

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

**Die funktionelle Bedeutung des  $\beta$ 1-Integrins  
bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie  
und Insuffizienz am konditionalen Knock Out  
Mausmodell**

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

vorgelegt von  
Tobias Johannes Kupfer  
aus Neumarkt in der Oberpfalz

Würzburg, Januar 2007

Referent: Privatdozent Dr. med. J. Strotmann

Koreferent: Professor Dr. med. G. Ertl

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Mai 2007

Prüfer: Privatdozent Dr. med. J. Strotmann  
Professor Dr. med. Dr. rer. nat. S. Engelhardt

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

### Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Gesellschaftliche Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie</b>	<b>2</b>
1.2.1. Herzinsuffizienz	2
1.2.1.1. Definition	2
1.2.1.2. Epidemiologie	2
1.2.1.3. Ätiologie	3
1.2.1.4. Pathophysiologie	4
1.2.1.5. Symptomatik, Klinik und Therapie	5
1.2.2. Herzhypertrophie als Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz	6
<b>1.3. Integrine und ihre Bedeutung bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz</b>	<b>9</b>
1.3.1. Aufbau und Wirkmechanismus	9
1.3.2. Integrinvermittelte Signalübertragung	10
1.3.2.1. <i>Integrinclustering</i>	10
1.3.2.2. FAK und Fyn/Shc Signalwege	11
1.3.2.3. Interaktion mit Growth Faktor Rezeptoren und anderen Membranrezeptoren	12
1.3.3. Integrinfunktionen	13
1.3.4. Integrinfunktionen im kardiovaskulären System und ihre klinische Bedeutung	14
<b>1.4. Tiermodelle in der klinischen Forschung</b>	<b>20</b>
1.4.1. Tiermodelle allgemein	20
1.4.2. Transgene Tiere und konditionaler $\beta$ 1-Integrin Knock Out	21
<b>1.5. Fragestellung</b>	<b>25</b>

<b>2. Material</b>	<b>26</b>
<b>2.1. Chemikalien einzeln</b>	<b>26</b>
<b>2.2. Lösungen</b>	<b>27</b>
2.2.1. Allgemein	27
2.2.2. Bei Verwendung von 7,5 % Gelen	29
2.2.3. Bei Verwendung der <i>Xcell Sure Lock™ Mini-Cell</i>	30
2.2.4. Protease und Phosphatase Inhibitoren	30
2.2.5. Größenstandard	30
<b>2.3. Antikörper</b>	<b>31</b>
2.3.1. Western Blot	31
2.3.2. Immunhistologie	32
<b>2.4. Geräte, sonstige Materialien und Software</b>	<b>33</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Herstellung von Mauslinien mit konditionalem <math>\beta</math>1-Integrin Knock Out</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Transversales Aortic Banding</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Zeitpunkte, Gruppen und Vorgehensreihenfolge</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Transthorakale Herzechokardiographie</b>	<b>38</b>
<b>3.5. Organentnahme und Morphologie</b>	<b>39</b>
<b>3.6. Proteinanalytische Methoden</b>	<b>39</b>
3.6.1. Proteinextraktion aus dem Herzmuskelgewebe	39
3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem Bradford-Assay	40
3.6.3. Proteinauftrennung mit der SDS–Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.6.3.1. Proteinauftrennung in 7,5 %-igen Trenngelen	42
3.6.3.2. Proteinauftrennung in <i>NuPAGE® Novex Bis-Tris</i> Gelen	43
3.6.4. <i>Western Blot</i> – Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran	43
3.6.4.1. <i>Semi-Dry-Transfer</i>	44
3.6.4.2. <i>Wet-Transfer</i>	44
3.6.5. Immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot	45
3.6.6. Größenstandard	46

<b>3.7. Histologische Methodik</b>	<b>47</b>
3.7.1. Entwässerung und Überführung der Proben in Paraffin	47
3.7.2. Herstellung der Paraffinschnitte	48
3.7.3. Färben der Paraffinschnitte	48
3.7.3.1. Entparaffinieren und Auswaschen	49
3.7.3.2. Pikro-Sirius-Rot Färbung	49
3.7.3.3. Hämalaun-Eosin Färbung	50
3.7.3.4. Eindecken der gefärbten Schnitte	50
3.7.4. Auswertung mit dem Computerprogramm <i>SigmaScan Pro</i>	50
<b>3.8. Immunhistologische Methodik</b>	<b>51</b>
3.8.1. Herstellung von Gefrierschnitten	51
3.8.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe	51
3.8.3. Analyse der hergestellten Gefrierschnitte mittels confocaler Lasermikroskopie	52
<b>3.9. Statistische Auswertungen mit dem Computerprogramm <i>StatView</i>®</b>	<b>54</b>
<b>3.10. Bildbearbeitung mit der Software <i>Adobe Photoshop 6.0</i></b>	<b>55</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Postoperative Überlebensraten</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Morphologie</b>	<b>57</b>
4.2.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ	57
4.2.1.1. Körpergewicht	57
4.2.1.2. Herzgewicht	58
4.2.1.3. Lungengewicht	58
4.2.1.4. Tibialänge	59
4.2.1.5. Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht	59
4.2.1.6. Herzgewicht bezogen auf die Tibialänge	60
4.2.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ	61
4.2.2.1. Körpergewicht	61
4.2.2.2. Herzgewicht	61
4.2.2.3. Lungengewicht	62
4.2.2.4. Tibialänge	62
4.2.2.5. Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht	63

## Inhaltsverzeichnis

4.2.2.6. Herzgewicht bezogen auf die Tibialänge	63
<b>4.3. Histologie</b>	<b>64</b>
4.3.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ	64
4.3.1.1. Hinterwand	64
4.3.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ	65
4.3.2.1. Hinterwand	65
4.3.2.2. Interventrikularseptum	66
4.3.3. Repräsentative Abbildungen	67
<b>4.4. Echokardiographie</b>	<b>68</b>
4.4.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ	68
4.4.1.1. Hinterwand in der Enddiastole	68
4.4.1.2. Interventrikularseptum in der Enddiastole	69
4.4.1.3. Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole	70
4.4.1.4. Durchmesser des linken Ventrikels in der Endsystole	71
4.4.1.5. Fractional Shortening	72
4.4.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ	73
4.4.2.1. Hinterwand in der Enddiastole	73
4.4.2.2. Interventrikularseptum in der Enddiastole	74
4.4.2.3. Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole	75
4.4.2.4. Durchmesser des linken Ventrikels in der Endsystole	76
4.4.2.5. Fractional Shortening	77
4.4.3. Repräsentative Abbildungen	78
<b>4.5. Proteinanalyse</b>	<b>81</b>
4.5.1. $\beta$ 1-Integrin	82
4.5.2. Aktivierte fokale Adhäsionskinase (p-FAK)	82
4.5.3. Aktivierte Src-Kinase (p-Src)	82
4.5.4. Aktivierte extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (p-Erk 1/2)	83
4.5.5. Extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (Erk 1/2)	83
4.5.6. Aktivierte mitogen aktivierte Proteinkinase P 38 (p-P 38 MAP Kinase)	83
4.5.7. Mitogen aktivierte Proteinkinase P 38 (P 38 MAP Kinase)	84
4.5.8. Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	84
4.5.9. GAPDH	84

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.6. Immunhistologie</b>	<b>85</b>
4.6.1. $\beta$ 1-Integrin	85
4.6.2. Aktivierte fokale Adhäsionskinase (p-FAK)	89
4.6.3. Aktivierte Src-Kinase (p-Src)	94
<b>5. Diskussion</b>	<b>99</b>
<b>5.1. Tiermodell</b>	<b>99</b>
<b>5.2. Postoperative Überlebensraten</b>	<b>100</b>
<b>5.3. Morphologie</b>	<b>102</b>
<b>5.4. Histologie</b>	<b>105</b>
<b>5.5. Echokardiographie</b>	<b>107</b>
<b>5.6. Western Blot</b>	<b>113</b>
<b>5.7. Immunhistologie</b>	<b>122</b>
<b>5.8. Ausblick</b>	<b>125</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>126</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>128</b>
<b>8. Anhang</b>	

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

°C	Grad Celsius
A	Ampere
AB	Aortic Banding
ACE	angiotensin converting enzyme
ADH	Vasopressin
Ag	Antigen
AHA	American Heart Association
Ak	Antikörper
Akt	Akt-Kinase
ANOVA	analysis of variance
ANP/ANF	Atriales natriuretisches Peptid/Atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
AT	Angiotensin
B-Mode	brightness-mode
BSA	bovine serum albumine
c	Konzentration der gelösten Substanz
Cdc42	Cdc42-GTPase
Cdk	Cyclin dependent kinase
c-Raf	c-Raf-Kinase
Cre	causes recombination
Crk	Crk-Adapterprotein
CT-1	cardiotrophin-1
Ctrl	Control
Cy <sup>TM</sup> 2	Carbocyanin 2
d	Schichtdicke der Lösung
d	Tag(e)
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Methylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular Matrix, Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
Erk	extracellular signal-regulated kinase, Extrazellulär Signal regulierte Kinase
ES	embryonic stem
FAK	focal adhesion kinase, Fokale Adhäsionskinase
FAT	focal adhesion targeting
FERM	Region von FAK mit den Proteinen Ezrin, Radixin, Moesin
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FN	Fibronectin
FS %	Fractional Shortening %
Fyn	Fyn-Kinase, Tyrosinkinase
g	Erdanziehung 9,81 m/s <sup>2</sup>
g	Gramm
G	Gauche
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gly	Glycin
Grb2	Grb2-Adapterprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämalaun-Eosin
HRP	horse raddish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IEG	immediately early genes
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin like growth factor
ILK	Integrin-linked Kinase
ISA	Intrinsische sympathomimetische Aktivität

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

IVS	Interventrikularseptum
Jnk	c-Jun N-terminale Kinase
k	Kilo-, $10^3$
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	Knock Out
l	Liter
lacZ	$\beta$ -Galactosidasegen
loxP	locus of crossing over of P1 recombinase
LV	left Ventricel, linker Ventrikel
m	Milli-, $10^{-3}$
M	Mega-, $10^6$
M	molar, mol/l
mA	Milliampere
MAPK	mitogen activated protein kinase Mitogen aktivierte Protein Kinase
max.	maximal
MEF2	MEF2-Transkriptionsfaktor
MEK	Erk aktivierende MAPK
MG	Molekulargewicht
MHz	Megahertz, Frequenz, $10^6 \cdot s^{-1}$
min	Minute(n)
min.	minimal
MKK3 / MKK6	mitogen activated protein kinase kinases 3/6
ml	Milliliter
MLC2v	myosin-light-chain 2v
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
M-Mode	motion-mode
MMP	Matrix Metallo Proteinase
Mol	mol
MPK-1	MAP Kinase Phosphatase 1
mRNA	messenger ribonucleic acid, messenger Ribonukleinsäure
mSOS	mSOS-Adapterprotein

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

n	Nano-, $10^{-9}$
NaCl	Natriumchlorid
Nck	Nck-Adapterprotein
NFAT3	NFAT3-Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
p-	phosphoryliert, aktivierte Form
P130 <sup>CAS</sup>	P130 <sup>Cas</sup> -Bindungsprotein
P38	P38 MAP Kinase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PI 3 Kinase	Phosphoinositide 3-OH Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLSD	protected least significant difference
PSR	Pikro-Sirius-Rot
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
p-value	probability value
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
rac1	rac1-GTPase
RGD	RGD-Bindungsmotiv, Arg-Gly-Asp
RIM	Radioimmuntherapie
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Shc	Shc-Adapterprotein
Src	Src-Kinase, Tyrosinkinase
Syk	Syk-Tyrosinkinase
Tac $\beta$ 1	Tac $\beta$ 1-Integrininhibitor
TBS	tris buffered saline
TBSA	tris buffered saline & bovine serum albumine

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

TBST	tris buffered saline & Tween®20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Temp.	Temperatur
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TSP	Thrombospondin
Tyr	Tyrosin
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VN	Vitronectin
WHO	World Health Organisation
Yes	Yes-Kinase, Tyrosinkinase
ZAP70	ZAP70-Tyrosinkinase
$\beta$	Beta
$\varepsilon$	Epsilon; Extinktionskoeffizient
$\lambda$	lambda; Wellenlänge
$\mu$	Mikro-, $10^{-6}$
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1. Gesellschaftliche Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen eine Gruppe von Krankheiten mit sehr hoher Prävalenz und Mortalität dar. Auch in Deutschland gehören Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems zu den häufigsten Erkrankungen. Unter den Todesursachen nach Organsystemen rangieren Herz- Kreislaferkrankungen in Deutschland derzeit sogar auf dem ersten Platz, noch vor malignen Neubildungen (*siehe Abbildung 1*). Sie sind somit im öffentlichen Gesundheitswesen auch ein bedeutender Kostenfaktor. Eine Veränderung dieser Situation scheint es auch in den folgenden Jahren nicht zu geben. Die Erforschung von Prävention, Ursachen und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen hat somit einen sehr wichtigen Stellenwert.

Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10				
Insgesamt				
Kapitel	Todesursache	2003	2004	2005
		<b>Anzahl</b>		
<b>Insgesamt</b>		853 946	818 271	830 227
II.	Neubildungen	214 788	214 863	216 928
<b>IX.</b>	<b>Krankheiten des Kreislaufsystems</b>	<b>396 622</b>	<b>368 472</b>	<b>367 361</b>
X.	Krankheiten des Atmungssystems	58 014	52 500	57 742
XI.	Krankheiten des Verdauungssystems	42 263	42 213	42 787
XIX.	Verletzungen, Vergiftungen und bestimmte andere Folgen äußerer Ursachen	34 606	33 309	33 024

**Abbildung 1:** Die fünf häufigsten Todesursachen nach Organsystemen in Deutschland von 2003-2005<sup>1</sup>

## **1.2. Herzinsuffizienz und Herzhypertrophie**

### **1.2.1. Herzinsuffizienz**

#### **1.2.1.1. Definition**

Um sowohl die Pathogenese, als auch die Symptomatik der Herzinsuffizienz adäquat zu beschreiben, hat die World Health Organisation (WHO) 1995 in ihrer Definition den Symptomenkomplex Herzinsuffizienz einmal pathophysiologisch und einmal klinisch beschrieben. Pathophysiologisch gesehen bedeutet Herzinsuffizienz die Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus in Ruhe und unter Belastung benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck zu fördern. Es resultiert eine Unterversorgung der Gewebe mit Blut und damit mit Sauerstoff und Nährstoffen. Unter klinischen Gesichtspunkten heißt das, dass eine ventrikuläre Dysfunktion die Ursache für verminderte körperliche Belastbarkeit darstellt.<sup>2-4</sup>

#### **1.2.1.2. Epidemiologie**

Mit einer 1995 geschätzten Anzahl von 15 Millionen Herzinsuffizienzpatienten weltweit stellt die Herzinsuffizienz eine der häufigsten internistischen Erkrankungen dar.<sup>5</sup> In Deutschland wird die Zahl der Menschen, die an einer Herzmuskelschwäche leiden auf etwa 1,2 Millionen beziffert. Die Prävalenz der Erkrankung ist dabei altersabhängig und steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. Aufgrund einer veränderten Altersstruktur der Gesellschaft und verbesserter Akutbehandlung von Herz- Kreislauferkrankungen, hat die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den letzten 20 Jahren drastisch zugenommen. Derzeit ist die Diagnose Herzinsuffizienz die häufigste Klinikdiagnose von über 75-jährigen Patienten. Wie die Prävalenz, steigt auch die Inzidenz der Erkrankung deutlich mit zunehmendem Alter an. Es treten pro Jahr 1-4/1000 Neuerkrankungen in der Gesamtpopulation westlicher Länder auf. Außerdem tragen Männer im Vergleich zu Frauen ein um 50-75 % erhöhtes Erkrankungsrisiko.<sup>3,4,6-8</sup>

## Einleitung

Seit 1968 hat sich die Zahl der Todesfälle durch Herzinsuffizienz mehr als vervierfacht.<sup>4</sup> Unter den zehn häufigsten Todesursachen nach ICD-10 belegt die Herzinsuffizienz in Deutschland derzeit sogar den dritten Rang (*siehe Abbildung 2*). Die Erkrankung besitzt eine hohe Letalität von 20-30 % pro Jahr. Diese nimmt deutlich mit dem Schweregrad der kardialen Dysfunktion zu und wird zudem entscheidend von der Therapie beeinflusst. Männer besitzen dabei im Vergleich zu Frauen eine um 25 % höhere Sterblichkeitsrate.<sup>3,4,6</sup>

Sterbefälle nach den zehn häufigsten Todesursachen 2005			
Insgesamt			
ICD-10	Todesursache	Gestorbene insgesamt	
		Anzahl	Anteil an insgesamt in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	80 998	9,8
I21	Akuter Myokardinfarkt	61 056	7,4
I50	Herzinsuffizienz	47 939	5,8
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	40 641	4,9
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	30 092	3,6
C18	Bösartige Neubildung des Dickdarms	20 976	2,5
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	20 895	2,5
J18	Pneumonie, Erreger nicht näher bezeichnet	18 970	2,3

**Abbildung 2:** Die acht häufigsten Todesursachen nach ICD-10 Diagnose in Deutschland 2005<sup>1</sup>

### 1.2.1.3. Ätiologie

Perikardiale, myokardiale, endokardiale Störungen, sowie Veränderungen der Herzklappen und der großen Gefäße kommen als Ursachen für eine chronische Herzinsuffizienz in Betracht. In westlichen Ländern ist die häufigste Ursache einer Herzinsuffizienz die koronare Herzerkrankung (54-70 %), die bei 35-52 % der Patienten von einer Hypertonie begleitet ist. Bei 9-20 % der Patienten wird eine isolierte arterielle Hypertonie als Herzinsuffizienzursache angenommen und bei 18-28 % eine idiopathische Kardiomyopathie. Als seltenere Ursachen gelten Herzvitien, alkoholische Kardiomyopathien, Myokarditiden, Endokarditiden und andere.<sup>3,4,6,7</sup>

### 1.2.1.4. Pathophysiologie

Wird der Herzmuskel geschädigt oder kurzzeitig/dauerhaft einer hämodynamisch erhöhten Belastung ausgesetzt, können die folgenden Anpassungsmechanismen sowohl im Herzen selbst, als auch in der Peripherie, aktiviert werden, um ein bedarfsgerechtes Schlagvolumen aufrechtzuerhalten und eine ausreichende Blutversorgung des Körpers sicherzustellen. Als Adaptionsmechanismen stehen sowohl funktionelle, als auch neurohumorale, als auch morphologische Mechanismen zur Verfügung.

Funktionale Adaptionsmechanismen wie eine Erhöhung der Vorlast (Frank-Straub-Starling Mechanismus), Kontraktilitätssteigerung als Folge einer Herzfrequenzsteigerung (Treppenphänomen) und Tachykardie sind physiologische Regelkreise, die allerdings im gesunden Herzen funktionell wirksamer sind, als im geschädigten. Falls diese Regulationsmechanismen erschöpft sind, versucht der Organismus über neurohumorale Reflexmechanismen gegenzusteuern, die beim herzinsuffizienten Patienten durch Flüssigkeitsretention zu massiver Preload-Erhöhung und durch Erhöhung des peripheren Widerstandes zu einer Afterload-Erhöhung führen.

Neurohumorale Kompensationsmechanismen sind eine Sympathikusaktivierung mit gesteigerter Katecholaminausschüttung, eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), eine Aktivierung von Vasopressin (ADH) und eine gesteigerte Freisetzung des kardialen Gewebshormons ANP (atriales natriuretisches Peptid).

Der morphologische Adaptionsmechanismus ist durch eine Hypertrophie des Myokards, durch fibrotischen Umbau des Herzens mit progredienter Apoptose und durch Desensitivierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren gekennzeichnet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die chronische Herzinsuffizienz einen dynamischen Prozess darstellt, bei dem die anfangs hilfreichen Kompensationsmechanismen allerdings in einen Circulus vitiosus münden und durch Verschlechterung der kardialen Funktion die Symptomatik der Herzinsuffizienz progredient verschärfen.<sup>2-4,6</sup>

### 1.2.1.5. Symptomatik, Klinik und Therapie

Ein insuffizienter linker Ventrikel führt einerseits zu Rückwärtsversagen und andererseits zu Vorwärtsversagen („*low output*“). Beim Rückwärtsversagen finden sich Lungenstauung mit Belastungs- und später Ruhedyspnoe, Asthma cardiale, Lungenödem und Zyanose. Leistungsminderung, Schwächegefühl und besonders bei älteren Patienten zerebrale Funktionsstörungen treten dagegen besonders beim Vorwärtsversagen auf. Rechtsherzinsuffizienz hat einen Rückstau in den großen Kreislauf mit sichtbarer Venenstauung, Gewichtszunahme und Ödemen in abhängigen Körperpartien, sowie Stauungsleber, Stauungsniere und Stauungsgastritis zur Folge. Gemeinsame Symptome bei Links- und Rechtsherzversagen sind Nykturie, Tachykardie und Rhythmusstörungen, Herzvergrößerung und Pleuraergüsse.

Klinisch wird die Herzinsuffizienz einerseits in die ABCD-Stadien der American Heart Association (AHA) und andererseits in vier klinische Grade nach der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt (*siehe Abbildung 3*), wobei sich die beiden Klassifikationen ergänzen.<sup>2-4,6,9</sup>

<b><i>Funktionelle und revidierte NYHA-Klassifikation bei Herzinsuffizienz</i></b>	
I.	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
II.	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
III.	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
IV.	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

**Abbildung 3:** Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association<sup>4</sup>

Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz richtet sich dabei hauptsächlich nach der NYHA-Klassifikation (*siehe Abbildung 4*). Dabei konnte bislang für ACE-Hemmer, für  $\beta$ -Blocker in Kombination mit ACE-Hemmern und für Aldosteron-Antagonisten in Kombination mit ACE-Hemmern und  $\beta$ -Blockern eine signifikante Senkung der Mortalität nachgewiesen werden. Offensichtlich sind bezüglich der Mortalität ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker nahezu gleichwertig. Die Diuretika sollen dabei eher symptomatisch die

## Einleitung

Flüssigkeitsretention verhindern. Das Digitalis dient hauptsächlich der Verlangsamung der atrioventrikulären Überleitung bei Vorhofflimmern. Obwohl dieses Therapieschema in der Lage ist die Mortalität zu senken, stellt es dennoch keine wirklich kausale Therapie der Herzinsuffizienz dar.<sup>4,9</sup>

<i>Medikamente</i>	<i>NYHA I</i>	<i>NYHA II</i>	<i>NYHA III</i>	<i>NYHA IV</i>
ACE-Hemmer	Indiziert	Indiziert	Indiziert	Indiziert
β-Blocker (ohne ISA)	- nach Myokardinfarkt - bei Hypertonie	Indiziert*	Indiziert*	Indiziert*
Diuretika				
-Thiazide	Bei Hypertonie	Bei Flüssigkeitsretention oder ehemals vorgelegener Flüssigkeitsretention	- Indiziert - zur Potenzierung der Schleifendiuretikawirkung	- Indiziert - zur Potenzierung der Schleifendiuretikawirkung
-Schleifendiuretika	-		Indiziert	Indiziert
Aldosteron-Antagonisten	nach Myokardinfarkt	nach Myokardinfarkt	Indiziert	Indiziert
AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Blocker	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz	Bei ACE-Hemmer-Intoleranz
Herzglykoside	Bei tachysystolischem Vorhofflimmern	- Bei tachysystolischem Vorhofflimmern - Im Sinusrhythmus nach Besserung von schwerer Symptomatik**	Indiziert**	Indiziert**

ISA intrinsische sympathomimetische Aktivität; NW Nebenwirkung

\* nur bei stabilen Patienten, langsam einschleichend unter engmaschiger Kontrolle; \*\* mit niedrigen Zielerumspiegeln

**Abbildung 4:** Medikamentöse Stufentherapie bei systolischer linksventrikulärer Dysfunktion (EF<40%)<sup>4</sup>

### 1.2.2. Herzhypertrophie als Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz

Da der Herzmuskel ein sogenanntes zellkonstantes Organ darstellt, ist es ihm nicht möglich, auf eine chronisch erhöhte Druck- oder Volumenbelastung, oder auf einen Verlust an kontraktile Masse, zum Beispiel nach Myokardinfarkt, mit einer Erhöhung der Zellzahl zu reagieren. Stattdessen bedient er sich oben beschriebener funktioneller, neuroendokriner und morphologischer Adaptionsmechanismen. Dabei erreicht der Herzmuskel durch eine Hypertrophie des Myokards zunächst einen Zuwachs an kontraktilen Elementen und somit schließlich eine Steigerung der Inotropie. Die Hypertrophie hat außerdem einen Einfluss auf die Wandspannung, die nach dem Gesetz von Laplace proportional zu Druck und Radius, sowie umgekehrt proportional zur Wanddicke ist:

<b><math>\sigma = p \cdot r / 2 h</math></b>	$\sigma$ = Wandspannung $p$ = Druck $r$ = Radius $h$ = Wanddicke
--	---

## Einleitung

Es wird deutlich, dass eine Zunahme der Wanddicke durch Myokardhypertrophie zu einer Senkung der Wandspannung führt. Chronische Druck- bzw. Nachlastserhöhungen, wie sie beispielsweise bei arterieller Hypertonie, Aortenstenose und Herzinsuffizienz auftreten, sowie vermehrte Volumenbelastungen durch Herzklappeninsuffizienzen oder Ventrikeldilatation führen dagegen zu einer Erhöhung der Wandspannung. Gelingt es durch die einsetzende Myokardhypertrophie nicht, die Wandspannung zu normalisieren, spricht man von inadäquater Hypertrophie. Im Gegensatz dazu bedeutet exzessive Hypertrophie, wenn die Wandspannung durch den Hypertrophieprozess zu stark gesenkt wird.<sup>3,6</sup>

Dieser Kompensationsmechanismus führt allerdings bei längerem Bestehen selbst zu einer kontraktiven Dysfunktion des hypertrophierten Myokards, weswegen eine ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie einen immensen Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz darstellt.<sup>3,6</sup>

Die Art der Ventrikelbelastung bestimmt unterschiedliche Hypertrophieformen. Während erhöhte Volumenbelastung zu einem seriellen Sarkomerwachstum und somit zu einer exzentrischen Hypertrophie führt, hat eine primär erhöhte Druckbelastung einen parallelen Sarkomerzuwachs und somit eine konzentrische Hypertrophie zur Folge. Bei Myokardinfarkt und Kardiomyopathien, bei denen ein Verlust an kontraktile Masse kompensiert werden muss, treten beide Hypertrophieformen auf.<sup>3,6,10</sup>

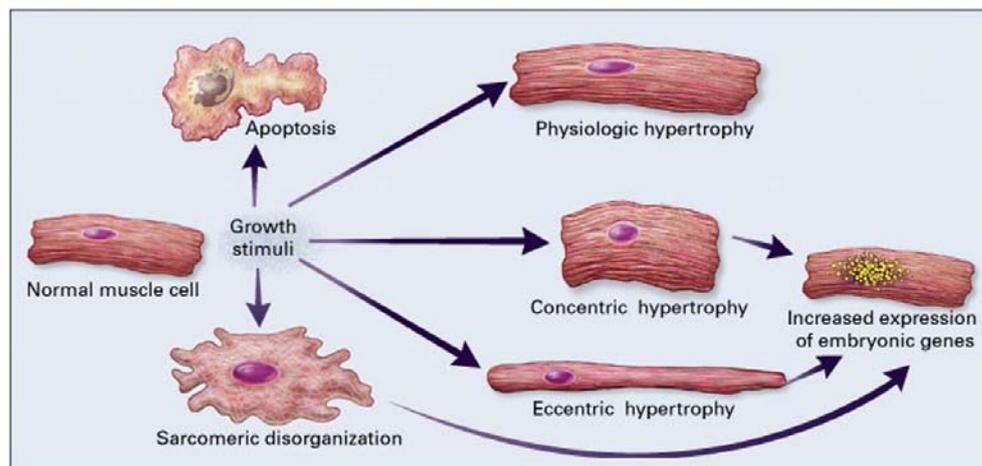


Abbildung 5: Morphologie kardialer Hypertrophie<sup>10</sup>

## Einleitung

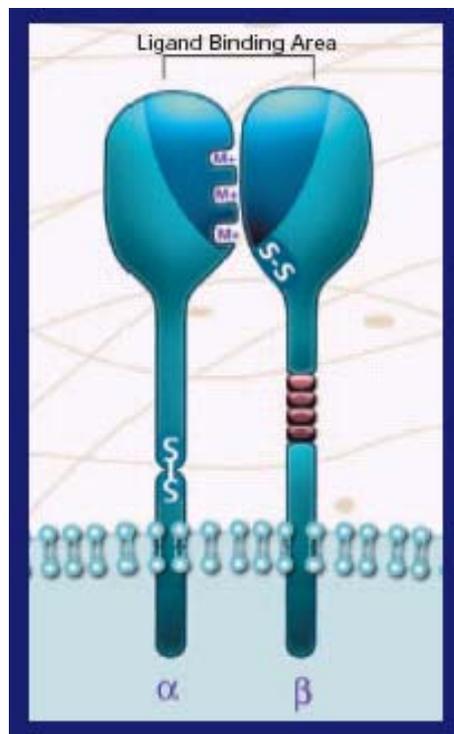
Die zugrundeliegenden Mechanismen der Herzhypertrophie und des kardialen „*Remodelings*“ sind zum Teil noch unbekannt und seit längerem Gegenstand intensiver Forschung. Dies liegt an dem komplexen Zusammenspiel verschiedener „*Stressfaktoren*“ die als Antwort auf die Belastung des Herzens gebildet werden. Die Haupt-„*Stressfaktoren*“ sind zum einen mechanischer „*Wandstress*“ und zum anderen neurohumorale, parakrine/autokrine Botenstoffe, wie z.B. Angiotensin II, Endothelin 1, *insulin like growth factor* (IGF-1), *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *fibroblast growth factor* (FGF) und cardiotrophin-1 (CT-1). Diese „*Stressfaktoren*“ können z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, Zytokinrezeptoren und G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren. Signale, die diesen Wegen entspringen, werden in die Zelle geleitet und haben eine veränderte Genexpression und somit Proteinsynthese zur Folge. Ob eine Hypertrophie in eine Insuffizienz mündet, scheint dabei von der Aktivierung verschiedener Signalwege abzuhängen. Aus diesem Grunde gibt es noch immer keine kausalen Therapieformen, um den Eintritt einer Herzhypertrophie und deren Übergang in eine Insuffizienz zu verhindern oder zu verlangsamen.<sup>3,6,10-13</sup>

In diesem Zusammenhang haben Integrinsignalwege bisher wenig Beachtung gefunden, obwohl sich in den letzten Jahren gezeigt hat, dass Integrine viel mehr Funktionen erfüllen, als man anfangs vermutete. Da sie sowohl Zell-Zell Interaktionen vermitteln, als auch die Extrazellulärmatrix (ECM) mit dem Zytoskelett verbinden, sind sie in der Lage mechanischen Stress in biochemische Signale zu übersetzen. Somit haben sie vielleicht auch einen Einfluss auf die Reorganisation des Zytoskeletts und auf die Entstehung einer myokardialen Hypertrophie und Insuffizienz.<sup>12,14-19</sup>

### 1.3. Integrine und ihre Bedeutung bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz

#### 1.3.1. Aufbau und Wirkmechanismus

Integrine sind eine Familie von heterodimeren, transmembranösen, ubiquitär vorkommenden Glycoproteinrezeptoren, die aus nicht kovalent miteinander verbundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Beide Untereinheiten besitzen eine extrazelluläre Domäne, sowie eine kurze zytoplasmatische Verlängerung (*siehe Abbildung 6*).<sup>20,21</sup>



**Abbildung 6:** Allgemeine Struktur der Integrinfamilie<sup>20</sup>

Mittlerweile sind bei Säugetieren 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine formen können, wobei die Einteilung nach den  $\beta$ -Untereinheiten stattfindet. Die Klasse der  $\beta 1$ -Integrine stellt dabei die größte Integrin Unterfamilie dar. Eine weitere Erhöhung der Mannigfaltigkeit ist durch alternatives mRNA „*splicing*“, sowohl der extrazellulären, als auch der intrazellulären Domäne der Untereinheiten möglich. Durch diese Variationen ergeben sich hochspezifische Funktionen für zahlreiche Integrinkombinationen. Jede Zellart hat dabei ihre eigene Anzahl an unterschiedlichen Integrinen, wobei dieser

Zustand je nach Entwicklungsstufe variiert. Diese Abhängigkeit von Entwicklungsstufe und Gewebeart trifft auch für die Zusammensetzung und Eigenschaft der Extrazellulärmatrix zu.

Obwohl jeder Integrinrezeptor eine eigene Bindungsspezifität besitzt, die von der  $\alpha$ -Untereinheit bestimmt wird, binden viele den gleichen Liganden, oder teilweise überlappende Serien von Liganden, welchen die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) als Integrinbindungsmotiv gemeinsam ist. Deswegen werden wichtige Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Laminin, Vitronektin, Fibronektin oder Kollagen, sowie wichtige Komponenten des Plasmas wie Fibrinogen und Thrombin von vielen verschiedenen Integrinen erkannt.<sup>15,17,21-25</sup> Dabei müssen zwei Integrine, die die gleiche Region des gleichen Liganden binden, nicht notwendigerweise die gleiche Funktion in der Zelle erfüllen.<sup>26</sup> Sie binden zudem auch an Gegenrezeptoren, im allgemeinen Mitglieder der Ig Familie, welche auf anderen Zellen exprimiert werden und vermitteln so Zell-Zell Kontakte.<sup>22</sup>

Integrine existieren in zwei allosterischen Hauptformen und können Signale in beide Richtungen durch die Zellmembran vermitteln. Sobald sie an die Extrazellulärmatrix binden, ändert sich ihre Konformation und ihre zytoplasmatischen Domänen interagieren mittels Verbindungsproteinen mit dem Zytoskelett und mit Signalproteinen („*outside-to-inside signaling*“). Andererseits können Integrine auch in einer inaktiven, oder teilweise aktiven Konformation existieren und mit einer aktivierenden Konformationsänderung auf intrazelluläre Signale antworten („*inside-to-outside signaling*“), was wiederum eine vermehrte Interaktion mit bereits vorhandenen Liganden zur Folge hat.<sup>21,22</sup>

### **1.3.2. Integrinvermittelte Signalübertragung**

#### ***1.3.2.1. Integrinclustering***

Da die zytoplasmatischen Domänen der Integrine sehr kurz sind (20-60 Aminosäuren) und keine intrinsische enzymatische Aktivität besitzen, findet die Signalübertragung mit Hilfe von Adapterproteinen statt, welche die Integrine mit dem Zytoskelett, mit zytoplasmatischen Kinasen und mit transmembranösen Growth Faktor Rezeptoren verbinden. Eine Anheftung an die Extrazellulärmatrix führt zu einer „*Integrinclusterbildung*“ in der Zellmembran und zu einer Assoziation mit einem zytoskelettären signalvermittelnden Komplex, der die Ansammlung von Aktinfilamenten anstößt. Diese Reorganisation der Aktinfilamente in größere „*stress fiber*“-Formationen führt zu einem positiven Feedbacksystem mit vermehrtem „*Integrinclustering*“ und somit zu einer erhöhten Extrazellulärmatrixbindung und

## Einleitung

Integrinorganisation. Dies führt zur Bildung eines fokalen Adhäsionskomplexes, bestehend aus Extrazellulärmatrixproteinen, Integrinen und Proteinen des Zytoskeletts. Durch diese Integration von Extrazellulärmatrix und Zytoskelett erhielten Integrine ihren Namen. Bei dieser „*Clusterbildung*“ könnte den Integrinen auch ein Membranprotein namens caveolin-1 behilflich sein, dessen Inhibition zu einer Unterdrückung der Adhäsionskomplexbildung und Integrinsignalwirkung führt.<sup>21,22,27</sup>

### 1.3.2.2. FAK und Fyn/Shc Signalwege

Integrine aktivieren nach Extrazellulärmatrixbindung mehrere verschiedene Proteintyrosinkinasen, u.a. die fokale Adhäsionskinase (FAK), die Familie der Src-Kinasen (Src, Yes, Fyn) und die Integrin-linked Kinase (ILK).

Der Signalweg über FAK wird von den meisten Integrinen aktiviert. Dies geschieht über die  $\beta$ -Domäne. FAK interagiert entweder über direktem Weg oder über die Zytoskelettproteine Talin und Paxillin mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrin  $\beta$ -Untereinheiten. Sobald FAK aktiviert wird, autophosphoryliert die Kinase Tyr<sup>397</sup> und assoziiert mit einer Kinase der Src Familie, welche dann andere fokale Adhäsionskomponenten phosphoryliert, wie z.B. Paxillin, Tensin und p130<sup>CAS</sup>. P130<sup>CAS</sup> ist ein Bindungsprotein, das die Adapterproteine Crk und Nck rekrutiert. FAK kann auch an die Phosphoinositide 3-OH Kinase (PI 3 Kinase) binden und diese eventuell direkt oder über Src-Kinasen aktivieren. Außerdem kann FAK offensichtlich auch an Tyr<sup>925</sup> unter anderem durch Src phosphoryliert werden, worauf eine Bindungsstelle für Grb2 und mSOS geschaffen wird. Diese Interaktionen verbinden FAK mit Signalwegen, die das Zytoskelett modifizieren und mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAP Kinasen) Kaskaden aktivieren. Zu diesen MAP Kinasen gehören hauptsächlich die extrazellulär signal-regulierte Kinase (Erk), die P38 MAP Kinase und die c-Jun N-terminale Kinase (Jnk). FAK scheint außerdem nach Phosphorylierung von Serin Zell-Substratkontakte lösen zu können und somit eine Mitose zu ermöglichen.<sup>17,19,21,22,27</sup>

## Einleitung

Zusätzlich zur Aktivierung von FAK können einige Integrine über die  $\alpha$ - Untereinheit auch die Tyrosinkinase Fyn und durch sie das Adapterprotein Shc aktivieren. In diesem Signalweg scheint auch caveolin-1 als ein Membranadapter eine Rolle zu spielen, der die  $\alpha$ - Untereinheit der Integrine mit Fyn verbindet. Nach Aktivierung an Tyr<sup>317</sup> verbindet sich Shc mit dem Grb2-mSOS Komplex. Es ist wahrscheinlich, dass sowohl FAK, als auch Shc zur Aktivierung der Erk MAP Kinase Kaskade beitragen. Sowohl der FAK, als auch der Fyn/Shc Signalweg werden durch Tyrosin Phosphatasen sowohl positiv, als auch negativ reguliert. Weiterhin gibt es eine Reihe von noch wenig erforschten Signalwegen, die mit Hilfe von Integrinen reguliert werden.<sup>17,19,21,22,27</sup>

### **1.3.2.3. Interaktion mit Growth Faktor Rezeptoren und anderen Membranrezeptoren**

Integrine übertragen Signale nicht nur auf eigene Faust, sondern interagieren mit Growth Faktor Rezeptoren und anderen Membran Proteinen. Sie scheinen sogar für eine optimale Aktivierung der Growth Faktor Rezeptoren notwendig zu sein. Die Rezeptoren für Insulin, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) werden von ihren Liganden nur unter geeigneten Zellanbindungsbedingungen optimal aktiviert. Growth Faktor Rezeptoren können aber im Gegenzug durch verschiedene Signalwege auch Integrine aktivieren. Man spricht bei diesen Interaktionen vom sogenannten Integrin/Growth Faktor Rezeptor „*crosstalk*“.<sup>21,22,28</sup>

Außerdem wurden Integrin Interaktionen auch mit IAP, einem der Immunglobulin Familie angehörenden transmembranösen Protein, welches für die Bindung von Thrombospondin an Zellen verantwortlich ist, sowie Assoziationen mit Tetraspan Proteinen, welche Integrine an Phosphatidylinositol Signalwege anbinden könnten und Interaktionen mit verschiedenen Arten von Ionenkanälen und Zytokinrezeptoren beschrieben.<sup>21,22,28</sup>

Zur Veranschaulichung der wesentlichen Signalwege, Interaktionen und Funktionen dient *Abbildung 7*.

## Einleitung

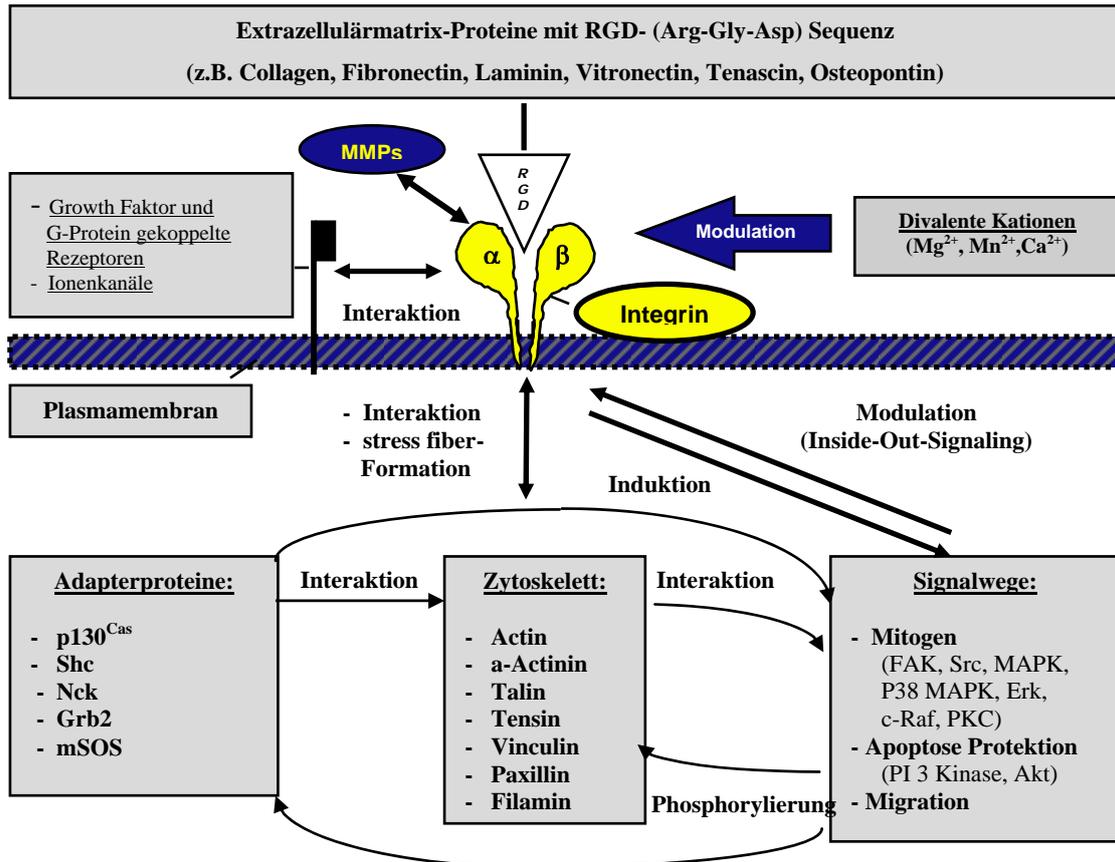


Abbildung 7: Überblick über die Signalwege, Interaktionen und Funktionen der Integrine<sup>29</sup>

### 1.3.3. Integrinfunktionen

Durch die Kombination verschiedener Untereinheiten, durch unterschiedliche Zusammensetzung der Extrazellulärmatrrixproteine, durch Interaktionen mit verschiedenen Rezeptoren, Matrix Metallo Proteinasen (MMPs) und Ionenkanälen, sowie durch Induktion verschiedenster Signalwege, stellen Integrine nicht nur eine mechanische Verbindung zwischen Extrazellulärmatrrix und Zytoskelett her, sondern erfüllen im Zellverbund die unterschiedlichsten hochspezifischen Funktionen.

Zusammen mit Growth Faktor Rezeptoren nehmen sie durch Erk, Jnk und Rac Signalwege Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus über eine Expression von Cyclin D und Cyclin abhängigen Kinasen (Cdk's). Integrine spielen auch eine Rolle im Zellwachstum, da sie über wachstumsfördernde Signalwege (Aktivierung von Erk, Rac, PI 3 Kinase und Jnk) für eine Verankerung der Zellen an die Extrazellulärmatrrix sorgen und dadurch eine einwandfreie Funktion und ein Überleben der Zellen ermöglichen. Da die Zellen von Signalen aus der Matrix abhängig sind, proliferieren sie oder sterben an Apoptose, wenn sie den Kontakt mit einer passenden Matrix verlieren. Diese Verankerung ist für den Aufbau und den Erhalt von

## Einleitung

Gewebestrukturen essentiell. Neoplastische Zellen dagegen haben die Notwendigkeit einer Zellverankerung verloren und können sich somit ungehemmt und unkontrolliert teilen.

Integrine übermitteln somit Signale, die den Zellen befehlen sich anzuheften, zu migrieren, die Gestalt zu verändern, zu metastasieren, zu proliferieren, zu reparieren oder aus dem Zellzyklus auszusteigen und zu differenzieren, zu leben oder sogar zu sterben. Sie sind damit notwendig für eine normale Embryo- und Organogenese, sowie Gewebekomöostase.

Darüber hinaus ermöglichen Integrine den Zellen durch die Anheftung an die Extrazellulärmatrix auf lösliche Wachstumsfaktoren und Zytokine zu reagieren und beeinflussen auch die Art der Antwort. Sie organisieren den Umbau des Zytoskeletts und modulieren die Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix. Sie fördern die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen, spielen eine Rolle bei der Leukozytenwanderung in Entzündungsherde und sind über die Aktivierung zytoplasmatischer Tyrosinkinase wie Syk und ZAP70 in T-Zell Rezeptorsignalwege involviert. Sie nehmen somit auch Einfluss auf Immun- und Entzündungsreaktionen. Integrine können außerdem zur Ansammlung von Hemidesmosomen beitragen, durch Interaktionen mit Ionenkanälen den intrazellulären pH Wert, oder die intrazelluläre Konzentration von  $Ca^{2+}$  beeinflussen, über Jnk und c-Jun Signalwege die DNA-Synthese und Genexpression regulieren und über JAB-1 zu einer nukleären Translokation führen.<sup>21,22,27,28,30</sup>

### **1.3.4. Integrinfunktionen im kardiovaskulären System und ihre klinische Bedeutung**

Die Integrine  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha I\text{Ib}\beta 3$  können sich mit IAP verbinden, einem Protein, das fünf transmembranöse Segmente enthält und als ein Rezeptor für Thrombospondine (TSPs) fungiert. Thrombospondine sind eine Klasse von Extrazellulärmatrixproteinen, die bei Plättchenaggregationen, Entzündungsreaktionen und bei der Angiogenese eine Rolle spielen. Durch das Integrin  $\alpha 2\beta 1$  wird in Blutplättchen die Kollagen vermittelte Aktivierung und durch  $\alpha I\text{Ib}\beta 3$  die Fibrinogen abhängige Aggregation verstärkt.<sup>22</sup>

Die Inhibition des Integrins  $\alpha I\text{Ib}\beta 3$  am Thrombozyten, welches mit dem Glykoprotein Iib/IIIa identisch ist, hat in der klinischen kardiovaskulären Medizin therapeutischen Nutzen erlangt. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper wie Abciximab oder synthetischer Rezeptorantagonisten wie Eptifibatid und Tirofiban, wird eine vom Aktivierungsreiz unabhängige, extrem hochpotente Thrombozytenaggregationshemmung und sogar eine Auflösung frischer arterieller Thromben erreicht. Die Indikation zum Einsatz der Glykoprotein Iib/IIIa Hemmung liegt bei der perkutanen Koronarintervention mittels PTCA,

## Einleitung

Stentimplantation, oder Atherektomie bei Hochrisikopatienten, sowie bei Patienten, die an instabiler Angina pectoris leiden. Patienten mit akutem Koronarsyndrom, die ein hohes Risiko aufweisen (dynamische ST-Streckenveränderungen, ST-Streckensenkungen, rezidivierende Brustschmerzen und/oder erhöhte Troponinwerte), profitieren besonders von Glykoprotein IIb/IIIa Antagonisten in Kombination mit Acetylsalicylsäure, Heparin und einer innerhalb der ersten 48 Stunden durchgeführten Koronarangiographie mit eventueller Intervention. Die Medikation mit Glykoprotein IIb/IIIa Antagonisten sollte nach einer Intervention noch für 24 Stunden weitergeführt werden. Durch diese Maßnahmen konnten ischämische Komplikationen wie Myokardinfarkt, refraktäre Ischämie oder Tod signifikant gesenkt werden.<sup>31-33</sup>

Besonders die von Blutgefäßendothelzellen exprimierten Integrinunterformen  $\alpha v \beta 3$  und  $\alpha v \beta 5$  spielen in der Angiogenese eine wichtige Rolle, wobei das Integrin  $\alpha v \beta 3$  besonders das Wachstum von Blutgefäßen garantiert. In der Onkologie ist seit langem bekannt, dass eine starke Angiogenese essentiell für das Wachstum und die Malignisierung eines Tumors ist, da neoplastische Zellen einen großen Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen besitzen. Seit einiger Zeit sind deshalb eine ganze Reihe von Medikamenten erhältlich oder in der Testphase, die als Alternative bei malignen Neoplasien angewendet werden und die Angiogenese unterdrücken sollen. Bei malignen Tumoren, die auf eine konventionelle Chemotherapie nicht ansprechen, waren durch den Einsatz dieser Substanzen deutliche Erfolge zu erzielen. Das zyklische Peptid Cilengitide, das die Integrine  $\alpha v \beta 3$  und  $\alpha v \beta 5$  hemmt, wird derzeit in Phase I- und II-Studien an Patienten getestet, die an Pankreaskarzinomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen oder Glioblastomen leiden. Eine Kombination von Cilengitide mit einer Radioimmuntherapie („RIM“) war in einem Mausmodell für das metastasierende Mammakarzinom einer alleinigen Radioimmuntherapie signifikant überlegen. Durch eine verstärkte Apoptoseneigung der Zellen steigerte Cilengitide die Therapieeffektivität um ein vielfaches, obwohl es als alleinige Therapie keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte. Es war bei den Mäusen weiterhin keine Verstärkung der Toxizität nachzuweisen.<sup>34-36</sup>

Im Myokard werden besonders die Integrine  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 5$  mit den Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  und  $\alpha 10$  exprimiert. Die Expression dieser  $\alpha$  Untereinheiten wird dabei zeitlich modifiziert und dem Entwicklungsstand angepasst. Die Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  werden beispielsweise embryonal exprimiert, postnatal herunterreguliert und bei erhöhter hämodynamischer Druckbelastung des Herzens wieder hochreguliert. Die verschiedenen  $\alpha$  Ketten scheinen dabei hauptsächlich mit dem  $\beta 1$ -Integrin assoziiert zu sein. Das  $\beta 1$ -Integrin

## Einleitung

existiert dabei in verschiedenen „*splice*“ Varianten, wobei die Isoform  $\beta 1D$  in quergestreifter Muskulatur und im Herzen nach der Geburt die vorherrschende Variante darstellt.<sup>24,27,37</sup>

Für eine normale Herzentwicklung sind Interaktionen der Zellen mit der Extrazellulärmatrix essentiell. Die durch den *epidermal growth factor* (EGF) vermittelte Proliferation von menschlichen fetalen Ventrikelmyozyten ist an eine Zelladhäsion durch  $\beta 1$ -Integrine, im besonderen durch die Integrine  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$ , gekoppelt.<sup>38</sup> Das Expressionsmuster der Integrine während der Herzentwicklung legt dabei den Verdacht einer zeitlich koordinierten Expression sowohl spezifischer Integrine, als auch von Extrazellulärmatrixsubstraten nahe. Für eine korrekte Organogenese scheint dabei weniger die An- oder Abwesenheit einiger Integrine von Bedeutung zu sein, sondern deren präzise zeitlich abgestimmte Expressionsordnung.<sup>39,40</sup> Veränderungen der Kardiomyozyten und Fibroblasten während des kardialen Wachstumsprozesses werden offensichtlich von einer Freisetzung von  $\beta 1$ -Integrinen begleitet, wobei das  $\beta 1$ -Integrin als Fragment im Interstitium von Zellkulturen beobachtet wurde. Im Wachstumsprozess des Herzens könnte diese Beobachtung eine ganz neue Art und Weise der Zellinteraktion mit der Extrazellulärmatrix bedeuten.<sup>41</sup>

Die genetische Ausschaltung einiger Integrinuntereinheiten resultierte weiterhin in abnormalen Organentwicklungen und Organfunktionen. Das Fehlen des  $\beta 1$ -Integrins in embryonalen Stammzellen verhinderte beispielsweise die Implantation der Blastozyste und führte zu Letalität schon im Embryonalstadium.<sup>42</sup> Außerdem hatten Knock Out/Knock In Experimente, bei denen in Mäusen die Integrin Isoform  $\beta 1A$  komplett durch die Isoform  $\beta 1D$  ersetzt wurde, den Tod der Embryos zur Folge.<sup>43</sup>

Im Herzen ist eine Verzahnung von Extrazellulärmatrix und Zytoskelett für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und eine Anpassung an pathophysiologische Bedingungen essentiell.<sup>27</sup> In einigen experimentellen Modellen konnten bei Herzhypertrophie, dilatativer Kardiomyopathie und Myokardinfarkt dramatische Veränderungen von Extrazellulärmatrixkomponenten, wie beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Osteopontin und Tenacin, sowie eine Zunahme der kardiozytären Zellsteifheit und der Mikrotubuli des Zytoskeletts gefunden werden.<sup>44,45</sup>

Da Integrine genau diese Verzahnungsfunktion erfüllen und extrazelluläre mechanische Stresstimuli in intrazelluläre biochemische Signale übersetzen, gelangt man zu der Vermutung, dass sie für eine normale Herzfunktion notwendig sind, ja sogar einen Einfluss auf das kardiale „*Remodeling*“ und somit auf die Entstehung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz haben könnten.<sup>27</sup>

## Einleitung

Eine herzmuskelspezifische Reduktion des  $\beta$ 1-Integrins führte in Experimenten zu einer progressiven Abnahme der Herzfunktion und zu Herzinsuffizienz. Mit Hilfe ventrikulärer Rattenkardiomyozyten konnte eine Beteiligung beider Isoformen (A und D) des  $\beta$ 1-Integrins an Hypertrophiesignalwegen nachgewiesen werden.<sup>16,27</sup> Eine mit Hilfe von adenoviralem Gentransfer erzeugte  $\beta$ 1-Integrin Überexpression führte zu einer Zunahme der Proteinsynthese und zur Erhöhung von zellulären Hypertrophie markern. Außerdem verstärkte diese Überexpression eine durch  $\alpha$ 1-adrenerge Substanzen ausgelöste zelluläre Hypertrophieantwort, während die Inhibition des  $\beta$ 1-Integrins eine adrenerg stimulierte Hypertrophie reduzierte. Am Rattenkardiomyozytenmodell wurde weiterhin eine um über 350% erhöhte Expression des  $\beta$ 1D-Integrins nach adrenerger Stimulation der Zellen nachgewiesen.<sup>46,47</sup>

Bei in vivo Experimenten mit Ratten, Mäusen und Katzen wurden Anzeichen für eine Beteiligung von Integrinen an der kardialen Hypertrophieentwicklung, die durch hämodynamische Druckbelastung provoziert wurde, gefunden. Transversales Aortic Banding führte beispielsweise zu einer erhöhten Expression der Integrine  $\beta$ 1A,  $\beta$ 1D,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 7 $\beta$  und zu einer Re-Expression der Integrin Untereinheiten  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 5, die normalerweise in der Herzentwicklung exprimiert und postnatal im normalen Myokard herunterreguliert werden.<sup>15</sup> Der rechte Ventrikel von Katzen wurde von Kuppuswamy durch eine Unterbindung der Pulmonalarterie einer starken Drucküberlastung ausgesetzt. Als Ergebnisse fanden sich im aufgelösten Myokardgewebe vier Stunden nach der Drucküberlastung eine Erhöhung des  $\beta$ 3-Integrins in der zytoskelettären Fraktion, sowie nach 48 Stunden eine Erhöhung des  $\beta$ 3-Integrins sowohl in der zytoskelettären, als auch in der membrangebundenen Fraktion. Nach einer Woche sank der Integrinspiegel aber wieder auf den Ausgangswert ab.<sup>48</sup>

Auch nach Myokardinfarkt findet ein extrazelluläres „*Remodeling*“ sowohl im akuten Heilungsprozess, als auch in chronischen Umbauvorgängen statt, an dem wahrscheinlich Integrine beteiligt sind.<sup>49</sup> Es konnte z.B. in Tierversuchen mit Ratten eine Veränderung der Expression von  $\alpha$ -Integrinuntereinheiten nachgewiesen werden. Analog zu den Ergebnissen bei Drucküberlastung fand sich eine Re-Expression der  $\alpha$ 1-Integrinkette sieben Tage nach Myokardinfarkt sowohl in der Infarktzone, als auch in der Umgebung der Infarktzone, als auch in umgebautem Herzgewebe. Die Expressionserhöhung der  $\alpha$ 1-Integrinkette in der Peri-Infarktzone war auch noch sechs Wochen nach Myokardinfarkt vorhanden. Es zeigte sich hierbei keine Veränderung im Expressionsmuster der  $\alpha$ 3-Kette, wohl aber eine Expressionserhöhung der  $\alpha$ 5 Untereinheit in der Peri-Infarktzone und im nicht infarzierten

## Einleitung

Gewebe sieben bis vierzehn Tage nach Myokardinfarkt.<sup>50</sup> Da dieses Expressionsmuster starke Unterschiede zu dem Expressionsmuster bei Drucküberlastung aufwies, drängt sich der Verdacht auf, dass diese Integrininduktion nicht nur durch die Hypertrophie alleine, sondern auch durch andere parakrine Faktoren, wie z.B. Angiotensin II zustande kam. Diese Induktion wurde ja schon in Fibroblasten beschrieben.<sup>51</sup>

Das gestörte Zusammenspiel zwischen Extrazellulärmatrix und Integrin scheint beim Übergang von einer kompensierten in eine dekompenzierte Herzfunktion eine große Rolle zu spielen. Während in den Anfangsstadien einer Drucküberlastung Fibronectin und der Integrinrezeptor  $\alpha 5\beta 1$  gemeinsam stärker exprimiert werden, scheint in späteren Stadien der Hypertrophieentwicklung keine zusammengehörige Expression mehr vorhanden zu sein. Dieser „Mismatch“ führt zum Entlassen der Zellen aus dem Zellverbund, gefolgt von deren Apoptose. Man nennt diesen Prozess *Anoikis* (griechisch für heimatlos). Offensichtlich ist ein Integrin abhängiges Überleben der Zellen notwendig für die Entwicklung der kardialen Hypertrophie und für die Verhinderung einer Herzinsuffizienz.<sup>27,52</sup>

Eine entscheidende Bedeutung in dem Prozess kardialer Hypertrophieentwicklung hat dabei scheinbar die fokale Adhäsionskinase (FAK) als intrazellulärer Signalvermittler. FAK kann dabei auch durch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) aktiviert werden. Eine Sympathomimetika vermittelte Aktivierung von Erk 1/2 und anderer hypertropher Signalwege wurde durch eine starke FAK Inhibition deutlich abgeschwächt. Integrinvermittelte Signalwege scheinen deshalb im Kardiomyozyten mit anderen hypertrophen Signalwegen zusammenzulaufen und über Erk 1/2 ihre Wirkung zu entfalten.<sup>15,27,53</sup>

Verschiedene Gruppen, wie auch unsere Arbeitsgruppe versuchen nun die Integrinsignalwege nicht nur in Zellen zu untersuchen, sondern auch im intakten Herzen zu entschlüsseln. Es ist beispielsweise möglich über eine Expression von Tac $\beta$ 1 in transgenen Tieren eine herzspezifische Integrinfunktion zu unterbinden. Eine hohe Inhibitorexpression hatte dabei kardiale Fibrose und Tod kurz nach der Geburt zur Folge, wahrscheinlich verursacht durch eine Ablösung der Extrazellulärmatrix von den Zellen. Eine niedrigere Inhibitorexpression führte nach transversalem Aortic Banding zu einer reduzierten ventrikulären Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit, reduzierter FAK Phosphorylierung und abgeschwächter Erk Aktivierung. Ähnliche Ergebnisse im Bezug auf kardiale Fibrose und embryonale Letalität lieferte die Überexpression eines veränderten  $\alpha 5$  Integrins.<sup>27</sup>

## Einleitung

Kuppuswamy und Laser analysierten Integrinsignalwege am Katzenmodell. Hierbei wurde durch Pulmonalarterienbanding ein Überdruck im rechten Ventrikel erzeugt, wohingegen der linke Ventrikel unangetastet blieb und als Kontrolle diente. Somit sollten die Auswirkungen einer Hypertrophie untersucht werden, die nur durch Drucküberlastung zustande kam und nicht durch hypertrophiefördernde Substanzen. Kuppuswamy konnte hiermit eine Assoziation von  $\alpha\beta3$ -Integrin, FAK und aktiviertem c-Src mit dem Zytoskelett des Herzmuskels im Sinne eines fokalen Adhäsionskomplexes zeigen. Dieser Komplex kommt nur im aktivierten Zustand von Integrinen vor.<sup>48</sup> Laser fand dabei eine erhöhte Expression und zytoskelettäre Assoziation der Extrazellulärmatrixproteine Fibronectin und Vitronectin. Dies wurde durch eine stärkere Bindung an das Zytoskelett und Zunahme der Phosphorylierung von FAK an der Stelle Tyr<sup>397</sup> und Tyr<sup>925</sup> und von c-Src an der Stelle Tyr<sup>416</sup> begleitet. Außerdem wurden vermehrt Adapterproteine wie p130<sup>Cas</sup>, Shc und Nck nachgewiesen, sowie eine verstärkte Aktivierung von Erk 1/2 festgestellt.<sup>17,19</sup> Es konnte von Rozich mit dem gleichen Modell gezeigt werden, dass Druck oder Volumenbelastung innerhalb von 48 Stunden zur Induktion von sogenannten „*immediately early genes*“ (IEG) führt, deren Produkte verschiedene Extrazellulärmatrixproteine, wie Fibronectin und Vitronectin sind.<sup>54</sup> Durch transversales Aortic Banding bei Ratten fand Franchini eine Aktivierung von FAK, sowie die Bildung eines Signalkomplexes aus FAK, c-Src, Grb2 und der PI 3 Kinase. Aus der Drucküberlastung resultierte außerdem eine Aktivierung von Erk 1/2 und Akt.<sup>55</sup>

Weitere Beweise, dass Integrine am kardialen „*Remodeling*“ beteiligt sind, lieferten folgende Studien: Transgene Mäuse, die eine aktive Form von rac1 in kardialen Zellen exprimierten, entwickelten nach der Geburt eine dilatative Kardiomyopathie.<sup>56</sup> In der Arbeitsgruppe um Babbit wurde herausgefunden, dass akute Drucküberlastung des Herzens die Aktivierung von FAK, p42 und p44 Erk verstärkte und chronische Drucküberlastung eine Erhöhung von  $\alpha1$ ,  $\alpha5$  und  $\beta1$ -Integrin Transskripten und damit eine erhöhte Proteinexpression von Integrinuntereinheiten zur Folge hatte.<sup>15</sup> Brancaccio konnte an Knock Out Mäusen beweisen, dass ein muskelspezifisches Protein namens Melusin mit dem  $\beta1$ -Integrin interagiert und benötigt wird, um Herzversagen als Antwort auf chronische Drucküberlastung zu verhindern.<sup>14</sup>

## Einleitung

Aus diesen Daten und weiteren Zellkulturmodellen lässt sich ableiten, dass die Extrazellulärmatrixproteine, wie Fibronectin und Vitronectin über das RGD-Bindungsmotiv Kontakt mit Integrinen aufnehmen. Dies führt zur Aktivierung von FAK und c-Src und zur Bildung eines fokalen Adhäsionskomplexes aus weiteren Tyrosinkinasen und Adapterproteinen. Dieser Komplex ist anscheinend am kardialen „*Remodeling*“ beteiligt.<sup>17,19,57</sup>

Trotz dieser Hinweise auf die Beteiligung von Integrinen am Hypertrophieprozess und am kardialen „*Remodeling*“, ist man von einem kompletten Verständnis der Integrin vermittelten Mechanismen am Herzen noch weit entfernt.

### **1.4. Tiermodelle in der klinischen Forschung**

#### **1.4.1. Tiermodelle allgemein**

Für das Verständnis menschlicher Krankheiten sind Untersuchungen anhand von Tiermodellen von eminenter Bedeutung. Sie bieten die Möglichkeit molekulare und biochemische Grundlagen, die zu Krankheiten führen, zu erfassen und zu verstehen, sowie neue Therapieformen zu entwickeln. Dabei kommen verschiedene Organismen in Frage.

Obwohl Primaten die nächsten Verwandten des Menschen darstellen und ihm in entwicklungsbiologischer, biochemischer und anatomischer Hinsicht ähnlich sind, werden heutzutage nur noch wenige Forschungen an Primaten durchgeführt. Die langen Generationszeiten und die hohe Lebenserwartung der Primaten führen zu sehr hohen Kosten bei der Züchtung und zu einem großen Zeitbedarf in der Beobachtung von Krankheiten. Einer der wichtigsten Gründe, der gegen Primaten als Tiermodelle spricht, ist die fehlende gesellschaftliche Akzeptanz.

Kleinere Labortiere, wie z.B. Nagetiere (Maus, Ratte) haben dagegen viele Vorteile. Viele an Nagetieren gewonnene Erkenntnisse gelten auch für den menschlichen Organismus, da sie sowohl in biologischer, als auch in genetischer Hinsicht dem Menschen ähneln. Mittlerweile liegt sogar eine Arbeitsversion des Maus Genoms vor, welches dem Genom des Menschen hinsichtlich Größe und Anzahl der Gene gleicht. Die Effekte von Genveränderungen kann man an Mäusen über viele Generationen sehr gut beobachten, da sie eine hohe Reproduktionsrate und eine geringe Lebenserwartung besitzen und sehr schnell geschlechtsreif werden. Für die Erforschung menschlicher Krankheiten stellen deshalb Untersuchungen an Mäusen die wichtigsten Tiermodelle dar. Die Auswirkungen von

## Einleitung

Genommutationen die spontan innerhalb einer Population auftreten, oder durch äußere Einwirkungen (z.B. chemische, physikalische Mutagenese) und Klontechniken hervorgerufen werden, lassen sich besonders gut an der Maus untersuchen. Mit Klontechniken ist es dabei möglich bestimmte Gene auszuschalten, artfremde Gene einzuschleusen, oder eine vermehrte Expression bestimmter Gene zu erzielen. Es gibt heutzutage bei Mäusen viele etablierte Modelle menschlicher Krankheiten, wie z.B. Stoffwechselerkrankungen, Erbkrankheiten oder verschiedene immunologische und maligne Erkrankungen. Weiterhin ist es möglich an Mäusen verschiedene Medikamente zu testen, mikrochirurgische und interventionelle Techniken anzuwenden und Transplantationen durchzuführen. Dennoch werden für diese Versuche eher größere Tiere, wie z.B. Ratten, Katzen, Hunde oder Schweine bevorzugt.

Mäuse eignen sich als Modell auch nicht bei allen Krankheiten (z.B. Bluthochdruck). Hierbei greift man auf Ratten zurück. Obwohl sie eine längere Generationszeit besitzen, sind sie dennoch teilweise für physiologische und pharmakologische Untersuchungen oder Verhaltensbeobachtungen besser zugänglich. Die Auswahl der Tierart richtet sich in der klinischen Forschung deshalb meistens nach dem Studienaufbau, nach den Studienzielen, nach der Dauer der Experimente und nach den voraussichtlichen Kosten.

In unseren Versuchen wurde ein konditionales Knock Out Mausmodell zur Klärung der Frage, inwieweit das  $\beta 1$ -Integrin bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie eine Rolle spielt, ausgewählt. Bei den Tieren wurde durch das etablierte Cre/loxP System herzmuskelspezifisch das  $\beta 1$ -Integrin größtenteils ausgeschaltet.

### **1.4.2. Transgene Tiere und konditionaler $\beta 1$ -Integrin Knock Out**

Die Entwicklung eines transgenen Tieres ermöglicht eine genaue Untersuchung spezifischer Gen- und somit Proteinfunktionen und deren Regulationsmechanismen. Dabei kann man ein Tier als transgen definieren, wenn es rekombinante DNA Moleküle in seinem Genom besitzt, die durch menschliche Intervention dort eingebracht wurden.<sup>58</sup>

Die DNA eines Tieres lässt sich dahingehend manipulieren, dass Genabschnitte, die für bestimmte funktionelle Proteine codieren entweder hinzugefügt oder ersetzt (Knock In),<sup>59,60</sup> oder aber durch homologe Rekombination mutiert und/oder ausgeschaltet werden (Knock Out oder „gene-targeting“ Strategie).<sup>61,62</sup> Da ein konventioneller Knock Out, d.h. die vollständige Deletion des  $\beta 1$ -Integringens ( $\beta 1^{-/-}$ ) in allen Geweben zur Letalität bereits im Embryonalstadium führt,<sup>63</sup> muss das für das  $\beta 1$ -Integrin codierende Gen gewebespezifisch (z.B. herzmuskelzellenspezifisch) ausgeschaltet werden: konditionaler Knock Out. Dieser

## Einleitung

herzmuskelspezifische Knock Out könnte somit einen möglichen Einfluss des  $\beta$ 1-Integrins auf die Entwicklung einer Hypertrophie und Insuffizienz des druckbelasteten Herzens aufzeigen.

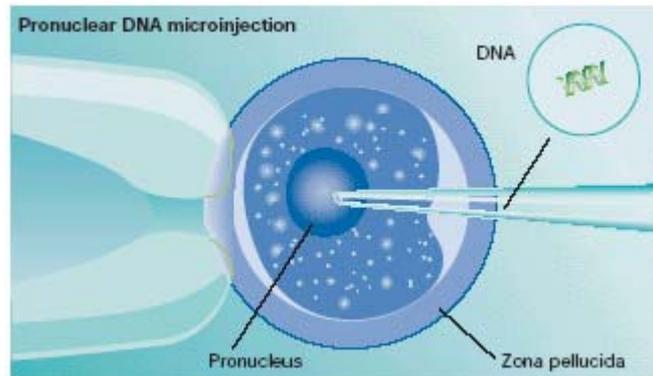
Um das  $\beta$ 1-Integrin herzspezifisch auszuschalten, bedienen wir uns des Cre/loxP Systems.<sup>61,62,64,65</sup> Mit Hilfe dieses Systems lassen sich sowohl Punktmutationen induzieren, als auch gewebespezifische Knock Out Mäuse erzeugen.<sup>66</sup> Das Prinzip dieses Systems basiert darauf, dass das 38 kDa große Enzym Cre-Rekombinase, das 1981 erstmals von Austin et al. aus dem Bakteriophagen P1 isoliert wurde, in den Zellen, in denen es exprimiert wird, ein Zielgen deletiert, welches von loxP-Sequenzen („*locus of crossing over*“) flankiert ist.<sup>67</sup> Diese loxP-Sequenzen sind 34 Basenpaare lang und beinhalten eine 13 Basenpaare lange, inverse Wiederholung von Basen, die gemeinsam eine Kernregion umgeben.<sup>64</sup> Während des Rekombinationsprozesses bilden vier Cre-Rekombinasen eine synaptische Struktur mit zwei ihrer spezifischen loxP-Erkennungssequenzen.<sup>68</sup> Durch homologe Rekombination kommt es dabei zwischen den loxP-Sequenzen, wenn sie in gleichsinniger Orientierung vorliegen, zu einer Deletion, oder falls sich die Sequenzen invers wiederholen, zu einer Inversion des entsprechenden DNA-Abschnitts.<sup>67</sup> Um eine Cre/loxP induzierte Deletion eines Zielgens, hier des  $\beta$ 1-Integrins, zu einem definierten Zeitpunkt/Entwicklungsabschnitt zu erreichen, werden zwei unterschiedliche transgene Mauslinien benötigt, die dann miteinander gekreuzt werden.<sup>61,62,69</sup>

Zur Erzeugung eines transgenen Tieres gibt es dabei mehrere Verfahren, von denen für das Cre/loxP System die zwei folgenden miteinander kombiniert werden:

- Ein klassisches Verfahren stellt die Mikroinjektion von DNA in den parentalen Pronukleus einer befruchteten Eizelle dar, welche einer scheinchwangeren Ammenmutter implantiert wird (*siehe Abbildung 8*). Bei dieser Methode findet der Einbau der fremden DNA zufällig in Bezug auf Integrationsort und Zahl integrierter Kopien statt.<sup>70-72</sup> Durch Auswahl geeigneter regulatorischer Elemente ist eine Steuerung der Expression in Bezug auf Genprodukt, Expressionszeitpunkt und Gewebespezifität in engen Grenzen möglich.<sup>58,71</sup> Mit diesem System werden transgene Mäuse erzeugt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines geeigneten gewebespezifischen Promoters exprimieren.

## Einleitung

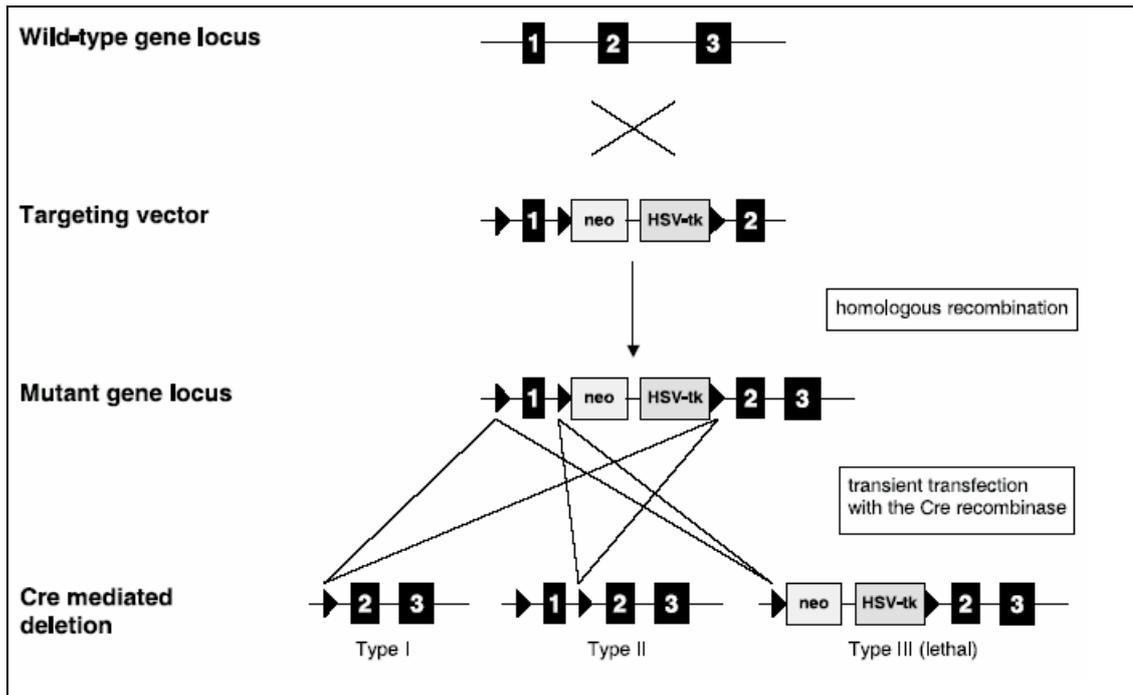
Um eine selektive Ausschaltung des  $\beta 1$ -Integrins im Herzmuskel zu erreichen, wird in unserem Fall der herzmuskelspezifische Promoter für das MLC2v-Gen („*myosin-light-chain 2v*“) eingesetzt. Dieses Gen ist in keinem anderen Gewebe vorhanden und wird nur in Kardiomyozyten in den frühen Stadien der ventrikulären Differenzierung exprimiert (Embryonalstadium 7,5).<sup>73,74</sup>



**Abbildung 8:** Pronukleäre DNA Mikroinjektion<sup>72</sup>

- Ein neueres und nur bei der Maus etabliertes Verfahren stellt der Einsatz von transfizierten Zelllinien als Vektoren dar, die definierte Genlocus spezifische Veränderungen im Erbgut ermöglichen. Dabei werden pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten isoliert. Diese lassen sich unter geeigneten Bedingungen permanent in vitro kultivieren<sup>62,75,76</sup> und mittels homologer Rekombination zielgerichtet mit bestimmten Genkonstrukten transfizieren.<sup>62,77</sup> Werden diese gezielt mutierten ES-Zellen in ein frühes Stadium des Mäuseembryos zurücktransferiert, können sie in alle Gewebe, einschließlich der Keimbahn differenzieren. Sie führen so zur Entstehung einer Chimäre, welche diese Mutation an ihre Nachkommen weitervererbt. Diese tragen die Mutation von Beginn der Embryonalentwicklung an in allen Zellen. Mit diesem System wird in der Maus das Zielgen, hier das  $\beta 1$ -Integrin, mit den loxP-Sequenzen flankiert („*geflox*t“), wobei es wichtig ist, dass diese loxP-Sequenzen durch ihre geringe Größe an sich die Funktion und Expression des Zielgens nicht stören (*siehe Abbildung 9*).<sup>61,62,78</sup>

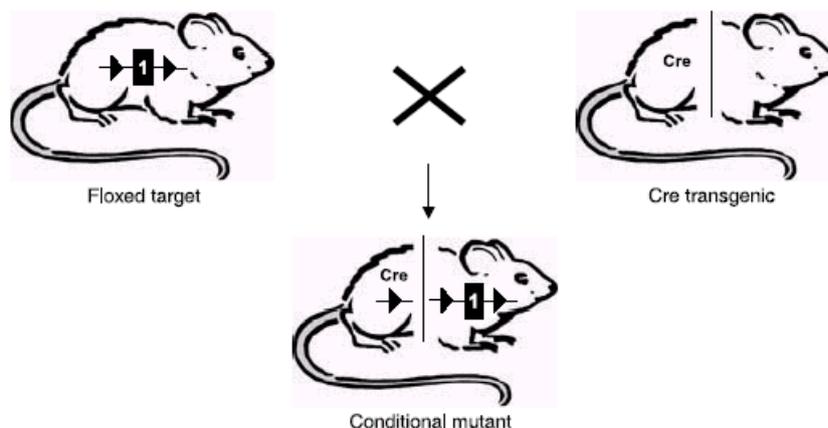
## Einleitung



**Abbildung 9:** Herstellung mutierter ES-Zellen mit „gefloxtem“ Zielgen.

Mittels homologer Rekombination werden loxP-Sequenzen (schwarze Dreiecke) und die Selektionsmarker neo (Neomycin Resistenz) und HSV-tk (wandelt Ganciclovir in toxische Metaboliten um) in die ES-Zellen eingeführt. Diese Zellen werden nun mit der Cre-Rekombinase transfiziert, was zu drei Mutationstypen führt. Typ 1 sind Neomycin sensitive Klone, bei denen die gesamte „gefloxt“ Region entfernt wurde. Typ 2 sind die gewünschten Klone, bei denen nur die Selektionsmarker entfernt wurden. Typ 3 sind Klone, die aufgrund des nicht entfernten HSV-tk unter Ganciclovir Selektion letal sind.<sup>62</sup>

Im folgenden werden die Mäuse, bei denen das entsprechende Zielgen mit den loxP Sequenzen flankiert ist, mit den Mäusen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, gekreuzt (siehe Abbildung 10). Die Cre-Rekombinase schneidet nun in den Nachkommen das „gefloxt“ Zielgen aus, woraus ein konditionaler Knock Out resultiert.<sup>62</sup>



**Abbildung 10:** Kreuzung der transgenen Mäuse zur Erlangung eines konditionalen Knock Outs<sup>62</sup>

## 1.5. Fragestellung

Obwohl mittlerweile einige Hinweise auf die Beteiligung von Integrinen beim kardialen „*Remodeling*“ und bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz vorliegen, stehen wir beim Verständnis ihrer Funktionsweise erst am Anfang. Weiterhin ist die kausale Bedeutung von Integrinen bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie noch immer nicht vollständig geklärt.

In dieser Arbeit soll nun die funktionelle Bedeutung des  $\beta$ 1-Integrins bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz untersucht werden, wobei als Tiermodell die Induktion einer kardialen Hypertrophie durch transversales Aortic Banding bei Mäusen mit Expression der Cre-Rekombinase und bei Mäusen mit konditionalem  $\beta$ 1-Integrin Knock Out ausgewählt wurde. Die Züchtung der konditionalen Knock Out Tiere wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich durchgeführt. Sowohl mit morphologischen, histologischen und echokardiographischen, als auch mit proteinanalytischen und immunhistologischen Methoden werden die Tiere zwei und sieben Tage nach der Operation untersucht. Dabei sollen die morphologischen, histologischen und echokardiographischen Verfahren über die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz Aufschluss geben, während mittels der proteinanalytischen und immunhistologischen Experimente die Regulation und Lokalisation sowohl des  $\beta$ 1-Integrins, als auch ausgewählter, den Integrinen nachgeschalteter Signalwege, erforscht werden soll.

Diese Untersuchungen sollen daher zur Aufklärung der Pathomechanismen bei der Entstehung von Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz beitragen und die Grundlage für mögliche therapeutische Interventionen schaffen.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien einzeln

<b>Acrylamid 40%</b>	(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)
<b>Aluminiumkaliumsulfat</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>APS</b>	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Avertin (Tribromoethanol)</b>	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Bis-Solution 2%</b>	(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)
<b>BSA</b>	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Chloralhydrat</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>Diethyl ether extra pure, stabilized</b>	(Riedel-de-Haën®, Seelze, Germany)
<b>DMSO</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>DTT</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>EDTA</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Entellan®</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>Eosin</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>Esel Normalserum</b>	(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.)
<b>Ethanol absolut</b>	(Klinikapotheke der Universität Würzburg)
<b>Forene® (Isofluran 0,6 %)</b>	(Abbott Laboratories, Illinois, U.S.A.)
<b>Formalin</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Glycine</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Hämatoxylin</b>	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany)
<b>Isopentan</b>	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>KCl</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Methanol 96%</b>	(Klinikapotheke der Universität Würzburg)
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>NaCl</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>NaCl-Lösung 0,9%</b>	(Fresenius AG, Bad Homburg, Germany)
<b>NaN<sub>3</sub></b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Natriumjodat</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>Paraffin</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
<b>Paraformaldehyd</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Pikrinsäure</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Roti®-Histol</b>	(Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Germany)
<b>SDS</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Sirius Red</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Temed</b>	(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)
<b>Tert-Amyl Alkohol</b>	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Triton-X 100</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Trizma® Base</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Trizma® HCl</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Tween®20</b>	(Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
<b>Zitronensäure</b>	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

## 2.2. Lösungen

### 2.2.1. Allgemein

#### 10 % APS (10 ml)

APS	1 g
ddH <sub>2</sub> O	10 ml

#### Avertinlösung (400 ml)

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

#### 0,5 M Tris (1l)

Trizma® Base	60,5 g
Auffüllen auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O; pH 6,8	

#### 1,5 M Tris (1l)

Trizma® Base	181,6 g
Auffüllen auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O; pH 8,6	

#### 20 % SDS (100 ml)

SDS	20 g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

#### 10x PBS (1l)

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g
Auffüllen auf 1l mit ddH <sub>2</sub> O; pH-Wert 7,4; RT	

#### 1x PBS

10x PBS verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10

#### TBS

NaCl	150 mM
Tris/HCl	20 mM
NaN <sub>3</sub>	0,05 %
pH-Wert 7,6; 4 °C	

#### 2% Tris-Triton Lysis Buffer (100ml)

Triton-X 100	2 ml
EGTA (10mM)	380 mg
NaVO <sub>3</sub> (1000x)	200 µl
Tris-HCl (100mM)	1,21 g
auffüllen auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O; pH-Wert 7,4; 4 °C	

## Material

### **2% SDS-Sample-Puffer (40 ml)**

ddH <sub>2</sub> O	19 ml
Glycerol	12 ml
20% SDS	4 ml
Tris/EDTA	5 ml
DTT	617 mg

### **1% SDS-Sample-Puffer**

2% SDS-Sample-Puffer verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1

### **10x TBST (1 l)**

Tris-Base	12,1g
NaCl	58.4g
Tween-20	15 ml

Auffüllen auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O; pH-Wert 7,5

### **1x TBST**

10 x TBST verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10

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

Luminol Enhancer Solution gemischt mit Stable Peroxide Buffer im Verhältnis 1:1

**Bradford Reagenzlösung Bio-Rad Protein Assay**, (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, U.S.A.)

### **Pikro-Sirius-Rot:**

90 ml Pikrinsäure

10 ml Sirius Rot

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei RT

### **Hämalaun nach Mayer**

Hämatoxylin	6 g
Natriumjodat	1 g
Aluminiumkaliumsulfat	250 g
Chloralhydrat	250 g
Zitronensäure	5 g

Auffüllen auf 5 l mit ddH<sub>2</sub>O; Lichtgeschützte Aufbewahrung bei RT

### **Eosin**

Eosin	1g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei RT

### **2% PFA Lösung (500 ml):**

Paraformaldehyd	10 g
ddH <sub>2</sub> O	450 ml
10x PBS	50 ml

bei 60 °C ca. 30 min umrühren bis die Lösung klar ist; pH-Wert 7,4; 4 °C

## Material

### **0,1 % Triton Lösung (150 ml):**

TBS	150 ml
Triton X 100	150 µl

bei RT solange umrühren bis sich das Triton X 100 aufgelöst hat

### **1% TBSA Lösung (10 ml):**

TBS	10 ml
BSA	0,1 g

pH-Wert 7,6; 4 °C

### **10 % Esel Normalserum (pro Schnitt 100 µl):**

TBSA	100 µl
Esel Normalserum	10 µl

Vortexen, 4 °C

*Alle Verdünnungen soweit nicht anders angegeben mit ddH<sub>2</sub>O*

## **2.2.2. Bei Verwendung von 7,5 % Gelen**

### **Running Buffer (4l)**

Tris-Base	24 g
Glycine	116 g
20% SDS	20 ml

Auffüllen auf 4 l mit ddH<sub>2</sub>O; RT

### **Transfer Buffer (4l)**

Tris-Base	12 g
Glycine	58 g
Methanol	800 ml

Auffüllen auf 4 l mit ddH<sub>2</sub>O; RT

### **Gel 7,5 % (42 ml)**

ddH <sub>2</sub> O	16,0 ml
1,5 M Tris	11,3 ml
20 % SDS	280 µl
40 % Acrylamid	10,5 ml
2 % Bis-Solution	4,1 ml
Temed	14 µl
10 % APS	315 µl

### **Stacker, 4% (14 ml)**

ddH <sub>2</sub> O	9,0 ml
0,5 M Tris	1,75 ml
20 % SDS	90 µl
40 % Acrylamid	1,8 ml
2 % Bis-Solution	1,05 ml
Temed	14 µl
10 % APS	210 µl

### 2.2.3. Bei Verwendung der Xcell Sure Lock™ Mini-Cell

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

**Running Buffer (400 ml)**, (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

20x NuPage SDS Running Buffer 20 ml

ddH<sub>2</sub>O 380 ml

**Transfer Buffer (400 ml)**, (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

20x NuPage Transfer Buffer 20,0 ml

5% Methanol 20,0 ml

NuPAGE Antioxidant 0,4 ml

Auffüllen auf 400 ml mit ddH<sub>2</sub>O

**Anmerkung:** In US-Laboratorien wird Transferpuffer mit 5 % Methanol zur Übertragung großer Proteine verwendet.

### 2.2.4. Protease und Phosphatase Inhibitoren

**EGTA (10mM)**, (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

Metalloproteasen-Inhibitor; Ca<sup>2+</sup>-spezifisch als Lösung in ddH<sub>2</sub>O;

pH-Wert > 10; -20 °C

**EDTA**, (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

Metalloproteasen-Inhibitor; unspezifisch als Lösung in ddH<sub>2</sub>O; pH-Wert > 10; -20 °C

**NaVO<sub>3</sub> Sodium-Vanadate (1000x)**, (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)

Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor; als Lösung in ddH<sub>2</sub>O; -20 °C

**Ocadaic Acid (sodium salt)**, (Calbiochem®, San Diego, U.S.A.)

Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor; als Lösung in DMSO; -20 °C

**Phosphatase-Inhibitor-Cocktail Set II**, (Calbiochem®, San Diego, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

**Protease-Inhibitor-Cocktail Set III**, (Calbiochem®, San Diego, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

### 2.2.5. Größenstandard

**High Marker Full Range Rainbow™ RPN 800 V**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)

Verdünt mit 2 x SDS im Verhältnis 1:1; -20 °C

**Low Marker MagicMark™ Western Standard**, (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

Aufbewahrung bei -20 °C

## 2.3. Antikörper

### 2.3.1. Western Blot

**p-FAK 925:** Rabbit phospho-FAK (Tyr<sup>925</sup>) antibody  
(Cell Signaling Technology®, Inc., Beverly, U.S.A.)  
Verdünnung 1:1000; -20 °C

**p-Src 416:** Rabbit phospho-Src family (Tyr<sup>416</sup>) antibody  
(Cell Signaling Technology®, Inc., Beverly, U.S.A.)  
Verdünnung 1:1000; -20 °C

**β1-Integrin:** Mouse IgG<sub>1</sub> Anti-β1-Integrin antibody  
(BD Transduction Laboratories™, Kentucky, U.S.A.)  
Verdünnung 1:2500; -20 °C

**ANP:** Rabbit Anti-Atrial Natriuretic Peptide affinity purified polyclonal antibody  
(Chemicon International, Inc., Temecula, U.S.A.)  
Verdünnung 1:500; -20 °C

**Erk 1/2:** Rabbit polyclonal Anti-Erk 1&2 pan antibody, unconjugated  
(Biosource, Camarillo, U.S.A.)  
Verdünnung 1:8000; -80 °C

**p-Erk 1/2:** Rabbit polyclonal Anti-Erk 1&2 [pTpY<sup>185/187</sup>] phosphospecific antibody,  
unconjugated (Biosource, Camarillo, U.S.A.)  
Verdünnung 1:1000, -80 °C

**P 38:** Mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> Anti-P 38 (A-12): sc-7972  
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)  
Verdünnung 1:500; 4 °C

**p-P 38:** Rabbit polyclonal Anti-P 38 [pTpY<sup>180/182</sup>] phosphospecific antibody,  
unconjugated (Biosource, Camarillo, U.S.A.)  
Verdünnung 1:1000; -80 °C

**GAPDH:** Mouse Anti-Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase monoclonal  
antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, U.S.A.)  
Verdünnung 1:8000; 4 °C; Incubationszeit 1h bei RT

**Zweitantikörper:** Donkey Anti-Mouse IgG HRP  
Donkey Anti-Rabbit IgG HRP  
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)  
Verdünnung 1:1000

### 2.3.2. Immunhistologie

**p-FAK 925:** Affinity purified rabbit polyclonal antibody p-FAK (Tyr<sup>925</sup>)  
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)  
Verdünnung mit 1% TBSA 1:20; 4 °C

**p-Src 418:** Rabbit (polyclonal) Anti-Src [pY<sup>418</sup>] phosphospecific antibody  
unconjugated (Biosource, Camarillo, U.S.A.)  
Verdünnung mit 1% TBSA 1:20; -20 °C

**Konjugierte Antikörper: β1-Integrin:** Armenian hamster monoclonal IgG  
Integrin β1 (HMβ1-1) FITC  
(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)  
Lichtgeschützte Aufbewahrung bei 4 °C; Verdünnung mit 1% TBSA 1:20

*Farbstoff FITC:*

Absorptionsmaximum: 494 nm; Emmisionsmaximum: 520 nm; Emissionsfarbe: grün

**Zweitantikörper: Anti Rabbit IgG** Cy<sup>TM</sup>2- conjugated AffiniPure F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub>  
Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)  
**Anti Mouse IgG:** Cy<sup>TM</sup>2- conjugated AffiniPure F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub>  
Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C; Verdünnung mit 1% TBSA 1:500

*Farbstoff Cy<sup>TM</sup>2:*

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

**Aktinfärbung: Alexa Flour? 546 phalloidin**

(Molecular Probes, Eugene, U.S.A.)

Lichtgeschützte Aufbewahrung bei -20 °C; Verdünnung mit 1% TBSA 1:10

*Farbstoff Alexa Fluor 546:*

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

## **2.4. Geräte, sonstige Materialien und Software**

**3CCD Color Video Camera**, (Sony Corporation, Japan)  
**Adobe Photoshop 6.0**, (Adobe Systems Incorporated, San Jose, U.S.A.)  
**Argon Laser 161C-030, Luftgekühlt, Output 488 nm**, (Spectra-Physics, Mountain View, U.S.A.)  
**BD Venflon™ Pro verschiedene Größen**, (Becton, Dickinson, NJ, U.S.A.)  
**Beheizte Arbeitsplatte (37 °C konstant, DC Erwärmung)**, (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Germany)  
**Camera Adaptor CMA-D2**, (Sony Corporation, Japan)  
**ChemImager™ 5500 chemiluminescence imaging system**, (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, U.S.A.)  
**Confocal Microscope C1**, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)  
**Cutfix® Surgical Disposable Scalpel verschiedene Größen** (AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany)  
**Dounce Kolben**, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)  
**Einmalküvetten REF 67.742**, (Sarstedt AG & Co., Nürnberg Germany)  
**Elektrophoresis Power Supply EPS 301, EPS 601**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)  
**Eppendorf Röhrchen 1,5 ml, 2 ml**, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)  
**Gewebeeinbettautomat**, (Bavimed Laborgerätebau GmbH, Birkenau, Germany)  
**Heizplatte BBA 1**, (Grant Boekel, Cambridgeshire, G.B.)  
**Helium-Neon Laser 1674P, Output 543 nm**, (JDS Uniphase, San Jose, U.S.A.)  
**Hoefer Elektrophoresis Unit SE 600**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)  
**Insulinspritzen Omnifix®-F 1ml**, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)  
**Kryotom CM 1850**, (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)  
**Kugelschere BC030R**, (AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany)  
**Laborrührwerk Eurostar digital**, (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)  
**Linearschallkopf 15 MHz**  
**Microtome Blades C35**, (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)  
**Microtome Blades S22**, (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)  
**Mikroskop Laborlux S (Vergrößerung 10x) mit Objektiv Plan 1,6**, (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)  
**Mikroskop Nikon Eclipse ME 600**, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)  
**Mini Eppendorf Cups 0,5 ml**, (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)  
**Objektiv Plan Apo 60xa 1.40 Oil DIC H**, (Nikon Instech Co., Ltd., Kawasaki, Japan)  
**Objektträger Superfrost®-Plus**, (Erie Scientific Company, Portsmouth, U.S.A.)  
**Operationsmikroskop (Vergrößerung 20x)**, (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany)  
**Nadeln Sterican® verschiedene Größen**, (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)  
**PAP Pen**, (Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan)  
**Perma Hand Seide verschiedene Größen**, schwarz, geflochten, nicht resorbierbar, (Ethicon, Cornelia, U.S.A.)  
**pH Messgerät inoLab pH Level 1**, (WTW, Weilheim, Germany)  
**Pico Fuge**, (Stratagene, La Jolla, U.S.A.)  
**Pinzetten, Scheren verschiedene Größen** (AESCULAP AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany)

## Material

**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)

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

**PVDF Membranen**, (A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Germany)

**Reagenzglasmixer**, (A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Germany)

**Rodent Ventilator 7025**, (Ugo Basile, Comerio VA, Italy)

**Schlittenmikrotom Hn 40**, (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)

**Schwenktische**, (A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Germany)

**SemiPhor™ Transphor Unit**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)

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

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

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

**Spectrophotometer Ultrospec 3000**, (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England)

**StatView®**, (SAS Institute Inc., Cary, U.S.A.)

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

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

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

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

**Vortex**, (A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Germany)

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

**Whatman Papiere**, (A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Germany)

**XCell II™ Blot Module**, (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

**XCell Sure Lock™ Mini-Cell**, (Invitrogen® Corporation., Carlsbad, U.S.A.)

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

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

### **3. Methoden**

#### **3.1. Herstellung von Mauslinien mit konditionalem $\beta$ 1-Integrin Knock Out**

Wie unter *Punkt 1.4.2* beschrieben, wurden in unseren Versuchen Mäuse eingesetzt, bei denen mit dem etablierten Cre/loxP System herzmuskelzellenspezifisch das  $\beta$ 1-Integrin größtenteils ausgeschaltet wurde.

Die Mäuse für den konditionalen Knock Out des  $\beta$ 1-Integrins wurden freundlicherweise von Prof. Reinhard Fässler und Dr. Cord Brakebusch, Lund, Schweden zur Verfügung gestellt.<sup>79,80</sup> Die Mäuse, deren Cre-Rekombinase mit dem MLC2v-Promotergen gekoppelt sind, stammten von Dr. K. Chien, San Diego, Kalifornien.<sup>81</sup>

Sowohl die konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäuse,<sup>79,80</sup> als auch die kardiomyozytenspezifischen Cre-Mäuse wurden bereits erfolgreich eingesetzt.<sup>73,81,82</sup>

Nachdem adulte chimäre Mäuse mit einem nicht 100 %-igen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out noch einen normalen kardialen Phänotyp aufwiesen,<sup>83</sup> wurde ein letaler embryonaler Phänotyp nicht erwartet.

Folgende Verpaarungen wurden durchgeführt:

- Heterozygote Cre-MLC2v-Mäuse (Cre +/-) wurden mit heterozygoten  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen ( $\beta$ 1 +/-) verpaart. Erzeugter Genotyp:  $\beta$ 1 +/-; Cre +/-.
- Die Männchen dieser Zucht wurden daraufhin mit weiblichen homozygot konditionalen loxP flankierten  $\beta$ 1-Integrin Mäusen ( $\beta$ 1 c/c; Cre -/-) gekreuzt. Erwünschter Genotyp:  $\beta$ 1 -/c; Cre +/-.

Somit wurde eine ca. 90 %-ige Ausschaltung des  $\beta$ 1-Integrins im Myokard erreicht. Zur leichteren Quantifizierung des konditionalen Knock Outs wurde zusätzlich zu den loxP-Schnittstellen das E. coli lacZ-Gen inseriert, das nach dem Ausschneiden des  $\beta$ 1-Integrins aktiviert wird und dessen Genprodukt  $\beta$ -Galactosidase sich durch eine Farbreaktion im Gewebe nachweisen lässt.<sup>62,79,84</sup>

### 3.2. Transversales Aortic Banding

Für unsere Fragestellung benötigten wir nach Herstellung von Mauslinien mit konditionalem  $\beta$ 1-Integrin Knock Out noch ein Verfahren um suffizient eine kardiale Hypertrophie zu erzeugen. Eine elegante und etablierte Methode um dieses Ziel zu erreichen, stellt das Modell des transversalen Aortic Bandings dar (siehe Abbildung 11).<sup>85</sup>

Dabei wurden die Tiere zuerst mit Ether betäubt, mit dem Kunststoffkatheter einer 22 G Venenverweilkanüle intubiert und mit Isofluran narkotisiert. Isofluran eignet sich für kardiovaskuläre Untersuchungen besonders, da es eine nur gering ausgeprägte kardiodepressive Wirkung zeigt. Die Tiere wurden mit einem Atemzugvolumen von ca. 0,2 ml und einer Atemfrequenz von ca. 130/min beatmet. Der Thorax des narkotisierten Tieres wurde sodann unter einem Operationsmikroskop mit einer Kugelkopfschere sternal eröffnet und die Aorta transversalis aufgesucht. Diese wurde zusammen mit einer an das Gefäß angelegten 27 G Nadel als Größenstandard mit einem Faden umschlungen. Der Faden wurde zugezogen und die Nadel entfernt. Dadurch wurde die Aorta transversalis so weit eingengt, dass eine Konstriktion von ca. 65-70 % entstand. Dieses Hindernis in der Auswurfbahn führt zu einer erhöhten Druckbelastung des linken Ventrikels und soll somit im Verlauf von zwei bis sieben Tagen eine ausgeprägte linksventrikuläre, konzentrische Hypertrophie mit einer Zunahme des Herzgewichts in Bezug zum Körpergewicht von 40-60 % zur Folge haben.<sup>85-87</sup>

Nach der Operation wurde der Thorax der Mäuse mit Metallclips verschlossen und die Narkose ausgeleitet.

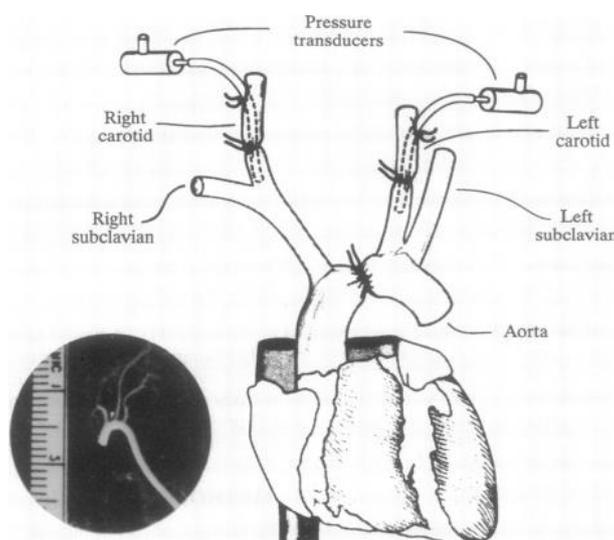


Abbildung 11: Transversales Aortic Banding<sup>85</sup>

### 3.3. Zeitpunkte, Gruppen und Vorgehensreihenfolge

Wir betrachteten für unsere Versuche folgende Mausgruppen:

- **Ctrl-Cre** (Cre +/-,  $\beta 1$  +/+): Scheinoperierte Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase als Kontrollgruppe.
- **Ctrl-KO** (Cre +/-,  $\beta 1$  c/-): Scheinoperierte Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase und konditionalem  $\beta 1$ -Integrin Knock Out.
- **AB-Cre 2d** (Cre +/-,  $\beta 1$  +/+): Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase und Untersuchungszeitpunkt zwei Tage nach transversalem Aortic Banding.
- **AB-KO 2d** (Cre +/-,  $\beta 1$  c/-): Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase, konditionalem  $\beta 1$ -Integrin Knock Out und Untersuchungszeitpunkt zwei Tage nach transversalem Aortic Banding.
- **AB-Cre 7d** (Cre +/-,  $\beta 1$  +/+): Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase und Untersuchungszeitpunkt sieben Tage nach transversalem Aortic Banding.
- **AB-KO 7d** (Cre +/-,  $\beta 1$  c/-): Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase, konditionalem  $\beta 1$ -Integrin Knock Out und Untersuchungszeitpunkt sieben Tage nach transversalem Aortic Banding.

Zu beachten ist hierbei, dass alle Tiere erst ab einem Alter von ca. 12 Wochen in die Experimente integriert werden, um mögliche endogene Wachstumseffekte zu vermindern. Nach der Operation wurden die Mäuse zurück in ihre Käfige verbracht und zwei Mal täglich, sowohl vormittags, als auch abends nach Vitalität geprüft. Zum jeweils vorgegebenen Untersuchungszeitpunkt nach transversalem Aortic Banding wurden die Mäuse zunächst einer Echokardiographie unterzogen (*siehe Punkt 3.4*). Danach erfolgte die Tötung der Tiere und die Entnahme der noch schlagenden Mäuseherzen. Die Organe wurden daraufhin für die jeweiligen Untersuchungsmethoden vorbereitet (*siehe Punkt 3.5*).

### **3.4. Transthorakale Herzechokardiographie**

Dieses sonographische Verfahren eignet sich besonders zur Darstellung kardialer und perikardialer Strukturen, sowie zur Untersuchung der Herzfunktion *in vivo*. Die Ultraschallwellen werden dabei in einem Schallkopf erzeugt, in Pulsationen in den Körper geleitet und erfahren im Gewebe einen Energieverlust in Form von Absorption, Reflexion, Streuung und Brechung. Reflektierte Schallwellen werden daraufhin wieder vom Schallkopf aufgefangen und in elektrische Energie umgewandelt, die mittels computergestützter Berechnung eine Bilderzeugung ermöglicht. Die Abbildung geschieht dabei in Graustufen. Der Ort der Reflexion wird als weißer Punkt abgebildet, welcher sich umso kräftiger darstellt, je stärker die Reflexion ist. Es gibt mehrere verschiedene Darstellungsformen. Der B-Mode (B = „*Brightness*“) eignet sich besonders zur Betrachtung und Untersuchung von Bewegungen des Myokards, sowie zur Bestimmung von Umfängen und Flächen. Im M-Mode (M = „*Motion*“) werden Bewegungsabläufe durch eine Aneinanderreihung von B-Mode Bildern bei unbewegtem Schallkopf registriert. Er eignet sich deswegen besonders zur Untersuchung, Messung, Berechnung und Dokumentation von Herzfunktion und Herzmorphologie.

Die Mäuse wurden an den festgelegten Untersuchungszeitpunkten zunächst mit Avertin narkotisiert, welches mit einem Richtwert von ca. 0,1 ml pro g/KG unter die Haut und in die Bauchhöhle gespritzt wurde. Obwohl der genaue Wirkmechanismus dieses Mittels unbekannt ist, ist die Avertinnarkose eine einfache und schonende Methode, eine Kurznarkose von 15-20 min herbeizuführen. Die narkotisierten, spontanatmenden Tiere wurden daraufhin im Brustbereich rasiert und rücklings auf einem Wärmekissen gelagert. Mit einem 15 MHz Linearschallkopf wurden die Herzen der Mäuse mit möglichst wenig Druck in der kurzen Achse in der Papillarmuskelebene, sowohl im M- als auch im B-Mode geschallt. Die Ultraschallbilder wurden gespeichert und mit dem *DICOM*<sup>TM</sup>-Standard in eine Software geladen, die offline eine Betrachtung der Bilder, ein Ausmessen von Distanzen, sowie eine Berechnung von Herzfunktionsparametern ermöglicht. In den Ebenen wurden dabei vermessen: Die Dicke der Hinterwand und des Interventrikularseptums in der Enddiastole, sowie der Durchmesser des linken Ventrikels in Enddiastole und Endsystole. Ferner wurde noch das *Fractional Shortening* in Prozent als Parameter für die Herzfunktion berechnet. Die erhaltenen Daten wurden danach zur statistischen Auswertung in das Programm *StatView*® (siehe Punkt 3.9) eingegeben.

### **3.5. Organentnahme und Morphologie**

Die Mäuse wurden vor der Organentnahme tief mit Äther narkotisiert und gewogen. Daraufhin wurden die Tiere mittels Genickbruch getötet und nach Eröffnung des Thorax die noch schlagenden Herzen entnommen. Die Organe wurden in eiskaltem 1x PBS gewaschen, von Blut befreit und die Vorhöfe abpräpariert. PBS eignet sich hierfür besonders, da es osmotische Folgen, wie ein Platzen oder Schrumpfen von Zellen, abzupuffern vermag. Es folgte das Wiegen der so behandelten Herzen und das Ausschneiden von ein bis zwei transversalen Ringen aus dem mittleren Drittel der Herzen mit einer kleinen scharfen Schere, welche für Histologie (*siehe Punkt 3.7*) bzw. Immunhistologie (*siehe Punkt 3.8*) verwendet wurden. Der Herzring für die Histologie wurde in ein mit 20 % igem Formalin gefülltes Plastikröhrchen eingebracht und konnte so einige Zeit aufbewahrt werden. Der Herzring für die Immunhistologie wurde zuerst in einem Glas mit stickstoffgekühltem flüssigem Isopentan kältefixiert und danach in einem Plastikröhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das restliche Herzgewebe wurde auch in ein Plastikröhrchen eingesetzt, mit diesem in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und darauffolgend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Als letztes wurde aus dem Thorax noch die Lunge entnommen und gewogen, sowie die Tibia herauspräpariert und gemessen. Die so gewonnenen Daten wurden wiederum in das *StatView*® Programm eingegeben und statistisch ausgewertet (*siehe Punkt 3.9*).

### **3.6. Proteinanalytische Methoden**

#### **3.6.1. Proteinextraktion aus dem Herzmuskelgewebe**

Um Proteine gelelektrophoretisch entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, ist es notwendig, die Proteine aus dem Gewebe zu extrahieren und in eine SDS-haltige Probe zu überführen.

Zuerst wurden für jedes Herz je ein rotes und ein blaues Zentrifugenröhrchen vorbereitet, beschriftet und auf Eis gelagert. Außerdem wurden sog. *Dounce*-Glaskolben zur Homogenisierung des Gewebes vorbereitet, beschriftet und ebenso auf Eis gelagert. Das bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Herzgewebe wurde nun dem Gefrierschrank entnommen und gewogen. Nun wurde die entsprechende Puffermenge pro Herz, bezogen auf das Herzgewicht, sowie die Gesamtpuffermenge berechnet. Wir kalkulierten 2,5 ml 2 % Tris-Triton Lysis Buffer pro 100 mg Herzgewebe. Folgende Inhibitoren wurden daraufhin dem 2 % Tris-Triton Lysis Buffer

## Methoden

zugesetzt: Ocadaic Acid, Phosphatase Inhibitor Cocktail Set 2, Protease Inhibitor Cocktail Set 3, sowie EDTA. Für je 1 ml Gesamtpuffer wurden 10 µl pro Inhibitor gerechnet. Diese Inhibitoren verhindern eine Proteindegradation durch endogene Enzyme. Das Herzgewebe wurde nun in die Glaskolben eingebracht und sodann mit einem Glasstab solange homogenisiert, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Dies erfolgte zur Verminderung von Reibungswärme auf Eis. Das Homogenisat wurde nun für 20 min auf Eis inkubiert, nach diesem Zeitraum mit einer Plastikpipette in 2 ml rote Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert (14000g, 4 °C, 10 min). Nach diesem Vorgang wurde dem dabei entstandenen Überstand (Supernatant, S1) 50 µl abgenommen und in *Mini-Eppendorf-Cups* eingefüllt. Die Konzentration dieser Proteine konnte dann durch den Bradford-Assay bestimmt werden (*siehe Punkt 3.6.2*). 800 µl dieses Überstandes wurden in ein vorbereitetes blaues Röhrchen transferiert, dem die gleiche Menge an 2x SDS-Sample-Puffer zugesetzt wurde. Der restliche Überstand wurde dekantiert und verworfen. Nach sorgfältigem Mischen mittels Vortex wurden die Röhrchen wieder auf Eis gelagert. Im roten Röhrchen wurde nun das übriggebliebene Sediment (Pellet, P1) weiterverarbeitet. Dazu wurde das Pellet mit ca. 1ml Gesamtpuffer gewaschen, mobilisiert und zerkleinert, indem es mehrmals in Insulinspritzen mit aufgesetzter 23 G Nadel aufgesaugt wurde. Die entstandene Suspension wurde daraufhin zentrifugiert (14000g, 4 °C, 10 min), um den Waschpuffer von den Proteinen zu trennen. Der Waschpuffer stellte sich daraufhin als Supernatant dar, der vorsichtig abgegossen und verworfen wurde. Dieser Schritt ließ sich nötigenfalls mehrmals wiederholen, falls das nun erhaltene Pellet noch rötlich oder rosafarbenen war. Das gewaschene Pellet wurde in 1x SDS-Sample-Puffer aufgenommen (5 µl 1x SDS-Sample-Puffer pro 1 mg Gewebe) und wie zuvor beschrieben mit einer Insulinspritze grob zerkleinert. Mit Hilfe eines *Ultrasonicators* wurden letzte vorhandene Gewebestücke aufgelöst. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen (S1, P1) aufgekocht (95 °C, S1: 5 min, P1: 3 min), nach Abkühlen direkt auf Western Blot Gele geladen oder bei -80 °C kryokonserviert.

### **3.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem Bradford-Assay**

Diese schnelle und bewährte Methode zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde 1976 von M. M. Bradford veröffentlicht.<sup>88</sup> Sie basiert auf dem Prinzip einer Komplexbildung zwischen Aminosäureresten (insbesondere Arginin-Reste) und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, die zu einer intensiven Blaufärbung führt. Die Extinktion der Blaufärbung ist abhängig von der Proteinkonzentration und wird mit einem Photometer bei

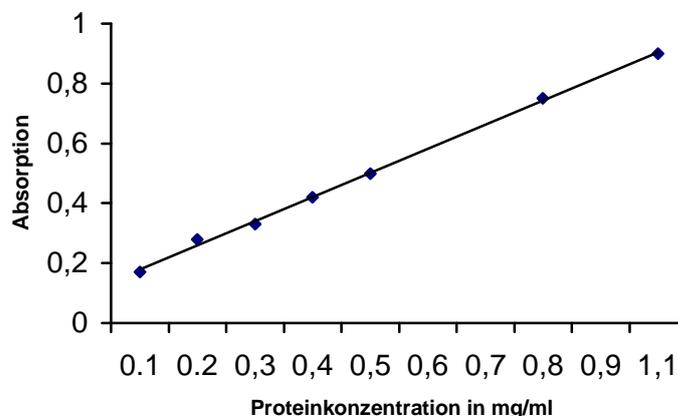
## Methoden

einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gegen einen Leerwert gemessen. Als Referenz dient eine BSA-Eichkurve. Diese muss vor jeder Messung neu ermittelt werden.

Zunächst wurde eine kommerziell erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenzlösung mit PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt. Jeweils 1 ml dieser Farbstofflösung wurde in eine Einmal-Küvette pipettiert. Den Küvetten wurde zur Bestimmung der Standardkurve jeweils 2  $\mu\text{l}$  einer bekannten Proteinkonzentration von 2,5; 5,0; 7,5; und 10,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zugegeben. Mit den Proteinproben unbekannter Konzentration wurde entsprechend verfahren und zur Sicherheit eine Doppelbestimmung durchgeführt. Vor der Absorbanzmessung war es notwendig, die Lösung in den Küvetten sorgfältig mit dem Vortex zu durchmischen. Die optische Dichte des daraufhin eintretenden blauen Farbumschwungs wurde nun bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte (y-Achse) können nun gegen die Proteinkonzentrationen (x-Achse) aufgetragen werden und es wird eine Ausgleichsgerade (siehe Abbildung 12) gelegt. Durch einen Vergleich der Messwerte mit der Eichkurve ist es dann möglich die unbekannt Proteinkonzentrationen nach dem Lambert-Beer-Gesetz zu ermitteln:

<b><math>E = \epsilon \cdot c \cdot d</math></b>	E=Extinktion	$\epsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient
	c = Konz. der gelösten Substanz	d = Schichtdicke der Lösung

Diese Berechnungen erfolgten automatisch durch das Photometer. Da pro Ansatz 2  $\mu\text{l}$  Proteinlösung zugegeben wurde, müssen die Ergebnisse noch durch zwei geteilt werden. Mit einer Zielvorgabe von 32  $\mu\text{g}$  Protein pro Geltasche wird anschließend das Ladevolumen für die Gelelektrophorese berechnet.



**Abbildung 12:** Standardkurve bei bekannten Proteinkonzentrationen

### **3.6.3. Proteinauftrennung mit der SDS–Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)<sup>89</sup> werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Trägermedium wird dabei Polyacrylamid verwendet. Dieses besitzt den Vorteil, dass es chemisch inert ist und zudem die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid leicht variiert werden kann. Durch ihre Zusammensetzung aus basischen, neutralen und sauren Aminosäuren besitzen Proteine eine vom pH-Wert abhängige Nettoladung, die durch eine dem Molekulargewicht direkt proportionale Anlagerung der negativ geladenen SDS-Moleküle überdeckt wird. Somit wird die Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-haltigen Gelen alleine durch das Molekulargewicht des unmodifizierten Proteins, sowie durch den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt.

Ein Gel für eine SDS-PAGE besteht aus einem Sammelgel („*Stacker*“) und einem Trenngel. Der „*Stacker*“ fokussiert die geladenen Proben am Übergang zum Trenngel, um auch größere Probenvolumina ohne Beeinträchtigung der Auflösung auftragen zu können. Im Trenngel erfolgt daraufhin die Auftrennung der Proteine nach dem Massen/Ladungsverhältnis.

Zur Proteinauftrennung verwendet werden die zwei folgenden Verfahren: Das „*Screening*“ nach bestimmten Proteinen erfolgte in selbst hergestellten 7,5 %-igen Trenngelen und die Auftrennung von Proteinen für die Abbildungen in kommerziell erhältlichen Fertiggelen.

#### **3.6.3.1. Proteinauftrennung in 7,5 %-igen Trenngelen**

Zuerst wurde die Gellösung vorbereitet, die Glasplatten mit Ethanol gereinigt und die Gelgießvorrichtung in einer Elektrophoresekammer mit einem Abstandshalter zwischen den Glasplatten aufgebaut. Das Trenngel wurde nun zwischen die Glasplatten gegossen, bis es eine Höhe von ca.  $\frac{3}{4}$  des gesamten Gels ausmachte. Das noch flüssige Gel wurde zum Erzeugen einer planen Oberfläche nun vorsichtig mit ca. 2 ml ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser abgegossen und das vorbereitete Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Durch das Einsetzen einer kammartigen Schablone blieben die Probestaschen ausgespart. Nach dem Auspolymerisieren des „*Stackers*“ wurde der Kamm gezogen und die Taschen gründlich mit Laufpuffer („*Running Buffer*“) gespült, um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen.

Nach dem Einfüllen der Größenmarker in die äußersten Geltaschen wurden nun die zu ladenden Proben auf dem Heizblock erhitzt (92 °C, S1: 5 min, P1: 3 min) und nach Abkühlen das nach dem Bradford-Assay (*siehe Punkt 3.6.2*) errechnete Volumen mit einer Pipette in die Geltaschen eingebracht. Die Elektrophoresekammer wurde daraufhin mit „*Running Buffer*“ gefüllt und geschlossen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei einer Maximalspannung von 200 V und einer Stromstärke von 9 mA. Durch die langsame Auftrennung erhält man in der Regel geradere Bandenmuster.

### **3.6.3.2. Proteinauftrennung in NuPAGE® Novex Bis-Tris Gelen**

Die vorgefertigten Gele wurden der Verpackung entnommen und in die *XCell SureLock™ Mini-Cell* eingesetzt, in der die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen stattfindet. Wie unter *Punkt 3.6.3.1* beschrieben, wurden die Proben erhitzt und die berechneten Volumina, sowie die Größenmarker in die gespülten Geltaschen eingefüllt. Daraufhin wurde die obere Pufferkammer mit 200 ml 1x *NuPage® SDS „Running Buffer“* und die untere Pufferkammer mit 600 ml 1x *NuPage® SDS „Running Buffer“* aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 90 min bei einer Maximalspannung von 200 V und einer Stromstärke von 80 mA.

### **3.6.4. Western Blot – Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran**

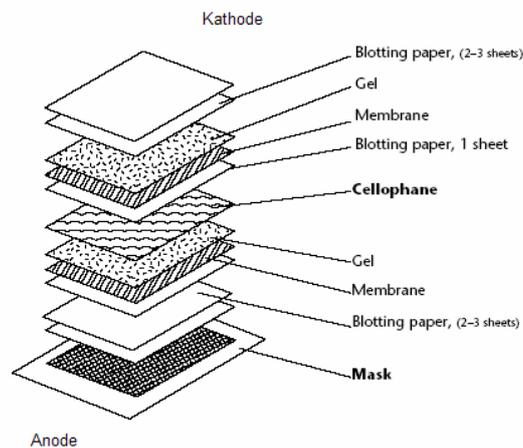
Mit dieser Methode wird eine exakte Kopie des Gels produziert, indem die nach einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einen Trägerfilter, eine PVDF-Membran oder Nitrocellulose übertragen werden. Dabei werden die Proteine auf dem Filter immobilisiert. Da die Immunreaktivität der Proteine bei dem Transfer erhalten bleibt, können sie mit Antikörpern detektiert und so quantitativ und qualitativ untersucht werden.<sup>90-92</sup>

Analog der Verwendung von unterschiedlichen Gelen (*siehe Punkte 3.6.3.1 und 3.6.3.2*), kamen auch hier unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Proteine, die in selbsthergestellten 7,5 %-igen Gelen aufgetrennt wurden, wurden mittels *Semidry-Transfer* übertragen, wohingegen der Transfer von in *NuPage® Novex Bis-Tris* Gelen aufgetrennten Proteinen mit dem *Wet-Transfer* erfolgte.

### 3.6.4.1. *Semi-Dry-Transfer*

Der *Semi-Dry-Transfer* ist eine schnelle und einfache Methode zur Proteinübertragung. Er benötigt weniger Puffervolumen als der *Wet-Transfer* und eignet sich besonders zur Übertragung kleinerer Proteine.

Es wurde dabei folgendermaßen verfahren: Zunächst wurde die PVDF-Membran 1 min in 96 % Methanol aktiviert und für 20 min in Transferpuffer gewaschen. Danach wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Nun wurden die einzelnen Schichten im horizontalen *Blot-Modul* (siehe *Abbildung 13*) möglichst ohne Lufteinschlüsse angeordnet und mit Transferpuffer umspült. Der Transfer der Proteine erfolgte mit einer Spannung von 50 V und einer Stromstärke von 150 mA über einen Zeitraum von 90 min.



**Abbildung 13:** Anordnung der Schichten im horizontalen *Semi-Dry Blot-Modul*

### 3.6.4.2. *Wet-Transfer*

Der *Wet-Transfer* findet in einer mit Transferpuffer gefüllten vertikalen Kammer (z.B. *XCell II Blot Module™*) statt. Da das Gel-Membran-„Sandwich“ durch den kühlenden Puffer vor einer bei dem Transfer auftretenden Erwärmung geschützt wird, eignet sich dieses Verfahren durch die Möglichkeit längerer Transferzeiten besonders für den Transfer von Proteinen hohen Molekulargewichts.

Das Vorgehen entsprach weitgehend dem oben beschriebenen *Semi-Dry* Transfer und fand mit einer Spannung von 30 V, einer Stromstärke von 230 mA und über einen Zeitraum von 60 min statt. Die Anordnung der Schichten im *Wet-Blot* Modul zeigt *Abbildung 14*.

## Methoden

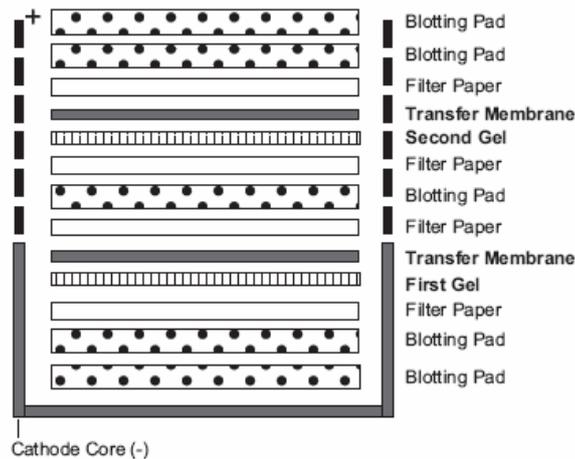


Abbildung 14: Anordnung der Schichten im *Wet XCell II Blot Module*<sup>93</sup>

### 3.6.5. Immunologische Detektion von Proteinen im Western Blot

Nach dem Transfer auf die PVDF-Membran werden die gesuchten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dabei bindet der primäre Antikörper an das gesuchte Protein und der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper an den primären Antikörper. Die Peroxidase spaltet  $H_2O_2$  und setzt Sauerstoffradikale frei, welche geeignete Substrate oxidieren. Die ECL-Nachweisreagenz nutzt diese Reaktion um Luminol unter alkalischen Bedingungen und Anwesenheit von  $H_2O_2$  zu oxidieren. Luminol wird dadurch kurzzeitig in einen angeregten Zustand versetzt und strahlt bei der Rückkehr in den energieärmsten Zustand überschüssige Energie in Form von Lichtquanten ab, die mit einem computergesteuerten digitalen Fluoreszenz- und Chemiluminiszenzdetektionssystem (*ChemImager*<sup>TM</sup> 5500) nachgewiesen werden können. Dieses System arbeitet mit einer gekühlten, hoch Schwachlicht sensitiven Megapixel-digitalkamera in einer Dunkelkammer und mit einer entsprechenden Steuerungs- und Bildbetrachtungssoftware. Die Belichtungszeit der Kamera richtet sich dabei nach der Fluoreszenzintensität.

Der Nachweis der Proteine auf der PVDF Membran erfolgte in mehreren Schritten unter permanentem Schütteln:

- 1 x 5 min Waschen der Membranen mit 1x TBST
- Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % Milch in 1x TBST oder bei Verwendung phosphospezifischer Antikörper mit 2 % BSA in 1x TBST, 60 min bei RT
- Inkubation der Blots mit den Primärantikörperlösungen (*siehe Punkt 2.3.1*), über Nacht bei 4 °C
- 3 x 10 min Waschen in 1x TBST zur Entfernung ungebundener AK

## Methoden

- Inkubation der Blots mit den Sekundärantikörperlösungen (*siehe Punkt 2.3.1*), 60 min bei RT
- 3 x 10 min Waschen in 1x TBST
- Membranen in 3 ml ECL-Nachweisreagenz schwenken, 3 min

Die Membranen wurden danach mit Frischhaltefolie umwickelt und zur Analyse und Dokumentation der Ergebnisse in das *ChemiImager™ 5500* Gerät eingelegt.

### 3.6.6. Größenstandard

Es wurden zwei Größenstandards verwendet. Der „*High Marker*“ *Full Range Rainbow™* zeigt ein farbiges Bandenmuster bei 10, 15, 25, 30, 35, 50, 75, 105, 160 und 250 kDa (*siehe Abbildung 15*). Bei der Versuchsdurchführung wurde dabei die äußerste Geltasche links mit 15 µl beladen.

2 µl des „*Low Markers*“ *MagicMark™* wurden bei der SDS-PAGE in die äußerste Geltasche rechts eingefüllt. Er zeigt Proteinbanden bei 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 kDa (*siehe Abbildung 16*).

Die Detektion dieser Banden erfolgte nach Behandlung mit der ECL-Reagenz durch Chemilumineszenz mit Hilfe des *ChemiImager™ 5500* Geräts.

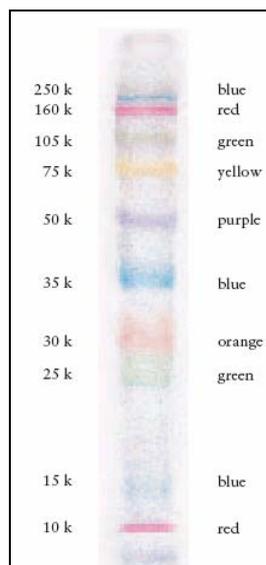


Abbildung 15: *Full Range Rainbow™* Proteinstandard<sup>94</sup>

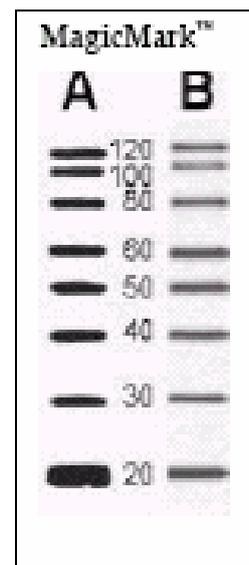


Abbildung 16: *MagicMark™* Proteinstandard<sup>93</sup>

### 3.7. Histologische Methodik

#### 3.7.1. Entwässerung und Überführung der Proben in Paraffin

Wie in *Punkt 3.5* vorbeschrieben, wurden die Herzen den Mäusen entnommen und transversale Ringe geschnitten. Diese in 20 %-igem Formalin aufbewahrten Ringe wurden nun folgendermaßen weiterverarbeitet: Um das Gewebe für die weitere Verarbeitung zu entwässern und in Paraffin zu überführen, wurden die Ringe in beschriftete weiße Kunststoffkassetten eingebracht. Nun wurden die Kassetten in einen Korb aus Metallgitter eingelegt, welcher in einen speziellen Einbettungsautomat eingehängt wurde. Der Einbettungsautomat arbeitet nach dem Karussellprinzip, d.h. er besteht aus einer runden beheizbaren Plattform, auf der sich reihum neun Gefäße mit verschiedenen Substanzen postieren, aus einer über der Plattform rotierenden und vertikal beweglichen Scheibe, an die der Korb mit den Proben gehängt wird und aus einer Zeitschaltuhr, die es ermöglicht Verweilzeiten für die einzelnen Gefäße einzustellen. Dieser Korb wird nun für eine festgelegte Zeitdauer nacheinander in jedes Gefäß eingetaucht. Das Gerät arbeitet nach folgendem Protokoll:

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

die Proben so schnell wie möglich entfernt und im nächsten Schritt in Paraffin eingebettet werden. In spezielle Metallformen wurde nun heißes Paraffin eingegossen und die entwässerten Geweberinge dort mit einer Pinzette eingeführt. Hierbei war zu beachten, dass Luftblasen vorsichtig mit der Pinzette ausgedrückt wurden. Nach einem Abkühlungszeitraum von ein bis zwei Tagen konnten die gegossenen Blöcke aus den Formen entfernt werden.

### **3.7.2. Herstellung der Paraffinschnitte**

Zum Schneiden der gegossenen Wachsböcke wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Dieses besteht aus einer dreidimensional beweglichen Plattform, auf die der zu schneidende Wachsböck eingespannt wird, aus einem auf einem beweglichen Schlitten angebrachten Messerböck und einer Stellschraube, mit deren Hilfe die erforderliche Schnittdicke eingestellt wird. Durch Hin- und Herbewegen des Schlittens ist es nun möglich den Wachsböck in dünne Scheiben zu schneiden.

Bis erstes Gewebe sichtbar wird, ist es empfehlenswert eine dickere Schichtdicke zu wählen. Ab dem Zeitpunkt, an dem ein vollständiger Ring sichtbar war, wurde die Schichtdicke auf 5 µm umgestellt. Die geschnittenen Scheiben wurden vorsichtig mit einem dünnen Pinsel aufgenommen und in ein warmes Wasserbad mit einer Temperatur von 44-49 °C gelegt. Nun wurden sie auf einen sauberen, fettfreien und beschrifteten Objektträger faltenfrei aufgezogen. Pro Träger empfiehlt es sich zwei Schnitte dicht zusammen aufzuziehen. Die Objektträger wurden daraufhin in einen Objektträgerständer eingelegt und im Trockenschrank bei 70 °C aufbewahrt.

### **3.7.3. Färben der Paraffinschnitte**

Zur Färbung der Paraffinschnitte verwendeten wir routinemäßig folgende Standardfärbungen: Pikro-Sirius-Rot (PSR) und Hämalaun-Eosin (HE). Bei der HE-Färbung werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen blau und alle azidophilen Bestandteile rot angefärbt, während bei der PSR-Färbung Muskulatur und Zytoplasma gelb und Collagen dagegen rot angefärbt werden.

Da mit Substanzen wie Roti-Histol und Ethanol gearbeitet wurde, war es absolut erforderlich die folgenden Schritte unter einem Abzug durchzuführen.

### 3.7.3.1. Entparaffinieren und Auswaschen

Zum Färben des Gewebes ist es erforderlich dieses zuerst mit Roti-Histol zu entparaffinieren und mit Ethanol auszuwaschen. Dazu wurden die Objektträgerständer mit den darin befindlichen Schnitten nach einer Trockenzeitdauer von ein bis zwei Tagen dem Trockenschrank entnommen und nacheinander für jeweils vorgegebene Zeiträume in acht verschiedene Glasgefäße eingesetzt.

Wir verwendeten dazu folgendes Schema:

1. Gefäß	Roti-Histol	5 min
2. Gefäß	Roti-Histol	5 min
3. Gefäß	Roti-Histol	5 min
4. Gefäß	Roti-Histol / Ethanol 1:1	5 min
5. Gefäß	Ethanol 100 %	5 min
6. Gefäß	Ethanol 95 %	5 min
7. Gefäß	Ethanol 50 %	5 min
8. Gefäß	ddH <sub>2</sub> O	klar spülen

### 3.7.3.2. Pikro-Sirius-Rot Färbung

Nach dem Entparaffinieren und Auswaschen konnten die Schnitte nun für 30 – 45 min in ein weiteres Gefäß mit der Färbelösung eingetaucht werden. Nach diesem Zeitraum wurden die Schnitte kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und danach zum Entfärben, Entwässern und Aufhellen in sieben weitere Gefäße für jeweils festgelegte Zeiten eingetaucht. Hierbei wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

1. Gefäß	Ethanol 50 %	2 min
2. Gefäß	Ethanol 75 %	2 min
3. Gefäß	Ethanol 95 %	2 min
4. Gefäß	Roti-Histol / Ethanol 1:1	5 min
5. Gefäß	Roti-Histol	5 min
6. Gefäß	Roti-Histol	5 min
7. Gefäß	Roti-Histol	5 min

### **3.7.3.3. Häkalaun-Eosin Färbung**

Um das Herzgewebe mit Häkalaun-Eosin zu färben, wurde es zuerst mit dem unter *Punkt 3.7.3.1* beschriebenen Protokoll entparaffiniert und ausgewaschen. Danach konnten die Schnitte in Häkalaun Reagenz getaucht und dort für ca. 15 min belassen werden. Nach dieser Zeit wurden die geschnittenen Geweberinge der Färbelösung entnommen und für 10 min unter fließendem kaltem Wasser gewässert. Nach diesem Vorgang wurden die Schnitte mit Eosin gegengefärbt. Dazu wurden sie mit dem Objektträgerständer für ca. 3 min in ein Gefäß mit darin befindlicher Eosin Lösung eingesetzt. Zum Entfärben wurden die Schnitte einmal kurz in ddH<sub>2</sub>O abgespült und danach zum Entwässern jeweils 1-2 mal in drei Gefäße, die alle 100 % Ethanol enthielten, eingetaucht. Nun war es möglich, die Schnitte in drei Roti-Histol gefüllte Gefäße für je 5 min zu inkubieren und aufzuhellen.

### **3.7.3.4. Eindecken der gefärbten Schnitte**

Als letzter Schritt wurden die Herzringe nach Entparaffinieren, Färben und Entfärben mit Entellan eingedeckt und mit herkömmlichen Deckgläschen verschlossen. Zum Trocknen wurden die Objektträger für einen Tag unter dem Abzug belassen und konnten danach unter einem Mikroskop betrachtet und mit einem speziellen Computerprogramm ausgemessen werden.

### **3.7.4. Auswertung mit dem Computerprogramm SigmaScan Pro**

Zuerst war es zum Entfernungsabgleich erforderlich ein spezielles Eich-Bild in die Software zu laden. Als nächster Schritt erfolgte die Einstellung der Messbedingungen. Wir verwendeten dabei die Einstellung „*Cumulative Distance*“, um von Punkt zu Punkt zu messen. Nun wurde der Schnitt am Mikroskop scharf gestellt und dessen Bild mit Hilfe einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera in die Software geladen. An den Schnitten konnte so die Dicke von Hinterwand und Interventrikularseptum bestimmt werden. Die so gewonnenen Daten wurden zur weiteren Verarbeitung in das Statistikprogramm *StatView*® eingegeben (*siehe Punkt 3.9*) und die Bilder auf Festplatte gespeichert.

### **3.8. Immunhistologische Methodik**

#### **3.8.1. Herstellung von Gefrierschnitten**

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konservierten Herzringe (*siehe Punkt 3.5*) dem Gefrierschrank entnommen und im Kryotom weiterverarbeitet. Dieses musste, um eine für den Schneidevorgang optimale Temperatur zu erreichen, mindestens 4-5 Stunden auf  $-25^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt werden. Die Herzringe wurden nun mit einem speziellen Gewebeklebstoff (*Tissue-Tec*) auf einen Träger im Kryotom aufgeklebt und dort ca. 30 min belassen, um auch im Gewebe die entsprechende Temperatur zu erreichen. Nach der Akklimatisierung des Gewebes wurde der Träger an der Schneidevorrichtung befestigt und das darauf befindliche Gewebe mit einem speziellen Messer in  $7\ \mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten, die dann auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen wurden. Die so gewonnenen Schnitte wurden dann entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder zur sofortigen Weiterverarbeitung 20 min luftgetrocknet und auf Raumtemperatur erwärmt.

#### **3.8.2. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebe**

Durch Immunfluoreszenzfärbung können ausgewählte Zellbestandteile direkt angefärbt werden. Die getrockneten und aufgewärmten Schnitte wurden zunächst in einen Objektträgerständer eingesetzt und zur Fixierung für 15 min in ein Gefäß mit 2 %-iger PFA Lösung eingetaucht. Nach der Fixierung wurde der Objektträgerständer entnommen und für 20 min in ein weiteres Gefäß mit 0,1 % Triton Lösung eingetaucht. Nach diesem Vorgang, welcher der Extraktion löslicher Proteine aus dem Gewebe dienen sollte, wurde der Objektträgerständer in ein letztes Gefäß mit TBS Lösung eingetaucht, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden. Die Objektträger wurden nun einzeln dem Objektträgerständer entnommen, beschriftet und in eine flache, mit saugfähigem Papier ausgelegte, Schale gelegt. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mit einem speziellen Klebestift (*PAP-Pen*) umkreist und ließen sich nun für ca. eine Stunde mit jeweils  $100\ \mu\text{l}$  10 %-igem Normalserum inkubieren. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde das Normalserum aus der Spezies eingesetzt, aus welcher der Sekundärantikörper stammte. Nach dem Blocken des Gewebes wurde jeweils  $100\ \mu\text{l}$  der Primärantikörperlösung (Verdünnung mit 1% TBSA 1:20) auf das Gewebe aufgebracht und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Um ein

## Methoden

Austrocknen des Gewebes zu verhindern, wurde das in die Schale gelegte Papier mit ddH<sub>2</sub>O befeuchtet und die Schale mit Alufolie verschlossen.

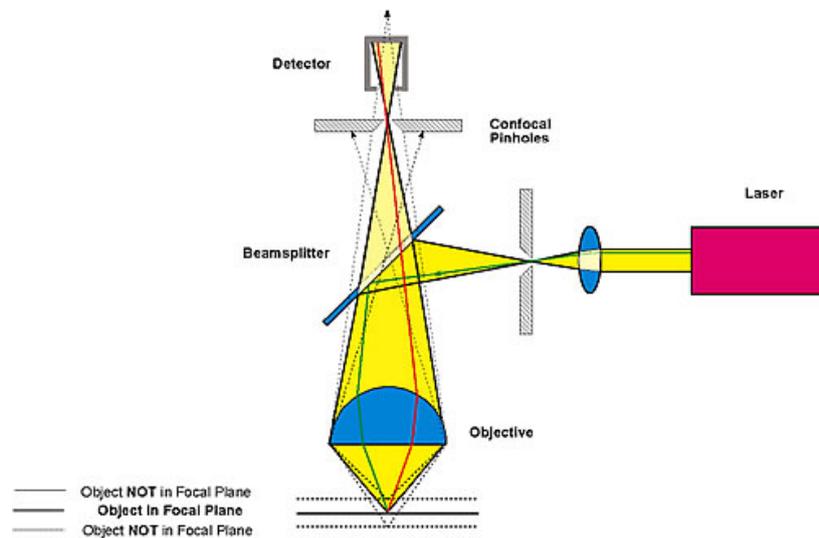
Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zuerst 3 x für 5 min mit je 100 µl 1 % TBSA-Lösung gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Um sich gebildete Antigen-Antikörper-Immunkomplexe sichtbar zu machen, wurde ein dem Primärantikörper entsprechender fluorochromkonjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Dafür wurde jeder Gewebeschnitt mit 100 µl einer Lösung versetzt, die aus diesem Anti-Antikörper und 1 % TBSA-Lösung in der Verdünnung 1:500 bestand. Die Schnitte wurden daraufhin wieder 3 x für 5 min mit je 100 µl 1 % TBSA-Lösung gewaschen. Um zu zeigen, dass es sich bei dem vorliegenden Gewebe um Myokard handelt, wurden die Schnitte als nächstes für 30 min mit je 100 µl der Aktinfärbung Phalloidin (Verdünnung mit 1 % TBSA 1:10) versetzt. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe war es notwendig, die Lösungen lichtgeschützt aufzubewahren und im abgedunkelten Raum aufzubringen. Für die Inkubationszeit wurde die Schale mit den darin befindlichen Objektträgern deshalb mit Alufolie lichtundurchlässig verschlossen. Nach diesem Vorgang wurde das Gewebe nochmals 3 x für 5 min mit je 100 µl 1 % TBSA-Lösung gewaschen. Die Schnitte konnten nun mit einem speziellen Zweikomponentenklebstoff (*Prolong Antifade*) eingedeckt und mit herkömmlichen Deckgläschen verschlossen werden. Nun ließ man den Klebstoff für einen Tag bei Raumtemperatur und Lichtschutz trocknen. Danach erfolgte mit Nagellack die Versiegelung des Deckgläschens am Rand. Sowohl dieser Vorgang, als auch der Zweikomponentenklebstoff sollten ein Austrocknen des Gewebes und ein Ausbleichen der Farbstoffe verhindern und zu einer längeren Haltbarkeit der Schnitte führen. Diese konnten nun bei 4 °C für einige Zeit in einer lichtundurchlässigen Box aufbewahrt werden.

### **3.8.3. Analyse der hergestellten Gefrierschnitte mittels confocaler Lasermikroskopie**

Zur Analyse der fertiggestellten Gefrierschnitte bedienen wir uns eines confocalen Lasermikroskops 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. Mit Hilfe von Spiegeln kann der Laser an jeden beliebigen Punkt des Gewebes gelenkt werden.

## Methoden

Streustrahlung, also Strahlung, die außerhalb der gewünschten Ebene liegt, wird durch den Einsatz von Lochblenden unterdrückt.



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines confocalen Lasermikroskops<sup>95</sup>

Mit dieser Methode kann die Lokalisation, sowie die Expressionsstärke ausgewählter Zellbestandteile aufgrund ihres Fluoreszenzverhaltens beurteilt werden. Außerdem können die Ergebnisse in Form digitaler Fotos festgehalten werden.

Um die Leuchtintensität vergleichen zu können, war 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. Um weiterhin Vergleichbarkeit zu ermöglichen, musste eine passende Einstellung der Detektorempfindlichkeit („Gain“) für jeden Antikörper gefunden und im Laufe einer Serie beibehalten werden. Dazu wurde das Gewebe mit einer geringen Auflösung und einer kurzen „Scanzeit“ an einer Teststelle durchsucht. Da es mit dem confocalen Lasermikroskop möglich ist, verschiedene Schichten des Gewebes zu „scannen“, sollte während einer Serie eine ausgewählte Schicht beibehalten werden. Es empfiehlt sich weiterhin, jeweils die Schicht mit der höchsten Signalintensität für den Aktinfarbstoff Phalloidin zu wählen, da man so in der Mitte der Herzmuskelzellen liegt. Dazu bedient man sich eines Motors, der es ermöglicht, den Mikroskoptisch genau auf die gewünschte Höhe zu verstellen. Zur Dokumentation wurde die gewünschte Gewebeschicht mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel, der ermittelten Gain-Einstellung, einer festgelegten „Scanzeit“ und einer festgelegten Lochblendengröße „gescannt“ und die Fotos auf Festplatte abgespeichert.

### **3.9. Statistische Auswertungen mit dem Computerprogramm StatView®**

Die in die Software *StatView®* eingegebenen Daten und Messwerte wurden mit der Analysemethode ANOVA und einem dazu passenden „*Post-hoc*“ Test statistisch ausgewertet. ANOVA bedeutet „*Analysis of Variance*“ und ist eine statistische Analysemethode, die es ermöglicht Haupt- und Interaktionseffekte zwischen kategorisch unabhängigen Variablen bezüglich einer abhängigen Variablen zu detektieren. Der Haupteffekt bezeichnet hier die Messvariable und der Interaktionseffekt die gemeinsamen Effekte, die zwei oder mehr Variablen auf eine abhängige Variable, also die Messvariable ausüben. Die ANOVA-Statistik arbeitet mit einem F-Test für Differenzen der Gruppenmittelwerte, d.h. er testet, ob die Mittelwerte der Gruppen durch die Werte der unabhängigen Variablen oder deren Kombinationen eine größere Differenz aufweisen, als durch Zufall zu erwarten wäre. Die Formel für den F-Test gibt deshalb drei Sachen wieder: die Größe des Unterschiedes zwischen den Gruppenmittelwerten, die Probengröße jeder Gruppe und die Gruppenvarianzen. Falls die Mittelwerte unterschiedlich genug sind, um nicht durch Zufall entstanden sein zu können, unterscheiden sie sich signifikant. Nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte dagegen bedeuten, dass die unabhängige Variable(n) keinen Effekt auf die abhängige(n) Variable(n) hat/haben. Falls der F-Test eine Abhängigkeit mit der abhängigen Variablen anzeigt, wird ein multipler Signifikanzvergleichstest („*Post-hoc*“ Test) angewendet, um zu sehen, welche Gruppen den größten Einfluss auf die Beziehung haben. Dabei wird der Wahrscheinlichkeitswert („*probability value*“, „*p-value*“), der die Wahrscheinlichkeit angibt, fälschlicherweise die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie eigentlich richtig ist (Fehler 1. Art, „ *$\alpha$ -error*“), mit dem Signifikanzlevel verglichen. Eine Nullhypothese wäre z.B. die Annahme, dass es keine Unterschiede zwischen den Werten der abhängigen Variable gibt, die durch Unterschiede in den unabhängigen Variablen erklärbar wären. Falls der p-Wert kleiner ist als das Signifikanzlevel, erhalten wir ein signifikantes Ergebnis. Das heißt: Falls die Nullhypothese mit einem Signifikanzlevel von 5 % abgelehnt wird, so gilt:  $p < 0,05$ . Als „*Post-hoc*“ Tests für die Korrektur der Irrtumswahrscheinlichkeit verwendeten wir die Bonferroni/Dunn Korrektur.

Um das Überleben statistisch auszuwerten, wurde die Methode nach Kaplan-Meier angewandt. Bei dieser Methode definieren die Ereignisse die Beobachtungsintervalle. Die Beobachtungsintervalle sind nicht fest vorgegeben. Ein neues Zeitintervall wird in unserem Fall dadurch definiert, dass eine Maus verstirbt. Es wird für jedes Zeitintervall die bedingte Wahrscheinlichkeit berechnet, dass die Maus das Zeitintervall überlebt, falls sie schon bis zum Beginn des neuen Zeitintervalls überlebt hat. Das Produkt der entsprechenden bedingten Wahrscheinlichkeiten stellt dabei die Gesamtwahrscheinlichkeit dar, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben. Mit Hilfe der Kaplan-Meier Kurve ist es möglich spezifische Überlebensraten oder Überlebenszeiten abzulesen.

Die mit *StatView*<sup>®</sup> berechneten Tabellen und Graphiken können nun aus dem Programm exportiert und in jede beliebige Bildverarbeitungs- oder Textverarbeitungssoftware importiert werden.

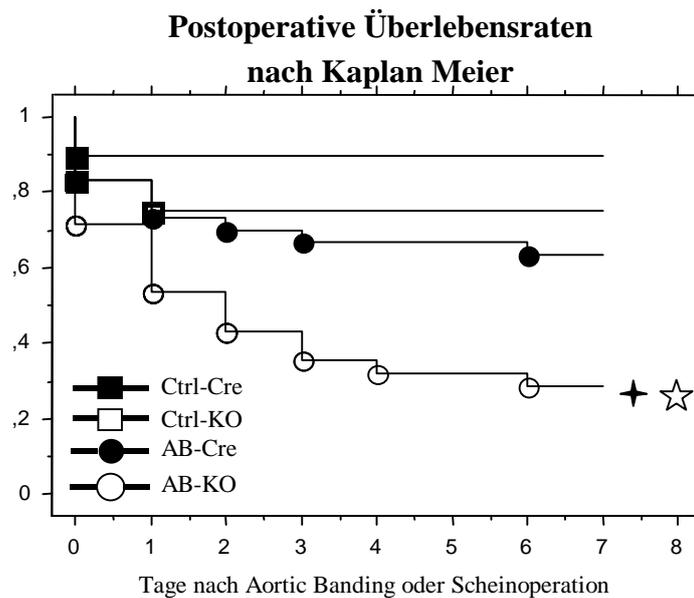
### **3.10. Bildbearbeitung mit der Software Adobe Photoshop 6.0**

Die aus den einzelnen Programmen exportierten Abbildungen wurden in die *Software Adobe Photoshop* importiert und damit bearbeitet. Mit Hilfe dieser Software konnten die Abbildungen beschriftet und zugeschnitten werden. Dabei war darauf zu achten, dass die repräsentativen Abbildungen der Histologie, der Echokardiographie und der Immunhistologie mit einer zu der jeweiligen Methodik passenden festgelegten Größe zugeschnitten wurden, um künstlichen Zoomeffekte zu vermeiden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Postoperative Überlebensraten

Die Überlebensraten wurden nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn der Wahrscheinlichkeitswert  $p < 0,05$  war. Das Signifikanzlevel wurde dadurch auf 5 % festgelegt.



Symbol	Gruppen	p-value	
★	Ctrl-KO vs. AB-KO	$p < 0,017$	S
☆	AB-Cre vs. AB-KO	$p < 0,01$	S

#### Ergebnis:

- Knock Out Tiere mit transversalem Aortic Banding zeigten eine signifikante Abnahme der Überlebensrate im Vergleich zu scheinoperierten Knock Out Tieren und im Vergleich zu Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Alle anderen Gruppen wiesen im Vergleich miteinander keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate auf.
- Zwei Tage nach Aortic Banding betrug die Überlebensrate der Knock Out Mäuse nur noch ca. 43 %, sieben Tage nach der Operation nur noch ca. 30 %.
- Die mediane Überlebenszeit der Knock Out Mäuse mit Aortic Banding betrug zwei Tage.

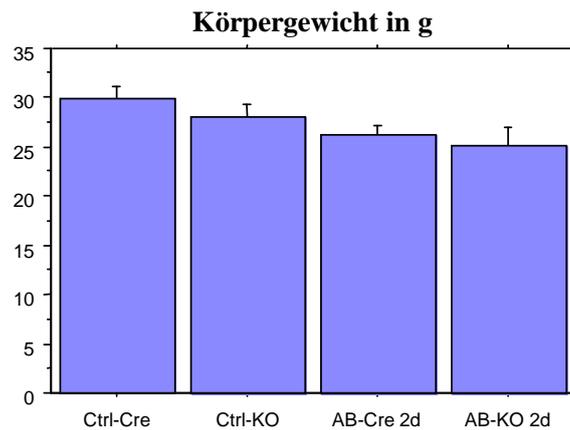
## 4.2. Morphologie

Die Werte, die durch das Wiegen von Körpergewicht, Herzgewicht und Lungengewicht, sowie durch das Ausmessen der Tibialänge ermittelt wurden, wurden mit ANOVA und Bonferroni/Dunn Korrektur für signifikante Unterschiede statistisch ausgewertet. Das Signifikanzlevel wurde mit 0,83 % festgelegt, d.h. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn der Wahrscheinlichkeitswert  $p < 0,0083$  war.

### 4.2.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 49 Mäuse untersucht.

#### 4.2.1.1. Körpergewicht

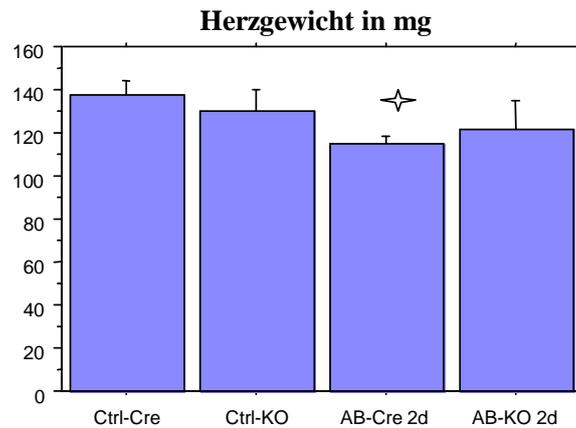


#### **Ergebnis:**

- Es fanden sich zwei Tage nach dem Eingriff keine signifikanten Differenzen bezüglich des Körpergewichts im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander.

## Ergebnisse

### 4.2.1.2. Herzgewicht

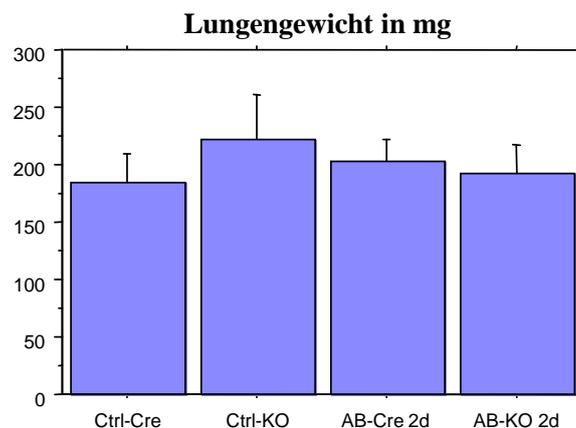


Symbol	Gruppen	Durchschnitt $\pm$ Standardfehler	p-value	
✦	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	137,385 $\pm$ 6,961 vs. 1,127 $\pm$ 0,185	p<0,0044	S

#### Ergebnis:

- Zwei Tage nach der Operation kam es zu einer signifikanten Abnahme des Herzgewichts bei Cre-Tieren mit Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren.
- Alle anderen Gruppen zeigten im Vergleich miteinander zwei Tage postoperativ keine signifikanten Veränderungen im Herzgewicht.

### 4.2.1.3. Lungengewicht

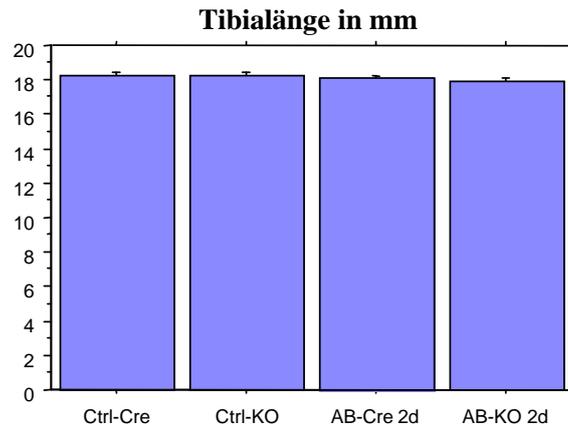


#### Ergebnis:

- Es ergaben sich zwei Tage nach dem Eingriff keine signifikanten Unterschiede im Lungengewicht im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander.

## Ergebnisse

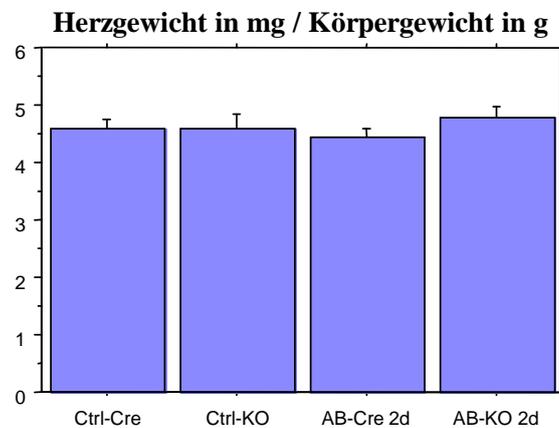
### 4.2.1.4. Tibiallänge



#### Ergebnis:

- Bezüglich der Tibiallänge entwickelten sich zwei Tage postoperativ keine signifikanten Differenzen im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander.

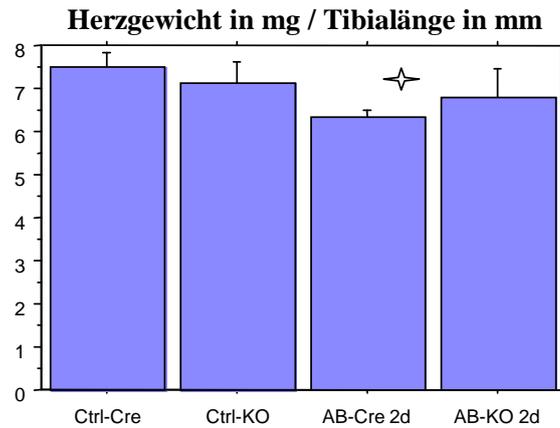
### 4.2.1.5. Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht



#### Ergebnis:

- Bei dem Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht ergaben sich zwei Tage nach Operation keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

4.2.1.6. Herzgewicht bezogen auf die Tibiallänge



Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✧	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	7,500 ± 0,325 vs. 6,345 ± 0,160	p<0,0034	S

**Ergebnis:**

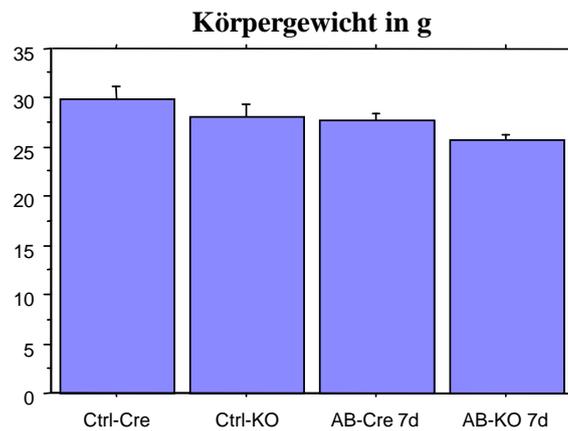
- Der Quotient aus Herzgewicht und Tibiallänge nahm bei Cre-Tieren zwei Tage nach transversalem Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren signifikant ab.
- Alle anderen Gruppen, verglichen miteinander, wiesen zwei Tage nach Operation keine signifikante Veränderung des Quotienten aus Herzgewicht und Tibiallänge auf.

## Ergebnisse

### 4.2.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 32 Mäuse untersucht.

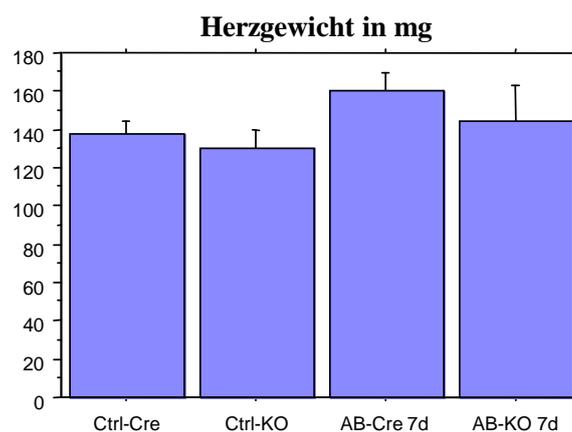
#### 4.2.2.1. Körpergewicht



#### Ergebnis:

- Es fanden sich sieben Tage nach der Operation keine signifikanten Differenzen bezüglich des Körpergewichts im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander.

#### 4.2.2.2. Herzgewicht

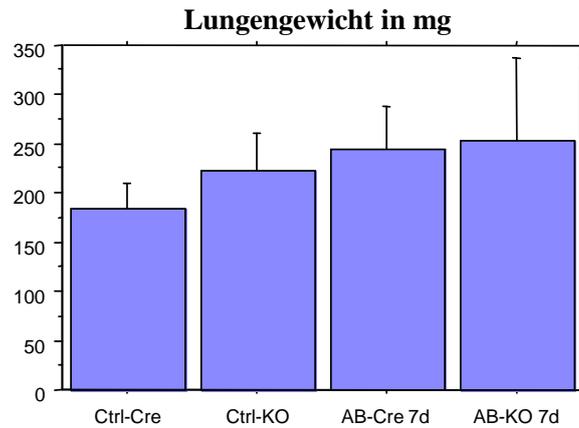


#### Ergebnis:

- Es zeigte sich im Vergleich der einzelnen Gruppen, dass sieben Tage postoperativ keine signifikante Veränderung des Herzgewichts vorlag.

## Ergebnisse

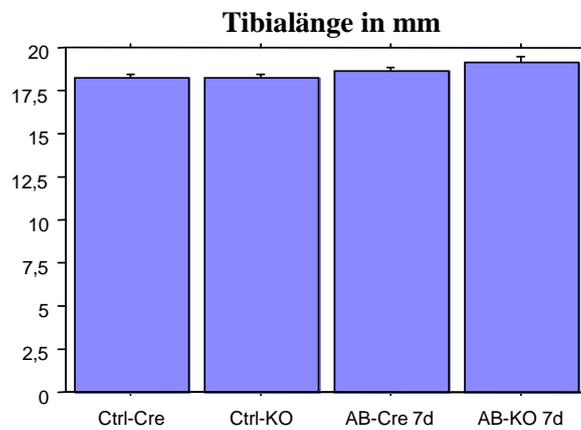
### 4.2.2.3. Lungengewicht



#### Ergebnis:

- Beim Lungengewicht war sieben Tage postoperativ im Gruppenvergleich keine signifikante Veränderung zu verzeichnen.

### 4.2.2.4. Tibiallänge

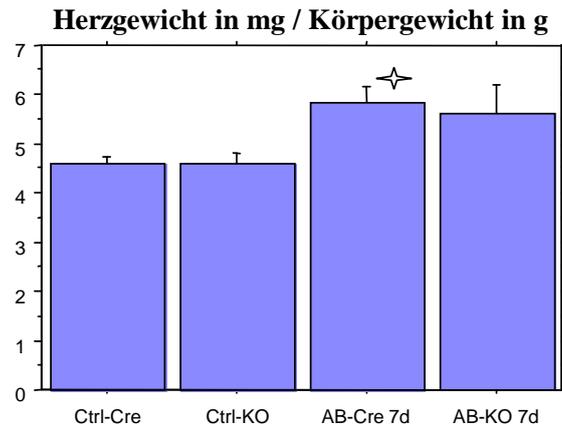


#### Ergebnis:

- Sieben Tage nach dem Eingriff blieb die Tibiallänge im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander ziemlich konstant, d.h. es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

## Ergebnisse

### 4.2.2.5. Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht

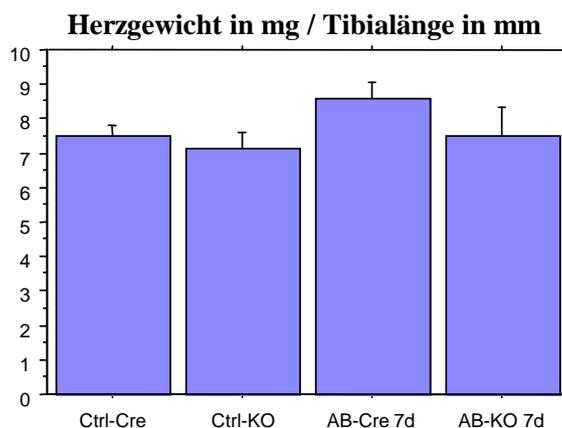


Symbol	Gruppen	Durchschnitt $\pm$ Standardfehler	p-value	
☆	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	4,599 $\pm$ 0,147 vs. 5,817 $\pm$ 0,326	p<0,0006	S

#### Ergebnis:

- Es zeigte sich nach sieben Tagen eine signifikante Zunahme des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren.
- Alle anderen Gruppen zeigten nach sieben Tagen im Vergleich miteinander keine signifikanten Veränderungen dieses Quotienten.

### 4.2.2.6. Herzgewicht bezogen auf die Tibiallänge



#### Ergebnis:

- Es waren sieben Tage nach Operation keine signifikanten Zu- oder Abnahmen des Quotienten aus Herzgewicht und Tibiallänge bei den einzelnen Gruppen zu verzeichnen.

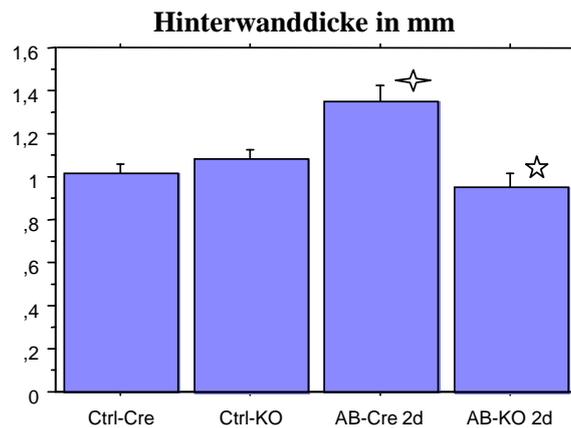
### 4.3. Histologie

Die durch das Ausmessen der Paraffinschnitte erhaltenen Werte wurden mit ANOVA und Bonferroni/Dunn Korrektur für signifikante Unterschiede statistisch ausgewertet. Dabei wurden Unterschiede als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,0083$  war. Das Signifikanzlevel betrug demnach 0,83 %.

#### 4.3.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 21 Mäuse untersucht.

##### 4.3.1.1. Hinterwand



Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
☆	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	1,019 ± 0,042 vs. 1,353 ± 0,074	p<0,0004	S
☆	AB-Cre 2d vs. AB-KO 2d	1,353 ± 0,074 vs. 0,950 ± 0,064	p<0,0009	S

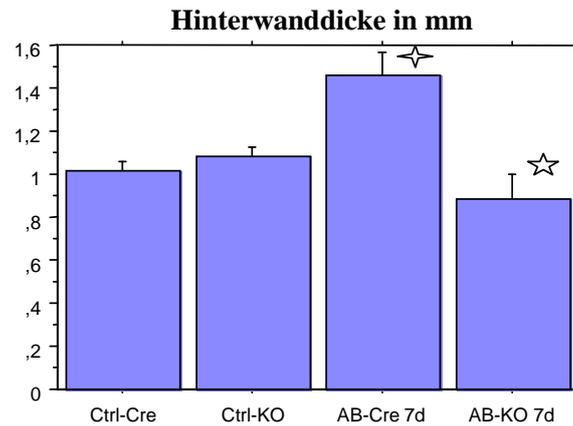
#### **Ergebnis:**

- Es fand sich eine signifikante Zunahme der Hinterwanddicke nach zwei Tagen bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Nach zwei Tagen zeigten Knock Out Tiere mit Aortic Banding eine signifikant geringere Stärke der Hinterwand als Cre-Tiere mit Aortic Banding
- Die anderen Gruppen wiesen in diesem Zeitraum im Vergleich miteinander keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Hinterwandstärke auf.

### 4.3.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 20 Mäuse untersucht.

#### 4.3.2.1. Hinterwand

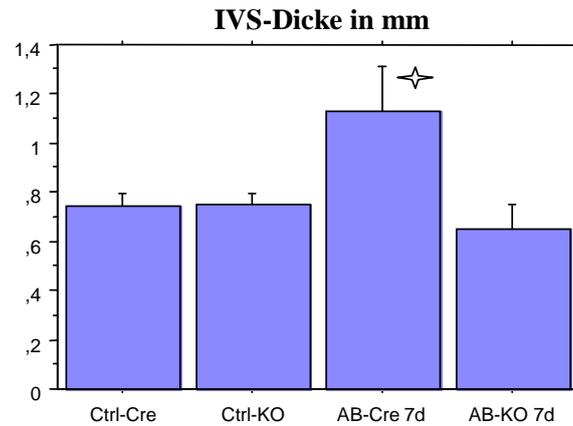


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
☆	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	1,019 ± 0,042 vs. 1,455 ± 0,108	p<0,0002	S
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	1,455 ± 0,108 vs. 0,880 ± 0,120	p<0,0005	S

#### Ergebnis:

- Nach sieben Tagen fand sich eine signifikante Zunahme der Hinterwanddicke bei Cre-Tieren mit Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren.
- Es zeigte sich, dass nach diesem postoperativen Zeitraum Knock Out Tiere mit Aortic Banding eine signifikant dünnere Hinterwand aufwiesen, als Cre-Tiere mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der restlichen Gruppen untereinander ergaben sich zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Differenzen im Bezug auf die Dicke der Hinterwand.

**4.3.2.2. Interventrikularseptum**

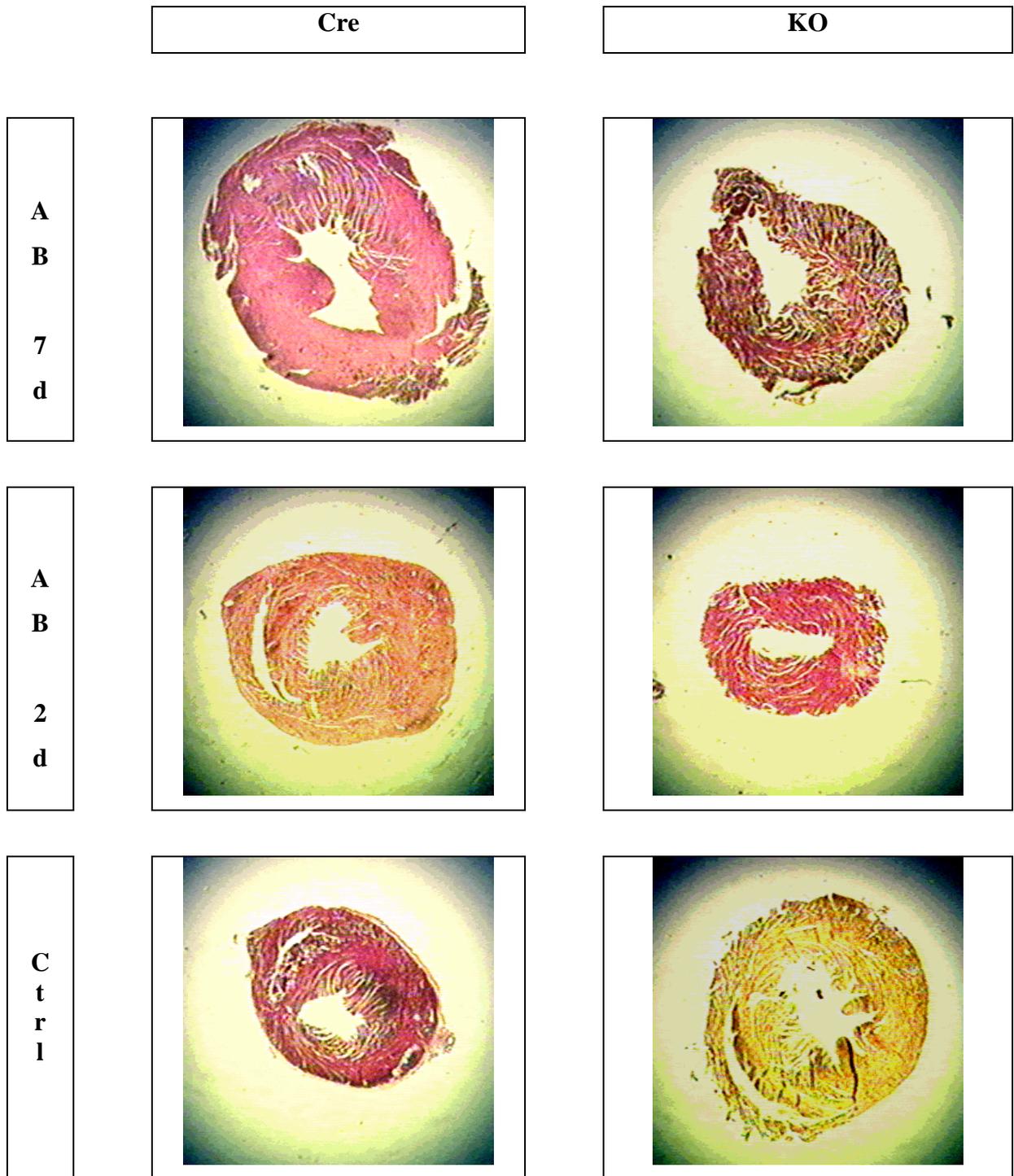


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✧	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	0,741 ± 0,052 vs. 1,127 ± 0,185	p<0,0073	S

**Ergebnis:**

- Es ergab sich nach sieben Tagen eine signifikante Zunahme der Stärke des Interventrikularseptums bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Sieben Tage postoperativ waren keine signifikanten Differenzen bezüglich der Interventrikularseptumdicke im Vergleich der anderen Gruppen untereinander zu erkennen.

4.3.3. Repräsentative Abbildungen



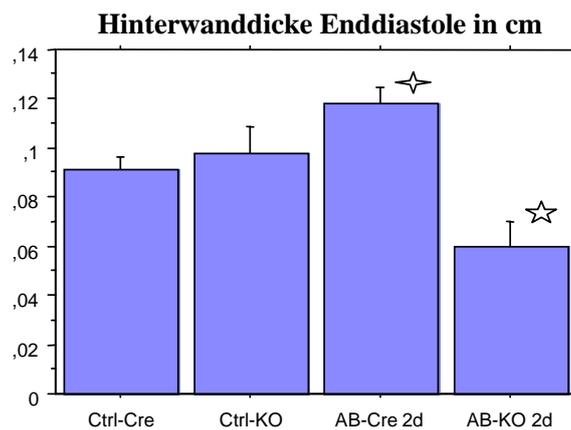
#### 4.4. Echokardiographie

Mit ANOVA und Bonferroni/Dunn Korrektur für signifikante Unterschiede wurden die durch das echokardiographische Ausmessen der Herzen erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. Dabei wurde simultan zur Histologie und Morphologie ein Signifikanzlevel von 0,83 % gesetzt, d. h. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,0083$  betrug.

##### 4.4.1. Untersuchungszeitpunkt zwei Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 22 Mäuse untersucht.

##### 4.4.1.1. Hinterwand in der Enddiastole

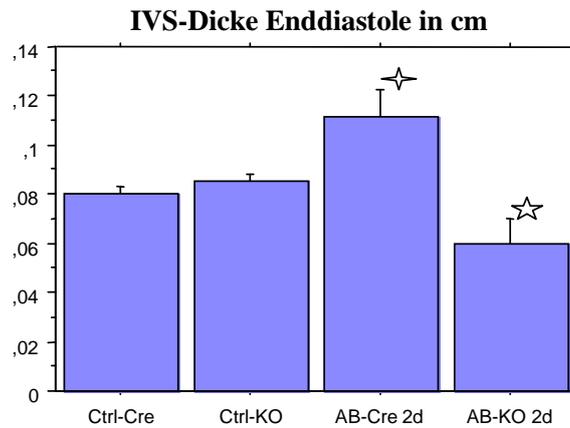


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
☆	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	0,091 ± 0,005 vs. 0,118 ± 0,007	p<0,0073	S
☆	AB-Cre 2d vs. AB-KO 2d	0,118 ± 0,007 vs. 0,060 ± 0,010	p<0,0001	S

#### **Ergebnis:**

- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren fand sich eine signifikante Zunahme der enddiastolischen Hinterwanddicke nach zwei Tagen bei Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Zwei Tage postoperativ wiesen Knock Out Tiere mit Aortic Banding eine signifikant dünnere enddiastolische Hinterwand auf, als Cre-Tiere mit Aortic Banding.
- Alle anderen Gruppen zeigten im Vergleich miteinander zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Veränderungen der enddiastolischen Hinterwanddicke.
- Es wurde das histologisch ermittelte Ergebnis echokardiographisch bestätigt.

**4.4.1.2. Interventrikularseptum in der Enddiastole**

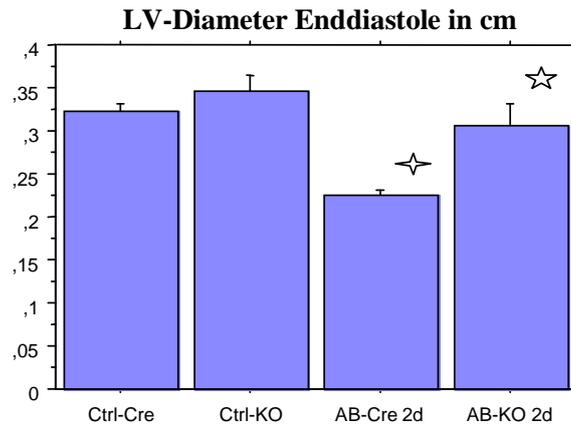


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
☆	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	0,080 ± 0,003 vs. 0,112 ± 0,011	p<0,0020	S
☆	AB-Cre 2d vs. AB-KO 2d	0,112 ± 0,011 vs. 0,060 ± 0,010	p<0,0004	S

**Ergebnis:**

- Es zeigte sich, dass nach zwei Tagen die Stärke des Interventrikularseptums in der Enddiastole bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren signifikant zunahm.
- Knock Out Tiere mit Aortic Banding zeigten zwei Tage postoperativ ein signifikant dünneres Interventrikularseptum in der Enddiastole, als Cre-Tiere mit Aortic Banding nach diesem Zeitraum.
- Im Vergleich miteinander waren zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Veränderungen der enddiastolischen Interventrikularseptumdicke bei den anderen Gruppen zu finden.

4.4.1.3. Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole

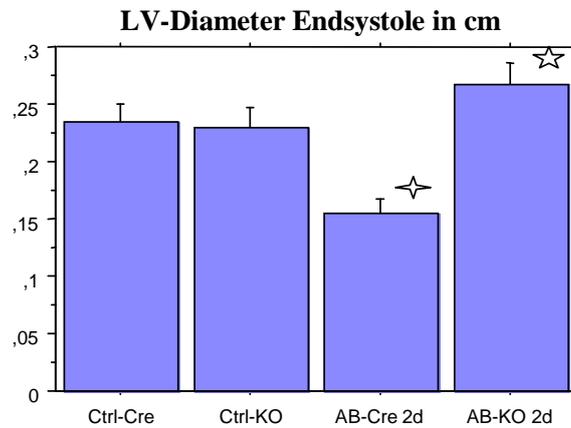


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✧	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	0,323 ± 0,008 vs. 0,225 ± 0,006	p<0,0001	S
☆	AB-Cre 2d vs. AB-KO 2d	0,225 ± 0,006 vs. 0,307 ± 0,024	p<0,0004	S

**Ergebnis:**

- Es ergab sich zwei Tage nach dem Eingriff eine signifikante Abnahme des enddiastolischen linksventrikulären Durchmessers bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Knock Out Tiere mit Aortic Banding wiesen nach zwei Tagen einen signifikant größeren Durchmesser der linken Kammer in der Enddiastole auf, als Cre-Tiere mit Aortic Banding.
- In diesem Zeitraum waren keine signifikanten Differenzen bezüglich des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers im Vergleich der anderen Gruppen untereinander zu erkennen.

**4.4.1.4. Durchmesser des linken Ventrikels in der Endsystole**

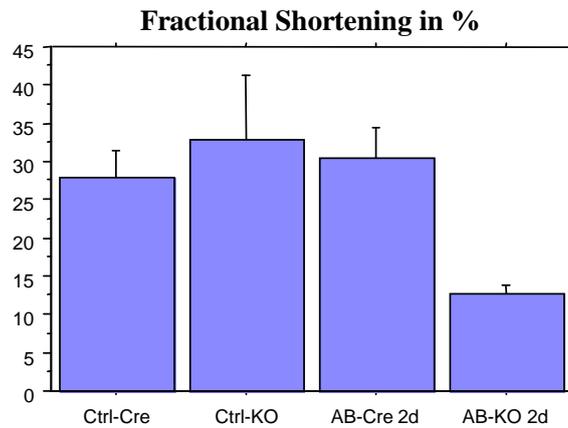


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✧	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 2d	0,234 ± 0,015 vs. 0,155 ± 0,012	p<0,0010	S
☆	AB-Cre 2d vs. AB-KO 2d	0,155 ± 0,012 vs. 0,267 ± 0,019	p<0,0007	S

**Ergebnis:**

- Der endsystolische Durchmesser des linken Ventrikels nahm bei Cre-Tieren zwei Tage nach Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren signifikant ab.
- Knock Out Tiere mit Aortic Banding wiesen zwei Tage nach Operation einen signifikant größeren endsystolischen linksventrikulären Durchmesser auf, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Bei den restlichen Gruppen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt im Vergleich miteinander keine signifikanten Veränderungen im Bezug auf den Durchmesser der linken Kammer in der Endsystole.

#### 4.4.1.5. Fractional Shortening



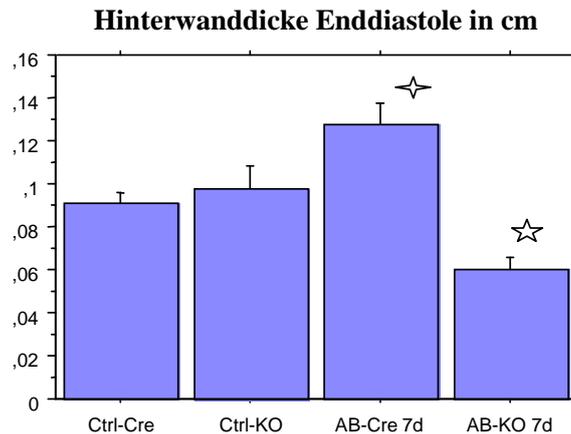
#### **Ergebnis:**

- Es waren zwei Tage nach Operation keine signifikanten Veränderungen des Fractional Shortenings bei den einzelnen Gruppen zu verzeichnen.

#### 4.4.2. Untersuchungszeitpunkt sieben Tage postoperativ

Es wurden insgesamt 23 Mäuse untersucht.

##### 4.4.2.1. Hinterwand in der Enddiastole

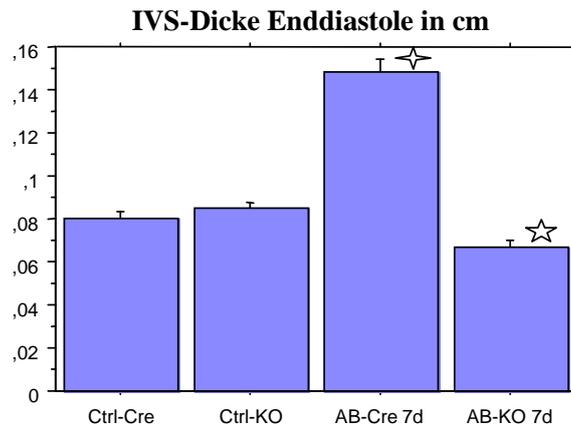


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✦	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	0,091 ± 0,005 vs. 0,127 ± 0,010	p<0,0024	S
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	0,127 ± 0,010 vs. 0,060 ± 0,006	p<0,0001	S

#### Ergebnis:

- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren fand sich eine signifikante Zunahme der enddiastolischen Hinterwanddicke nach sieben Tagen bei Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Sieben Tage nach der Operation wiesen Knock Out Tiere mit Aortic Banding eine signifikant dünnere Hinterwand in der Enddiastole auf, als Cre-Tiere mit Aortic Banding.
- Alle anderen Gruppen zeigten im Vergleich miteinander bezüglich dieses Parameters keine signifikanten Veränderungen.
- Das histologisch ermittelte Ergebnis wurde echokardiographisch bestätigt.

4.4.2.2. Interventrikularseptum in der Enddiastole

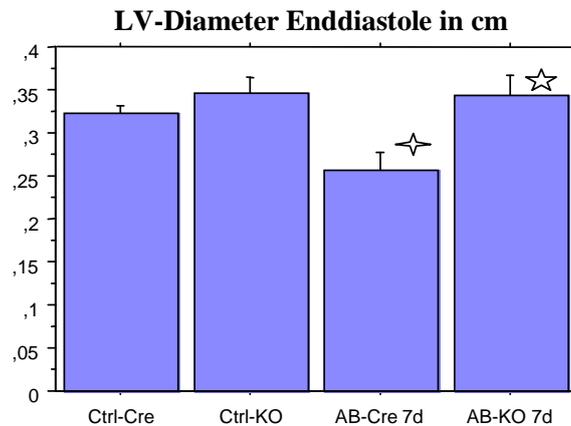


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✦	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	0,080 ± 0,003 vs. 0,149 ± 0,006	p<0,0001	S
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	0,149 ± 0,006 vs. 0,067 ± 0,003	p<0,0001	S

**Ergebnis:**

- Es zeigte sich, dass sieben Tage nach Operation die Stärke des Interventrikularseptums in der Enddiastole bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren signifikant zunahm.
- Es ergab sich sieben Tage nach Aortic Banding enddiastolisch ein signifikant dünneres Interventrikularseptum bei den Knock Out Tieren, verglichen mit den Cre-Tieren.
- Im Vergleich der restlichen Gruppen untereinander ergaben sich zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Differenzen bezüglich der Dicke des Interventrikularseptums in der Enddiastole.
- Das histologisch ermittelte Ergebnis wurde echokardiographisch teilweise bestätigt.

4.4.2.3. Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole

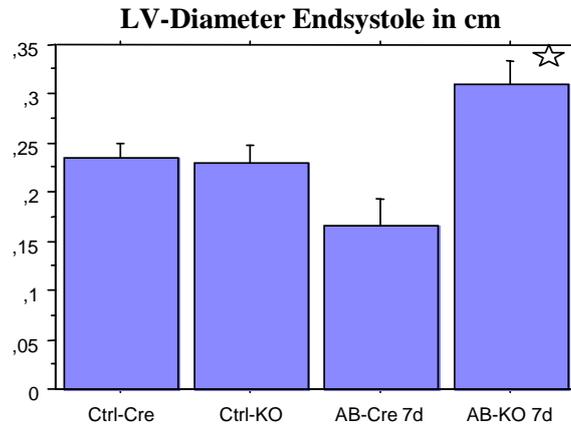


Symbol	Gruppen	Durchschnitt ± Standardfehler	p-value	
✦	Ctrl-Cre vs. AB-Cre 7d	0,323 ± 0,008 vs. 0,256 ± 0,022	p<0,0050	S
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	0,256 ± 0,022 vs. 0,343 ± 0,024	p<0,0073	S

**Ergebnis:**

- Es fand sich sieben Tage postoperativ eine signifikante Abnahme des enddiastolischen linksventrikulären Durchmessers bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Zu diesem Zeitpunkt zeigten Knock Out Tiere mit Aortic Banding einen signifikant größeren Durchmesser der linken Kammer in der Enddiastole als Cre-Tiere mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der anderen Gruppen untereinander waren zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Differenzen im Bezug auf den Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole zu erkennen.

**4.4.2.4. Durchmesser des linken Ventrikels in der Endsystole**

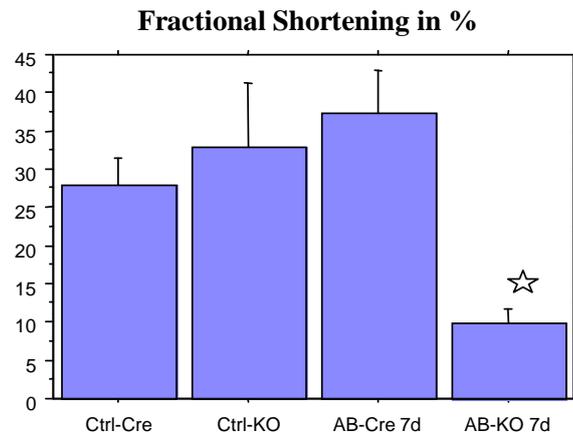


Symbol	Gruppen	Durchschnitt $\pm$ Standardfehler	p-value	
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	0,166 $\pm$ 0,027 vs. 0,310 $\pm$ 0,023	p<0,0011	S

**Ergebnis:**

- Im Vergleich zu Cre-Tieren wiesen Knock Out Tiere sieben Tage nach Aortic Banding einen signifikant größeren linksventrikulären Diameter in der Endsystole auf.
- Bei den restlichen Gruppen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt im Vergleich miteinander keine signifikanten Veränderungen im Bezug auf den Durchmesser der linken Kammer in der Endsystole.

**4.4.2.5. Fractional Shortening**

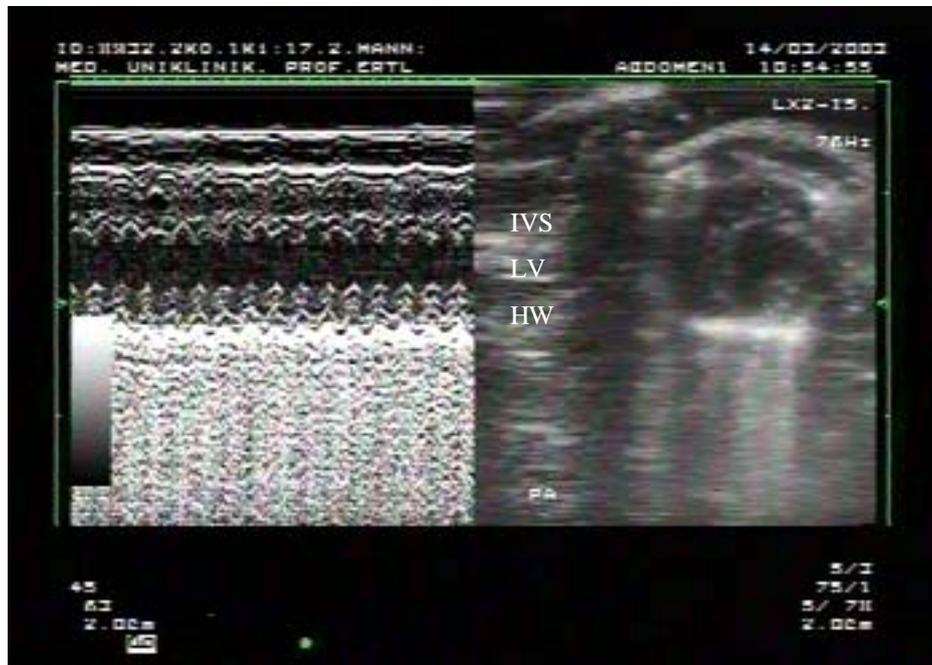


Symbol	Gruppen	Durchschnitt $\pm$ Standardfehler	p-value	
☆	AB-Cre 7d vs. AB-KO 7d	37,157 $\pm$ 5,760 vs. 9,767 $\pm$ 1,981	p<0,0042	S

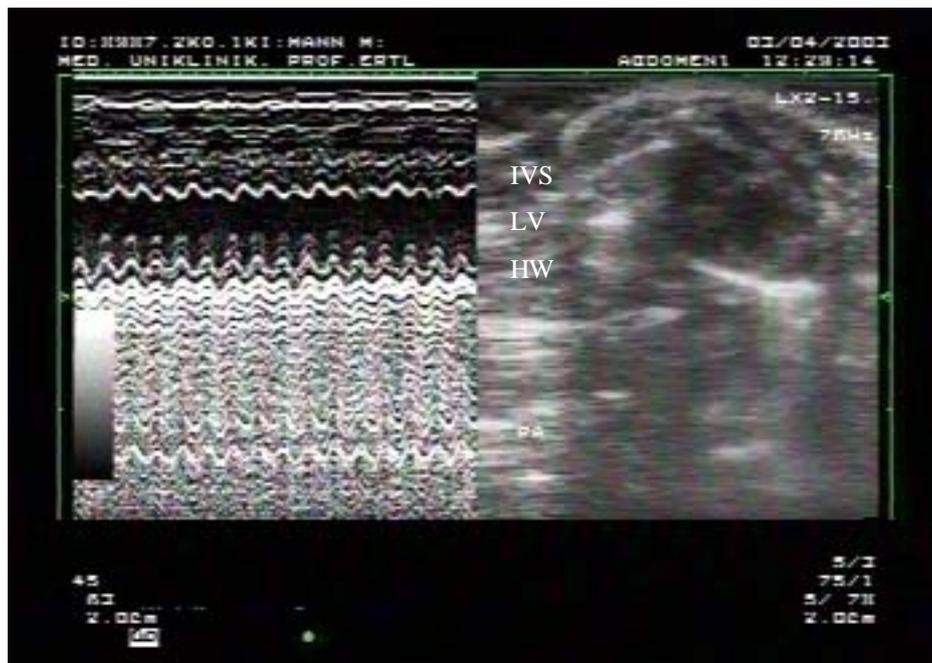
**Ergebnis:**

- Sieben Tage nach der Operation nahm bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding das Fractional Shortening signifikant ab, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Alle anderen Gruppen boten in diesem Zeitrahmen im Vergleich miteinander keine signifikanten Änderungen des Fractional Shortenings.

4.4.3. Repräsentative Abbildungen

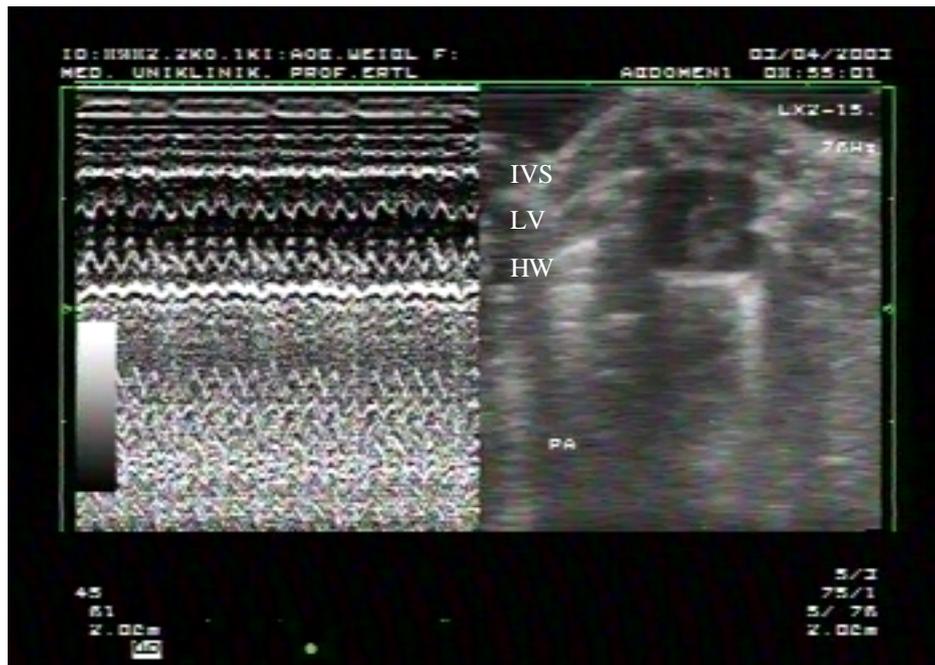


Ctrl-Cre



Ctrl-KO

# Ergebnisse

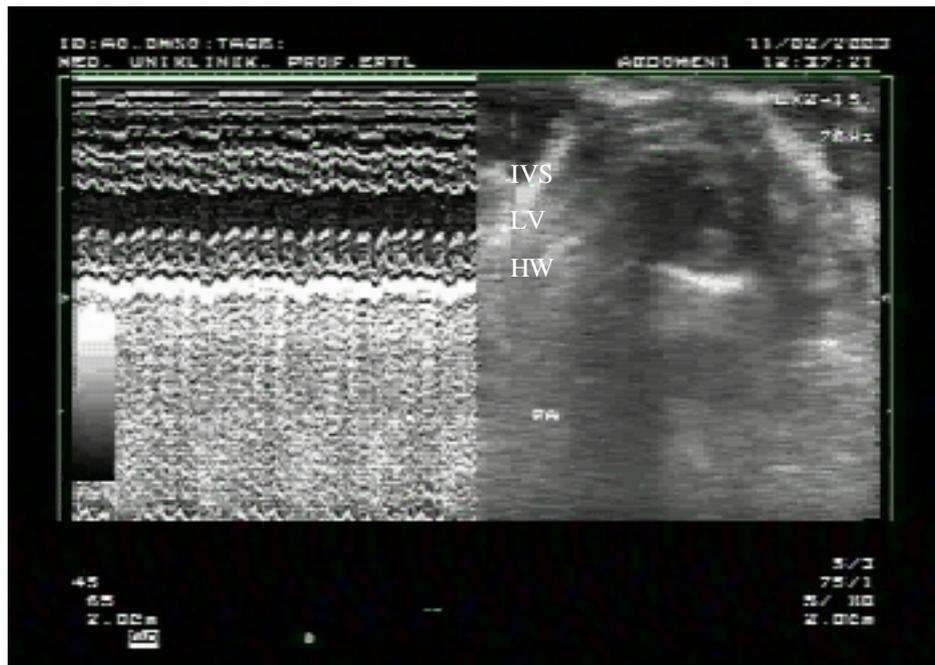


AB-Cre 2d

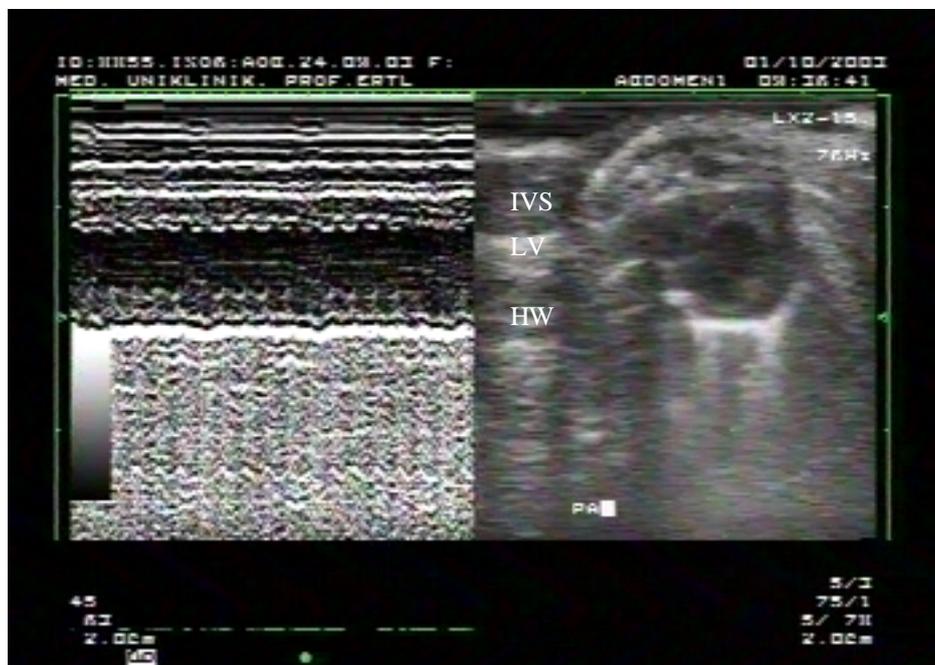


AB-KO 2d

## Ergebnisse



AB-Cre 7d



AB-KO 7d

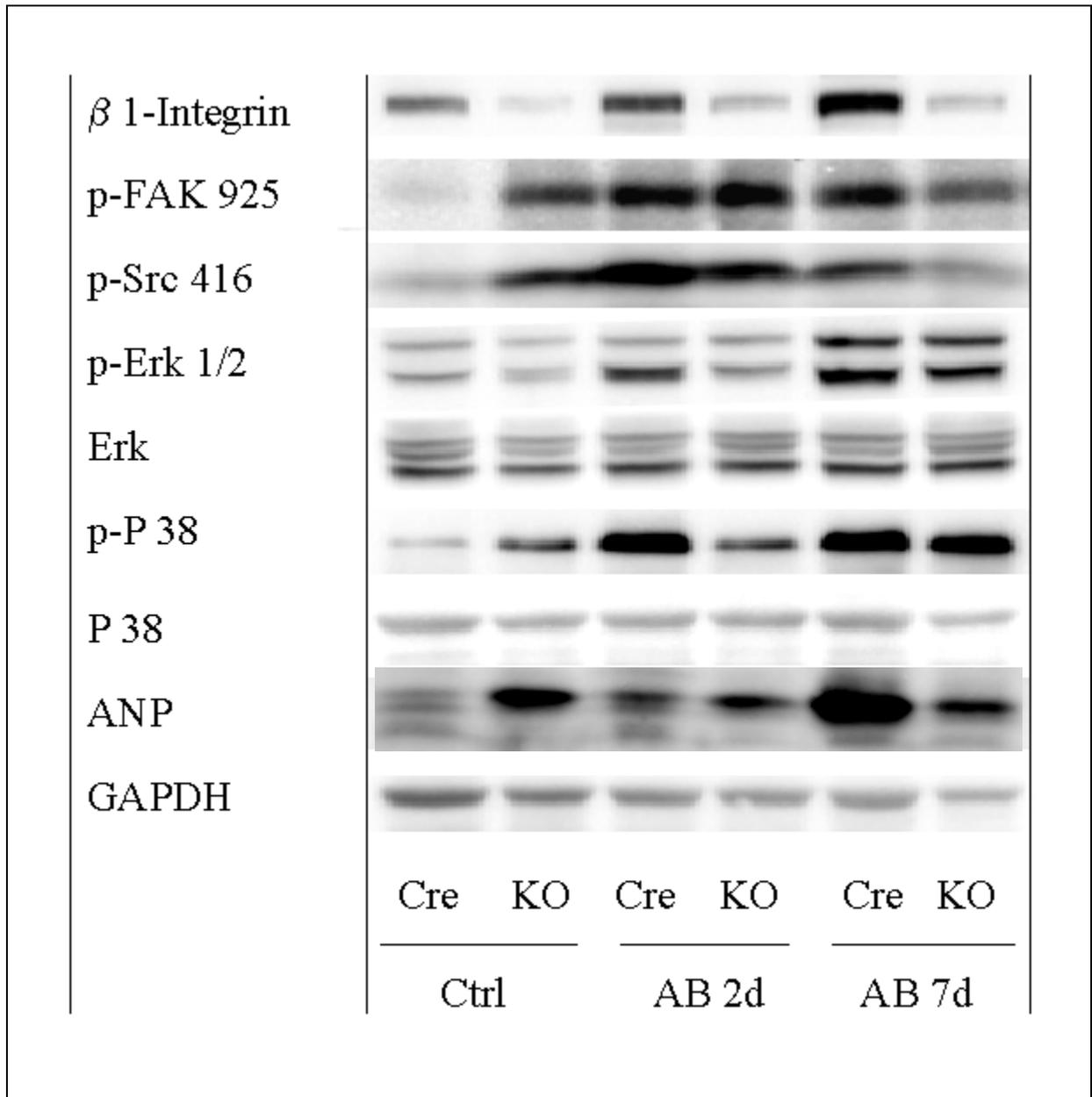
### Anmerkung:

Alle Bilder wurden in der Papillarmuskelebene und im M-Mode aufgenommen.

#### 4.5. Proteinanalyse

**Anmerkungen:**

- Aus jeder Gruppe werden die Testergebnisse eines repräsentativen Tieres gezeigt.
- GAPDH diene als Kontrolle für die Proteinladungsmenge.



#### **4.5.1. β1-Integrin**

##### **Ergebnis:**

- Es fand sich zwei und sieben Tage nach Aortic Banding eine stark angestiegene Expression des β1-Integrins bei den Cre-Tieren, verglichen mit den scheinoperierten Cre-Tieren.
- Zu den einzelnen Zeitpunkten ergaben sich keine Unterschiede in der Expression des β1-Integrins zwischen den einzelnen Knock Out Tieren.
- Der konditionale β1-Integrin Knock Out führte zur Reduktion der β1-Integrinexpression sowohl bei scheinoperierten Tieren, als auch bei Tieren mit Aortic Banding zu den verschiedenen Zeitpunkten, verglichen mit den jeweiligen Cre-Tieren.
- Der konditionale β1-Integrin Knock Out war erfolgreich.

#### **4.5.2. Aktivierte fokale Adhäsionskinase (p-FAK)**

##### **Ergebnis:**

- Zwei und sieben Tage postoperativ stieg die Aktivität von FAK bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren stark an.
- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren war die Aktivität von FAK bei scheinoperierten Knock Out Tieren erhöht.
- Der konditionale β1-Integrin Knock Out führte weder zwei noch sieben Tage nach Aortic Banding zu einer Reduktion der FAK Aktivität, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der einzelnen Knock Out Gruppen untereinander ergaben sich keine Unterschiede in der FAK Expression.

#### **4.5.3. Aktivierte Src-Kinase (p-Src)**

##### **Ergebnis:**

- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren stieg zwei und sieben Tage postoperativ die Aktivität der Src-Kinase bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding stark an.
- Scheinoperierte Knock Out Tiere wiesen eine Aktivitätszunahme der Src-Kinase im Vergleich mit scheinoperierten Cre-Tieren auf.

## Ergebnisse

- Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out führte sieben, aber nicht zwei Tage nach Aortic Banding zu einer Reduktion der Src-Kinase Aktivität im Vergleich mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der einzelnen Knock Out Gruppen untereinander, ergab sich eine Reduktion der Src-Kinase Aktivität sieben Tage nach Aortic Banding.

### **4.5.4. Aktivierte extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (p-Erk 1/2)**

#### **Ergebnis:**

- Es kam zwei Tage postoperativ zu einem leichten und sieben Tage postoperativ zu einem starken Anstieg der Aktivität an Erk 1/2 bei Cre-Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Scheinoperierte Knock Out Tiere wiesen keine Aktivitätszunahme an Erk 1/2 im Vergleich mit scheinoperierten Cre-Tieren auf.
- Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out führte zwei, aber nicht sieben Tage nach Aortic Banding zu einer Reduktion der Erk 1/2 Aktivität im Vergleich mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Sieben Tage nach Aortic Banding kommt es im Vergleich der einzelnen Knock Out Gruppen untereinander zu einer Zunahme der Erk 1/2 Aktivität.

### **4.5.5. Extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (Erk 1/2)**

#### **Ergebnis:**

- Es ergab sich im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander keine Veränderung bezüglich der Erk Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten.

### **4.5.6. Aktivierte mitogen aktivierte Proteinkinase P 38 (p-P 38 MAP Kinase)**

#### **Ergebnis:**

- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren stieg die Expression an aktivierter P 38 MAP Kinase bei Cre-Tieren mit Aortic Banding zwei und sieben Tage nach dem Eingriff stark an.
- Im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren war die P 38 MAP Kinase Aktivität bei scheinoperierten Knock Out Tieren leicht erhöht.

## Ergebnisse

- Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out führte zwei, aber nicht sieben Tage nach Aortic Banding zu einer Reduktion der P 38 MAP Kinase Aktivität im Vergleich zu Cre-Tieren mit Aortic Banding. Dennoch war bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding nach zwei Tagen eine geringe Aktivität der P 38 MAP Kinase vorhanden.
- Sieben Tage nach Aortic Banding kommt es im Vergleich der einzelnen Knock Out Gruppen untereinander zu einer Zunahme der P 38 MAP Kinase Aktivität.

### **4.5.7. Mitogen aktivierte Proteinkinase P 38 (P 38 MAP Kinase)**

#### **Ergebnis:**

- Die P38 MAP Kinase Expression unterschied sich im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zu den jeweiligen Zeitpunkten nicht.

### **4.5.8. Atriales natriuretisches Peptid (ANP)**

#### **Ergebnis:**

- Bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding stieg im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren die Expression an ANP sowohl zwei, als auch insbesondere sieben Tage postoperativ an.
- Auch bei den scheinoperierten Knock Out Tieren und bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding kam es nach zwei und sieben Tagen zu einer Zunahme der ANP Expression.

### **4.5.9. GAPDH**

#### **Ergebnis:**

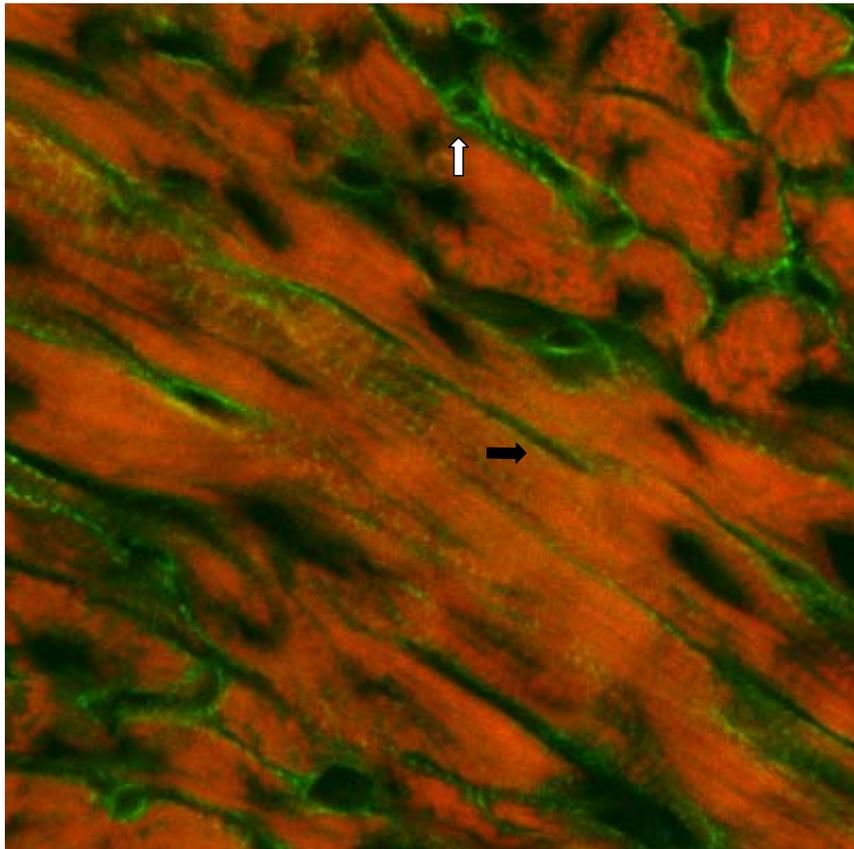
- Im Vergleich der Gruppen und der Zeitpunkte untereinander waren keine Unterschiede bezüglich der GAPDH vorhanden.
- Es wurde in alle Geltaschen die gleiche Proteinmenge geladen.

## 4.6. Immunhistologie

### Anmerkung:

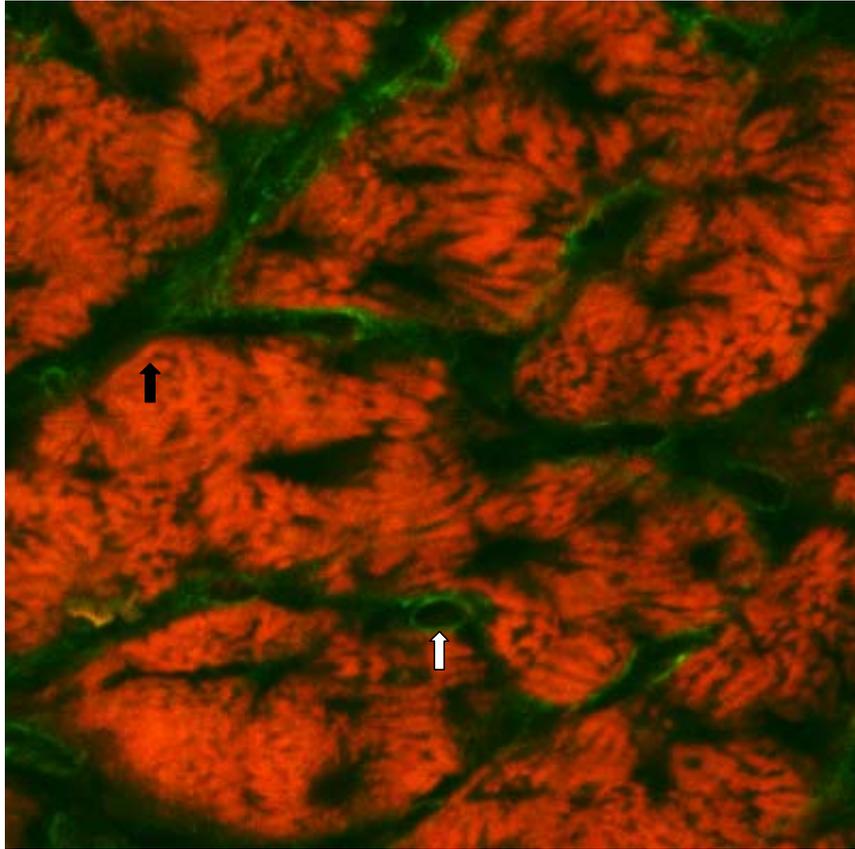
Das Aktin der Herzmuskelzellen stellt sich rot, das gesuchte Protein grün-gelb dar. Es werden jeweils die Abbildungen eines repräsentativen Tieres gezeigt.

### 4.6.1. $\beta$ 1-Integrin

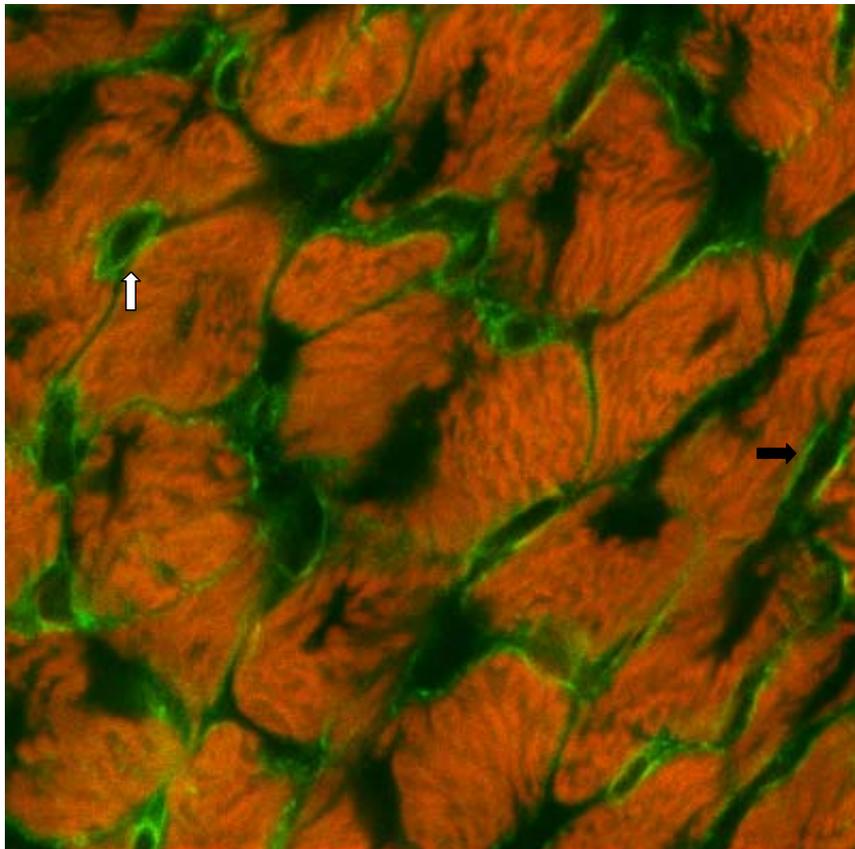


Ctrl-Cre

Ergebnisse

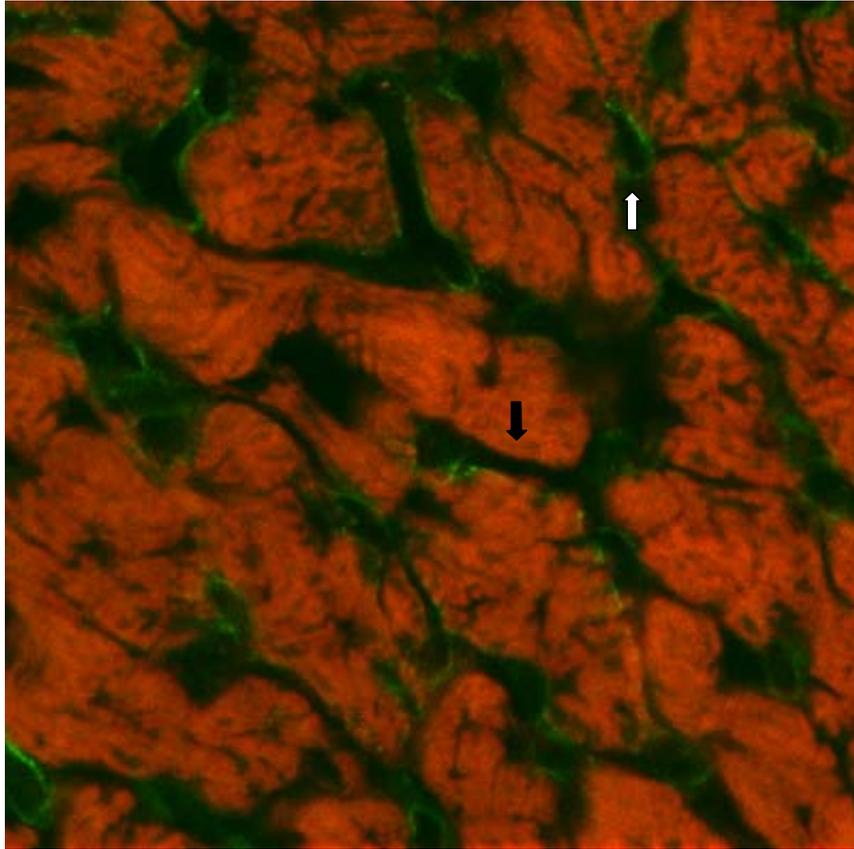


**Ctrl-KO**

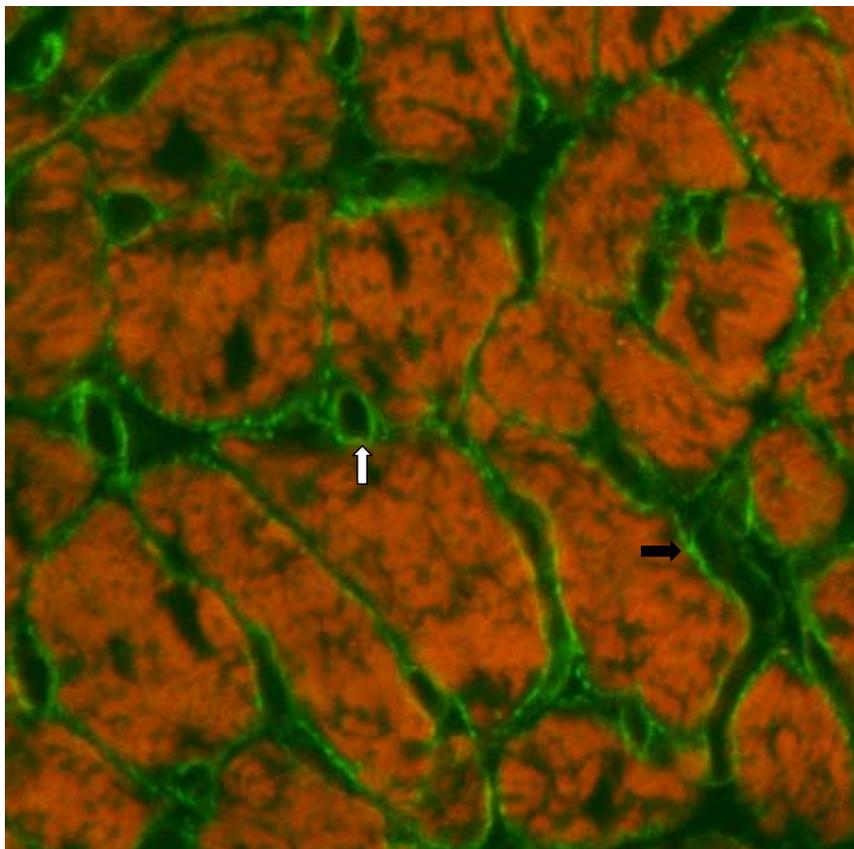


**AB-Cre 2d**

Ergebnisse



**AB-KO 2d**



**AB-Cre 7d**

## Ergebnisse

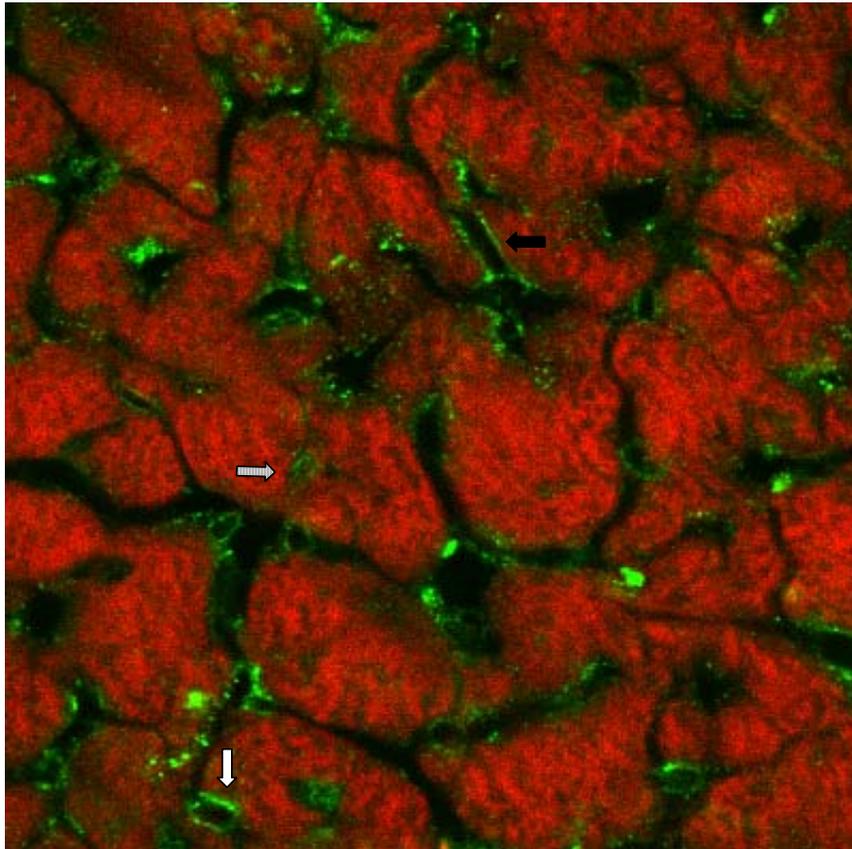
### **Lokalisation:**

Das  $\beta$ 1-Integrin war sowohl in Gefäßwänden (helle Pfeile), als auch in der Zytoplasmamembran der Kardiomyozyten (dunkle Pfeile) nachweisbar.

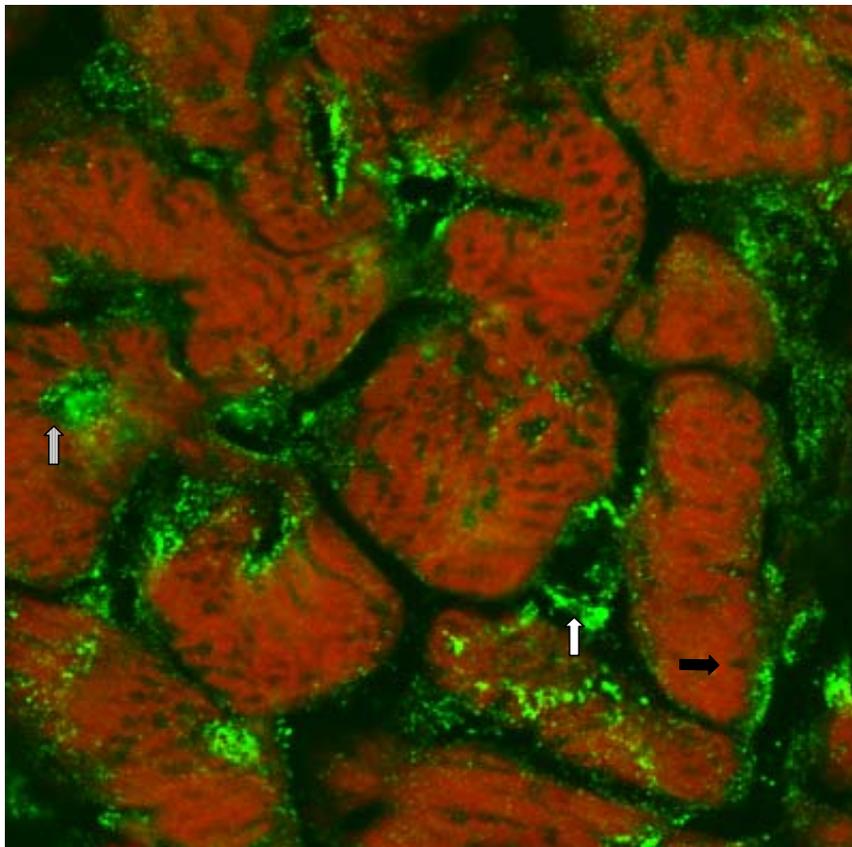
### **Ergebnis:**

- Es ergab sich bei Cre-Tieren zwei und sieben Tage nach Aortic Banding eine stark angestiegene Zunahme der Fluoreszenzintensität sowohl in den Gefäßwänden, als auch in den Zellmembranen, im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Es fanden sich zu den einzelnen Zeitpunkten keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität in den Zellwänden bei den Knock Out Tieren. Die Fluoreszenz in den Gefäßwänden und in der Extrazellulärmatrix war dennoch deutlich intensiver, als in den Zellmembranen.
- Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out führte bei scheinoperierten Tieren und bei Tieren mit Aortic Banding nach einem postoperativen Zeitraum von zwei Tagen zu einer starken Reduktion der Fluoreszenzintensität in den kardiomyozytären Zytoplasmamembranen.
- Der herzmuskelspezifische konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out war erfolgreich.
- Das Ergebnis des Western Blot wurde bestätigt.

4.6.2. Aktivierte fokale Adhäsionskinase (p-FAK)

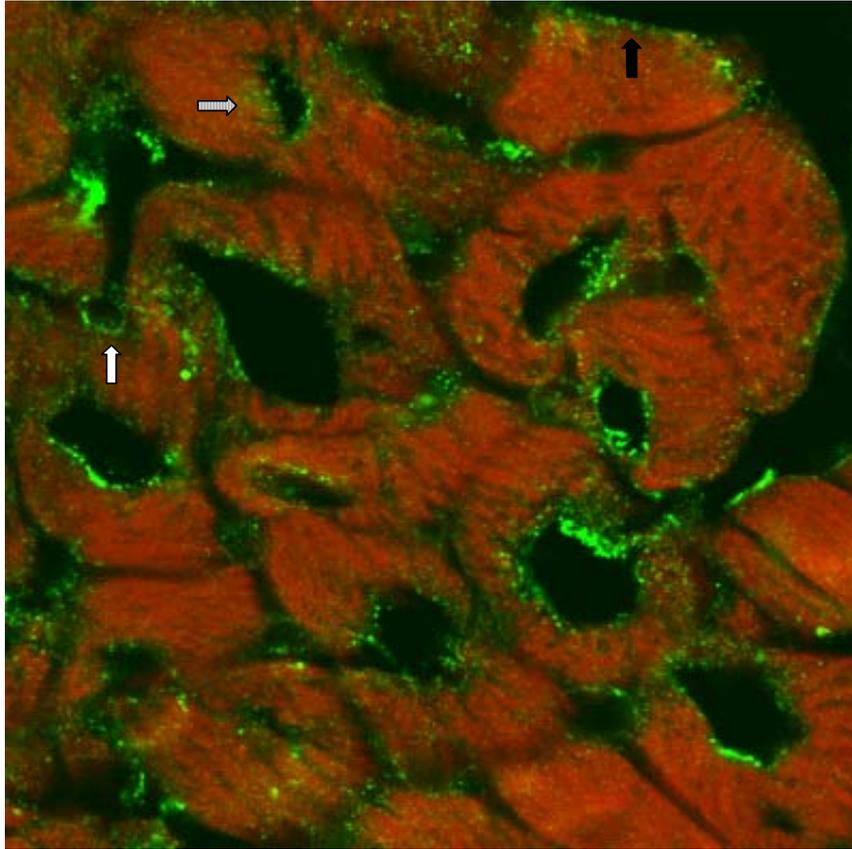


Ctrl-Cre

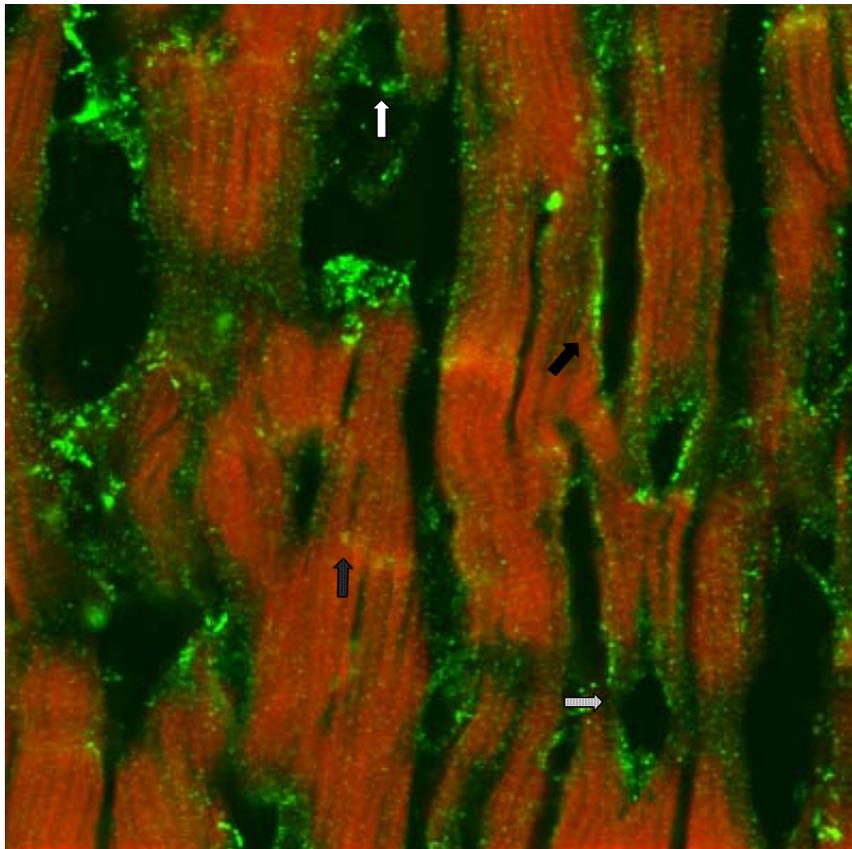


Ctrl-KO

Ergebnisse

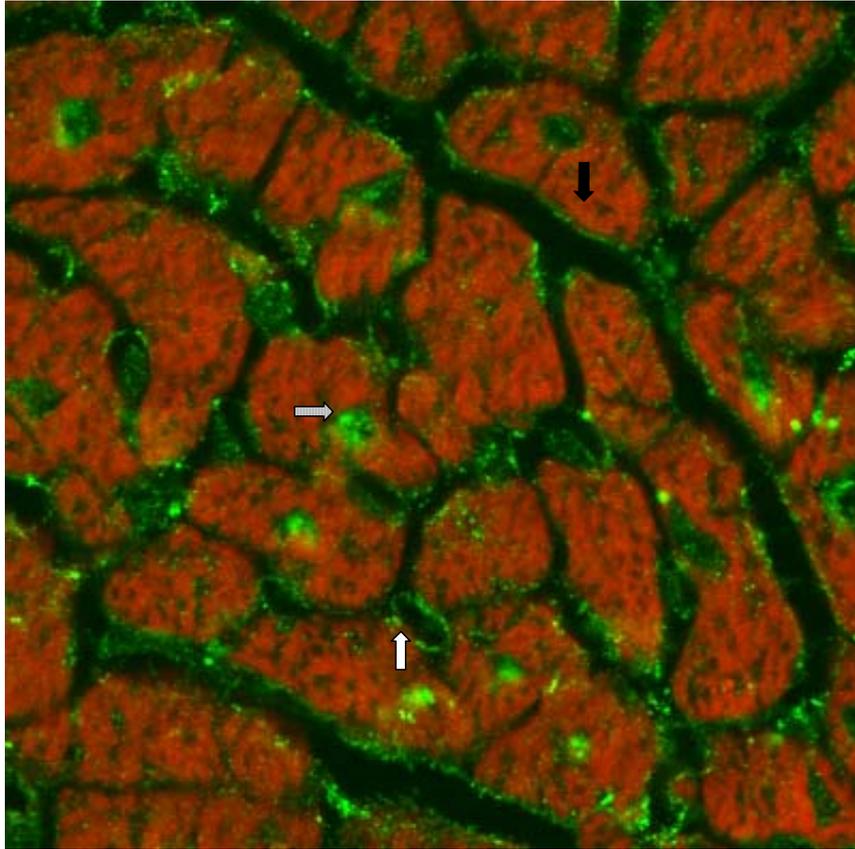


AB-Cre 2d

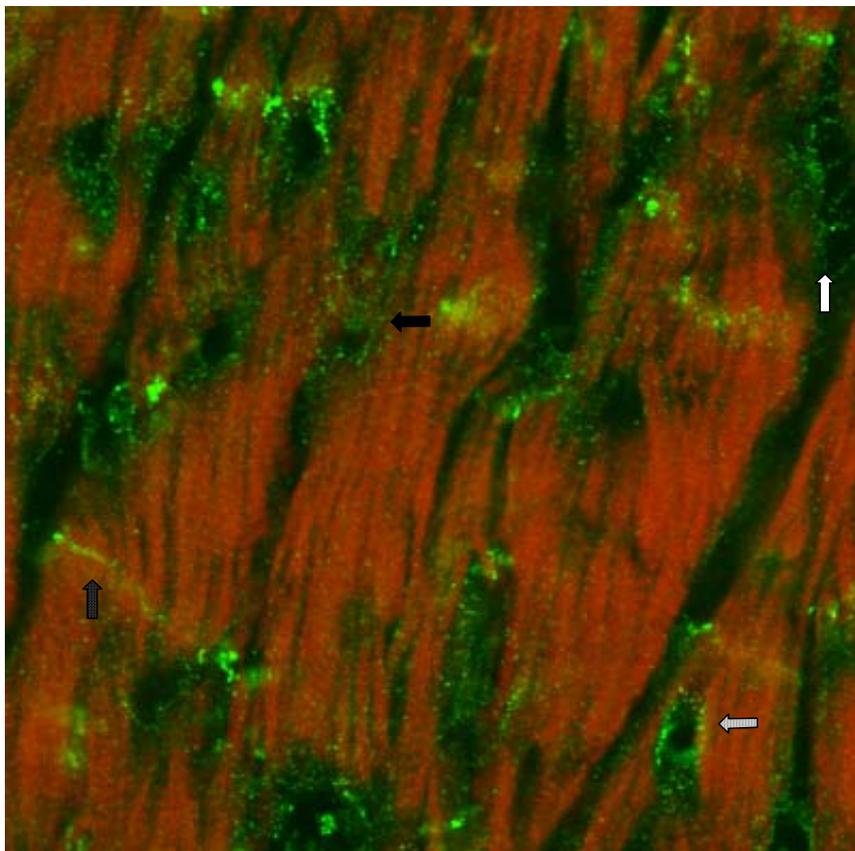


AB-Cre 2d

Ergebnisse

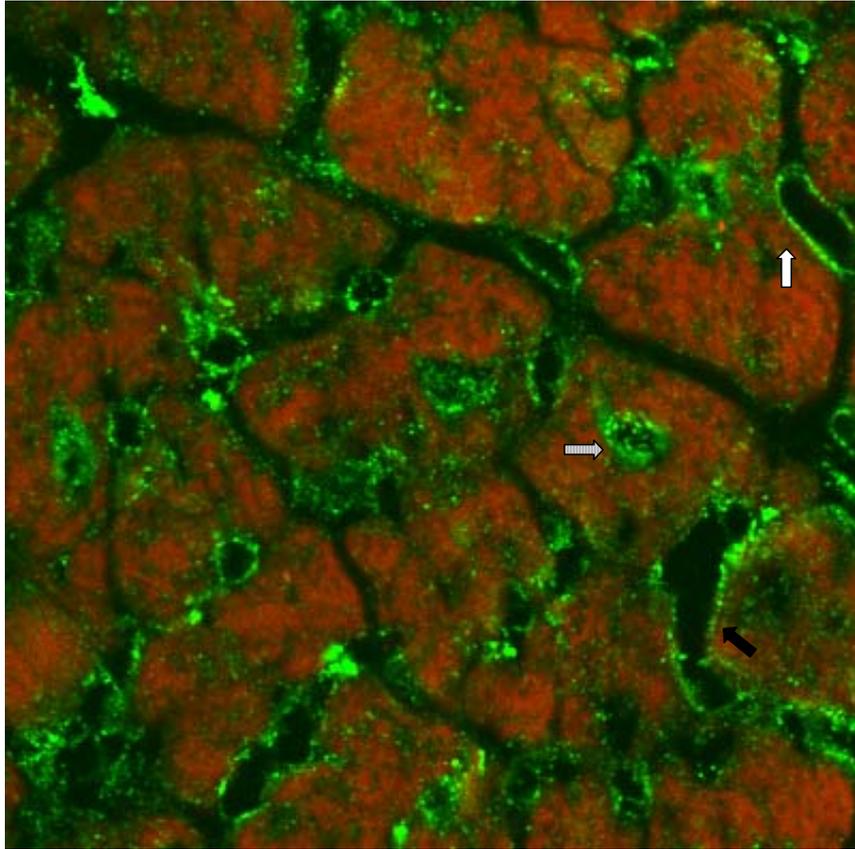


AB-KO 2d

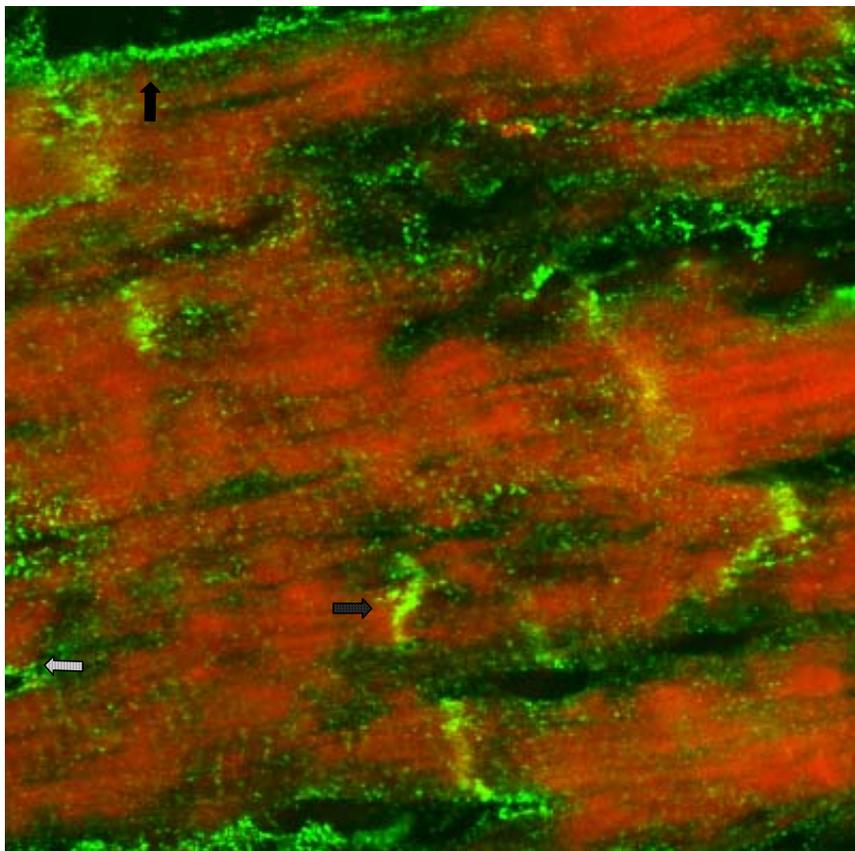


AB-KO 2d

Ergebnisse



AB-Cre 7d



AB-Cre 7d

## Ergebnisse

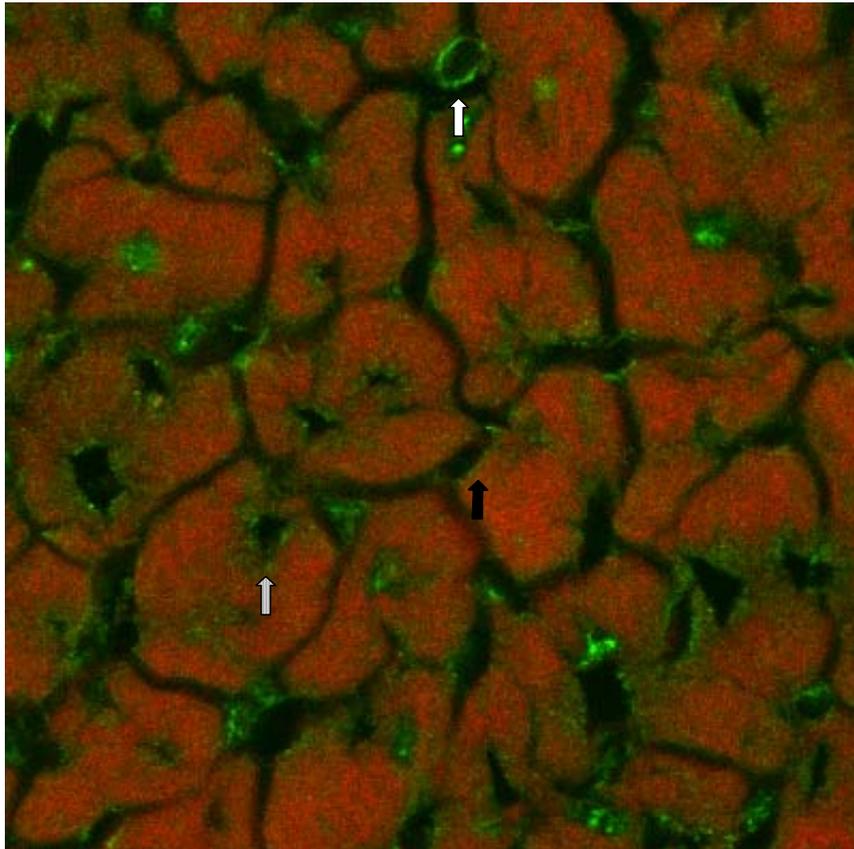
### **Lokalisation:**

Die aktivierte Form der fokalen Adhäsionskinase war sowohl in Gefäßwänden (helle Pfeile), als auch in der kardiomyozytären Zytoplasmamembran (dunkle Pfeile), als auch in den Disci Intercalares (dunkle Pfeile mit weißen Punkten), als auch in den Zellkernmembranen der Kardiomyozyten (helle Pfeile mit schwarzen Punkten) nachweisbar.

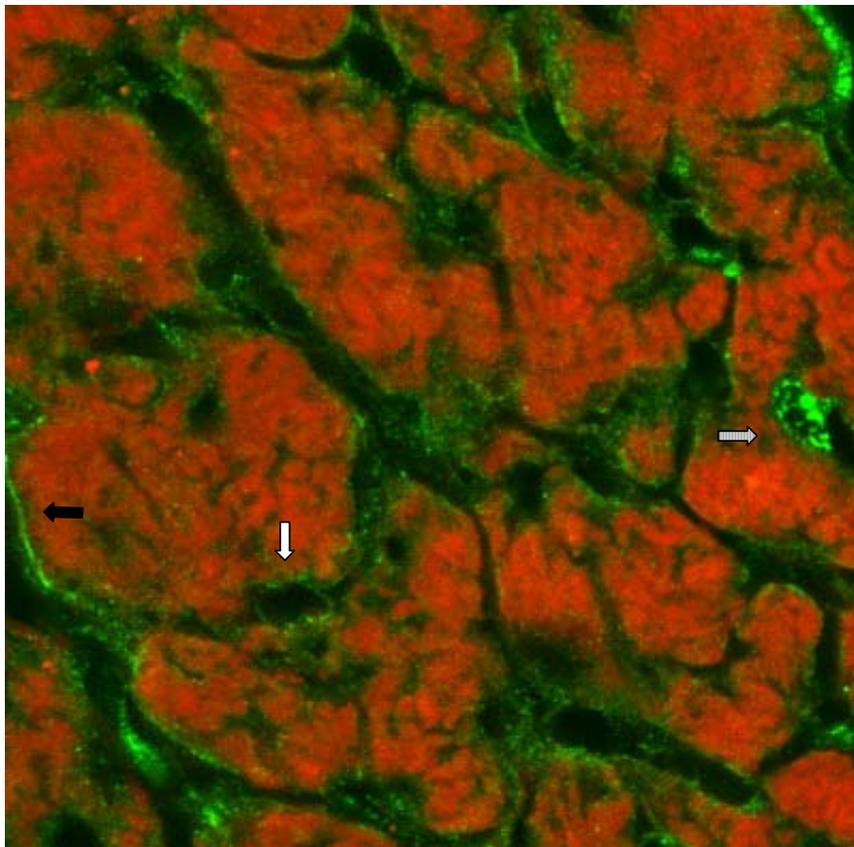
### **Ergebnis:**

- Zwei und sieben Tage postoperativ fand sich bei Cre-Tieren mit Aortic Banding eine stark angestiegene Zunahme der Fluoreszenzintensität in den Gefäßwänden, in den Zytoplasmamembranen, in den Disci Intercalares und in den Zellkernmembranen, im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Scheinoperierte Knock Out Tiere zeigten eine Zunahme der Fluoreszenzintensität sowohl in den Gefäßwänden, als auch in den Zytoplasmamembranen, als auch in den Zellkernmembranen, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren.
- Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out führte zwei Tage nach Aortic Banding zu keiner Reduktion der Fluoreszenzaktivität in Gefäßwänden, Zellmembranen, Disci Intercalares und Kernmembranen, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der beiden Knock Out Gruppen untereinander, ergaben sich keine Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität der Gefäßwände, der Zellmembranen und der Kernmembranen.
- Das Ergebnis des Western Blot wurde bestätigt.

4.6.3. Aktivierte Src-Kinase (p-Src)

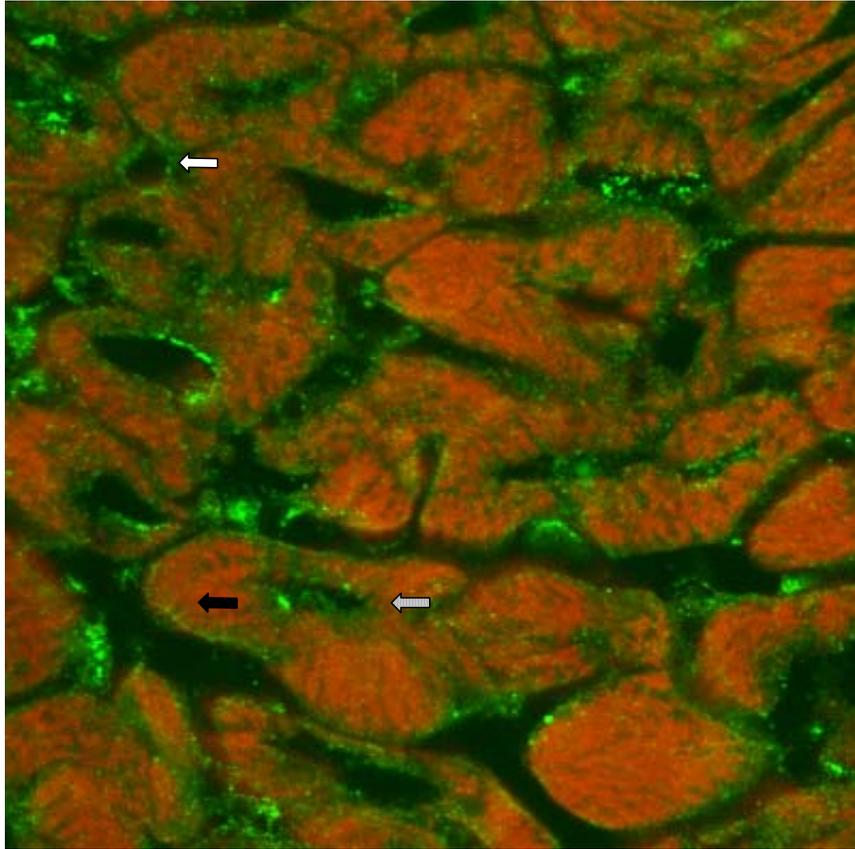


Ctrl-Cre

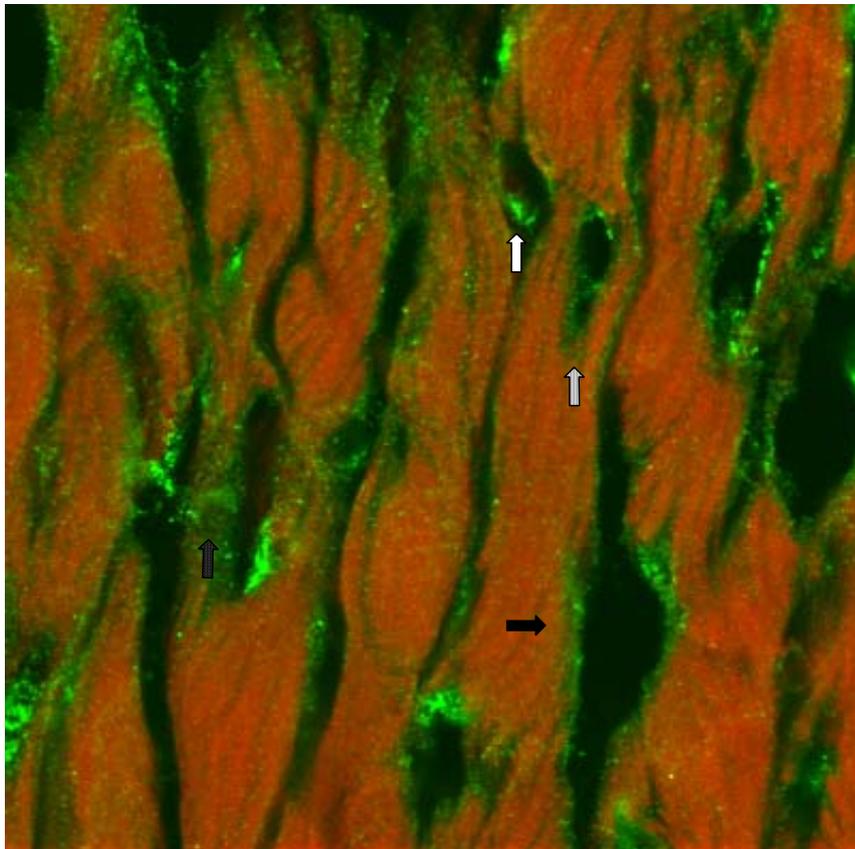


Ctrl-KO

Ergebnisse

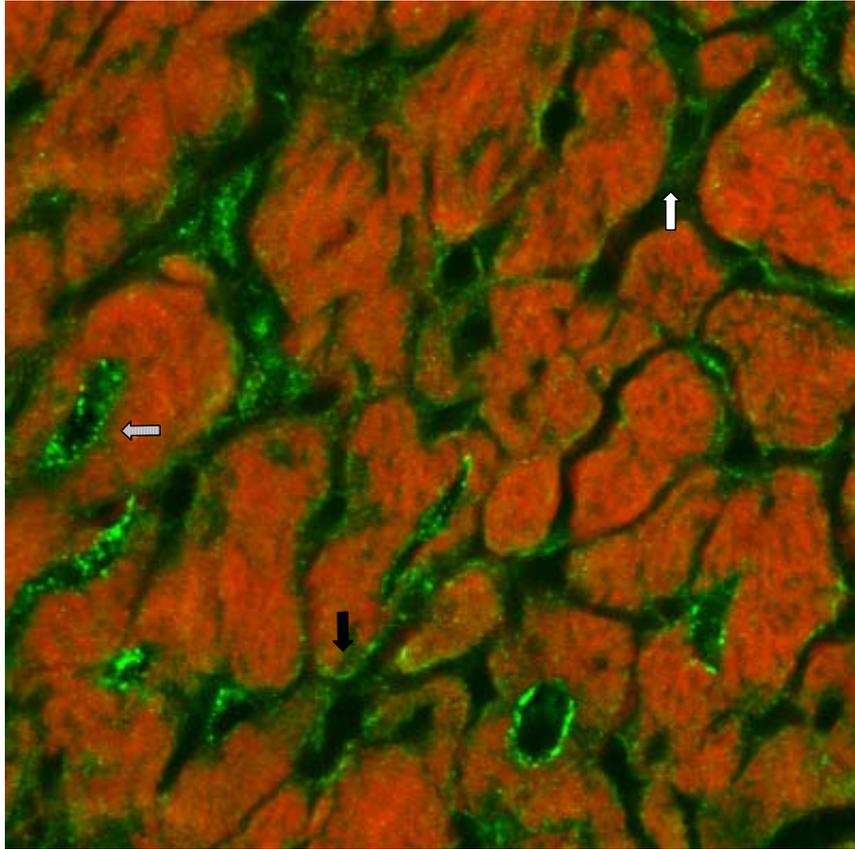


AB-Cre 2d

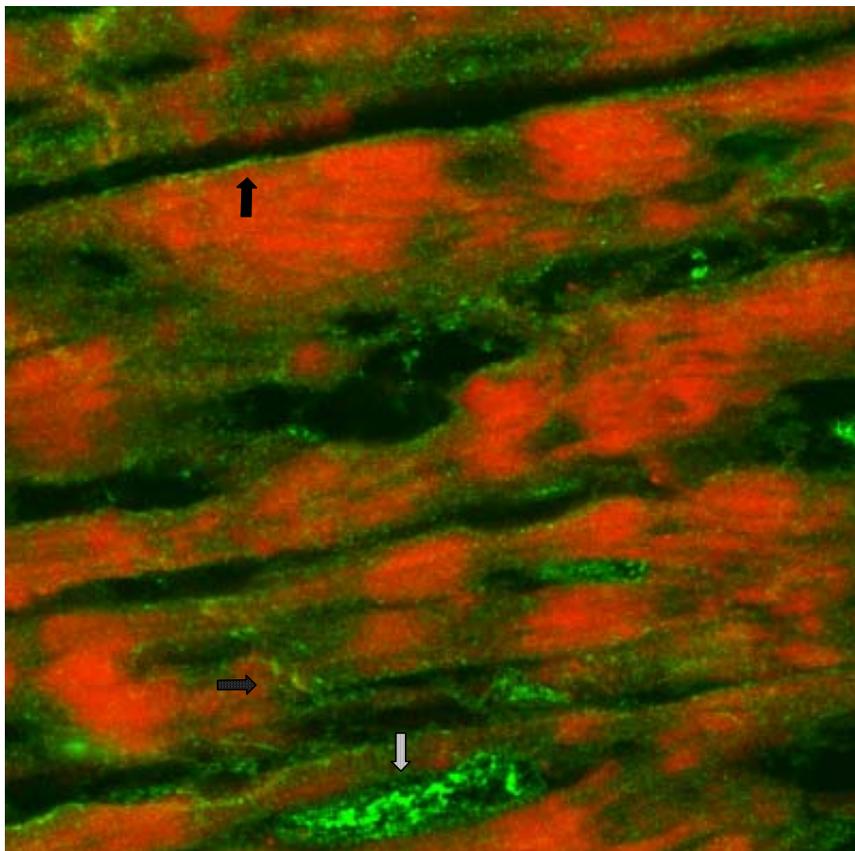


AB-Cre 2d

Ergebnisse

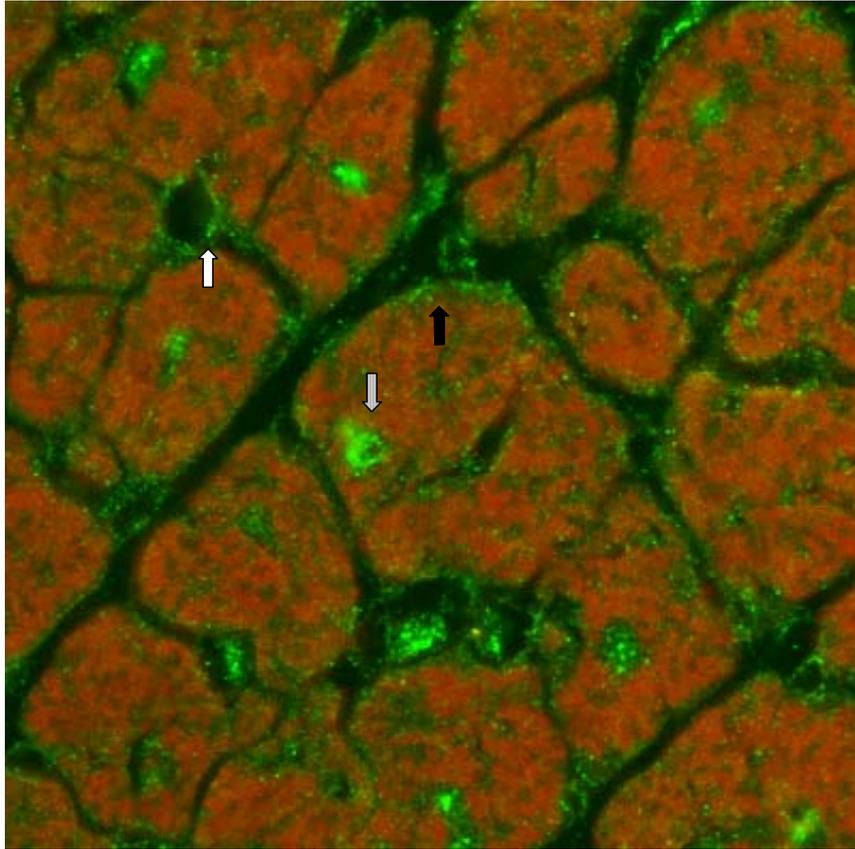


AB-KO 2d

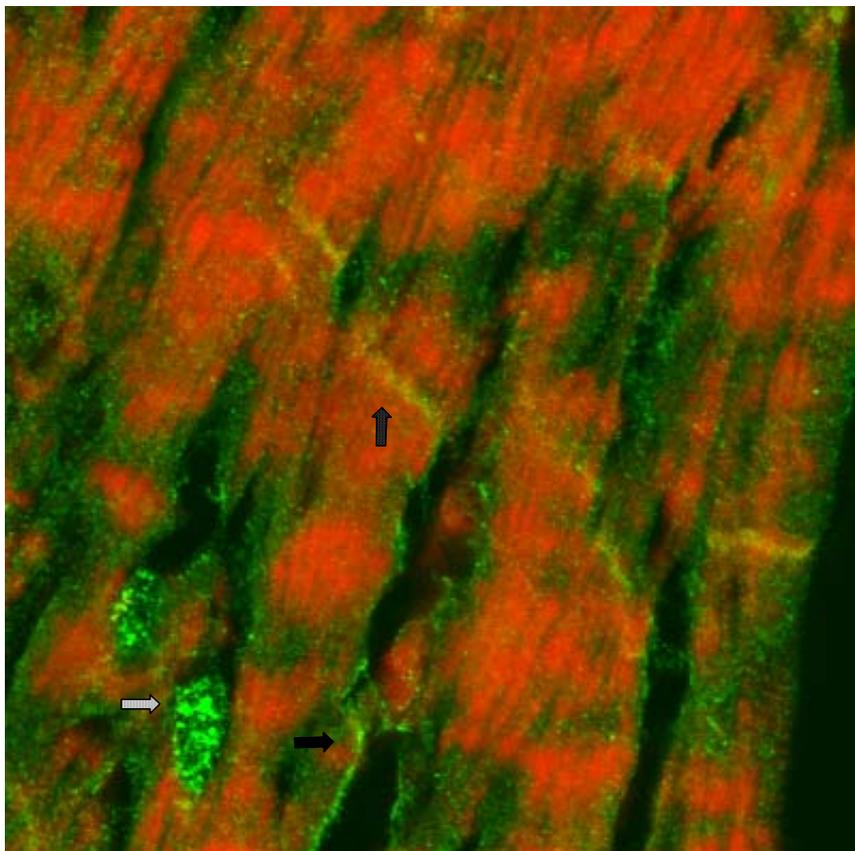


AB-KO 2d

Ergebnisse



AB-Cre 7d



AB-Cre 7d

## Ergebnisse

### **Lokalisation:**

Die aktivierte Form der Src-Kinase war sowohl in Gefäßwänden (helle Pfeile), als auch in der kardiomyozytären Zytoplasmamembran (dunkle Pfeile), als auch in den Disci Intercalares (dunkle Pfeile mit weißen Punkten), als auch in den Zellkernmembranen der Kardiomyozyten (helle Pfeile mit schwarzen Punkten) nachweisbar.

### **Ergebnis:**

- Zwei und sieben Tage postoperativ fand sich bei Cre-Tieren mit Aortic Banding eine stark angestiegene Zunahme der Fluoreszenzintensität in den Gefäßwänden, in den Zytoplasmamembranen, in den Disci Intercalares und in den Zellkernmembranen im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren.
- Scheinoperierte Knock Out Tiere zeigten eine Zunahme der Fluoreszenzaktivität in den Gefäßwänden, in den Zytoplasmamembranen und in den Zellkernmembranen, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren.
- Es fand sich bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding zwei Tage postoperativ keine Reduktion der Fluoreszenzaktivität in Gefäßwänden, Zellmembranen, Disci Intercalares und Kernmembranen im Vergleich zu Cre-Tieren mit Aortic Banding.
- Im Vergleich der beiden Knock Out Gruppen untereinander, ergaben sich keine Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität der Gefäßwände, der Zellmembranen und der Kernmembranen.
- Das Ergebnis des Western Blot wurde bestätigt.
- Es zeigte sich desweiteren, dass das  $\beta$ 1-Integrin mit der aktivierten fokalen Adhäsionskinase und der aktivierten Src-Kinase sowohl in den Zellmembranen, als auch in den Gefäßwänden co-lokalisiert war.

## 5. Diskussion

### 5.1. Tiermodell

Für die Frage, welche Rolle das  $\beta$ 1-Integrin bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz spielt, verwendeten wir in unseren Experimenten Mäuse, bei denen das  $\beta$ 1-Integrin mittels konditionalem Knock Out herzmuskelspezifisch ausgeschaltet wurde. Als Kontrollgruppen dienten uns dabei Mäuse mit Expression der Cre-Rekombinase ohne  $\beta$ 1-Integrin Knock Out. Die Knock Out Mäuse wurden dabei bereits von Jones in unserer Arbeitsgruppe gezüchtet, wobei er auf ein etabliertes System zurückgriff. Um die Herzmuskelspezifität des Knock Outs zu erreichen, setzte er den Promoter für das MLC2v-Gen („*myosin-light-chain 2v*“) ein.<sup>29,73,74,79,81</sup> Wie schon erwähnt, wurden die Mäuse für den konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out von Prof. Reinhard Fässler und Dr. Cord Brakebusch zur Verfügung gestellt, während die Cre-Mäuse von Dr. K. Chien stammten. Diese Mäuse wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert und entsprechend weiterverpaart. Die so gezüchteten Knock Out Mäuse wurden schließlich nochmals mittels PCR und Western Blot kontrolliert, wobei der erfolgreiche herzmuskelspezifische konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out bewiesen werden konnte.<sup>29</sup>

In unseren Versuchen konnte außerdem erwartungsgemäß festgestellt werden, dass die Cre-Mäuse mit Wild Typ Mäusen absolut identisch waren, d.h. die alleinige Expression der Cre-Rekombinase führte zu keinerlei morphologischen oder funktionellen Veränderungen in der Herzfunktion.

Dieses Knock Out Verfahren ermöglicht allerdings nicht, zwischen den verschiedenen  $\beta$ 1-Integrin Isoformen zu diskriminieren. Am Herzen ist dabei das  $\beta$ 1D-Integrin die dominierende Isoform. Das  $\beta$ 1D-Integrin kann aber das  $\beta$ 1A-Integrin offensichtlich nicht in allen Geweben ersetzen. In Knock Out/Knock In Versuchen hatte der Ersatz des  $\beta$ 1A-Integrins durch das  $\beta$ 1D-Integrin embryonale Letalität mit verschiedensten Entwicklungsdefekten zur Folge. Wurde allerdings das  $\beta$ 1D-Integrin komplett ausgeschaltet, führte dies interessanterweise nur zu einem „mild“ veränderten Phänotyp.<sup>43</sup> Weitere wichtige Erkenntnisse könnte hierbei vielleicht die Züchtung einer  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Maus bringen, die es erlaubt, zwischen den  $\beta$ 1-Integrin Isoformen zu unterscheiden.

Obwohl sich die Maus als Modell für viele Leiden des Menschen bewährt hat, ist die Aussagekraft solcher Tiermodelle eventuell eingeschränkt. Knock Out Versuche bieten

## Diskussion

beispielsweise den Nachteil, dass die Beurteilung der Daten durch verschiedene Kompensationsmechanismen erschwert sein könnte. Außerdem wäre es möglich, dass sich diese Tiere im Expressionsmuster verschiedener Integrinunterformen deutlich vom Menschen unterscheiden. Weiterhin könnte auch bei den Tieren eine andere Gewichtung der Integrine, die am Signaltransduktionsprozess der Herzhypertrophie beteiligt sind, vorhanden sein. Die Maus unterscheidet sich auch in den Histokompatibilitätsgenen, deren eventueller Einfluss auf Signalübertragungsprozesse bis heute unklar ist. Wenn man die Physiologie betrachtet, fällt auf, dass die Herzfrequenz der Mäuse ca. das Zehnfache der Menschlichen beträgt. Dies könnte beispielsweise Auswirkungen auf den Grundmetabolismus bei den einzelnen Spezies haben. Es ist auch nicht klar, ob das von uns verwendete Modell des transversalen Aortic Bandings geeignet ist, die menschliche Pathophysiologie bei Drucküberlastung eindeutig zu erklären.

Dennoch gibt es zu Tiermodellen in diesem Fall keine Alternative, da man Versuche dieser Art nicht am Menschen durchführen kann. Es überwiegen hier eindeutig die Vorteile, wie beispielsweise die geringe Größe der Tiere, die kurze Generationszeit, die hohe Zahl an Nachkommen und die geringen Kosten, so dass das Mausmodell zur Klärung unserer Fragen das ideale Modell darstellt.

### **5.2. Postoperative Überlebensraten**

Als Rockman 1991 erstmals das transversale Aortic Banding bei Mäusen beschrieb, erkannte er zugleich die großen Möglichkeiten, die diese Methode der linksventrikulären Druckbelastung in Bezug auf die Untersuchung spezifischer zellulärer Vorgänge, die sich bei der Entwicklung einer Herzhypertrophie abspielen, bot. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass dieses Modell einerseits einfach zu reproduzieren ist und andererseits eine hohe Überlebensrate der so behandelten Mäuse erlaubt, hat sich das Verfahren heutzutage weltweit als Standardversuch etabliert<sup>14-16,85,96</sup> und stellt somit für unsere Untersuchungen das am besten geeignete Verfahren dar. Da eine sehr große Zahl an Forschern mit dieser Methode arbeitet, sollen unsere Ergebnisse insbesondere im Vergleich zu den Daten von Rockman und Tarnavski diskutiert werden. Während Rockman als Erstbeschreiber des transversalen Aortic Bandings gilt, beschrieb Tarnavski 2004 in seinem Review nochmals genau verschiedene herzchirurgische Techniken an Mäusen. Allerdings unterband Tarnavski dabei nicht den transversalen, sondern den ascendierenden Abschnitt der Aorta.<sup>96</sup>

## Diskussion

In unseren Versuchen ergab die Auswertung der Überlebensdaten, dass scheinoperierte Kontrolltiere mit und ohne Knock Out erwartungsgemäß nur eine geringe postoperative Sterblichkeitsrate von ca. 10-20 % in den ersten zwei Tagen aufwiesen.

Bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding kam es in unseren Versuchen nach sieben Tagen zu einem Anstieg der Mortalitätsrate auf ca. 30-35 %. Viele Tiere können diese Druckbelastung offensichtlich nicht kompensieren und sterben an Pumpversagen und Rhythmusstörungen. Die überlebenden Tiere entwickeln aufgrund der gesteigerten hämodynamischen Anforderung eine Hypertrophie des Myokards. Wenn diese Hypertrophie nach geraumer Zeit in eine chronische Herzinsuffizienz umschlägt, ist hier mit einem weiteren Anstieg der Sterblichkeitsrate zu rechnen.

In anderen Arbeitsgruppen ergaben sich im Vergleich zu unseren Daten unterschiedliche Überlebensraten bei den druckbelasteten Tieren. Bei Rockman lag die Sterblichkeitsrate der Mäuse während der Aortic Banding Operation bei ca. 4 %, während die postoperative Sterblichkeitsrate auf ca. 10 % anstieg.<sup>85</sup> Tarnavskis postoperative Mortalitätsrate der Mäuse mit Aortic Banding lag bei ca. 7 %.<sup>96</sup> Die unterschiedlichen Sterblichkeitsraten zwischen unseren Versuchen und denen von Rockman oder Tarnavski beispielsweise, könnten auf Unterschiede im Operationsverfahren, sowie auf unterschiedliche Narkosetechniken beruhen. Während wir wie Rockman die Aorta mit einer 27 G Nadel unterbanden, verwendete Tarnavski hierfür eine 25 G Nadel. Außerdem narkotisierten wir mit Ether und Isofluran, im Gegensatz zu Rockman der mit intraperitonealen Ketamin, Xylazin und Morphin Injektionen arbeitete. Tarnavskis Anästhesie bestand aus intraperitonealen Pentobarbital Injektionen.<sup>85,96</sup> Für die unterschiedlichen Überlebensraten könnten sicherlich noch viele weitere Ursachen gefunden werden. Jedes Labor wendet dabei für diese Methodik unterschiedliche Verfahren an, woraus sich natürlich auch unterschiedlich hohe Überlebensraten ergeben.

Das interessante Ergebnis in unseren Versuchen ist aber, dass die Überlebensrate bei  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Tieren mit Aortic Banding im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren und im Vergleich zu den Cre-Tieren mit Aortic Banding signifikant abfiel. Bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding waren nach sieben Tagen nur noch ca. 30 % der Tiere am Leben. Auch Shai machte die Entdeckung, dass Tiere, denen das  $\beta$ 1-Integrin durch herzmuskelspezifischen konditionalen Knock Out auf ungefähr 18 % des Normallevels reduziert wurde, hämodynamische Druckbelastung durch transversales Aortic Banding schlecht kompensieren konnten. Bei Shai lag die Überlebensrate sieben Tage postoperativ bei 53 %, verglichen mit 83 % Überlebensrate in der Kontrollgruppe.<sup>16</sup> Neben der Operations- und Narkotisierungstechnik ist für die Differenz in der Überlebensrate im Vergleich zu

unseren Versuchen hier wahrscheinlich auch ein unterschiedlich starker Knock Out verantwortlich.

In Shais Versuchen zeigten weiterhin scheinoperierte Knock Out Mäuse nach sechs Monaten klinische Zeichen der Herzinsuffizienz, inklusive Pleuraergüsse und Leberstauung. An den Insuffizienzfolgen verstarben die Mäuse schließlich. Dies führte Shai darauf zurück, dass der normale Herzschlag an sich schon eine gewisse hämodynamische Anforderung darstellt, die diese Knock Out Tiere nur über einen begrenzten Zeitraum tolerieren können. Außerdem konnte er nachweisen, dass die Knock Out Mäuse einen gestörten Glucose Metabolismus, sowie eine gestörte Integrität der Kardiomyozytenmembran aufwiesen.<sup>16</sup> Obwohl sich in unseren Versuchen sieben Tage postoperativ kaum Unterschiede bezüglich des Überlebens im Vergleich von scheinoperierten Mäusen mit und ohne Knock Out ergaben, wäre aufgrund dieser Erkenntnisse die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auch bei unseren scheinoperierten Knock Out Mäusen nach längerer Zeit sehr wahrscheinlich.

Da der konditionale herzmuskelspezifische  $\beta 1$ -Integrin Knock Out zu signifikant erhöhter Mortalität nach kardialer Druckbelastung führt, lässt sich daraus schließen, dass die Verbindung der Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett durch das  $\beta 1$ -Integrin am Herzen essentiell für eine normale Herzfunktion, sowie für die Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie ist. Durch den  $\beta 1$ -Integrin Knock Out wird diese Verbindung unterbrochen und die hierfür notwendigen Adaptationsmechanismen können nicht mehr ablaufen.

### **5.3. Morphologie**

Um den Grad der Hypertrophieentwicklung nach Aortic Banding einschätzen zu können, wurden die Tiere zunächst morphologisch untersucht. Wenn das Herz auf die Druckbelastung mit Hypertrophie, also mit einer Zunahme der Zellmasse reagiert, erwartet man eine Zunahme des Herzgewichts. Weiterhin erwartet man eine Erhöhung des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht, sowie des Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge. Diese Parameter gelten als indirekte Marker für eine Hypertrophie der Herzwände und wurden von vielen Autoren als Beweis für eine Hypertrophieentwicklung herangezogen.<sup>14,15,85,87</sup>

In unseren Versuchen ergab sich erwartungsgemäß im Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander keine Änderung der Parameter Herzgewicht, Herzgewicht/Körpergewicht und Herzgewicht/Tibialänge.

Entgegen unserer Erwartungen zeigte sich das totale Herzgewicht bei den Cre-Tieren zwei Tage nach Aortic Banding signifikant rückläufig. Während sich ein Konstantbleiben des

## Diskussion

Herzgewichts noch durch eine sehr gering ausgeprägte Hypertrophie erklären ließe, ist dieser signifikante Abfall möglicherweise darauf zurückzuführen, dass wir in unseren Versuchen nicht das Gewicht des linken Ventrikels isoliert betrachteten. Deshalb scheint der Parameter Herzgewicht/Körpergewicht noch am ehesten aussagekräftig zu sein. Dieser Parameter zeigte zwei Tage nach Operation keine signifikanten Änderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander. Wie schon angedeutet, könnte diese Tatsache dafür sprechen, dass in unseren Versuchen nach zwei Tagen eine mögliche Hypertrophie noch sehr gering ausgeprägt war. In unserer Arbeitsgruppe stellte Joner an Wildtyp Mäusen fest, dass der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht, sowie der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge zwei Tage nach Aortic Banding relativ konstant blieb.<sup>29</sup> Dass sich in unseren Versuchen der signifikante Abfall des totalen Herzgewichts auch in einem signifikanten Abfall des Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge äußerte, erscheint nicht weiter verwunderlich, da die Tibialänge zwei Tage postoperativ bei allen Gruppen ziemlich konstant blieb. Da davon ausgegangen wurde, dass der  $\beta$ 1-Integrin Knock Out die Entwicklung einer Herzhypertrophie vermindert, blieb das Konstantbleiben der Werte der Knock Out Tiere mit Aortic Banding im Vergleich zu den scheinoperierten Knock Out Tieren und im Vergleich zu den Cre-Tieren mit Aortic Banding im Rahmen der Erwartungen.

Offensichtlich kann man erst nach ca. sieben Tagen mit einem deutlichen Anstieg dieser morphologischen Parameter rechnen. Bei Rockman kam es bei den Mäusen sieben Tage nach Aortic Banding sogar zu einer 41 % igen Zunahme des Gewichts noch feuchter Herzen und zu einer 30 % igen Zunahme des Gewichts getrockneter Herzen. Der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht nahm sieben Tage postoperativ bei den feuchten Herzen um 33 % und bei den trockenen Herzen um 24 % zu.<sup>85</sup> Bei Choi ergab sich nach sieben Tagen Druckbelastung durch Aortic Banding bei den Mäusen eine Zunahme des Quotienten aus linkem Herzventrikel und Körpergewicht von 34 % und eine Zunahme des Quotienten aus linkem Herzventrikel und Tibialänge von 39 %, verglichen mit scheinoperierten Mäusen.<sup>87</sup> Auch bei Babbitt entwickelten die Mäuse sieben Tage nach Aortic Banding eine signifikante Zunahme dieser Quotienten.<sup>15</sup>

Analog diesen Ergebnissen kam es bei unseren Tieren sieben Tage nach transversalem Aortic Banding verglichen mit den scheinoperierten Kontrolltieren zu einer signifikanten Zunahme des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht. Allerdings fällt dieser Wert mit einer Zunahme von ca. 20 % etwas geringer aus, als bei Rockman, Choi und Babbitt. Möglicherweise spielen auch hier wieder unterschiedliche Operationstechniken eine Rolle.

## Diskussion

Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass Choi und Babbitt isoliert den linken Ventrikel betrachteten.<sup>15,87</sup>

In unseren Versuchen nahm weiterhin sieben Tage nach Aortic Banding weder das totale Herzgewicht, noch das Verhältnis aus Herzgewicht und Tibialänge bei den Cre-Tieren im Vergleich mit den scheinoperierten Kontrolltieren signifikant zu. Auch noch nach sieben Tagen blieb die Länge der Tibia ziemlich konstant. In den Vorarbeiten von Joner in unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht, sowie des Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge und eine deutliche Zunahme des totalen Herzgewichts allerdings erst nach einem postoperativen Zeitraum von dreißig Tagen.<sup>29</sup>

Während bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding nach sieben Tagen der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant zunahm, ergaben sich interessanterweise bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Herzgewichts, bezüglich des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht, sowie bezüglich des Quotienten aus Herzgewicht und Tibialänge, verglichen mit Kontrolltieren und verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding. Aufgrund der Überlebensraten gingen wir ja davon aus, dass der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out die Hypertrophie des Herzens zu vermindern vermag. Die Tatsache, dass es bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding nicht zu signifikanten Veränderungen dieser Parameter kam, könnte hier für eine verminderte Hypertrophietendenz sprechen.

Dennoch lieferten diese Parameter außer bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding sieben Tage postoperativ keine wirklich eindeutig signifikanten Erkenntnisse. Möglicherweise beeinflussen auch „*Remodeling*“ Vorgänge, wie z.B. Fibrosierungen oder Kalzifikationen das Herzgewicht. Diese Umbauprozesse wurden beispielsweise von Shai bei  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen ohne Aortic Banding nach einem halben Jahr beobachtet und könnten auch bei unseren Knock Out Tieren aufgetreten sein.<sup>16</sup>

Weiterhin wurden morphologisch noch die Parameter Körpergewicht, Tibialänge und Lungengewicht untersucht, wobei sich aber erwartungsgemäß weder zwei noch sieben Tage postoperativ signifikante Veränderungen ergaben. Diese Werte scheinen sich offensichtlich erst nach einiger Zeit signifikant zu verändern. Dazu passen die Beobachtungen von Joner, der erst ab einem Zeitraum von vier Wochen bis zu drei Monaten ein deutlich gesteigertes Körpergewicht, die Entwicklung eines Lungenödems und exzessive kardiale Hypertrophie beobachtete. Das Einsetzen dieser Kriterien sollte ihm als Hinweis für ein beginnendes Herzversagen dienen. Die deutliche Zunahme des Körpergewichts in diesem Zeitraum führte

er auf eine zunehmende Ödemneigung zurück, wobei allerdings dieser Anstieg auch sehr viele andere Ursachen haben könnte.<sup>29</sup>

Aufgrund unserer Datenlage und den bisher veröffentlichten Ergebnissen scheint sich als Parameter für die Herzhypertrophie zu den frühen postoperativen Zeitpunkten von zwei und sieben Tagen wohl am ehesten der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht zu eignen. Dieser Parameter erlaubt es auch Fehler durch postoperative Gewichtsveränderungen auszuschließen. Das totale Herzgewicht ist als alleiniger Parameter wohl eher für spätere Zeitpunkte, wenn eine noch stärkere Hypertrophie eingesetzt hat, eingeschränkt tauglich. Da sich die Tibialänge über diesen frühen postoperativen Zeitraum relativ konstant hielt, zeigte sich der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge eher als Abbild des totalen Herzgewichtes und scheint auch eher für die Hypertrophiebeobachtung ab einer Woche nach Aortic Banding sinnvoll zu sein, wenn es auch zu Veränderungen in der Tibialänge kommt.

Aufgrund dieser Unsicherheiten in der indirekten Bestimmung der Hypertrophie erscheint es sinnvoller die Herzwände mittels Histologie und Echokardiographie direkt auf Hypertrophie hin zu untersuchen.

### **5.4. Histologie**

Zur direkten Bestimmung der Hypertrophie eignet sich insbesondere das Ausmessen der Dicke von Hinterwand und Interventrikularseptum. Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, vermuteten wir aufgrund unserer und fremder Daten bei Cre-Tieren eine leichte Zunahme dieser Parameter zwei Tage nach Aortic Banding und eine deutlich signifikante Zunahme dieser Werte sieben Tage nach Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren. Wir vermuteten weiterhin im Vergleich zu Cre-Tieren mit Aortic Banding eine Reduktion der Hinterwand- und Interventrikularseptumdicke bei den  $\beta 1$ -Integrin Knock Out Mäusen mit Aortic Banding.

Tatsächlich ergab sich in unseren Versuchen eine signifikante Zunahme der Hinterwandstärke bei den Cre-Tieren im Verlauf von zwei und sieben Tagen nach Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren. Außerdem konnte mit dieser Methode eine signifikante Zunahme der Interventrikularseptumdicke bei Cre-Tieren sieben Tage nach Aortic Banding nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen, dass es in unserer Arbeitsgruppe gelungen ist, durch transversales Aortic Banding eine signifikant ansteigende Hypertrophie der Herzwände und des Interventrikularseptums im Verlauf von zwei bis sieben Tagen zu provozieren.

## Diskussion

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding sowohl zwei als auch sieben Tage postoperativ keine signifikante Veränderung bezüglich der Hinterwand- oder der Interventrikularseptumdicke zeigte, verglichen mit scheinoperierten Knock Out Tieren. Sowohl dieses Ergebnis, als auch die Tatsache, dass im Vergleich zu Control-Tieren mit Aortic Banding die Hinterwand bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding signifikant dünner ist, bedeutet, dass das nahezu vollständige Fehlen des  $\beta$ 1-Integrins die notwendige Antwort auf hämodynamische Druckbelastung im Sinne einer Herzhypertrophie verhindert.

Ferner ergaben unsere Ergebnisse keine signifikanten Veränderungen der Parameter Hinterwand- und Interventrikularseptumdicke im Vergleich der beiden Kontrollgruppen miteinander. Diese Ergebnisse entsprechen wiederum den Erwartungen, da sich weder aus den Überlebenskurven, noch aus den morphologischen Daten ein Anhalt für mögliche signifikante Veränderungen ergab. Außerdem wissen wir aus Shais Erkenntnissen, dass sich bei konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen offensichtlich erst nach ca. einem halben Jahr eine dilatative Kardiomyopathie einstellt.<sup>16</sup>

Obwohl diese Methodik schon sehr eindeutige Ergebnisse zu liefern vermag, kann man mit ihr die Herzfunktion im lebenden Tier nicht untersuchen und somit die geringe Überlebensrate hämodynamisch druckbelasteter Tiere mit konditionalem  $\beta$ 1-Integrin Knock Out nicht ausreichend erklären. Außerdem konnten wir mit den uns zur Verfügung stehenden Apparaten keine Aussage über mikroskopische Veränderungen im Herzgewebe und in den Kardiomyozyten machen. Diese Untersuchungen würden sicherlich auch zu interessanten Entdeckungen führen und sollten deshalb auf alle Fälle bei weiteren Experimenten durchgeführt werden. Allerdings muss man noch anmerken, dass auch diese Methodik nicht frei von Fehlerquellen ist. Als postmortale Artefakte beobachteten wir ein sich Zusammenziehen des Gewebes durch die Entwässerung, sowie das Auftreten von Rissen durch das Einbetten des Gewebes in Paraffin und das darauffolgende Schneiden im Schlittenmikrotom. Auch war durch ein oftmaliges Abreißen des rechten Ventrikels die Beurteilung des Interventrikularseptums erschwert oder unmöglich. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung der Interventrikularseptumdicke zwei Tage nach Aortic Banding verzichtet. Zur weitergehenden Diagnostik und zur Bestätigung der Ergebnisse griffen wir deshalb im nächsten Schritt auf die Echokardiographie zurück.

## 5.5. Echokardiographie

Die Echokardiographie stellt beim Menschen eine weltweit im klinischen Alltag etablierte Methode dar, um Form und Funktion des Herzens adäquat und in standardisierter Form zu untersuchen. Dabei sind erfahrene Untersucher in der Lage Fehlerquellen auf ein Mindestmaß zu reduzieren und eine hohe Aussagekraft zu erreichen.

Auch Mäuse lassen sich mit dieser Methode sehr gut untersuchen. Dennoch stellt die geringe Größe der Mäuseherzen und die hohe Herzfrequenz von oftmals über 500 Schlägen pro Minute besondere Anforderungen an dieses bildgebende Verfahren. Diesen Anforderungen können aber neue Geräte mit Linearschallköpfen sehr gut begegnen. Wichtig ist weiterhin die richtige Dosierung des Anästhetikums zu beachten, welches unter speziellen Umständen etwas kardiodepressiv wirken kann. Wenn man dieses Verfahren sorgfältig anwendet, ist es auch bei Mäusen eine relativ schnelle, vielseitige und zuverlässige Methode um die Stärke von Herzwänden, den Durchmesser der Herzkammern und die kardiale Funktion zu messen.

Der große Vorteil dabei ist, dass die Herzechokardiographie nicht invasiv durchgeführt werden kann.<sup>14,16,97</sup> Diese Methode ist also ideal, um die kardiale Hypertrophieentwicklung nach Aortic Banding zu messen und zu vergleichen. Brancaccios Wildtyp Mäuse beispielsweise zeigten sieben Tage nach Aortic Banding in Enddiastole und Endsystole signifikant erhöhte Stärken von Hinterwand und Interventrikularseptum, sowie einen signifikant reduzierten linksventrikulären Durchmesser.<sup>14</sup>

Unsere echokardiographischen Untersuchungen ergaben passend hierzu deutlich signifikant verdickte Hinterwände und Interventrikularsepten in der Enddiastole bei Cre-Tieren mit Aortic Banding zwei und sieben Tage nach dem Eingriff, verglichen mit den scheinoperierten Cre-Tieren.

Die Tatsache, dass sich die Stärken der Hinterwände und der Interventrikularsepten in der Enddiastole bei  $\beta 1$ -Integrin Knock Out Mäusen mit Aortic Banding nicht signifikant von den Werten der scheinoperierten Knock Out Tiere unterschieden, weist, wie auch die vorangegangenen Untersuchungen, darauf hin, dass Knock Out Tiere auf die hämodynamische Druckbelastung nicht mit Hypertrophie reagieren können. Diese Vermutung wurde abermals durch die signifikant geringere Stärke der Hinterwand und des Interventrikularseptums bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding zwei und sieben Tage postoperativ, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding, bestätigt. Im B-Mode zeigten sich zwei und sieben Tage nach Aortic Banding sowohl Hinterwand als auch Interventrikularseptum bei diesen Knock Out Tieren nicht nur in der Hypertrophie vermindert, sondern erschienen sogar deutlich dilatiert.

## Diskussion

Somit wurde die Hypertrophieentwicklung an Hinterwand und Interventrikularseptum bei den Cre-Tieren, sowie das Ausbleiben der Hypertrophie bei den Knock Out Tieren im Verlauf von zwei bis sieben Tagen nach Aortic Banding erneut bewiesen und die histologischen Ergebnisse damit echokardiographisch bestätigt.

Dass der Hypertrophieprozess nicht nur an der Hinterwand, sondern auch am Interventrikularseptum abläuft, ist logisch, da eine hämodynamische Druckbelastung nicht nur die Hinterwand isoliert betrifft. Außerdem ist das  $\beta 1$ -Integrin in allen Herzmuskelzellen vorhanden und wird auch in allen Zellen durch den konditionalen Knock Out nahezu vollständig eliminiert. Dieser Mangel vermindert somit bei hämodynamischer Druckbelastung nicht nur die Hypertrophie der Hinterwand, sondern auch des Interventrikularseptums. Die histologischen Ergebnisse ergaben hierzu schon erste Anhaltspunkte, der endgültige Beweis für diese Vermutungen konnte aber erst mit Hilfe der Echokardiographie erbracht werden. Offensichtlich sind zur Untersuchung der Hinterwand sowohl die Histologie, als auch die Echokardiographie in gleichem Maße geeignet. Aufgrund obengenannter Gründe und Fehlerquellen ist wohl die Echokardiographie der Histologie zur Untersuchung des Interventrikularseptums überlegen. Zur weiteren Untersuchung der Herzfunktion bedarf es allerdings noch weiterer Diagnostik.

Um die Funktion des Herzmuskels zu untersuchen, wurde der Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole und in der Endsystole bestimmt. Während dabei ein großer Durchmesser des linken Ventrikels in der Enddiastole für eine hohe Compliance des Herzmuskels oder für dilatative Kardiomyopathie spricht, bedeutet ein kleiner Wert eher verminderte Compliance der Herzmuskulatur, wie sie bei Herzhypertrophie auftritt. In der Endsystole dagegen kann man Rückschlüsse auf die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskulatur ziehen, wobei ein kleiner Durchmesser für starke Kontraktionsfähigkeit und/oder Hypertrophie spricht. Aus physiologischer Sicht erscheint dies sinnvoll, da ja die Hypertrophie die Auswurfleistung verbessern soll. Es zeigt sich auch oftmals im klinischen Alltag, dass eine Hypertrophie nicht zwangsläufig zu einer Umfangsvergrößerung des Herzens führt, sondern der Ventrikel nach innen eingeeengt wird. Ein großer Durchmesser des linken Ventrikels in der Endsystole spricht daher gegen Hypertrophie, für geringe Kontraktionsfähigkeit und für Dilatation.

Die Auswertung des linksventrikulären Durchmessers in der Enddiastole ergab, dass bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding im Zeitraum von zwei und sieben Tagen nach Operation der Durchmesser signifikant abnahm, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren und verglichen

## Diskussion

mit  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen mit Aortic Banding. Diese Herzen besitzen also aufgrund ihrer Hypertrophie eine niedrige Compliance.

Es zeigten sich weiterhin bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding weder nach zwei noch nach sieben Tagen im Vergleich mit scheinoperierten Knock Out Tieren signifikante Unterschiede im linksventrikulären Durchmesser. In diesem Zeitraum wiesen die Knock Out Tiere mit Aortic Banding sogar einen signifikant größeren Durchmesser des linken Ventrikels auf, verglichen mit Cre-Tieren mit Aortic Banding. Während also zweifelsfrei die Compliance bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding ab und die Hypertrophie zunimmt, könnten diese Erkenntnisse bedeuten, dass sich bei den konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen entweder die Compliance ungefähr auf Normlevel bewegt, oder eine Dilatation eingetreten ist.

Die Betrachtung des linksventrikulären Diameters in der Endsystole ergab folgendes Bild: bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding spricht der signifikant geringere Diameter zwei Tage postoperativ im Vergleich mit scheinoperierten Cre-Tieren einerseits für gesteigerte Kontraktionsbereitschaft, als auch für die schon beschriebene Hypertrophieentwicklung. Sieben Tage postoperativ scheint diese Kontraktionsfähigkeit nicht mehr so signifikant ausgeprägt zu sein. Ein schleichender Übergang in die Herzinsuffizienz erscheint ab diesem Zeitpunkt durchaus möglich.

Verglichen mit den Cre-Tieren mit Aortic Banding bleibt nach zwei und sieben Tagen der endsystolische Diameter des linken Ventrikels bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding signifikant größer. Offensichtlich liegt bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding eine signifikant geringere Kontraktionsfähigkeit bei nicht erfolgter Hypertrophieentwicklung vor. Außerdem ergab sich beim Vergleich des enddiastolischen mit dem endsystolischen Durchschnittswert des linken Ventrikels bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding zwei und sieben Tage nach der Operation nur ein sehr geringer Unterschied in den Werten. Dieser Umstand belegt die Vermutung, dass sich die Herzwände bei diesen Tieren kaum mehr kontrahieren können. Auch in den B-Mode Bildern imponierten bei diesen Tieren die dilatierten Herzwände deutlich hypoton.

Obwohl die  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäuse mit Aortic Banding im Vergleich zu scheinoperierten Knock Out Mäusen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des linksventrikulären endsystolischen Diameters aufwiesen, gehen wir bei diesen Tieren trotzdem aufgrund der echokardiographischen Durchschnittswerte, der B-Mode Bilder und der deutlich reduzierten Überlebensrate von einer geringeren Kontraktionsfähigkeit auch im Vergleich mit Kontrolltieren aus.

## Diskussion

Ob man aber aufgrund dieser Ergebnisse und dem kurzen Beobachtungszeitraum von dilatativer Kardiomyopathie sprechen kann, ist nicht klar zu sagen. Was man aber sicherlich annehmen kann, ist, dass die Knock Out Tiere mit Aortic Banding diesen Herzfehler in einem gewissen Zeitrahmen entwickeln werden, sofern sie bis dahin überleben.

Inwieweit die bisher gewonnen Erkenntnisse mit den vermuteten Änderungen der Herzfunktion korrelieren, soll nun anhand des Fractional Shortening diskutiert werden, welches bezüglich der Auswurfleistung etwas mehr Klarheit schaffen könnte. Das Fractional Shortening bezeichnet die Annäherung von Hinterwand und Interventrikularseptum während des Pumpvorgangs. Es berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{LV-Diameter Enddiastole} - \text{LV Diameter Endsystole}}{\text{LV-Diameter Enddiastole}}$$

Diese Formel bietet den Vorteil, dass sie nicht von der Dicke der Herzwände abhängig ist. Da sich zwei Tage nach Aortic Banding keine signifikanten Unterschiede im Fractional Shortening zwischen den einzelnen Gruppen zeigten, gelangt man zu der Vermutung, dass die bis dahin eingetretene Hypertrophie bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding die Auswurfleistung nicht signifikant steigern kann und dass die geringere Hypertrophie bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding noch nicht zu einer hämodynamisch hochrelevanten Reduktion der Auswurfleistung geführt hat. Während sich aber sieben Tage nach der Operation bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding noch immer keine signifikante Erhöhung des Fractional Shortening und damit der Auswurfleistung eingestellt hat, fällt im Vergleich mit diesen Tieren bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding die Herzfunktion signifikant ab.

Diese Ergebnisse beweisen für den Zeitpunkt sieben Tage nach Aortic Banding obengenannte Vermutung, dass der konditionale  $\beta 1$ -Integrin Knock Out nach hämodynamischer Druckbelastung zu einer Reduktion der Auswurfleistung führt. Für den Zeitpunkt zwei Tage nach Aortic Banding konnte diese Vermutung, welche aus der Betrachtung des linksventrikulären Diameters in der Enddiastole und Endsystole geäußert wurde, allerdings nicht bestätigt werden. Das signifikante Nachlassen der Auswurfleistung bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding erst nach mehreren Tagen lässt sich auch mit den Erkenntnissen, die sich aus der Überlebensrate ziehen lassen, in Einklang bringen, da viele Tiere dieser Gruppe im Zeitraum von zwei bis sieben Tagen nach Operation verstarben.

Neben der schlechten Auswurfleistung sind sicherlich noch andere Faktoren wie arrhythmogene Tendenzen oder plötzlicher Herztod durch Kammerflimmern für den Anstieg

## Diskussion

der Mortalität verantwortlich. Wie wir aus der klinischen Erfahrung wissen, neigen viele Herzfehler und Herzerkrankungen zu Herzrhythmusstörungen. Insbesondere sind dies ischämische Infarkte, Kardiomyopathien, dilatative/obstruktive Herzerkrankungen und andere Vorgänge die zu einer Reduktion der Pumpfunktion führen. Weiterhin könnte natürlich auch der konditionale  $\beta 1$ -Integrin Knock Out allein zu Herzrhythmusstörungen führen. Fässler konnte beispielsweise an  $\beta 1$ -Integrin fehlerhaften Kardiomyozyten, welche aus Stammzellen gewonnen wurden und keine Veränderungen bezüglich Expression oder Funktion von Ionenkanälen aufwiesen, nachweisen, dass diese eine erhöhte Rate an spontanen Kontraktionen und Arrhythmien aufwiesen.<sup>63</sup>

Als Schlussfolgerung lässt sich ziehen, dass im postoperativen Zeitraum von zwei Tagen für die Todesfälle bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding eher akutes Pumpversagen und Kammerflimmern verantwortlich sind, während nach zwei Tagen wohl eher die chronisch nachlassende Herzleistung die maßgebliche Todesursache darstellt.

Die durch die Daten des linksventrikulären endsystolischen Diameters aufgeworfene Frage, ob bei Cre-Tieren mit Aortic Banding bereits nach sieben Tagen ein langsamer Übergang in eine Insuffizienz stattfindet, konnte durch die Untersuchung des Fractional Shortenings nicht eindeutig geklärt werden.

Das Fractional Shortening ist allerdings in der Humanmedizin im klinischen Alltag nicht unumstritten. Oftmals wird es dort durch die Berechnung der Ejektionsfraktion ersetzt. Die Ejektionsfraktion entspricht dem prozentualen Anteil des Gesamtvolumens in der Enddiastole, welcher durch den Herzschlag ausgeworfen wird. Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{LV-Volumen in der Enddiastole} - \text{LV-Volumen in der Systole}}{\text{LV-Volumen in der Enddiastole}}$$

Oftmals wird im klinischen Alltag auch das Herzzeitvolumen als Maß für die Auswurfleistung bestimmt. Sowohl für die Ejektionsfraktion, als auch für das Herzzeitvolumen ist die Bestimmung des linksventrikulären Volumens nötig und somit die dritte Dimension in Form des vier Kammerblicks bei der Herzechokardiographie. Dies ist allerdings bei den Mäusen schwierig durchzuführen. Da wir deshalb kaum mit standardisierbaren Ergebnissen rechneten, verzichteten wir auf diese Untersuchung. Außerdem kann es hierbei zu anderen Fehlern kommen, da z.B. ein großer Ventrikel mit geringer Kontraktion und schlechter Auswurfleistung ein gleich großes Schlagvolumen haben kann, wie ein kleiner Ventrikel mit guter Kontraktion und Auswurfleistung. Dies kommt

## Diskussion

dadurch zustande, dass der große Ventrikel aufgrund des großen Ausgangsvolumens mit geringer Kontraktion genauso viel Volumen pumpen kann, wie ein kleiner Ventrikel mit kleinem Ausgangsvolumen und guter Kontraktion.

Diese Indices sind also von der Volumenlast abhängig und deswegen nicht so gut geeignet zwischen Änderungen in der Kontraktionsfähigkeit und Veränderungen, die durch unterschiedliche Volumenbelastung hervorgerufen werden, zu diskriminieren.<sup>97</sup>

Auch werden sie standardmäßig in Ruhe und nicht unter Belastung durchgeführt, was im klinischen Alltag und in der Forschung praktischer und billiger ist. Um die Herzleistung besser betrachten zu können, müsste man eigentlich auf Belastungstests zurückgreifen. Beim Menschen bietet sich da die Spiroergometrie und Stressechokardiographie an und auch Katheteruntersuchungen unter Belastung sind möglich. Diese Untersuchungen sind aber bei Mäusen viel schlechter durchführbar. Im Rahmen der Verbesserung der echokardiographischen Methodik wird dennoch heutzutage versucht mittels Ultraschallkontrastmittel und Farbdoppler-Sonographie die Herzfunktion besser messen zu können.<sup>97</sup>

Eine weitere und mittlerweile auch gut etablierte Möglichkeit die Herzfunktion bei den Mäusen zu überprüfen, wäre die hämodynamische Untersuchung der Tiere mittels Millar® Katheter. Bei dieser invasiven Methode wird die A. carotis der Mäuse mit einem Katheter punktiert und dieser bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dort können nun Druckmessungen in Enddiastole und Endsystole durchgeführt und Druckkurven berechnet werden. Weiterhin lassen sich die Ejektionsfraktion und die Herzfrequenz messen. Aufgrund des begrenzten Rahmens dieser Arbeit wurde auf diese Möglichkeit aber verzichtet. Sie sollte dennoch bei weitergehenden Untersuchungen in Betracht gezogen werden.<sup>98</sup>

In Zusammenschau der Ergebnisse aus Überlebensrate, Morphologie, Histologie und besonders der Echokardiographie lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Erstens ist es uns gelungen mit transversalem Aortic Banding eine ausreichend starke kardiale Hypertrophie zu erzeugen. Zweitens konnte bewiesen werden, dass das  $\beta 1$ -Integrin eine bedeutende Rolle im Hypertrophieprozess des hämodynamisch druckbelasteten Myokards spielt. Wird nämlich das  $\beta 1$ -Integrin durch konditionalen Knock Out fast vollständig eliminiert, kommt es zu schweren Herzfehlern mit Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie und Reduktion der linksventrikulären Kontraktilität. Eine erhöhte postoperative Mortalität ist die Folge. Die Tatsache, dass sich in keiner der Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen scheinoperierten Cre-Tieren und scheinoperierten Knock Out Mäusen zeigten, lässt ferner den Schluss zu, dass auch bei unseren scheinoperierten Knock Out Tieren

die von Shai festgestellten Herzfehler wahrscheinlich nach gewisser Zeit normaler hämodynamischer Belastung durch den physiologischen Herzschlag auftreten werden.<sup>16</sup>

Unser Interesse gilt nach diesen Erkenntnissen natürlich den Vorgängen und Zusammenhängen, die hierbei in den Herzmuskelzellen ablaufen. Im nächsten Kapitel sollen deshalb die Daten, die mittels proteinanalytischer Methodik erstellt wurden, interpretiert und diskutiert werden.

### **5.6. Western Blot**

Aufgrund der vorhergegangenen Genotypisierung der Mäusezucht wurde die Expression des  $\beta 1$ -Integrins bei Cre-Tieren, sowie ein Ausbleiben der  $\beta 1$ -Integrin Expression bei den konditionalen Knock Out Tieren erwartet.<sup>29</sup>

Auf der Proteinebene konnte dies bestätigt werden, denn unsere proteinanalytischen Ergebnisse zeigten eine gewisse Menge an  $\beta 1$ -Integrin bei den scheinoperierten Cre-Tieren und eine kaum vorhandene Menge an  $\beta 1$ -Integrin bei allen Knock Out Tieren. Der erfolgreiche konditionale Knock Out des  $\beta 1$ -Integrins wurde somit bewiesen.

Interessanterweise stieg die Menge an  $\beta 1$ -Integrin bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding zwei und sieben Tage postoperativ stark an. Mechanischer Wandstress, ausgelöst durch hämodynamische Druckbelastung, führt also zur Hochregulation der  $\beta 1$ -Integrin Expression. Diese Tatsache und die Beobachtung, dass Tiere ohne  $\beta 1$ -Integrin Expression keine Hypertrophie entwickelten, beweist wiederum die wesentliche Rolle, die das  $\beta 1$ -Integrin durch die Verzahnung von Extrazellulärmatrix und zellinternen Signalwegen im Hypertrophieprozess des druckbelasteten Myokards einnimmt.

Die Vermutung, dass das  $\beta 1$ -Integrin hierbei eine wesentliche Rolle spielt, wurde ja schon von einigen Autoren durch ihre Versuche geäußert und konnte nun bei Mäusen in vivo bewiesen werden. Ross konnte beispielsweise an kultivierten Rattenkardiomyozyten nachweisen, dass eine Adenovirus vermittelte Überexpression des  $\beta 1$ -Integrins die Expression zellulärer hypertropher Signalmarker wie ANF erhöhte und zu erhöhter Proteinsynthese führte. Außerdem vermochte die Inhibition des  $\beta 1$ -Integrins eine adrenerg stimulierte Hypertrophieantwort zu reduzieren, während die Überexpression des  $\beta 1$ -Integrins hierbei zu verstärkter Hypertrophieantwort führte.<sup>46</sup> Bei Pham reagierten diese Zellen auf  $\alpha 1$ -adrenerge Stimulation mit einem um 350 % erhöhten  $\beta 1$ D Proteinlevel und veränderter zellulärer Verteilung des Integrins. Außerdem hatte die adenovirusvermittelte Überexpression des  $\beta 1$ D-

## Diskussion

Integrins eine um 250 % erhöhte Zellgröße zur Folge und führte zur Induktion von molekularen Hypertrophie markern.<sup>47</sup> Die Versuche von Babbitt zeigten bei Mäusen sieben Tage nach transversalem Aortic Banding eine erhöhte Expression des  $\beta$ 1D-Integrins und Shais konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäuse waren nicht in der Lage auf hämodynamische Druckbelastung adäquat zu reagieren und starben zu einem hohen Prozentsatz.<sup>15,16</sup> Man könnte daraus schließen, dass der Anstieg der  $\beta$ 1-Integrinexpression einerseits die strukturelle Integrität der Herzmuskelzellen und andererseits eine stabile Interaktion von Extrazellulärmatrix und Zytoskelett, die bei hämodynamischer Druckbelastung absolut benötigt wird, sichern soll.<sup>15</sup> Das  $\beta$ 1-Integrin wird aber anscheinend nicht nur bei Druckbelastung benötigt, sondern auch für die Aufrechterhaltung der normalen, basalen Herzfunktion.<sup>16</sup>

Um weitere Klarheit über die Wirkungsweise der Integrine im Hypertrophieprozess zu erlangen, werden nun die proteinanalytischen Ergebnisse ausgewählter Proteine interpretiert und diskutiert. Diese Proteine besitzen eine wichtige Funktion in intrazellulären Signalkaskaden, die den Integrinen nachgeschaltet sind.

Von vorhergegangenen Versuchen wissen wir, dass die meisten Integrine nach Ligandenbindung über die  $\beta$ -Domäne und/oder die Bindung der zytoskelettären Proteine Talin und Paxillin den Signalweg über FAK aktivieren. FAK autophosphoryliert darauf an Tyr<sup>397</sup> und schafft dadurch eine Bindungsstelle für Src oder Fyn, woraufhin Src an der Stelle Tyr<sup>416</sup> phosphoryliert und in den aktiven Zustand übergeht. Src phosphoryliert nun wiederum FAK an der Stelle Tyr<sup>925</sup>. Durch einige Veränderungen in der Konformation kann der FAK/Src Komplex nun Cas binden und weitere Signalkaskaden aktivieren, wie z.B. die Erk-Kaskade.<sup>21,22,27,99</sup>

Allerdings wurden diese Erkenntnisse meistens an Zellkulturen gewonnen. Auch waren diese Zellen in der Regel keine Kardiomyozyten. An neonatalen Kardiomyozyten der Ratte konnten verschiedene Gruppen nachweisen, dass FAK in der Hypertrophieentstehung eine Rolle spielt. Durch eine starke Inhibition von FAK konnte an solchen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden, dass eine Sympathomimetika vermittelte Aktivierung von Erk 1/2 und anderer hypertropher Signalwege abgeschwächt wurde. Erk 1/2 scheint hier ziemlich am Ende der hypertrophen Signalkaskade zu stehen.<sup>46,53</sup> Am intakten Herzen konnte eine herzspezifische Integrinfunktion unterbunden werden, indem man in transgenen Mäusen den Inhibitor Tac $\beta$ 1 exprimieren ließ. Nach transversalem Aortic Banding führte eine geringe Inhibitorexpression zu reduzierter FAK und Erk Aktivierung.<sup>27</sup> Kuppuswamy zeigte am rechten Herzmuskel von Katzen, deren Pulmonalarterie gebandet wurde, eine Assoziation von

## Diskussion

$\alpha\beta3$ -Integrin, FAK und c-Src mit dem Zytoskelett. Dieser fokale Adhäsionskomplex kam allerdings nur im aktivierten Zustand von Integrinen vor.<sup>48</sup> Am gleichen Modell fand Laser nach hämodynamischer Druckbelastung des rechten Ventrikels eine zytoskelettäre Zunahme der Phosphorylierung von FAK an der Stelle Tyr<sup>397</sup> und Tyr<sup>925</sup> und von c-Src an der Stelle Tyr<sup>416</sup>, sowie eine verstärkte Aktivierung von Erk 1/2.<sup>17,19</sup> Franchini konnte bei Ratten nach Drucküberlastung mittels Aortic Banding eine Aktivierung von FAK, die Bildung eines Signalkomplexes aus FAK, c-Src, Grb2 und PI 3 Kinase, sowie eine Aktivierung von Erk 1/2 und Akt nachweisen.<sup>55</sup> An Mäusen, die ein transversales Aortic Banding erhielten, fand Babbitt heraus, dass schon 5 min nach dem Eingriff eine deutliche Aktivierung von Erk 1/2 und FAK vorhanden war, die über einen Zeitraum von 60 min weiter anstieg. Obwohl er allerdings nur einen Zeitraum von einer Stunde betrachtete, war Babbitt bisher der einzige, der die Aktivität von FAK und Erk in vivo bei Mäusen mit Aortic Banding untersuchte. Allerdings konnte er nicht feststellen, ob die Erk Aktivität FAK abhängig war oder nicht.<sup>15</sup>

In unseren Versuchen war nun aufgrund dieser Publikationen ein Aktivitätsanstieg von FAK<sup>925</sup>, Src<sup>416</sup> und Erk 1/2 erwartet worden, der mit einem Anstieg der Expression des  $\beta1$ -Integrins positiv korreliert. Erwartungsgemäß zeigte sich zwei Tage nach Aortic Banding bei den Cre-Tieren eine Zunahme der Expression des  $\beta1$ -Integrins, eine Zunahme der Aktivierung von FAK<sup>925</sup> und eine Zunahme der Src<sup>416</sup> Aktivität. Sieben Tage nach dem Eingriff nahm die Expression des  $\beta1$ -Integrins noch stärker zu, bei gleichbleibend hoher Aktivität von FAK<sup>925</sup> und Src<sup>416</sup>. Allerdings zeigte sich auch eine unerwartet hohe Src<sup>416</sup> Aktivität bei den Knock Out Tieren mit Scheinoperation und mit Aortic Banding zwei Tage nach dem Eingriff, während die Src<sup>416</sup> Aktivität sieben Tage nach Aortic Banding bei diesen Tieren wieder deutlich reduziert war. Unerwartet war außerdem die erhöhte FAK<sup>925</sup> Aktivität bei allen Tieren mit konditionalem  $\beta1$ -Integrin Knock Out, unabhängig von hämodynamischer Druckbelastung durch Aortic Banding.

Bei Versuchen, welche die Zellmigration von Fibroblasten und Nervenzellen beleuchten sollten, wurde herausgefunden, dass FAK auf Growth Faktor Stimulation durch seine N-terminale FERM Domäne mit Growth Faktor Rezeptoren und durch seine C-terminale FAT Domäne über Paxillin und Talin mit Integrinen interagiert und damit eine Brücke zu beiden Rezeptorsystemen schlägt.<sup>100,101</sup> Diese Interaktion könnte die hohe FAK<sup>925</sup> und Src<sup>416</sup> Aktivität auch bei den Knock Out Tieren erklären. Möglicherweise läuft die Hypertrophieentwicklung über den Synergismus von Integrinen und Growth Faktor Rezeptoren und über Signalwege aus beiden Systemen. Dieser Synergismus wird auch als Integrin/Growth Faktor Rezeptor „*crosstalk*“ bezeichnet. Es gibt mittlerweile viele Hinweise

## Diskussion

für einen „*crosstalk*“ zwischen diesen beiden wichtigen Rezeptorklassen. Obwohl beide Rezeptorklassen auch unabhängig voneinander agieren können, ist bei komplexen zellulären Vorgängen für Growth Faktor induzierte biologische Prozesse oftmals eine Ligandenbindung an Integrine notwendig. Solche komplexen Vorgänge wären beispielsweise Angiogenese, Embryogenese, Tumorwachstum und Metastasierung. Interessanterweise werden viele Signalwege und Effektorproteine, die von Integrinen aktiviert werden auch nach Growth Faktor Stimulation aktiviert. Nicht nur FAK, sondern auch die Src-Kinasen können dabei sowohl von Integrinen, als auch von Growth Faktor Rezeptoren aktiviert werden.<sup>28</sup>

Bei den Cre-Tieren könnten somit beide Systeme zusammen für die hohe Aktivität von FAK<sup>925</sup> und Src<sup>416</sup> bei Druckbelastung durch Aortic Banding verantwortlich sein. Fehlt das Integrin aber, wie bei den konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen, könnte der Organismus versuchen über Growth Faktor Rezeptoren oder andere Signalwege gegenzusteuern. Diese Mechanismen könnten zwar FAK<sup>397</sup>, Src<sup>416</sup> und damit FAK<sup>925</sup> aktivieren, was aber nicht zu einer suffizienten Hypertrophieentwicklung führt, wie aus unseren Ergebnissen hervorgeht. Die Hypertrophieentwicklung könnte demnach nicht nur auf synergistische Mechanismen zurückzuführen sein, sondern sie scheitert sogar, wenn ein Partner, in unserem Falle das  $\beta$ 1-Integrin, fehlt. Dass sowohl die FAK<sup>925</sup>, als auch die Src<sup>416</sup> Aktivität schon bei den scheinoperierten Knock Out Mäusen hochreguliert ist, könnte auch auf mögliche Kompensationsmechanismen zurückzuführen sein. Wie wir ja aus Shais Versuchen wissen, kommt es bei konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Tieren auch ohne Druckbelastung nach ca. sechs Monaten zu dilatativer Kardiomyopathie. Allein schon der normale Herzschlag stellt dabei chronische hämodynamische Anforderungen an das Myokard.<sup>16</sup> Der Kompensationsversuch scheint aber auch bei diesen Tieren zu scheitern, allerdings erst später als bei den Knock Out Mäusen, die durch Aortic Banding einer massiven hämodynamischen Druckbelastung ausgesetzt wurden.

Da bei dem konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out nur das  $\beta$ 1-Integrin ausgeschaltet wird und im Myokard neben dem vorherrschenden  $\beta$ 1-Integrin auch die Integrine  $\beta$ 3 und  $\beta$ 5 mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten, wie z.B. das Integrin  $\alpha$ v/ $\beta$ 5 oder  $\alpha$ v/ $\beta$ 3, exprimiert werden,<sup>17,24,27,37</sup> könnten diese anderen Integrine und Untereinheiten eine wichtige Steuerungsfunktion übernehmen. Dadurch ließe sich bei den Knock Out Tieren einerseits die erhöhte Aktivität von FAK<sup>925</sup> und Src<sup>416</sup>, sowie die geringe Src<sup>416</sup> Aktivität sieben Tage nach Aortic Banding erklären. Allerdings scheinen auch die übriggebliebenen Integrine und Integrinuntereinheiten bei einem  $\beta$ 1-Integrin Mangel keine suffiziente

## Diskussion

Hypertrophieentwicklung ermöglichen zu können. Somit stellt sich die Frage, ob nicht auch ein Integrin/Integrin „*crossstalk*“ für die Hypertrophieentwicklung notwendig ist.

Die erhöhte Aktivität von FAK<sup>925</sup> könnte aber auch auf adrenerge Signalwege zurückzuführen sein, wie Pham herausfand. In seinen Versuchen mit kultivierten Kardiomyozyten hatte eine Stimulation der Zellen mit Phenylephrin eine schnelle und anhaltende Phosphorylation von FAK zur Folge.<sup>47</sup>

Für eine suffiziente Hypertrophieentwicklung sind wahrscheinlich auch noch andere Enzyme und Proteine notwendig, die von Integrinen abhängig sind und demzufolge bei einem Integrinmangel nicht aktiviert werden können. Man kennt momentan ca. zwanzig Enzyme, die direkt mit der intrazellulären Domäne der Integrine interagieren und es gibt wahrscheinlich noch viele mehr, die mit ihnen indirekt verbunden sind.<sup>102</sup> Ein Protein, welches eventuell für diese Anforderungen essentiell ist, wäre beispielsweise das Melusin. Melusin ist ein muskelspezifisches Protein, welches mit dem  $\beta$ 1-Integrin interagiert. Brancaccio konnte nachweisen, dass dessen Fehlen bei Mäusen mit Aortic Banding zu abnormalem kardialen „*Remodeling*“, zu dilatativer Kardiomyopathie und zu kontraktile Dysfunktion führte.<sup>14</sup>

Weitere Enzyme, die offensichtlich auch durch Integrine aktiviert werden können, sind die mitogen aktivierten Kinasen (MAP Kinasen), die sich in drei Hauptfamilien einteilen lassen: in die extrazellulär regulierten Kinasen (Erk), die c-Jun N-terminalen Kinasen (Jnk) und die P38 MAP Kinasen. Die beiden letzten Hauptfamilien gelten als sogenannte „*stress responsive*“ MAP Kinasen, da sie auch durch Stresszustände wie Ischämie und Azidose aktiviert werden können und nicht nur durch anabole Stimuli oder Agonisten. Diese MAP Kinasen sind eine wichtige Verbindung zwischen extrazellulären Stimuli und dem Zellkern, da sie multiple Transkriptionsfaktoren regulieren. Sie stehen deshalb im Verdacht eine entscheidende Rolle im Hypertrophieprozess zu spielen.<sup>11</sup> Interessanterweise konnte eine Überexpression der MAP Kinase Phosphatase 1 (MPK-1), welche die Signalwege aller drei Subfamilien blockiert, nicht nur Agonisten induzierte Hypertrophie in vitro, sondern auch Hypertrophie, die durch hämodynamische Drucküberlastung hervorgerufen wurde, in vivo reduzieren.<sup>103</sup> Sudgen und Mitarbeiter berichteten, dass die Depletion von Erk 1/2 mit Antisense Oligonucleotiden oder die pharmakologische Inhibition von MEK 1/2, eine Phenylephrin induzierte Hypertrophie in kultivierten Rattenkardiomyozyten abzuschwächen vermochte.<sup>104,105</sup> MEK ist dabei eine MAP Kinase, die Erk 1/2 aber nicht Jnk oder die P38 MAP Kinase aktiviert. Die Überexpression dieser Kinase in Mäusen führte bei Bueno zu kardialer Hypertrophie.<sup>106</sup> Auch Jnk und P38 stehen im Verdacht bei der kardialen

## Diskussion

Hypertrophieentwicklung beteiligt zu sein.<sup>11</sup> Auf Jnk soll hier allerdings nicht näher eingegangen werden. Die wichtigsten Aktivatoren der P38 MAP Kinase sind MKK3 und MKK6, welche in vitro eine Hypertrophie von Kardiomyozyten und die Freisetzung von ANF auslösten.<sup>107</sup> Wie bei den anderen MAP Kinase Subfamilien konnte eine erhöhte Aktivität der P38 MAP Kinase sowohl durch hämodynamische Drucküberlastung, als auch durch Phenylephrin hervorgerufen werden. Clerk verwendete für seine Versuche Kardiomyozyten der Ratte und Takeishi isolierte Meerschweinchenherzen.<sup>104,108</sup> Interessanterweise phosphoryliert die P38 MAP Kinase auch einige Transkriptionsfaktoren wie MEF2 und NFAT3. Diese sind offensichtlich in die Genexpression bei Hypertrophieprozessen involviert.<sup>11</sup>

Aufgrund dieser Datenlage und der Erkenntnis, dass Erk 1/2 in der Hypertrophieentstehung des Herzens eine entscheidende Rolle spielt und dem Wissen, dass auch Integrine Erk 1/2 aktivieren können, erwarteten wir auch bei Erk 1/2 eine Zunahme der Aktivität, die mit erhöhter Expression des  $\beta$ 1-Integrins und kardialer Hypertrophie positiv korreliert.

Unsere Ergebnisse ergaben den Erwartungen nahezu entsprechend bei den Cre-Tieren eine leichte Zunahme der Aktivität von Erk 1/2 zwei Tage nach Aortic Banding und eine starke Zunahme sieben Tage nach Aortic Banding, verglichen mit scheinoperierten Cre-Tieren. Dass Integrine, in unserem Fall das  $\beta$ 1-Integrin, Erk 1/2 über verschiedene Zwischenstationen aktivieren können, scheint sich somit zu bestätigen. Dies wird weiterhin dadurch bekräftigt, dass weder scheinoperierte Knock Out Tiere, noch Knock Out Tiere mit Aortic Banding nach einem postoperativen Zeitpunkt von zwei Tagen, erhöhte Erk 1/2 Aktivität zeigten. Die Tatsache, dass Cre-Tiere zwei Tage nach Aortic Banding im Gegensatz zu den Knock Out Tieren auch eine gewisse Hypertrophie aufwiesen, beweist außerdem, dass Erk 1/2 bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie eine entscheidende Bedeutung besitzt.

Sieben Tage nach Aortic Banding ist allerdings der Aktivitätsgrad bei den Cre-Tieren und den Knock Out Tieren nahezu gleich hoch. Da Erk 1/2 nicht nur über Integrine, sondern insbesondere auch über Growth Faktor Rezeptoren reguliert wird, drängt sich der Verdacht auf, dass die Erk 1/2 Aktivierung zu einem frühen Zeitpunkt nach hämodynamischer Druckbelastung hauptsächlich integrinabhängig ist, während zu einem späteren Zeitpunkt Growth Faktor Rezeptor Signalkaskaden alleine für die Aktivierung von Erk 1/2 sorgen könnten. Die Tatsache, dass Knock Out Tiere sieben Tage nach Aortic Banding zwar erhöhte Erk 1/2 Aktivität zeigten, aber keine Hypertrophie entwickelten, gibt weiterhin Hinweise, dass für die Entstehung einer suffizienten Hypertrophie möglicherweise ein Integrin/Growth Faktor Rezeptor „*crosstalk*“ notwendig ist. Vielleicht hätte diese verspätete Erhöhung des

## Diskussion

Erk 1/2 Spiegels doch noch Hypertrophieeffekte zur Folge gehabt, die wir aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraumes nicht mehr registrieren konnten. Allerdings käme ein etwaiges Einsetzen der Hypertrophie zu diesem Zeitpunkt aufgrund der hohen Frühmortalität für die meisten Tiere wohl eher zu spät, um die hämodynamische Druckbelastung noch aufzufangen.

Die Erk Aktivierung durch Integrine geschieht wahrscheinlich über zwei Signalwege: Einerseits über den FAK/Src Signalweg und andererseits FAK unabhängig über den Src/Shc Signalweg. Der FAK/Src Signalweg wird dabei von den meisten, oder vielleicht sogar allen Integrinen durch den zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit aktiviert. Der Src/Shc Signalweg dagegen wird von einigen Integrinen durch das transmembranöse Segment ihrer  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert. Für eine effiziente Aktivierung von Erk müssen offensichtlich beide Signalwege aktiviert sein, was Versuche ergaben, bei denen durch Mutationen die Aktivierung jeweils einer der beiden Signalwege unterbunden wurde.<sup>21,22,109</sup> Es scheint so, als würde der  $\alpha$ -Untereinheit abhängige Signalweg die Aktivität von Erk erhöhen können, wohingegen der  $\beta$ -Untereinheit abhängige Signalweg die Erk Aktivität aufrechterhält und den Übertritt von Erk in den Zellkern kontrolliert.<sup>22</sup> Diese Beobachtungen wurden bisher aber noch nicht am Mäuseherzen in vivo nachgewiesen. Möglicherweise sind diese Erkenntnisse aber auch die Erklärung dafür, warum es bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding nach sieben Tagen zwar zu erhöhter Erk 1/2 Aktivität kommt, aber nicht zu Herzmuskelhypertrophie. Man müsste allerdings aufgrund der Kenntnisse über die Aktivierung von Erk 1/2 durch die Integrinsignalkaskade erwarten, dass die Erk 1/2 Aktivität auch positiv mit der Fak<sup>925</sup> und der Src<sup>416</sup> Aktivität korreliert. Auch hier sind eventuell noch mehr Vermittlerenzyme involviert, welche durch den  $\beta$ 1-Integrin Mangel nicht aktiviert werden können oder instabil sind.

Es erscheint demnach möglich, dass die Signalkaskade, die vom Integrin ausgehend über FAK und Src zur Aktivierung von Erk führen soll, durch den Integrinmangel erst stromabwärts von FAK und Src unterbrochen wird.

Eine weitere MAP Kinase, die im Verdacht steht kardiale Hypertrophie auslösen zu können, ist die P38 MAP Kinase.<sup>11,110</sup> Allerdings ist nicht eindeutig geklärt, ob sie durch Integrine aktivierbar ist. Die Vermutung, dass Integrine in der Lage sind die P38 MAP Kinase zu aktivieren, wurde beispielsweise von Ivaska geäußert, die an Zellkulturen zeigen konnte, dass das  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 Integrin die P38a Isoform aktivierte und spezifische P38 Inhibitoren die Hochregulation der Transkription von Kollagenen blockierten. Mit ihren Versuchen

## Diskussion

konnte sie Cdc42, MKK3 und MKK4 als mögliche Effektoren in dieser Signalkaskade identifizieren.<sup>111</sup>

In unseren Experimenten fanden wir bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding sowohl nach zwei als auch nach sieben Tagen eine starke Zunahme der Aktivität der P 38 MAP Kinase im Vergleich mit den scheinoperierten Cre-Tieren. Diese Zunahme korrelierte dabei positiv mit der zunehmenden Expression des  $\beta$ 1-Integrins und der kardialen Hypertrophie. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die P38 MAP Kinase wahrscheinlich auch über Integrinsignalwege aktiviert werden kann und einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung der kardialen Hypertrophie hat. Ein weiterer Beleg dafür ist die Tatsache, dass zwei Tage nach Aortic Banding konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäuse eine reduzierte Aktivität der P38 MAP Kinase und eine reduzierte kardiale Hypertrophie zeigten, verglichen mit Cre-Tieren.

Bei den Knock Out Mäusen mit Scheinoperation und bei den Knock Out Mäusen mit Aortic Banding war allerdings zwei Tage postoperativ eine gering erhöhte Aktivität der P38 MAP Kinase zu verzeichnen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die P38 MAP Kinase zu den „*stress responsive*“ MAP Kinasen zählt und auch durch Ischämie oder Azidose aktiviert werden kann. Ischämie und Azidose wären bei den Herzfehlern, die diese Knock Out Tiere aufweisen, nichts ungewöhnliches. Wie bei Erk 1/2 könnte die erhöhte P38 MAP Kinase Aktivität bei den Knock Out Tieren sieben Tage nach Aortic Banding durch Growth Faktor Rezeptor Signalkaskaden bedingt sein. Es stellt sich auch hier die Frage, ob diese Aktivierung ab diesem Zeitpunkt noch zu einer effizienten Hypertrophie führen könnte. Außerdem sind hier wahrscheinlich wiederum viele andere bekannte und noch unbekannte Mechanismen involviert.

Wir untersuchten ferner noch die inaktivierten Formen der MAP Kinasen Erk und P38, die in unseren Versuchen bei allen Gruppen erwartungsgemäß unverändert blieben. Für die intrazelluläre Signalübertragung im adaptiven Hypertrophieprozess spielen bei diesen Enzymen offensichtlich nur die phosphorylierten Formen eine Rolle.

Das Hormon ANP wurde untersucht, da es heutzutage sowohl im klinischen Gebrauch, als auch in der experimentellen Forschung als Marker für die Hypertrophieentstehung und Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Physiologischerweise führt Wandstress über die Dehnung der Vorhöfe zur Exkretion von ANP und dieses zur Flüssigkeitsausscheidung über die Niere. Mit zunehmender Herzinsuffizienz steigt der Hormonspiegel dabei an.<sup>2,6</sup>

In unseren Versuchen ergab sich eine gering erhöhte Expression des ANP bei den Cre-Tieren zwei Tage nach Aortic Banding und eine starke Expression sieben Tage nach Aortic Banding.

## Diskussion

Dieses Ergebnis passt einerseits zu der schon beschriebenen Hypertrophieentwicklung dieser Tiere und andererseits zu den Ergebnissen anderer Autoren. Durch Northern Blot Analyse fand Babbitt beispielsweise bei Mäusen sieben Tage nach Aortic Banding einen deutlichen Anstieg der ANF mRNA.<sup>15</sup>

Weiterhin führte der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out nach Aortic Banding zu erhöhten ANP Spiegel. Dies lag sicherlich am erhöhten Wandstress, dem diese Herzen aufgrund des Aortic Banding, der Dilatation und der schlechten Pumpfunktion ausgesetzt waren. Wegen der gestörten Kardiomyozytenmembranintegrität genügte bei den scheinoperierten Knock Out Tieren anscheinend schon der normale physiologische Herzschlag, um einen gewissen Wandstress auszulösen und die ANP Expression zu steigern. Auch Baudoin, welcher bei Mäusen erstmals das  $\beta$ 1D-Integrin in allen Geweben ausschaltete, fand bei diesen Tieren erhöhte ANP mRNA Spiegel.<sup>43</sup>

Schließlich zeigte uns die gleichbleibende Menge an GAPDH, welches als Ladekontrolle diente, an, dass bei allen Gruppen eine nahezu konstante Menge an Proteinen in die Geltaschen geladen wurde. Dieser Umstand schließt Fehler in der Proteinlademenge aus und beweist die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Die Signalwege im Herzen die zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophieentwicklung führen, sind alle sehr komplex. Es gilt als sicher, dass viele verschiedene Signalwege ineinander übergreifen. Auch der Integrinsignalweg ist mit vielen anderen Signalwegen, die teilweise noch unerforscht sind, verknüpft. Aus unseren Daten und in Zusammenschau mit in der Arbeit vorgestellten Ergebnissen anderer Autoren lassen sich dennoch einige Schlussfolgerungen bezüglich der  $\beta$ 1-Integrin Signalkaskaden ziehen.

Hämodynamische Druckbelastung, ausgelöst durch transversales Aortic Banding, führt zu erhöhtem Wandstress. Dieser führt bei den Mäusen im Verlauf von zwei bis sieben Tagen zu einer erhöhten Expression des  $\beta$ 1-Integrins, welches Extrazellulärmatrix und Zytoskelett miteinander verbindet. Hierdurch wird einerseits die Integrität der Kardiomyozyten sichergestellt und andererseits werden stabile Interaktionen zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett gewährleistet. Diese Interaktionen geschehen über verschiedene intrazelluläre Signalwege. Dabei spielt offensichtlich eine Komplexbildung aus dem  $\beta$ 1-Integrin, aus den Tyrosinkinase FAK und Src und aus anderen Enzymen, beziehungsweise Adapterproteinen eine wichtige Rolle. Dieser Komplex kann schließlich im „*crosstalk*“ mit anderen Signalwegen, hauptsächlich mit Growth Faktor Rezeptor abhängigen Signalkaskaden die Schlüsselenzyme Erk 1/2 und P38 MAP Kinase phosphorylieren. Diese MAP Kinasen treten

in den Zellkern über und aktivieren Transkriptionsfaktoren, die dazu führen, dass Gene abgelesen werden die an myokardialer Hypertrophie beteiligt sind.

Fehlt das im Herzen dominierende  $\beta 1$ -Integrin, können diese Schlüsselenzyme anfangs nicht ausreichend aktiviert werden und die Hypertrophie bleibt aus. Außerdem scheint bei einem  $\beta 1$ -Integrinmangel weder eine stabile Interaktion zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett, noch eine ausreichende Kardiomyozytenintegrität möglich zu sein. Weitere Signalwege, insbesondere über Growth Faktor Rezeptoren und andere Integrine, können bei Fehlen des  $\beta 1$ -Integrins anscheinend zwar die Aktivität von FAK und Src erhöhen, sind aber offensichtlich nicht in der Lage für eine suffiziente Hypertrophieentwicklung zu sorgen. Die essentielle Funktion des  $\beta 1$ -Integrins in der Hypertrophieentwicklung ist somit zweifelsfrei bewiesen. Folgende Überlegungen könnten weiterhin die herausragende Rolle des  $\beta 1$ -Integrins erklären: Für eine effiziente Signalverarbeitung in der Integrinkaskade sind noch andere Proteine, wie beispielsweise das Melusin nötig, die ohne  $\beta 1$ -Integrin nicht aktiviert werden können. Möglich ist auch, dass das  $\beta 1$ -Integrin für Konformationsänderungen oder für die Stabilität des FAK/Src Komplexes und damit für die Bindung weiterer entscheidender Enzyme gebraucht wird. Vielleicht wird auch die Signalübertragung im Hypertrophieprozess bei einem  $\beta 1$ -Integrinmangel stromabwärts von FAK und Src unterbrochen. Auch hier sind vielleicht noch unbekannt Signalwege involviert.

### **5.7. Immunhistologie**

Um die zelluläre Verteilung und die Co-Lokalisation des  $\beta 1$ -Integrins und der Tyrosinkinase FAK und Src zu untersuchen, wurde die Immunhistologie eingesetzt. Da das  $\beta 1$ -Integrin ein transmembranöser Rezeptor ist, welcher ubiquitär vorkommt,<sup>17,19,22</sup> konnten wir das Integrin erwartungsgemäß bei den Cre-Tieren in der Zellwand der Kardiomyozyten nachweisen. Unter Druckbelastung zeigte sich passend zu den Ergebnissen der Proteinanalyse bei den Cre-Tieren eine ansteigende Fluoreszenzintensität des  $\beta 1$ -Integrinantikörpers in der Kardiomyozytenzellwand, beweisend für eine erhöhte  $\beta 1$ -Integrinexpression. Unsere Ergebnisse stimmen hierbei mit denen Babbitts überein, welcher in Herzmuskelzellen das  $\beta 1$ -Integrin der Zelloberfläche und den Disci Intercalares zuordnen konnte und sieben Tage nach Aortic Banding eine Fluoreszenzzunahme des  $\beta 1$ -Integrinantikörpers an beiden Orten beobachtete.<sup>15</sup> Dass das  $\beta 1$ -Integrin auch in den Disci Intercalares lokalisiert ist, wissen wir aus Belkins Versuchen.<sup>112</sup>

## Diskussion

In unseren Versuchen konnten wir weiterhin das  $\beta$ 1-Integrin in der Gefäßwand nachweisen. Auch hier stieg die Expression mit erhöhter Druckbelastung an. Da das hypertrophierende Myokard natürlich erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf zeigt, kommt es möglicherweise zu einem  $\beta$ 1-Integrin vermittelten Anstieg der Angiogenese. Dass viele verschiedene Integrine u.a. das  $\beta$ 1-Integrin auf die Angiogenese einwirken, ist bereits bekannt. Man weiß auch, dass sie in Wundheilungsprozessen eine Rolle spielen und in ischämischen Gewebereichen die Bildung neuer Gefäße induzieren können.<sup>30</sup> Außerdem betrifft der mechanische Wandstress durch Aortic Banding nicht nur die Kardiomyozyten isoliert, sondern sicherlich auch die Gefäße und das umgebende Gewebe.

Bei den  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Tieren konnte durch verminderte Fluoreszenz gezeigt werden, dass der konditionale Knock Out zu einer verminderten Expression des  $\beta$ 1-Integrins in der Zellwand der Herzmuskelzellen führte. In den Gefäßwänden konnte das  $\beta$ 1-Integrin nach wie vor dargestellt werden. Auch Shai gelang es, mit Hilfe der Immunhistologie nachzuweisen, dass der konditionale herzmuskelspezifische  $\beta$ 1-Integrin Knock Out eine verminderte Expression und abnorme Verteilung des  $\beta$ 1D-Integrins an der Kardiomyozytenzellwand, sowie eine gestörte Membranintegrität zur Folge hatte.<sup>16</sup>

Die Lokalisationen der aktivierten fokalen Adhäsionskinase (p-FAK) und der aktivierten Src-Kinase (p-Src) im Mäuseherzen wurden mit der Immunhistologie bisher noch nicht untersucht. Aufgrund des bekannten Zusammenspiels der beiden Tyrosinkinasen mit dem  $\beta$ 1-Integrin in anderen Geweben<sup>22</sup> gingen wir auch im Herzgewebe von einer Co-Lokalisation der Kinasen mit dem Integrin aus.

P-FAK und p-Src fanden sich dabei der Vermutung entsprechend in der kardiomyozytären Zytoplasmamembran, in der wir ja das  $\beta$ 1-Integrin besonders nachweisen konnten. Aufgrund der Ergebnisse von Belkin und Babbitt bezüglich der  $\beta$ 1D-Integrin Isoform,<sup>15,112</sup> überrascht es auch nicht weiter, dass in den Disci Intercalares eine erhöhte p-FAK und p-Src Aktivität zu verzeichnen war. Außerdem stellen diese Bereiche die Belastungszonen dar, die hauptsächlich mechanischen Wandstress verkraften und verarbeiten müssen. Die mutmaßlichen Gründe, warum sich nicht nur bei Cre-Tieren mit Aortic Banding, sondern auch bei den Knock Out Tieren eine erhöhte p-FAK und p-Src Aktivität zeigte, wurden bereits im vorhergehenden Kapitel diskutiert.

Da wir das  $\beta$ 1-Integrin auch in Gefäßwänden nachweisen konnten, passt hier die gleichzeitige Lokalisation von p-FAK und p-Src mit dem  $\beta$ 1-Integrin auch gut ins Bild. Natürlich führte der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out wegen seiner Herzmuskelzellenspezifität zu keinerlei

## Diskussion

Änderung der  $\beta$ 1-Integrinexpression oder der Aktivität der beiden Tyrosinkinasen in den Gefäßwänden.

Allerdings fanden wir auch eine erhöhte Fluoreszenz der p-FAK und p-Src Antikörper im Bereich der Zellkernmembran. Diese Tatsache könnte folgende zwei Ursachen haben: Entweder handelt es sich hier um eine Kreuzreaktion der p-FAK und p-Src Antikörper mit Zellkernmembranbestandteilen, oder aber FAK und Src besitzen weitergehende noch unbekannte Aufgaben auch in der Übermittlung von Signalen aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Diese Ergebnisse beweisen einerseits wiederum den erfolgreichen herzmuskelspezifischen konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out und bestätigen andererseits das Ergebnis des Western Blots. Weiterhin konnte mit dieser Methode die Co-Lokalisation des  $\beta$ 1-Integrin mit den aktivierten Tyrosinkinasen p-FAK und p-Src im Herzgewebe gezeigt werden.

Obwohl sich die Immunhistologie zur Lokalisationsbestimmung bestens eignet, ist die Proteinanalyse mittels Western Blot zur Beobachtung der Expressionsstärke doch das bessere Verfahren. Der Western Blot stellt dabei die standardisiertere Methode dar, die seit Jahrzehnten in unzähligen Laboratorien weltweit routinemäßig eingesetzt wird. Das immunhistologische Verfahren ist dagegen eine relativ neue Methode, die auch deutlich schwieriger zu standardisieren ist. Passende Antikörper für diese Methode zu finden, ist im Vergleich mit dem Western Blot außerdem noch schwieriger. Es zeigte sich ferner, dass nicht alle Antikörper die für den Western Blot zu gebrauchen waren, auch in der Immunhistologie funktionierten. Die Behandlung der Proben beim Western Blot mit den verschiedenen Substanzen, wie z.B. SDS, könnte weitere Bindungsstellen geöffnet haben, die am relativ intakten Gewebe bei der Immunhistologie nicht so einfach zugänglich sind. Wie auch beim Western Blot sollten bei diesem Verfahren mehrere Kontrolldurchgänge das Auftreten von Fehlern vermeiden. Eine generelles Problem, das nicht nur für die Immunhistologie, sondern für alle Methoden galt, war auf die hohe Mortalitätsrate der Knock Out Tiere mit Aortic Banding zurückzuführen. Da sieben Tage nach Aortic Banding nur noch sehr wenige Knock Out Tiere am Leben waren, gelang es uns nicht mehr, ausreichend Gewebe für die Immunhistologie zu gewinnen. Aus diesem Grunde konnten hier leider keine Ergebnisse dieser Gruppe gezeigt werden.

## 5.8. Ausblick

Wie schon beschrieben, stellt die Hypertrophie des Herzens einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar. In unseren Versuchen konnte zweifelsfrei belegt werden, dass das  $\beta$ 1-Integrin in der Entwicklung dieser Hypertrophie eine sehr große Bedeutung besitzt und ein Mangel daran die Entwicklung der kardialen Hypertrophie verhindert. Möglicherweise könnten diese Erkenntnisse in Zukunft zu Therapien führen, die das Auftreten dieser Hypertrophie oder deren Fortschreiten effektiv unterbinden. Mittlerweile sind ja schon einige Integrininhibitoren am Markt, die in der Onkologie zur Verminderung des Tumorwachstums oder in der Kardiologie zur Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzt werden.

Allerdings wäre wohl der Einsatz von Integrininhibitoren zur Therapie der kardialen Hypertrophieentwicklung im Frühstadium gefährlich, wie man an der hohen Mortalitätsrate unserer Knock Out Mäuse mit Aortic Banding sah. Möglicherweise müsste man dem Herzen erst eine gewisse kompensatorische Hypertrophieentwicklung zugestehen, um dann mit einem Integrininhibitor einzugreifen, bevor die Hypertrophie in eine manifeste Herzinsuffizienz übergeht. Eventuell müsste man auch die Dosis sorgfältig auftitrieren und im Verlauf genauestens überwachen. Allerdings würden bis zu einem Einsatz von Integrinrezeptorblockern zur Therapie von kardialer Hypertrophie und Insuffizienz wahrscheinlich sehr viele Jahre vergehen, da wir heutzutage noch weit von einem vollkommenen Verständnis der Zusammenhänge auf molekularer Ebene entfernt sind. Unsere Versuche legten den Verdacht nahe, dass hierbei ein Integrin/Growth Faktor Rezeptor „*crosstalk*“ involviert sein könnte. Dennoch ist bei diesem Thema sehr viel weitere Forschung nötig. Ein anderes Projekt unserer Arbeitsgruppe, bei dem in Mäusen mit Aortic Banding oder Herzinfarkt das  $\alpha$ v/ $\beta$ 5-Integrin durch eine Substanz inhibiert wird, die von subkutan implantierten *Mini Osmotic* Pumpen freigesetzt wird, könnte diesbezüglich weitere Erkenntnisse bringen.

## **6. Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung des  $\beta$ 1-Integrins bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Insuffizienz am konditionalen Knock Out Mausmodell untersucht werden.

Es wurden dazu Mäuse verwendet, bei denen mit Hilfe des Cre-LoxP Systems das  $\beta$ 1-Integrin herzmuskelspezifisch konditional ausgeschaltet wurde. Als Vergleichsgruppe dienten dabei Mäuse mit Expression des Enzyms Cre-Rekombinase, ohne Knock Out. Tiere beider Gruppen wurden entweder scheinoperiert, oder chronischer hämodynamischer Druckbelastung durch transversales Aortic Banding ausgesetzt. Sowohl zwei, als auch sieben Tage nach der Prozedur wurden die Tiere mit verschiedenen Methoden untersucht. Zunächst wurden die Überlebensraten ermittelt und die Tiere morphologisch, histologisch und echokardiographisch befundet.

Es zeigte sich im Vergleich mit Cre-Tieren, dass der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out im Herzmuskel im Verlauf von zwei bis sieben Tagen nach Aortic Banding zu einer erhöhten postoperativen Mortalität, zu einer Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie und zu einer Reduktion der Kontraktilität des Herzens führte. Scheinoperierte Knock Out Tiere zeigten dagegen im Vergleich zu scheinoperierten Cre-Tieren bezüglich dieser Parameter keinerlei Unterschiede.

Daraufhin wurden die Tiere auf der molekularen Ebene mit proteinanalytischen und immunhistologischen Verfahren weiter betrachtet. Hier führte die hämodynamische Druckbelastung im Verlauf von zwei bis sieben Tagen bei den Cre-Tieren zu erhöhter  $\beta$ 1-Integrinexpression. Im Gegensatz dazu fehlte die  $\beta$ 1-Integrinexpression bei den Knock Out Tieren fast vollständig. Im Verlauf von zwei bis sieben Tagen kam es weiterhin zu einer Erhöhung der FAK, Src, Erk 1/2 und P38 MAP Kinase Aktivität bei den Cre-Tieren mit Aortic Banding. Der konditionale  $\beta$ 1-Integrin Knock Out hatte zwei Tage nach Aortic Banding keine Aktivitätsverminderung von FAK und Src zur Folge. Sieben Tage nach Aortic Banding allerdings zeigte sich bei den Knock Out Tieren eine deutlich reduzierte Src-Aktivität, während die FAK-Aktivität unverändert hoch blieb. Im Bezug auf die MAP Kinasen Erk 1/2 und P38 ergab sich bei den Knock Out Tieren mit Aortic Banding ein deutlicher Aktivitätsverlust nach zwei Tagen, aber nicht nach sieben Tagen. Ferner war bei scheinoperierten Knock Out Tieren ein Anstieg der FAK und Src Aktivität, sowie eine gering erhöhte Aktivität der P38 MAP Kinase zu verzeichnen.

## Zusammenfassung

Immunhistologisch konnte das  $\beta$ 1-Integrin bei den Cre-Tieren sowohl in der Kardiomyozytenmembran, als auch im Gefäßendothel nachgewiesen werden, während es bei den konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out Mäusen aufgrund der Herzmuskelspezifität nur in der Gefäßwand vorhanden war. Erhöhte Fluoreszenz der FAK und Src Antikörper war sowohl bei den Cre-Tieren, als auch bei den Knock Out Tieren in „*Stresszonen*“, wie Kardiomyozytenmembran, Disci Intercalares und Gefäßendothel zu finden.

Es konnte somit bei Mäusen *in vivo* gezeigt werden, dass das  $\beta$ 1-Integrin bei der Hypertrophieentstehung des hämodynamisch druckbelasteten Myokards eine essentielle Bedeutung besitzt. Die Ergebnisse beweisen auf der Proteinebene den erfolgreichen herzmuskelspezifischen konditionalen  $\beta$ 1-Integrin Knock Out. Sie legen weiterhin die Vermutung nahe, dass zwar andere Signalwege eine erhöhte Aktivität von FAK und Src auslösen können, was aber bei einem Fehlen des  $\beta$ 1-Integrins nicht zu suffizienter Hypertrophieentwicklung führt. Das  $\beta$ 1-Integrin ist offensichtlich für die Aufrechterhaltung der Kardiomyozytenintegrität und für eine stabile Interaktion zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett unabdingbar. Außerdem ergibt sich der Verdacht, dass für eine effiziente kardiale Hypertrophieentwicklung ein Integrin/Growth Faktor Rezeptor „*crosstalk*“ mit den Schlüsselenzymen Erk 1/2 und P38 MAP Kinase notwendig ist, welche in den Zellkern übertreten und daraufhin Transkriptionsfaktoren aktivieren. Dennoch bedürfen die molekularen Mechanismen die hier stattfinden weiterhin intensiver Erforschung und Abklärung. In Zukunft könnte das Verständnis dieser Zusammenhänge vielleicht zu neuen Therapiekonzepten in der Behandlung der kardialen Hypertrophie und Insuffizienz führen. Die Idee dabei wäre, mit Integrininhibitoren das Fortschreiten einer Hypertrophie zu verhindern, bevor diese unweigerlich in eine Insuffizienz übergeht.

## 7. Literaturverzeichnis

1. <http://www.destatis.de>, Statistisches Bundesamt Deutschland.
2. Herold, G., *Innere Medizin*. 2003: p. 170ff.
3. Erdmann, E., *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 5. Auflage, Springer, 2000: p. 539ff.
4. <http://www.dgk.org>, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie.
5. Eriksson, H., *Heart failure: a growing public health problem*. J Intern Med, 1995. **237**(2): p. 135-41.
6. Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., *Innere Medizin*. 5. Auflage, Urban & Fischer, 2004: p. 210ff.
7. McMurray, J.J. and S. Stewart, *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure*. Heart, 2000. **83**(5): p. 596-602.
8. McKee, P.A., et al., *The natural history of congestive heart failure: the Framingham study*. N Engl J Med, 1971. **285**(26): p. 1441-6.
9. Swedberg, K., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2005. **26**(11): p. 1115-40.
10. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. Cell, 1999. **98**(5): p. 555-8.
11. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
12. Barki-Harrington, L. and H.A. Rockman, *Sensing heart stress*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 19-20.
13. Chien, K.R. and E.N. Olson, *Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH*. Cell, 2002. **110**(2): p. 153-62.
14. Brancaccio, M., et al., *Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 68-75.
15. Babbitt, C.J., et al., *Modulation of integrins and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle*. Histochem Cell Biol, 2002. **118**(6): p. 431-9.
16. Shai, S.Y., et al., *Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 458-64.
17. Laser, M., et al., *Integrin-dependent and -independent signaling during pressure overload cardiac hypertrophy*, in *The Hypertrophied Heart*, N. Takeda, M. Nagano, and N. Dhalla, Editors. 2000, Kluwer Academic Publisher: Boston. p. 143-164.
18. Laser, M., et al., *Integrin-mediated cytoskeletal assembly of signaling proteins in cardiac hypertrophy*. Circulation, 1999. **100**(18): p. I-269.
19. Laser, M., et al., *Integrin activation and focal complex formation in cardiac hypertrophy*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35624-30.
20. <http://www.bdbiosciences.com>, BD Biosciences.
21. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1028-32.
22. Giancotti, F.G. and G. Tarone, *Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 173-206.
23. Hescheler, J. and B.K. Fleischmann, *Integrins and cell structure: powerful determinants of heart development and heart function*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(4): p. 645-7.
24. van der Flier, A., et al., *A novel beta 1 integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 340-4.
25. Maitra, N., et al., *Expression of alpha and beta integrins during terminal differentiation of cardiomyocytes [In Process Citation]*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(4): p. 715-25.

## Literaturverzeichnis

26. Juliano, R. and S. Haskill, *Signal transduction from the extracellular matrix*. J Cell Biol, 1993. **120**(3): p. 577-585.
27. Ross, R.S. and T.K. Borg, *Integrins and the myocardium*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. 1112-9.
28. Eliceiri, B.P., *Integrin and growth factor receptor crosstalk*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1104-10.
29. Joner, M., *Integrinaktivierung und Formation des "fokalen Adhäsionskomplexes" im Hypertrophieprozess adulter Mäuseherzen*. <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2004/999/>, 2004(Dissertation).
30. Rupp, P.A. and C.D. Little, *Integrins in vascular development*. Circ Res, 2001. **89**(7): p. 566-72.
31. Bertrand, M.E., et al., *Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation*. Eur Heart J, 2002. **23**(23): p. 1809-40.
32. Adgey, A.A., *An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors*. Am Heart J, 1998. **135**(4): p. S43-55.
33. Karow, T., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2003: p. 199ff.
34. Burke, P.A., et al., *Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4263-72.
35. Smith, J.W., *Cilengitide Merck*. Curr Opin Investig Drugs, 2003. **4**(6): p. 741-5.
36. Mizejewski, G.J., *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. **222**(2): p. 124-38.
37. Zhidkova, N., A. Belkin, and R. Mayne, *Novel isoform of b1 integrin expressed in skeletal and cardiac muscle*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(1): p. 279-285.
38. Hornberger, L.K., et al., *Synthesis of extracellular matrix and adhesion through beta(1) integrins are critical for fetal ventricular myocyte proliferation*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 508-15.
39. Carver, W., et al., *Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart*. Journal Of Histochemistry And Cytochemistry, 1994. **42**(2): p. 167-75.
40. Carver, W., L. Terracio, and T.K. Borg, *Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart*. Anat Rec, 1993. **236**(3): p. 511-20.
41. Goldsmith, E.C., et al., *Integrin shedding as a mechanism of cellular adaptation during cardiac growth*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2227-34.
42. Fassler, R., et al., *Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts*. J Cell Biol, 1995. **128**(5): p. 979-88.
43. Baudoin, C., et al., *Knockout and knockin of the beta1 exon D define distinct roles for integrin splice variants in heart function and embryonic development*. Genes And Development, 1998. **12**(8): p. 1202-16.
44. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms*. Cardiol Clin, 2000. **18**(3): p. 435-42.
45. Heling, A., et al., *Increased expression of cytoskeletal, linkage, and extracellular proteins in failing human myocardium*. Circ Res, 2000. **86**(8): p. 846-53.
46. Ross, R.S., et al., *Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes*. Circulation Research, 1998. **82**(11): p. 1160-72.
47. Pham, C.G., et al., *Striated muscle-specific beta(1D)-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(6): p. H2916-26.
48. Kuppaswamy, D., et al., *Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4500-8.
49. Matsushita, T., et al., *Remodeling of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions at the border zone of rat myocardial infarcts*. Circ Res, 1999. **85**(11): p. 1046-55.

50. Nawata, J., et al., *Differential expression of alpha 1, alpha 3 and alpha 5 integrin subunits in acute and chronic stages of myocardial infarction in rats*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(2): p. 371-81.
51. Kawano, H., et al., *Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 273-9.
52. Frisch, S.M. and E. Ruoslahti, *Integrins and anoikis*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(5): p. 701-6.
53. Taylor, J.M., J.D. Rovin, and J.T. Parsons, *A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 19250-7.
54. Rozich, J.D., et al., *Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 485-99.
55. Franchini, K.G., et al., *Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart [In Process Citation]*. Circ Res, 2000. **87**(7): p. 558-65.
56. Sussman, M.A., et al., *Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 875-86.
57. Nagai, T., et al., *Beta3-integrin-mediated focal adhesion complex formation: adult cardiocytes embedded in three-dimensional polymer matrices*. Am J Cardiol, 1999. **83**(12A): p. 38H-43H.
58. Wall, R.J., *Transgenic livestock: progress and prospects for the future*. Theriogenology, 1996. **45**: p. 57-68.
59. Hanks, M., et al., *Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2*. Science, 1995. **269**(5224): p. 679-82.
60. Zou, Y.R., et al., *Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies*. Curr Biol, 1994. **4**(12): p. 1099-103.
61. Rajewsky, K., et al., *Conditional gene targeting*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 600-3.
62. Prella, K., N. Zink, and E. Wolf, *Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**(3): p. 169-86.
63. Fassler, R., et al., *Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin*. J Cell Sci, 1996. **109**(Pt 13): p. 2989-99.
64. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
65. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. J Mol Biol, 1981. **150**(4): p. 467-86.
66. Orban, P.C., D. Chui, and J.D. Marth, *Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 6861-5.
67. Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg, *A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons*. Cell, 1981. **25**(3): p. 729-36.
68. Guo, F., D.N. Gopaul, and G.D. van Duyne, *Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 40-6.
69. Marth, J.D., *Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 1999-2002.
70. Gordon, J.W., et al., *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7380-4.
71. Wall, R.J., *Pronuclear microinjection*. Cloning Stem Cells, 2001. **3**(4): p. 209-20.
72. Fassler, R., *Lentiviral transgene vectors*. EMBO Rep, 2004. **5**(1): p. 28-9.
73. Chen, J., S.W. Kubalak, and K.R. Chien, *Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis*. Development, 1998. **125**(10): p. 1943-9.
74. Chen, J., et al., *Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 1252-6.

## Literaturverzeichnis

75. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
76. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
77. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.
78. Gossler, A., et al., *Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 9065-9.
79. Brakebusch, C., et al., *Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta1 integrin expression on keratinocytes*. Embo J, 2000. **19**(15): p. 3990-4003.
80. Potocnik, A.J., C. Brakebusch, and R. Fassler, *Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 653-63.
81. Hirota, H., et al., *Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress*. Cell, 1999. **97**(2): p. 189-98.
82. Gutstein, D.E., et al., *Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43*. Circ Res, 2001. **88**(3): p. 333-9.
83. Fassler, R. and M. Meyer, *Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1896-908.
84. Mansour, S.L., et al., *Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7688-92.
85. Rockman, H.A., et al., *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(18): p. 8277-81.
86. Müller, J.G., et al., *Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy*. Science, 1998. **282**: p. 1007a (Technical Comment).
87. Choi, D.J., et al., *Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17223-9.
88. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
89. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
90. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
91. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Immunoblotting in the clinical laboratory*. J Clin Chem Clin Biochem, 1989. **27**(8): p. 495-501.
92. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**: p. 4350-4354.
93. <http://www.invitrogen.com>, Invitrogen Corporation.
94. <http://www.amersham.com>, Amersham Biosciences.
95. [http://www.leica-microsystems.com/Confocal\\_Microscopes](http://www.leica-microsystems.com/Confocal_Microscopes), Leica Microsystems.
96. Tarnavski, O., et al., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies*. Physiol Genomics, 2004. **16**(3): p. 349-60.
97. Collins, K.A., C.E. Korcarz, and R.M. Lang, *Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice*. Physiol Genomics, 2003. **13**(3): p. 227-39.

98. Pacher, P., et al., *Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(2): p. H533-41.
99. Polte, T.R. and S.K. Hanks, *Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(9): p. 5501-9.
100. Ivankovic-Dikic, I., et al., *Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(9): p. 574-581.
101. Sieg, D.J., et al., *FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(5): p. 249-56.
102. Brakebusch, C. and R. Fassler, *The integrin-actin connection, an eternal love affair*. *Embo J*, 2003. **22**(10): p. 2324-33.
103. Bueno, O.F., et al., *The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo*. *Circ Res*, 2001. **88**(1): p. 88-96.
104. Clerk, A., A. Michael, and P.H. Sugden, *Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy?* *J Cell Biol*, 1998. **142**(2): p. 523-35.
105. Glennon, P.E., et al., *Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes*. *Circ Res*, 1996. **78**(6): p. 954-61.
106. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. *Embo J*, 2000. **19**(23): p. 6341-50.
107. Wang, Y., et al., *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(4): p. 2161-8.
108. Takeishi, Y., et al., *Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(9): p. 1637-48.
109. Barberis, L., et al., *Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(47): p. 36532-40.
110. Kinugawa, K., et al., *Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(6): p. 1618-28.
111. Ivaska, J., et al., *Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(2): p. 401-16.
112. Belkin, A.M., et al., *Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(1-2): p. 211-26.

## Anhang

### Danksagung

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

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

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

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

Ich danke allen Personen unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Dr. M. Joner, Frau Dr. Rong Xue Wu, Frau C. Joha und Herrn Dr. A.Grimm für die hervorragende Zusammenarbeit.

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

## Anhang

### CURRICULUM VITAE

**Tobias Johannes Kupfer**

geboren am 10.10.1979 in Neumarkt i. d. OPf.

#### **Schule**

1986 – 1999

Grundschule und Gymnasium in Neumarkt i. d. OPf.  
Allgemeine Hochschulreife (Notendurchschnitt: 1,5)

#### **Studium**

10.1999 – 05.2006

Humanmedizin

Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

09.2001

Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)

08.2002

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: befriedigend)

04.2005

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)

05.2006

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut,  
Gesamtnote: 1,83)

06.2006

Approbation als Arzt

#### **Famulaturen**

03.2002

Innere Medizin, Klinikum Neumarkt i. d. OPf.

03.2003

Universitätsklinik für Allgemeinchirurgie, St. Johanns-Spital  
Salzburg

03.2004

Radiologie, Institut für Röntgendiagnostik Universität Würzburg

10.2004

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Praxis Dr. med. Albin Kupfer,  
Neumarkt i. d. OPf.

#### **Praktisches Jahr**

04.2005 – 08.2005

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

08.2005 – 11.2005

Innere Medizin, Universitätsklinikum Würzburg

12.2005 – 03.2006

Chirurgie, Universitätsspital Zürich

#### **Beruflicher Werdegang**

Seit 01.10.2006

Assistenzarzt an der Klinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

Würzburg, 19. Januar 2007



Tobias Johannes Kupfer