

**Aus der Medizinischen Poliklinik der  
Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. K. Wilms**

**Untersuchungen zur Beteiligung von p38 MAPK beim Remodelingprozeß nach  
Myokardinfarkt in vivo und bei der Fibronektinexpression in Rahmen der  
Neointima - Entstehung nach Angioplastie in vitro**

**Inaugural - Dissertation**

**Zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Marinela Gueorguieva Berova**

**aus Sofia**

**Würzburg, Juni 2004**

**Referentin:** Professor Dr. med. C. E. Angermann

**Koreferent:** Professor Dr. med. G. Ertl

**Dekan:** Professor Dr. med. S. Silbernagl

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2004**

**Die Promovendin ist Ärztin**

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite:</b>
1.0. Einleitung	1
1.1. Signaltransduktion: Definition und Bedeutung	1
1.2. Familie der MAPK	2
1.2.1. MAPK Stimuli	2
1.2.2. MAPK Subgruppen und Spezifität	3
1.3. P38 MAPK	4
1.3.1. P38 MAPK im kardiovaskulären System	4
2.0. Zielsetzung	6
2.1. Myokardinfarkt - Modell der Ratte	6
2.2. Restenose nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA)	6
3.0. Material und Methoden	7
3.1. Myokardinfarkt der Ratte <i>in vivo</i>	7
3.1.1. Versuchsaufbau	7
3.1.2. OP - Durchführung	7
3.1.3. Echokardiographie	8
3.1.4. Organentnahme	8
3.1.5. Klinische Parameter der Herzinsuffizienz	9
3.1.6. Proteinextraktion aus linkem Ventrikel	9
3.1.7. Bestimmung der Proteinkonzentration	10
3.1.8. Nicht-radioaktiver p38 MAPK Aktivitätsassay <i>in vivo</i>	10
3.1.9. WesternBlot	11
3.1.10. ProANP (1-30) ELISA	12
3.2. P38 MAPK vermittelte Fibronektinexpression <i>in vitro</i>	14
3.2.1. Primäre Zellkultur	14

3.2.2. Passagieren der Zellen und Vorbereitung der Versuchsreihen	15
3.2.3. TGF- $\beta$ Stimulation Assay	15
3.2.4. Proteinextraktion der <i>in vitro</i> Experimente	18
3.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	18
3.2.6. Western Blot	19
3.3. Statistik	19
4.0. Ergebnisse	20
4.1. Myokardinfarkt der Ratte <i>in vivo</i>	20
4.1.1. Mortalität	20
4.1.2. Infarktgrößenbestimmung	20
4.1.3. Echokardiographie	20
4.1.4. P38 MAPK Aktivität und ANP – Expression	24
4.2. P38 MAPK vermittelte Fibronectinexpression <i>in vitro</i>	31
5.0. Literaturübersicht und Diskussion	34
5.1. Myokardinfarkt der Ratte <i>in vivo</i>	34
5.1.1. Myokardinfarkt – Definition und Folgen	34
5.1.2. Die P38 MAPK Aktivierung beim akuten Myokardinfarkt: Ischämie, Wandspannung und neurohumoralen Faktoren	35
5.1.3. Die P38 MAPK Aktivierung beim akuten Myokardinfarkt: Zellprotektion, Hypertrophie und Apoptose	36
5.1.4. Die p38 MAPK Aktivierung nach akutem Myokardinfarkt: Chemotaxis und Extrazelluläre Matrix	37
5.1.5. ANP als Remodelingparameter	42
5.2. P38 MAPK vermittelte Fibronectinexpression <i>in vitro</i>	44
5.2.1. P38 MAPK in der Wand arterieller Gefäße	44
5.2.2. Restenose und Modulation der EZM -Zusammensetzung	45

5.2.3. Fibronectin und Auswirkung auf den Remodelingprozeß nach PTCA	47
5.2.4. Die Fibronectinstimulation und – expression	48
6.0. Zusammenfassung und Ausblick	51
7.0. Verwendete Abkürzungen	55
8.0. Literatur – Verzeichnis	57
Danksagung	
Lebenslauf	

**Meinen Eltern; L. A. Mintshev**

## **1. Einleitung**

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Arteriosklerose zu einer der führenden Zivilisationskrankheiten in den Industrieländern entwickelt (1). Die häufigsten klinischen Manifestationen der Arteriosklerose sind die koronare Herzerkrankung (KHK) und die arterielle Verschlusskrankheit (AVK). Die Progredienz dieser Erkrankungen führt zu lebensbedrohlichen Komplikationen, dem Myokardinfarkt, der akuten und chronischen Herzinsuffizienz, dem Herztod und Apoplex. Sie gehen mit einem erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko einher, sowie, in der chronischen Phase, mit einer deutlichen Verschlechterung der Lebensqualität.

Im Hinblick auf die Bedeutung dieser Erkrankungen ist das Erforschen der pathogenetischen und pathophysiologischen Vorgänge, die den Folgeerkrankungen der Arteriosklerose, etwa den zum Myokardinfarkt führenden Ereignis und der Neointimaentstehung nach perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA), zugrunde liegen, von großer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Aspekten der Signaltransduktion im Hinblick auf den Myokardinfarkt und die Neointimaentstehung nach PTA.

### **1.1. Signaltransduktion: Definition und Bedeutung**

Die Signaltransduktion ist definiert als die Weiterleitung der an der Zelloberfläche ankommenden Signale über enzymatische Kaskaden ins Zytoplasma und/oder in den Zellkern (2). Es kommt zu einer Antwort der Zelle auf die Stimuli in Form von einer Änderung des Genexpressionsmusters, sowie der Proteinbiosynthese.

Wichtige Stimuli der Signaltransduktion sind Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und Chemokine, neuroendokrine Faktoren und Wachstumsfaktoren (2). Diese sind Triggersubstanzen der Remodeling-Prozesse nach Myokardinfarkt und auch bei der Neointimaentstehung nach PTA (Restenose) beteiligt.

Es sind gegenwärtig über 6000 Signaltransduktionsmoleküle bekannt, die in komplexen, vielfach kommunizierenden Netzwerken verschaltet sind. Diese Moleküle lassen sich in verschiedene Familien gruppieren, eine davon ist die Gruppe der Mitogen Aktivierten Protein Kinasen (MAPK).

## **1.2. Familie der MAPK**

Die Signaltransduktion durch Mitogen Aktivierte Protein Kinasen (MAPK) besitzt im kardiologischen System große Bedeutung. Ihre Aktivierung erfolgt kaskadenartig durch übergeordnete Kinasen wie die MAPKK (MAPK Kinasen) und die MAPKKK (MAPK Kinase Kinasen) mittels Übertragung von Phospho-Gruppen. Die MAPKKK aktiviert die MAPKK durch Phosphorylierung eines Serinrestes in der Aktivierungsschleife. MAPKK wiederum aktiviert MAPK durch Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin in der Aktivierungsschleife (3-5). Aktivierte MAPK können sowohl in den Zellkern migrieren als auch im Zytosol ihr Signal weiter leiten. Als wichtige Substrate für die MAPK am Ende der Kettenreaktion dienen zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel ATF-2, MEF2, SRF, sowie weitere Kinasen, zum Beispiel MAPKAP2 und PRAK (4-7). MAPK können auch Heat Shock Proteine (HSP) aktivieren, wodurch ihnen eine modulierende Rolle für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität zukommt (8;9). Es gibt mehrere Isoformen, bzw. verwandte Subgruppen, auf den unterschiedlichen Stufen der Kinasekaskade. Sie sind vernetzt untereinander verschaltet und tragen zur Spezifität der Kinaseantwort auf unterschiedliche Stimuli bei (Abb. 1).

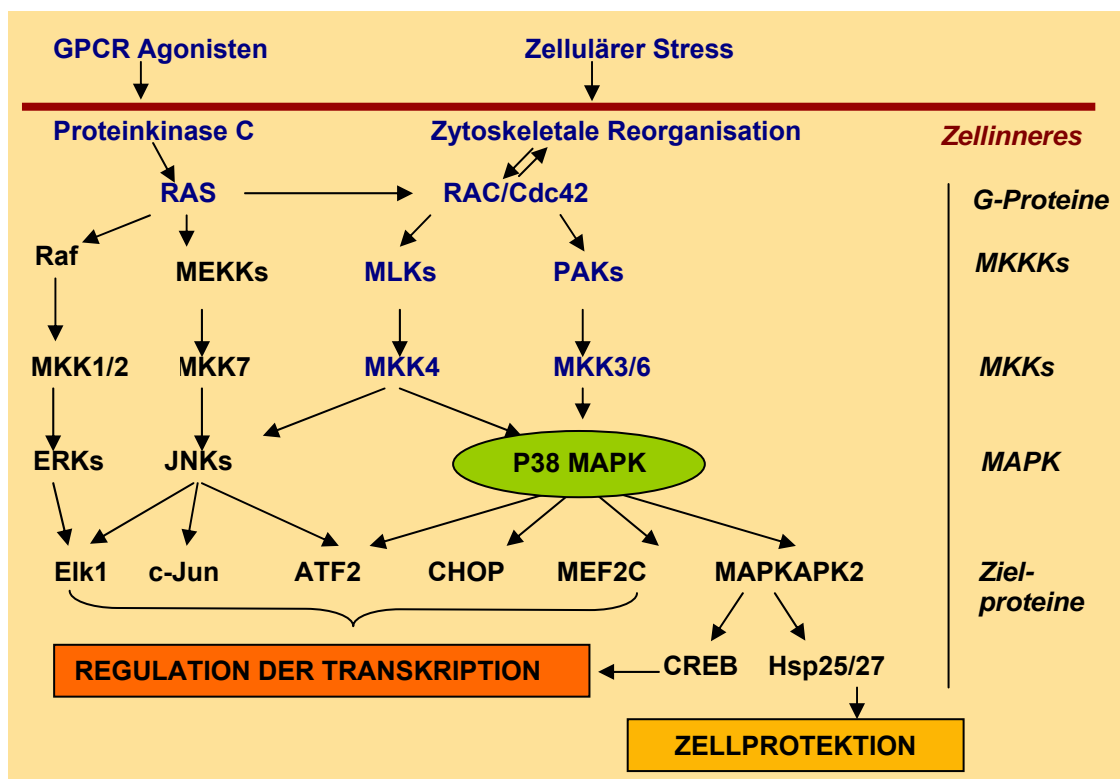
### **1.2.1. MAPK Stimuli**

Es sind zahlreiche Stimuli der MAPK beschrieben worden (3;10-13). Charakteristisch für die MAPK ist die Aktivierung durch zellschädigende Einwirkungen, wie z. B. osmotischen Stress, Bestrahlung, Ischämie, pH-Änderungen, mechanische Belastung und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Zusätzlich wird die MAPK Kaskade durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine stimuliert, was zu ihrer Beteiligung an komplexen Regulationsmechanismen wie Mitogenese, Differenzierung, Zellprotektion, Apoptose und Migration führt (3;4;7;14-18).



## 1.2.2. MAPK Subgruppen und Spezifität

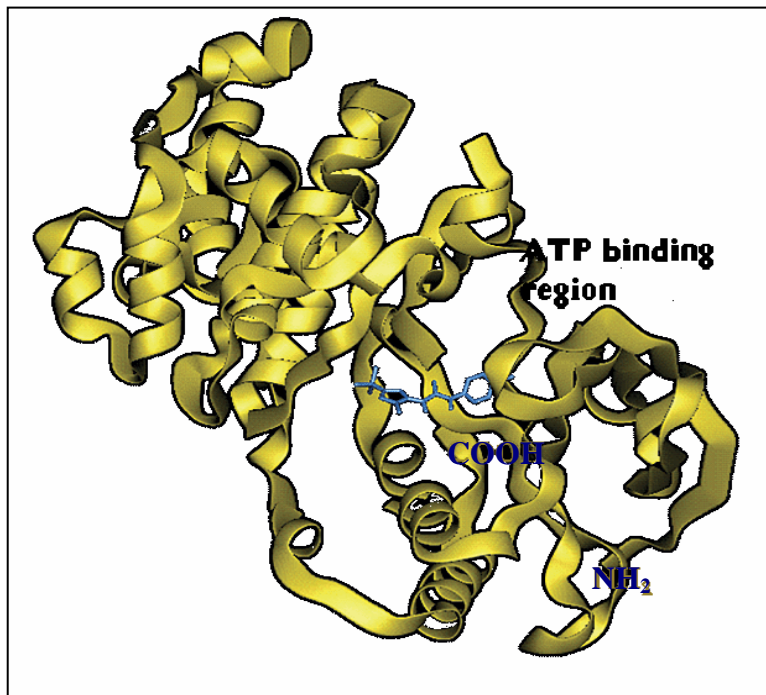
Bisher wurden drei große Gruppen, die zu der Familie der MAPK gehören, identifiziert. ERK (Extracellular Regulated Kinase), JNK (c-jun N-terminale Kinase) und p38 MAPK (3;9;12). Sie werden oft durch ähnliche Stimuli aktiviert, wobei die Selektivität der Antwort auf der Ebene der MAPKK moduliert wird, die weitgehend spezifisch die verschiedenen MAPK aktivieren. Manche der MAPKK können zwei der drei Gruppen stimulieren, was zu Kreuzreaktionen unter den verschiedenen Signalwegen führt und die Komplexität der Signaltransduktion widerspiegelt. Die ERK wird vor allem mit dem Zellwachstum und Differenzierung in Verbindung gebracht. Der JNK kommt eine Rolle bei der Zellprotektion, Apoptose und Differenzierung zu, während für p38 MAPK eine Beteiligung bei der Zytokinproduktion, Zellhypertrophie und Apoptose diskutiert wird. Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von p38 MAPK-Aktivität bei pathophysiologischen Prozessen im kardiovaskulären System, so daß diese im Folgenden näher ausgeführt wird.



**Abb. 1:** Stimuli und Signaltransduktionskaskade, sowie Vernetzung der MAPK Subgruppen. Vereinfachte Darstellung nach Sugden P. et al. (5)

### 1.3. P38 MAPK

P38 MAPK (Abb.2) ist ein 38kDa großes Protein der MAPK Familie, das durch Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation spezifisch aktiviert wird. Es wurden bislang 4 Isoformen dieses Proteins identifiziert - p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ . Sie unterscheiden sich durch ihr Verteilungsmuster in den Geweben, sowie durch ihre unterschiedlichen Auswirkungen nach Stimulation (6;12;19-21).



**Abb. 2:** P38 MAPK Tertiär-Struktur nach Regan et al. (22). Das Beispiel einer pharmakologischen Hemmung der p38 MAPK Aktivität durch Bindung in der ATP-Bindungsregion ist blau dargestellt.

#### 1.3.1. P38 MAPK im kardiovaskulären System

Im kardiovaskulären System werden vor allem die p38 $\alpha$  MAPK und die p38 $\beta$  MAPK Isoform exprimiert (3;5;10;23;24). Die bisherigen Untersuchungen bezüglich der Rolle der p38 MAPK sind noch unvollständig und zum Teil widersprüchlich (25) (siehe Abb. 3). Das erklärt sich vor allem aus der Tatsache, daß viele dieser Studien *in vitro* oder in *ex-vivo* Langendorff Präparationen durchgeführt wurden und dadurch

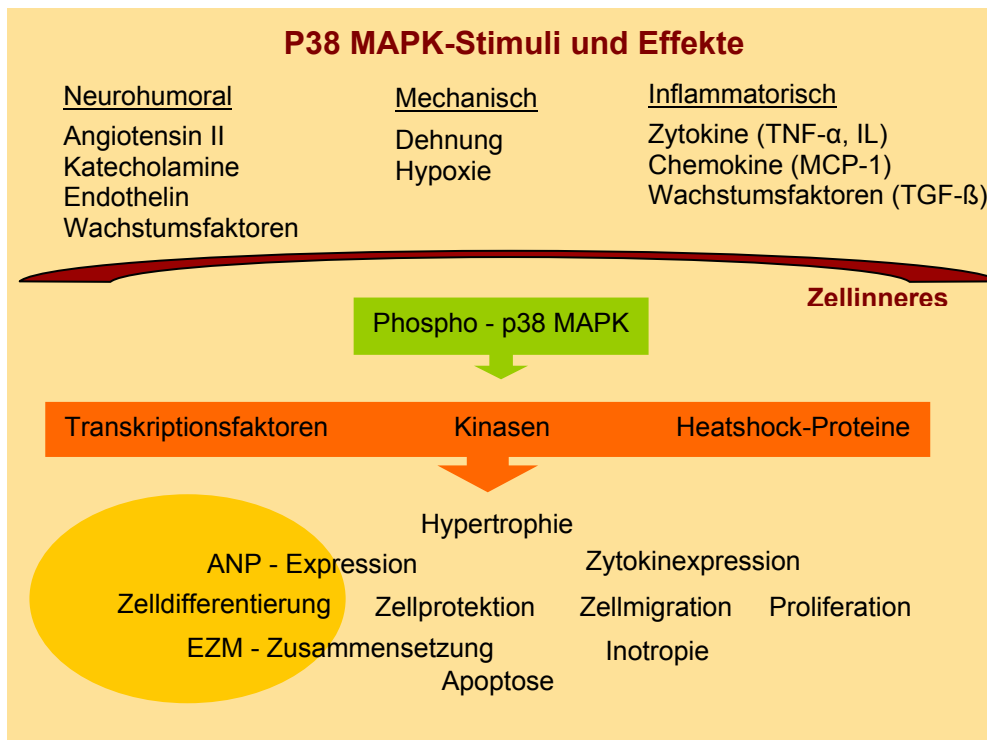
nur eingeschränkt auf die Komplexität der Signaltransduktion *in vivo* übertragbar sind.

#### **1.3.1.1. P38 MAPK im Myokard**

Für die Auswirkung der p38 MAPK Aktivierung in den Kardiomyozyten werden die Vermittlung von Zellhypertrophie und programmiertem Zelltod (Apoptose), sowie eine zellprotektive Wirkung nach ischämischem Stimulus diskutiert (12;13;26-30). Des Weiteren ist eine Beteiligung von p38 MAPK bei der Unterhaltung der chemotaktischen und inflammatorischen Vorgänge im Rahmen der Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie wahrscheinlich (14). Neuerdings wird auch eine wichtige Rolle von p38 MAPK bei der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix im Sinne einer Potenzierung der kardialen Fibrose diskutiert (31) (siehe Abb. 3). Die bisher einzige *in vivo* Langzeit-Studie zur Rolle von p38 MAPK im Rahmen des kardialen Remodelings bei einem Modell einer hypertensiven Herzerkrankung der Ratte zeigte eine deutliche Reduktion von Mortalität und Morbidität durch eine pharmakologische Hemmung der p38 MAPK-Aktivität (32).

#### **1.3.1.2. P38 MAPK in der arteriellen Gefäßwand**

Restenose ist eine erneute Einengung eines Gefäßabschnittes durch Neointimabildung, der zuvor mittels perkutaner transluminaler Angioplastie (PTA) aufgeweitet wurde. Die Bildung der Neointima als morphologisches Korrelat der Restenose ist bedingt durch eine Proliferation und Migration von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (Vascular Smooth Muscle Cells: VSMC), eine Ansammlung von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen und T-Zellen, sowie durch eine überschießende und in ihrer Zusammensetzung veränderte Extrazellulärmatrix-Bildung (72). Es konnte in zwei *in vivo* Untersuchungen gezeigt werden, daß eine pharmakologische Hemmung der p38 MAPK Aktivität zur einer Reduktion der Neointimabildung um etwa 30% führt (61; 100). P38 MAPK wurde bislang mit einer Reduktion der Zellmigration und Zellproliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur in Verbindung gebracht. Die Beteiligung der p38 MAPK bei der Modulation der extrazellulären Matrix nach PTA ist bisher nicht untersucht worden (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** P38 MAPK Stimulation und Effekte im kardiovaskulären System

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Charakterisierung der p38 MAPK-Beteiligung bei den Remodelingvorgängen nach Myokardinfarkt und im Rahmen der Restenosebildung leisten.

## **2. Zielsetzungen**

### **2.1. Myokardinfarkt-Modell der Ratte**

- Es sollte erstmalig *in vivo* untersucht werden, ob p38 MAPK nach Myokardinfarkt anhaltend (über 6 Wochen) aktiviert ist.
- Für den Fall einer Aktivierung sollte der zeitliche Verlauf des Aktivitätsgrades bestimmt werden.
- Es sollte anhand klinischer Parameter und dem Remodelingmarker ANP untersucht werden, ob ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der p38 MAPK Aktivität und der Entstehung einer Herzinsuffizienz besteht.

### **2.2. Restenose nach PTA**

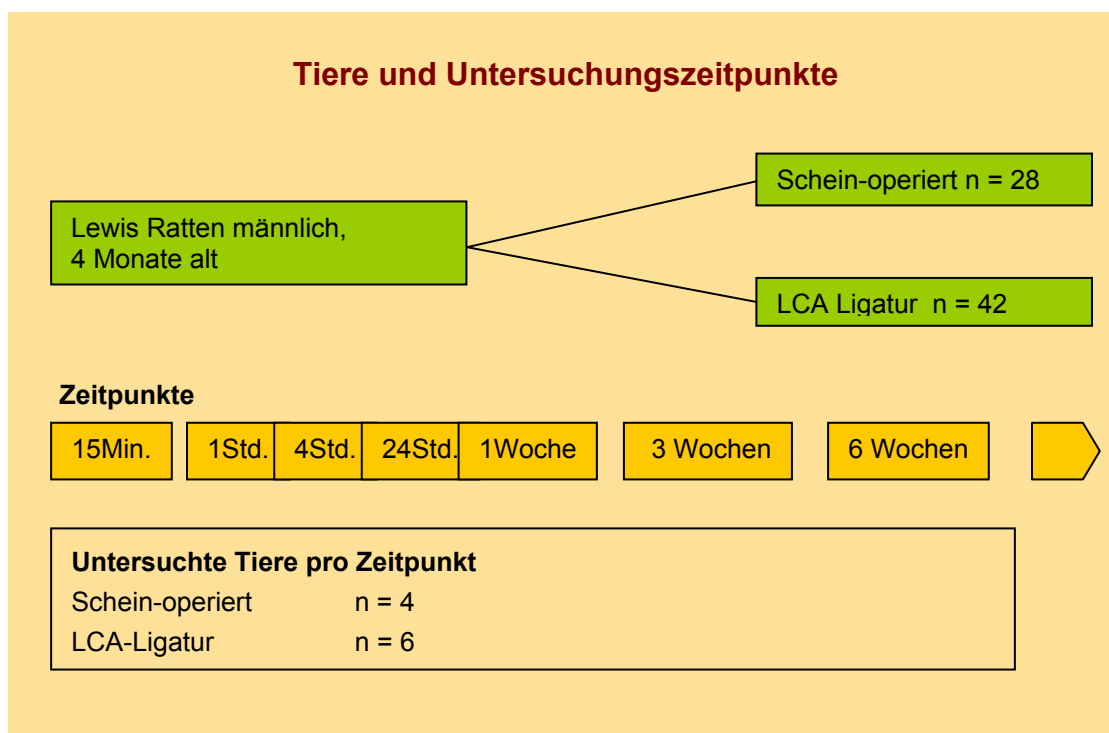
- Es sollte untersucht werden, ob p38 MAPK bei der Modulation der extrazellulären Matrix im Rahmen der Neointimaentstehung beteiligt ist. Dies sollte anhand einer *in vitro* Untersuchung der TGF- $\beta$  induzierten Fibronectin-Expression in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (primäre Zellkultur) erfolgen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Myokardinfarkt der Ratte *in vivo*

##### 3.1.1. Versuchsaufbau

Mittels Ligatur der linken Koronararterie (LCA) wurden Myokardinfarkte bei männlichen, 4 Monate alten Lewis Ratten erzeugt. Schein-operierte Ratten dienten als Kontrollgruppe. Die Infarktgröße wurde echokardiographisch, sowie bei Organentnahme visuell beurteilt. Bei der Organentnahme wurden die Tiere nach klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz untersucht. Die p38 MAPK-Aktivierung wurde mittels MAPK-Assay und im Western Blot nach 15 Minuten (Min.), 1, 4, 24 Stunden (Std.), sowie 1, 3 und 6 Wochen im linksventrikulären Myokard gemessen. Pro Zeitpunkt wurden 10 Tiere untersucht. Als Remodelingparameter wurde das atriale natriuretische Peptid (ANP) im Serum und im linksventrikulären Gewebe bestimmt (ELISA).



**Abb. 4:** Untersuchte Tiere und Zeitpunkte für die Organentnahme im Rahmen des verwendeten Myokardinfarktmodells.

### **3.1.2. Myokardinfarktmodell der Ratte**

Die Ratten wurden mittels Ketamin/Xylozine (70/6mg/kg intraperitoneal (i.p.)) anästhesiert und an einen kleinen Tierventilator (1ml/100g) angeschlossen. Unter sterilen Bedingungen wurde ein Hautschnitt im 4. interkostalen Raum durchgeführt und der linke Vorhof freigelegt. Das Perikard wurde oberhalb des linken Ventrikels und des linken Vorhofs eröffnet. Die linke Koronararterie (LCA) wurde ca 2mm unterhalb ihrer Abzweigung mittels nicht-resorbierbarem 5.0 Ethibond Faden und C-1 Nadel ligiert. Die Thorakotomie wurde mittels Dexon-Faden (3.0) und die Haut mittels Klipps verschlossen. Die Tiere wurden unmittelbar danach vom Beatmungsgerät entfernt. Die Tiere wurden, bis sie sich vollständig erholt hatten, warm gehalten. Die Schein-operierten Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, die LCA-Ligatur ausgenommen.

### **3.1.3. Echokardiographie**

Die Tiere wurden mittels 1.5% Isofluran anästhesiert. Die transthorakalen Echokardiographien wurden mit einem GE/Vingmed System V durchgeführt. Die systolischen und diastolischen Innendurchmesser wurden nach der „leading-edge“ Methode bestimmt. Die enddiastolischen und endsystolischen Volumina wurden planimetriert. Die Ejektionsfraktion (EF), das Herzzeitvolumen (HZV), der kardiale Index (CI), das Schlagvolumen (SV) und die „fractional shortening“ (FS) wurden berechnet. Zu jedem Zeitpunkt wurden das Gewicht und die Herzfrequenz (HF) bestimmt.

### **3.1.4. Organentnahme**

Nach den entsprechenden Zeitintervallen der Studie wurden die Tiere mit ca. 65mg/kg Pentobarbital Natrium intraperitoneal (i.p.) anästhesiert. Es wurden jeweils 2ml Vollblut aus der Aorta abdominalis entnommen, in ein heparinisiertes Röhrchen übertragen und unverzüglich auf Eis gestellt. Das Blut wurde bei 4°C für 5 Min. bei

8.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert und das Plasma bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Jedes Herz wurde entnommen und unverzüglich mit kalter Pufferlösung gespült, bis die Herzhöhlen blutfrei waren. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel voneinander getrennt. Das infarzierte Areal wurde nicht vom übrigen Myokard getrennt, um eine artifizielle p38 MAPK Aktivierung durch eine zu lange Ischämiezeit zu vermeiden. Der linke Ventrikel (LV) wurde in Folie eingepackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.1.5. Klinische Zeichen der Herzinsuffizienz: pulmonale Stauung, Körpergewicht und Organgröße**

Die Lungen und der rechte Ventrikel der 3 und 6 Wochen-Tiere wurden gewogen, um eine pulmonale Stauung zu überprüfen. Um die Unterschiede von individuellen Körper- bzw. Organgrößen zu normalisieren, wurde die Tibialänge jedes Tieres gemessen und der Quotient Organgewicht zu Tibialänge bestimmt.

### **3.1.6. Proteinextraktion aus dem linken Ventrikel**

Linksventrikuläres Gewebe wurde auf Trockeneis pulverisiert. Anschließend wurden ca.  $400\mu\text{g}$  Gewebe in Extraktionspuffer (Lysepuffer, Tabelle 1) für 30 Min. auf Eis inkubiert. Dabei wurde auf eine adäquate Hemmung der endogenen Phosphatasen-Aktivität besonders geachtet, um eine korrekte Aktivitätsbestimmung der p38 MAPK gewährleisten zu können. Die Proben wurden dabei mindestens 3 x gut mittels Vortex gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugieren über 5 Min. wurden die Überstände gesammelt, aliquotiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



**Tabelle 1: Extraktionspuffer (Lysepuffer) zur Proteinisolierung aus Myokard**

Substanz	Konzentration
HEPES, pH=7.4	20mM
$\beta$ -Glyzerolphosphat	20mM
EDTA (pH 8,0)	0.1mM
NaCl	75mM
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM
Triton	0.1%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.1mM
PMSF	0.4mM
DTT	0.5mM
NaF	50mM
Proteinase Hemmer Tablette (Boehringer Mannheim)	1Tbl pro 10 ml Puffer

### 3.1.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay von Bio-Rad Laboratories (Kat# 500-0116) angewendet. Der DC Protein Assay stellt eine modifizierte Variante des Lowry Assays mit folgenden Verbesserungen dar: Die Reaktion erreicht 90% der maximalen Farbentwicklung innerhalb der ersten 15 Min. und das Reaktionsprodukt bleibt für eine Stunde stabil (weniger als 5% Verlust innerhalb der ersten Stunde).

Als Vergleichskontrolle wurde eine Standardproteinreihe im Bereich von 0.2mg/ml bis 4mg/ml hergestellt. Als Standardprotein wurde BSA (Rinder Serum Albumin) verwendet.

Aliquotierte Probenextrakte wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung hergestellt. 5 $\mu$ l von jeder Probe und der Standard-Verdünnungsreihe wurden in dreifacher Ausführung in eine Mikrotiterplatte pipetiert. 25 $\mu$ l der fertigen alkalischen Kupfertatrat-Lösung wurden in jede Vertiefung hinzugegeben. Zusätzlich wurden 200 $\mu$ l von der dazugehörigen Folin Reagenz hinzugefügt. Durch vorsichtiges Schütteln wurden die Reagenzen vermischt. Nach 15 Min. wurde die Proteinkonzentration der Proben spektrophotometrisch bei 750nm Wellenlänge bestimmt.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch Zugabe vom Lysepuffer an die Konzentration der Probe mit minimalem Wert angeglichen.

### **3.1.8. Nicht-radioaktiver p38 MAPK Aktivitätsassay *in vivo***

Es wurde ein kommerziell erhältlicher p38MAP Kinase Assay Kit (Kat Nr. 9820, Cell Signaling Technology, Inc.) verwendet.

#### **3.1.8.1. Prinzip**

Der Assay dient der quantitativen Bestimmung der aktiven Form von p38 MAPK. Das Prinzip des Assays beruht auf der Eigenschaft von p38 MAPK, den Transkriptionsfaktor ATF-2 am Thr71-Rest zu phosphorylieren. Die Menge des im Assay phosphorylierten ATF-2 ist direkt proportional zur Menge an aktivierter p38 MAPK.

#### **3.1.8.2. Durchführung**

200µg Protein aus aliquotierten Gewebeextrakten (s.o.) wurden mit 20µl immobilisierten, an Agarosepartikeln gebundenen, monoklonalen phospho-p38 MAPK Kinase (Thr180/Tyr182) Antikörper in 200µl Zellysepuffer bei 4° C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit 500µl 1 x Lysepuffer und zweimal mit 500µl 1x Kinasepuffer auf Eis. Nach Abpipetieren des Puffers blieb das mit Hilfe des immobilisierten Antikörpers gebundene Präzipitat der aktiven phospho-p38 MAPK übrig.

Im Anschluss wurde der nicht-radioaktive p38 MAPK Assay durchgeführt. Es erfolgte eine Inkubation mit 200µM ATP und 2µg ATF-2 Fusionsprotein bei 37° C im Wasserbad über 30 Min. Die Reaktion wurde mit 3 x Laemmlipuffer gestoppt. Anschließend wurde ein Western Blot zur Bestimmung des phosphorylierten Anteils des ATF-2 mit Hilfe eines Phospho-spezifischen ATF-2 Antikörpers durchgeführt.

### 3.1.9. Western Blot

Vom Überstand des Aktivitätsassays wurden je 25µl von jeder Probe in die Taschen eines 10% TRIS-HCL Gels (Bio-Rad, Kat#161-1101) pipetiert. Darauf folgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 30mV in einem Mini-II System der Firma Bio-Rad. Als Elektrophoresepuffer wurde ein 1xTRIS-Glycine-SDS Puffer verwendet. Um das gesuchte Protein in den auf diese Weise aufbereiteten Proben sichtbar zu machen, wurde das immunologische Prinzip der Antigen-Antikörper Erkennung angewendet, wie im Folgenden beschrieben:

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF Membran (Polyvinyliden Difluor Membran; Bio-Rad Kat# 162-0176) mittels des Mini Trans-Blot Transfer Cell Systems (Bio-Rad) übertragen. Die Übertragung erfolgte mit 86mA in 1xTRIS-Glycin Puffer mit 20% Methanol bei 4°C für 1Std. Danach wurde die Membran kurz in 1xTBS, 0.05% Tween-20 enthaltend, gespült. Anschließend wurde sie in 40ml Membran Blocking Solution (Zymed, Kat# 00-05) für 1Std. bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln vorinkubiert. Die Vorinkubation diente der Vorbeugung unspezifischer Bindungen der Antikörper. Dann erfolgte die eigentliche Inkubation mit einem phospho-ATF-2 spezifischen Antikörper über 1 Std. bei Raumtemperatur. Es folgten drei 7-minütige Spülungen mit dem oben angegebenen Waschpuffer. Danach wurde die Membran mit einem Horseradish Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundär-Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, für 1 Std. inkubiert. Die Bindung des Sekundärantikörpers wurde mit Hilfe von ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Kat# RPN 2106) sichtbar gemacht. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch das Signal einer als Positivkontrolle (Tabelle 2) mitgelaufenen Probe, die das gesuchte Protein enthielt, beurteilt. Zusätzlich wurde die zu erwartende Proteingröße an einem Standardmarker gemessen. Eine quantitative Analyse erfolgte nach Einscannen der Filme mittels ImageQuant®.

**Tabelle 2 : Verwendete Antikörper und Standard für den p38 MAPK Assay**

	<b>Spezifikation</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
Primär AK	Anti-phospho ATF-2	Kaninchen, polyklonal	1:1000	CellSignaling Kat# S 9221
Sekundär AK	Anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Ziege	1:5000	DACO Kat# PO 447
Standardmarker	Standardisierte Mischung aus Proteinen für die Bestimmung von Proteingrößen mit niedrigem molekularem Gewicht			BioRad Kat# 161-0324

### **3.1.10. ProANP (1-30) ELISA**

Es wurde der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für eine quantitative Bestimmung von proANP (1-30) der Firma ALPCO Diagnostics (Kat # 004-BI-20802) verwendet.

ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) wird in Kardiomyozyten als Prohormon, bestehend aus 126 Aminosäuren, gebildet. Nach Stimulation wird dieses Peptid in äquivalente Anteile von proANP (1-98) und biologisch aktivem a-ANP (1-28) gespalten. Beide Anteile werden von den Zellen sezerniert. In der Praxis hat sich auf Grund seiner signifikant längeren Halbwertszeit und dadurch bedingter besseren Stabilität die Bestimmung von proANP etabliert.

Der Assay basiert auf einer kompetitiven Reaktion zwischen einer vorgegebenen, bekannten Menge proANP (Tracer) und dem proANP-Anteil in den zu untersuchenden Proben/Standards um die Bindung an dafür spezifischen Antikörper. Die Tracerproteine sind an Biotin gekoppelt. Nach Ablauf der Inkubation erfolgt eine Bestimmung des gebundenen Tracerproteinanteils durch eine Reaktion mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin. Anschließend erfolgte, durch Zugabe von TBM (TBM Microwell substrate (Kirkegaard & Perry, Inc., Gaithersburg, Md.)) als Substrat, eine quantitative Bestimmung anhand der enzymatischen Farbänderung

mittels eines ELISA-Lesegerät. Die Menge an gebundenen Tracerproteinen ist umgekehrt proportional dem in der Probe vorhandenen ANP.

Alle für den Versuch notwendigen Reagentien, sowie die zu untersuchenden Proben wurden bei Raumtemperatur verwendet.

Zunächst erfolgte eine Inkubation der im Kit vorhandenen, polyklonalen Schaf anti-proANP (Nt 1-30) Antikörper mit den am Boden der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebundenen polyklonalen Kaninchen anti-Schaf-IgG (Fc-Fragment) über 5Std. In der Zwischenzeit wurde eine proANP-Standardreihe mit Konzentrationen von 0 bis 300 fmol/ml (0, 11, 33, 100, 300 fmol/ml) erstellt. Die Proben wurden mit dem im Kit vorgegebenen Assay-Puffer verdünnt (Serum 1+20, LV-Proteinextrakt 1+5). Als positive Kontrolle diente eine Probe mit synthetischem proANP (1-30). Nach intensivem Waschen der Vertiefungen wurden je 200 $\mu$ l vom Standard oder von den Proben in zweifacher Ausführung in die Vertiefungen pipetiert. Nach Zugabe von 50 $\mu$ l Tracerprotein erfolgte eine Inkubation für 24 Std. bei Raumtemperatur. Anschließend, nach dreimaligem Auswaschen mit je 350 $\mu$ l Waschpuffer wurden 200 $\mu$ l HRP-konjugiertes Streptavidin zugegeben. Nach 1 Std. Inkubationszeit bei 37°C und erneutem Waschen (4x350 $\mu$ l Waschpuffer) wurde die enzymatische Reaktion mit 200 $\mu$ l TMB als Substrat über 20Min. im Dunklen durchgeführt. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 50 $\mu$ l Stopplösung die Lesung bei 450nm im ELISA-Lesegerät. Nach den Standardwerten wurde eine Kalibrationskurve erstellt. Die Menge des vorhandenen proANP in den Proben wurde an der Kurve abgelesen. Als Kontrolle diente eine positive Kontrolle mit bekannter Konzentration.

### **3.2. P38 MAPK vermittelte Fibronektin-Expression *in vitro***

Primäre Kulturen glatter Gefäßmuskelzellen aus der Arteria femoralis von Kaninchen wurden angelegt, um die Rolle von p38 MAPK bei der Expression von Fibronektin nach TGF- $\beta$  Stimulation zu untersuchen. Die Charakterisierung der Rolle von p38 MAPK erfolgte durch die Verwendung von SB 239063, einem spezifischen p38 MAPK Inhibitor, welcher den Zellkulturen zugegeben wurde.

#### **3.2.1. Primäre Zellkultur**

Um Zellen der glatten Muskulatur arterieller Gefäße zu erhalten, wurden zunächst die Aorta descendens und die Arteria femoralis von mit 1mg/kgKG Phenobarbital anästhesierten Kaninchen entnommen. Das Gewebe wurde mit kalter PBS Lösung, 1xAntibiose (Penicillin und Streptomycin) enthaltend, gespült. Die Hauptanteile der Adventitia wurden durch ziehend-streifende Bewegungen mit einer Pinzette entfernt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Gefäße längs aufgeschnitten. Die innenliegende Schicht aus Endothelzellen wurde vorsichtig mit einer sterilen Messerklinge abpräpariert. Nach Umdrehen des Gefäßes wurde auf die gleiche Weise die restliche Adventitia entfernt. Die dadurch gewonnene Media wurde in eine sterile 100 mm Petri-Schale übertragen. Das Gewebe wurde in kleine Stücke geschnitten, die wiederum in eine neue 100 mm Petri-Schale gegeben wurden. Dulbecco's Modified Eagle Serum (DMEM) mit 20% FBS (Fötales Kälberserum), 1xAntibiose (Penicillin und Streptomycin) und niedrigem Glukosegehalt wurde in ausreichender Menge dazugegeben, so daß die Oberfläche der Gewebestücke bedeckt war. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Feuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Die erste Migration glatter Muskelzellen aus den Gewebestückchen wurde nach 3-4 Tagen beobachtet. Danach wurden die Gewebestücke in eine neue 100mm Petri-Schale transferiert, in der eine zweite Migration erfolgte.

### **3.2.2. Passagieren der Zellen und Vorbereitung der Versuchsreihen**

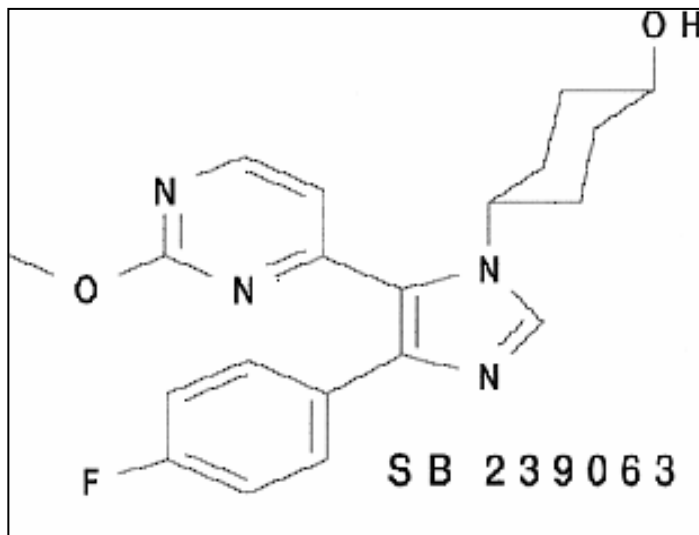
Es wurde abgewartet, bis die Zellen der ersten Migration 100% Konfluenz erreichten, dann wurden sie in 7.5cm Flaschen aufgeteilt, was als 1. Passage definiert wurde. Das Zellwachstum und die Zellproliferation wurden mit 15ml 10% FBS und 1xAntibiose enthaltendem DMEM aufrechterhalten, das alle 48 Stunden gewechselt wurde bis die Zellen erneut 100% Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden als glatte Muskelzellen mikroskopisch auf Grund des charakteristischen "hill and valley" (Hügel und Tal) Wachstumsmusters und immunohistochemisch mittels ihrer Positivität für alpha-"smooth muscle" Aktin identifiziert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gespült. Die Ablösung der Zellen von der Flaschenoberfläche erfolgte durch Zugabe von 1,5-2ml 0.05%-iger Trypsin-Lösung. Nach Ablösen wurde die Wirkung des Trypsins zügig durch Zugabe von 5ml 10% FBS enthaltendem DMEM neutralisiert. Das Medium wurde dann in 15ml Röhrchen pipetiert und bei 1000 Umdrehungen/Min. für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen im Sediment anzureichern. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde mit einer Pipette in 5ml DMEM gut verteilt. 10 $\mu$ l davon wurden für die Bestimmung der Zellzahl, die mikroskopisch in einer Zählkammer erfolgte, verwendet. Gleiche Zellanteile ( $4-6 \times 10^5$ ) wurden in die für den Versuch geplante Anzahl von 100mm Petri-Schalen aufgeteilt. Ein Teil der Zellen wurde in 7,5cm Flaschen als zweite Passage transferiert. Das Zellwachstum wurde mit 10% FBS und 1xAntibiose enthaltendem DMEM aufrechterhalten. Die oben beschriebenen Inkubationsbedingungen wurden beibehalten.

### **3.2.3. TGF- $\beta$ Stimulations-Assay**

Nach Erreichen von 100% Konfluenz wurden die Zellen für 48h in serumfreiem DMEM inkubiert. Damit wurden die Zellen in die gleiche (G0) Phase des Zellzyklus überführt, was eine Voraussetzung für die nachfolgende Stimulation mit TGF- $\beta$  (Transforming growth factor) als Wachstumsfaktor ist. Die Stimulation erfolgte mittels 10ng/ml TGF- $\beta$  (R&D Systems, Kat # 240-B) in 10ml serumfreiem DMEM pro Petri-Schale für 48Std. Zusätzlich wurden unterschiedlichen Konzentrationen von

SB239063 (0.3, 1, 3, 10 $\mu$ M) in serumfreiem DMEM erstellt und zu den TGF- $\beta$  stimulierten Zellen dazugegeben.

SB239063 ist ein Trans-1-(4-Hydroxycyclohexyl)-4-(4-Fluorophenyl) Methoxypyrimidin-4-yl) Imidazol und stellt einen p38 MAPK Inhibitor der zweiten Generation dar(33).



**Trans - 1- (4-Hydroxycyclohexyl) - 4 - (4-Fluorophenyl)-5 - (2 - Methoxypyrimidin-4-yl) Imidazol**

**Abb.5:** SB 239063 Struktur nach Barone et al. (33).

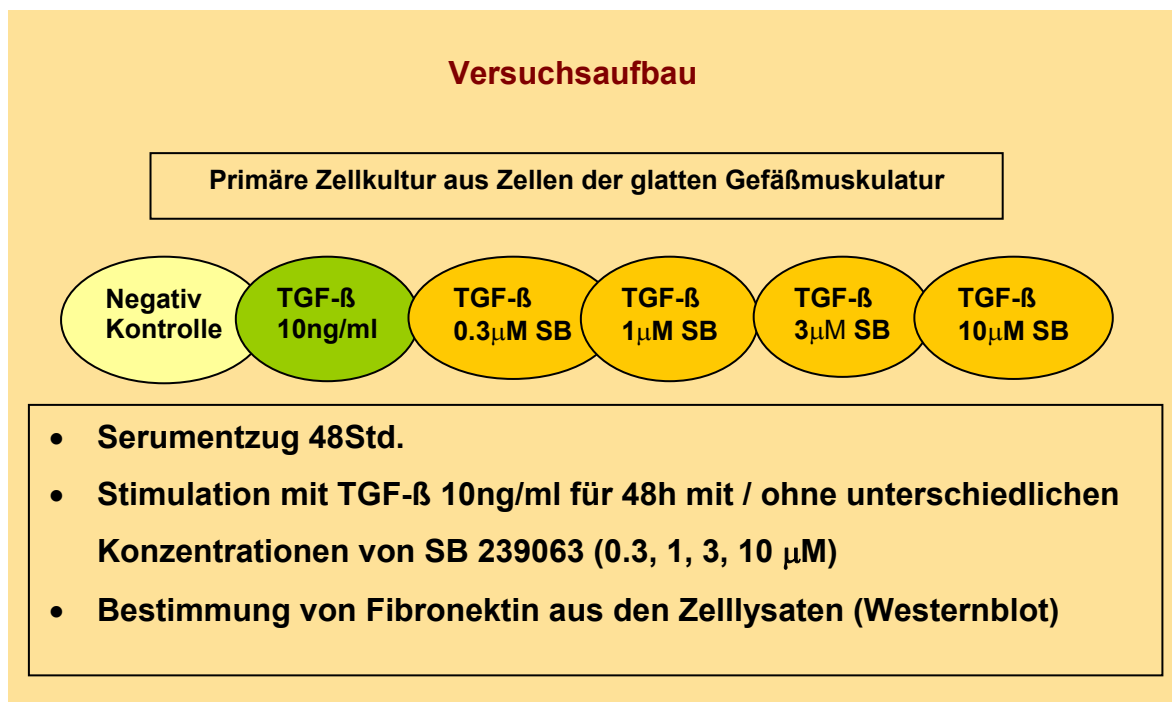
SB239063 besitzt eine sehr hohen Spezifität für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform von p38 MAPK. Die Aktivität weiterer verwandter Kinase wird erst durch eine tausendfache Konzentrationserhöhung beeinflusst (siehe Tabelle 3).



**Tabelle 3: Inhibierende Konzentration (IC50)  
für einzelne Proteinkinasen**

Kinase	SB 239063
p38 $\alpha$	0.04
p38 $\beta$	1
p38 $\gamma$	>50
p38 $\delta$	>50
JNK1	>10
JNK2b2	6
MAPKAP-K2	>10
MEK	>10
c-Raf	>10
ERK2	>10

Als Negativkontrolle für die Wirkung der TGF- $\beta$  induzierten Fibronectin-Stimulation dienten in serumfreien Medium inkubierte Zellen. TGF- $\beta$  stimulierte Zellen ohne SB239063 dienten als Positivkontrollen.



**Abb.6:** Versuchsaufbau zur Durchführung des TGF- $\beta$  Stimulationsassay.

### 3.2.4. Proteinextraktion der *in vitro* Experimente

Das Medium jeder Petri-Schale wurde in sterilen 15ml Röhrchen asserviert und bei 4°C mit 1600 Umdrehungen/Min. für 10Min. zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Die an den Boden der 100 mm Petri-Schalen adhärenten Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS-Puffer gespült. Mittels Zellschaber wurden die Zellen und die Extrazellulärmatrix (EZM) in etwa 1ml PBS-Puffer gewonnen und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 10 Min. bei 4°C mit 1600 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Nach Entfernung der Überstände wurden 200 l vom Zell-Lysepuffer (siehe Tabelle 4) zugegeben. Das Lysieren erfolgte auf Eis für 30 Min. Die Proben wurden dabei mindestens dreimal mittels Vortex gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugieren über 5 Min. wurden die Überstände gesammelt, aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Zell-Lysepuffers für die *in vitro* Experimente**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
HEPES, pH=7.4	20mM
�-Glyzerolphosphat	50mM
EDTA	2mM
Glycetol	10%
Triton	0.1%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1mM
PMSF	0.4m
DTT	1mM
NaF	50mM
Proteinase Inhibitor Tablette	1 Tbl. in 10ml

### 3.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie oben beschrieben mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad Laboratorien (Kat# 500-0116).

### 3.2.6. Western Blot

Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Hierzu wurden für die Fibronectinbestimmung die in Tabelle 5 aufgeführten spezifischen Antikörper, sowie die in Tabelle 6 aufgeführten Standard- und Positivkontrolle verwendet.

**Tabelle 5: Antikörper für Fibronectin Bestimmung**

	Spezifikation	Spezies	Verdünnung	Firma
Primär Antikörper	Anti-zelluläres Fibronectin	Maus, monoklonal	1:1000	Chemicon Kat# MAB1940
Sekundär Antikörper	Anti-maus IgG, HRP konjugiert	Ziege	1:5000	DACO Kat# P 0448

**Tabelle 6: Kontrollen zur Fibronectin Bestimmung**

Produkt	Beschreibung	Firma	Kat#
Standardmarker	Standardisierte Mischung aus Proteinen für Bestimmung von Proteingrößen mit hohem molekularem Gewicht	BioRad	161-0324
Hs68 Positivkontrolle	Proteinextrakt, gewonnen aus Fibroblasten humaner Vorhaut, zelluläres Fibronectin enthaltend.	SantaCruz, USA	sc-2230

### Statistik

Für die statistische Auswertung wurde der Student t-Test zum Vergleich zweier gepaarten Gruppen miteinander angewendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Myokardinfarkt der Ratte *in vivo***

#### **4.1.1. Mortalität**

Insgesamt wurden 87 Lewis Ratten verwendet. Bei 38 Tieren wurde eine Schein-Operation durchgeführt, und 49 Ratten erhielten eine Ligatur der linken Kranzarterie (LCA). Zwei der LCA-ligierten Ratten starben unmittelbar nach der chirurgischen Prozedur. Für die Versuchsreihe wurden Herzen mit mittelgroßen und großen Infarktarealen ausgesucht und untersucht.

#### **4.1.2. Infarktgrößenbestimmung und Lungengewichte**

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte visuell bei der Organentnahme. Auf Grund der Notwendigkeit des schnellen Kryokonservierens zwecks Erhaltung der p38 MAPK Aktivität wurde auf eine histologische Bestimmung der Infarktgröße verzichtet. Echokardiographische Daten, insbesondere die Auswurfsfraktion erhoben vor der Organentnahme, dienten als Referenz.

Die Lungengewichte wiesen bei diesen Lewis-Ratten keine signifikanten Unterschiede auf.

#### **4.1.3. Echokardiographie**

Nach einer und drei Wochen wurde eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Diese erbrachte folgende Ergebnisse:

**Zeitpunkt 1 (1 Woche)**

MI Größe	RATTE#	Alter (Wochen)	Tage post MI	Gewicht (g)	HF/Min.	EF	SV	HZV	CI	EDV	ESV	LVIDd	LVIDs	FS	RWT
<i>klein</i>	L1	7	7	341,9	378,36	0,70	0,43	162,69	47,59	0,61	0,18	0,64	0,38	40,4	0,53
groß	L2	7	7	333	387,99	0,33	0,30	116,40	34,95	0,9	0,6	0,98	0,82	15,97	0,27
groß	L3	7	7	323	378,83	0,35	0,29	109,86	34,01	0,84	0,55	0,97	0,81	16,05	0,22
<i>klein</i>	L4	7	6	309	328,5	0,56	0,35	114,98	37,21	0,62	0,27	0,82	0,43	47,5	0,43
groß	L5	7	6	318	351,61	0,39	0,32	112,52	35,38	0,83	0,51	0,97	0,78	20	0,28
groß	L6	7	6	312	368,9	0,36	0,29	106,98	34,29	0,8	0,51	0,92	0,75	17,83	0,36
mittel	L7	7	5	318	371,95	0,50	0,33	122,74	38,60	0,66	0,33	0,91	0,64	29,58	0,31
mittel	L8	7	5	305	333,44	0,51	0,36	120,04	39,36	0,7	0,34	0,95	0,44	52,97	0,27
groß	L9	7	5	297	362,95	0,33	0,26	94,37	31,77	0,79	0,53	0,96	0,77	20,16	0,28
<i>klein</i>	L10	7	5	312	409,16	0,60	0,34	139,11	44,59	0,57	0,23	0,85	0,42	50,9	0,40

**Zeitpunkt 2 (3 Wochen)**

MI Größe	RATTE#	Alter (Wochen)	Tage post MI	Gewicht (g)	HF/Min.	EF	SV	HZV	CI	EDV	ESV
<i>klein</i>	<i>L1</i>	9	18	400,10	387,99	71%	0,47	182,36	45,58	0,66	0,19
groß	L2	9	18	380,50	378,36	23%	0,27	102,16	26,85	1,18	0,91
groß	L3	9	18	377,80	398,29	30%	0,30	119,49	31,63	1,00	0,70
<i>klein</i>	<i>L4</i>	9	17	355,40	387,99	68%	0,42	162,96	45,85	0,62	0,20
groß	L5	9	17	354,50	351,87	34%	0,30	105,56	29,78	0,87	0,57
groß	L6	9	17	355,00	355,65	43%	0,36	128,03	36,07	0,83	0,47
mittel	L7	9	16	365,30	409,16	58%	0,49	200,49	54,88	0,84	0,35
mittel	L8	9	16	352,60	354,37	58%	0,41	145,29	41,21	0,71	0,30
groß	L9	9	16	345,30	409,36	34%	0,31	126,90	36,75	0,92	0,61
<i>klein</i>	<i>L10</i>	9	16	362,40	412,91	62%	0,41	169,29	46,71	0,66	0,25

*Die folgenden Abkürzungen werden in den Tabellen verwendet.*

MI Größe, Myokardinfarkt Größe; RATTE#, Ratten Nummer; Tage post MI, Tage nach Myokardinfarkt; HF/Min., Herzfrequenz pro Minute; EF, Ejektionsfraktion; SV, Schlagvolumen; HZV, Herzzeitvolumen; CI, kardialer Index; EDV, enddiastolisches Volumen; ESV, endsystolisches Volumen; LVIDd, diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; LVIDs, systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser; FS, fractional shortening; RWT, rechtsventrikulärer Wanddurchmesser.

Grau unterlegte Tiere wurden wegen einer zu geringen Infarktgröße, bzw. einer unauffälligen Auswurfsfraktion in der echokardiographischen Untersuchung, von der Untersuchung ausgenommen.

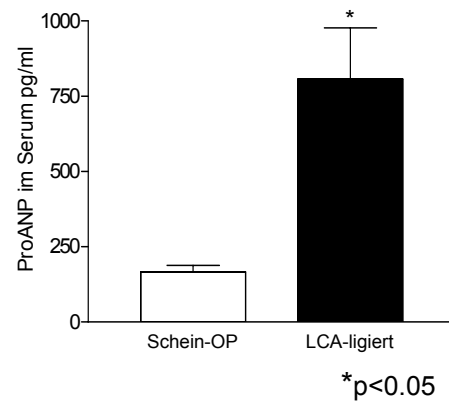
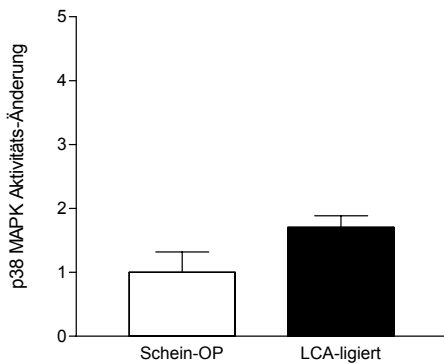
Zusammenfassend anhand dieser echokardiographischen Daten konnte festgestellt werden, daß bei den Tieren mit mittelgroßen und großen Myokardinfarkten eine infarktgrößenabhängigen Einschränkung der globalen Pumpfunktion vorlag. Eine Korrelation zwischen der p38 MAPK Aktivität und der Infarktgröße, obwohl bei den Tieren mit kleinen Infarktgebieten keine erhöhte p38 MAPK Aktivität nachzuweisen war, wurde nicht beobachtet.

#### 4.1.4. P38 MAPK Aktivität

##### Zeitpunkt 15 Minuten nach Ligatur

15 Min. nach Myokardinfarkt konnte ein Anstieg der p38 MAPK Aktivität in der LCA - ligierten Gruppe festgestellt werden. Die ANP-Spiegel im Serum waren deutlich und signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ) nach LCA-Ligatur. Erwartungsgemäß konnte zu diesem Zeitpunkt keine ANP-Expression im linksventrikulären Myokard nachgewiesen werden.

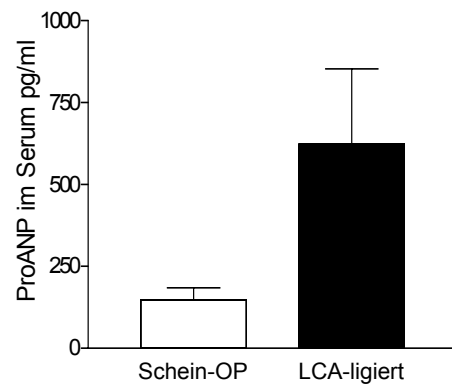
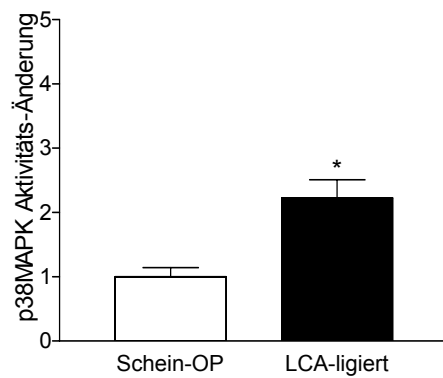
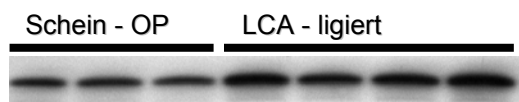
Schein - OP    LCA - ligiert





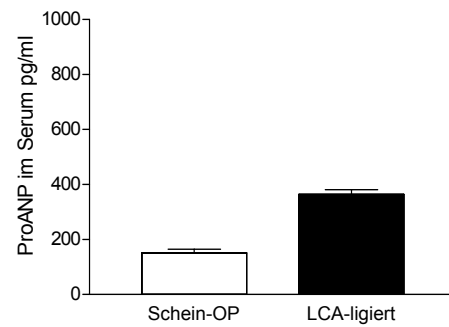
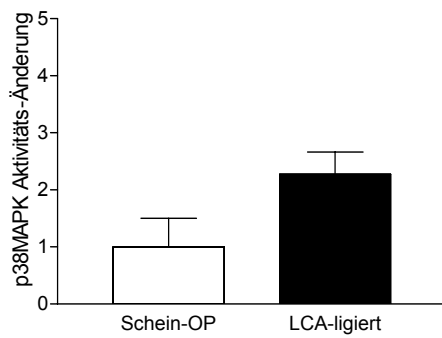
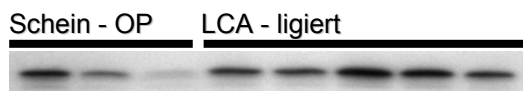
## Zeitpunkt 1 Stunde nach Ligatur

1 Std. nach LCA-Ligatur zeigte sich ein signifikanter Anstieg der p38 MAPK Aktivität im Vergleich zu den Schein-operierten Tieren (\* $p < 0.05$ ). Die ANP-Spiegel im Serum waren in der Tendenz hoch. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der großen Varianz und bei geringer Probenzahl nachgewiesen werden. ANP im linksventrikulären Gewebe war nicht nachweisbar.



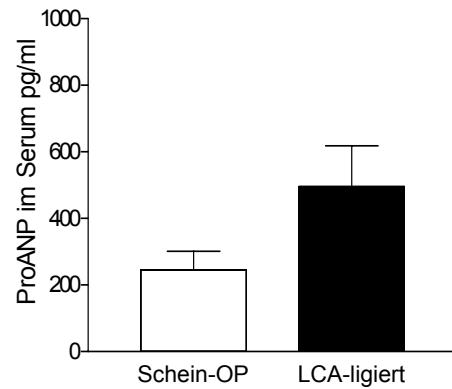
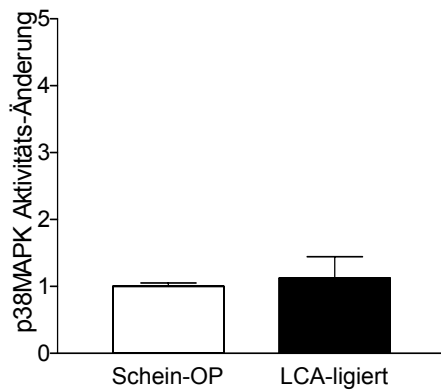
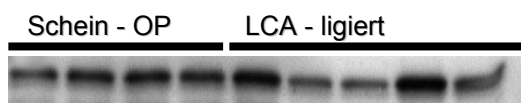
## Zeitpunkt 4 Stunden nach Ligatur

4 Std. nach LCA-Ligatur zeigte sich ein um das Doppelte erhöhte p38 MAPK Aktivität im linken Ventrikel. Das ProANP im Serum war in der ligierten Gruppe noch erhöht, aber im Vergleich zu den bisherigen Zeitpunkten niedriger. Eine proANP-Expression im LV-Gewebe war zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachzuweisen.



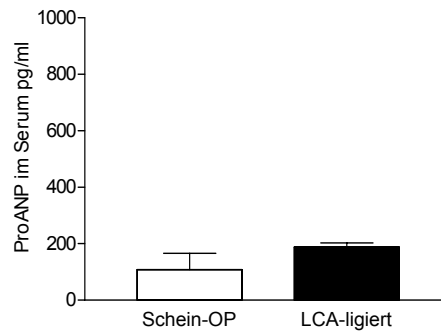
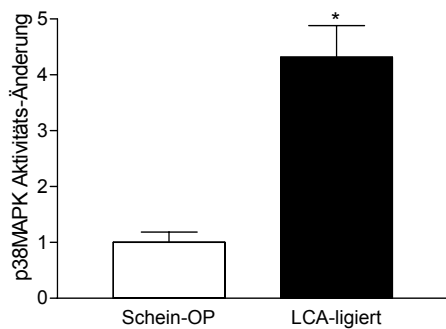
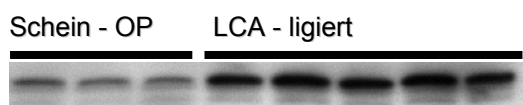
## Zeitpunkt 24 Stunden nach Ligatur

24 Std. nach LCA-Ligatur wurde kein Unterschied der linksventrikulären p38 MAPK Aktivität zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Einzelne Proben aus der LCA-ligierten Gruppe zeigten eine deutliche p38 MAPK Aktivität. Das proANP im Serum war in der Gruppe mit LCA-Ligatur noch erhöht. Nach wie vor gab es zu diesem Zeitpunkt kein Nachweis von proANP im LV-Gewebe.

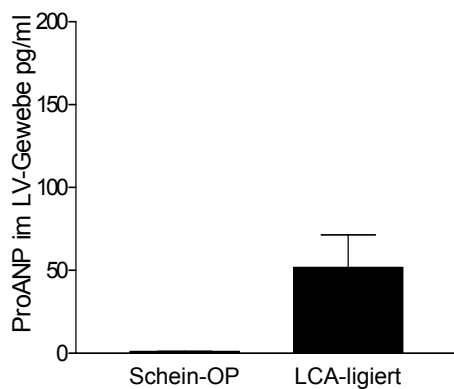


## Zeitpunkt 1 Woche nach Ligatur

1 Woche nach LCA-Ligatur wurde erneut ein signifikanter Anstieg der p38 MAPK Aktivität in der infarzierten Gruppe im Vergleich zu den Schein-operierten Tiere (\* $p < 0.05$ ) festgestellt. Keinen Unterschied zeigte der proANP-Spiegel im Serum. Erstmals wurde eine proANP-Expression im linksventrikulären Gewebe der LCA-ligierten Gruppe nachgewiesen.

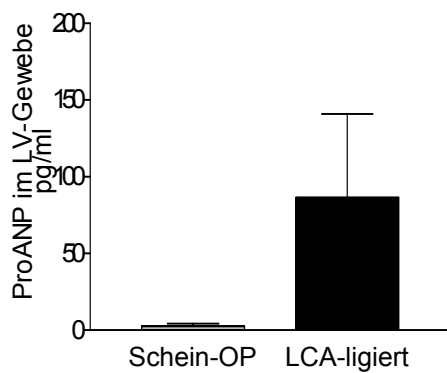
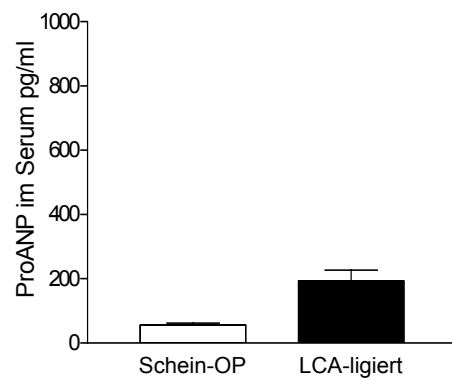
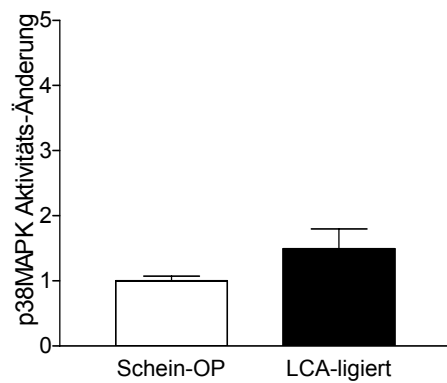
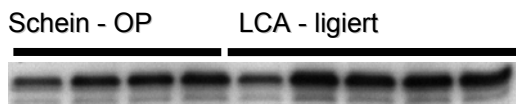


\*\* $p < 0.05$



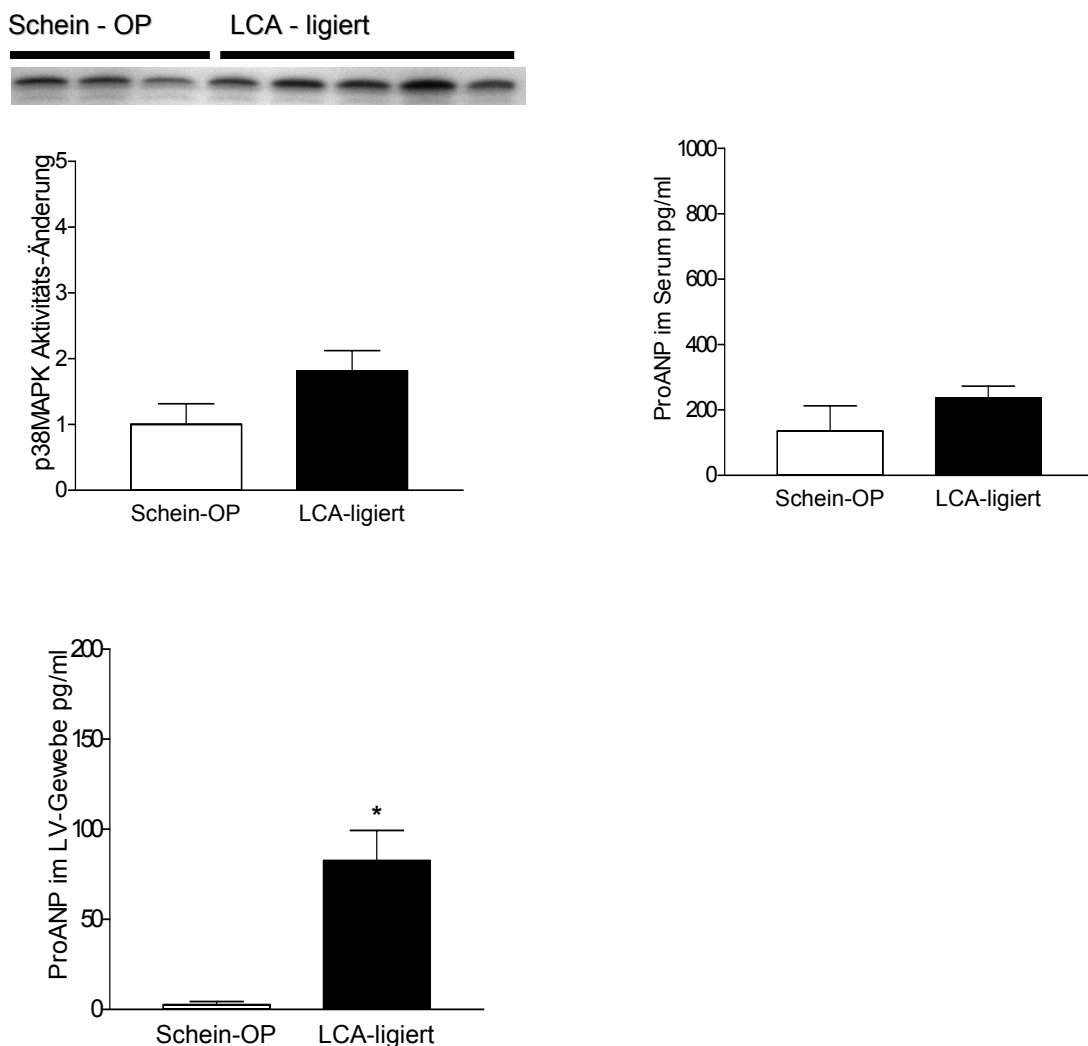
## Zeitpunkt 3 Wochen nach Ligatur

3 Wochen nach Myokardinfarkt war die p38 MAPK Aktivität gegenüber der Schein-operierten Gruppe tendenziell erhöht. Der proANP-Spiegel im Serum war anhaltend erhöht. Myokardiales proANP konnte in der infarzierten Gruppe nachgewiesen werden.



## Zeitpunkt 6 Wochen nach Ligatur

6 Wochen nach LCA-Ligatur zeigte sich weiterhin eine erhöhte p38 MAPK Aktivität in der LCA-ligierten Gruppe gegenüber den Schein-operierten Tieren. Im Serum war der pro ANP-Spiegel nicht erhöht, im Gegensatz dazu besteht eine signifikante pro ANP-Expression im infarzierten linksventrikulären Gewebe (\* $p < 0.05$ ).



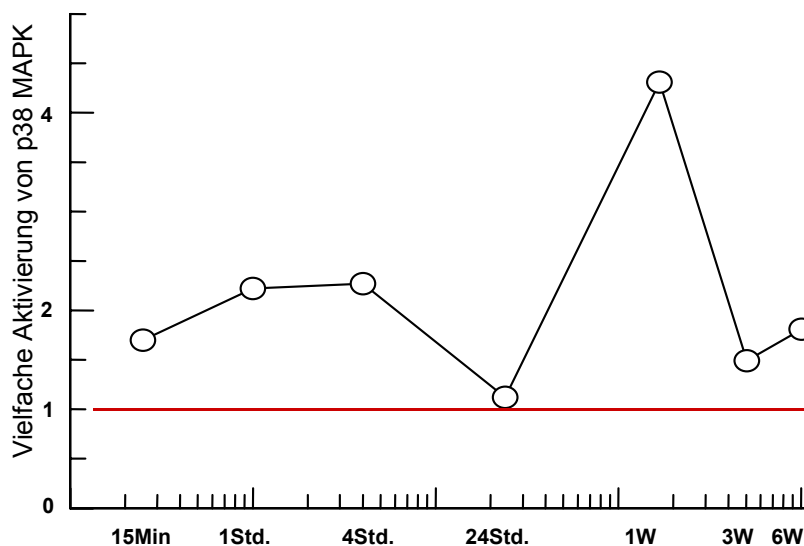
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zu den untersuchten Zeitpunkten von 15 Min., 1 Std., 4 Std., 1 Woche, 3 und 6 Wochen nach LCA-Ligatur eine gesteigerte p38 MAPK-Aktivität in der LCA-ligierten gegenüber der Schein-operierten Gruppe

nachgewiesen werden konnte. Das ist ein erstmaliger Nachweis von p38 MAPK Aktivität *in vivo* über einen längeren Zeitraum nach Myokardinfarkt. Es zeigten sich im Verlauf zwei Spitzen der p38 MAPK-Aktivität, nämlich 1 Std. und 1 Woche nach LCA-Ligatur.

Innerhalb der unterschiedlichen Gruppen wurde eine ausgeprägtere p38 MAPK-Aktivierung bei mittelgroßen bis großen Myokardinfarkten beobachtet.

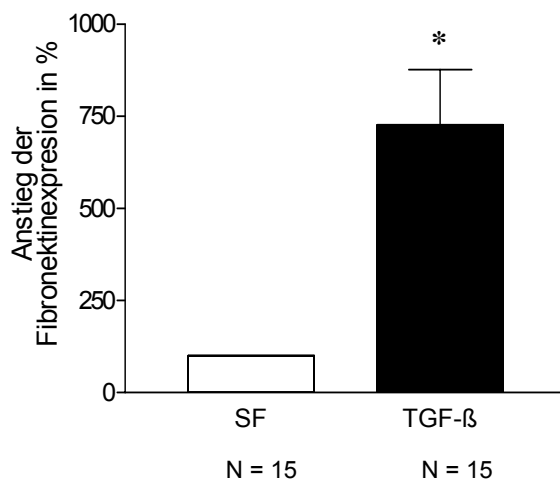
Ein erhöhter proANP-Spiegel im Serum wurde bis 24 Std. nach Myokardinfarkt nachgewiesen. Zu den späteren Zeitpunkten (1, 3 und 6 Wochen) war eine leicht erhöhte Tendenz erkennbar. Der höchste pro ANP-Spiegel im Serum wurde 15 Min. nach LCA-Ligatur festgestellt (5-fach im Vergleich zu den Schein-operierten Tieren). Im Verlauf zeigte der proANP-Spiegel im Serum eine abfallende Tendenz bis 24 Std. nach Ligatur.

Zu den frühen Zeitpunkten (15 Min., 1 Std., 4 Std., 24 Std.) gelang erwartungsgemäß kein Nachweis einer pro ANP-Expression im linksventrikulären Myokard. Erstmalig wurde eine proANP-Expression nach 1 Woche in der LCA-ligierten Gruppe festgestellt. Nach 3 und 6 Wochen zeigte sich die proANP-Expression im linksventrikulären- Myokard der LCA-ligierten Gruppe anhaltend erhöht.



#### 4.2.1. P38 MAPK vermittelte Fibronectin-Expression *in vitro*

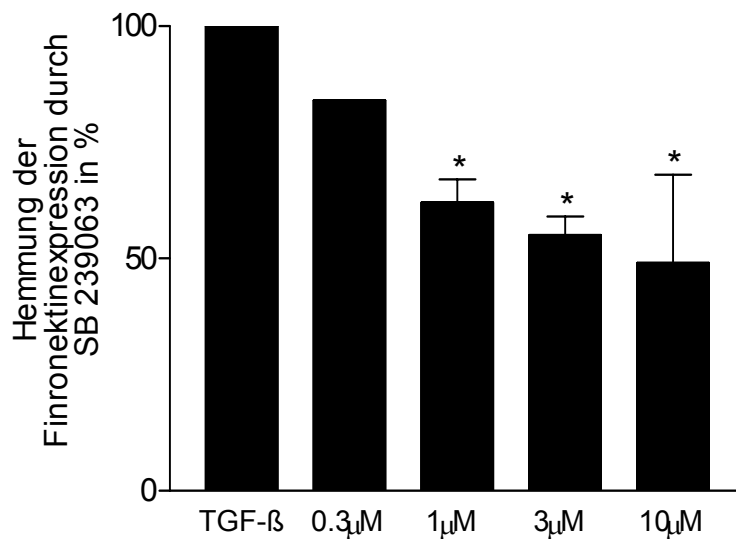
Primäre Kulturen von glatten Muskelzellen wurden mit 10ng/ml TGF- $\beta$  stimuliert. Erwartungsgemäß wurde eine verstärkte Expression von zellulärem Fibronectin durch die glatten Muskelzellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (Negativ-Kontrolle) festgestellt (\* $p < 0,05$ ).



**Abb.7:** Vielfacher Anstieg der TGF- $\beta$  stimulierten Fibronectinexpression in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur

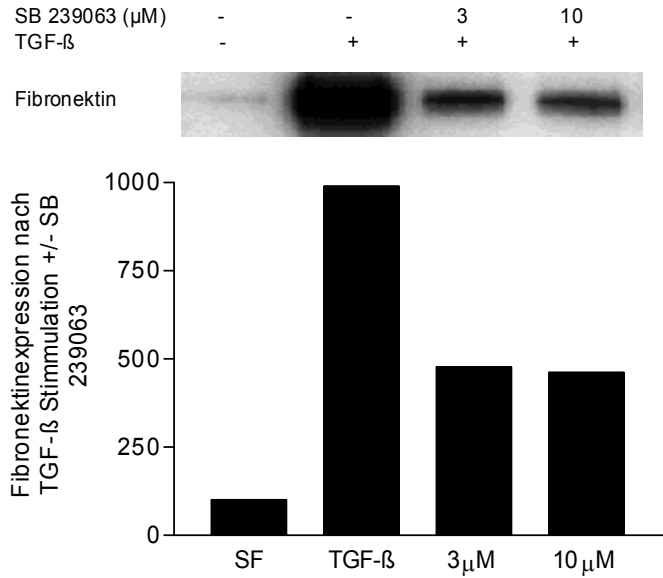
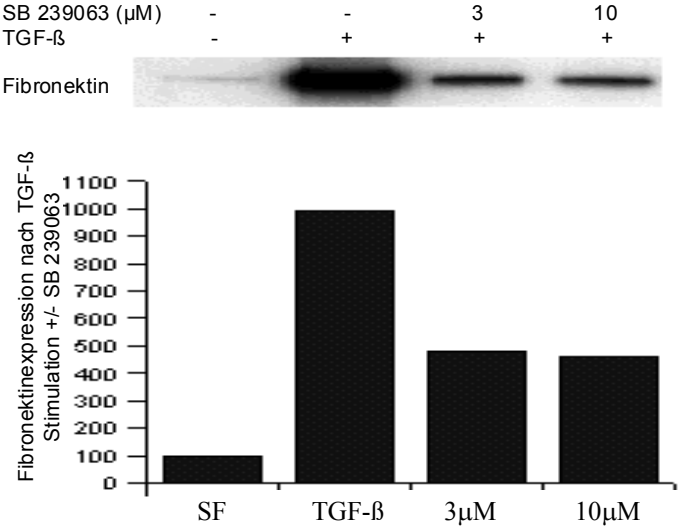


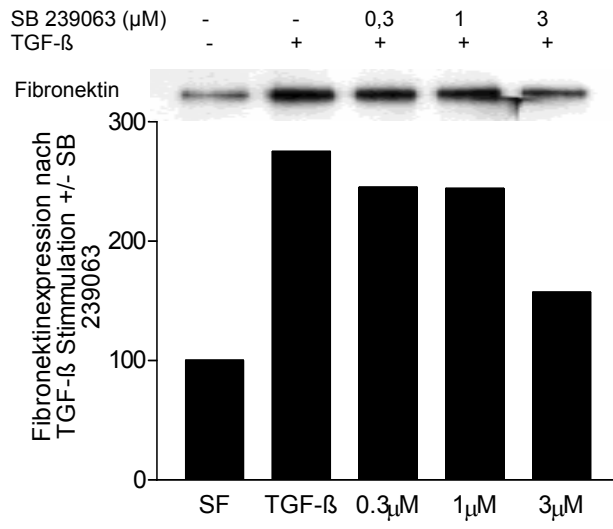
Durch Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen (0,3; 1; 3 und 10 $\mu$ M) SB239063 konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Expression von zellulärem Fibronektin erzielt werden (\* $p < 0,05$  vs. TGF- $\beta$  stimulierte Fibronektin-Expression).



**Abb. 8:** Konzentrationsabhängige Hemmung der TGF- $\beta$  stimulierten Fibronektin-Expression in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur durch SB 239063, einen spezifischen p38 MAPK Blocker

Im Folgenden sind einige Einzelversuche und deren quantitative Auswertung gezeigt. Die einzelnen unabhängigen Versuche führten zu obiger Auswertung (Abb. 8).





## **5.0. Literaturübersicht und Diskussion**

### **5.1. Myokardinfarkt der Ratte *in vivo***

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine verstärkte Aktivierung von p38 MAPK im linksventrikulären Gewebe erstmals bis 6 Wochen nach Myokardinfarkt gezeigt. Im Verlauf wurden zwei Aktivitätsspitzen, nämlich 1 bis 4 Stunden, sowie 1 Woche nach LCA-Ligatur festgestellt. Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen in diesem *in vivo* Modell der Herzinsuffizienz sind komplex. Ebenso komplex gestaltet sich auch die Interpretation der p38 MAPK Beteiligung beim postischämischen Remodeling des Myokards, beruhend auf den bisher vorliegenden zum Teil widersprüchlichen Daten und den hier erhobenen Ergebnissen.

#### **5.1.1. Myokardinfarkt: Definition und Folgen**

Pathologisch-anatomisch stellt der Myokardinfarkt eine Koagulationsnekrose eines größeren Myokardbezirkes in Form eines anämischen Infarktes dar. Der Infarkt ist Folge einer absoluten Koronarinsuffizienz mit anhaltender Ischämie im Versorgungsgebiet eines der drei Koronarhauptstämme (34). Der akute Verlust an funktionsfähigem Myokards und die akute Änderung der Volumenbelastung des linken Ventrikels führen zur Aktivierung zahlreicher biochemischer Kompensationsmechanismen, die einen Reparatur-Prozess des geschädigten Gewebes einleiten und die Anpassung des restlichen Myokard an die neuen Bedingungen fördern. Es handelt sich dabei zum einen um systemische Veränderungen wie z. B. die Aktivierung von neurohumoralen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung und Stabilisierung des Kreislaufs beitragen, sowie lokale Auswirkung im betroffenen Bereich haben. Beispiele hierfür sind eine erhöhte Noradrenalin-Sekretion, eine verstärkte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen, wie Zytokinen und Chemokinen. Zum anderen werden lokale para/autokrine Faktoren freigesetzt, etwa Wachstumsfaktoren wie z. B. TGF- $\beta$  und PDGF (35). Diese Substanzen sind am Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt beteiligt und fördern den Myokardumbau. In der Vermittlung der Signalweiterleitung dieser Neurohormone, inflammatorischen

Stimuli und Wachstumsfaktoren kommt intrazellulären Signaltransduktionswegen eine entscheidende Rolle zu. Im Folgenden sollen die Stimuli und die Mechanismen einer p38 MAPK Aktivierung beim Remodeling nach Myokardinfarkt im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse diskutiert werden.

### **5.1.2. P38 MAPK Aktivierung beim akuten Myokardinfarkt: Ischämie, Wandspannung und neurohumorale Faktoren**

Ischämie ist ein nachgewiesener Stimulus der p38 MAPK Aktivierung in Kardiomyozyten *in vitro* sowie in isolierten Langendorff-Präparaten (10; 23; 36). Dabei wurde eine transiente Erhöhung der p38 MAPK Aktivität ca. 20 Min. nach globaler Herzischämie bzw. im ischämischen Bereich nach Erzeugung von lokaler Ischämie in Langendorff-Herzen beobachtet. Nach Reperfusion des ischämischen Bereichs wurde ein erneuter Anstieg der p38 MAPK Aktivität gemessen.

Ähnlich dieser Studien konnte in der vorliegenden *in vivo* Untersuchung eine erhöhte p38 MAPK Aktivität 15 Min. nach LCA-Ligatur nachgewiesen werden. Diese ist in erster Linie auf den ischämischen Stimulus zurückzuführen. Die vereinzelt in der Schein-operierten Gruppe beobachtete verstärkte p38 MAPK Aktivität ist durch den perioperativen Reiz/Stress bzw. Ischämie zu erklären.

Die akute Myokard-Ischämie mit konsekutiver Einschränkung der Pumpfunktion führt zu einer Erhöhung der Wandspannung und damit zu einer Dehnung der Kardiomyozyten, die ebenfalls eine p38 MAPK Aktivierung direkt nach LCA-Ligatur (15 Min., 1 und 4 Stunden) triggern kann (36;37).

Die akute Myokard-Ischämie mit nachfolgender Einschränkung der Pumpfunktion und Erhöhung der Wandspannung bewirkt eine systemische Ausschüttung und Aktivierung von neurohumoralen Substanzen wie Angiotensin II, Noradrenalin, Endothelin, sowie von proinflammatorischen Faktoren, z.B. Chemokinen (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ), Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-6) und Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF) (35;38), die ihrerseits potente Stimuli des p38 MAPK Signaltransduktionsweges darstellen und eine Aktivierung von p38 MAPK zur Folge haben können. Diese Faktoren dürften auch einen großen Anteil an der p38 MAPK Langzeit-Aktivierung haben, wenn die akute ischämische Phase vorüber ist.

Die Auswirkungen der frühen p38 MAPK Aktivierung nach akutem Myokardinfarkt durch Ischämie, erhöhte Wandspannung, Neurohormone und Zytokine werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Die pathophysiologischen Vorgänge, bei denen p38 MAPK beteiligt sein dürfte, sind die der Zell-Protektion und -Hypertrophie, sowie der Apoptose.

### **5.1.3. P38 MAPK Aktivierung beim akuten Myokardinfarkt: Zell-Protektion, Hypertrophie und Apoptose**

In primären Zellkulturen von neonatalen Kardiomyozyten wurde unter ischämischen Bedingungen gezeigt, daß mittels p38 MAPK Aktivierung zellprotektive Faktoren wie Heat Shock Protein 27 (HSP27) und Heme Oxydase-1 (HO-1) verstärkt aktiviert werden (39). Die Rolle von p38 MAPK bei der *in vivo* Expression von HSP27 und HO-1 nach Myokardinfarkt ist bislang nicht geklärt.

*In vitro* Studien (40; 41), zeigten, daß p38 MAPK nach der Stimulation mit Phenylephrin und Endothelin eine Hypertrophie von Kardiomyozyten vermittelt. Die Hemmung der p38 MAPK Aktivität, pharmakologisch oder gentechnisch, führte zu einer Hemmung der Zellhypertrophie. Zechner et al. zeigten durch eine Überexpression von MMK 3 und MKK 6, zwei spezifischen, direkt der p38 MAPK übergeordnete Kinasen, eine Zellhypertrophie und eine verstärkte Organisation der Sarkomere (41).

Andererseits wird die p38 MAPK Aktivität nach ischämischem und stressinduziertem Stimulus mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht. Die Gruppe von Yin et al. (36) wies eine erhöhte Apoptoserate nach globaler Ischämie von Rattenherzen in Zusammenhang mit einer erhöhten p38 MAPK Aktivität nach. In Übereinstimmung damit konnten Ma et al. zeigen, daß durch eine pharmakologische Hemmung (SB 203580) der p38 MAPK-Aktivität im Langendorff Modell der Ratte die Ischämie-Folgen wie Apoptose und Infarktgröße deutlich verringert werden (42). P38 MAPK vermittelt Apoptose möglicherweise durch TNF- $\alpha$  Induktion (16). Andererseits vermittelt p38 MAPK auch anti-apoptotische Signale, z.B. die Expression von IL-6, einem Zytokin, welches Kardiomyozyten *in vitro* vor Apoptose schützt (43).

Diese kontroverse Rolle von p38 MAPK in Bezug auf Apoptose beruht möglicherweise auf einer isoformspezifischen Wirkung. Im Herzen wurden die p38 $\alpha$

und p38 $\beta$  Isoformen nachgewiesen. Wang et al. 1998 und Nemoto et al. (JBC 98, 273 16415-20) konnten zeigen, daß nach genetischem Transfer einer dominant negativen p38 $\beta$  MAPK Mutante die Kardiomyozyten-Hypertrophie gehemmt wurde. Andererseits bewirkte die Aktivierung der p38 $\alpha$  MAPK Isoform eine Apoptose-Induktion (28; 30). Eine Hemmung der p38 $\alpha$  MAPK führte *in vitro* in neonatalen Kardiomyozyten zu einer Zellprotektion (44). Die p38 $\beta$  Isoform ist also möglicherweise für eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zuständig, während p38 $\alpha$  MAPK eine apoptotische Zellreaktion vermittelt.

Die Annahme liegt nahe, daß zu den frühen Zeitpunkten die Aktivität der p38 $\alpha$  MAPK Isoform mit Vermittlung von Apoptose dominiert. Die Hypertrophie kardialer Myozyten ist lang anhaltend und charakterisiert auch die späteren Phasen des LV-Remodelings. Eine erhöhte Aktivität der p38 $\beta$  MAPK ist möglicherweise für die zweite und anhaltende Aktivität ab einer Woche verantwortlich.

In dem vorliegenden *in vivo* Modell des Myokardinfarkts konnte eine Bestimmung der Aktivität beider Isoformen aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine isoformspezifischen Antikörper kommerziell erhältlich waren. Eine solche Bestimmung ist von größtem Interesse und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

#### **5.1.4. Die P38 MAPK Aktivierung nach akutem Myokardinfarkt: Chemotaxis und Extrazellulärmatrix**

Die Einwanderung (Migration) von inflammatorischen Zellen, wie Monozyten und neutrophilen Granulozyten, in das Infarktareal ist von entscheidender Bedeutung für die Heilung des ischämisch geschädigten Gebietes. Die Einwanderung dieser Entzündungszellen wird durch Chemokine getriggert und erreicht ihren Höhepunkt etwa eine Woche nach dem akuten Myokardinfarkt, zeitgleich mit dem zweiten Gipfel der p38 MAPK Aktivierung in der vorgelegten Untersuchung. Der Einwanderungs-Prozeß (Chemotaxis) ist durch 3 Hauptschritte charakterisiert. Zunächst kommen Granulozyten aus dem Blutstrom in Kontakt mit den Endothelzellen der Gefäßinnenwand und durch Bindung an Oberflächenproteine (Selektine) rollen sie entlang der Endothelauskleidung des Gefäßes. Beim Vorhandensein von proinflammatorischen Substanzen wie Chemokinen, Zytokinen und

Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche der Endothelzellen werden die rollenden Neutrophilen aktiviert und dadurch fest an das Gefäßendothel via Oberflächenrezeptoren (Integrine) gebunden (Adhäsion). Nach der Adhäsion erfolgt bei Persistenz der chemotaktischen Stimuli die Einwanderung (Migration) der Zellen ins interstitielle Gewebe, dem Ort der Chemokineproduktion entgegen.

In mehreren Studien wird p38 MAPK eine vielfältige Rolle bei der Zellmigration zugeschrieben. Der p38 MAPK Signaltransduktionsweg ist bei der Expression von chemotaktischen Substanzen involviert. Beispiele hierfür sind MCP-1, MIP-2, TNF- $\alpha$ , IL-8 und TGF- $\beta$ . In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, daß eine TNF- $\alpha$  getriggerte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten p38 MAPK vermittelt wird. Die Hemmung der p38 MAPK Aktivität führt zu einer Verringerung der TNF- $\alpha$  stimulierten IL-8 Expression und Superoxid-Produktion und dadurch zu einer deutlichen Einschränkung der Neutrophilen-Chemotaxis (45). Dies konnte in einer zweiten Studie bestätigt werden (46), in der eine Hemmung der p38 MAPK Aktivität zu einer Reduktion der Freisetzung von TNF- $\alpha$ , MIP-2, MIP-1 $\beta$ , IL-8 durch LPS (Lipopolysaccharide) stimulierte neutrophile Granulozyten führte. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß in einem *in vivo* Modell der akuten pulmonalen Inflammation die Hemmung der p38 MAPK Aktivität zu einer Verminderung der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, unabhängig von der Zytokinkonzentration, führt. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) spielt bei der Neutrophileneinwanderung ins geschädigte Gewebe eine wichtige Rolle, und p38 MAPK ist bei dessen Signaltransduktion beteiligt (47). Die Inhibierung von p38 MAPK hat auch direkte Effekte auf die Zellmigration durch die Beeinflussung von Anpassungsvorgängen des Zytoskeletts und damit der Beweglichkeit der infiltrierenden Zellen (48).

Die Aktivierung von Monozyten zu Makrophagen ist von besonderer Bedeutung in der Frühphase des Remodelings nach Myokardinfarkt. Plasmin, eine Serinprotease, spielt hierbei eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von Monozyten durch Plasmin, im Sinne einer verstärkten Expression von MCP-1 und CD 40 Ligand p38 MAPK und JAK/STAT vermittelt wird (49). Dies erfolgt unter anderem durch eine p38 MAPK vermittelte Phosphorylierung von cAMP-response element-bindendes Protein (CREB) und ATF-2, einem Transkriptionsfaktor, die wiederum an die Promoter Region von c-fos binden und seine Transkription aktivieren. ATF-2 und c-Fos können ein Heterodimer mit AP-1 Transkriptionsfaktor



bilden und dadurch die Transkription von mehreren proinflammatorischen Genen, sowie von Matrixmetalloproteinasen (MMP) stimulieren (50). Darüber hinaus fördert MCP-1 die Zelladhäsion und Migration von Monozyten, wobei die MCP-1 stimulierte Zellmigration p38 MAPK vermittelt wird, nicht aber die Zelladhäsion (51). Eine kürzlich erschienene *in vivo* Untersuchung zeigte eine deutlich erhöhte MCP-1 Expression nach Myokardinfarkt von Tag 1 bis 28. Die Blockade des MCP-1 Signals führt zu einer Reduktion der Mortalität und geht mit einer geringeren Dilatation des linken Ventrikels, so wie mit einer verminderten Fibrosierung, Makrophagen-Infiltration, Expression von Zytokinen (TNF- $\alpha$ ) und Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ) einher (52).

Die lokale Zytokinexpression (MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) induziert und verstärkt nicht nur die Chemotaxis ins betroffenen Areal, sondern stellt eine wichtige Voraussetzung für die Einwanderung der inflammatorischen Zellen durch Modifikation der extrazellulären Matrix (EZM) dar. Schlüsselenzyme hierfür sind die Matrix Metalloproteinasen (MMP). Die Expression von Metalloproteinasen wird u. a. durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-1, TNF-  $\alpha$ , EGF, PDGF, bFGF und CD40-Ligand (Makrophagen) stimuliert (53-56). Wie schon oben erwähnt ist p38 MAPK Mediator der Signaltransduktion dieser Zytokine bzw. kann zu einer Potenzierung ihrer Freisetzung führen und somit *indirekt* die Induktion von MMP-Aktivierung modulieren. Andererseits deuten bisherige Ergebnisse auf eine *direkte* Induktion der MMP-Expression durch p38 MAPK. Als Beispiel hierzu zeigten Simon et al., daß die MMP-9 Expression durch p38 MAPK mittels AP-1 als Transkriptionsfaktor vermittelt wird. MMP-9 wird vor allem in den Leukozyten und den Makrophagen exprimiert und erreicht seine Spitzenaktivität am 2. Tag nach Myokardinfarkt. AP-1 ist kein p38 MAPK spezifischer Transkriptionsfaktor. Es kann auch über ERK und JNK aktiviert (57). Underwood et al. zeigten eine verminderte MMP-9 Aktivierung (<64%) *in vivo* durch Hemmung der p38 MAPK Aktivität (SB 239063; 30  $\mu$ g/kg) nach endobronchialer Applikation von Lipopolysacchariden (LPS), einem potenten Aktivator von p38 MAPK (58).

Durch die MMP Freisetzung ins Gewebe, z. B. aus den Neutrophilen, Fibroblasten und Kardiomyozyten, wird das Kollagen der EZM gespalten. Das gespaltene Kollagen wird von Makrophagen entfernt. Dies bedingt eine Zunahme des ischämisch geschädigten Gewebeanteils und verstärkt die anschließende Kardiomyopathie im Sinne von Dilatation des Ventrikels und Verschmälerung der

Ventrikelwand. In diesem Zusammenhang sind MMP-2 und MMP-9, bekannt als Gelatinasen, als wichtig für das Extrazellulärmatrix-Remodeling identifiziert worden (59). Sie degradieren die durch MMP-1 und MMP-3 zu Fragmenten gespaltenen Kollagenfibrillen zu Aminosäuren und Oligopeptiden. Die MMP-2 Aktivität ist eine Stunde nach Myokardinfarkt sowohl im Infarktareal als auch im übrigen Myokard erhöht. Vier Stunden danach kommt es zu einem Abfall der Aktivität und anschließend 24 Stunden später zu einem erneuten Anstieg. MMP-9 Aktivität wurde zunächst nur im Infarktareal (2 Stunden nach MI) und anschließend nach 24 Stunden, schwächer, auch im übrigem Myokard dokumentiert (60). Der beschriebene Verlauf der MMP-2 Aktivität entspricht der in der vorliegenden Studie dem Aktivitätsmuster von p38 MAPK mit einer Spitze nach 1-4 Stunden und Abfall nach 24 Stunden, sowie einem erneuten anschließenden Anstieg. Ob p38 MAPK direkt an der Freisetzung von MMP beteiligt ist, ist bislang nicht untersucht.

Fibronectin ist ein weiteres Extrazellulärmatrix-Protein, das im Rahmen von Remodeling-Prozessen verstärkt exprimiert wird. P38 MAPK ist bei der Expression von zellulärem Fibronectin beteiligt (61). Fibronectin kann die Aktivität von MMP-9 verstärkend beeinflussen (50).

Die erste, inflammatorische Phase des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt mit Bildung von Granulationsgewebe ist von einer zweiten, fibrogenetischen Phase gefolgt, die durch die Entstehung von Narbengewebe im infarzierten Myokard charakterisiert ist (35). Diese beginnt um den Tag 7 nach dem ischämischen Ereignis. Dabei handelt es sich um Einwandern von Myofibroblasten in das betroffene Areal, die eine gesteigerte Kollagen I und III Synthese unterhalten. Die Myofibroblasten sind phänotypisch veränderte Fibroblasten, charakterisiert durch Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (SMA) Mikrofilamenten, und sind von zentraler Bedeutung für die Fibrose-Entstehung nach Myokardinfarkt. Bisherige *in vivo* und *in vitro* Studien zeigten, daß TGF- $\beta$  zur Änderung des Fibroblasten-Phänotyps beiträgt. Wie schon erwähnt, ist p38 MAPK ein Mediator der TGF- $\beta$  Signaltransduktion, es liegen aktuell jedoch keine Untersuchungen vor, die eine direkte Beteiligung von p38 MAPK bei der Entstehung von kardialen Myofibroblasten nachweisen. Andere Studien lassen eine solche Vermutung zu, in dem gezeigt werden konnte, daß in pankreatischen stellaten Zellen, die den gleichen Phänotyp wie die Myofibroblasten aufweisen und die Fibrose und die Inflammation im

Pankreas triggern, die Produktion von  $\alpha$ -SMA, Kollagen und Zytokinen (MCP-1) p38 MAPK vermittelt wird (62).

Das Narbengewebe besteht vor allen aus Typ I und Typ III Kollagen (35). Ein mikroskopischer Nachweis einer Akkumulation von Kollagenfibrillen wurde am Infarkttrand 7 Tage nach Myokardinfarkt gezeigt. Eine organisierte Zusammensetzung in Form von Narbengewebe wurde ab 14 Tage nach Myokardinfarkt dokumentiert und setzt sich Wochen danach fort (63;64). Diese Ergebnisse sind parallel zu dem in dieser Studie gezeigte Verlauf der p38 MAPK Aktivierung mit einer zweiten Aktivitätsspitze 1 Wochen nach Infarkt. Dies läßt sich zum einen durch die schon oben erwähnte p38 MAPK abhängige Signaltransduktion der potentesten Mediatoren der Kollagensynthese im Narbengewebe, nämlich TGF- $\beta$  und Angiotensin II, erklären. Eine andauernde Aktivierung durch diese Substanzen führt zu einer verstärkten Fibrose auch des übrigen kardialen Gewebes. Andererseits wurde in einer *in vitro* Untersuchung in primären Kultur von Fibroblasten gezeigt, daß p38 MAPK die Expression von Extrazellulärmatrix Proteine wie Fibronectin, Kollagen I und III nach gleichzeitiger Stimulation mit TGF- $\beta$  und Norepinephrin vermittelt (64;65). Die verstärkte Expression von Extrazellulärmatrix-Proteinen nach Myokardinfarkt ist ein lang andauernder Prozeß und führt im Verlauf zu Entwicklung einer restriktiven Funktionseinschränkung des Myokards. In einer Untersuchung von Liao et al. konnte gezeigt werden, daß eine transgene Aktivierung von MMK3 und MMK6, zweier unmittelbar der p38 MAPK übergeordneten Kinasen, die Entwicklung einer restriktiven Kardiomyopathie zur Folge hat (64). Dem liegt eine deutliche interstitielle Fibrose zu Grunde, bei fehlender Hypertrophie der Kardiomyozyten. Eine weitere Studie, die die Rolle von p38 MAPK bei der Entwicklung von kardialer Fibrose unterstreicht, stellt die Arbeit von Zhang et al. dar (31). Dabei wurde ein *in vivo* Model der hypertensiven Kardiomyopathie in dominant-negativen p38 MAPK ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform) transgenen Mäusen untersucht. Es zeigte sich, daß unter Druckbelastung eine deutliche Hypertrophie kardialer Zellen festzustellen war, aber keine verstärkte Fibrose, die in diesem Model zu erwarten wäre.

Die in der vorliegenden Studie gezeigte verstärkte p38 MAPK in den untersuchten Zeitpunkten bis zu 6 Wochen nach Myokardinfarkt erlaubt anhand der bisherigen Literatur die Annahme, daß p38 MAPK in dieser späten Phase nach Myokardinfarkt in der Induktion und Unterhaltung des Fibroseprozesses, sowohl im infarzierten Gebiet, als auch im übrigen Myokard involviert ist und die Entwicklung einer

restriktiven Funktionseinschränkung fördert. Weitere Untersuchungen zum direkten Einfluß von p38 MAPK auf die Fibroseentstehung nach Myokardinfarkt mittels einer pharmakologischen p38 MAPK Hemmung sind aufgrund der vorliegenden Daten geplant.

#### **5.1.5. ANP als Remodelingparameter**

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein anerkannter Parameter für den Remodeling-Prozeß im linksventrikulären Gewebe nach Myokardinfarkt und wurde daher im Serum und im linksventrikulären Myokard bestimmt (66). Im Gegensatz zum brain natriuretischem Peptid (BNP) wird ANP im gesunden Zustand nur in den Zellen der Herz-Vorhöfe produziert. Es wird in Vesikeln gespeichert und bei einem entsprechenden Reiz, z. B. durch Vorhofdehnung, ins Blut sezerniert. Im physiologischen Bereich dient die ANP Sekretion der Förderung der Diurese bei Volumenbelastung im großen Kreislauf. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird ANP im Rahmen des Remodeling-Prozesses auch in den ventrikulären Kardiomyozyten produziert. Dies ist Ausdruck einer Änderung des Zellphänotyps und einer Zellhypertrophie im Sinne einer Anpassung an pathophysiologische Bedingungen. Bezüglich der Induktion der ANP-Expression in den Kardiomyozyten gibt es Hinweise, daß diese p38 MAPK vermittelt werden kann. Dies erfolgt mittels Aktivierung von ATF-6, einem Transkriptionsfaktor, welcher als Koaktivator für die Stimulation von Promotor-Proximalem Serum Response Element (SRE) dient und dadurch die Transkription von ANP induziert (67).

Erwartungsgemäß wurde in der vorliegenden Arbeit ein schneller Anstieg des Serum-ANP kurz nach LCA-Ligatur festgestellt. Das ist im Rahmen der direkten Sekretion des in Vesikeln gespeicherten ANP aus den Vorhöfen zu erklären, die durch den Myokardinfarkt akut gedehnt wurden. Im Verlauf zeigte sich der ANP-Spiegel anhaltend erhöht, jedoch mit abfallender Tendenz. Im linksventrikulären Myokard wurde zu den Zeitpunkten 15 Min., 1 Std., 4 Std. und 24 Std. erwartungsgemäß keine ANP-Expression nachgewiesen. Nach 1 Woche konnte erstmalig ANP-Expression im linksventrikulären Gewebe nachgewiesen werden, parallel zum zweiten Anstieg der p38 MAPK-Aktivität im Verlauf. Diese ANP-Expression wurde nur in den Proben mit mittelgroßen und großen Myokardinfarkt nachgewiesen. Bei

diesen Herzen war auch eine besonders hohe p38 MAPK Aktivität zu verzeichnen. Diese Beobachtung ventrikulärer ANP-Expression und gesteigerter p38 MAPK Aktivität weist auf eine Rolle von p38 MAPK beim Remodeling nach Myokardinfarkt hin. Daß die p38 MAPK Aktivität nicht mit der Infarktgröße bzw. nicht mit dem Grad der LV-Funktionseinschränkung korreliert ist zum einen auf die biologische Varianz und auf die kleine Fallzahl der untersuchten Tieren, zum anderen aber auch auf die Komplexität der Vorgänge bei der p38 MAPK involviert ist, zurückzuführen.

## **5.2. P38 MAPK vermittelte Fibronectin-Expression *in vitro***

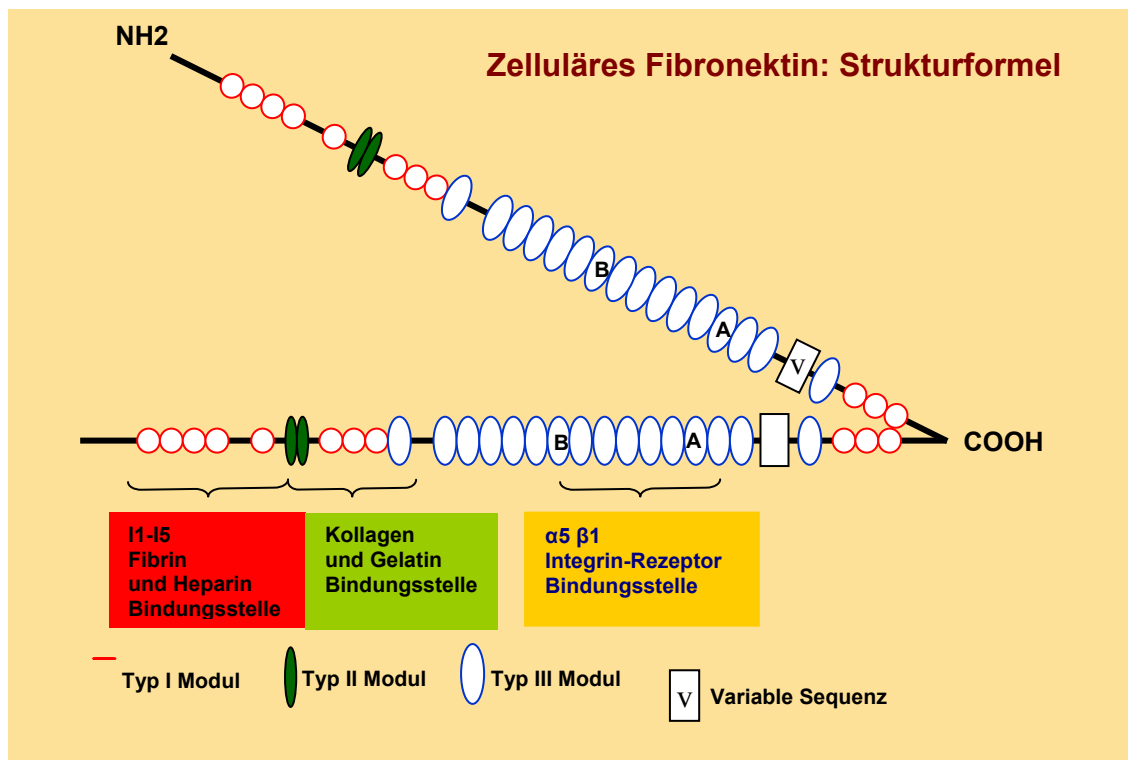
### **5.2.1. P38 MAPK in der Wand arterieller Gefäße**

Die hier vorgelegten Daten belegen eine Beteiligung von p38 MAPK bei der TGF- $\beta$  induzierten Fibronectin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. Fibronectin in der Wand von arteriellen Gefäßen besitzt vielfältige Eigenschaften, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

Fibronectin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 550.000kD (siehe Abb. 9). Das Protein, ein Heterodimer, besteht aus zwei Peptidketten, die mittels Disulfid-Brücken am COOH-Ende miteinander verbunden sind. Die Peptidkette besteht aus drei verschiedenen Arten von homogenen, sich wiederholenden Modulen, die wie in einer Perlenschnurkette miteinander verbunden sind. Diese Module bedingen die unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften und Bindungsstellen für verschiedene Proteine der Extrazellulärmatrix, sowie für Heparin, Fibrin, und Integrine. Dabei von besonderem Interesse ist die Zellbindungs-Domäne, charakterisiert durch die Peptidsequenz Arginin-Glycin-Aspartat (Arg-Gly-Asp), die die Bindung an Integrin- $\alpha 5\beta 1$ , einen spezifischen Rezeptor für Fibronectin, ermöglicht (68;69).

Nach dem Ort der Produktion werden zwei Isoformen von Fibronectin - plasmatisches und zelluläres - unterschieden. Die plasmatische Isoform wird zu 99% von Hepatozyten produziert und sezerniert. Sie ist löslich und zirkuliert im Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Für diese Isoform ist charakteristisch, daß zwei Module, nämlich ED IIIA und ED IIIB fehlen. Das plasmatische Fibronectin ist involviert bei der Blutgerinnung, Wundheilung und der Phagozytose. Die zelluläre Form von

Fibronektin stammt von nicht-hepatischen Zellen und wird nur in die unmittelbare Umgebung, parakrin, sezerniert. Sie enthält ED IIIA und ED IIIB-Module. Das zelluläre Fibronektin wird innerhalb von Stunden nach Expression unlöslich. Zum Nachweis macht man sich Antikörper gegen die ED IIIA und ED IIIB-Module zu nutze, die den isolierten Nachweis von zellulärem Fibronektin erlauben (70;71)



**Abb.9:** Struktur von zellulärem Fibronektin mit den charakteristischen IIIA und IIIB Modulen (nach Magnusson et al. (71)). Dazwischen befindet sich die für die spezifische Bindung an Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  - Rezeptor. Zur näheren Erklärung siehe Text.

Im Folgenden soll die Pathophysiologie der Restenose, soweit sie für die hier vorgelegten Daten relevant ist, zusammengefasst werden.

## 5.2.2. Restenose und Modulation der Extrazellulärmatrix-Zusammensetzung

Restenose ist eine erneute Einengung eines Gefäßabschnittes durch Neointimabildung, der zuvor mittels Ballondilatation aufgeweitet wurde. Die Bildung der Neointima als morphologisches Korrelat der Restenose ist bedingt durch die folgenden Prozesse: Proliferation und Migration von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC), Ansammlung von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen und T-Zellen, sowie durch überschießende und in ihrer Zusammensetzung veränderte Extrazellulärmatrix-Bildung (72). Ein wichtiger Stimulator dieser Modulation ist die mechanische Verletzung des Endothels der Gefäßwand durch die Ballondilatation (73). Es kommt zu einer Anlagerung von Thrombozyten an die verletzte Stelle, die Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- $\beta$  freisetzen. Diese Wachstumsfaktoren sind ihrerseits potente Stimuli für die Induktion einer überschießenden Expression von Extrazellulärmatrix-Proteinen, sowie für die Migration und Proliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (siehe Abb. 10).

### Phänotypische Änderung der VSMC bei Restenose

(in Bezug auf die Fähigkeit zur Zellmigration und -Proliferation)

#### Intrazelluläre Änderung:

- Zunahme der  $\beta$ -Aktin- und Abnahme der  $\alpha$ -Aktin Expression
- Abnahme der Myofilamentdichte
- Veränderte Desmin und Vimentin Positivität
- Überschießendes Wachstum von Endoplasmatischem Retikulum und Golgiapparat

#### Expressionsveränderung

- Zunahme der Sekretion von EZM Komponenten (Kollagen I und III, Elastin, Fibronectin, MMP)
- Abnahme der Sekretion von Basalmembranproteinen (Laminin, Kollagen IV)
- Änderungen der Expression von Membranrezeptoren

**Abb. 10:** Phänotypische Änderungen der Zellen der glatten Gefäßmuskulatur nach PTA.

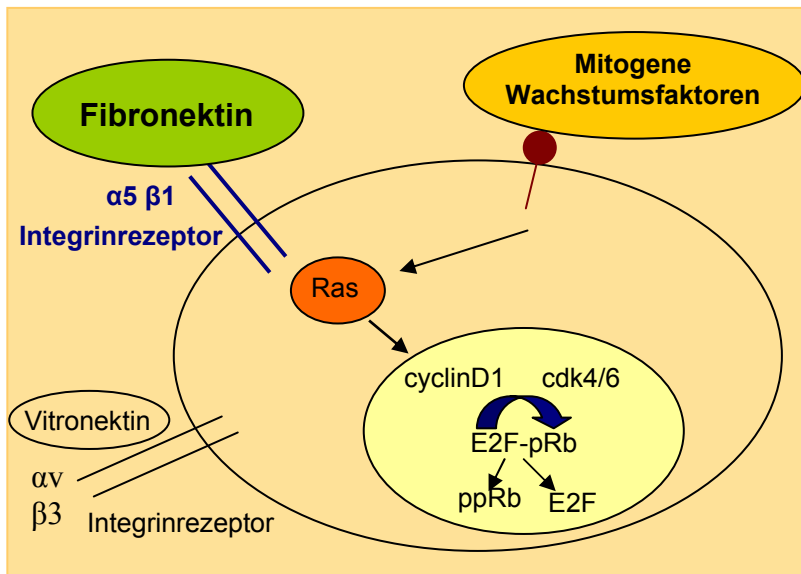
Während im nicht verletzten Zustand die Extrazellulärmatrix der arteriellen Gefäßwand vor allem aus Bestandteilen der Basalmembranproteine wie z. B.

Kollagen Typ IV und Laminin besteht, wird nach PTA eine erhöhte Expression von Kollagen Typ I und III, sowie Fibronectin beobachtet. Dabei wird interessanterweise ein zeitlicher Ablauf beobachtet. In der Anfangsphase der durch den Ballon gedehnten Matrix wird die Extrazellulärmatrix von Fibronectinfibrillen dominiert (74;75). Diese Fibronectinfibrillen erscheinen direkt unterhalb der luminalen Thrombozytenschicht, kurz vor dem Beginn der VSMC-Migration. Eine erhöhte Kollagen Typ I und III Expression tritt erst nach 7 Tagen auf (76). Die ersten migrierten VSMC sind von Fibronectin umgeben. *In vivo* Studien zeigten die stärkste Expression von Fibronectin in den ersten 6 Std. bis 24 Std., sie ist aber bis zu 7 Tagen nach PTA nachweisbar (76). Konkordant dazu wurde in der Studie von Pickering et al. die stärkste Expression des Fibronectin Rezeptors Integrin- $\alpha 5\beta 1$  am Tag 4 nach PTA gezeigt (77). Zu späteren Zeitpunkten, etwa nach 14 Tagen, ist der Rezeptor zwar noch exprimiert, aber in deutlich geringerem Ausmaß, so daß eine Abnahme der Fibronectinauswirkungen anzunehmen ist.

### **5.2.3. Fibronectin und Auswirkung auf den Remodeling-Prozeß nach PTCA**

Den bisher vorliegenden Studien nach ist eine Beteiligung von Fibronectin im Prozeß der Zellproliferation durch Stimulation von Integrin- $\alpha 5\beta 1$  gegeben (78). Wenn Fibronectin an seinen Rezeptor Integrin- $\alpha 5\beta 1$  bindet, erfolgt eine Aktivierung der intranukleären Transkriptionsfaktoren cdk4/6 und cdk2, die zu einer Phosphorylierung von Retinoblastoma Protein führen. Durch die Aktivierung von Retinoblastoma Protein wird der E2F-Transkriptionsfaktor von seiner Bindung an Retinoblastoma Protein freigesetzt. Der E2F-Transkriptionsfaktor aktiviert die Expression von Genen, die die Zellzyklus-Progression und eine Änderung des Phänotyps bewirken (79) (siehe Abb. 11).



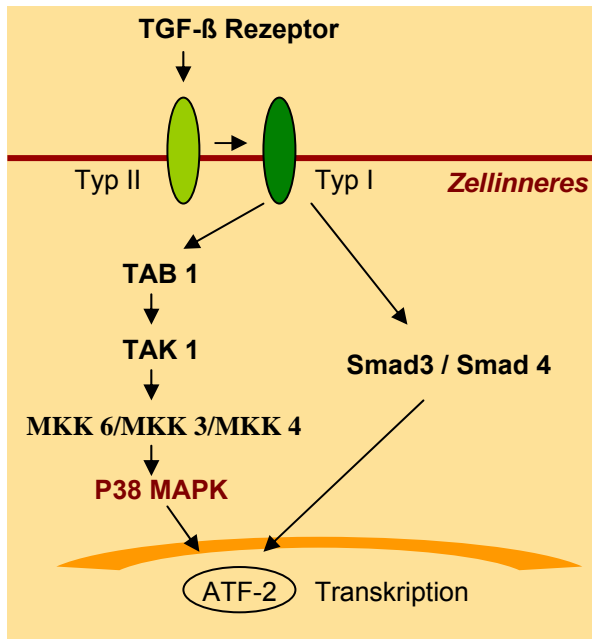


**Abb. 11:** Beispiel einer Induktion der Zellzyklus-Progression mittels Fibronektin nach Assoian et al. (78). Zur näheren Erklärung: siehe Text.

Fibronektin induziert eine phänotypische Änderung von kontraktilen, ortständigen Zellen der glatten Gefäßmuskulatur zu proliferativen, sekretorischen in der Weise, daß sie ihre Migrationsfähigkeit wiedererlangen (80-82). Zusätzlich dient Fibronektin als Verankerungsmolekül der aus der Blutbahn einwandernden Monozyten, die wichtige Stimulatoren der Zelldifferenzierung, der Phagozytose und der Sekretion von inflammatorischen Substanzen, sowie von Metalloproteinasen sind (83-86). Als weiteren Effekt verstärkt Fibronektin die Aufnahme von LDL in den Makrophagen, was wiederum die inflammatorischen Vorgänge in der arteriellen Wand verstärkt, die ihrerseits die Neointimabildung fördert (87;88).

#### 5.2.4. Expression und Stimulation von Fibronektin

Ein potenter Stimulator der Fibronektin-Expression ist TGF- $\beta$  (89-94). Nach PTA erfolgt durch die anliegenden Thrombozyten eine starke Sekretion von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- $\beta$ , FGF) in das verletzte Gewebe (72;95). Die Signaltransduktion von TGF- $\beta$  erfolgt zum Einen über die Smad3/4 Kinase oder zum Anderen über MKK6/4/3 und p38 MAPK (96;97) (siehe Abb. 12).



**Abb.12:** Schematische Darstellung der intrazellulären Signaltransduktionswege nach TGF- $\beta$  Stimulation, nach Sano et al. (97).

Bisherige Daten zeigten in humanen mesangialen Zellen eine dehnungsinduzierte, sowie durch einen erhöhten TGF- $\beta$ -Spiegel hervorgerufene Fibronectin-Expression, die mit einer Aktivierung der p38 MAPK nach 30 Min. bis 33 Std. einher geht und durch SB 203580, einen spezifischen p38 MAPK Inhibitor, deutlich reduziert werden kann (98). Weitere Daten legen die Annahme nahe, daß eine TGF- $\beta$  induzierte Fibronectinproduktion in humanen fetalen pulmonalen Fibroblasten auch durch p38 MAPK vermittelt wird (99).

Bei der Restenose wurde eine Beteiligung der p38 MAPK durch zwei *in vivo* Experimente postuliert. Ohashi et al. zeigten eine Aktivierung der p38 MAPK innerhalb der ersten 15 Min. nach Ballondilatation. Sie führten die gesteigerte IL-1 $\beta$  Synthese auf die Aktivierung von p38 MAPK zurück und postulierten eine indirekte Beteiligung von p38 MAPK bei der Neointimabildung (100).

Die zweite Untersuchung stammt von unserer Arbeitsgruppe und verwendet auch die hier vorgelegten Daten (61). In dieser Studie konnte erstmalig eine persistierende Aktivierung von p38 MAPK bis zu 6 Wochen nach PTA im Bereich der dilatierten Stelle gezeigt werden. Eine Hemmung der p38 MAPK Aktivität durch SB239063 in

der gleichen Studie führte zu einer Reduktion des Neointima/Media Quotienten um 30%. P38 MAPK hat eine nicht nur akute (100) sondern auch eine anhaltende Mediatorrolle in diesem Modell der Restenose nach PTA (61).

Es gibt keine ausreichenden Untersuchungen zur Rolle von p38 MAPK bei der Veränderung der Extrazellulärmatrix im Rahmen der Neointimaentstehung. Bisherige in vitro Experimente konzentrierten sich auf die Untersuchung zur Beteiligung von p38 MAPK bei der Proliferation und Migration von VSMC nach Ballondilatation. Dabei konnte eine Rolle für p38 MAPK bei der Zellmigration mehrfach nachgewiesen werden. In trachealen und vaskulären, glatten Muskelzellen (101;102), sowie in epithelialen Zellen (103) konnte gezeigt werden, daß p38 MAPK die PDGF-induzierte Aktin-Reorganisation vermittelt. Die Aktin-Reorganisation ist ein notwendiger Faktor für die Migration von VSMC, dadurch daß sie die Formation von Lamellipodien und Membran-Zusammenziehungen verursacht. Die bislang vorliegenden Daten über eine Beteiligung von p38 MAPK bei der Zellproliferation sind widersprüchlich (104-106). Daten aus unserer Arbeitsgruppe konnten keinen sicheren Hinweis auf eine direkte p38 MAPK Vermittlung der Zellproliferation zeigen (61).

## 6.0. Zusammenfassung und Ausblick

Die Signaltransduktion vermittelt zelluläre Stimuli von der Zellmembran ins Zellinnere (Zytosol bzw. Zellkern) und steuert physiologische und pathophysiologische Vorgänge in der Zelle. Die Aufschlüsselung des komplexen Netzwerks der Signaltransduktion ist eine Voraussetzung für die gezielte experimentelle und auch therapeutische Beeinflussung zellulärer Vorgänge. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Beteiligung von p38 MAPK beim Remodeling-Prozeß nach Myokardinfarkt *in vivo* und bei der Fibronectin-Expression in Rahmen der Neointima-Entstehung nach Angioplastie *in vitro* durchgeführt.

Im Bereich der kardiovaskulären Forschung hat die Familie der Mitogen Aktivierten Protein Kinasen besonderes Interesse gewonnen. Sie besteht aus drei Subgruppen - JNK, ERK und p38 MAPK. Diese sind durch Vermittlung vieler neurohumoraler, mechanischer und inflammatorischer Stimuli am Remodeling-Prozeß des Herzmuskelgewebes und der arteriellen Gefäßwand beteiligt.

*In vitro* Experimente zeigten eine p38 MAPK-Aktivierung bei akuter Ischämie und eine konsekutive Beteiligung dieser Kinase bei der Hypertrophie bzw. Apoptose von Kardiomyozyten. Die Rolle von p38 MAPK bei der absoluten Ischämie *in vivo* wurde bislang nicht untersucht. Als erstes sollte in einer Pilotstudie untersucht werden, ob p38 MAPK nach akutem Myokardinfarkt eine erhöhte Aktivität *in vivo* aufweist. Des Weiteren sollte, für den Fall einer erhöhten p38 MAPK Aktivität, der zeitliche Verlauf beschrieben werden. Von besonderem Interesse dabei war, wie lange eine erhöhte p38 MAPK Aktivität nach Myokardinfarkt nachweisbar ist. Bei länger anhaltender p38 MAPK Aktivität liegt es nahe, daß diese Kinase am postischämischen Remodeling-Prozeß beteiligt ist. Man würde damit einen möglichen Ansatzpunkt für eine pharmakologische Beeinflussung gewinnen. Darüber hinaus sollte anhand klinischer Parameter und Remodelingmarker, wie des atrialen natriuretischen Peptides (ANP), untersucht werden, ob ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der p38 MAPK Aktivität und der Entstehung einer Herzinsuffizienz besteht.

Es wurden in einem ersten Teil der Arbeit mittels Ligatur der linken Koronararterie Myokardinfarkte bei männlichen 4 Monate alten Lewis Ratten erzeugt. Schein-

operierte Ratten dienten als Kontrollgruppe. Die Infarktgröße wurde echokardiographisch, sowie bei Organentnahme visuell beurteilt. Die p38 MAPK-Aktivierung wurde mittels nicht radioaktivem MAPK-Assay und anschließendem Western Blot nach 15 Minuten, 1, 4, 24 Stunden, sowie 1, 3 und 6 Wochen im linksventrikulären Myokard gemessen. Pro Zeitpunkt wurden mindestens 10 Tiere untersucht. Zur Bestimmung von ANP im Serum und im linksventrikulären Gewebe wurde die ELISA Methode angewandt.

Wichtigstes Ergebnis war, daß eine deutliche p38 MAPK-Aktivierung bis 6 Wochen nach Myokardinfarkt im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt wurde. Im Verlauf zeigten sich zwei signifikante Spitzen der p38 MAPK-Aktivierung, nämlich nach 1 Stunde und nach 1 Woche. Innerhalb der unterschiedlichen Gruppen wurde eine deutlichere p38 MAPK-Aktivierung bei mittelgroßen bis großen Myokardinfarkten beobachtet. In diesen Proben wurde auch eine linksventrikuläre ANP-Expression nachgewiesen.

Somit konnte in dieser Untersuchung erstmalig eine prolongierte p38 MAPK-Aktivität bis zu 6 Wochen nach Myokardinfarkt *in vivo* gezeigt werden. Die Tatsache, daß p38 MAPK bei mittelgroßen und großen Infarkten, die mit einer ventrikulären ANP Expression einhergehen, aktiviert ist, weist auf eine Beteiligung von p38 MAPK beim Remodeling-Prozeß nach Myokardinfarkt hin.

Die erste Spitze der p38 MAPK Aktivität nach einer Stunde ist im Zusammenhang der akuten Ischämie und der erhöhten Wandspannung, evtl. auch mit der Manipulation bei der Operation zu sehen und ist in ihrer Bedeutung nicht geklärt. P38 MAPK könnte hier möglicherweise zum einen proapoptotische Vorgänge auslösen, zum anderen aber auch eine Zellprotektion im Rahmen der durch die akute Ischämie bedingten Entstehung von Zellnekrosen, z. B. mittels Heat Shock Proteine, vermitteln. Die zweite Spitze der p38 MAPK Aktivität nach einer Woche weist auf eine Beteiligung an den adaptiven Prozessen nach Myokardinfarkt hin und wird am ehesten durch Neurohormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren chronisch unterhalten. Die Ergebnisse unserer Studie können hier als Grundlage für zukünftige Untersuchungen bezüglich der Rolle von p38 MAPK nach Myokardinfarkt dienen. Von besonderem Interesse wäre die Bestimmung der beiden im kardialen Gewebe nachgewiesenen p38 MAPK Isoformen, der p38 $\alpha$  MAPK und der p38 $\beta$  MAPK. Diese könnten unterschiedliche Auswirkungen bezüglich der Apoptose und des Zellüberlebens aufweisen, sowie zeitlich getrennt aktiviert werden. Weiterer wichtiger

Ansatz zukünftiger Untersuchungen ist die Lokalisation der p38 MAPK Aktivität im ischämischen Gewebe, im direkt angrenzenden Gebiet, sowie im übrigen Myokard.

Eine Restenose ist eine häufige Komplikation nach Angioplastie. Sie entsteht aufgrund einer Neointimabildung. Die Neointima ist charakterisiert durch die Proliferation und Migration von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, sowie durch eine überschießende und in ihrer Zusammensetzung veränderte extrazelluläre Matrix-Bildung. Ein *in vivo* Experiment, von dem die vorliegende Arbeit einen Teilaspekt darstellt (61), zeigte eine erhöhte p38 MAPK Aktivität während der Neointimaentstehung nach PTA für 28 Tage. Die Hemmung der p38 MAPK Aktivität mittels eines selektiven Inhibitors führte zu einer verringerten Neointima-Bildung.

Bisherige Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung von p38 MAPK bei den Prozessen der Migration und der Proliferation von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur hin, wobei diese zum Teil kontrovers diskutiert werden. Eine Untersuchung zur Beteiligung von p38 MAPK bei der Modulation der extrazellulären Matrix-Zusammensetzung war bis lang nicht untersucht worden.

Fibronectin ist ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix und spielt eine wichtige Rolle in der Frühphase der Neointimabildung. Fibronectin trägt zur phänotypischen Änderung der glatten Gefäßmuskelzellen bei und ermöglicht deren Proliferation und Migration. TGF- $\beta$  ist ein bekannter Stimulus für eine verstärkte Fibronectin-Expression. Es wird unmittelbar nach Angioplastie durch Thrombozyten in der Gefäßwand freigesetzt. Die Signaltransduktion von TGF- $\beta$  kann durch p38 MAPK vermittelt werden. Der Zusammenhang zwischen einer TGF- $\beta$  induzierten p38 MAPK Aktivierung und der Fibronectin-Expression in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur war bislang nicht geklärt. Daher wurden im zweiten Teil dieser Arbeit primäre Kulturen aus Zellen der glatten Gefäßmuskulatur aus der Arterie femoralis von Kaninchen (6 Monate alt, männlich) angelegt und mit TGF- $\beta$  über 48h stimuliert. Durch unterschiedliche Konzentrationen von SB 239063, einem spezifischen p38 MAPK Inhibitor, wurde die Beteiligung von p38 MAPK bei der Fibronectin-Expression untersucht. Die Bestimmung der Expression von zellulärem Fibronectin erfolgte im Western Blot.

TGF- $\beta$  bewirkte eine verstärkte Expression von zellulärem Fibronectin in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Die Fibronectinproduktion konnte durch SB 239063 konzentrationsabhängig signifikant reduziert werden.

Am Beispiel der Induktion der Fibronectin-Expression konnte erstmalig ein Hinweis auf eine Beteiligung der p38 MAPK an der Modulation der Extrazellulärmatrix bei der Restenose nach perkutaner transarterieller Angioplastie gewonnen werden. Dies ist in den ersten Tagen nach Angioplastie von besonderer Bedeutung, da Fibronectin die Dedifferenzierung, Proliferation und Migration von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur fördert.

Somit könnte p38 MAPK direkt bei den Umbauvorgängen der Extrazellulär-Matrix beteiligt sein und indirekt auch die Proliferation und Migration der Zellen der glatten Gefäßmuskulatur nach PTA beeinflussen.

## 7.0. Verwendete Abkürzungen

ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
AVK	Arterielle Verschlusskrankheit
BNP	Brain Natriuretisches Peptid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
Cdc 2	Mitglied der kleinen GPCR-Subgruppe
Cdk	G1 phase Cyclin-Dependent Kinase
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CI	Kardialer Index
CREB	cAMP-response element binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2F	Transkriptionsfaktor, beteiligt an der Kontrolle des Zellwachstums
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EGF	Endothel Wachstumsfaktor
ELK	Ternary Complex factor Transcription factor
ERK	Extrazellulär Responsive Kinase
ESV	Endsystolisches Volumen
EZM:	Extrazellulärmatrix
FGF	Fibroblast growth factor
FS	Fractional shortening
Gly	Glycin
GPCR	G Protein–Coupled Receptor
HF/Min.	Herzfrequenz pro Minute
HO-1	Heme Oxydase 1
HRP	Horse Radish Peroxidase
HSP	Heat Schock Proteine
HZV	Herzzeitvolumen



IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminale Kinases
Kat #	Katalognummer
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCA	Linke Koronararterie
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LV	Linker Ventrikel
LVIDd	Diastolischer linksventrikulärer Innendurchmesser
LVIDs	Systolischer linksventrikulärer Innendurchmesser
mA	Miliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAP2	MAPK aktiviertes Protein 2
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEF2	Myocyte Enhancer Faktor 2
MEKK	MAPK oder ERK Kinase Kinases
MI	Myokardinfarkt
MLK	Mixed Lineage Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
mV	Millivolt
PAK	p21-Aktivierte Kinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PRAK	p38 regulierte/aktivierte Kinase
PRb	Retinoblastoma Protein
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
RAC	Mitglied der kleinen GPCR-Subgruppe
Raf	Mitglied der kleinen GPCR-Subgruppe
RAS	Mitglied der kleinen GPCR-Subgruppe
RATTE #	Ratten Nummer
RV	Rechter Ventrikel
RWT	Rechtsventrikulärer Wanddurchmesser

SMA	Smooth muscle Actin
Samad 3	Transkriptionsprotein des TGF- $\beta$ Signaltransduktionswegs
Smad 4	Transkriptionsprotein des TGF- $\beta$ Signaltransduktionswegs
SRF	Serum Responsive Factor
SV	Schlagvolumen
TAB 1	TAK1 Bindendes Protein
TAK 1	TGF- $\beta$ Aktivierte Kinase-1
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktor- $\beta$
Thr	Threonin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
Tyr	Tyrosin
VSCM	Vascular smooth muscle cells

## 8.0. Literaturverzeichnis

- (1) Basha BJ, Sowers JR. Atherosclerosis: an update. *Am Heart J* 1996; 131(6):1192-1202.
- (2) Katz A. *Heart Failure: Pathophysiology, Molecular Biology and Clinical Management*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- (3) Bogoyevitch MA. Signaling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. [Review]. *Cardiovascular Research* 2000; 45(4):826-842.
- (4) Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):211-218.
- (5) Sugden PH, Clerk A. Stress-responsive mitogen-activated protein kinases (C-jun n-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) In the myocardium [Review]. *Circulation Research* 1998; 83(4):345-352.
- (6) Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 1997; 386(6622):296-299.
- (7) Sugden PH, Bogoyevitch MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart [Review]. *Cardiovascular Research* 1995; 30(4):478-492.
- (8) Kim SO, Baines CP, Critz SD, Pelech SL, Katz S, Downey JM, Cohen MV. Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochemistry & Cell Biology-Biochimie & Biologie Cellulaire* 1999; 77(6):559-567.
- (9) Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, hsp25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochemical Journal* 1998; 333(Part 3):581-589.
- (10) Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. Stimulation of stress-regulated mitogen-activated protein kinases (Stress-activated protein kinases c-jun n-

- terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) In perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(13):7228-7234.
- (11) Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH. Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1999; 31(12):2087-2099.
- (12) Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12(1):1-13.
- (13) Ruwhof C, van der LA. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research* 2000; 47(1):23-37.
- (14) Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH. Cellular stresses differentially activate c-jun n-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(50):29710-29717.
- (15) Bogoyevitch MA, Sugden PH. The role of protein kinases in adaptational growth of the heart [Review]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1996; 28(1):1-12.
- (16) Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways [Review]. *Cardiovascular Research* 2000; 45(3):560-569.
- (17) Glennon PE, Sugden PH, Poolewilson PA. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy [Review]. *British Heart Journal* 1995; 73(6):496-499.
- (18) Haq SA, Clerk A, Sugden PH. Activation of mitogen-activated protein kinases (P38-mapks, sapks/jnks and erks) By adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Letters* 1998; 434(3):305-308.

- (19) Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 1996; 271(30):17920-17926.
- (20) Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 1997; 272(48):30122-30128.
- (21) Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228(2):334-340.
- (22) Regan J, Breitfelder S, Cirillo P, Gilmore T, Graham AG, Hickey E, Klaus B, Madwed J, Moriak M, Moss N, Pargellis C, Pav S, Proto A, Swinamer A, Tong L, Torcellini C. Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. *J Med Chem* 2002; 45(14):2994-3008.
- (23) Bogoyevitch MA, Gillespiebrown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Benlevy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart-p38/rk mitogen-activated protein kinases and c-jun n-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion [Review]. *Circulation Research* 1996; 79(2):162-173.
- (24) Sugden PH, Clerk A. Regulation of the erk subgroup of map kinase cascades through g protein-coupled receptors [Review]. *Cellular Signalling* 1997; 9(5):337-351.
- (25) Behr TM, Berova M, Doe CP, Ju H, Angermann CE, Boehm J, Willette RN. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors for the treatment of chronic cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4(9):1059-1064.
- (26) Martin-Blanco E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 2000; 22(7):637-645.
- (27) Nagarkatti DS, Shaafi RI. Role of p38 map kinase in myocardial stress. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* 1998; 30(8):1651-1664.

- (28) Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(26):16415-16420.
- (29) Sugden PH, Fuller SJ, Michael A, Clerk A. Activation of mitogen-activated protein kinase subfamilies by oxidative stress in the perfused rat heart. *Biochemical Society Transactions* 1997; 25(4):S.
- (30) Wang YB, Huang SA, Sah VP, Ross J, Brown JH, Han JH, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(4):2161-2168.
- (31) Zhang S, Weinheimer C, Courtois M, Kovacs A, Zhang CE, Cheng AM, Wang Y, Muslin AJ. The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 111(6):833-841.
- (32) Behr TM, Nerurkar S.S., Nelson A.H., Lee JC, Sisko J., Sackner-Bernstein J.D., Willette R.N. Sustained activation of cardiac p38 mitogen activated protein kinase in the development of heart failure: premature mortality is abolished by chronic p38 inhibition in a rat model of cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* October, Suppl. 2000.
- (33) Barone FC, Irving EA, Ray AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, White RF, McVey MJ, Legos JJ, Erhardt JA, Nelson AH, Ohlstein EH, Hunter AJ, Ward K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(2):312-321.
- (34) Riede UN, Schäfer HE. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Auflage, Thieme Verlag, 488-491. 1995.
- (35) Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000; 46(2):250-256.
- (36) Yin TG, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai TW, Whelan J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in

- ischemic/reperfused heart and kidney. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(32):19943-19950.
- (37) Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Yazaki Y. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB Journal* 1996; 10(5):631-636.
- (38) Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101(25):2981-2988.
- (39) Kacimi R, Chentoufi J, Honbo N, Long CS, Karliner JS. - Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection.(1):-50.
- (40) Clerk A, Michael A, Sugden PH. 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. *Journal of Cell Biology* 1998; 142(2):523-535.
- (41) Zechner D, Craig R, Hanford DS, Mcdonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 1998; 273(14):8232-8239.
- (42) Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang CL, Lee JC, Feuerstein GZ, Yue TL. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1999; 99(13):1685-1691.
- (43) Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, Mcdonough PM, Glembotski CC. p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem* 2000; 275(31):23814-23824.

- (44) Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(10):6272-6279.
- (45) Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL, Huang CK, Sha'afi RI. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol* 1998; 160(4):1982-1989.
- (46) Nick JA, Young SK, Arndt PG, Lieber JG, Suratt BT, Poch KR, Avdi NJ, Malcolm KC, Taube C, Henson PM, Worthen GS. Selective suppression of neutrophil accumulation in ongoing pulmonary inflammation by systemic inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* 2002; 169(9):5260-5269.
- (47) Nick JA, Avdi NJ, Young SK, McDonald PP, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS. An intracellular signaling pathway linking lipopolysaccharide stimulation to cellular responses of the human neutrophil: the p38 MAP kinase cascade and its functional significance. *Chest* 1999; 116(1 Suppl):54S-55S.
- (48) Cara DC, Kaur J, Forster M, McCafferty DM, Kubes P. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J Immunol* 2001; 167(11):6552-6558.
- (49) Burysek L, Syrovets T, Simmet T. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277(36):33509-33517.
- (50) Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000; 46(2):214-224.
- (51) Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. Differential signaling for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947:387-389.



- (52) Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108(17):2134-2140.
- (53) Mostafa ME, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, Feldman LJ. Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 2001; 49(4):882-890.
- (54) Osteen KG, Bruner-Tran KL, Ong D, Eisenberg E. Paracrine mediators of endometrial matrix metalloproteinase expression: potential targets for progestin-based treatment of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:139-146.
- (55) Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol* 2001; 18(4):669-681.
- (56) Kopp CW, Hoelzenbein T, Steiner S, Marculescu R, Bergmeister H, Seidinger D, Mosberger I, Kaun C, Cejna M, Horvat R, Wojta J, Maurer G, Binder BR, Breuss JM, Ecker RC, De Martin R, Minar E. Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor: in vivo and in vitro evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity. *Blood* 2003.
- (57) Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks MJ, Plinkert PK, Koitschev A, Zenner HP. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp Cell Res* 2001; 271(2):344-355.
- (58) Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW, Griswold DE. SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(5):L895-L902.
- (59) Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, Hauet AM, Escobar PG, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ, Zile MR, Spinale FG. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284(1):H364-H371.

- (60) Herzog E. Early Activation of Metalloproteinases after Experimental Myocardial Infarction Occurs in Infarct and Non-infarct Zones. *Cardiovascular Pathology* 1998; Volume 7(Issue 6):307-312.
- (61) Ju H, Nerurkar S, Sauermelch CF, Olzinski AR, Mirabile R, Zimmerman D, Lee JC, Adams J, Sisko J, Berova M, Willette RN. Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301(1):15-20.
- (62) Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304(1):8-14.
- (63) Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc Res* 1994; 28(11):1623-1628.
- (64) Whittaker P. Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1995; 29(6):758-762.
- (65) Akiyama-Uchida Y, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Tsukazaki T, Kikuchi H, Yamashita S, Yano K. Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2002; 40(2):148-154.
- (66) White M, Rouleau JL, Hall C, Arnold M, Harel F, Sirois P, Greaves S, Solomon S, Ajani U, Glynn R, Hennekens C, Pfeffer M. Changes in vasoconstrictive hormones, natriuretic peptides, and left ventricular remodeling soon after anterior myocardial infarction. *Am Heart J* 2001; 142(6):1056-1064.
- (67) Thuerlauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, Demartin KM, Mcdonough PM, Prywes R, Glembotski CC. P38 mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element - a potential role for the transcription factor atf6. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(32):20636-20643.
- (68) Armstrong PB, Armstrong MT. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470(2):O9-20.

- (69) Hynes RO. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6):2588-2590.
- (70) Hynes RO. *Fibronectins*. 1990. Springer Verlag, New York.
- (71) Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(9):1363-1370.
- (72) Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol* 2000; 190(3):300-309.
- (73) Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(11):1769-1776.
- (74) Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995; 281(3):421-433.
- (75) Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(6):837-846.
- (76) Kim S, Kawamura M, Wanibuchi H, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Iwao H. Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the expression of immediate-early genes and fibronectin in rat injured artery. *Circulation* 1995; 92(1):88-95.
- (77) Pickering JG, Chow LH, Li S, Rogers KA, Rocnik EF, Zhong R, Chan BM. alpha5beta1 integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol* 2000; 156(2):453-465.
- (78) Assoian RK, Marcantonio EE. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1996; 98(11):2436-2439.

- (79) Assoian RK, Marcantonio EE. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1997; 100(11 Suppl):S15-S18.
- (80) Hedin U, Bottger BA, Luthman J, Johansson S, Thyberg J. A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Dev Biol* 1989; 133(2):489-501.
- (81) Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1988; 107(1):307-319.
- (82) Zhu X, Ohtsubo M, Bohmer RM, Roberts JM, Assoian RK. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 1996; 133(2):391-403.
- (83) Chana RS, Martin J, Rahman EU, Wheeler DC. Monocyte adhesion to mesangial matrix modulates cytokine and metalloproteinase production. *Kidney Int* 2003; 63(3):889-898.
- (84) Perez RL, Roman J. Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation. *J Immunol* 1995; 154(4):1879-1887.
- (85) Roth P, Polin RA. Induction of monocytic cell adherence to matrix-bound fibronectin by phorbol ester. *J Clin Lab Immunol* 1992; 37(2):51-63.
- (86) Mosesson MW. The role of fibronectin in monocyte/macrophage function. *Prog Clin Biol Res* 1984; 154:155-175.
- (87) Beppu M, Hora M, Watanabe M, Kikugawa K. Binding and uptake of oxidized low density lipoprotein (LDL) by macrophage scavenger receptors are enhanced by substrate-bound fibronectin. *Biol Pharm Bull* 1995; 18(6):802-809.

- (88) Falcone DJ, Salisbury BG. Fibronectin stimulates macrophage uptake of low density lipoprotein-heparin-collagen complexes. *Arteriosclerosis* 1988; 8(3):263-273.
- (89) Kreisberg JI, Garoni JA, Radnik R, Ayo SH. High glucose and TGF beta 1 stimulate fibronectin gene expression through a cAMP response element. *Kidney Int* 1994; 46(4):1019-1024.
- (90) Asem EK, Novero RP. Stimulation of fibronectin production and deposition by chicken granulosa cells in vitro by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Reprod Fertil* 1994; 101(2):375-384.
- (91) Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93(6):2431-2437.
- (92) Boudreau N, Clausell N, Boyle J, Rabinovitch M. Transforming growth factor-beta regulates increased ductus arteriosus endothelial glycosaminoglycan synthesis and a post-transcriptional mechanism controls increased smooth muscle fibronectin, features associated with intimal proliferation. *Lab Invest* 1992; 67(3):350-359.
- (93) Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest* 1991; 88(3):904-910.
- (94) Howe PH, Cunningham MR, Leof EB. Distinct pathways regulate transforming growth factor beta 1-stimulated proto-oncogene and extracellular matrix gene expression. *J Cell Physiol* 1990; 142(1):39-45.
- (95) Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 2000; 190(3):343-348.
- (96) Wang L, Ma R, Flavell RA, Choi ME. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for activation of p38alpha and p38delta MAPK isoforms by TGF-beta 1 in murine mesangial cells. *J Biol Chem* 2002; 277(49):47257-47262.

- (97) Sano Y, Harada J, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8949-8957.
- (98) Gruden G, Zonca S, Hayward A, Thomas S, Maestrini S, Gnudi L, Viberti GC. Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor- beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 2000; 49(4):655-661.
- (99) Kucich U RJSGAWHASSRJ. TGF-beta1 stimulation of fibronectin transcription in cultured human lung fibroblasts requires active geranylgeranyl transferase I, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-delta, and p38, but not erk1/erk2. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374(2):313-324.
- (100) Ohashi N, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Miyamoto T, Nakano A, Sasayama S. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(12):2521-2526.
- (101) Hedges JC, Singer CA, Gerthoffer WT. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(1):86-94.
- (102) Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA, Gerthoffer WT. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274(34):24211-24219.
- (103) Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno H, Saito Y, Mori S. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274(20):13954-13960.
- (104) Duan C. The chemotactic and mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to insulin-like growth factor-I require the activation of ERK1/2. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 206(1-2):75-83.
- (105) Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, Iwao H. Role of JNK, p38, and ERK in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular

Proliferation, Migration, and Gene Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5):795-801.

- (106) Zhao M, Liu Y, Bao M, Kato Y, Han J, Eaton JW. Vascular smooth muscle cell proliferation requires both p38 and BMK1 MAP kinases. *Arch Biochem Biophys* 2002; 400(2):199-207.

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. C. E. Angermann für die freundliche Überlassung des Themas und für die Ermöglichung des Auslandsaufenthaltes als Gastwissenschaftlerin im Center of Excellence for Drug Discovery and Development: Cardiovascular Department, GlaxoSmithKline, King of Prussia, PA, USA, wo der Hauptteil dieser Arbeit entstanden ist. Ferner bin ich ihr für die Unterstützung in meinem klinischen Werdegang und für die Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit zu großem Dank verpflichtet.

Herzlichst möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Thomas M. Behr für das offene und begeisternde Geleit in die Welt der molekularbiologischen Forschung und für die geduldige, verständnisvolle und ideenreiche Anleitung im Lern- und Entstehungsprozess dieser Arbeit danken. Ganz besonderes möchte ich mich bei ihm auch für seinen Einsatz und sein Vertrauen bedanken und nicht zuletzt dafür, daß er mich auf diesem Abschnitt meines Lebenswegs als treuer Ratgeber und guter Freund durch zahlreiche Höhen und Tiefen begleitet hat.

Mein besonderer Dank gilt hier auch seiner Familie für die herzliche Aufnahme und für das Verständnis für manche der Wissenschaft gewidmeten Stunden.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn R. N. Willette für die großzügige Bereitstellung des Labors und der Arbeitsmaterialien, sowie für die intensiven und anregenden Diskussionen mit einem beispielhaften Wissenschaftler und Lehrer.

Danken möchte ich auch Frau S. S. Nerurkar für die Einleitung und die Anleitung und die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit und für die gute Zusammenarbeit im Labor und außerhalb.

Nicht zuletzt sei dem ganzen Team des Center of Excellence for Drug Discovery and Development, Cardiovascular Department, GlaxoSmithKline für die freundliche Unterstützung gedankt.



Und ganz besonders möchte ich mich bei meinen Nächsten bedanken, die mich während dieser Arbeit begleitet haben und mich immer in dem Glauben bestärkt haben, auf dem richtigen Weg zu sein.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

NAME: Marinela Gueorguieva Berova  
GEBURTSDATUM: 12.05.1974  
GEBURTSORT: Sofia, Bulgarien  
FAMILIENSTATUS: ledig  
KONFESSION: bulgarisch - orthodox  
ELTERN:  
Mutter: Dr. Tzvetanka Todorova - Mintscheva, Fachärztin für Kardiologie  
Vater: Prof. Dr. Georgi Berov Kuntshev, Professor für Maschinenbau an der Technischen Universität, Sfax, Tunesien

### Ausbildung

1981 - 1984 Grundschule, Sofia, Bulgarien  
1984 - 1988 Hauptschule, Sofia, Bulgarien  
1988 - 1992 Gymnasium, Sofia, Bulgarien  
1992 - 1993 Studienkolleg, München, Deutschland  
1993 - 2000 Studium der Humanmedizin an der LMU - München  
1995, August „Physikum“ in München  
1996, August 1. Staatsexamen in München  
1999, März 2. Staatsexamen in München  
2000, April 3. Staatsexamen in München

### Beruflicher Werdegang

06/00-03/01 Gastwissenschaftlerin im Center of Excellence for Drug Discovery and Development: Cardiovascular Department, GlaxoSmithKline, PA, USA  
6/2001 bis 11/2002 ÄiP an der Medizinischen Poliklinik (Direktor Professor Dr. K. Wilms) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Seit 12/2002 Assistenzärztin an der Medizinischen Poliklinik der Julius-Maximilians-Universität

**Sprachliche Kenntnisse:** Deutsch, Englisch, Bulgarisch und Mazedonisch (fließend), Russisch (Grundkenntnisse)

Würzburg, den 25.05.04