des Herzgewebes nicht zu zerstören, musste dieses Messer bereits 4-5 Stunden vor Beginn des Schneidens auf -25°C vorgekühlt werden. Die Herzringe gab man auf einen Objektträger, fixierte sie mittels eines Gewebeklebstoffes (Tissue-Tec) und befestigte den Glasträger innerhalb des Kryotoms. Das Gewebe musste circa 30min innerhalb des Gerätes verweilen, um dort die oben genannte Umgebungstemperatur zu erreichen. Wurde die passende Temperatur erreicht, so schnitt man den Herzring in $7\ \mu\text{m}$ -dicke Scheiben, die man sogleich auf einem sauberen Objektträger übertrug. Diesen sollte man ordentlich beschriften, um Verwechslungen des Herzgewebes zu vermeiden. Die so gewonnenen Schnitte wurden dann entweder bei -20°C gelagert, oder zur sofortigen Weiterverarbeitung 20 Minuten luftgetrocknet und auf Raumtemperatur erwärmt.

2.2.4.2.2 Aufbereitung der Schnitte und Beschichtung mit Antikörpern

Die so hergestellten Schnitte wurden für 15 Minuten in einen Behälter mit 2% PFA-Lösung getaucht, was zur Fixierung der Schnitte dient.

Anschließend entnahm man die Objektträger. Um noch vorhandene lösliche Proteine aus dem Herzgewebe zu extrahieren stellt man die Schnitte noch für 20 Minuten in einen Behälter mit 0,1 % Triton Lösung. Abschließend gab man die Objektträger noch in eine Schale mit TBS-Lösung, um sie vor dem Austrocknen zu bewahren. Dann gab man die Schnitte einzeln in eine Wanne, die mit saugfähigem Papier ausgelegt war.

Ziel war es nun mittels Beschichtung des Gewebes mit Antikörpern, die gegen spezielle Komponenten des Herzgewebes gerichtet waren, deren Menge in den unterschiedlichen Mäuse-Gruppen darzustellen. Dazu benötigte man einen Primär-Antikörper, dessen antigene

Bindungsstelle am Kardiomyozyt liegt, und einen Sekundär-Antikörper, durch den der Primär-Antikörper zur Darstellung gebracht wurde. Dies basiert auf einer Bindung dessen an die Fc-Domäne des ersten Antikörpers. Der zweite Antikörper ist fluorchromkonjugiertem (Farbstoff Cy2), wodurch die Primär-Antikörper-Antigen-Komplexe zum Leuchten gebracht werden.

Da es sich bei den Zweit-Antikörpern um Antikörper bestimmter Spezies, nämlich Hase oder Hamster handelt, beschichtete man das Herzgewebe zuerst für 1 Stunde mit nicht-fluorchromkonjugiertem Normalserum (10%-iges Normalserum, 100µl) dieser Tiere, um unspezifische Kreuzreaktionen des Sekundär-Antikörpers zu vermeiden. Es könnte sonst nämlich passieren, dass der Sekundär-Antikörper auch mit anderen Komponenten des Gewebes reagiert, die nicht mit dem Primär-Antikörper beschichtet sind, und somit unspezifische Bindungen und ein verfälschtes Signal entstehen.

Diese Prozedur geschieht, nachdem der Herzschnitt mit einem speziellem Klebestift umgeben wurde.

Wenn auf diese Weise mögliche Antikörper-Bindungsstellen blockiert waren, beschichtete man das Präparat mit 100µl des Primär-Antikörpers (1:20 verdünnt mit TBSA) und lies dies über Nacht bei 4°C stehen. Zur Vermeidung eines möglichen Austrocknens benetzte man das Papier in der Wanne mit destilliertem Wasser und umhüllte alles mit Alufolie.

Um die nichtgebundenen Primär-Antikörper auszuwaschen, spülte man am nächsten Tag die Wanne dreimal mit jeweils 100µl TBSA-Lösung für je 5 Minuten aus.

Nun beschichtete man die Schnitte mit 100µl des fluorchromkonjugierten Sekundär-Antikörper, der im Verhältnis 1:500 mit TBSA verdünnt war.

Abermals wusch man die Wanne dreimal mit 100µl TBSA-Lösung für je 5 Minuten aus, diesmal, um die nichtgebundenen Anti-Antikörper zu entfernen.

Anschließend wurden die Gewebe noch 30 Minuten mit 100µl Phalloidin (1:10), einer Aktinfärbung versetzt. Dies diente dem Nachweis der Kardiomyozyten an sich. Nach diesem Vorgang wurde das Gewebe noch einmal 3 mal 5 Minuten lang mit je 100 µl TBSA-Lösung gewaschen.

Allgemein ist zu beachten, dass auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Farblösungen immer im abgedunkelten Raum gearbeitet werden sollte, und dass die Schnitte während der Inkubation mit Alufolie umhüllt werden müssen.

Zum Abschluss trocknete man die Schnitte 24 Stunden bei Raumtemperatur, nach dem man sie mit einem Deckgläschen versiegelt hatte, die mittels eines Klebstoffes (Prolong Antifade) befestigt wurden. Schließlich umgab man das Ganze noch mit Nagellack. Dies diente alles der

längeren Haltbarkeit der Präparate, da dadurch Austrocknung und Verblässung der Farbstoffe verringert wurden.

Die Schnitte konnte man nun bei 4°C in einem geschlossenen Behälter lichtgeschützt aufbewahren.

2.2.4.2.3 Analyse der hergestellten Gefrierschnitte mittels confocaler Lasermikroskopie

Zur Analyse der fertiggestellten Gefrierschnitte bedienen wir uns eines confocalen Lasermikroskopes und einer dazu passenden Computersoftware. Durch den Laser wird hierbei mit energiereichen Strahlen einer bestimmten Wellenlänge der Fluoreszenzfarbstoff punktförmig in einer ausgewählten Ebene angeregt. Dieser Farbstoff emittiert nun energieärmere Strahlung, die von einem Detektor aufgefangen, in Informationen umgewandelt und an eine Bildbetrachtungssoftware versendet wird. Mithilfe von Spiegeln kann der Laser an jeden beliebigen Punkt des Gewebes gelenkt werden. Streustrahlung, also Strahlung, die außerhalb der gewünschten Ebene liegt, wird durch den Einsatz von Lochblenden unterdrückt. Die Ziele dieser Methode sind die Lokalisation ausgewählter Zellbestandteile, der Vergleich verschiedener Fluoreszenzintensitäten eines ausgewählten Zellbestandteils bei unterschiedlichen Mausgruppen und die Dokumentation der Ergebnisse mittels digitaler Fotos. Um die Leuchtintensität vergleichen zu können, ist es zum einen notwendig, zwischen Fertigstellung und Untersuchung der Schnitte den gleichen Zeitabstand einzuhalten und zum anderen wichtig, eine Serie eines ausgewählten Zellbestandteils am gleichen Tag zu untersuchen und fertigzustellen. Um weiterhin Vergleichbarkeit zu ermöglichen, muss eine passende Einstellung der Detektorempfindlichkeit (Gain) für jeden Antikörper gefunden und im Laufe einer Serie beibehalten werden. Dazu kann man das Gewebe mit einer geringen Auflösung und einer kurzen Scanzeit an einer Teststelle durchsuchen. Da es mit dem confocalen Lasermikroskop möglich ist verschiedene Schichten des Gewebes zu scannen, ist es bedeutend während einer Serie eine ausgewählte Schicht beizubehalten. Es empfiehlt sich, jeweils die Schicht mit der höchsten Signalintensität für den Aktinfarbstoff Phalloidin zu wählen. Dazu bedient man sich eines Motors, der es ermöglicht den Mikroskopisch genau auf die gewünschte Höhe zu verstellen. Zur Dokumentation wird die erwünschte Gewebeschicht mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel, der ermittelten Gain-Einstellung, einer festgelegten Scanzeit und einer festgelegten Lochblendengröße gescannt und die erhaltenen Bilder korrekt bezeichnet auf Festplatte abgespeichert.

Die so erstellten Bilder kann man nun anhand ihrer Antikörperbeschichtung und der daraus resultierenden Intensitäten der Fluoreszenz auswerten und mögliche Unterschiede in der Expression einzelner Proteinfractionen erkennen. Die gebundenen Proteinfractionen zeigen sich in einer Zunahme der Grünfärbung des Präparates, bei der Rotfärbung handelt es sich um Phalloidin-gebundenes Aktin.

2.2.4.3 Western Blot

Der Western Blot dient der elektrophoretischen Auftrennung der unter 2.2.2 gewonnen Proben (S1/P1) nach ihrer Größe (in kD). Dazu benötigt man 20µl der Proben, gelöst in SDS-Puffer. Zur Durchführung dieser bewährten Methode benötigt man Trenngel und Sammelgel. Wir benutzten 7,5%-ige Gele. Diese Konzentration entsteht in Abhängigkeit von der verwendeten Menge an Acrylamid und BIS-Lösung. Je nach Konzentrationen entstehen veränderte Bedingungen für die Proteine, es entsteht ein dreidimensionales System mit unterschiedlicher Porengröße und Durchlässigkeit abhängig von der Molekülgröße.

Mit obiger Konzentration konnten wir Proteine in einem Größenbereich von 3 bis 220 kD gut untersuchen.

Für die Herstellung von zwei Gelen benötigte man destilliertes Wasser (16ml), 11,3 ml des bereits erwähnten 1,5M TRIS-Puffers, 280 µl 20% SDS-Lösung, 10,5ml 40% Acrylamid-Mix, 4,1 2% BIS-Lösung, 14µl TEMED und 315 µl 10% APS. Dieses Gel ist die entscheidende Komponente zur Auftrennung der Proben in seine einzelnen Proteinfractionen.

Man goss nun die flüssige Trenngel-Lösung in eine Vorrichtung aus zwei Glasplatten, die senkrecht fest fixiert waren. Die Platten mussten zuvor unbedingt mit 70%-igem Ethanol gereinigt werden. Nach 45 Minuten sollte das Gel hart sein. Das umgebende Wasser konnte verworfen werden und nun konnten mittels eines speziellen Kamms Taschen erzeugt werden.

Dazu füllten wir den restlichen Hohlraum mit Sammelgel auf. Dieses stellten wir aus 9ml destilliertem Wasser, 1,75ml 0,5M TRIS-Puffer, 90ml 20% SDS-Lösung, 1,8ml 40% Acrylamid-Mix, 1,05ml 2% BIS-Lösung, 14µl TEMED und 210µl 10% APS her. Dieses Gel dient der Fokussierung und der Polarisierung der einzelnen Proteinfractionen.

Nach 15 bis 20 Minuten konnte der Kamm entfernt werden, die Taschen wurden mit Laufpuffer aufgefüllt.

Die Kombination aus beiden Gelen bildet die SDS-Page, die der Auftrennung der Proteine dient. Dabei dient das negativ geladene SDS der Anlagerung an die Proteine in Abhängigkeit zur jeweiligen Proteingröße.

Über ein senkrecht dazu angelegtes elektrisches Feld konnten nun die Proteinfractionen aufgetrennt werden. Dabei benötigte man eine Spannung von 200V und 9 mA über 16 Stunden. Ein Protein wandert umso weiter, je kleiner es ist.

Dieser Aufbau ermöglichte es, uns einen Überblick über vorhandene Proteine und Bestandteile zu verschaffen.

Weiterhin ist es wichtig einen Größenmarker nebenher laufen zu lassen. Dieser diente der Einteilung der Proteinfractionen nach ihrer Größe und als Orientierungswert. Es ergaben sich dann beispielsweise folgende Abbildungen.

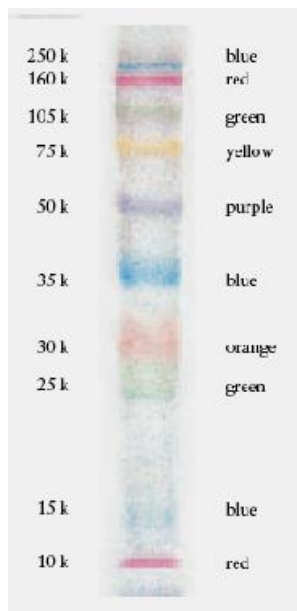


Abbildung 9

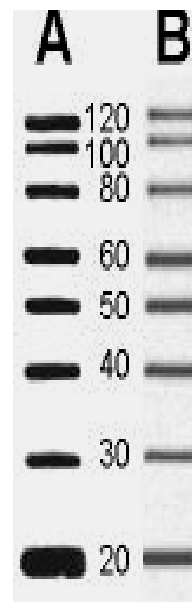


Abbildung 10

Für die Anfertigung der Abbildungen verwendeten wir vorgefertigte Gele der Firma Invitrogen (NuPage). Dieses Gel hatte den Vorteil, dass es aus unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 4 und 12% bestand, und somit eine hervorragende Auflösung und Darstellung ermöglichte. Die Box dazu war ebenso vorgegeben (XCell *SureLock* Elektrophoresis Cell™). Hier füllte man die freien Kammern mit speziellen NuPage-Puffern auf. Die Spannung zur Elektrophorese betrug ebenso 200V bei 80mA und die Auftrennung dauert 90 Minuten.

Die aufgetrennten Fraktionen mussten nun auf eine Membran transferiert werden. Dabei blieb das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Man verwendete PVDF-Membranen; ausschlaggebend für den Transfer war auch hier die angelegte Spannung. Diese Membranen wurden zuvor in Methanol und Transfer-Puffer eingelegt.

Bei den selbst hergestellten Gelen benutzten wir hierzu das Semidry-Transfer-Verfahren mit einer Semiphor Transpher Unit (39). Wichtig war hierbei, sowohl das Gel als auch die übrigen Lagen, wie Filterpapier und Schaumstoffschichten, gut mit Transfer-Puffer zu befeuchten.

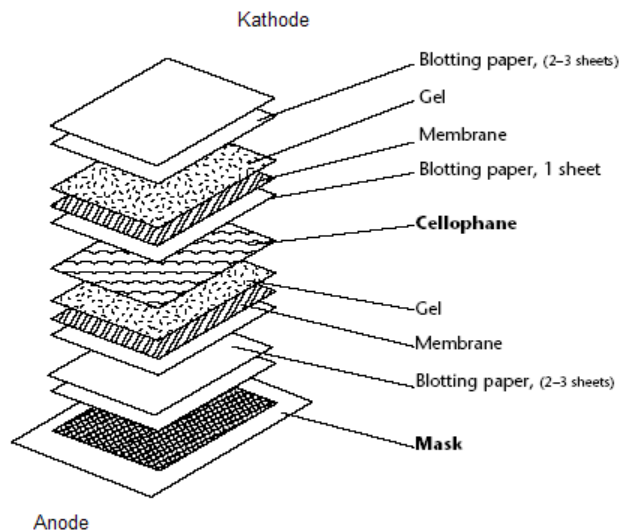
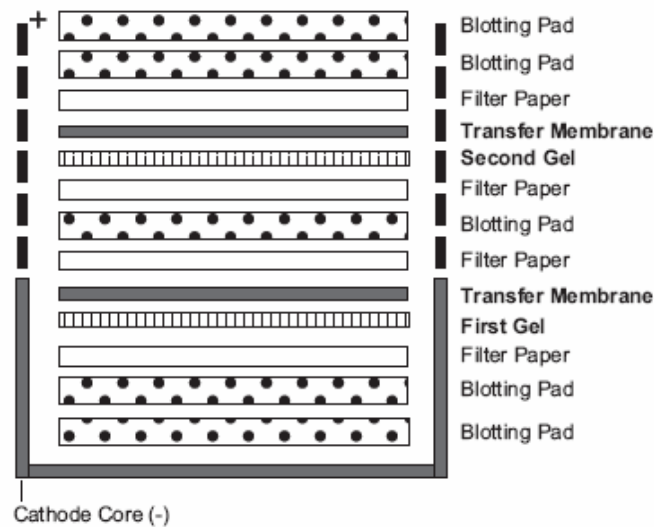


Abb. 11 Semiphor Transpher Unit von Amersham [163]

Dann legte man eine Spannung von 50 Volt über 90 Minuten und 150mA an.

Bei den Fertig-Gelen verwendete man ein spezielles Blot-Modul, passend zu dem vorgefertigten Elektrophorese-System von Invitrogen. Dieses System bestand ebenso aus Filterpapier, Schaumstoffauflagen, Gel und Membran. Die genaue Anordnung der Membranen wurde der Anleitung der Herstellerfirma entnommen.

Hier verwendete man als Transferpuffer wieder einen der Firma Invitrogen. Das System bezeichnete man als WetTransfer. Man legt eine Spannung von 30 Volt bei 230 mA über 60 Minuten an.



**Abbildung 12 Anordnung der Schichten beim WetTransfer
im XCell II Blot-Module™ von Invitrogen®[164]**

Zur Detektion der Proteinfractionen benötigte man eine Kombination aus Erst- und Zweit-Antikörpern.

Die freien Bindungsstellen wurden zuvor auf der Membran mit 2%-igem BSA und 10%-iger Milch geblockt. Dies war nötig, um zu vermeiden, dass der Primärantikörper an unspezifische freie Bindungsstellen ging und somit das Ergebnis verfälschte.

Dann wurden die Blots über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in BSA und 5%-iger Milch gelöst.

Dieser band an die uns interessierenden Proteine Src, Src-PY, FAK, FAK-PY, ANP, GPDH und Integrin $\beta 5$. Anschließend wurde die Membran mit TBST dreimal für 10 Minuten gewaschen.

Daraufhin beschichtete man die Membran mit einem Zweitantikörper. Dieser war mit dem speziellen Enzym assoziiert HRP (horse raddish peroxidase). Dieses Enzym diente der Bildgebung, indem es geeignete Substrate umsetzte und anschließend durch eine Digitalkamera dargestellt werden konnte. Dieses Substrat hieß Chemiglow, zusammengesetzt aus einer Wasserstoffperoxid- und einer Luminol-Lösung. Die Reaktion aus Zweitantikörper und Substrat lies die Banden sichtbar werden.

2.2.5 Herzechokardiographie

Für die Gewinnung der Daten zu Herzkontraktion und -physiologie verwendete man ein Ultraschallgerät mit einer Frequenz von 12 MHz und zeichnet die Bewegungsabläufe auf einer Videokassette auf:



Abb.13 Ultraschallgerät mit speziellem Schallkopf (roter Pfeil)

Echokardiographische Evaluation von strukturellen und funktionellen Veränderungen am Mäuseherzen ist mittlerweile in der Forschung etabliert. Eine Arbeit von Kanno et al. zeigte, dass diese Methode hervorragend zur nicht-invasiven Bestimmung von funktionellen und morphologischen Veränderungen am Mäuseherzen geeignet ist.

Insgesamt wurden 33 Tiere aus allen Gruppen Echokardiographisch untersucht.

Dazu musste man vorher die Tiere rasieren und mit Pentobarbital betäuben. Dabei handelte es sich um Tiere aus den verschiedenen Versuchsgruppen jeweils zum Zeitpunkt zwei oder sieben Tage nach Einbau der Pumpen (siehe 2.2.1.1).

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

Hatte man nun alle Daten gesammelt, so konnte man diese mithilfe eines an einen Rechner angeschlossenen Abspielgerätes überarbeiten. Zur Auswertung erstellte man von jedem Versuchstier sechs Bilder (zweimal M-Mode AP/PA, viermal B-Mode AP/PA in Systole/Diastole). Dafür bediente man sich einer speziellen Software (Fast Forward), um einzelne Standbilder aus dem bewegten Kontraktionsablauf zu extrahieren.

Diese Bilder konnte man nun mit einer weiteren Software (Firma Toshiba) auswerten. Im B-Mode erhielt man Angaben über Fläche und Umfang in Systole und Diastole; im M-Mode konnte man Angaben über Wanddicke von Septum und freier Wand, sowie über Durchmesser (Diameter) im linken Ventrikel erheben. Auch diese erhob man im Systolikum als auch im Diastolikum. Zur Messung der einzelnen Strecken anhand des Echo-Bildes orientierte man sich an den Ausschlägen in der digitalen Darstellung:

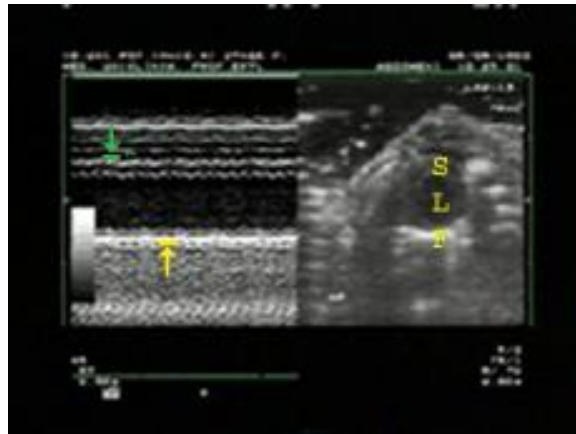


Abb.14 MI-Inhibitor nach 2 Tagen Echo:M-Mode

Man erkennt in dieser Aufnahme nun rechts das mit Ultraschall dargestellte Herz. Das Septum ist die mit S markierte, von zwei helleren Linien begrenzte Wand. In der Wellendarstellung links beginnt dies mit dem grünen Pfeil und endet mit der nächsten helleren Linie. Daran schließt sich das Lumen an, welches als LV-Durchmesser oder LV bezeichnet wird. Das Lumen ist die ungefähr in Bildmitte liegende schwarze Fläche, die mit L markiert ist rechts am Bild. Die in der Wellendarstellung sich anschließende nächste durchgehende weiße Welle bildet das Endokard der freien Wand des linken Ventrikels. Dies ist begrenzt durch die am stärksten angefärbte weiße Welle, im Herzbild mit F bezeichnet.

Die Werte von Septum, linksventrikulärem Durchmesser und freier Wand können in Systole und Diastole bestimmt werden. Das ist einer der Vorteile der Echokardiographie zur Histologie. Um die Werte in beiden Herzaktionen zu erheben, muss man wissen, dass in der Systole sich der Wellenbogen sowohl von Septum als auch von freier Wand auf das Lumen zu bewegt, in Diastole vom Lumen weggeht. Diese Messung wäre anhand des Herzbildes nicht möglich.

Dieses Programm berechnet auch automatisch aus diesen Angaben die Ejektionsfraktion EF des Herzens in Prozent sowie die FS.

Die FS ist die prozentuale systolische Verkürzungsfraction (=percent fractional shortening) und errechnet sich aus den ausgemessenen endsystolischen und enddiastolischen Ventrikeldurchmessern: $FS (\%) = (EDD-ESD) \times 100 / EDD$

Dieser Wert korreliert annähernd mit der EF (Auswurfraction (%)) = Schlagvolumen/enddiastolisches Volumen $\times 100$) [1].

Der Normwert der FS liegt bei $>25\%$.

Diese Werte trägt man nun analog zur histologischen Auswertung in eine Tabelle des Statistikprogramms Stat-View ein. Anhand der darin eingetragenen Werte kann man nun über verschiedene Varianz- und Signifikanzanalysen die einzelnen Ergebnisse in Relation setzen (siehe 2.2.7).

2.2.6 Mathematische und statistische Ausarbeitung der Ergebnisse

Mithilfe der Software Stat-View kann man nun die gemessenen Daten der Histologie und Echokardiographie analysieren. Unter der Zuteilung der Versuchstiere zu Ihren zugehörigen Gruppen (Myokardinfarkt mit DMSO bzw. Integrin-Inhibitor nach zwei beziehungsweise sieben Tagen; Kontrolltiere mit DMSO bzw. Integrin-Inhibitor) kann man nun gleichartige anatomische Strukturen dieser vergleichen, indem man zum Beispiel die einzelnen Werte der Septumbreiten gegenüberstellt. Die Berechnung von signifikanten Unterschieden beziehungsweise von wesentlichen Übereinstimmungen wurde nach speziellen Methoden vollzogen. Zuerst kann man in diesem Programm die zu bestimmenden Gruppen auswählen und dann über die Statistikauswertung ANOVA zu beliebigen Qualitäten (beispielsweise Septum oder Freie Wand) Diagramme in Bezug auf diese Gruppen erstellen (siehe unter anderem 3.1). Anschließend errechnet man signifikante Auffälligkeiten nach der Formel von Bonferroni/Dunn. Dabei ergeben sich Signifikanzen ab einem P-Wert von kleiner 0,0083. Diese Werte wurden dann unterhalb der Diagramme erwähnt.

3. ERGEBNISSE

3.1 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN

3.1.1 Histologische Bilder im Vergleich

Für die Darstellung der morphologischen Gegebenheiten in den einzelnen untersuchten Gruppen kann man einerseits histologische Schnitte (Anfertigung unter 2.2.3) andererseits mit Ultraschall-Geräten aufgenommene Bilder verwenden. Die histologischen Bilder dienen primär der Darstellung des Herzgewebes und der einzelnen Strukturen, vor allem zur Messung der Herzwände und des Ventrikeldurchmessers. Die Echokardiographie hingegen soll die anatomischen Gegebenheiten der Mäuseherzen anhand des lebenden Objekts darstellen. Im Unterschied zur Histologie können hier auch Messungen in Systole und Diastole erfolgen, und somit Aussagen über die Kontraktionsfähigkeit sowie die Ejektionsfraktion beziehungsweise das Fractional Shorting FS gemacht werden. Anfangs sollen hier die Resultate der histologisch bearbeiteten Gewebeproben aufgeführt werden.

3.1.1.1 Kontrolltiere

Begonnen werden soll hier mit dem Vergleich zweier Kontroll-Gruppen, das heißt Tieren, die keinen Herzinfarkt induziert bekommen haben, und bei denen man also von unbeschädigtem Herzgewebe ausgehen kann.

Es gibt eine Kontroll-Gruppe, die eine DMSO-Lösung erhält (Ctrl-DMSO), und eine, die eine Integrin-Inhibitor-Pumpe eingebaut bekommt (Ctrl-Inh). Zusätzlich gibt es noch eine Gruppe von Mäusen, die weder eine Integrin-Inhibitor-Gabe noch eine DMSO-Gabe erhalten (Normal).

Durch den Vergleich dieser drei Gruppen möchte man erfahren, ob sich allein durch die Gabe von DMSO-Lösung oder den Einbau einer Integrin-Inhibitor-Pumpe morphologische beziehungsweise histologische Gegebenheiten am Herzgewebe ändern.

Im Folgenden soll jeweils eine repräsentative Beispielaufnahme aus jeder Gruppe dargestellt werden:

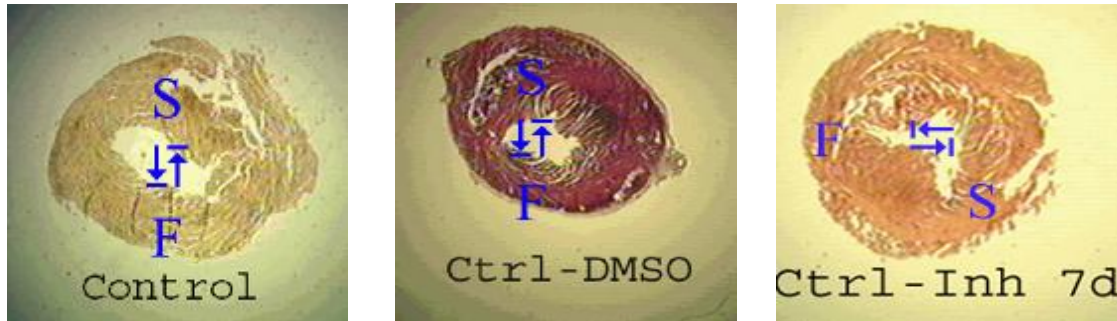


Abb. 15-17 S: Septum; F: Freie Wand des linken Ventrikels; G weiße Strecke zwischen S und F ist der Durchmesser des linken Ventrikels(Diameter). Diese Bezeichnungen werden beibehalten

Von links nach rechts:

Abb.15 Herzquerschnitt Kontrolltier ohne DMSO/Inhibitor in PSR-Färbung

Abb.16 Kontrolltier mit DMSO in HE-Färbung

Abb.17 Kontrolltier mit Integrin-Inhibitor in PSR-Färbung

Die hier verwendeten unterschiedlichen Färbungen haben keinen Einfluss auf die Darstellung des Gewebes.

Bei diesen Beispielen lassen sich folgende Daten erheben:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
Ctrl-Inh	0,07	0,11	0,121
Ctrl-DMSO	0,08	0,10	0,115
Normal	0,08	0,10	0,113

Tabelle 1

Folgende Resultate ergeben sich für alle Tiere dieser Gruppen als Durchschnittswerte aus der unter 2.2.3 beschriebenen Methode, die einzelnen Schnitte auszumessen:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
Ctrl-Inh (10 Tiere)	0,076	0,101	0,102
Ctrl-DMSO (9 Tiere)	0,073	0,101	0,101
Normal (11 Tiere)	0,079	0,103	0,105

Tabelle 2

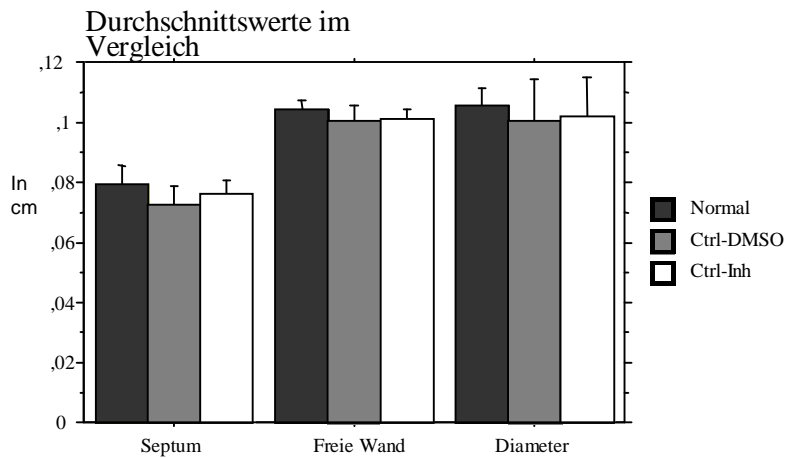


Diagramm 1

Man kann erkennen, dass sowohl die einzelnen Wandabschnitte als auch der Herzdurchmesser im linken Ventrikel sich nur geringfügig unterscheiden in den einzelnen Kontrollgruppen. Im weiteren Verlauf der Ergebnis-Darstellung wird daher zu Gunsten der Überschaubarkeit die Gruppe NORMAL nicht mehr zum Vergleich herangezogen.

3.1.1.2 Infarkttiere nach zwei Tagen

Im weiteren Verlauf vergleicht man nun Gewebeproben von Mäusen mit einem zwei Tage alten Herzinfarkt, denen entweder eine Integrin-Inhibitor-Pumpe (MI-Inh 2d) eingebaut oder eine DMSO-Lösung (MI-DMSO 2d) verabreicht wurde.

Anhand zweier Beispiel-Bilder sollen hier die morphologischen Gegebenheiten dargestellt werden:

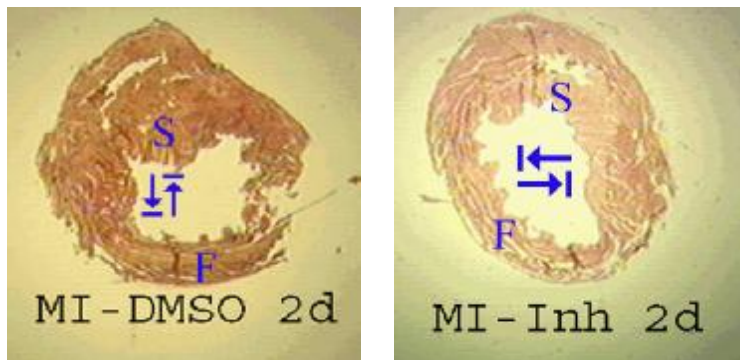


Abb.18 Infarkttier mit DMSO-Lösung nach zwei Tagen

Abb.19 Infarkttier mit Inhibitor nach zwei Tagen

Schon anhand der beiden Beispielbilder kann man erkennen, dass das Tier mit Inhibitor insgesamt dünnere Herzwände zu haben scheint.

Folgende Resultate ergeben sich für diese Tiere:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
MI-DMSO 2 Tage	0,11	0,12	0,11
MI-Inh 2 Tage	0,05	0,05	0,23

Tabelle 3

Man kann anhand der Tabelle erkennen, dass die aus der Bilddarstellung gezogenen Schlüsse sich objektiv bestätigen lassen. Sowohl die freie Wand des linken Ventrikels als auch das Septum der Inhibitor-Maus sind im Vergleich zu Infarktmaus mit DMSO wesentlich dünner.

Für alle Tiere dieser Gruppe ergeben sich folgende Resultate:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
MI-DMSO 2 Tage (5 Tiere)	0,10	0,11	0,14
MI-Inh 2 Tage (7 Tiere)	0,07	0,09	0,14

Tabelle 4

Anhand der Durchschnittswerte kann man erkennen, dass die Infarkttiere mit Inhibitor deutlich dünnere Wandabschnitte haben als diejenigen mit DMSO.

Dies soll anhand folgenden Histogrammes dargestellt werden:

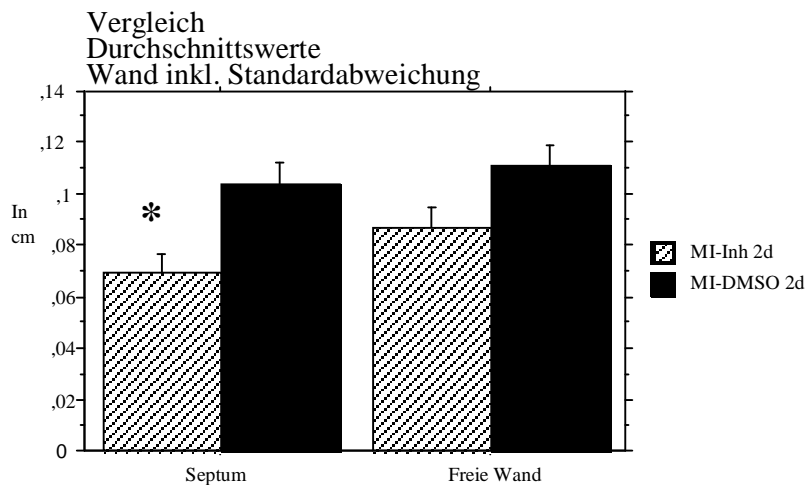


Diagramm 2

Die Unterschiede sind nach Bonferroni/Dunn signifikant in Bezug auf das Septum:

* $p < 0,01$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage

Vergleicht man nun die Infarkttiere nach zwei Tagen mit den Kontrolltieren, so ergibt sich folgende Grafik für die einzelnen Herzwände:

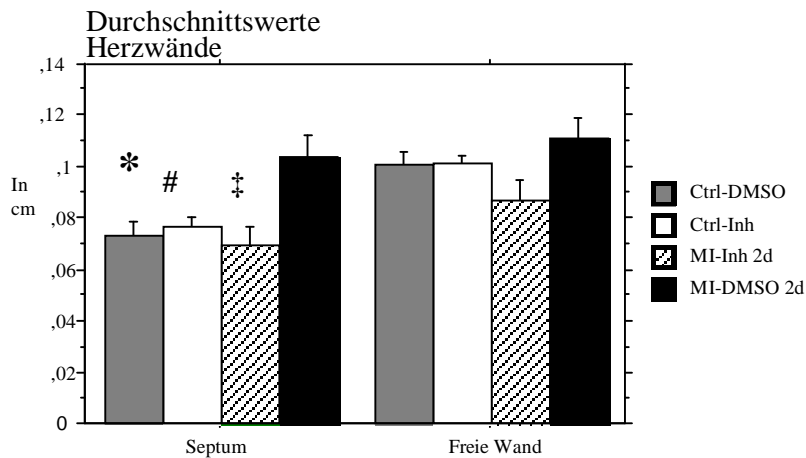


Diagramm 3

Nach Bonferroni/Dunn ergeben sich hier folgende Signifikanzen zwischen den Vergleichsgruppen für den intraventrikulären Wandabschnitt:

*** $p < 0,003$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 2 Tage**

$p < 0,008$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 2 Tage

‡ $p < 0,002$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage

Man kann erkennen, dass sich im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen sowohl das Septum als auch die linksventrikuläre freie Wand bei den Mäusen mit DMSO-Gabe verdickt, bei den Mäusen mit Inhibitor-Gabe verschmälert.

Das Septum nimmt bei DMSO-Infarkttieren sogar signifikant zu, verglichen mit allen drei anderen Gruppen, am ausgeprägtesten im Vergleich zu MI-Inhibitor-Gruppe.

Weitere auffällige Ergebnisse erhält man aus dem Vergleich der durchschnittlichen Diameter, das heißt dem Abstand zwischen Septum und linksventrikulärem Endokard:

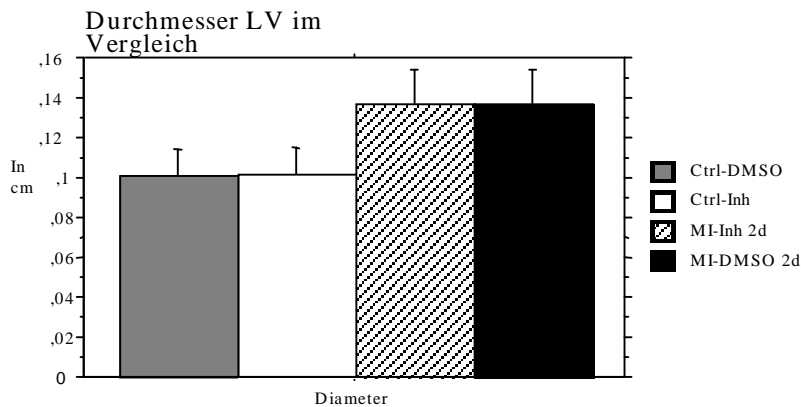


Diagramm 4

Nach Bonferroni/Dunn ergeben sich zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede, allerdings kann man aus der Grafik ablesen, dass die Infarktmäuse mit Inhibitor sowie diejenigen mit DMSO mit 0,14 cm einen deutlich größeren Durchmesser haben als beide Kontrollgruppen mit 0,10 cm .

3.1.1.3 Infarkttiere nach sieben Tagen

Im weiteren Verlauf untersucht man nach sieben Tagen abermals Gewebe aus Mäuseherzen histologisch, um eventuelle weitere Veränderungen der Herzwände oder des Diameters zu untersuchen.

Zuerst stellt man wieder zwei Beispeltiere aus den Infarkt-Gruppen nach sieben Tagen gegenüber:

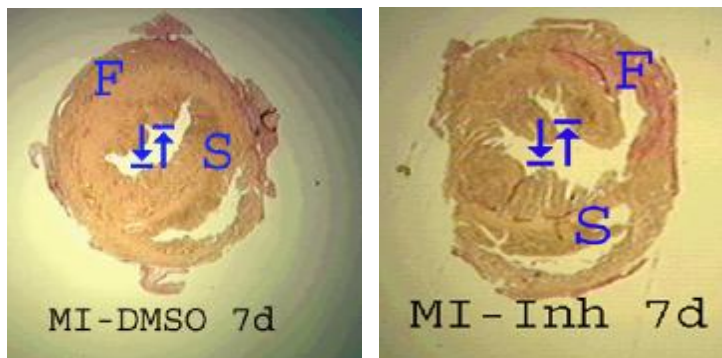


Abb.20 Infarkttier mit DMSO-Lösung nach sieben Tagen
 Abb.21 Infarkttier mit Inhibitor nach sieben Tagen

Die Bilddarstellung zeigt sehr gut, dass das Infarkt-Herz mit DMSO-Lösung stark hypertrophiert, während das Infarkt-Herz mit Inhibitor eine scheinbar normale Wandstruktur und -dicke besitzt.

Folgende Resultate ergeben sich für diese Mäuse:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
MI-DMSO 7 Tage	0,14	0,15	0,10
MI-Inh 7 Tage	0,04	0,08	0,20

Tabelle 5

Anhand dieser Werte sieht man, dass sich beide Tiere stark unterscheiden in der Dicke ihrer einzelnen Wände und ihm Durchmesser des linken Ventrikels.

Vergleicht man alle Tiere dieser Gruppe erhält man folgende Durchschnittsergebnisse:

Tier	Septum/IVS in cm	Freie Wand in cm	Durchmesser LV in cm
MI-DMSO 7 Tage (6 Tiere)	0,15	0,14	0,11
MI-Inh 7 Tage (6 Tiere)	0,06	0,09	0,19

Tabelle 6

Die Gesamtergebnisse aller Tiere der beiden Infarktgruppen ergeben in allen Werten Unterschiede. So sind sowohl das Septum als auch das linksventrikuläre Myokard der MI-DMSO-Gruppe nach sieben Tagen im Vergleich zur MI-Inhibitor-Gruppe wesentlich dicker. Dies sei in folgendem Histogramm noch veranschaulicht:

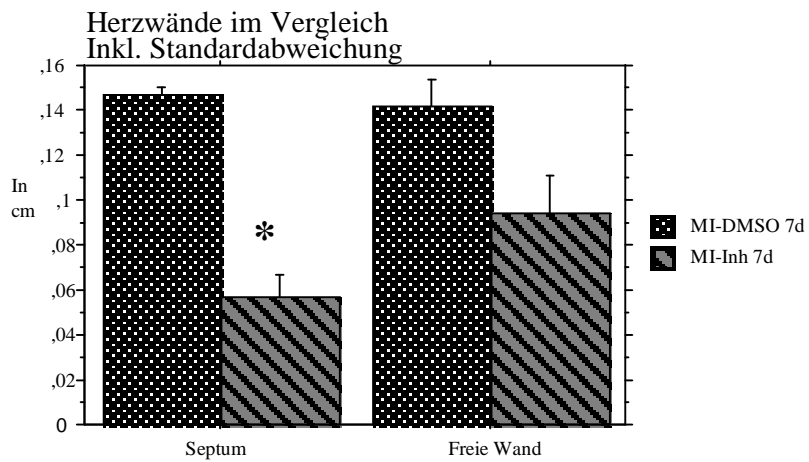


Diagramm 5

* $p < 0,0001$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

Nach Bonferroni/Dunn ergeben sich für den Vergleich der intraventrikulären Wandabschnitte (Septum) signifikante Unterschiede, bei der linksventrikulären freien Wand nicht. Diese Ergebnisse sind mit denen in der Echokardiographie vergleichbar (vgl. 3.1.2.3)

Nun vergleicht man noch den Diameter des linken Ventrikels miteinander:

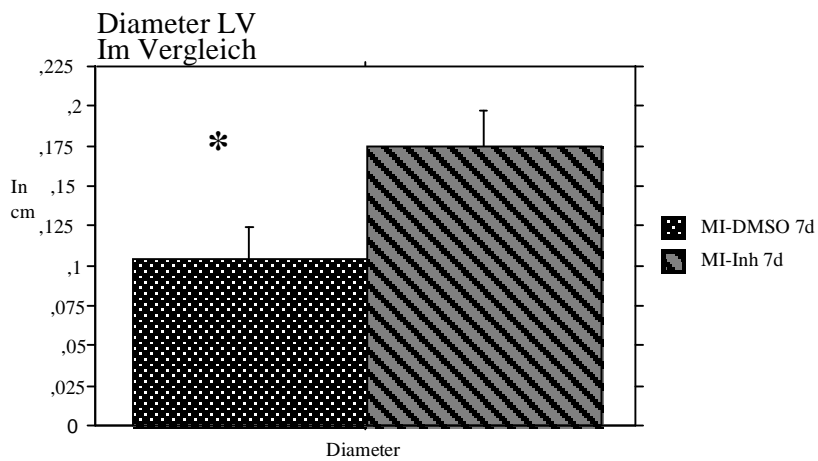


Diagramm 6

* $p < 0,0048$ MI-DMSO 7 Tage vs. MI-Inh 7 Tage

Der Herzdurchmesser des linken Ventrikels ist bei den integrin-inhibierten Mäusen signifikant größer als bei den DMSO-Infarkt-Mäusen. Nach diesen Werten sind die MI-Inhibitor-Tiere dilatiert, verglichen mit jener Gruppe.

Vergleicht man nun die Infarkttiere nach sieben Tagen mit den Kontroll-Gruppen so ergibt sich dieses Histogramm für die Herzwände:

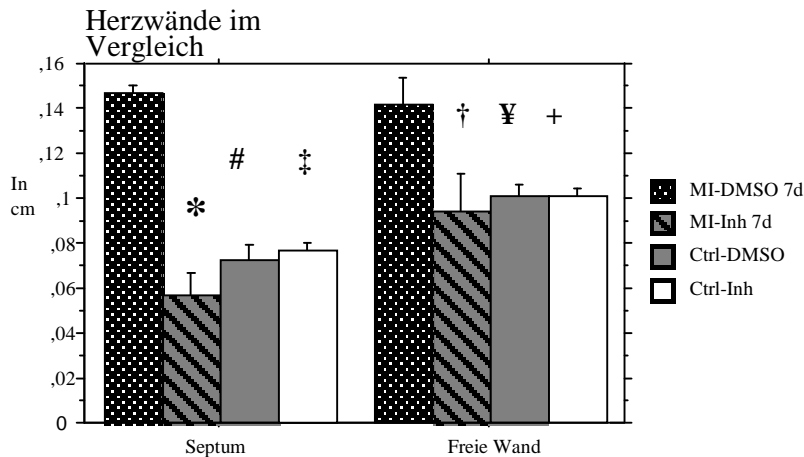


Diagramm 7

* $p < 0,0001$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

$p < 0,0001$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 7 Tage

‡ $p < 0,0001$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 7 Tage

Für den intraventrikulären Wandabschnitt ergeben sich so hochsignifikante Unterschiede mit einem P-Value $< 0,0001$ zwischen der Infarktgruppe mit DMSO nach sieben Tagen zu beiden Kontroll-Gruppen und zur integrin-inhibierten Infarktgruppe nach sieben Tagen. Die Wand dieser Mäuse ist also stark hypertrophiert. Ähnliche Resultate zeigen sich auch im echokardiographischen Befund (siehe 3.1.2.3).

Anhand des Balkendiagrammes kann man aber auch erkennen, dass das Septum der MI-Mäuse mit Inhibitor-Gabe dünner ist, wenn auch nicht signifikant, verglichen mit den Kontroll-Gruppen. Auch dieser Befund lässt sich echokardiographisch ebenso nachweisen (siehe 3.1.2.3).

Für die linksventrikuläre Wand erhält man folgende Signifikanzen nach Bonferroni:

† $p < 0,002$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

¥ $p < 0,003$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 7 Tage

+ $p < 0,003$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 7 Tage

Vergleicht man diese Berechnung mit der in Tabelle 6, so sieht man dass auch die freie Wand der DMSO-Infarkttiere im Vergleich zu allen drei Gruppen signifikant hypertrophiert, während die der Inhibitor-Infarkttiere wieder leicht dünner zu sein scheint.

Zusätzlich stellt man noch den Durchschnitts-Durchmesser des linken Ventrikels in einer Grafik gegenüber. Nach zwei Tagen ist dieser mit 0,14 cm bei beiden Infarktgruppen gleich groß. Nach sieben Tagen ergibt sich folgender Befund:

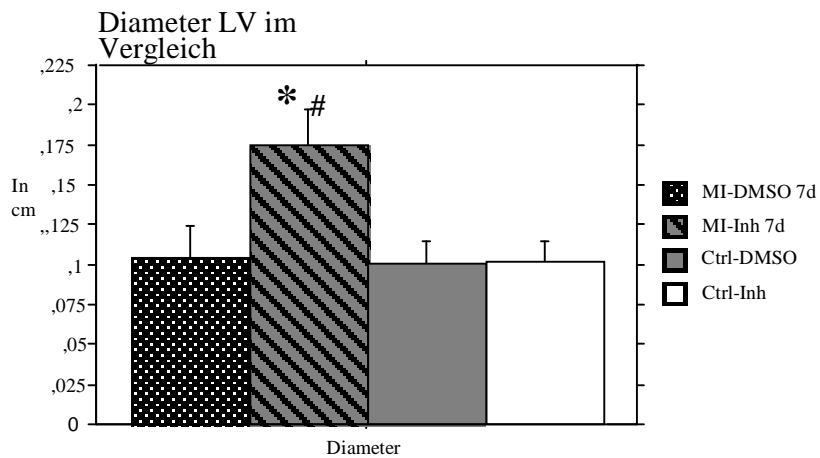


Diagramm 8

Der Durchmesser hat sich nach sieben Tagen bei den Infarkttieren mit DMSO-Lösung wieder auf 0,11 cm reduziert, während er bei den MI-Inhibitor-Tieren weiter zugenommen hat auf 0,19cm.

Dies ergibt nach Bonferroni/Dunn folgende Signifikanzen:

* $p < 0,004$ Ctrl-DMSO vs. MI-Inh 7 Tage

$p < 0,004$ Ctrl-Inh vs. MI-Inh 7 Tage

Somit ist nach sieben Tagen der Durchmesser im LV bei den Infarkttieren mit Integrin-Inhibitor signifikant größer als bei beiden Kontroll-Gruppen.

3.1.1.4 Vergleich aller Gruppen

Zum Abschluss der histologischen Ergebnisdarstellung sollte man noch alle Gruppen untereinander vergleichen, um zusätzlich noch Veränderungen zwischen den Infarktgruppen nach zwei beziehungsweise sieben Tagen erkennen zu können.

Zuerst folgt eine graphische Darstellung der durchschnittlichen Septumdicke:

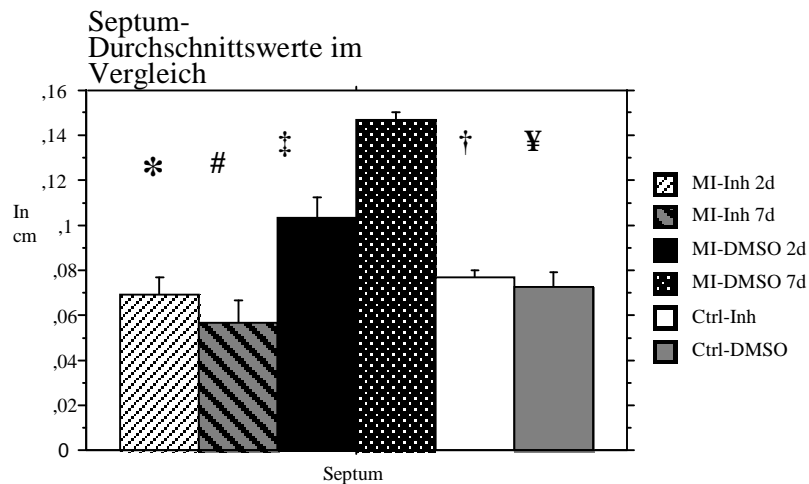


Diagramm 9

* $p < 0,002$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage

$p < 0,0001$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

‡ $p < 0,0001$ MI-DMSO 2 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

† $p < 0,0001$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 7 Tage

¥ $p < 0,0001$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 7 Tage

Vergleiche in dieser Tabelle sind erst signifikant bei P-Value-Werten kleiner gleich 0,0033.

Folgende Vergleichspaare sind sinnvoll.

1. MI-DMSO nach 2 und 7 Tagen
2. MI-Inh nach 2 und 7 Tagen
3. MI-DMSO und MI-Inh nach 2 Tagen
4. MI-DMSO und MI-Inh nach 7 Tagen
5. Ctrl-Gruppen zu allen anderen.

Ein Vergleich zwischen MI-Inh 2d und MI- DMSO 7d zum Beispiel ist nicht sinnvoll.

Das Balkendiagramm zeigt eine Übersicht über die durchschnittliche Septumdicke aller Gruppen. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der graphischen Darstellung der Septumdicke im Echokardiogramm (vgl. 3.1.2.4).

Man kann dem Histogramm zum einen Entwicklungen gleichartiger Gruppen in Bezug auf das Septum im Verlaufe von zwei und sieben Tagen betrachten, zum anderen kann man die unterschiedlichen Gruppen innerhalb eines gleichen Zeitpunktes vergleichen.

Untersucht man nun die Entwicklung des Septums bei MI-DMSO-Tieren so sieht man, dass bei 2 Tage alten Tieren das Septum im Durchschnitt 0,10 cm dick ist, bei 7 Tage alten Tieren dagegen 0,15 cm. Somit ergibt sich nach Bonferroni/Dunn eine signifikante Verbreiterung des Septums nach 7 Tagen bezogen auf das Resultat nach 2 Tagen (siehe ‡).

Vollzieht man diesen Vergleich jetzt bei den MI-Inhibitor-Tieren, so stellt man fest, dass das Septum bei 2 Tage alten Mäusen 0,07 cm dick, bei 7 Tage alten Mäusen 0,06 cm breit ist. Es ergibt sich eine relative Verschmälerung dieses Wandabschnittes, allerdings nicht signifikant.

Des Weiteren ergeben sich hochsignifikante Veränderungen bei den MI-DMSO-Mäusen nach 7 Tagen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen mit P-Werten $< 0,0001$. Auch hier ist das Septum signifikant hypertrophiert, verglichen mit den Kontroll-Tieren mit 0,07 cm.

Das Septum bei den integrin-inhibierten Tieren hingegen ist im Vergleich zu den Kontroll-Tieren gleich groß beziehungsweise nach sieben Tagen etwas schmaler. Diese Veränderungen sind jedoch nicht signifikant.

Ein weiterer relevanter Vergleich ist der bereits in 3.1.1.2 beziehungsweise 3.1.1.3 erwähnte Unterschied zwischen den beiden Infarktgruppen. So ergeben sich sowohl nach zwei als auch nach sieben Tagen signifikant Unterschiede zwischen der MI-DMSO-Gruppe und der MI-Inh-Gruppe.

Zusammenfassend kann man für das Septum sagen, dass dies bei den Infarkt-Tieren mit DMSO im Verlaufe von einer Woche konsekutiv zunimmt im Durchmesser, während es bei MI-Inhibitor-Tieren nicht dicker wird, sondern annähernd gleiche beziehungsweise kleinere Werte aufweist als die Kontroll-Gruppen.

Vergleicht man nun die freie Wand FW des linken Ventrikels miteinander so ergibt sich folgendes Diagramm:

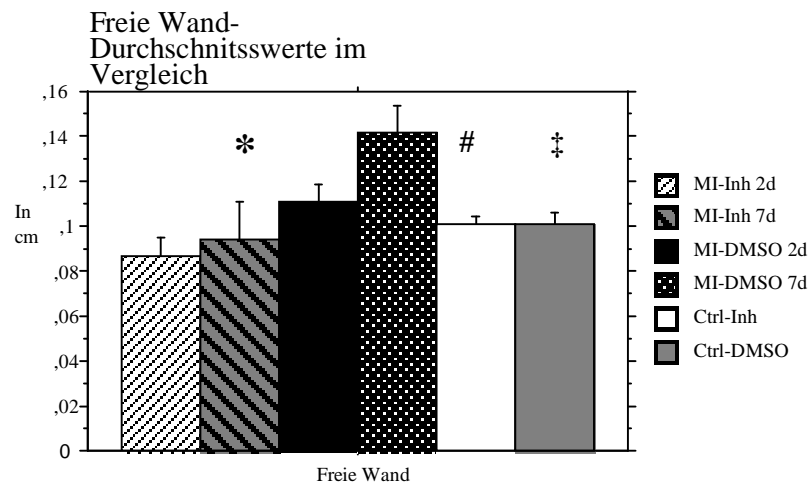


Diagramm 10

* $p < 0,001$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

$p < 0,002$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 7 Tage

‡ $p < 0,002$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 7 Tage

Die Werte bei der linksventrikulären Herzwand zeigen ähnliche Tendenzen auf wie diejenigen beim Septum, allerdings ergeben sich signifikante Auffälligkeiten erst nach einem Zeitraum von sieben Tagen. Dann ist dieser Wandabschnitt bei den infarzierten Mäusen mit DMSO-Lösung im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen und zur Integrin-Inhibitor-Infarkt-Gruppe signifikant hypertrophiert mit durchschnittlich 0,14 cm.

Weiterhin von Interesse ist die Gegenüberstellung der durchschnittlichen Ventrikeldurchmesser:

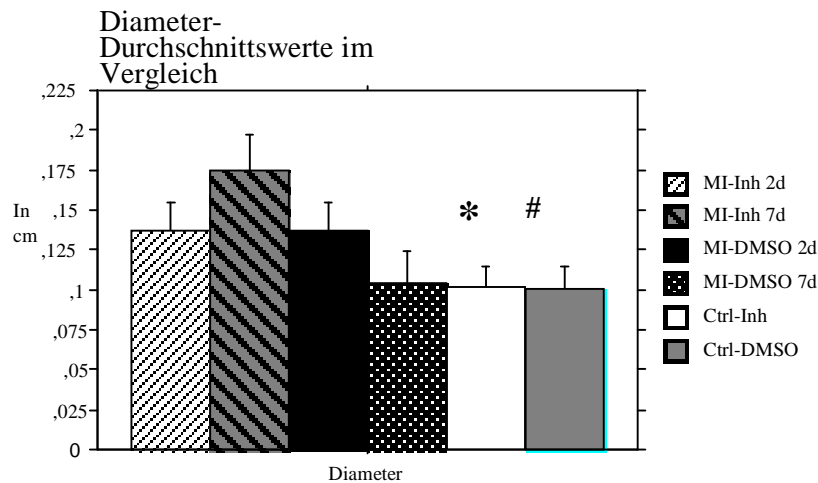


Diagramm 11

* $p < 0,003$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-Inh

$p < 0,003$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-DMSO

Mit Durchschnittswerten von 0,19 cm ist die Distanz zwischen Septum und linksventrikulär gegenüberliegendem Myokard bei den MI-Inhibitor-Tieren nach 7 Tagen am größten.

Insgesamt erkennt man, dass nach 2 Tagen beide Infarktgruppen mit 0,14 cm im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen mit 0,10 cm leicht dilatieren. Im Verlaufe einer Woche entwickelt sich der Ventrikeldurchmesser bei MI-DMSO-Tieren wieder auf 0,11 cm zurück, während er wie oben erwähnt bei der Inhibitor-Infarkt-Gruppe weiter zunimmt, das heißt dilatiert.

Der statistischen Auswertung des Diagramms 11 entnimmt man, dass es sich hierbei um eine signifikante Zunahme des Ventrikeldurchmessers im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen handelt.

Zusammenfassend ergibt die histologische Messung:

1. Die Myokard-Infarkt-Mäuse mit DMSO-Lösung hypertrophieren im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen innerhalb einer Woche sowohl am Septum als auch an der freien Wand. Der Durchmesser des linken Ventrikels geht nach kurzer Zunahme wieder auf die Werte bei gesunden Tieren zurück.

2. Die Myokard-Infarkt-Mäuse mit Integrin-Inhibitor bekommen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe im gleichen Zeitraum schmalere Wandabschnitte und dilatieren im Durchmesser.
3. Zwischen den beiden Kontroll-Gruppen bestehen keine auffälligen morphologischen Unterschiede.

3.1.2 Echo-Bilder im Vergleich

Ähnlich wie bei der Ausmessung der Gewebeschnitte bestimmt man hier die unterschiedlichen Wandabschnitte, zum einen Septum (IVS) zum anderen linksventrikuläre Wand (FW) sowie den Durchmesser des linken Ventrikels. Zusätzlich bestimmt man noch die Ejektionsfraktion, die im Falle einer Erniedrigung ein Maß für systolische Ventrikelfunktionsstörungen darstellt. Im Gegensatz zur Histologie kann man, da man das Tier lebend untersucht unterscheiden zwischen Systole und Diastole.

3.1.2.1 Kontrolltiere

Im folgenden Verlauf sollen die einzelnen echokardiographischen Bilder der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden und die Veränderungen dargestellt werden. Beginnen sollte man wie bei der Histologie zuerst mit der Gegenüberstellung von Kontrolltieren.

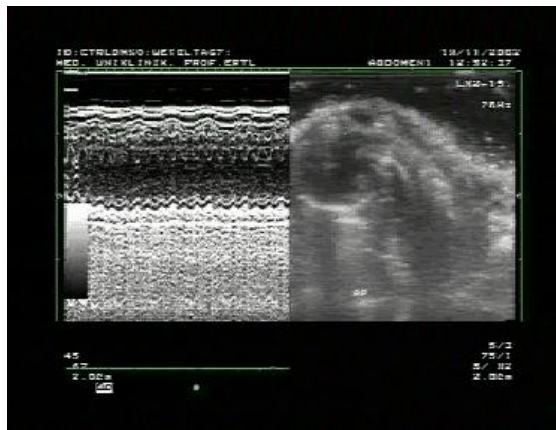


Abb.22 Ctrl-DMSO



Abb.23 Ctrl-Inh

Die beiden Echo-Bilder zeigen im M-Mode jeweils eine AP-Aufnahme von Kontrollmäusen ohne induzierten Myokardinfarkt. Eines der Tiere hat eine Integrin-Inhibitor-Pumpe (Ctrl-Inh)

eingebaut bekommen, das andere nicht (Ctrl-DMSO). Wenn man die Aufnahmen vergleicht, dann kann man erkennen, dass sich die beiden Bilder in den entscheidenden Daten, nämlich sowohl Septum- und linksventrikuläre Wanddicke als auch Durchmesser des linken Ventrikel kaum unterscheiden. Lediglich die Ejektionsfraktion zeigt in der Kontrollgruppe mit Inhibitor-Gabe signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Tieren, die mit DMSO-Lösung substituiert wurden. Folgende Ergebnisse wurden speziell bei diesen Tieren gemessen:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Freie Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
Ctrl-DMSO	0,08/0,12	0,08/0,09	0,32/0,22	31,3
Ctrl-Inh	0,07/0,11	0,10/0,12	0,39/0,21	46,2

Tabelle 7

Lediglich die dick untermalten Werte zeigen auffällige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Insgesamt ergaben sich für die Kontrollgruppen folgende Durchschnittswerte:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Frei Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
Ctrl-DMSO (5 Tiere)	0,08/0,11	0,09/0,12	0,31/0,23	28,2
Ctrl-Inh (4Tiere)	0,08/0,12	0,09/0,13	0,34/0,21	36,2

Tabelle 8

Dies bestätigt, dass sich außer in der Bestimmung des fractional shorting (FS) beziehungsweise der Ejektionsfraktion keine großen Unterschiede in der echokardiographischen Darstellung der Herzen ergeben, was man anhand folgenden Histogrammes auch ersehen kann.

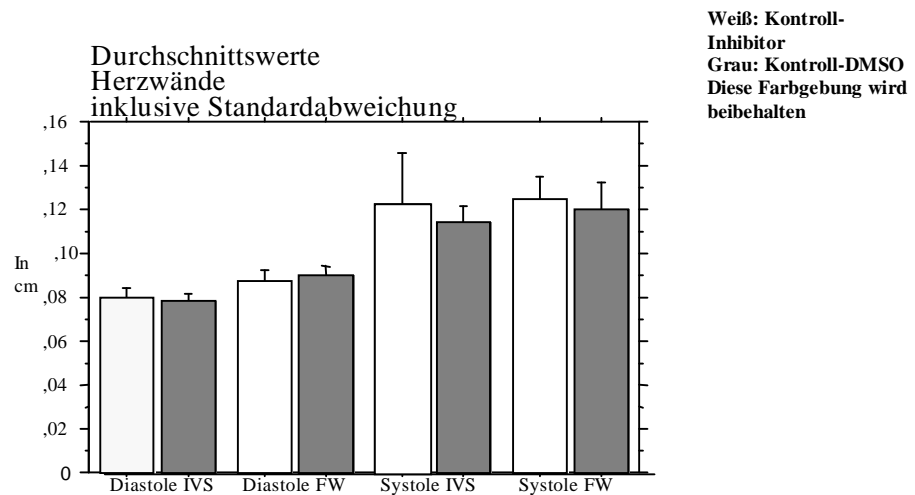


Diagramm 12

So zeigen sich im Durchschnittswert weder in der Systole noch in der Diastole große Schwankungen in den einzelnen Wanddurchmessern.

Lediglich die in der Ejektionsfraktion und somit im fractional shorting (FS) auftretenden Unterschiede werden im folgenden Diagramm dargestellt. So zeigen sich wie oben aus der Tabelle ersichtlich in den Kontrollgruppen, die mit einer Integrin-Inhibitor-Pumpe versehen sind, im Durchschnitt um 8 % höhere Werte im Vergleich zu den mit DMSO-Pumpe.

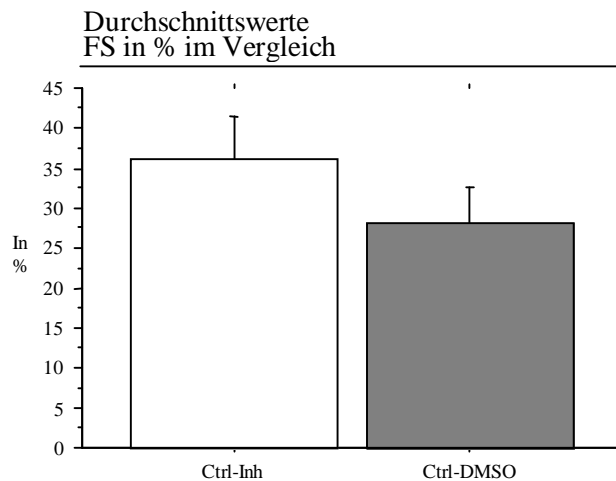


Diagramm 13

Anhand des B-Mode kann man nun die Kontraktionsabläufe der einzelnen Mäuseherzen beobachten. Man bedient sich zur Erfassung der Videosequenzen zweie Momentaufnahmen – einer im enddiastolischen und einer im endsystolischen Bereich.

Im folgenden Beispiel ist die Bewegung eines Herzen eines Tieres dargestellt, das mit einer Integrin-Inhibitor-Pumpe versehen ist.

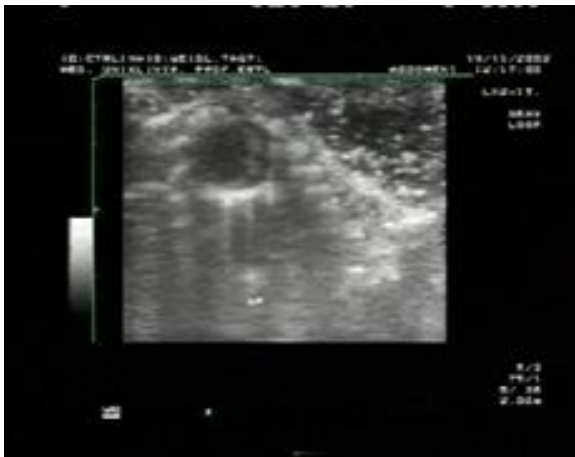


Abb.24 Ctrl-Inh Diastole

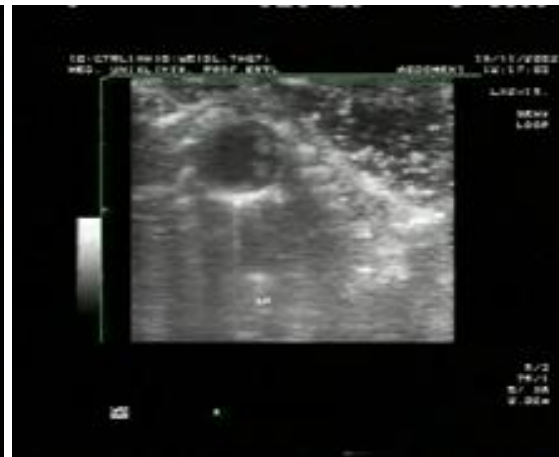


Abb.25 Ctrl-Inh Systole

An Hand dieser Aufnahme im PA-Modus kann man gut erkennen, dass sich die papillären Herzmuskeln kontrahieren und das Herz sich in der Fläche verändert. Es findet eine regelrechte Kontraktion statt.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Mäusen, denen anstelle eines Integrin-Inhibitors DMSO-Pumpen verabreicht wurden.

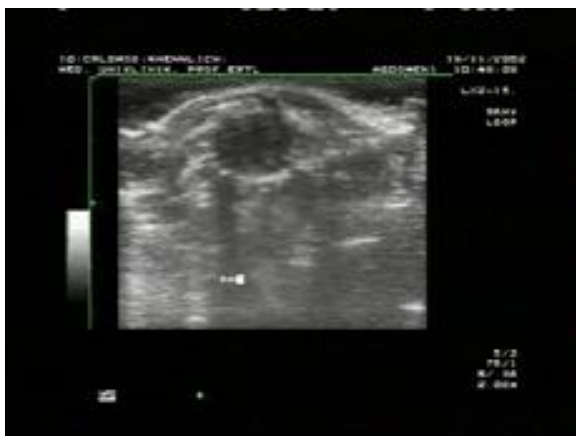


Abb.26 Ctrl-DMSO Diastole



Abb.27 Ctrl-DMSO Systole

Auch hier zeigt sich eine regelrechte Abfolge der Herzaktion. Dies zeigt sich im Übrigen bei allen Tieren dieser Gruppe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Resultate bei beiden Kontrollgruppen weitestgehend übereinstimmen. Die Morphologie sowie die Herzkontraktion verändern sich in beiden Gruppen nicht; lediglich die Pumpleistung ist in der Inhibitor-Gruppe größer.

3.1.2.2 Infarkttiere nach zwei Tagen

Vergleicht man nun Mäuse, denen ein künstlicher Infarkt induziert wurde, so ergeben sich schon nach zwei Tagen Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Auch innerhalb der Infarktgruppen gibt es wieder eine Aufteilung in Tiere, die eine Integrin-Inhibitor-Pumpe erhalten, und welche, die lediglich eine DMSO-Lösung bekommen.

Im M-Mode ergeben sich folgende Befunde in AP-Aufnahme:

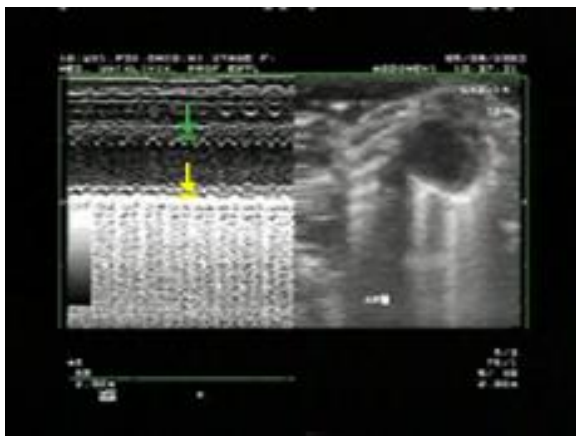


Abb.28 MI-DMSO nach 2 Tagen

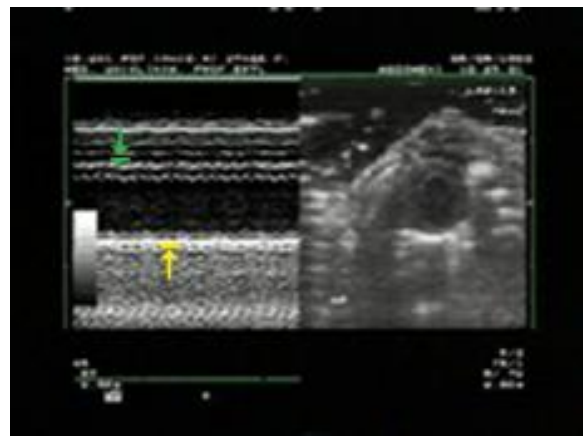


Abb.29 MI-Inh nach 2 Tagen

Während das Tier in Abb. 28 noch regelrechte Wandkontraktionen sowohl im Septum (grüner Pfeil), als auch am linksventrikulären Myokard (gelber Pfeil) zeigt, so scheint das Tier in Abb. 29 kaum mehr Kontraktionsbewegungen auszuführen. Dadurch erscheint auch das Lumen des linken Ventrikels bei dem, mit Inhibitor behandelten Tier größer zu sein.

Für diese Beispiel-Tiere ergeben sich dann auch folgende Werte:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Freie Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
MI-DMSO 2 Tage	0,13/0,20	0,14/0,17	0,32/0,26	18,8
MI-Inh 2 Tage	0,05/0,10	0,07/0,13	0,33/0,31	7,5

Tabelle 9

Vor allem im Bereich des Septums ergeben sich mit 0,13 cm im Vergleich zu 0,05 cm in der Diastole sowie mit einer FS von 18,8 % im Vergleich zu 7,5 % große Unterschiede. Für alle Tiere dieser Gruppen ergeben sich folgende Durchschnittsergebnisse:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Frei Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
MI-DMSO 2 Tage (6 Tiere)	0,10/0,14	0,10/0,14	0,34/0,28	19,4
MI-Inh 2 Tage (3 Tiere)	0,06/0,09	0,08/0,13	0,36/0,32	11,5

Tabelle 10

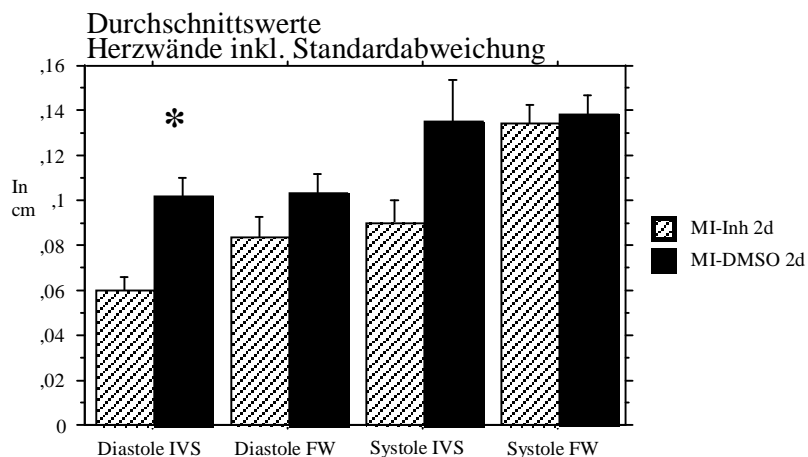


Diagramm 14

Anhand des Histogrammes sowie der Tabelle 10 kann man erkennen, dass die Mäuse mit Inhibitor-Gabe starke Unterschiede zu denen ohne aufweisen. So sind die Durchmesser der Herzwand, vor allem aber des Septums (IVS), signifikant dünner.

*** $p < 0,001$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage**

Auch die FS zeigt sich, wie aus der Tabelle 10 ersichtlich stark verringert im Vergleich zu normalen Infarkttieren.

Vergleicht man nun die Infarkttiere nach zwei Tagen mit den Kontrolltieren, so ergibt sich anhand der Resultate in Tabelle 8 und 10 folgendes Diagramm:

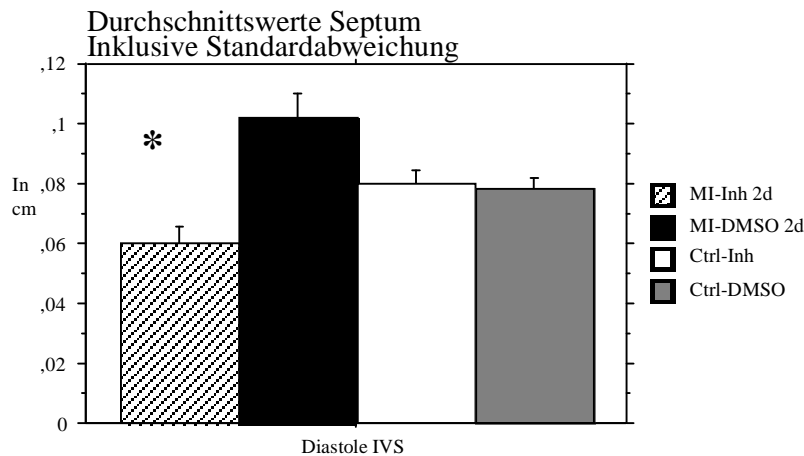


Diagramm 15

Man erkennt nun, dass sich im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen die Septen bei den Infarktmäusen mit Integrin-Inhibition verschmälern, während sie bei normalen herzwandgeschädigten Tieren dicker werden. Diese Resultate lassen sich mit denen aus der histologischen Auswertung vereinbaren (vgl. 3.1.1.2).

*** $p < 0,0009$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage**

Deutliche Signifikanzen in Bezug auf das Septum nach Bonferroni/Dunn ergeben sich somit zwischen Infarktmäusen mit und ohne Inhibitor.

Weitere Auffälligkeiten ergeben sich aus dem Vergleich der unterschiedlichen Ejektionsfraktionen:

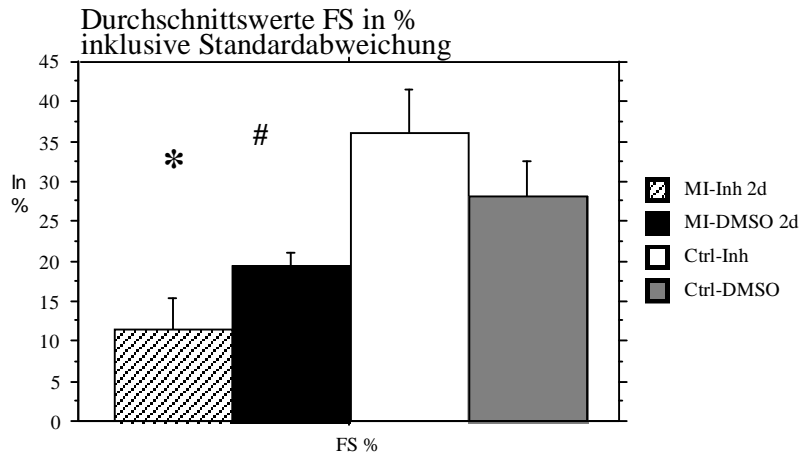


Diagramm 16

Schaut man sich hierzu nun wieder die Berechnung nach Bonferroni/Dunn an, so erkennt man, dass sich die Infarkttiere, vor allem aber die mit Integrin-Inhibition, stark zu den Kontrolltieren unterscheiden, die ebenfalls eine Integrin-Inhibition erhielten.

* $p < 0,004$ MI-Inh 2 Tage vs. Ctrl-Inh

$p < 0,007$ MI-DMSO 2 Tage vs. Ctrl-Inh

3.1.2.3 Infarkttiere nach sieben Tagen

Nach sieben Tagen untersucht man nun die Tiere erneut echokardiographisch, um weitere Veränderungen am Myokard sowie der Kontraktionsfähigkeit des Herzens feststellen zu können.

Im AP-Mode bietet sich nun folgendes Bild:

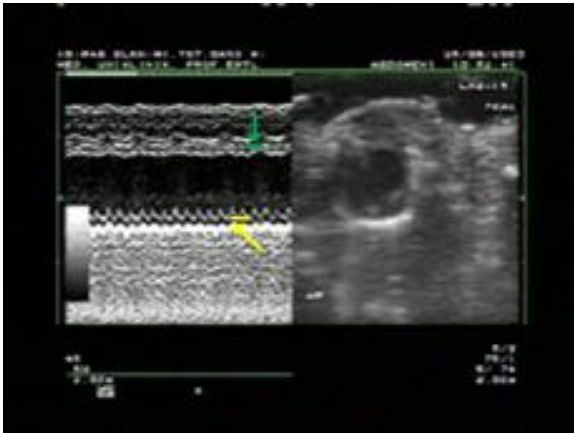


Abb.30 MI-DMSO nach sieben Tagen

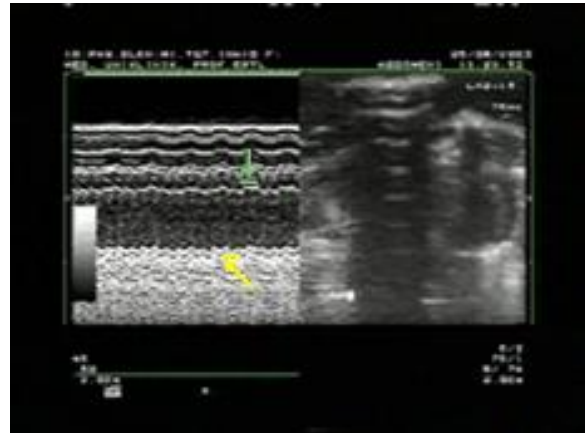


Abb.31 MI-Inh nach sieben Tagen

Man kann in diesen Aufnahmen gut die fast fehlende Herzkontraktion der Tiere mit Inhibitor-Gabe erkennen, während die Infarkttiere mit DMSO-Lösung noch regelrechte Herzaktionen zeigen, gut zu sehen an der linksventrikulären Herzwand (gelber Pfeil). Ebenso kann man auf dem Ultraschallbild sehen, dass die freie Wand in Abb. 31 sehr dünn zu sein scheint.

Für diese beiden Tiere ergeben sich folgende Messwerte:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Freie Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
MI-DMSO 7 Tage	0,13/0,14	0,13/0,20	0,30/0,23	20,7
MI-Inh 7 Tage	0,07/0,07	0,08/0,10	0,40/0,34	15,0

Tabelle 11

Diese beiden Tiere unterscheiden sich nun in allen aufgelisteten Qualitäten stark voneinander. Für die Gesamtzahl der Tiere dieser Gruppe ergeben sich folgende Resultate:

Tier	Septum/IVS in Diastole/Systole in cm	Frei Wand in Diastole/Systole in cm	Durchmesser LV in Diastole/Systole in cm	FS in %
MI-DMSO 7 Tage (8 Tiere)	0,11/0,15	0,10/0,15	0,34/0,27	21,4
MI-Inh 7 Tage (7 Tiere)	0,06/0,08	0,07/0,11	0,39/0,34	13,5

Tabelle 12

Auch hier bestätigt sich die Tendenz aus Tabelle 11. In allen Bereichen zeigen die Inhibitor-Tiere starke Unterschiede zu denen mit DMSO. Die Herzwände sind allgemein dünner, das Lumen des linken Ventrikels ist größer mit 0,39 cm im Vergleich zu 0,34 cm und wird in der Systole mit 0,34 cm auch nur geringfügig weniger im Vergleich zu 0,27 cm bei normalen Infarkttieren.

Im untenstehenden Histogramm werden die einzelnen Wanddurchmesser dargestellt:

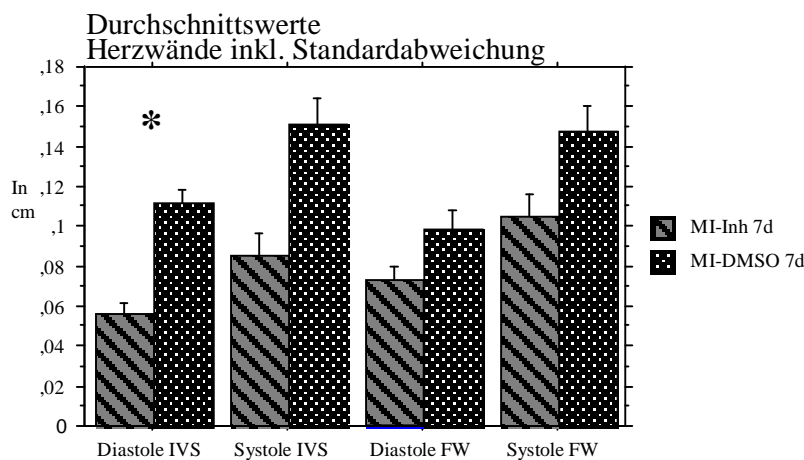


Diagramm 17

* $p < 0,0001$ MI-Inh nach 7 Tagen vs. MI-DMSO nach 7 Tagen

Die Auswertung nach Bonferroni/Dunn zeigt die deutlichsten Unterschiede zwischen beiden Gruppen am Septum, und zwar in der Diastole.

Allerdings ergeben sich auch auffällige Differenzen im Durchmesser der linksventrikulären Wand, die aber nicht so stark sind, als dass sie als signifikant bezeichnet werden könnten. Diese Resultate sind mit denen aus der histologischen Messung vergleichbar (vgl. 3.1.1.3).

Auch in der Ejektionsfraktion ergeben sich signifikante Unterschiede, wie untenstehend ersichtlich:

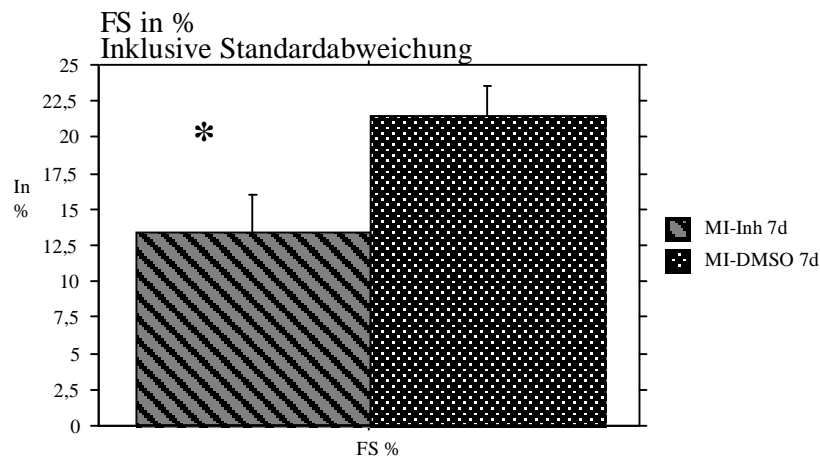


Diagramm 18

*** $p < 0,003$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage**

Es zeigt sich also, dass die Mäuse, die keinen Integrin-Inhibitor erhielten, eine signifikant höhere Ejektionsfraktion – fractional shorting – haben, als diejenigen mit Inhibition.

Vergleicht man die Infarkttiere nun mit den Kontrollgruppen ergibt sich folgendes Bild:

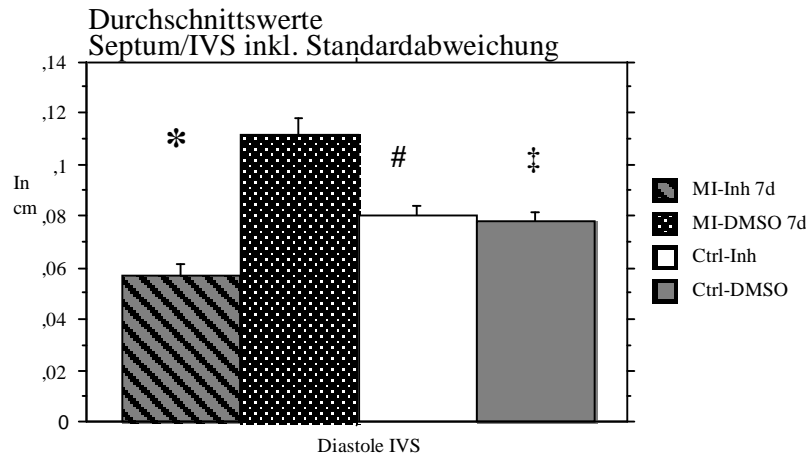


Diagramm 19

* $p < 0,0001$ MI-Inh 7 tage vs. MI-DMSO 7 Tage

$p < 0,003$ Ctrl-Inh vs. MI-DMSO 7 Tage

‡ $p < 0,0008$ Ctrl-DMSO vs. MI-DMSO 7 Tage

Zusammenfassend kann man in Bezug auf die unterschiedlichen Herzwände sagen, dass sich vor allem das Septum der Infarkttiere mit DMSO-Lösung sowohl im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen als auch im Vergleich zur Inhibitor-Gruppe nach sieben Tagen signifikant verdickt, während eben das der Gruppe mit Integrin-Inhibition sich sogar, wenn auch nicht signifikant, so aber doch deutlich sichtbar verschmälert, verglichen zu den Kontrolltieren.

Am stärksten ist der Unterschied zwischen den MI-DMSO- und den MI-Inhibitor-Tieren mit einem P-Value-Wert $< 0,0001$. Diese Resultate stimmen mit denen aus der histologischen Gewebeuntersuchung überein (vgl. 3.1.1.3).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Vergleich der Durchmesser des linken Ventrikels. Während sich in der Diastole keine signifikanten Unterschiede nachweisen lassen, so fallen allerdings in der Systole starke Differenzen zwischen der Integrin-Inhibitor-Gruppe und beiden Kontrollgruppen auf:

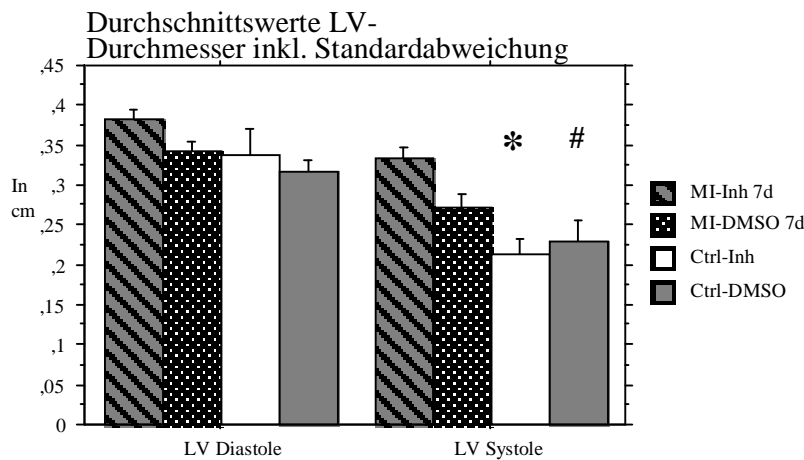


Diagramm 20

*** p < 0,0001 Ctrl-Inh vs. MI-Inh 7 Tage**

p < 0,0007 Ctrl-DMSO vs. MI-Inh 7 Tage

In der Diastole erkennt man geringe Schwankungsbreiten der Lumina im linken Ventrikel zwischen 0,39 cm bei der Integrin-Inhibitor-Gruppe und 0,31 cm bei der Kontroll-DMSO-Gruppe, die aber nicht signifikant nach Bonferroni/Dunn sind.

In der Systole hingegen ergibt sich bei den MI-Inhibitor-Tieren ein Durchschnittswert von 0,34 cm, während dieser bei den Kontroll-DMSO-Tieren nur 0,23 cm, bei den Kontroll-Inhibitor-Tieren sogar nur 0,21 cm groß ist.

Daraus ergibt sich im Ventrikeldurchmesser ein signifikanter Unterschied zwischen den Inhibitor-Tieren und beiden Kontroll-Gruppen wie aus obenstehenden Zahlen ersichtlich.

Da sich das Lumen des linken Ventrikels bei den integrin-inhibierten Tieren weniger kontrahiert als bei den Kontrolltieren, muss sich das auch auf die Berechnung der Ejektionsfraktion auswirken. Die errechneten Resultate sollen in folgendem Diagramm dargestellt werden:

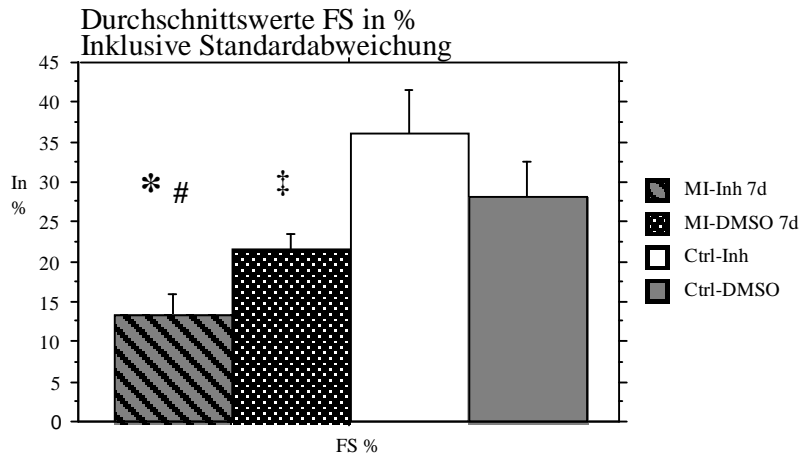


Diagramm 21

* $p < 0,0003$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-Inh

$p < 0,007$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-DMSO

‡ $p < 0,008$ MI-DMSO 7 Tage vs. Ctrl-Inh

Somit ergibt sich aus den Ergebnissen die Tatsache, dass die Mäuse mit Integrin-Inhibition eine signifikant geringere Ejektionsfraktion, beziehungsweise FS haben als die Kontrollgruppen. Im Vergleich zur Kontroll-Inhibitor-Gruppe, die Gruppe mit der höchsten FS,

hat auch die MI-DMSO-Gruppe nach sieben Tagen eine signifikant niedrigere FS.

3.1.2.4 Vergleich aller Gruppen

Vergleicht man nun alle Gruppen miteinander, so kann man einerseits die oben beschriebenen Veränderungen zwischen den Infarktmäusen mit und ohne Inhibitor, zwischen diesen Gruppen und den Kontrollgruppen beobachten, andererseits aber auch MI-Inhibitor-Mäuse sowie MI-DMSO-Mäusen nach zwei und sieben Tagen miteinander vergleichen.

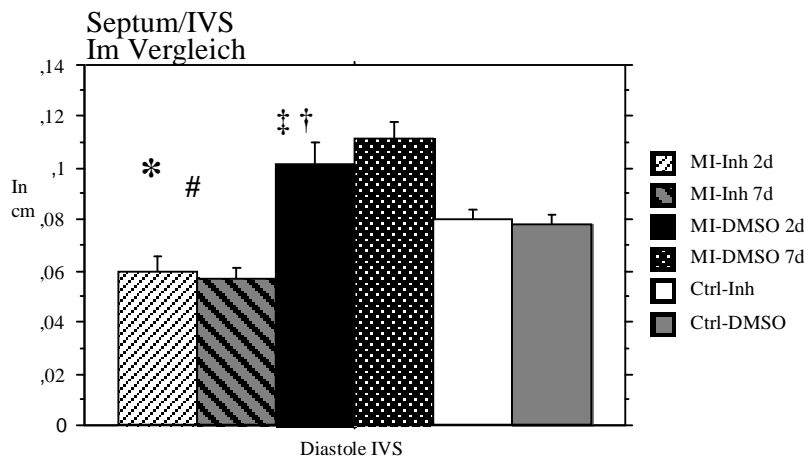


Diagramm 22

* $p < 0,0007$ MI-Inh 2 Tage vs. MI-DMSO 2 Tage

$p < 0,0001$ MI-Inh 7 Tage vs. MI-DMSO 7 Tage

‡ $p < 0,003$ MI-DMSO 7d vs. Ctrl-Inh

† $p < 0,0008$ MI-DMSO 7d vs. Ctrl-DMSO

Betrachtet man dieses Diagramm, so kann man erkennen, dass die Größe der einzelnen Balken sehr hohe Übereinstimmung mit denen aus der histologischen Darstellung hat. (3.1.1.4).

Sieht man die Resultate aller Gruppen in Bezug auf das Septum im Vergleich, so erkennt man zum einen, dass sich das Septum der MI-Tiere mit DMSO-Lösung im Verlauf von einer Woche zunehmend verdickt (0,10 beziehungsweise 0,11 cm), verglichen mit dem gesunder, das heißt nicht-infarzierter Kontroll-Tiere (beide 0,08 cm). Des Weiteren kann man feststellen, dass das Septum von mit Integrin-Inhibitor behandelten Infarkt-Mäusen dünner wird (beide 0,06 cm), verglichen mit dem von Kontroll-Mäusen.

Betrachtet man die Entwicklung des Septums nach zwei, beziehungsweise sieben Tagen innerhalb einer Infarktgruppe, so sieht man das bei den Mäusen mit DMSO-Lösung dieser Wandabschnitt nach sieben Tagen noch einmal um 0,01 cm dicker ist als nach zwei Tagen. Allerdings ergibt dieser Vergleich keine signifikante Differenz.

Bei den integrin-inhibierten Tieren zeigt sich im Vergleich ebenso tendenziell eine weitere Verdünnung des intraventrikulären Wandabschnitts im Verlauf von sieben Tagen, wenn auch ebenfalls nicht signifikant.

Auffällige Signifikanzen finden sich, wie bereits in 3.1.2.2 und 3.1.2.3 erwähnt, vor allem im Vergleich der MI-DMSO-Tiere mit den MI-Inhibitor-Tieren, sowohl nach zwei als auch nach sieben Tagen, wobei die Unterschiede zum letzteren Zeitpunkt sogar noch zunehmen (P-Value < 0,0001).

Weiterhin ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen der Myokardinfarkt-Gruppe mit DMSO nach sieben Tagen zu beiden Kontrollgruppen. Diese Resultate ergeben eine signifikante Zunahme des Septum-Durchmessers im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen.

Auch in Bezug auf die freie Wand FW des linken Ventrikels ergeben sich ähnliche Resultate, jedoch nicht so gravierende Unterschiede wie beim Septum. Dennoch sei hier folgendes Histogramm aufgeführt:

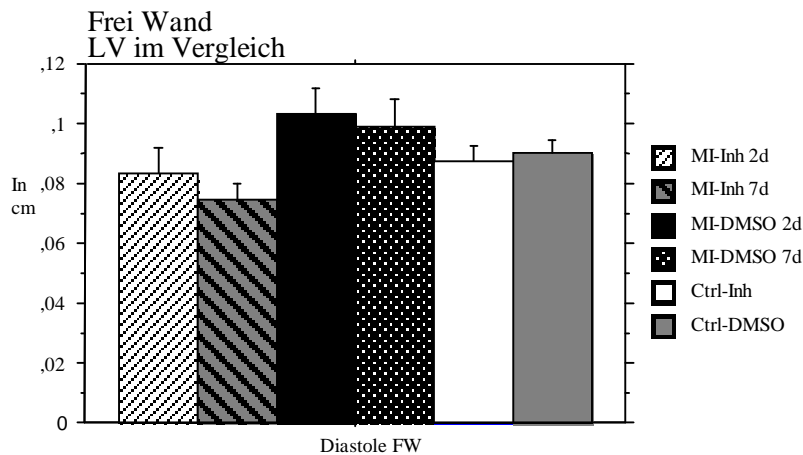


Diagramm 23

Auch hier erkennt man eine Zunahme der Wanddicke bei MI-DMSO-Tieren sowie eine Abnahme bei MI-Inhibitor-Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Vergleich der durchschnittlichen Ejektionsfraktion der einzelnen Gruppen. Wie bereits im Vorfeld erwähnt, nimmt das FS bei den Kontroll-Inhibitor-Tieren im Vergleich zu allen Gruppen mit Infarkt signifikant zu, und vergrößert sich auch im Vergleich zu den Kontroll-Tieren mit DMSO auffallend.

Des Weiteren nimmt das FS der MI-Inhibitor-Tiere auch im Vergleich zu den MI-DMSO-Tieren sowohl nach zwei als auch nach sieben Tagen ab, das heißt die Pumpleistung des Herzens verringert sich stärker bei integrin-inhibierten Infarkttieren als bei Infarkttieren mit DMSO im Vergleich zu den Kontroll-Tieren, wie aus folgendem Histogramm ersichtlich.

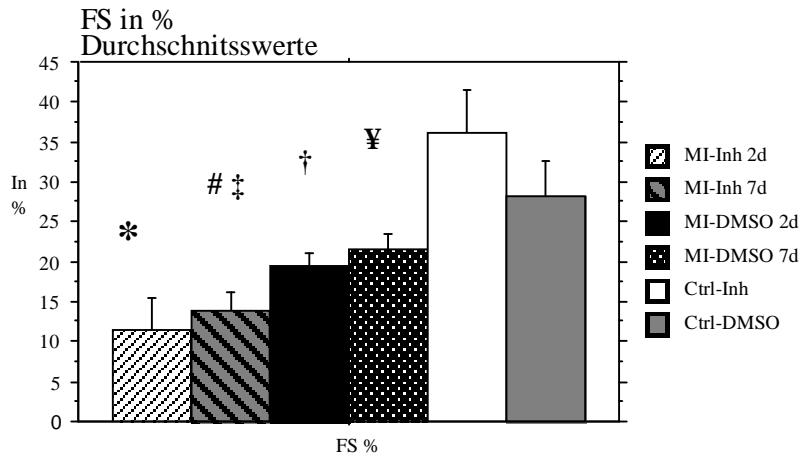


Diagramm 24

* $p < 0,0004$ MI-Inh 2 Tage vs. Ctrl-Inh

$p < 0,0001$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-Inh

‡ $p < 0,002$ MI-Inh 7 Tage vs. Ctrl-DMSO

† $p < 0,001$ MI-DMSO 2 Tage vs. Ctrl-Inh

¥ $p < 0,003$ MI-DMSO 7 Tage vs. Ctrl-Inh

Zusammenfassend kann man erkennen, dass das FS der MI-Tiere im Vergleich zu den Kontroll-Inhibitor-Tieren signifikant geringer ist, stärker bei den Tieren mit Inhibitor und am ausgeprägtesten mit einem P-Value-Wert $< 0,0001$ bei den MI-Inhibitor-Tieren nach sieben Tagen.

Zusätzlich ist bei dieser Gruppe das FS auch signifikant geringer im Vergleich zur Kontroll-DMSO-Gruppe.

Zusammenfassend kann man bei der echokardiographischen Untersuchung feststellen:

1. Die Kontroll-Gruppen unterscheiden sich lediglich in der Ejektionsfraktion voneinander; die Gruppe mit Inhibitor vergrößert ihr FS.
2. Die MI-DMSO-Mäuse hypertrophieren im Verlaufe einer Woche in allen betrachteten Wandbereichen. Das FS sinkt nach zwei Tagen, steigt nach sieben Tagen wieder leicht an.
3. Die MI-Inhibitor-Mäuse bekommen im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen schmalere Wände im Verlaufe einer Woche. Das FS sinkt stärker als bei den DMSO-Tieren, steigt allerdings nach sieben Tagen ebenfalls wieder leicht an.

3.2 PROTEINANALYSE

3.2.1 Western Blot

Mit Hilfe der proteinanalytischen Methodik möchte man feststellen, welche Art von Proteinen in den unterschiedlichen Gruppen in welcher Menge exprimiert werden. Ein besonderes Interesse gilt hier den Proteinen und Rezeptoren die eine wichtige Bedeutung in der Entwicklung von Herzhypertrophie haben. Vor allem die in die Integrin-Kaskade involvierten Protein- bzw. Tyrosin-Kinasen Fak (focal adhesion kinase), c-Src, p-38 und ERK 1/2 sollen hier beobachtet werden.

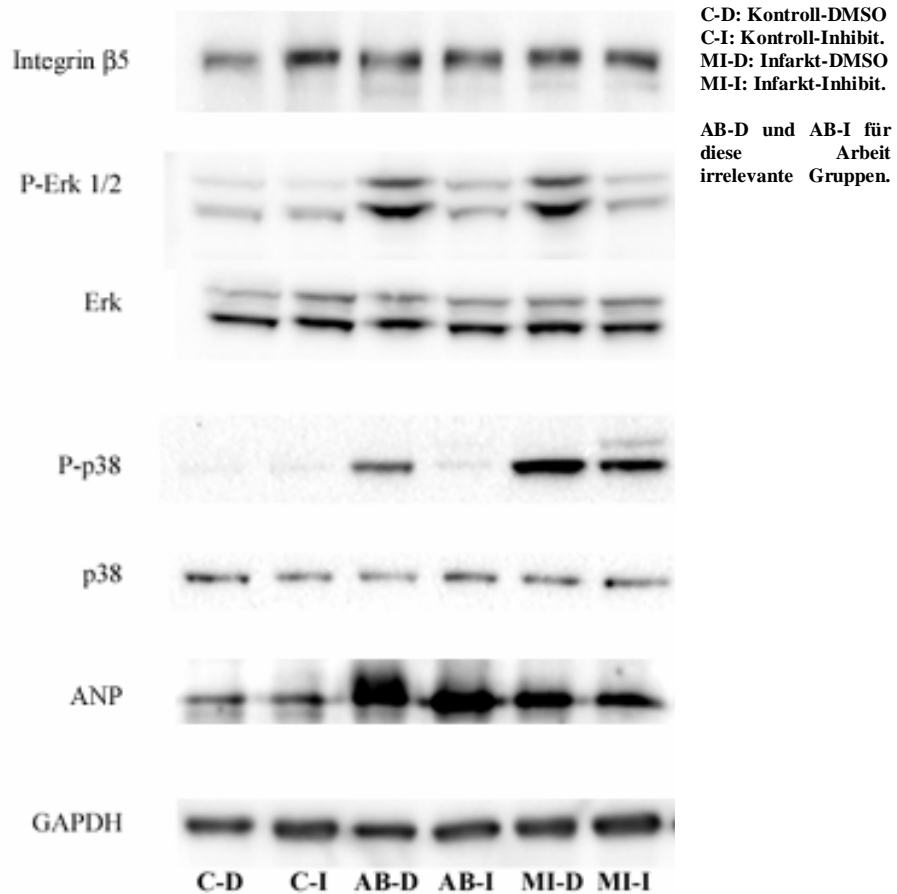


Abb.32 Proteinanalyse verschiedener Gruppen nach sieben Tagen im Vergleich (Teil 1)

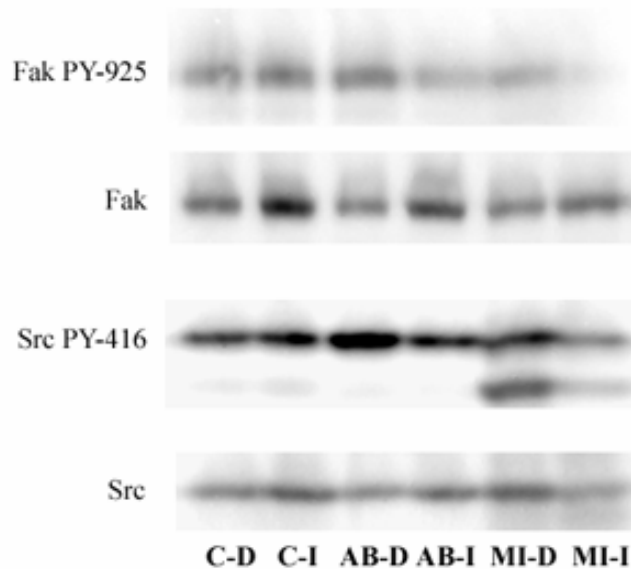


Abb.33 Proteinanalyse verschiedener Gruppen nach sieben Tagen im Vergleich (Teil 2)

Dieser repräsentative Western Blot zeigt die Auftrennung nach verschiedenen Proteinen je nach Molekulargewicht. Anhand der Schwarzfärbung einer Bande kann man die Intensität und die Quantität eines Proteins abschätzen. Je dunkler eine Bande, desto häufiger kommt das Element in dieser Gruppe vor.

Wenn man die Proteinanalyse betrachtet, so erkennt man, dass der β 5-Integrin-Rezeptor bei allen Gruppen in gleicher Menge vorhanden ist.

Ebenso fällt auf, dass die nicht-aktivierten Enzyme Fak, Src und p-38 sowohl in beiden Kontroll-Gruppen als auch in beiden Infarkt-Gruppen in gleicher Intensität enthalten sind.

ANP als Marker für den Wandstress erscheint in beiden Infarkt-Tieren gleich, in den Kontroll-Tieren kaum. Das zeigt, dass beide herzgeschädigten Tiere einem fast identischem Wandstress ausgesetzt sind.

Auffällige Unterschiede zeigen sich in den phosphorylierten Tyrosin-Kinasen, p-ERK $\frac{1}{2}$, Fak PY-925, Src PY-416 und p-p38. Während diese in den Infarkt-Tieren mit DMSO-Lösung stark aktiviert werden, scheinen sie in den integrin-inhibierten Tieren mit Infarkt nahezu zu fehlen. Einzige Ausnahme stellt das phosphorylierte p-38 dar, das auch in geringen Mengen im integrin-inhibierten Tier vorkommt.

Am auffälligsten erscheinen die Unterschiede im Bereich der aktivierten Erk $\frac{1}{2}$ -Kinase.

Erwähnt werden muss noch, dass es in der Kontroll-Inhibitor-Gruppe zu einer vermehrten Expression von nicht-aktiviertem FAK kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibierung des α v/ β 5-Integrins sieben Tage nach Myokardinfarkt das Vorkommen der untersuchten Tyrosin-Kinasen nicht reduziert, jedoch deren Aktivierung verhindert beziehungsweise vermindert.

GAPDH, ein Kontrollwert für die Proteinlademenge, erscheint in allen Tieren gleich. Das heißt, es wurden bei allen Tieren die gleichen Proteinmengen untersucht.

3.2.2 Antikörperbeschichtete Gefrierschnitte

3.2.2.1 Darstellung von nicht aktiviertem FAK

Im folgenden Verlauf soll das Vorhandensein von FAK in den unterschiedlichen Untergruppen der Versuchsreihe dargestellt und verglichen werden:

(1) Kontrolltier mit DMSO

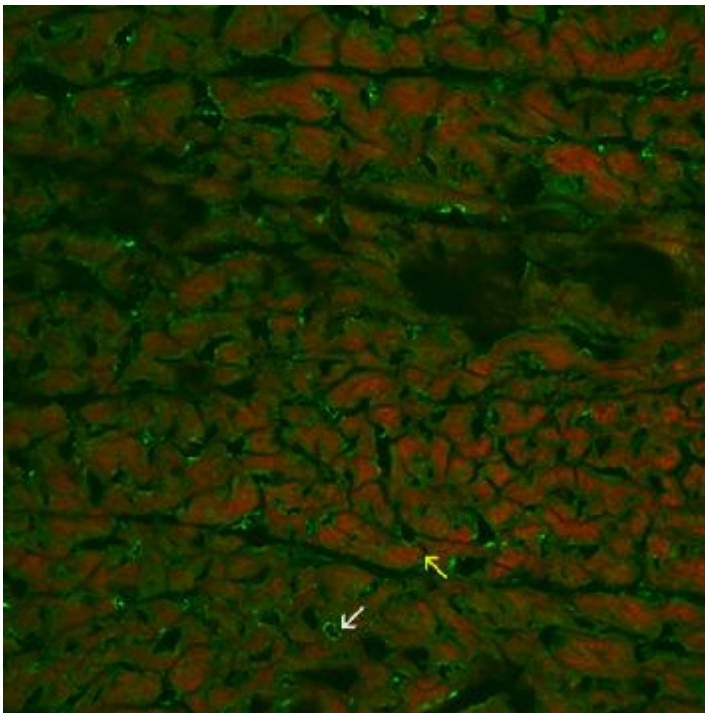


Abb.34 FAK-Ctrl-DMSO

Der weiße Pfeil stellt die Konzentration an FAK am Gefäßendothel dar, der gelbe das der Zytoplasmamembran. Diese Kartierung wird beibehalten.

(2) Kontrolltier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor

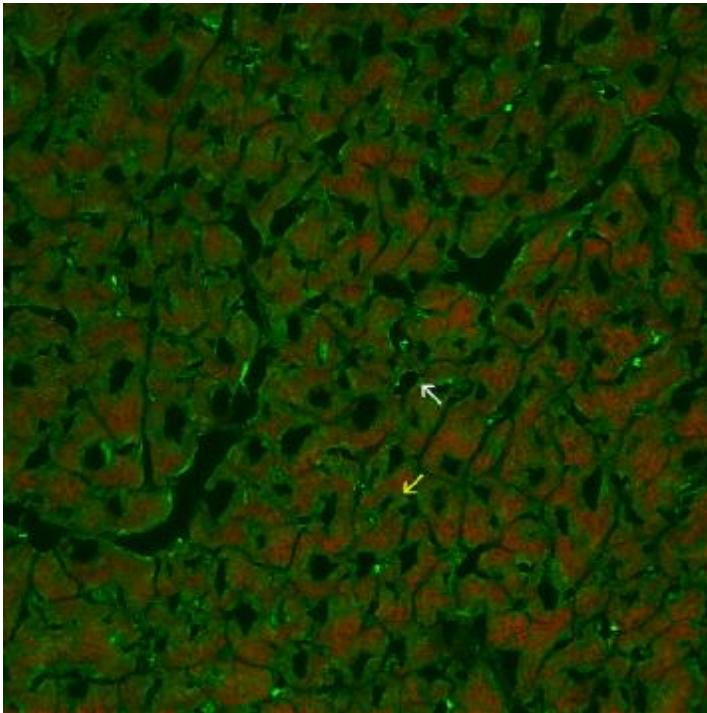


Abb.35 FAK Ctrl-Inhibitor

(3) Myokardinfarkt tier mit DMSO nach 7 Tagen

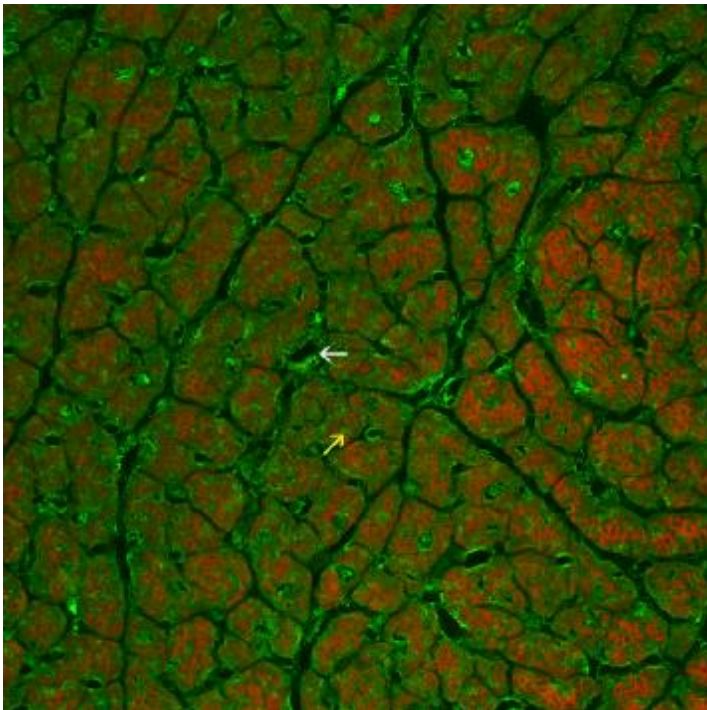


Abb.36 FAK MI-DMSO

(4) MyokardinfarktTier mit Integrin- $\alpha\beta$ 5-Inhibitor nach 7 Tagen

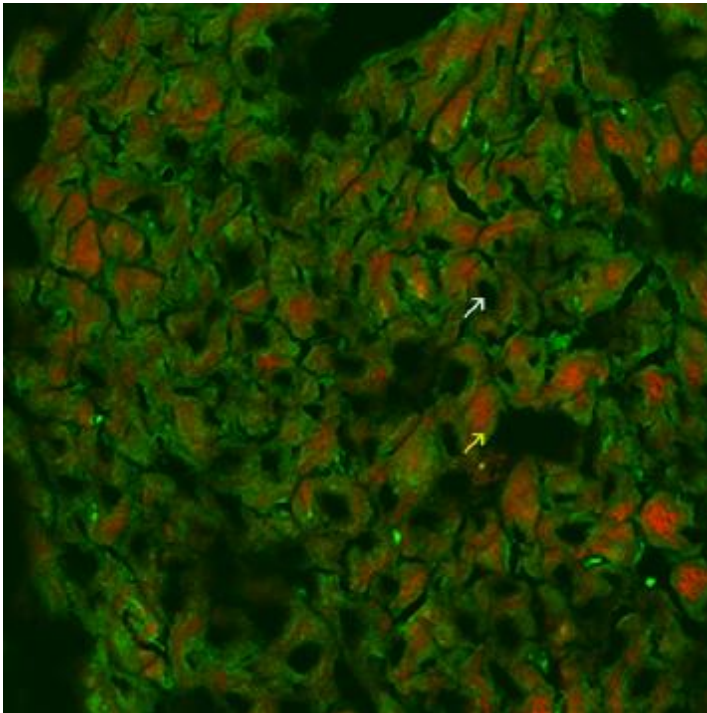


Abb.37 FAK MI-Inhibitor

Vergleicht man die Intensität der FAK-Färbung der unterschiedlichen Gruppen, so kann man feststellen, dass in keiner der Untersuchungsgruppen signifikante Differenzen zu erkennen sind. Bei allen Gruppen scheint eine annähernd gleiche Konzentration zytoplasmatischen und vesikulären FAKs in nicht aktiver Form vorzuliegen. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse überein.

3.2.2.2 Darstellung von phosphorylierten FAK-PY 925

Auf Grund des obigen Ergebnisses ist es nun von besonderem Interesse, welche Konzentrationen sich bei aktiviertem FAK-PY 925 ergeben. Auch hier vergleicht man wieder alle Gruppen.

(1) Kontrolltier mit DMSO

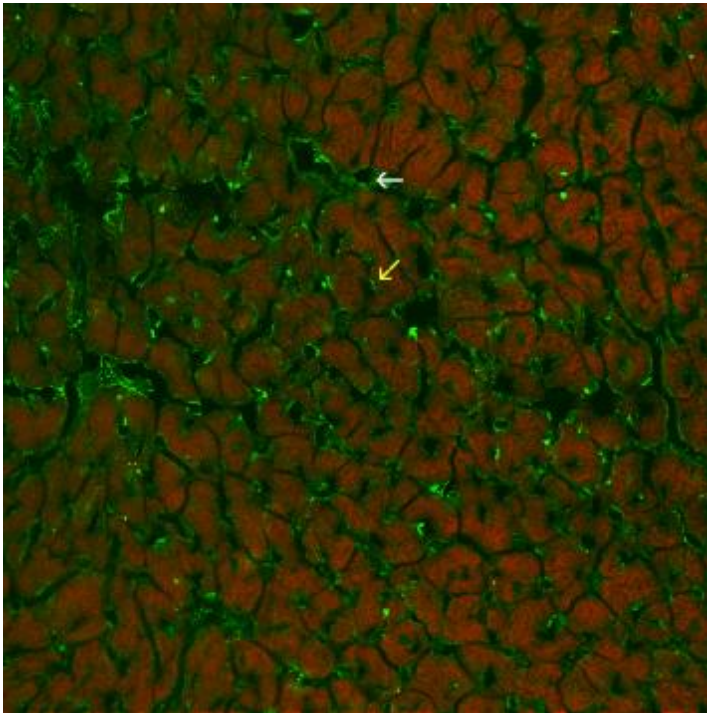


Abb.38 FAK-PY 925 Ctrl-DMSO

(2) Kontrolltier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor

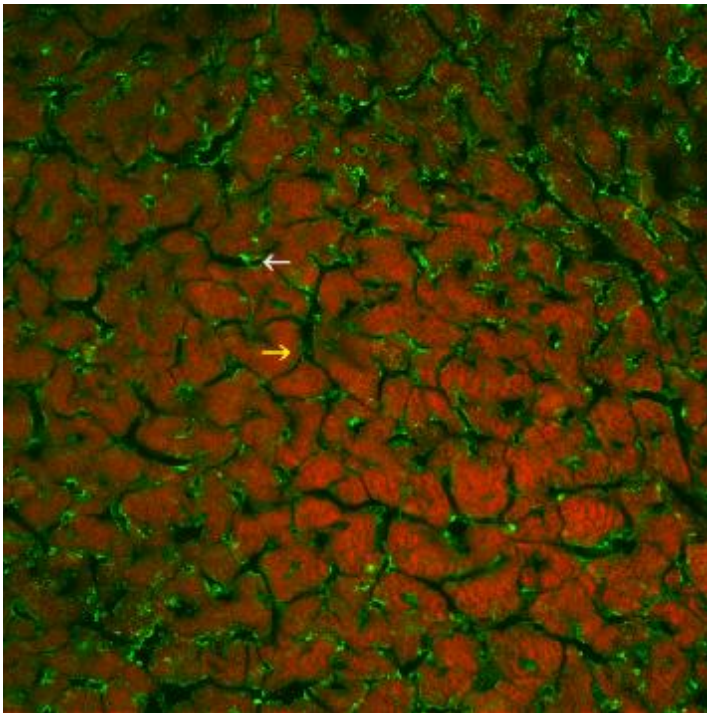


Abb.39 FAK-PY 925 Ctrl-Inhibitor

(3) Myokardinfarkt tier mit DMSO nach 7 Tagen

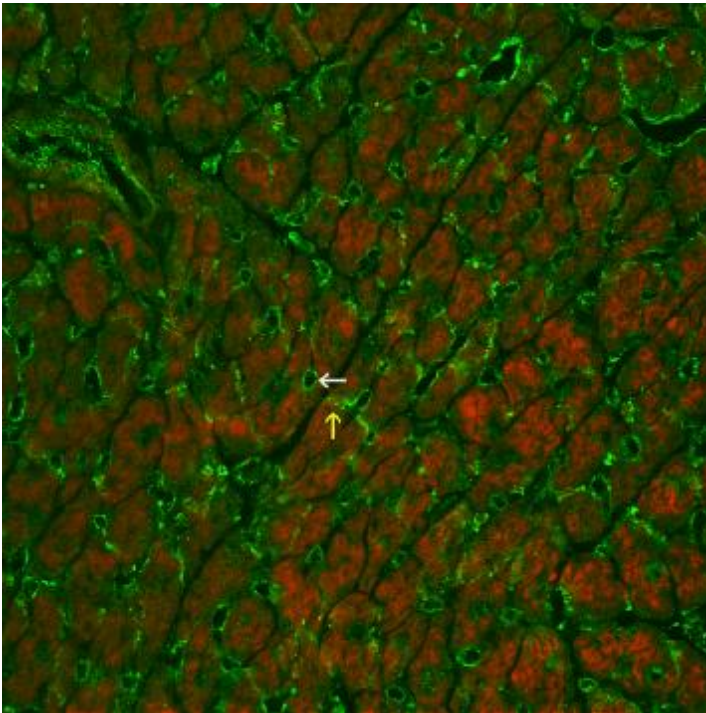


Abb.40 FAK-PY 925 MI-DMSO

(4) Myokardinfarkt tier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor nach 7 Tagen

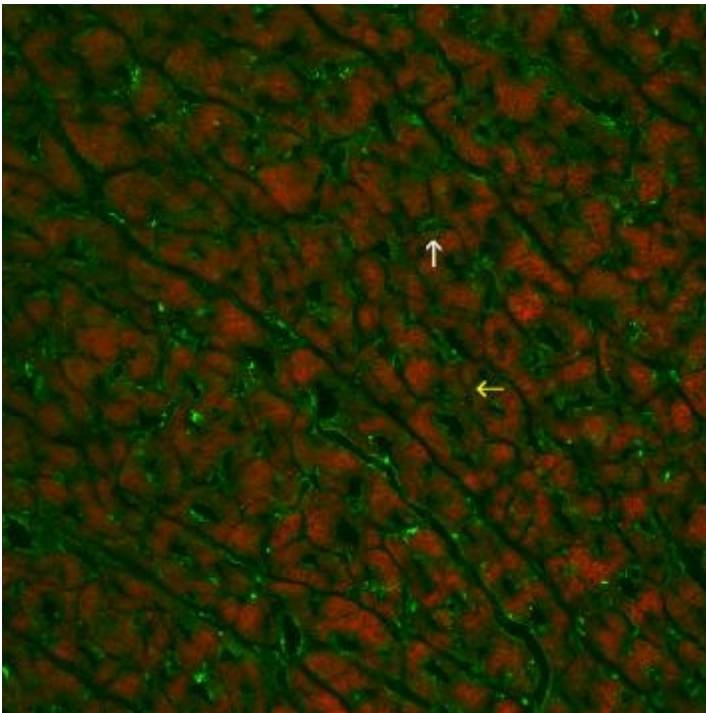


Abb.41 FAK-PY 925 MI-Inhibitor

Vergleicht man nun die Intensität der Fluoreszenz des aktivierten FAK-PY 925 so erkennt man, dass sich Kontrolltiere mit DMSO und Inhibitor ähneln. Das Infarkt tier mit DMSO

zeigt eine deutliche Zunahme an phosphoryliertem FAK, die Intensität hat im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich zugenommen. Auffällig sind die Unterschiede zwischen den Infarkttieren mit Inhibitor zu denen mit DMSO. Bei ersteren zeigt sich eine wesentlich geringere Konzentration an aktiviertem FAK.

Auch diese Bilder bestätigen die Ergebnisse aus den Westernblot-Analysen.

3.2.2.3 Darstellung von nicht aktiviertem Src

(1) Kontrolltier mit DMSO

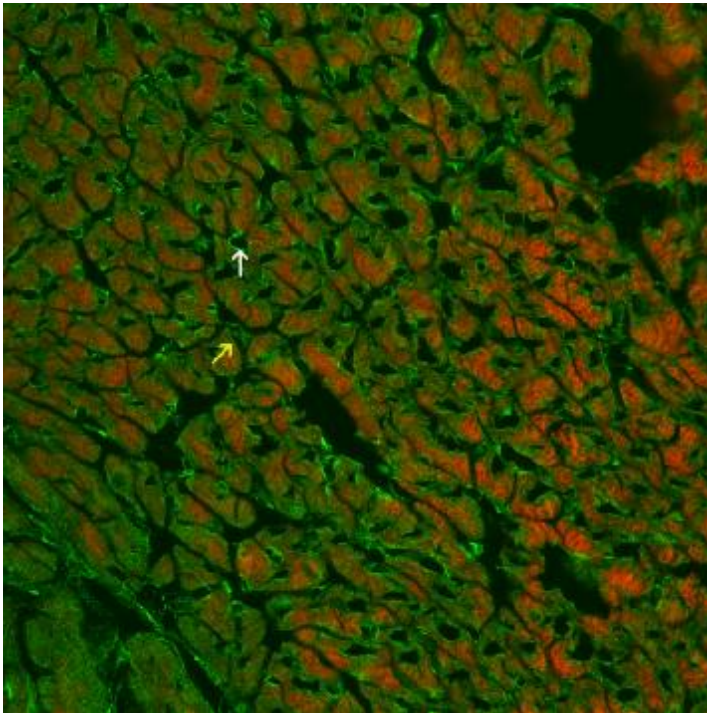


Abb.42 c-Src Ctrl-DMSO

(2) Kontrolltier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor

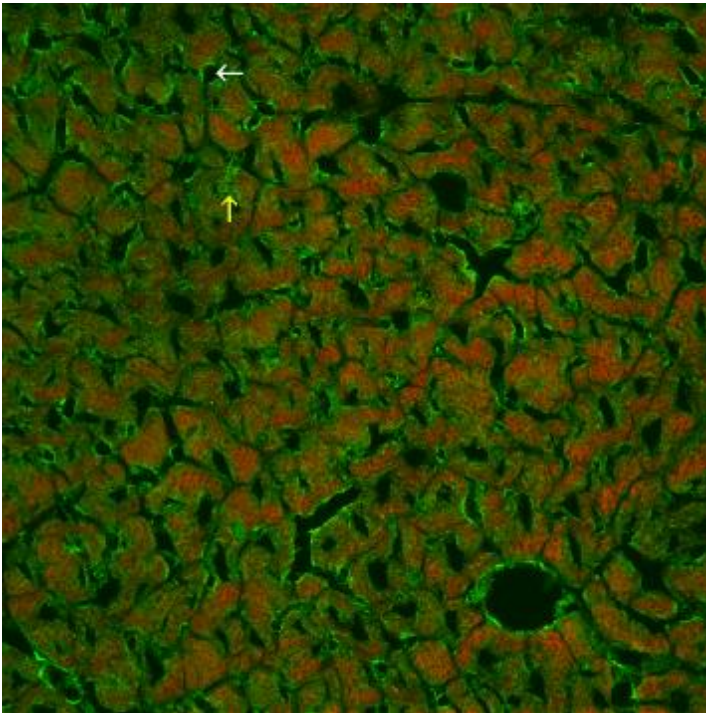


Abb.43 c-Src Ctrl-Inhibitor

(3) Myokardinfarkt tier mit DMSO nach 7 Tagen

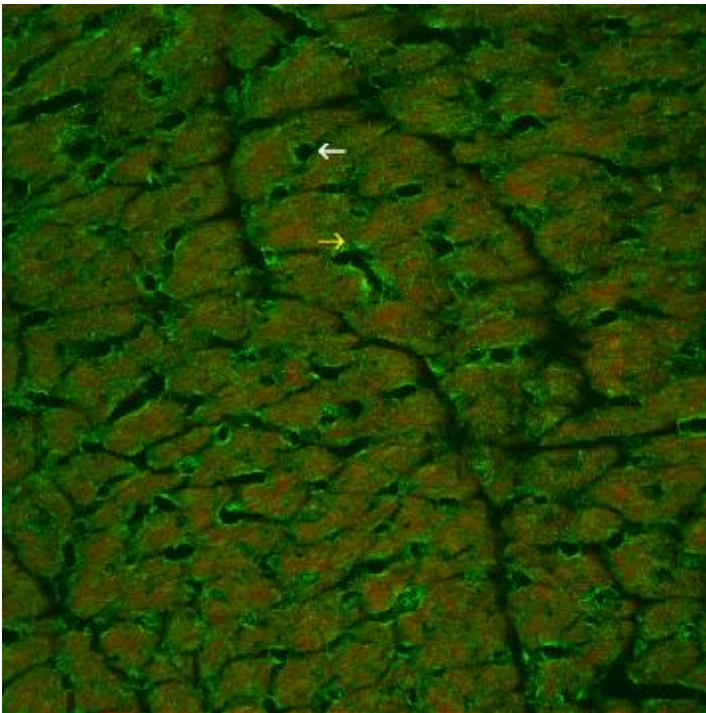


Abb.44 c-Src MI-DMSO

(4) MyokardinfarktTier mit Integrin- $\alpha\beta$ 5-Inhibitor nach 7 Tagen

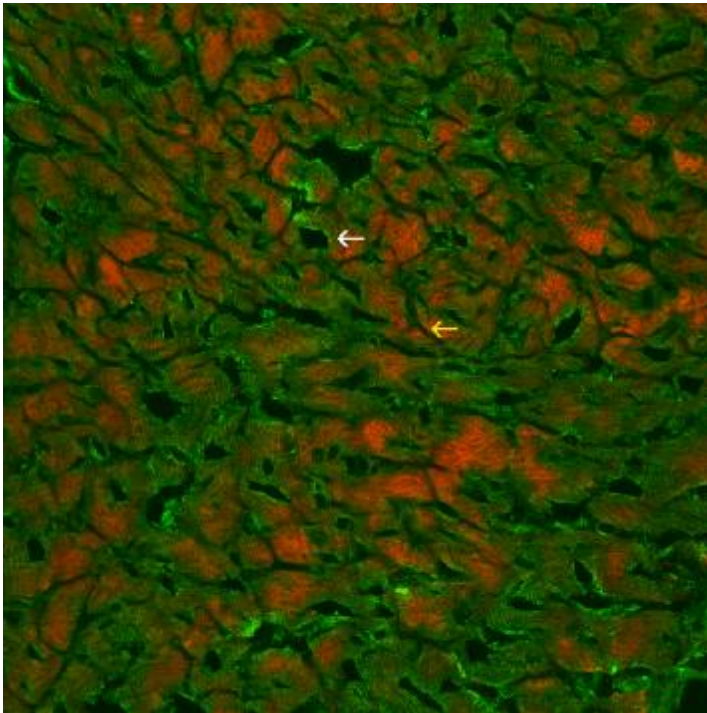


Abb.45 Src MI-Inhibitor

Ähnlich dem Befund bei nichtaktiviertem FAK (3.2.2.1) zeigen sich auch bei nichtaktiviertem c-Src keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Schnitte. Hier lassen sich die Ergebnisse ebenso mit denen aus den Westernblots vereinbaren

3.2.2.4 Darstellung von phosphoryliertem Src-PY 416

Da sich auch bei der Konzentration von Src an Zellmembran und vesikulär im inaktiven Zustand keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigen, sollen die Veränderungen aktiviertes Src betreffend im folgenden Verlauf bildlich dargestellt werden.

(1) Kontrolltier mit DMSO

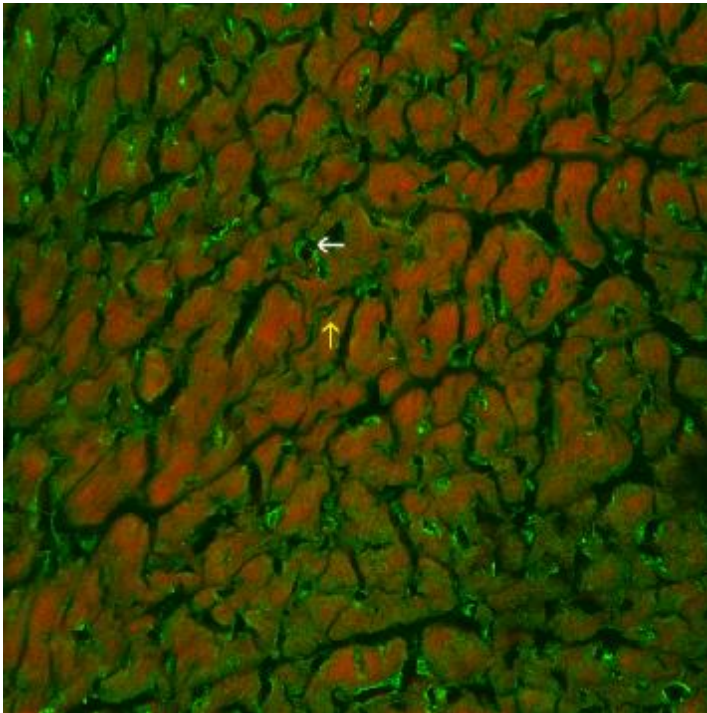


Abb.46 Src-PY 418 Ctrl-DMSO

(2) Kontrolltier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor

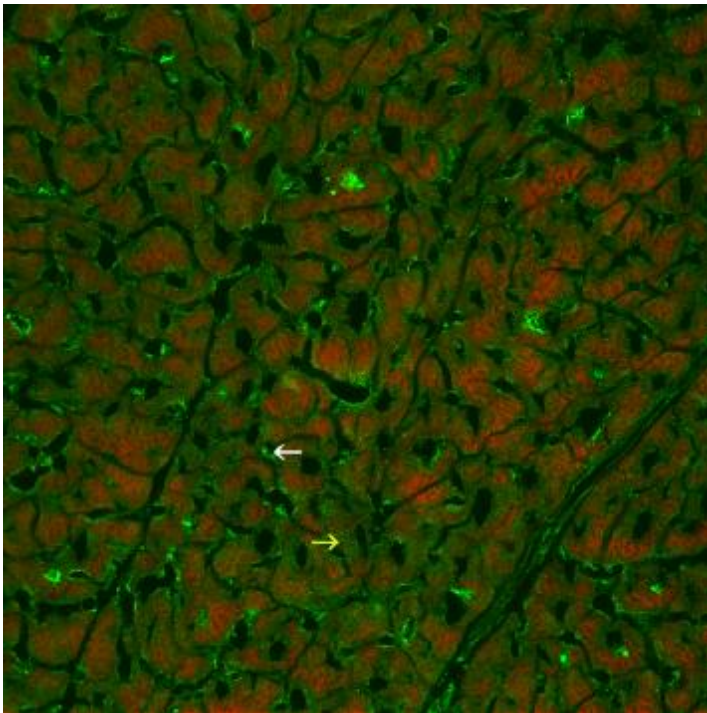


Abb.47 Src-PY 418 Ctrl-Inhibitor

(3) Myokardinfarkt tier mit DMSO nach 7 Tagen

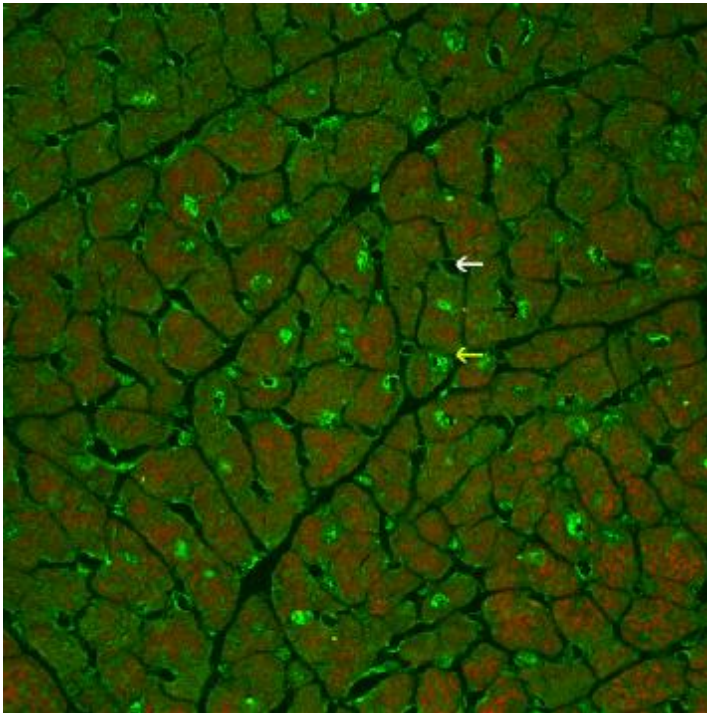


Abb.48 Src-PY 418 MI-DMSO

(4) Myokardinfarkt tier mit Integrin- $\alpha\beta 5$ -Inhibitor nach 7 Tagen

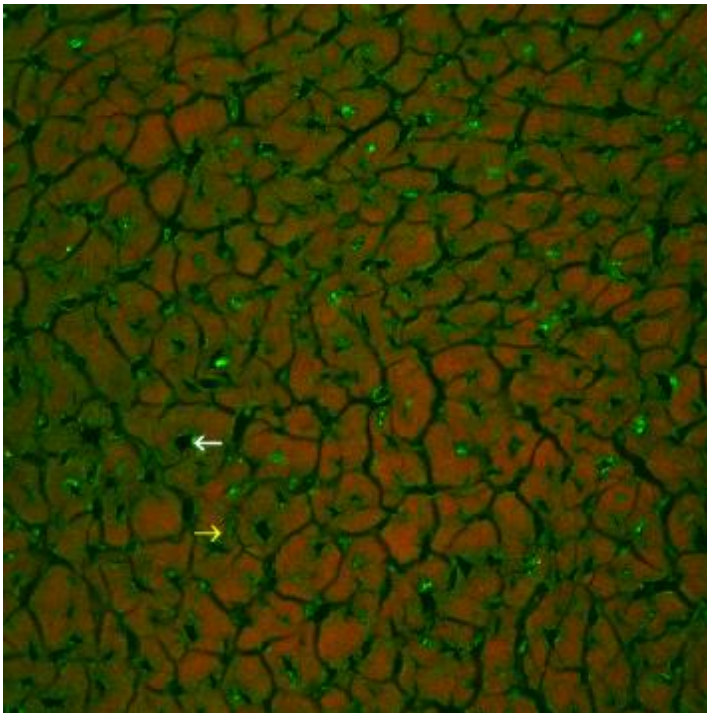


Abb.49 Src-PY 418 MI-Inhibitor

Die Unterschiede in der Darstellung des aktivierten Src-PY 416 sind an den Gefrierschnitten sichtbar. So unterscheiden sich die Kontrolltiere kaum voneinander. Im Infarkttier mit DMSO-Lösung zeigt sich eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz, und zwar an mehreren Stellen: zum einen an der Zellmembran, zum anderen in den Gefäßwänden und zum dritten auch in den Zellkernen (schwarzer Pfeil). Dieser Zusammenhang wird noch zu diskutieren sein, da nicht aktiviertes Src im Zellkern nicht nachzuweisen ist.

Im integrin-inhibierten Tier sieht man keine Zunahme des phosphorylierten Src. Die Anzahl der antikörpergebundenen Moleküle scheint sogar geringer zu sein als bei den Kontrolltieren. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten des Westernblots überein. Auch dort sind im inaktiven Zustand die Konzentrationen von Src bei allen Gruppen nahezu gleich, im aktivierten Zustand zeigen sich auch dort starke Differenzen zwischen Myokardinfarktieren mit Inhibitor und ohne.

Zusammenfassend lässt sich bei der Proteinanalyse folgendes festhalten:

1. Western Blot und Antikörperbeschichtung von Gefrierschnitten ergeben nahezu übereinstimmende Resultate bei den gemeinsam überprüften Molekülen.
2. Integrin $\beta 5$ ist im Western Blot in allen Gruppen in gleicher Menge vorhanden.
3. Im nichtaktivierten Zustand ergeben sich weder bei Src oder FAK in beiden Modellen, noch bei ERK im Western Blot Unterschiede bei den einzelnen Gruppen.
4. Im infarzierten Mäuseherz kommt es zu einem signifikanten Anstieg von ERK $\frac{1}{2}$ -Kinase, im integrin-inhibierten Infarkttherz fehlt dieser Anstieg.
5. Im infarzierten Mäuseherz kommt es zu einem Anstieg phosphorylierten FAKs und Srcs, sowohl im Western Blot als auch im Gefrierschnitt, im inhibierten Infarkttherz liegt dieser Anteil sogar unter dem der Kontrollgruppen.
6. Phosphoryliertes p38 steigt bei beiden Infarktgruppen an, bei den Kontrollgruppen nicht

3.3 MORTALITÄTSUNTERSCHIEDE

Ein wichtiges Resultat während der Untersuchungen ergab die Mortalität der beiden Myokardinfarkt-Gruppen. Anhand folgenden Diagramms ist dies ersichtlich.

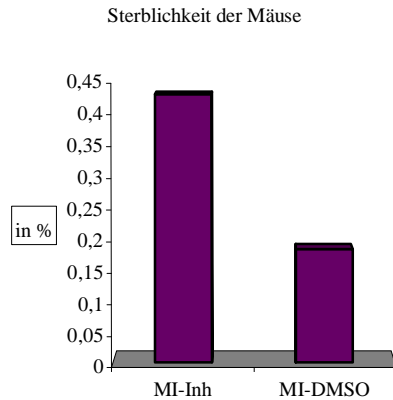


Diagramm 25 Mortalität von Myokardinfarkt-Inhibitor-Tieren und Myokardinfarkt-DMSO-Tieren nach 3 Tagen im Vergleich

Während der Versuche starben innerhalb der ersten Woche mehr als doppelt so viele Tiere mit $\alpha\beta 5$ -Integrin-Inhibitor-Gabe und induziertem Herzinfarkt als ohne (42,5% im Vergleich zu 18% bezogen auf die jeweilige Anzahl pro Gruppe).

Bei den Kontroll-Gruppen war die Mortalität unabhängig von Integrin-Inhibitor-Pumpe gleich, nämlich 0%.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inhibierung des Integrin αv Folgen für die Funktion eines Myokardinfarkttherzens hat, ob es zu strukturellen Veränderungen im Vergleich zu anderen Myokardinfarkt-Mäusen kommt und ob diese Veränderungen auch auf molekularer Ebene sichtbar werden.

Wie bereits erwähnt konnten zahlreiche Arbeiten an verschiedenen Tiermodellen, den Einfluss von Integrinen auf Veränderungen der EZM, der Synthese von Proteinen und der Angiogenese zeigen [142, 143].

Nach Myokardinfarkt kommt es zu ausgedehnten Veränderungen (remodeling) sowohl in Myozyten als auch in der EZM [135, 15].

Beteiligung von α -Untereinheiten der Integringruppe und von $\beta 1$ und $\beta 3$ an diesem Prozess konnten bisher belegt werden [135, 144].

Die bisherigen Resultate zum Einfluss von Integrinen auf die Entstehung von Herzhypertrophie nach einem Myokardinfarkt entsprechen den Resultaten der biochemischen Veränderungen bei anderweitig induzierter Hypertrophie [68, 111, 145].

Von uns wurde nun primär untersucht, welcher Zusammenhang zwischen Herzhypertrophie nach Myokardinfarkt und Integrin αv besteht.

Ein Einfluss von dieser Unterform auf die Entstehung von Herzhypertrophie wurde von Kuppuswamy et al. am Katzenmodell nach Pulmonalarterienkonstriktion beschrieben [111]. Ebenso konnte ein gleichzeitiges Ansteigen der von uns untersuchten Moleküle FAK und Src entdeckt werden [112]. Am Mäuseherzen arbeiteten Joner et al. zum erstenmal mit einem Inhibitor von Integrin αv [113].

4.1 Morphologische und funktionelle Veränderungen

Nach einem Myokardinfarkt kommt es am linken Ventrikel zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen wie kompensatorische Hypertrophie in nichtinfarziertem Gewebe und Dilatation [7, 15, 139]. Dies geschieht unter anderem durch die Aktivierung zahlreicher neurohumoraler Systeme [146].

Welche Stellung Integrin αv in dem Prozess der Hypertrophie-Entwicklung einnimmt, ist bisher weitestgehend unklar. Es wurde zwar, wie bereits erwähnt, ein Zusammenhang

beschrieben, allerdings sind die genauen Folgen einer Inhibierung dieses Subtyps nicht bekannt.

Nun war von Interesse, welche Unterschiede die verschiedenen Untersuchungsgruppen aufwiesen und welche Veränderungen bei den Tieren mit Integrin-Inhibierung im Vergleich zu denen ohne auftraten.

Hierfür wurden die Tiere echokardiographisch und histologisch untersucht. Mittels Echokardiographie war man in der Lage das Herz am lebenden Tier zu untersuchen und die Entwicklung der Tiere zu beobachten. Echokardiographie am Tiermodell ist mittlerweile erprobt und bewährt. An der Maus beschrieben unter anderem Kanno et al. diese Methode [139].

Die histologische Untersuchung des Gewebes ist ebenso etabliert und dient einer weiteren Unterstützung der echokardiographisch diagnostizierten Veränderungen.

Diese Resultate wurden dann statistisch ausgewertet. Es lässt sich festhalten, dass es in beiden Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen kommt. Man kann daraus schließen, dass diese beiden Untersuchungsmethoden eine gute Darstellung von morphologischen Vorgängen am Versuchstierherzen ermöglichen.

Vergleicht man die Entwicklung des interventrikulären Wandabschnittes, so stellt man fest, dass die Mäuse mit Myokardinfarkt innerhalb von zwei Tagen eine Zunahme des Wanddurchmessers entwickeln, der nach sieben Tagen noch größer ist. Dies bestätigt die bereits bekannten Ergebnisse [15], dass es nach Infarkt zu einer kompensatorischen Herzhypertrophie kommt.

Die Tatsache, dass es bei den integrin-inhibierten Tieren nicht zur Hypertrophie des Septums, sondern sogar zu einer Verschmälerung kommt, ist von entscheidender Bedeutung. Das Septum ist bei der Gruppe mit Inhibitor nur noch halb so dick wie bei der Infarktgruppe mit Hypertrophie. Dieses Resultat ist insofern interessant, da es ganz neue Erkenntnisse für die Entwicklung von Hypertrophie am Herzen bringt. Es bietet sich hier eine neue Option in der Ursachenforschung der Herzinsuffizienz. Diese Folge einer Ausschaltung von Integrin α_v war bisher nicht bekannt und sollte durch weitere Experimente bestätigt werden.

An der freien Wand des linken Ventrikels kommt es zu ähnlichen Veränderungen. Schon nach zwei Tagen zeigen sich zwischen beiden Infarktgruppen deutliche Unterschiede. Bei den Tieren mit DMSO tritt Hypertrophie ein, bei denen mit Inhibitor nicht. Nach sieben Tagen ist dieser Unterschied noch ausgeprägter.

Septum und linksventrikuläres Myokard weisen zeitgleiche Veränderungen auf. Diese Veränderungen im Echo zeigten sich auch in der histologischen Untersuchung.

Anhand dieser Tatsache kann man vermuten, dass Integrin α_v einen essentiellen Einfluss auf die Struktur des Myokards hat und für die Entwicklung von Zellwachstum am stressbelasteten Herzen notwendig ist. Ein Fehlen dieses Integrins könnte sogar zu einer vermehrten Apoptose im geschädigten Herzen zu führen. Dies wäre eine Erklärung für die sogar im Vergleich zu den Kontroll-Tieren verschmälerte Herzwand. Eine andere wäre die Möglichkeit einer „Dehnung“ der Herzzellen. Eine Blockade der Verbindung von EZM über Integrine zum Zytoskelett, beziehungsweise des „inside-outside-signalling“ könnte eine zugrunde liegende Pathologie der Dilatation sein.

Im gesunden Herzen scheint es dagegen folgenlos auf die Herzwände zu bleiben, da sowohl die Kontrolltiere mit als auch ohne Inhibitor keine Unterschiede in der Wanddicke aufweisen. Anscheinend wird dieses Integrin benötigt um ein geregeltes Zellwachstum und eine Kompensation eines Gewebeschadens in geschädigten Herzen aufrechtzuerhalten.

Des Weiteren fällt auf, dass der linke Ventrikel beider Infarkt-Gruppen nach zwei Tagen im Vergleich zu den Kontrollgruppen dilatiert (jeweils 0,14cm gegenüber jeweils 0,10cm im histologischen Schnitt Statistik 7). Dies geht mit dem Ergebnis von Sutton et al. und Pfeffer et al. einher, die behaupten, dass es nach einem Herzinfarkt unter anderem zu signifikanter Dilatation des LV kommt [3, 15]. Entscheidend ist allerdings das Resultat, dass es bei unserer Arbeit bei den Tieren mit α_v -Inhibitor nach sieben Tagen zu einer schnelleren Dilatation auf 0,18 cm kommt, während der Durchmesser bei Tieren mit DMSO sich nicht so abrupt dilatiert und eine Gegenregulation entwickelt (0,11cm). Im Herzecho erkennt man diese Entwicklung nach sieben Tagen sowohl in der Systole als auch in der Diastole (B-Mode). Auffällig ist hier auch die geringe Veränderung des Diameters zwischen einer Herzaktion bei integrin-inhibierten Tieren. Dies bedingt auch die schlechte Auswurffraktion auf Grund mangelhafter Kontraktilität bei dieser Untersuchungsgruppe und die daraus resultierende erhöhte Mortalität. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sieben Tage nach einem Infarkt die DMSO-Tiere kein derartig akutes Pumpversagen entwickeln (FS 21,7% bei MI-DMSO verglichen zu 28,2% bei Kontroll-DMSO).

Die mangelnde Kompensation des Gewebeschadens bei integrin-inhibierten Infarktmäusen dagegen führt zu einer signifikanten Verschlechterung der Herzfunktion (FS 13,5% nach sieben Tagen). Während sich diese bei den Infarkttieren mit Kontrolllösung relativ rasch ein wenig erholt, bleibt sie bei den Tieren mit Inhibitor signifikant schlecht. Ein normaler Wert müsste bei mehr als 25% liegen. Dieses Pumpversagen scheint auch die Hauptursache der erhöhten Mortalität dieser Gruppe zu sein (42,5% gegenüber 18% bei MI-DMSO). Im

Ultraschall kann man die mangelnde Pumpleistung und die Hypokinese der freien Wand des LV gut beobachten. Im M-Mode zeigt sich fast eine amotile Kontraktionslinie, im B-Mode zeigt sich das Herz zwischen Systole und Diastole nahezu unverändert. Integrin αv hat nach diesen Resultaten eine wichtige Bedeutung für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens nach Myokardinfarkt.

Interessant ist allerdings auch die Tatsache, dass es bei Kontrolltieren mit Integrin-Inhibitor zu einer Zunahme der Ejektionsfraktion und damit des FS kommt (36,2% gegenüber 28,2% bei Kontroll-DMSO). Dies könnte bedeuten, dass sich eine Inhibierung von αv Integrin positiv auf die Kontraktionsfähigkeit von gesunden Herzen auswirkt. Dieser Zusammenhang wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es ist reine Spekulation welchen Einfluss Integrin αv und dessen Ausschaltung auf gesunde Herzen an der Maus haben könnten. Beispielsweise könnte es durch Inhibierung von Integrinen zu einer Entkopplung von extrazellulärer Matrix und Zytoskelett und somit zu einer Auflockerung der Zellstruktur kommen. Hierdurch käme es zu einer Abnahme des relativen Wandstress und dadurch zu einer Zunahme der Kontraktilität. Unser Versuch zeigt einen interessanten Sachverhalt, der weiterer Abklärung bedarf.

Don Ingber et al. haben die Bedeutung für mechanischen Zusammenhalt und von Mechanotransduktion in Ihrem „Tensegrity-Zell-Modell“ erwähnt [147]. Das Zytoskelett verhält sich wie ein mechanisches Netzwerk. Stress von außen wirkt auf die einzelnen Elemente des Zytoskeletts und des Zellkerns, die wiederum mit Transformation auf diese äußeren Einwirkungen reagieren. Entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung sprechen Ingber et al. hierbei den Integrinen als Mediatoren der mechanischen Signale durch Ihre direkte Verbindung zur EZM und zum Zytoskelett zu [148]. Sie haben einen wesentlichen Einfluss auf Zellspannung und Zellstruktur, weswegen ihnen eine bedeutsame Rolle bei Angiogenese, kardiovaskulärer Physiologie und auch Krebs zugesprochen wird. Eine Unterbindung des Integrins, wie in dieser Arbeit geschehen, könnte also eine Unterbindung der mechanischen Transduktion und somit eine entscheidende Störung der Zellstabilität bewirkt haben. Das mangelnde Zellwachstum und die ausbleibende Hypertrophie bei integrin-inhibierten Tieren untermauern die Aussagen Ingebers über die mechanische Struktur der Zellen und deren Abhängigkeit von Integrinen.

Eine schematische Darstellung der Bedeutung von Integrinen bei der Einwirkung von Stressfaktoren direkt oder mittels EZM auf die Zellmembran ist im Folgenden zu sehen:

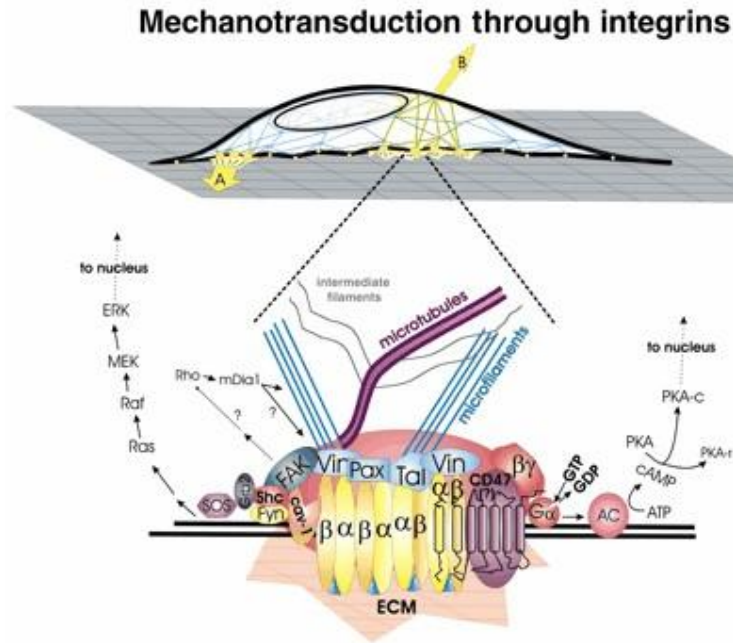


Abb. 50 Mechanotransduktion durch Integrine [Ingber D et al., 2003; 148]

Man kann gut erkennen, dass die zellwandständigen α - und β -Einheiten in engem Kontakt mit fokalen Adhäsionsproteinen (Vinculin, Taxin etc.) stehen und darüber Einfluss auf Mikrofilamente und Tubuli nehmen. Zusätzlich besteht eine enge Verbindung zu verschiedenen Kinasen (ERK etc.), worauf in der Diskussion der Proteinanalyse noch eingegangen wird.

Insgesamt deuten die Resultate darauf hin, dass αv eine ähnlich hohe Bedeutung für die Herzfunktion hat wie $\beta 1$, dessen Fehlen unter anderem zu fetaler Mortalität durch Herzmissbildungen führt [107-109]. Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch schon Joner et al., die eine bevorzugte Expressierung von $\alpha v \beta 5$ am Herzen postulierten [113]. In weiteren Untersuchungen wird nun festzustellen sein, welchen Einfluss eine Ausschaltung von Integrin $\alpha v \beta 5$ beispielsweise auf die Entwicklung fetaler Herzen hat. Weiterhin scheint von großem Interesse eine Modifizierung unseres Versuchsaufbaus. Wie verändert sich beispielsweise die Herzstruktur, wenn man den Integrin-Antagonisten nicht parallel zum Myokardinfarkt verabreicht, sondern zu einem späteren Zeitpunkt, eventuell nach circa sieben Tagen. Nach den aktuellen Resultaten kann man vermuten, dass es nach einer Erholungsphase zu ausreichender Kompensation kommt, wie die Infarktmäuse mit DMSO beweisen. Eine überschießende Hypertrophie allerdings soll ja vermieden werden. Dies könnte durch die

Gabe von Integrin-Inhibitor zu diesem Zeitpunkt ermöglicht werden, da man nun die integrinabhängigen Kaskaden stoppen könnte.

Ebenso ist der Einfluss der Inhibierung von $\alpha\beta5$ auf gesunde Herzen in einem längeren Beobachtungszeitraum von Bedeutung.

Festzuhalten ist auf jeden Fall die Tatsache, dass Integrin $\alpha\beta5$ für das Gewebe des Herzens und den geregelten Bewegungsablauf bei Herzinfarktieren essentielle Bedeutung hat und dessen Ausschaltung mit erhöhter Mortalität einhergeht.

4.2 Proteinanalyse

Integrine haben einen großen Einfluss auf die Stimulierung verschiedener Enzymkaskaden. Verschiedene Autoren konnten den entscheidenden Einfluss dieser Proteine auf Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen nachweisen [51, 52, 116].

Giancotti und Ruoslahti konnten 1999 die integrin-vermittelten Signalwege sehr detailliert darstellen. So führt die Aktivierung von Integrin unter anderem über die Phosphorylierung von FAK unter Beteiligung von Src zur Aktivierung von ERK $\frac{1}{2}$ und dadurch zur Veränderung der Zellstruktur und Differenzierung [51]. Diese Zusammenhänge wurden auch schon in anderen Arbeiten beschrieben [132].

Die Rolle von Integrinen beim Wachstum von kardialen Myozyten wurde in verschiedenen Laboratorien festgestellt [68, 112, 149].

Von Bedeutung ist nun inwieweit die einzelnen Integrine unterschiedliche Prozesse am Herzen auslösen und ob einige Integrine überhaupt am Hypertrophieprozess beteiligt sind.

Der Einfluss verschiedener β -Integrin Subtypen auf die Entwicklung kardialer Hypertrophie wurde häufig untersucht [68, 150-152].

Vor allem $\beta1$ -Integrin erlangte durch Forschungsergebnisse der letzten Jahre eine entscheidende Bedeutung am Herzen. Stephens et al. zeigten eine vorzeitige Letalität von Tieren mit verändertem oder fehlendem $\beta1$ -Integrin auf Grund von Herzversagen [152].

Auf molekularer Ebene führte die Mutation der $\beta1$ -Untereinheit zu einer mangelhaften Aktivierung von FAK [153] und somit zur mangelhaften Stabilität einer Zelle. FAK hat eine wichtige Bedeutung für die Weitergabe von Signalen und für die fokale Adhäsion [154-156].

Auch Integrin $\beta3$ konnte bei hypertrophierten Herzen vermehrt nachgewiesen werden [111]. Dabei war vor allem die enge Assoziation mit Src und FAK von hohem Interesse. Das Integrin $\beta3$ wurde ebenfalls als wichtiger Faktor der Plättchenaggregation entdeckt. Dies

beweisen klinische Untersuchungen mit den in der Einleitung erwähnten Substanzen Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid. Sie gehören bei akuter PTCA und Ballondilatation bei instabiler Angina pectoris inzwischen zur standardisierten Begleitmedikation.

In neuester Zeit wurde an verschiedenen Tiermodellen auch eine Beteiligung von Integrin $\alpha\beta 5$ an hypertrophem Myokard entdeckt [111-113]. Es ist zwar erwähnt, dass es durch mechanischen Stress zu einem Anstieg aktivierter Tyrosinkinasen neben Integrin $\alpha\beta 5$ kommt, ob allerdings Zusammenhänge bestehen ist bisher nicht eindeutig geklärt.

In dieser Arbeit war es daher von Interesse, welche Veränderungen bei Tieren mit Myokardinfarkt in der Expression von phosphoryliertem Src und FAK und konsekutiv auch für aktivierte MAP-Kinasen, in diesem Fall ERK, entstehen und welche Unterschiede zu infarzierten Tieren mit αv -Inhibitor auftreten.

Src und FAK sind Kinasen die an der Weiterleitung von Signalen beteiligt sind und über Integrine aktiviert werden. In hypertrophierten Herzen zeigte sich eine deutliche Zunahme der aktivierten Zustandsformen dieser beiden Enzyme. Die Aktivierung von ERK zählt zu einem Endpunkt dieser Signalkaskaden, der Zusammenhang mit Integrinen, FAK und Src ist an zahlreichen Tiermodellen beschrieben [132].

Bei den aktuellen Untersuchungen kam es in infarzierten Mäuseherzen zur Zunahme von ERK-1/2-Kinase, aktiviertem FAK und Src. Dies konnte auch bildlich mit antikörperbeschichteten Gefrierschnitten bestätigt werden. Es kommt nach einem Infarkt in den Zellen des Myokards, aber auch in den Gefäßen zu einem Anstieg dieser Enzyme. Die Fluoreszenzzunahme in diesen Bereichen ist auffällig im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dies zeigt, dass auf molekularer Ebene im Myokard biochemische Kaskaden aktiviert worden sind, um den eingetretenen Herzwandschaden zu kompensieren. Die bereits histologisch und echokardiographisch festgestellte Hypertrophie ist somit gut erklärt. Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit den bisher bekannten Forschungsergebnissen [132].

Auch der Anstieg von ERK-Kinase im hypertrophierten Myokard nach Herzinfarkt stimmt mit den bisherigen Resultaten anderer Laboratorien überein [128].

ERK ist wohl auch in unserem Modell nachweislich am Prozess der Herzhypertrophie beteiligt.

Das heißt, auch in unseren Untersuchungen bestätigt sich, dass im Rahmen von Hypertrophie am Herzen multiple Signalkaskaden aktiviert werden und somit ein Zellwachstum induziert wird. Die Beteiligung von FAK, Src und ERK ist nachgewiesen.

Betrachtet man nun die Resultate des integrin-inhibierten Tieres, so kann man feststellen, dass es im Western Blot nicht zum Anstieg von ERK-1/2-Kinase, aktiviertem FAK-PY 925 und Src-PY 416 kommt. Die Anzahl an aktivierten Enzymen ist sogar geringer als die bei Kontrolltieren. Die nichtaktivierten Enzyme und Integrin $\beta 5$ kommen dagegen in allen Tieren in gleicher Intensität vor.

Die antikörperbeschichteten Gefrierschnitte zeigen dies ebenso für phosphoryliertes Src und FAK. Man sieht fast kein Fluoreszenzsignal in den Myozyten.

So scheint Integrin $\beta 5$ eine entscheidende Rolle im Zellwachstum zuzukommen. Bisher wurde dieser Zusammenhang eher von Integrin $\beta 1$ und $\beta 3$, welches sich im Mäuseherzen jedoch nicht nachweisen ließ, vermutet.

Vor allem fällt auf, dass es in den Tieren mit Integrin-Antagonist neben den Myozyten auch in den Gefäßen nicht zum Anstieg der phosphorylierten Enzyme kommt.

Wenn man diese Resultate betrachtet, so kann man vermuten, das Integrin $\alpha \beta 5$ sowohl im Herzwandwachstum als auch in der Blutversorgung des neuen Gewebes eine große Rolle spielt.

ERK-Kinase wird im Western Blot ebenso gering exprimiert wie die aktivierten Proteine FAK und Src. Beim Infarkttier mit Kontrolllösung stellen wir eine Zunahme dieser MAP-Kinase analog dem Anstieg der anderen beiden Enzyme fest. Beim herzkranken Tier mit Inhibierung von $\alpha \nu$ steigen diese drei Proteine nicht an. Dies bestätigt den von Schläpfer et al. propagierten Zusammenhang dieser Moleküle in einem Signalweg auch an unserem Mausmodell [132]. Auch die Verbindung dieser Prozesse zu Integrin-Subtypen wurde mehrfach erwähnt. Neuartig daran ist allerdings die Tatsache, dass diese Verknüpfung in engem Zusammenhang mit Integrin $\beta 5$ steht. Allein die Inhibierung dieses Subtyps genügt, um zu gravierenden Veränderungen in der biochemischen Enzymkaskade zu führen. Die mangelhafte Kompensation des Herzschadens bei Tieren mit Integrin-Antagonist, die sich in der nichteingetretenen Hypertrophie des Myokards histologisch und echokardiographisch zeigt, ist auch auf Molekülebene zumindest teilweise erläutert, sind doch zahlreiche mitogene Mechanismen sichtlich unterbunden.

Erwähnt werden muss noch, dass die aktivierte MAP-Kinase p-p38 sowohl bei integrin-inhibierten als auch bei normalen Infarktieren gefunden wird. Zwar ist die Konzentration im Vergleich zu MI-DMSO-Tieren verringert, allerdings dennoch wesentlich höher als die von aktiviertem FAK, Src oder gerade ERK, die allesamt nahezu fehlen.

Bei gesunden Tieren tritt die aktivierte Form jedoch nur geringfügig auf.

Dies deutet daraufhin, dass p38 nicht oder zumindest nicht nur von Integrin $\alpha\text{v}\beta 5$ aktiviert wird. Dies bestätigt auch die Aussagen von New et al., die eine Aktivierung dieser Kinase durch multiple Einflüsse postulierten [134]. Da es im Rahmen von Myokardinfarkt zu einer Freisetzung multipler Stimulatoren und Mediatoren kommt [157] ist dieser Zusammenhang auch nicht verwunderlich.

Dieses Enzym ist nur ein Beispiel dafür, dass es nicht ausreicht, einzelne Schritte der Hypertrophie am Herzen zu betrachten, um den komplexen Sachverhalt dieser Pathologie zu begreifen. Man muss bedenken, dass der Organismus aus einem Netzwerk von Aktivatoren, Inhibitoren und Informationssystemen besteht, die an der Regulierung des Zelllebens und –sterbens teilhaben.

Dies wird auch in den Hemmstoffen des RAAS-Systems deutlich, die zwar nachweislich einen hohen Benefit für Koronariker haben, aber eben nicht in der Lage sind alle pathologischen Prozesse des Remodelings zu steuern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allerdings daraufhin, dass Integrin-Inhibitoren in ferner Zukunft einen weiteren Baustein in der Sekundärprävention von Infarktpatienten bilden könnten. Wenn man in der Lage sein wird, eine möglichst hohe Anzahl pathologischer Prozesse, unter anderem eben auf biochemischer Ebene, auszuschalten, so wird man in der Reduktion der Langzeitmortalität und –morbidity von Infarktpatienten große Fortschritte machen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Zunahme von Src und FAK in den Gefäßen des Myokards nach Infarkt; sie scheint auf eine Beteiligung dieser Enzyme an der Angiogenese hinzuweisen. Dieser Zusammenhang, beispielsweise in der Wundheilung wurde bereits von C. Hauck beschrieben [158].

Die Beteiligung von Src analog den Zellwachstumskaskaden im Kardiomyozyt ist auch im Wundheilungsprozess nachgewiesen [122, 159, 160].

Auch die Beteiligung von Integrin $\beta 5$ an der Gefäßversorgung von Pankreascarcinomen wurde bereits erwähnt [100]. Der Anstieg von aktiviertem Src und FAK und das gleichzeitige Ausbleiben dieser Aktivierung in integrin- αv -inhibierten Tieren in den Gefäßwänden von Myokardinfarkttieren könnte ein Hinweis dafür sein, dass dieses Molekül an der Blutversorgung des hypertrophierten Myokards beteiligt ist. Es ist nun sehr wichtig, genauere Zusammenhänge diesbezüglich zu untersuchen. So stellt sich zum einen die Frage, ob durch gezielte Angiogenese-Induktion über Integrin $\beta 5$ die Gefäßversorgung des hypertrophierten

Herzens gefördert werden kann. Eine weitere Frage wäre, ob man durch eine Inhibierung der Angiogenese nach Myokardinfarkt auch ein Ausbleiben der Hypertrophie bewirken könnte. Andererseits sollte geklärt werden, ob diese Entwicklung einzig durch die Analyse einzelner Schlüsselfaktoren erklärt werden kann und ob es Mechanismen gibt, die diesen Prozess zusätzlich beeinflussen. Des Weiteren ist unklar, welche Veränderungen langfristig entstehen und wie sich die molekulare Struktur auf Dauer verändert.

Wie in 4.1 erwähnt, entwickelten überraschenderweise Kontrolltiere mit Integrin-Inhibierung eine erhöhte Pumpleistung des Herzens ohne zeitgleiche morphologische Veränderungen verglichen mit der Kontrollgruppe mit DMSO. Die Proteinanalyse ergab nun bei dieser Gruppe auch einen Anstieg nichtphosphoryliertem FAKs bei ansonsten unveränderten Enzymexprimierungen. Ob das zeitgleich erhöhte Auftreten von dieser Tyrosinkinase eine Bedeutung für die Kontraktionsfähigkeit am Herzen hat, wird noch genauer untersucht werden müssen; ebenso stellt sich die Frage, ob diese erhöhte Pumpleistung des Herzens auf Dauer Konsequenzen für diese Tiergruppe hat. Genauere Aussagen hierzu können auf Grund der zeitlichen Begrenzung unseres Modells diesbezüglich nicht getroffen werden.

4.3 Einschränkungen

Da es sich bei dem Projekt um Versuche an Mäusen handelte, ergeben sich aus den Ergebnissen natürlich auch Einschränkungen, die zu bedenken sind. So kann man nicht automatisch davon ausgehen, dass am Menschen Integrine in der gleichen Subtyp-Population vorkommen oder dass diese dort in gleicher Konzentration vorkommen.

Wie bereits von Joner et al. beschrieben wurden die Ergebnisse des Katzenmodells durch die Untersuchung an der Maus bestätigt. Diese beschäftigten sich mit Herzhypertrophie durch Druckbelastung, während wir die Herzhypertrophie nach Infarkt untersuchten. Es zeigt sich aber, dass sich zumindest in den Teilbereichen, die ähnliche Ziele untersuchten, die Ergebnisse gleichen. Hypertrophie nach Aortenbanding und nach Myokardinfarkt benötigen ähnliche pathophysiologische Prozesse. Man kann nun zwar das Modell nicht direkt auf den Menschen übertragen, allerdings weisen die Übereinstimmungen von Katzenmodell und Mausmodell darauf hin, dass sich beim Menschen zumindest ähnliche Vorgänge ereignen.

Es ist außerdem positiv zu werten, dass beide Kontroll-Gruppen keine konträren Veränderungen aufweisen und auch keine Hypertrophie entwickeln. Dadurch kann man

ausschließen, dass die oben genannten Ergebnisse lediglich durch die Gabe des Inhibitors verursacht sind. Nur am geschädigten Herzen kommt es zu den morphologischen und molekularen Veränderungen, die mit Hypertrophie einhergehen. Die Ausnahmen betreffen die FS und die Expression von FAK in der Kontroll-Inhibitor-Gruppe.

Einschränkend muss man den kurzen Untersuchungszeitraum aufführen. Um endgültige Aussagen zur Wirkung dieser Substanz zu tätigen, ist es notwendig langfristige Beobachtungen zu unternehmen.

Dennoch lassen sich summa summarum folgende Punkte festhalten:

1. Nach Herzinfarkt kommt es zu kompensatorischer Hypertrophie des nicht-geschädigten Myokards. Diese Veränderung wird durch Inhibierung von Integrin αv verhindert.
2. Die Blockade von Integrin αv führt beim infarzierten Tier zu einer massiv verschlechterten Pumpleistung und vermehrten regionalen Wandbewegungsstörungen, und erhöht somit die Frühmortalität.
3. Integrin αv führt zur Aktivierung von Zellwachstumskaskaden in Myozyt und Gefäßendothel in Form von Tyrosinkinasen (FAK, Src) und MAP-Kinasen (ERK). Ein Antagonist verhindert diese Aktivierung.

Ein positiver Effekt für herzkranken Tiere ist primär aus der Inhibierung von Integrin αv nicht abzuleiten. Dies liegt aber vor allem daran, dass durch die sofortige Ausschaltung dieses Moleküls jedwede Kompensation verhindert wird, was zu verminderter Pumpleistung und gestörten Kontraktionsabläufen führt. Dies liegt auch an dem erhöhten Wandstress beziehungsweise der erhöhten Wandspannung. Nach dem bereits erwähnten Laplaceschen Gesetz steigt im belasteten Gewebe der Druck sowie durch die Dilatation auch der Radius, die Wanddicke aber eben nicht. Dies erhöht den Quotienten: σ (Wandspannung) = p (Druck) \times r (Radius) / $2h$ (Wanddicke).

Wenn man nun die notwendige Kompensation durch eine regulierte Hypertrophie zulässt und erst dann eine Inhibierung von Integrin αv beginnt, so könnte man überschüssendes Zellwachstum vermeiden und damit den Circulus vitiosus der schlechten Sauerstoffversorgung des hypertrophierten Herzens und folgender schlechter Pumpfunktion und somit eine der schwerwiegendsten Folgen des Herzinfarktes unterbinden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Herzinfarkt und seine Folgen, insbesondere die Herzhypertrophie und die daraus resultierende Herzinsuffizienz stellen trotz großer Fortschritte in der Therapie immer noch die Haupttodesursache in den Industrieländern dar. Man hat in den letzten Jahren viele Pathomechanismen der Entstehung der Hypertrophie entdeckt. So wurde die Bedeutung von Angiotensin-II für myokardiales Remodeling erkannt und medikamentöse Strategien zur Hemmung dieses Enzyms entwickelt.

Seitdem es möglich ist, die molekularen Vorgänge einzelner Zellen und ganzer Organismen besser zu erforschen, hat sich ein Augenmerk der Zellforschung auf enzymatische Signalwege in Zellen gelegt.

Man konnte feststellen, dass das Wachstum einer Zelle auf der Induktion verschiedenster Enzymkaskaden unter Beteiligung mannigfaltiger Kinasen und Proteine beruht. Es gibt zahlreiche Aktivatoren dieser Systeme und verschiedenste Resultate der Aktivierung einzelner Punkte dieser Enzymketten. Die einzelnen Schritte sind weitestgehend ungeklärt und vor allem die Kooperation und das Zusammenwirken einzelner Auslöser und Schlüsselenzyme sind bisher nur in groben Zügen bekannt. Dennoch werden immer mehr Einzelabschnitte von Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose aufgeschlüsselt und das unübersichtliche Konglomerat von Stimulatoren des Gewebewachstums lichtet sich.

Eines der Schlüsselproteine im Zellwachstum und in der Übermittlung von Informationen von Zelle zu Zelle und Zellumgebung in das Zellinnere und umgekehrt stellt die Gruppe der Integrine dar. Die Beteiligung dieser bei verschiedensten physiologischen Prozessen wie Organwachstum, Angiogenese und Adaption an neue Anforderungen an den Körper wurde nachgewiesen. Sie stehen in enger Kooperation mit anderen intrazellulären und extrazellulären Proteinen und leiten Signale über Kinasen wie beispielsweise die Tyrosinkinasen FAK und Src weiter und stellen somit eine Schaltzentrale zellulärer Adaption dar.

Dies trifft auch auf zahlreiche pathologische Prozesse zu, die mit Wachstum und Adaption einhergehen, so zum Beispiel Neoplasien und eben Herzhypertrophie.

Man hat in zahlreichen Forschungsprojekten den Zusammenhang von Integrinen und ihren Subtypen mit der Entstehung von Herzhypertrophie festgestellt. Dies betraf bisher vor allem die Integrine $\beta 1$ und $\beta 3$. In dieser Arbeit nun konnte ein enger Zusammenhang von

Herzhypertrophie im Rahmen von Herzinfarkt am Mausmodell und dem Integrin αv festgestellt werden. Dies konnte durch direkte Untersuchungen in vivo mittels Herzecho als auch in vitro mittels Histologie am Gewebe gezeigt werden, da eine Hypertrophie nur bei den Tieren vorkam, die keinen Integrin- αv -Antagonisten verabreicht bekommen hatten. Die Gruppe ohne funktionsfähiges Integrin αv dagegen entwickelte keine Adaption an die veränderten pathologischen Verhältnisse und hypertrophierte nicht.

Weiterhin konnte man die molekularen Veränderungen und die intrazelluläre Signalverarbeitung im Western Blot und an Gefrierschnitten darstellen und zeigen, dass die Aktivierung von Src, FAK und ERK-1/2-Kinase bei integrin- $\alpha v\beta 5$ -inhibierten Tieren ausbleibt. Da gleichzeitig bei den Tieren mit funktionstüchtigem Integrin $\beta 5$ eine Zunahme phosphorylierter Kinasen nachgewiesen werden konnte, muss man von einer entscheidenden Rolle dieses Integrins an der Weiterleitung von Signalen im hypertrophierenden Herz ausgehen.

Integrin αv hat nach diesen Ergebnissen einen mitentscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Herzhypertrophie nach Myokardinfarkt. Dies bietet neue Chancen und Alternativen in der Therapie von Folgeschäden nach Myokardinfarkt.

Das Ausschalten von αv führte zu einer erhöhten Mortalität der Tiere mit Infarkt. Allerdings war das zu erwarten, da jedwede Kompensierung im kranken Herzen ausblieb. Eine gewisse konsekutive Herzwandverdickung jedoch ist erwünscht (LaPlace) und für das Überleben notwendig. Ebenso konnte man erkennen, dass die Substanz bei gesunden Mäusen keinen Schaden anrichtet. Sie scheint sogar einen positiven Effekt auf die Pumpleistung des Herzens zu haben.

Als neue Untersuchung wäre es daher empfehlenswert, den Tieren die Substanz erst zu verabreichen, wenn die Akutphase des Myokardinfarktes überstanden ist und ein gewisser Hypertrophieprozess eingetreten ist. Es ist durchaus plausibel, davon auszugehen, dass die zu einem späteren Zeitpunkt verabreichte Substanz in der Lage sein könnte, eine übermäßige Hypertrophie zu vermeiden.

Dies würde bedeuten, dass man eine neuartige Medikation entwickeln könnte, die einen wichtigen Basispfeiler zur Vermeidung von chronischem Herzversagen nach Herzinfarkt darstellen könnte. Mit gezielter Hemmung einzelner Wachstumsstimulatoren von Zellen wäre man in der Lage, Zellwachstum gezielt zu regulieren, und somit eine physiologische Adaption an pathologische Prozesse zu erreichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Herold G und Mitarbeiter, Innere Medizin, Kardiologie, Ausgabe 2005 ; 171-220
2. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial expansion. *Circulation*. 1988;78:186–201.
3. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161–72.
4. Kostuk WJ, Kazamias TM, Gander MP, Simon AL, Ross J. Left ventricular size after myocardial infarction. Serial changes and their prognostic significance. *Circulation* 1973;47: 1174–9.
5. Stone PH, Raabe DS, Jaffe AS, et al. Prognostic significance of location and type of myocardial infarction. Independent adverse outcome associated with anterior location. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:453– 63
6. Hammermeister KE, DeRouen TA, Dodge HT. Variables predictive of survival in patients with coronary disease. Selection by univariate and multivariate analyses from clinical electrocardiographic, exercise, arteriographic, and quantitative angiographic evaluations. *Circulation* 1979;59:421–30.
7. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991;260:H1406–14.
8. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction. Beneficial effects of long term therapy with captopril. *Circulation* 1985;72:406 –12.
9. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PWT, Whitlock RML, Wild CJ. Left ventricular end systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987;76:44 –51..
10. Chien KR, Grace AA. Principles of cardiovascular molecular and cellular biology. In: Braunwald E, ed. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 5th ed. Vol. 2. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997:1626-49.
11. Cannon RO, Butany JW, McManus BM, Speir E, Kravitz AB, Bolli R, Ferrans VJ. Early degradation of collagen after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Cardiol* 1983;52:390–395.
12. Dixon et al., Effect of ramipril and losartan on collagen expression in right and left heart after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 1996; **165**: 31–45.
13. Shieffer B, Wirger A, Meybrum M, et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994;89: 2273–82.
14. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122:103–111.
15. Sutton M, Sharpe N., et al. Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction; Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981-2988

16. Braunwald, Kasper et al., Harrison`s Internal Medicine, Cardiology, 16th Edition; 1404-1471
17. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, et al. Myocardial response to infarction in the rat: morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol.* 1985;118:484–492.
18. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1995;77:258–265.
19. Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes: the potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1994;269:1110 –1119.
20. Sadoshima J, 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.* 1993;73: 413–423.
21. Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Ann Rev Physiol.* 2003; 65: 81–101
22. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 329–340
23. McKey R, Pfeffer M, Pasternark R, Markis J, Come P, Nakao S, Alderman J, Ferguson J, Safian R, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74:693–702.
24. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81:1161–1172.
25. Komuro I. Molecular mechanism of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Jpn Circ J.* 2000;41:117–129.
26. Rothermund L et al., Effects of angiotensin II subtype I receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene, *J Hypertens*, 2001; 19: 1465-1472
27. Maisel et al., Rapid measurement of BNP in the Emergency Diagnosis of Heart Failure, *NEJM* 2002, 347, 161-7
28. Ju H, Zhao S, Tappia PS, et al. Expression of Gq alpha and PLC-beta in scar and border tissue in heart failure due to myocardial infarction. *Circulation.* 1998;97:892– 829.
29. Schaper J, Speiser B, The extracellular matrix proteins in heart function. *Basic Res Cardiol* 1992. 87 Suppl 1: 303-9
30. van der Rest M and Garrone R, Collagen family of proteins, *FASEB J*; 1991; 5: 2814-2823
31. Timpl und Brown, Supramolecular assembly of basement membranes, *Bioessays.* 1996 ; 18 : 123-132
32. Werb et al., Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression, *J Cell Biol*, 1989; 109: 877-889
33. Chiquet et al., Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 1999;18:417-26
34. Boudreau et al., Extracellular matrix and integrin signalling : the shape of things to come, *Biochem. Journal* 1999, 339: 481-488
35. Heling A et al., Increased expression of cytoskeletal, linkage and extracellular proteins

36. Pelouch V et al., Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem*, 1993. 129 (2): 101-20
37. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al.: 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18:1135–1149.
38. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: 1999. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta* 1477:267–283.
39. Creemers E, Cleutjens J, et al. Matrix Metalloprotease Inhibition after myocardial infarction, *Circulation Research*, 2001, 89: 201-210
40. Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1281–92.
41. Rhode L, Aikawa M, Cheng G, et al., Echocardiography-Derived Left Ventricular End-Systolic Regional Wall Stress and Matrix Remodeling after experimental Myocardial Infarction, *Journal of the American College of Card*, 1999, 835-42
42. Herzog E, Gu A, Kohmoto T, Burkhoff D, Hochman JS. Early activation of metalloproteinases after experimental myocardial infarction occurs in infarct and non-infarct zones. *Cardiovasc Pathol*. 1998;7:307–312.
43. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM: 2000a. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 46:214–224.
44. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, et al.: 2000. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 46:225–238.
45. Lee R et al., Matrix Metalloproteinase Inhibition and the Prevention of Heart Failure, *Trends Cardiovasc Med*, 2001; 11: 202-205
46. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, et al.: 1999. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 99:3063 – 3070.
47. Asakura M et al., Cardiac Hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM 12 processing of HB-EGF : Metalloproteinase Inhibitors as a new therapy. *Nature Med*, 2002; 8: 35-40
48. Heymans S, Nuyens D, Theilmeier G, et al.: 1999. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nature Med* 5:1135–1142.
49. Lindsey M, Gannon J, Aikawa M et al., Selective Matrix Metalloproteinase Inhibition Ventricular Remodeling but Does Not Inhibit After Myocardial Infarction, *Circulation*, 2002; 105: 753-758
50. Xia et al., Integrin-dependent role of human T-cell matrix metalloproteinase activity in chemotaxis through a model basement membrane, *J Cell Biochem*, 1996; 61: 452-8
51. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028–1032.
52. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11–25.
53. Jin and Varner, Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer*. 2004; 9;90:561-5.
54. Pytela et al., A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82:5766-70

55. Smith et al., Withdrawal of chronic beta-adrenoceptorblockade: effects on haemodynamics, blood lipids and haemostatic variables. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990 ;39: 81-82
56. van der Flier und Sonnenberg, Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305:285-98
57. Sonnenberg, A. (1993) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **184**, 7–35
58. Denis, C., Williams, J. A., Lu, X., Meyer, D., and Baruch, D. (1993) *Blood* **82**, 3622–3630
59. Krutzsch, H. C., Choe, B. J., Sipes, J. M., Guo, N., and Roberts, D. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 24080–24086
60. Plow et al., Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21785-8.
61. Kuppuswamy D et al., Importance of Integrin Signaling in Myocyte growth and survival, *Circ Research*, 2002; 90: 1240-1242
62. Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman V, Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells, *Int J Cancer*, 1968; 3: 683-693
63. Calderwood D, Shattil S, Ginsberg M, Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signalling, *J of Biological Chemistry*, 2000; 275: 22607-22610
64. Hescheler J and Fleischmann B, Integrins and cell structure: powerful determinants of heart development and heart function, *Card Research*, 2000, 47: 645-647
65. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: [22] Aumailley M, Krieg T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J Invest Dermatol*
66. Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J* 1996;106:209–214. *Cell Biochem* 1996;61:543–553.
67. Hynes RO. Genetic analyses of cell–matrix interactions in development. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:569–574.
68. Ross RS et al., Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes, *Circ Research*, 1998 ; 82: 1160-1172
69. Gottschalk und Kessler, A computational model of transmembrane integrin clustering. *Structure (Camb)*. 2004 Jun;12(6):1109-16
70. Fishmann et al., Metastatic dissemination of ovarian epithelial carcinoma is promoted by $\alpha 2\beta 1$ -integrin-mediated interaction with type I collagen, *Invasion Metastasis*, 1998; 18: 15-26
71. Geiger et al., Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):793-805
72. Giancotti et al., Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Oct;9(5):691-700
73. Kornberg et al., *Proc Nat Acad Sci USA*, 1991; 88: 8392-8396
74. Schlaepfer et al., Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999;71(3-4):435-78
75. Wu C et al., Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix, *Cell*, 1995 ; 83: 715-24
76. Hynes RO, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673-87

77. Ridley et al., Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9
78. Bronner-Fraser M, Artinger M, Muschler J, Horwitz AF. Developmentally regulated expression of alpha 6 integrin in avian embryos. *Development* 1992;115:197-211.
79. Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 1993;119:1175-1186.
80. Ziober BL, Vu MP, Waleh N et al. Alternative extracellular and cytoplasmic domains of the integrin alpha 7 subunit are differentially expressed during development. *J Biol Chem* 1993;268:26773-26783.
81. Anderson und Springer, Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med*. 1987;38:175-94
82. Brakebusch,C., Bouvard,D., Stanchi,F., Sakai,T. and FaÈssler,R. (2002) Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.*, 109, 999-1006.
83. Mizejewski et al., Role of integrins in cancer : survey of expression patterns, *roc Soc Exp Biol Med*, 1999
84. Burke PA et al., Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografis, *Cancer Res*, 2002: 62: 4263-4272
85. Goldsmith EC et al., Integrin shedding as a mechanism of cellular adaption during cardiac growth, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284: 2227-34
86. George EL, Baldwin HS and Hynes RO, Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells, *Blood*, 1997; 90: 3073-81
87. Hynes RO, Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol*, 1996; 180: 402-12
88. Kwee L et al., Defective development of embryonic and extraembryonic circulatory system in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice, *Development*, 1995; 121: 489-503
89. Dowling et al, Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol*. 1996 Jul;134(2):559-72
90. Kreidberg et al., Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*. 1996 Nov;122(11):3537-47
91. Littlewood Evans et Muller, Stereocilia defects in the sensory hair cells of the inner ear in mice deficient in integrin alpha8beta1. *Nat Genet*. 2000 Apr;24(4):424-8
92. Fässler, R. and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of b1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev*. **9**, 1896-1908.
93. Adgey AA, An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, *Eur Heart J*, 1998; 19: D10-21
94. Samaha F, Hibbard C et al., Density of platelet collagen receptors glykoprotein VI and $\alpha 2\beta 1$ and prior myocardial infarction in human subjects, a pilot study, *Med Sci Monit*, 2005; 11: CR224-229
95. Kunicki et al., Variability of Integrin alpha(2)beta(1) activity in human platelets, *Blood*, 1993 ; 82: 2693-2703
96. Kunicki et al., Hereditary variation in platelet integrin alpha(2)beta(1) density is associated with two silent polymorphisms in the alpha(2) gene coding sequence, *Blood*, 1997; 89:1939-1943

97. Cass DL, Bullard KM, Sylvester KG, et al. Epidermal integrin expression is upregulated rapidly in human fetal wound repair. *J Pediatr Surg*. 1998;33:312–316.
98. Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ for angiogenesis. *Science*. 1994;264:569–571.
99. Eliceiri B et al., Integrin and growth factor receptor crosstalk, *Circ Res*. 2001;89:1104-1110.
100. Byzova TV, Goldman KC, Pampori N, Thomas AK, Bett A, Shattil JS, Plow FE. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*. 2000;6:851–860.
101. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct αv integrins. *Science*. 1995;270:1500–1502.
102. Chen X, Sievers E et al., Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer, *Neoplasia*, 2005; 7:271-279
103. Brancaccio M, Cabodi S, Belkin AM, et al. Differential onset of expression of α7 and α1D integrins during mouse heart and skeletal muscle development. *Cell Adhes Commun*. 1998;15:193–205.
104. Zhidkova NI, Belkin AM, Maynel R. Novel isoform of α1 integrin expressed in skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214:279–285.
105. Ingber DE. Cellular basis of mechanotransduction. *Biol Bull*. 1998;194: 323–325.
106. Simpson DG, Majeski M, Borg TK, et al. Regulation of cardiac myocyte protein turnover and myofibrillar structure in vitro by specific directions of stretch. *Circ Res*. 1999;85:e59–e69.
107. Hornberger LK et al., Synthesis of extracellular matrix and adhesion through beta (1) integrins are critical for fetal ventricular myocyte proliferation, *Circ Research*, 2000; 87: 508-515
108. Carver W et al., Distribution of beta (1) integrin in the developing rat heart, *J Histochem Cytochem*, 1994 ; 42: 167-175
109. Fassler R et al., Lack of beta (1) integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts, *J Cell Biol*, 1995; 128: 979-988
110. Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 1996;380:171–175.
111. Kuppuswamy D et al., Association of tyrosin-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium, *J Biol Chem*, 1997 ; 272: 4500-4508
112. Laser M et al., Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy, *J Biol Chem*, 2000 ; 275: 35624-35630
113. Joner M, Integrinaktivierung und Formation des fokalen Adhäsionskomplexes im Hypertrophieprozess adulter Mäuse, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Dissertation, 2004
114. Hsueh WA, Law RE, Do YS, Integrins, adhesion, and cardiac remodeling, *Hypertension*, 1998; 31: 176-180
115. Horwitz, A. F., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C. and Burridge, K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin – a transmembrane linkage. *Nature* 320, 317-329
116. Juliano RL et al., Signal transduction from extracellular matrix; *J Cell Biol*, 1993; 120: 577-585
117. Shyy JY et al., Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion, *Curr Opin Cell Biol*, 1997; 9: 707-713

118. Rabkin SW et al., Cardiac hypertrophy in the Dahl rat is associated with increased tyrosine phosphorylation of several cytosolic proteins, including 120 kDa protein, *Am J Hypertension*, 1996; 9:230-236
119. Laser et al., Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J Biol Chem*. 1998 Sep 18;273(38):24610-9
120. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 259: 8–14
121. Kudoh S, Komuro I, Hiroi Y et al., Mechanical stretch induced hypertrophic responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice, *J Biol Chem*, 1998; 273: 24037-24043
122. Sieg et al., Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*. 1999 Aug;112 (Pt 16):2677-91
123. Calalb, M. B., T. R. Polte, and S. K. Hanks. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol*. 15:954–963.
124. Hill CS and Treisman R, *Cell*, 1995; 80: 199-211
125. Seger R and Krebs EG, *FASEB J*, 1995 ; 9 : 726-735
126. Nishida et al., The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways, *Trends Biochem Sci*; 1993; 18: 128-131
127. Blenis et al., Growth-regulated signal transduction by the MAP kinases and RSKs, *Cancer Cells* ; 1991; 3: 445-449
128. Sidoshima et al., The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress, *Annu Rev Physiol*, 1997; 59: 551-571
129. Thoburn et al., Mitogen-activated protein kinases mediate changes in gene expression, but not cytoskeletal organization associated with cardiac muscle cell hypertrophy, *J Cell Biol*; 1994; 126:1565-1572
130. Chen, Y.-P., Djaffar, I., Pidard, D., Steiner, B., Cieutat, A.-M., Caen, J. P. & Rosa, J.-P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10169–10173.
131. Renshaw MW, Price LS, Schwartz MA. Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase. *J Cell Biol*. 1999;147:611–618.
132. Schlaepfer et al., Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase, 1994, *Nature* 372, 786-791
133. Davis et al., Capillary morphogenesis during human endothelial cell-invasion of three dimensional collagen matrices, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000 Sep;36(8):513-9
134. New et al., The p38 MAP Kinase pathway and its biological function, *Trends Card Med*; 1998; 8: 220-228
135. Mei S et al., Temporal response and localization of integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ in the heart after myocardial infarction, *Circulation*. 2003;107:1046-1052
136. Wagner J, Young investigator's Prizewinner 2001. Direct visualization of the influence of normothermic as apposed to hypothermic cardiopulmonary bypass on the systemic microcirculation in neonatal piglets, *Cardiol Young*, 2001; 11: 532-538

- 137.Li B, Li Q, Wang X, Jana KP, Redaelli G, Kajstura J, et al. Coronary constriction impairs cardiac function and induces myocardial damage and ventricular remodeling in mice. *Am J Physiol* 1997;273:H2508-19.
- 138.Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 1998;274: H1812-20.
- 139.Kanno S, Lerner D, Schuessler R et al., Echocardiographic Evaluation of Ventricular Remodeling in a mouse model of myocardial infarction, *J Am Soc Echo*, 2002; 15: 601-609
- 140.Shantz LM et al., Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy, *Biochem J*, 2001; 358: 25-32
- 141.Laycock SK et al., Captopril and norepinephrine-induced hypertrophy and hemodynamics in rats, *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996; 27: 667-672
- 142.Harwood FL, Monosov AZ, Goomer RS, et al. Integrin expression is upregulated during early healing in a canine intrasynovial flexor tendon repair and controlled passive motion model. *Connect Tissue Res*. 1998; 39:309–316.
- 143.Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994; 79:1157–1164.
- 144.Nawata J, Ohno I, Isoyama S, et al. Differential expression of $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 5$ integrin subunits in acute and chronic stages of myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:371–381.
- 145.Belkin AM, Retta SF, Pletjushkina OY, et al. Muscle beta-1D integrin reinforces the cytoskeleton-matrix link: modulation of integrin adhesive function by alternative splicing. *J Cell Biology*. 1997;139:1583–1595.
- 146.Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, et al. Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:390–398.
- 147.Ingber D et al. Tensegrity I. Cell structure and hierachical systems biology, *Journal of Cell Science* 2003, 116 : 1157-1173
- 148.Ingber D et al., Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks, *Journal of Cell Science* 2003, 116 : 1397-1408
- 149.Liang F, Atakilit A, Gardner DG. Integrin dependence of brain natriuretic peptide gene promoter activation by mechanical strain, *J Biol Chem*, 2000 ; 275 : 20355-20360
- 150.Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shai SY, Loftus JC, Ross RS. Striated muscle-specific $\beta 1D$ -integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279:H2916–H2926.
- 151.Keller RS, Shai SY, Babbitt CJ, Pham CG, Solaro RJ, Valencik ML, Loftus JC, Ross RS. Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance. *Am J Pathol*. 2001; 158:1079–1090.
- 152.Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA, Damsky CH. Deletion of beta1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev*. 1995; 9:1883–1895.
153. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking $\beta 1$ integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*. 1995; 130:1181–1187.

154. Richardson, A., and J. T. Parsons. 1995. Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioessays* 17:229–236.
155. Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. C. Cobb, A. B. Reynolds, and J. T. Parsons. 1992. pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5192–5196.
156. Schaller, M. D., and J. T. Parsons. 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:705–710.
157. Francis G et al., Changing the remodeling process in heart failure : basic mechanisms and laboratory results, *Curr Opin Cardiol*, 1998 ; 13: 156
158. Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer D, Focal Adhesion Kinase Facilitates Platelet-derived Growth Factor-BB-stimulated ERK2 Activation Required for Chemotaxis Migration of Vascular Smooth Muscle Cells, *J Biol Chem*, 2000; 275: 41092-41099
159. Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W., and Hanks, S. K. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4806–4818
160. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2000;2:249–256.
161. www.mun.ca/biology Addison Wesley Longmann
162. Schäfer et al. www.biocharta.com
163. www.5.amershambioscences.com
164. www.invitrogen.com

7. ANHANG

7.1 Abkürzungen

ACE = angiotensin converting enzyme

ADAM 12 = a disintegrin and metalloprotease

ANP = atriales natriuretisches Peptid

ASS = Acetylsalicylsäure

AT-1 = Angiotensin II Typ 1-Rezeptor

BNP = brain natriuretisches Peptid

c-Myc, c-Fos = Protoonkogene

c-Src = c-Src-Kinase

DTT = Dithiothreitol

DMSO = Dimethylsulfoxid

EDD = enddiastolischer Diameter

EF = Ejektionsfraktion

EGF = epidermal growth factor

EGTA = Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetylsäure

ERK = extracellular signal regulated kinase

ESD = endsystolischer Diameter

FAK(-PY 925) = focal adhesion kinase, phosphoryliert an Stelle 925

Fas = Fas-Kinase

FS = fractional shortening

FW = freie Wand des linken Ventrikels

GAPDH = Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

G-Protein = GTP-bindendes Protein

Grb-2 = Grb-2-Adapterprotein

GTP = Guanosin-5'-triphosphat

IL-1 β , IL-6 = Interleukin

IVS = intraventrikuläres Septum

kD = Kilo-Dalton

MAPK = mitogen activated kinase

MMP = Matrixmetalloprotease

μm = Mikrometer

MHz = Megahertz

NO = Stickoxydul

PDGF = platelet derived growth factor

PFA = Paraformaldehyd

PTCA = perkutane transluminale Coronarangioplastie

P130 Cas = Cas-Adapterprotein 130

RAAS = Renin-Angiotension-Aldosteron-System

Ras p21 = Ras-Kinase

Rho = Rho-Kinase

TGF β = Tumor growth factor β

TIMP = tissue inhibitor of metalloprotease

TNF α = Tumornekrosefaktor α

TRIS = Tris-(hydroxymethyl) aminomethan

VEGF = vesicular endothel growth factor

WHO = World health organisation, Weltgesundheitsorganisation

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Grimm
Vorname: Alexander
Geburtstag: 10.01.1979
Geburtsort: Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religion: römisch-katholisch
Eltern: Dr. Grimm, Hans-Joachim und Grimm, Angelika

Bildungsweg:

1985-1989 Eichendorff-Schule Veitshöchheim

1989-1998 Wirsberg-Gymnasium Würzburg, Abiturprüfung 1998 (Leistungskurse Latein und Mathematik, Nebenfächer Wirtschafts- und Rechtslehre und Geschichte; Gesamtnote 1,3)

WS 1999-SS 2005 Studium der Humanmedizin an der Bayr. Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Physikum SS 2001, 1. Staatsexamen SS 2002, 2. Staatsexamen SS 2004, 3. Staatsexamen Oktober 2005; Gesamtnote 1,3)

Beruf:

Pflegepraktikum im Missionsärztlichen Institut Würzburg

Famulaturen im Missionsärztlichen Institut Würzburg (INNERE MEDIZIN), im Landeskrankenhaus Salzburg (CHIRURGIE), im Martin-Luther-Krankenhaus Berlin (CHIRURGIE) sowie in der Praxis Dr. Eckert, Würzburg (CHIRURGIE)

PJ im Zentrum operative Medizin (CHIRURGIE), Universitätsklinik (NEUROLOGIE) und Kantonsspital Chur (INNERE MEDIZIN)

Seit Januar 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter mit ärztlicher Nebentätigkeit an der Universitätsklinik Würzburg, Fach Neurologie

Sonstiges:

08/1997 Teilnahme an der DEUTSCHEN SCHÜLER AKADEMIE in Annweiler

09/1998-07/1999 Grundwehrdienst als Sanitätssoldat in Ellwangen und Veitshöchheim

Würzburg, 13.07.2006

Alexander Grimm

Erklärung

Ich versichere, dass ich vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Des Weiteren ist die Arbeit bisher weder vollständig noch teilweise an einer weiteren Fakultät eingereicht worden. Mir wurde bisher kein akademischer Titel entzogen. Es läuft kein Straf- und kein Disziplinarverfahren gegen mich.

Würzburg, 13.12.2006

Alexander Grimm