

Aus dem
Institut für kardiovaskuläre Forschung (Center für Cardiovascular Research)
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Einfluss der Inhibition von Kollagen und HIF1alpha- Prolyl-4-Hydroxylasen auf
Volumenbelastung induzierte myokardiale Umbauprozesse

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Evelyn Schuch
aus Meiningen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Priv.-Doz. Dr. med. J. Strametz-Juranek
3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Schulz-Menger

Datum der Promotion: 21.11.2008

Christina und Norbert in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Publikationen

Originalarbeiten:

1. Fielitz, J; Philipp, S; Herda, LR; Schuch, E; Pilz, B; Schubert, C; Günzler, V; Willenbrock, R; Regitz-Zagrosek, V; Inhibition of prolyl 4-hydroxylase prevents left ventricular remodelling in rats with thoracic aortic banding;

Eur J Heart Fail. 2006 Dec 1; doi:10.1016/j.ejheart.2006.10.006

Kongressvorträge:

1. Steege, A; Bass, J; Herda, LR; Doller, A; Pregla, R; Zurbrügg, HR; Hetzer, R; Regitz-Zagrosek, V; The EDG-Receptors are functional in cardiac fibroblasts and are regulated in human heart failure;

24th Congress of the European Society of Cardiology; European Heart Journal 2002; 23(Suppl.):126

2. Fielitz, J; Philipp, S; Schuch, E; Herda, LR; Günzler, V; Willenbrock, R; Regitz-Zagrosek, V; Prolyl-4 hydroxylase inhibition leads to regression of left ventricular remodelling in chronic volume overloaded hearts;

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2004, Mannheim, Germany; Vortrag V1490; Zeitschrift für Kardiologie, 2004;93(Suppl.3):III / 295 – III / 296

3. Fielitz, J; Philipp, S; Herda, LR; Schuch, E; Günzler, V; Willenbrock, R; Regitz-Zagrosek, V; Prolyl-4 hydroxylase inhibition leads to regression of left ventricular remodelling in chronic pressure overloaded hearts;

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2004, Mannheim, Germany; Poster P1027; Zeitschrift für Kardiologie, 2004;93(Suppl.3):III / 399

4. Herda, LR; Fielitz, J; Philipp, S; Schuch, E; Pilz, B; Günzler, V; Willenbrock, R; Regitz-Zagrosek, V; Reduced left ventricular remodelling in rats with thoracic aortic constriction by Prolyl 4-hydroxylase inhibition;

16th European Student's Conference, Berlin, Germany, 2005.

Postervorträge:

1. Eder, S; Nordmeyer, J; Fielitz, J; Bethke, N; Schuch, E; Herda, LR; Regitz-Zagrosek, V; Myocardial estrogen receptor alpha regulation in cardiac disease;

1st summer school of Research Training Group 754; Berlin, 2003

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	8
1 EINLEITUNG	9
2 HERLEITUNG DER FRAGESTELLUNG	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Tiermodell und experimenteller Verlauf	17
3.2 Organmorphologie, Echokardiografie und hämodynamische Daten	17
3.2.1 Echokardiografie	17
3.2.2. Hämodynamik	18
3.2.3 Organmorphologie	18
3.3. Proteinanalyse	19
3.3.1. Proteinextraktion	19
3.3.2. Quantifizierung der Proteinmenge	19
3.3.3. Western Blot	20
3.3.4. Strippen der Membran	23
3.3.5. Kollagen- Quantifizierung	24
3.3.6. TGF- β 1 Quantifizierung	24
3.3.7. Quantifizierung von MMP1, MMP2, TIMP1 und Kollagen I	25
3.3.8. Zymographie	25
3.3.8.1. Elektrophorese	26
3.3.9. Densitometrie und Auswertung	28
3.4. mRNA Quantifizierung	28
3.4.1. RNA- Extraktion	28
3.4.2. DNase-I- Verdau	29
3.4.3. DNA Negativkontrolle	30
3.4.4. Reverse Transkription	30
3.4.5. Optimierung der PCR- Bedingung	31
3.4.6. Real- Time Polymerasen Kettenreaktion	32
3.5. Statistik	34

4. ERGEBNISSE	35
4.1. Organmorphologie, Echokardiografie und hämodynamische Daten	35
4.1.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS	35
4.1.2. Veränderungen bei ACS und gleichzeitiger Behandlung mit P4HI FG0041	36
4.1.3. Veränderungen bei ACS und gleichzeitiger Behandlung mit P4HI FG2216	38
4.1.4. Zusammenfassung des Kapitels	40
4.2. Regulation der neuroendokrinen Hormone und der Rezeptoren des Angiotensin- und Endothelin- Systems	42
4.2.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS	42
4.2.2. Einfluss des P4HI FG0041 und P4HI FG 2216 auf die mRNA- Expression	42
4.3. Regulation der Wachstumsfaktoren TGFβ1, CTGF, ITGβ1, OPN, HIF1α	43
4.3.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS	43
4.3.2. Einfluss des P4HI FG0041 und P4HI FG 2216 auf mRNA- und Proteinexpression	44
4.4 Regulation von Kollagen I und III	45
4.4.1. Identifikation von Kollagen im Western Blot	45
4.4.2. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS	46
4.4.3. Veränderungen bei ACS und Behandlung mit P4HI FG0041 und P4HI FG 2216	47
4.5 Regulation von Komponente der extrazellulären Matrix	48
4.5.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS	48
4.5.2. Einfluss der P4HI FG0041 und P4HI FG 2216 auf mRNA- Enzym- und Proteinexpression	51
4.6. Regulation der Fettstoffwechselmetaboliten	56
4.6.1. Veränderung durch Volumenbelastung mittel ACS	56
4.6.2. Einfluss des P4HI FG0041 und P4HI FG 2216 auf mRNA- und Proteinexpression	56
4.7. Korrelationen	57
4.7.1. Korrelationen innerhalb der aortocavalen Shuntgruppe	57

5. DISKUSSION	61
5.1. Veränderungen durch ACS	61
5.2. Veränderungen durch ACS und P4HI auf morphologischer und hämodynamischer Ebene	64
5.3. Veränderungen durch ACS und P4HI auf neuroendokriner Ebene	65
5.4. Veränderungen durch ACS und P4HI auf Wachstumsfaktoren	67
5.5. Veränderungen durch ACS und P4HI auf die Komponente der extrazellulären Matrix	68
5.6. Veränderungen durch ACS und P4HI auf die Metaboliten des Fettstoffwechsels	70
5.7. Hemmung der K-P4H, eine therapeutische Alternative ?	71
5.8. Hemmung der HIF-P4H, eine therapeutische Alternative ?	72
5.9. Limitationen	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
7. LITERATURVERZEICHNIS	78
8. DANKSAGUNG	85
9. LEBENS LAUF	85

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AoB	<u>B</u> anding der <u>A</u> orta ascendens
AngII	<u>A</u> ngiotensin <u>I</u> I
ACS	<u>A</u> orto- <u>C</u> avalier <u>S</u> hunt
CTGF β	<u>C</u> onnective- <u>T</u> issue- <u>G</u> rowth- <u>F</u> actor <u>β</u>
cDNA	komplementäre <u>D</u> NA
ECE1	<u>E</u> ndothelin- <u>C</u> onverting- <u>E</u> nzyme <u>1</u>
ELISA	<u>E</u> nzyme linked immunosorbend <u>A</u> ssay
ET1	<u>E</u> ndothelin <u>1</u>
ETRA	<u>E</u> ndothelin- <u>R</u> ezeptor <u>A</u>
ETRB	<u>E</u> ndothelin- <u>R</u> ezeptor <u>B</u>
GAPDH	<u>G</u> lyceraldehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GLUT4	<u>G</u> lukosetransporter <u>4</u>
HIF1 α	<u>H</u> ypoxia inducible factor <u>1</u> <u>α</u>
ITG β 1	<u>I</u> ntegrin <u>β1</u> Rezeptor
IVS	<u>I</u> nterventrikuläres <u>S</u> eptum
KOL I/III	<u>K</u> ollagen <u>I</u> und <u>III</u>
LV- FS	<u>L</u> inks ventrikuläres- <u>F</u> ractional <u>S</u> hortening
LVEDD	<u>L</u> inks ventrikulärer <u>E</u> nddiastolischer <u>D</u> urchmesser
LVESD	<u>L</u> inks ventrikulärer <u>E</u> ndsystolischer <u>D</u> urchmesser
LV-EF	<u>L</u> inks ventrikuläre- <u>E</u> jektionsfraktion
MMP	<u>M</u> atrixmetalloproteinase
NEP	<u>N</u> eutrale <u>E</u> ndopeptitase
OPN	<u>O</u> steopontin
PCR	<u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten- <u>R</u> eaktion (<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
P4HI	<u>P</u> rolyl- <u>4</u> - hydroxylase <u>I</u> nhibitor
PPAR	<u>P</u> eroxisome- <u>P</u> roliferator- <u>A</u> ctivator- <u>R</u> eceptor
RAAS	<u>R</u> enin- <u>A</u> ngiotensin- <u>A</u> ldosteron- <u>S</u> ystem
TIMP	<u>T</u> issue <u>I</u> nhibitor of <u>M</u> atrixmetalloproteinase
TGF β 1	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> aktor <u>β 1</u>

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Eine Hauptfunktion des Herzens ist die adäquate Bereitstellung von Sauerstoff zur Erfüllung der metabolischen Anforderungen des Körpers bei normaler und erhöhter Arbeitsleistung. Bei physiologisch und pathophysiologisch erhöhtem biomechanischen Stress, durch körperliches Training oder Erkrankungen, kommt es zu morphologischen Veränderungen des Herzmuskels, bekannt als myokardiale Hypertrophie. Diese Hypertrophie entsteht durch eine Zunahme der Herzmuskelzellgröße und dient der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion. Physiologische und pathologische Hypertrophie des Herzens sind hierbei strikt zu trennen. Die physiologische Hypertrophie wird vom Herzen gut toleriert und hat keinen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität der betroffenen Personen [89]. Demgegenüber führt die durch Klappenfehler (Abb.1), arteriellen Hypertonus, Myokardinfarkt und Ventrikelseptumdefekt entstehende pathologische Hypertrophie oft zu einer Herzinsuffizienz (Abb. 1), die in Industrieländern eine der führenden Todesursachen ist [36]. Darüber hinaus gilt die pathologische Myokardhypertrophie als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor für eine gesteigerte Morbidität und Mortalität von hospitalisierten Patienten [31; 32].

Die pathologische Hypertrophie wird in 2 Formen, die exzentrische Hypertrophie und die konzentrische Hypertrophie, unterteilt. Die exzentrische Hypertrophie wird durch eine chronische Volumenbelastung des Herzens verursacht und ist durch eine Dilatation des linken Ventrikels (LV) gekennzeichnet. Die konzentrische Hypertrophie, verursacht durch chronische Druckbelastung, führt dagegen zu einer Zunahme der Dicke der Ventrikelwand und zu einer Verengung des Ventrikellumes [31, 32, 88].

Die Pathogenese der konzentrischen Hypertrophie ist Gegenstand intensiver Forschung, wohingegen die Datenlage zur exzentrischen Hypertrophie spärlicher ist. Die Aufklärung der Mechanismen der Entstehung und Progression der exzentrischen Hypertrophie könnte die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien darstellen.

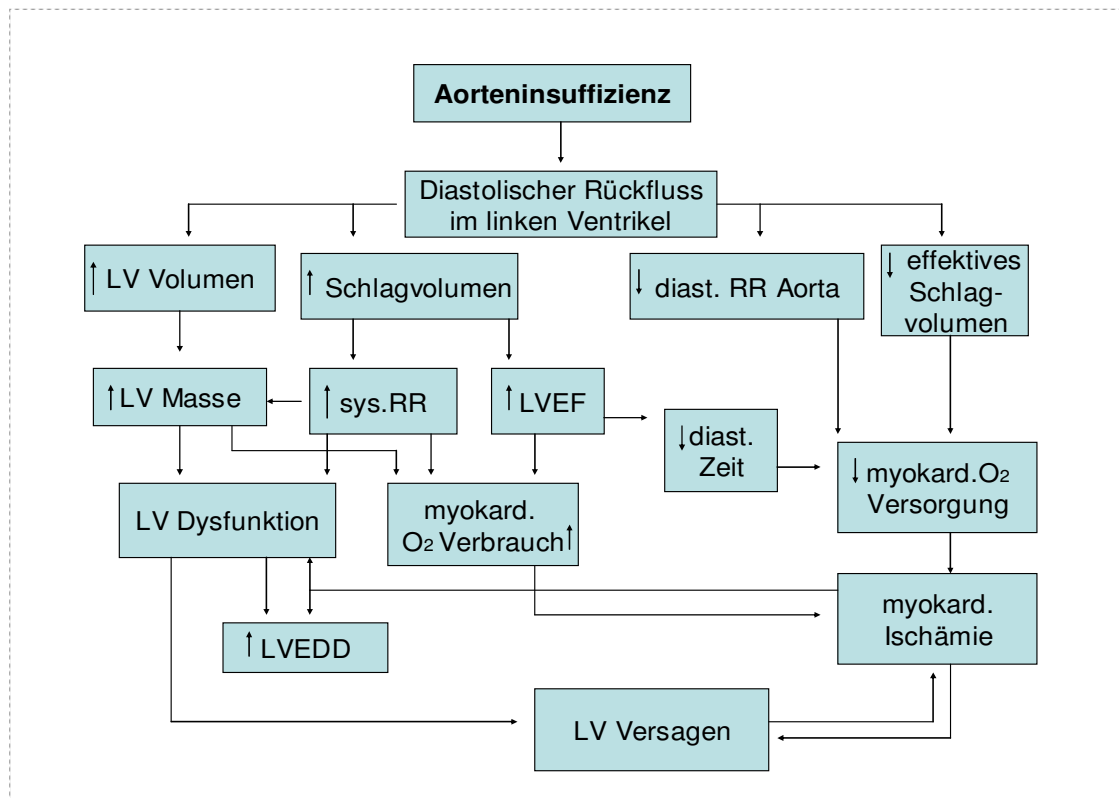


Abb.1 Pathophysiologie eines Modells Für Volumenbelastung (modifiziert nach [89])

1.2. Stressbedingte Umbauprozesse des Herzens

Eine chronische Volumenbelastung führt zu einem Anstieg des enddiastolischen Volumens des Herzens und des ventrikulären Gewichtes [88] sowie zu einer frühzeitigen systolischen Funktionseinschränkung [14]. Obwohl die linksventrikuläre Funktion anfänglich durch die Dilatation der Herzkammern und die kompensatorische Hypertrophie des Herzens aufrechterhalten wird, kommt es bei einem chronischen Verlauf zu einem pathologischen strukturellen Umbau des Myokards. Die Grundlage für die Entstehung der kompensatorischen Hypertrophie und der molekulare Mechanismus für den Übergang der kompensierten zur dekompenzierten Hypertrophie ist unzureichend erforscht. Ein wichtiges histopathologisches Unterscheidungsmerkmal von dekompenzierter Hypertrophie zur kompensierten Hypertrophie ist die interstitielle Kollagenablagerung, die auch Fibrose genannt wird, bei der dekompenzierten Hypertrophie [44, 15, 79]. Die genauen Mechanismen dieser Fibroseentstehung beginnt man gerade zu verstehen. So wurde eine Aktivierung von kardialen neuroendokrinen Systemen, Wachstumsfaktoren und eine Fehlregulation der extrazellulären Matrix umbauenden Enzyme (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) beim Menschen und in verschiedenen Tiermodellen beschrieben [23]. Von den neuroendokrinen Systemen sind insbesondere das kardiale Endothelin- und Renin-Angiotensin-Aldosteron System bei

pathologischer linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) aktiviert [27]. Die Aktivierung zeigt sich in einer gesteigerten Expression von Endothelin 1 (ET1) im linken Ventrikel und erhöhten Serum-ET1-Konzentrationen, die mit dem Schweregrad des Herzversagens korrelierten [9]. Des Weiteren werden ET1 und der kardiale Endothelin-Rezeptor Typ A (ETRA) bei chronischer Druckbelastung vermehrt von kardialen Fibroblasten exprimiert [52]. Da ET1 das Zellwachstum, die Synthese von Kollagenproteinen und die MMP Aktivierung in kultivierten kardialen Fibroblasten fördert, könnte es eine Rolle bei der Entstehung von kardialen Umbauprozessen spielen.

Darüber hinaus werden profibrotische Prozesse durch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems [27], erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren [7] sowie durch Veränderungen des dynamischen Gleichgewichtes zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix gesteigert. Neuroendokrine Hormone, wie Aldosteron und Angiotensin II (Ang II) aktivieren Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Faktor β 1* (TGF β 1) und *Connective tissue growth factor* (CTGF), welche die Expression von Kollagen Typ I und III (KOL I/ III) steigern und zu einer Fehlregulation von MMPs und TIMPs führen und so pathologische Umbauprozesse induzieren [50]. Die Stressmediatoren *beta 1 integrin* (ITG β 1), und *Osteopontin* (OPN) werden ebenfalls durch chronische Volumenbelastung aktiviert [37]. Sie wirken durch die Verbindung von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) mit dem Zytoskelett als Sensor der mechanischen Belastung des Herzens und vermitteln so die Expression hypertrophie-assoziiierter Gene. Die Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges wird dadurch verdeutlicht, dass eine Keimbahn-deletion von Integrin zu kardialer Hypertrophie und Insuffizienz führt [74]

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass es bei der pathologischen Herzhypertrophie zu einer gesteigerten Kollagen Expression und Anreicherung im Herzen kommt. Diese Kollagenakkumulation, oder Fibrose, führt zu einem Anstieg des links-ventrikulärem enddiastolischen Drucks (LVEDP) [27] und einer Einschränkung der systolischen Funktion des Herzens [39]. Eine Hemmung der myokardialen Fibrose könnte daher zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führen und den Übergang der kompensierten in die dekompenzierte Hypertrophie hemmen.

Matrix Metalloproteinasen, eine Gruppe von Zink- abhängigen Enzymen [85; 20], die vor allem Strukturkollagene wie KOL I/ III abbauen, scheinen beim Übergang von der kompensierten zur dekompensierten Hypertrophie wichtig zu sein [75]. Insbesondere die Kollagenasen (MMP1, MMP8 und MMP13) und die Gelatinasen (MMP2, MMP9) scheinen bei myokardialen Umbauprozessen bedeutsam zu sein [58]. So ist beschrieben, dass hauptsächlich MMP1 KOL I und III teilt (in 1/3 und 2/3 Fragmente), welche durch die Gelatinasen weiter abgebaut werden. Die Aktivität von MMPs wird durch die *Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen* (TIMP), von denen bisher vier verschiedene beschrieben wurden (TIMP 1-4) gehemmt [61]. Die biologische Bedeutung der TIMPs wird z.B. dadurch gezeigt, dass Mäuse mit einer Keimbahndeletion für TIMP1 eine gesteigerte Mortalität nach Myokardinfarkt verglichen mit Wildtyp- Tieren aufweisen [22]. Weiterhin war die linksventrikuläre Kontraktilität geringer und der Grad der LVH größer als bei den Wildtyp Mäusen [22]. TIMP2 geht einen Komplex mit den membranständigen MMPs (MT-MMP) ein, wobei dieser Komplex die Aktivität der pro-MMP2 und pro-MMP9 erhöht. Die Funktion des vor allem im Herzen exprimierten TIMP4 ist gegenwärtig noch nicht sicher [55], es wird mit einer gesteigerten Apoptose von kardialen Fibroblasten in Verbindung gebracht.

Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs führt zu einem gestörten Kollagenstoffwechsel und Kollagenakkumulation im LV und ist daher mitverantwortlich für den resultierenden Matrix-Umbau [68,55]. So wurde gezeigt, dass es bei humaner Aortenstenose (AS) zu einer vermehrten mRNA- und Proteinexpression, sowie Ablagerungen der Kollagene Typ I und III kommt [27,28], welche hauptsächlich durch MMP1 abgebaut werden. So wurde die vermehrte Kollagen Expression wurde von einer Fehlregulation von MMPs und TIMPs, mit einem Anstieg von MMP2, 3 und TIMP3 sowie einer Reduktion von MMP1, 9 und TIMP1 Expression, begleitet [27,28]. Das Zusammenspiel von gesteigerter Kollagenexpression und das Ungleichgewicht der Kollagen abbauenden Enzyme könnten eine Ursache für myokardiale Fibrose bei Patienten mit AS sein.

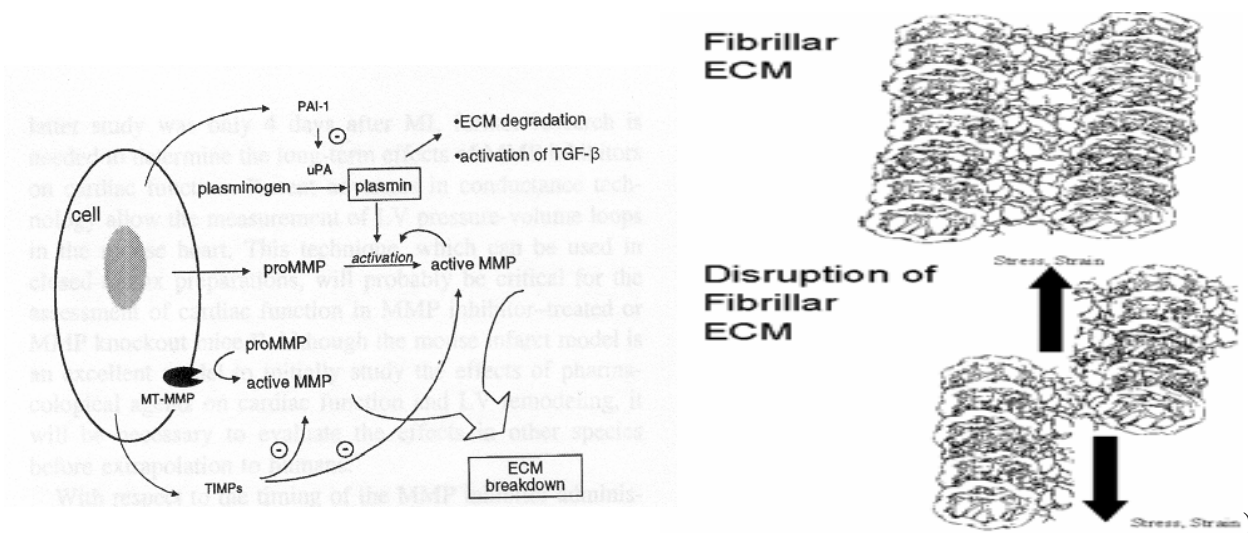


Abbildung 1: *Grafik links:* Aktivierung und Deaktivierung von MMPs innerhalb der extrazellulären Matrix (ECM) [9] *Grafik rechts:* Ein Ungleichgewicht zwischen MMP und TIMP führt zu einer Umwandlung der ECM und Ruptur der fibrillären ECM unter kardialen Stressbedingungen [21].

1.3. Kardialer Metabolismus

Der Energiemetabolismus des Herzens hängt zum größten Teil von der mitochondrialen Oxidation langkettiger Fettsäuren ab. Bei der pathologischen LVH kommt es zu einer Änderung der für die Energiegewinnung verwendeten Substanzen mit einer verminderten Fettsäure- und gesteigerten Glukose- und Laktatverwertung [53], was zu einem verringerten Sauerstoffverbrauch pro Mol ATP [6] führt. So führt die reduzierte Fettsäureoxidation im Myokard chronisch herzinsuffizienter Patienten zu einer Akkumulation von Lipiden im Herzmuskel [6]. Gene die in der Fettsäureoxidation involviert sind, werden durch die *Peroxisome Proliferator activated receptors* (PPARs) reguliert. Die 3 Isoformen α , β/δ und γ gehören zu der nukleären Hormonrezeptorfamilie und werden durch verschiedene Liganden, wie ungesättigte Fettsäuren und Medikamente aktiviert (z.B. Statine regulieren PPAR α und Thiazolidinedione PPAR γ). PPAR α , der vorherrschende PPAR-Rezeptor im Herzen, ist an der Vermittlung der physiologischen und pathologischen Hypertrophie beteiligt [54]. Es wurde gezeigt, dass bei chronischer Druckbelastung, als adaptive Antwort, die Genexpression von PPAR α verringert ist [54] und dass eine Reaktivierung der PPAR α -Aktivität, durch einen PPAR-Agonisten eine kontraktile Dysfunktion in chronisch druckbelasteten Rattenherzen hervor ruft [87]. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass PPAR γ die hypertrophie- assoziierte

Genexpression durch die Expression von TGF β 1- und CTGF β mRNA induziert und eine Hypertrophie der Kardiomyozyten bewirkt [2].

1.4. Rolle von HIF1 α bei kardialer Hypertrophie

Ein weiteres histopathologisches Unterscheidungsmerkmal der pathologischen von der physiologischen LVH ist eine verminderte Kapillarisation des hypertrophierten Myokards, was zu einer reduzierten myokardialen Sauerstoffversorgung führt, obgleich das Myokard einen gesteigerten Sauerstoffbedarf hat. Dieser chronische myokardiale Sauerstoffmangel könnte eine weitere Ursache für die pathologischen Umbauprozesse im hypertrophen Herzen sein. Zelluläre Antworten auf Sauerstoffmangel werden durch den Transkriptionsfaktor *hypoxie inducible factor 1 α* (HIF1 α) reguliert [60; 73]. HIF1 α ist im mechanisch belasteten Myokard, in ischämischen Geweben sowie bei Tumoren heraufreguliert [73]. HIF1 α hat auf die Sauerstoffversorgung des Myokards einen indirekten, positiven Effekt durch Steigerung der Expression von Erythropoetin und der dadurch bedingten Vermehrung von Erythrozyten, die eine verbesserte myokardiale Sauerstoffversorgung bewirken. Direkte Wirkungen von HIF1 α sind unter anderem die Steigerung des proangiogenetischen Faktors *VEGF* (*vascular endothelin growth factor*), der die Kapillarisation in den Epithelien und der Lunge bei Stress steigert und dadurch die Sauerstoffversorgung des Gewebes verbessert sowie die Förderung der NO-Synthese aus dem Epithel [4; 47]. Der Abbau von HIF1 α wird v.a. durch eine Gruppe von Isoenzymen, den Prolyl-4-Hydroxylasen (P4H) reguliert [52], welche HIF1 α unter normoxischen Bedingungen rasch abbauen. Unter Hypoxie hingegen werden P4H inaktiviert und so die Aktivität von HIF1 α gesteigert. Dieser Sachverhalt könnte auch therapeutisch genutzt werden, da durch eine Beeinflussung der P4H-Aktivität (z.B. deren Hemmung) auch gleichzeitig die HIF1 α -Proteinmenge und somit dessen Aktivität in der Zelle beeinflusst werden (z.B. gesteigert) könnte. Über eine Hemmung der P4H könnten so HIF1 α -induzierbare Gene vermehrt exprimiert werden.

Therapeutische Beeinflussung der exzentrischen Hypertrophie bei chronischer Volumenbelastung

Die Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase (K-P4H) sind ein Schlüsselenzym der Kollagensynthese, durch dessen Einwirkung Prolin-Reste in Alpha-Monomeren von Kollagen hydroxyliert werden. Dieser Syntheseschritt sichert die thermische Stabilität der Kollagen-Tripelhelix. Eine Hemmung der K-P4H führt daher zur Synthese von instabilem Kollagen innerhalb des

endoplasmatischen Retikulum, welches nachfolgend lysosomal abgebaut wird [3, 30]. Dadurch können pathologische Fibroseprozesse gehemmt werden [42]. Ein P4H Inhibitor, das Phenantrolinon, FG0041, ist bereits oral verfügbar. FG0041 hemmt extrazelluläre Umbauprozesse nach akutem Myokardinfarkt im Rattenmodell [65]. Ob die Hemmung der K-P4H auch positive Effekte bei der exzentrischen Hypertrophie durch Volumenbelastung hat ist unklar.

FG2216, eine ebenfalls oral verfügbare Substanz, welche die HIF-P4H inhibiert, verhindert die Degradation von HIF1 α und stabilisiert es somit [42]. Bei der durch die chronische Volumenbelastung induzierten exzentrischen LVH vergrößern sich die Muskelzellen des Myokards, die Blutgefäße wachsen allerdings nicht mit, daher nimmt die Sauerstoffversorgung der Muskelzellen stetig ab. Der durch die exzentrische LVH verursachte gesteigerte Sauerstoffverbrauch kann nicht durch die vorhandenen Blutgefäße gedeckt werden und es kommt zu einer Minderperfusion des Myokards und einen Zelltod der nicht versorgten Muskelzellen [89]. Die Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Myokards durch HIF1 α und die Steigerung des proangiogenetischen Faktors *VEGF* (*vascular endothelin growth factor*) durch HIF1 α könnte daher einen positiven Effekt für den Verlauf der exzentrische LVH haben.

Beide Substanzen, FG0041 und FG2216, hemmen unterschiedliche P4H. Die Hemmung der K-P4H sollte eine reduzierte Kollagenablagerung und Fibrose und die Hemmung der HIF-P4H einen Anstieg von HIF1 α mit einer verbesserten kardialen Oxygenierung des hypertrophierten Myokards bewirken.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die beiden P4H Inhibitoren hinsichtlich der Beeinflussung von kardialer Hypertrophie und Fibrose bei experimenteller Volumenbelastung des Herzens in einem Rattenmodell zu untersuchen.

2 Herleitung der Fragestellung

Ein zusammenhängender Vergleich mehrerer zu Hypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz führender Faktoren bei chronischer Volumenbelastung fehlt. Es sollte deshalb die Veränderungen von neuroendokrinen Faktoren, Wachstumsfaktoren, Stressmediatoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und des Energiestoffwechsels während chronischer Volumenbelastung im Rattenmodell auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Dafür analysierten wir eine Vielzahl von mit LVH in Verbindung stehenden Genen und Proteinen in chronisch volumenbelasteten Rattenherzen. Eine wirksame Therapie der exzentrischen LVH bei chronisch volumenbelasteten Herzen gibt es nicht. Es sollte daher überprüft werden, ob die Gabe eines K-P4HI bzw. eines HIF1 α -P4HI positive Effekte bei myokardialen Umbauprozessen von chronisch volumenbelasteten Herzen hat. Um die pathogenetische Bedeutung der Hemmung von Kollagenakkumulation und einer HIF1 α Stabilisierung zu untersuchen, benutzten wir zwei verschiedene P4H-Inhibitoren: den synthetischen Phenantrolin- K-P4H-Inhibitor FG0041, welcher spezifisch die K-P4H hemmt und die Kollagenanreicherung reduziert, sowie FG2216, welcher HIF-P4H inhibiert und somit HIF1 α stabilisiert. Der synthetische Inhibitor FG0041, konnte in bereits veröffentlichten Studien myokardiale Umbauprozesse nach experimentellem Myokardinfarkt und Aortenstenose in der Ratte reduzieren [28, 65].

Zusammenfassend führte dies zu folgenden Aufgabenstellungen für die vorliegende Arbeit:

1.

Ein Tiermodell der rechts (links) ventrikulären Volumenbelastung durch aortocavalen Shunt (ACS) sollte hinsichtlich der transkriptionellen und translationellen Regulationen von profibrotischen und hypertrophen Faktoren (neurohumorale Faktoren, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix) untersucht werden.

2.

Der Effekt der Inhibition der K-P4H und HIF-P4H auf volumeninduzierte exzentrische Hypertrophie innerhalb des ACS-Modells sollte anhand funktioneller Daten sowie der Gen- und Proteinexpression charakterisiert werden.

3.

Der Vergleich beider Substanzen bezüglich Wirkspektrum und Effekt auf myokardiale Umbauprozesse.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell und experimenteller Verlauf

Die operative und postoperative Behandlung der Ratten erfolgte durch die AG PD Dr. Willenbrock. Die Darstellung des Verfahrens und der Ergebnisse erfolgt daher hier nur insoweit, als sie zum weiteren Verständnis innerhalb dieser Arbeit notwendig ist.

Männliche Wistar-Ratten (Moellegaard Animal Farm, Schönwalde) wurden unter Standardbedingungen bei kommerzieller Ratten-Nahrung und Wasser ad libitum gehalten. Die 28 Tage alten Tiere (330g–390g) wurden in einem randomisierten Verfahren der Kontrollgruppe mit Schein-Operation (Sham-Gruppe) oder der aorto-cavalen Shunt-Gruppe (ACS-Gruppe) zugeteilt. Die Anästhesie wurde durch Chloralhydrat (400mg/kg KG i.p.) eingeleitet. Das jeweilige Tier wurde orotracheal intubiert und beatmet.

Zur Erzeugung eines aorto-cavalen Shunts wurde eine Verbindung zwischen Aorta abdominalis und Vena cava inferior mittels Kanülierung erzeugt (n=35) [84].

Bei den Sham-Tieren (n=14) wurde die gleiche Operation mit Darstellung der Aorta abdominalis und Vena cava inferior ohne Anbringen eines Shunts durchgeführt. Diese Tiere erhielten die FG-Trägersubstanz Carboxymethylcellulose.

Die perioperative Mortalität betrug < 3%. Von Tag 2 bis Tag 28 erhielten die Ratten der ACS- und Sham-Gruppe randomisiert eine der folgenden Behandlungen:

- Sham und Behandlung mit FG-Trägersubstanz Carboxymethylcellulose (n=14)
- ACS und Behandlung mit FG Trägersubstanz Carboxymethylcellulose (CMC; n=15)
- ACS und Behandlung mit K-P4HI FG0041 in der Dosierung 25 mg/kg KG/d (FG 0041; n=10)
- ACS Behandlung mit P4HI FG2216 in der Dosierung 30 mg/kg KG/d (FG 2216; n= 10)

Die Applikation von Trägersubstanz, FG0041 und FG2216 wurde oral appliziert. Das Verfahren wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt und erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien des „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“ [63].

3.2 Echokardiografie, hämodynamische Daten und Organmorphologie

3.2.1 Echokardiografie

Die Echokardiografie wurde für sämtliche Gruppen am Tag 28 nach Anlage des ACS bzw. der Sham-Operation durchgeführt. Nach Sedierung der Tiere wurde mittels eines 15 MHz Schallkopfes (Acuson Sequoia, Erlangen) der linke Ventrikel in 2-dimensionaler Kurz- und Langachsensicht dargestellt. Die Daten wurden als M-Mode Bilder in Langachsenansicht gespeichert und die Diameter des LV endsystolisch (LVESD) und enddiastolisch (LVEDD) ausgewertet. Die LV Ejektionsfraktion (EF) als Funktionsparameter wurde mittels Fläche-Länge-Methode und den Kurz-/Langachsen-Projektionen berechnet. Alle echokardiografischen Messungen wurden von einem Untersucher durchgeführt, der bezüglich der Gruppierung der Tiere, der Art der Operation und der Behandlung geblindet war. Alle Messungen orientierten sich an den Richtlinien der American Society of Echocardiography.

3.2.2 Hämodynamik

30 Tage nach Durchführung des ACS wurden die Tiere wieder mittels Chloralhydrat sediert, intubiert und maschinell beatmet. Ein PE 50-Katheter wurde über die rechte V. jugularis interna in der V. cava superior zur Messung des zentralen Venendrucks (ZVD) platziert. Der arterielle Blutdruck (RRsys) wurde direkt über ein in der linken A. carotis liegendes Drucksystem gemessen. Zur Erhebung der linksventrikulären, hämodynamischen Daten wurde anschließend erneut eine Thorakotomie durchgeführt. Nach Präparation des Herzens wurde ein weiterer PE 50-Katheter unter Anwendung der Seldinger-Technik mittels einer 14G Nadel durch das Myokard der linksventrikulären Wand im LV Lumen platziert. Der linksventrikuläre enddiastolische (LVEDP) Druck wurde mit einem Statham Messwandler (P23XL) und einem Goldham Verstärker (AMP4600) registriert. Die linksventrikuläre Kontraktilität (dpdt/max und dpdt/min) wurde über die LV Druckkurven berechnet.

3.2.3 Organmorphologie

Zum experimentellen Endpunkt wurde nach Euthanasie der Tiere zunächst das Körpergewicht bestimmt. Herz und Lunge, sowie rechte und linke Niere wurden entnommen und die Gewichte mittels einer Feinwaage ermittelt. Das Herz wurde entsprechend den Grenzen des rechten und linken Atriums bzw. Ventrikels geteilt. Die separaten Kammern wurden noch einmal gesondert abgewogen. Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren biochemischen Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3 Proteinanalyse

3.3.1 Proteinextraktion

Gefrorene Myokardproben (ca. 50mg–80mg) wurden in autoklavierte 1,5ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Deutschland) überführt, auf einer Feinwaage (Fa. Eppendorf, Deutschland) exakt gewogen und in flüssigem Stickstoff bei -80°C gekühlt.

Die Myokardstücke wurden in gefrorenem Zustand in ein Reaktionsgefäß „Lysis Matrix Typ D“ umgefüllt (Carl Roth GmbH +Co). Es wurden jeweils 100 μl eines 1:400 verdünnten Gemisches aus Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma P2714; 100ng/ml Aprotinin, 100ng/ml Leupeptin und 100ng/ml Pepstatin) und gewichtsadaptiert Protein-Extraktions-Doppel-Detergenz-Lysis Puffer, bestehend aus 10mM Tris pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 25% Glycerol, 0,5% Nonident P-40, 0,5mM DTT sowie 0,5mM PMSF, hinzugefügt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte 30sec lang bei 2000rpm mit dem FastPrep Gerät (FP 120 von Bio101 Thermo Savant). Dieser Schritt wurde 2-3 Mal wiederholt, bis das Gewebe vollständig homogenisiert war. Das Lysis Matrix-Gefäß wurde zwischen den Wiederholungen auf $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlt, um eine Erwärmung des Gewebes und Degradation der Proteine zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,05mM SDS; der Ansatz wurde gemischt, 10min auf 4°C inkubiert und dann bei 14.000U/min, 10min bei 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und nach Abnahme von 20 μl Lysat zur Proteinmessung bei -80°C eingefroren.

3.3.2 Quantifizierung der Proteinmenge

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde der BCA-Essay-Kit (Nr.23225, Fa. Pierce, Rockford, USA) auf der Basis der Bradford-Reaktion verwendet. Als Leerwert diente der unter 3.3.1 verwendete Lysis-Puffer. Zur Berechnung des Proteingehaltes der Proben diente eine im Doppelansatz mitgeführte Verdünnungsreihe einer kommerziellen Albumin-Lösung (2000 $\mu\text{g/ml}$; Fa. Pierce, Nr. 23209) von 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$. Die jeweiligen Proben wurden ebenfalls als Doppelansatz in je 2 μl und 5 μl einer 1:1 und 1:10-Verdünnung mitgeführt. Die Verdünnung erfolgte mit HPLC-gereinigtem Wasser. Sämtliche Proben wurden in einer 96-Well-ELISA-Platte (Fa. Biozym, Deutschland) quantifiziert.

Die Probenvolumina wurden auf 20 μl mit HPLC Wasser aufgefüllt. Mittels einer Multipipette (Fa. Eppendorf, Deutschland) wurde anschließend 300 μl des BCA-Reaktions-Farbstoffgemisches (24,5ml BCA Protein Assay Reagent A plus 500 μl BCA Protein Assay

Reagent B) pro Well hinzugegeben und 30min bei 37°C in einem abgedunkelten Behälter inkubiert.

Die Messung der Extinktionswerte erfolgt in einem ELISA-Platten-Reader (MTX Spectramax 250, Fa. MTX, USA) bei 550nm. Die Einzelwerte wurden in den Verdünnungsstufen gemittelt, um die entsprechenden Verdünnungsfaktoren korrigiert und wiederum gemittelt und der Blank-Hintergrund-Wert abgezogen. Die so erhaltenen Myokard- bzw. Zellkulturproteinisolationen wurden schließlich auf eine einheitliche Konzentration von 5µg/µl gebracht, aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert.

3.3.3 Western Blot

3.3.3.1 SDS- Page

Die Detektion und Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mittels semiquantitativem Western Blot. Zunächst erfolgte hierzu eine Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gel-Vorrichtung (System „Mini- Protean“, Fa. BioRad, Deutschland bzw. System „DPR“, Fa. VWR International, Deutschland) wurden hierfür zunächst gewaschen, um Fett- und Gelreste zu entfernen.

Es wurden SDS-Gele unterschiedlicher Dichte, entsprechend der Größe des zu detektierenden Proteins verwendet. Für ein 10% Trenngel wurden 3,3ml 30% Acrylamid Mix (Fa. Roth, Deutschland), 2,5ml 1,5M TRIS pH 8,8 (Fa. Roth), 4,0ml Wasser (Millipore), 100µl 10% SDS (Fa. Roth), 100µl 10% APS (Fa. Roth) und 4µl TEMED p.a. (Fa. Roth) verwendet. Nach vollständiger Polymerisation wurde über das Trenngel ein 5%-iges Sammel-Gel, bestehend aus 5,5ml Wasser, 1,3ml 30% Acrylamid Mix, 1ml 1M TRIS pH 6,8, 80µl 10% SDS, 80µl 10% APS und 8µl TEMED gegossen und darin ein Kamm luftblasenfrei eingebracht.

Zur Probenvorbereitung wurden je nach Protein-Optimum ca. 10µg Protein je Probe mit nicht-reduzierendem Gelladepuffer „Rotiload 2“ (Fa. Roth, Deutschland) gemischt, 5min bei 95°C im Thermoblock denaturiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die in der SDS-PAGE einzusetzenden Proteinmengen wurden in Vorarbeiten bestimmt (siehe Optimierungsschritte).

Die erste Tasche wurde mit 5µl eines Molekulargewichts-Markers (MBI Fermentas, Prestained Protein Marker 10kDa-180kDa) befüllt, um einen Größenvergleich innerhalb des Gels zu gewährleisten. Die restlichen Taschen wurden mit den jeweiligen Proben beladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100V, 350mA (Stromtransformator, Fa. Amersham Pharmacia, EPS 301/200) in einer Elektrophoresekammer (Fa. Biozym), welche mit Elektrophoresepuffer (15.1g TRIS-Base, 94g Glycerin, 50ml 10% SDS, pH 8.3) gefüllt war. Die Laufzeit war abhängig von der Größe des zu detektierenden Proteins, zwischen 2½h - 3½h.

3.3.3.2 Transfer

Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) mittels Elektro-Blot. Nach Abtrennen des Sammel-Gels wurden die Gele in Transferpuffer (3,3g Glycin, 14.4g 1M TRIS-Acid pH 8.3, 200ml Methanol, Wasser ad 1000ml) 3x15min gewaschen und die Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. In Serie wurden Schaumstoffpads, Filterkartonpapier, Trenngel, Nitrocellulosemembran, Filterkartonpapier und zum Abschluss Schaumstoffpads übereinander gelegt und in ein Gitter eingespannt. Dieses „Sandwich“ wurde in die Blot-Apparatur eingespannt und mit 1l Transferpuffer umspült. Der Transfer erfolgte unter ständiger Kühlung der Blot-Apparatur mit einem Eisakku bei 60V, 350mA für 1h 20min. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Ponceau Rot-S (0,1% v/w in 5% Eisessig; Fa. Sigma Aldrich, Deutschland) für 1min gefärbt. Danach wurde die Membran 2-5min mit Aqua dest. gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Es verblieben sichtbar die Proteinbanden sowie die standardisierten Banden des Molekulargewichtsmarkers.

3.3.3.3 Hybridisierungen

Vor der Hybridisierung des 1. Antikörpers (AK) wurde die Membran eine Stunde in 5% Blocking Reagenz (BR; 5g Milchpulver in 100ml Tris-buffered Saline plus TWEEN20, TBS-T; 20mM TRIS-Base, 137mM NaCl, 800ml Millipore-Wasser, mit 1M HCl pH 7,6 Millipore-Wasser ad 1l, 0,1% Tween20) inkubiert. Der 1. AK wurde entsprechend der in den Optimierungsschritten ermittelten optimalen Konzentration verdünnt und in das entsprechende Lösungsmittel gegeben (Tab.1), die Membran wurde hinzu gegeben und 1h bzw. über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert (Abb.2A). Nach der Inkubation des 1. AK wurde die Membran einmal 15min und zweimal 5min in TBS-T gewaschen und die Verdünnung des mit *horseradish-peroxidase* (HRP) markierten 2. AK vorbereitet. Die Inkubationszeit des 2. AK betrug ebenfalls 1h bzw. über Nacht. Nach Hybridisierung des 2. AK wurde erneut einmal 15min und zweimal 5min in TBS-T gewaschen.

Die Detektion des Proteins erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung eines Reaktions-Kits (ECL Kit, Fa. Amersham Pharmacia) nach Herstellerprotokoll. Die Membranen wurden mit der Reaktionslösung für 4min überschichtet, was eine Farbreaktion durch HRP an

den gebundenen 2.AK bewirkte (Abb.2A). Anschließend wurden die Membranen in Cellulose verpackt und licht-geschützt zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodax Biomax Light-1, Fa. Kodak, Deutschland) in eine Filmkassette gelegt. Die Dauer der Exposition war abhängig von der Intensität der Chemilumineszenzreaktion. Die Filmentwicklung erfolgte mit einer Entwicklermaschine Protec 45 compact Typ 1120 (Fa. Protec Gerätebau GmbH, Deutschland).

Optimierungsschritte:

1. Die Prozentigkeit der Gele wurde entsprechend der Größe des zu detektierenden Proteins festgelegt. Für Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht wie MMP1 (53kDa) wurde ein 10%iges oder 12,5%iges Gel gegossen und GAPDH durch Strippen auf der gleichen Membran quantifiziert. Für Proteine mit einem hohen Molekulargewicht (z.B. Kollagen 1, 180kDa) wurde ein 8% Gel angefertigt und GAPDH in einem getrennten Lauf quantifiziert.
2. Zur Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge wurden Verdünnungsreihen für jedes Protein angefertigt und mit den jeweils spezifischen Ak detektiert. Die Verdünnungsreihe bestand aus einem Pool derjenigen Proben, die untersucht werden sollten. Die optische Dichte der Banden auf den entwickelten Filmen wurde mittels AlphaEase-Software ausgewertet und grafisch gegen die Konzentration der Verdünnungsreihe dargestellt. Anhand der Kalibrationskurve wurde die Proteinmenge berechnet. Es wurde darauf geachtet, dass die Quantifizierung der Proben im linear ansteigenden Bereich der Verdünnungsreihe erfolgte.
3. Die Ak-Konzentration wurde in mehreren Schritten festgelegt. Beginnend mit dem 1.AK wurden Verdünnungen in TBS-T (1:100, 1:500, 1:1000, etc.) bei gleich bleibender 2.AK-Konzentration (1:50.000 in TBS-T) für 1h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden die spezifischen, jeweils optimalen Banden bestimmt; diese wurden durch Veränderung der Konzentration des 2.AK (1:25.000 - 1:200.000 in TBS-T) optimiert bzw. unspezifische Banden und Hintergrund reduziert.

<i>Protein (kDa)</i>	<i>1. AK</i>	<i>2. AK</i>	<i>%-igkeit Gel</i>	<i>Menge Protein</i>
MMP1 Latent (51-53) Aktiv (43-44)	Chemicon AB 806 rabbit; 1:2500 in TBS-T	Dianova; Donkey anti-rabbit; 1: 100.000	10%	10µg
MMP2 (41)	Santa Cruz SC10736 Rabbit, 1: 300 in TBS-T	Dianova; Donkey anti-rabbit 1:700.000 in Blocking Reagenz	8%	10µg
TIMP1 (24)	Santa Cruz SC5538 Rabbit; 1: 200 in TBS-T	Dianova; Donkey anti-rabbit; 1: 60.000 in Blocking Reagenz	8%	15µg
TIMP3 (36)	Chemicon AB802 Rabbit; 1: 1.000 in TBS-T	1: 80.000 in Blocking Reagenz	12,5%	15µg
TIMP4 (23)	DPC Biermann DP073 Rabbit; 1: 400 in TBS-T	1: 60.000 in Blocking Reagenz	12,5%	10µg
ITGβ-1 (140)	Santa Cruz SC8978 rabbit; 1: 400 in TBS-T	Dianova; Donkey anti-rabbit; 1: 20.000 in TBS-T	8%	55µg
NEP (99)	Sante Cruz H321 SC9149 1:150 über Nacht in TBS- T	Dianova; Donkey anti- Rabbit 1:20.000 in TBS-T	8%	10µg
Kollagen I (210) Kollagen III (130)	DPC Biermann R1038 rabbit; 1: 2.000 in TBS-T	Dianova; Donkey anti-rabbit; 1: 200.000 TBS-T	8%	60µg
GAPDH (36)	Chemicon MAB374 Mouse; 1: 50.000 in TBS- T	Dianova; Donkey anti- mouse; 1: 25.000 in Blocking Reagenz	ent- sprechend	ent- sprechend

Tab. 1: Darstellung der untersuchten Proteine und des Molekulargewichtes in Kilo-Dalton (kDa) mit entsprechendem 1. und 2. Antikörper (AK; Firma, Bestellnummer, Herstellungstier, Konzentration und Lösungsmittel) und optimierten Western Blot Bedingungen (Konzentration des Sammelgels und eingesetzte Proteinmenge je Probe).

3.3.4 Strippen der Membran

Das Strippen der Membran erfolgte zur Entfernung der gebundenen Ak von der Membran. Nachfolgend wurde als externer Standard Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) auf dem gleichen Blot detektiert. Die Membranen wurden dazu über Nacht in Stripping Puffer bei 4°C (15g Glycin in 800ml Wasser auf pH 2.2 titriert, 1g SDS, 10ml TWEEN20, Wasser ad 1000ml) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Nitrozellulosemembranen zweimal 30min in TBS-T gewaschen und anschließend mit Ponceau-Rot S (Fa. Sigma, Deutschland) angefärbt,

um die verbliebenen Proteine sichtbar zu machen. Es folgten erneut Blocken mit 5% Blocking-Reagenz, Inkubation mit 1.AK (GAPDH) sowie 2.AK und Entwicklung der Filme (siehe 3.3.3).

3.3.5 Kollagen-Quantifizierung

Das Molekulargewicht der Kollagen-Proteine Typ I und III (210kDa bzw. 130kDa) erschwerte die spezifische Quantifizierung dieser Proteine. Zusätzlich traten unspezifische Bindungen des 1.Ak auf; die Kollagen Typ I Positiv-Kontrolle zeigte unspezifische Banden, was eine eindeutige Identifizierung des Proteins verhinderte. Zur Identifikation der spezifischen Bande wurde daher zusätzlich ein Kollagenase-Verdau eingeführt, um so durch Entfernen der potentiell spezifischen Bande eine eindeutige Identifikation derselben zu ermöglichen. Hierzu wurden 200mg lyophilisierter Kollagenase-I (Roche Applied Biosciences, EC 3.4.24.3) in 10ml PBS gelöst. Kollagenase-I spaltet Kollagen Typ I, II und III. Die Aktivierung der Kollagenase erfolgte durch Zusatz von 120µl 0,1M CaCl₂. Die Kollagen-Positiv-Kontrollen wurden zur Lösung in einen sauren pH-Bereich (7,2 bis 7,5) mit NaOH eingestellt, da ein saures Milieu die Kollagenase irreversibel inhibiert hätte. Die Protein-Proben wurden auf einen basischen pH-Bereich titriert. Zum Verdau wurden 10µl der Kollagenase-I-Lösung zu den Kontrollen und Protein-Proben pipetiert und bei 37°C für 2,5 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 – 40µl 0,7% Eisessig gestoppt. Unverdaute Proben, Proben nach Kollagenase-Verdau, unverdaute Positiv-Kontrollen sowie Positiv-Kontrollen nach Kollagenase-Verdau wurden anschließend einem Western-Blot, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, unterzogen.

3.3.6 TGF-β1 Quantifizierung

Die Quantifizierung von TGF-β1 erfolgte durch einen „*solid-phase*“ ELISA (Fa. Quantikine) als „*Sandwich*“-Immunassay (Abb.2B).

In einer 96-Well Microtiterplatte waren lösliche TGF-β1 Rezeptoren Typ II gebunden. Zur Bindung an die Rezeptoren wurde latentes TGF-β1 durch Säureaktivierung und anschließende Neutralisation in die aktive Form überführt. Hierzu wurden zu 30µl Protein (entsprechend 150µg Protein) 6µl 1N HCl gegeben und der Ansatz 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation wurde mit 6µl 1,2N NaOH / HEPES 0,5M durchgeführt. Ein ebenfalls aktivierter, mitgelieferter interner Standard rekombinanten TGF-β1 Proteins (Konzentration: 2000pg/ml) diente zur Erstellung der Eichkurve und zur Berechnung der jeweiligen Menge des Proteins in den Proben. 200µl der Standard-Verdünnungsreihe als Doppelwerte (2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml und 31,2pg/ml) und jeweils 200µl der aktivierten Proben wurden in die Wells der Microtiterplatte pipettiert und diese für 3 Stunden

inkubiert, wodurch TGF- β 1 an die Rezeptoren binden konnte (Abb.2B). Der Inhalt der Wells wurde entfernt und diese dreimal mit 400 μ l Waschpuffer pro Well gewaschen. Anschließend wurde je 200 μ l TGF- β 1-Konjugat in jedes Well pipettiert und 90min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 400 μ l pro Well Waschpuffer wurde je 200 μ l Substratlösung in jedes Well gegeben und für 20min in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Die so entstehende Färbung der Lösung war proportional zur TGF- β 1-Menge der Proben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l einer Säurelösung pro Well gestoppt. Die Microtiterplatte wurde kurz geschüttelt, um den Farbstoff gleichmäßig zu verteilen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem ELISA Platten Reader bei 450nm. Eine Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 540nm bzw. 570nm.

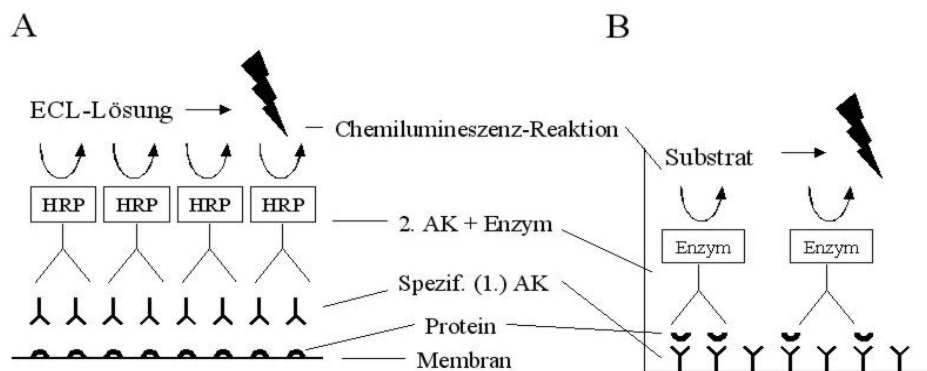


Abb. 2: Abbildung: Das Prinzip der TGF β Quantifizierung (Fa. Quantikine): Prinzip des Western Blots (A) und ELISA (B): Im Western Blot wird das auf der Membran gebundene Protein zunächst mit dem spezifischen 1. AK detektiert; es folgt die Bindung eines 2. AK, welcher mit einem Enzym verbunden ist. Dieses Enzym katalysiert eine Substratreaktion, deren emittiertes Licht proportional zur AK-Menge und somit zur Proteinmenge ist. Im ELISA ist der 1. AK an der Wand des Reaktionsgefäßes immobilisiert; das Protein bindet hieran. Ein 2. AK mit Enzym bindet ebenfalls spezifisch an das Protein, das Enzym katalysiert die Substratreaktion, die wiederum proportional zur Proteinmenge ist.

3.3.7 Quantifizierung von MMP1, TIMP1, TIMP2 und Kollagen I

Die Quantifizierung von MMP1, TIMP1, TIMP2 und Kollagen I erfolgte aufgrund des verminderten verfügbaren Materials durch einen „solid-phase“ ELISA nach dem Schema des TGF- β 1-ELISAs als „Sandwich“-Immunoassay. MMP1-ELISA (Oncogene, Nr. QIA55), TIMP1-ELISA (Oncogene, QIA54), TIMP2-ELISA (Oncogene, Nr. QIA40), Kollagen I-ELISA (Chondrex, Arthrogen-CIA, Nr. 1024).

3.3.8 Zymographie

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der MMPs wurden Zymographien durchgeführt. 10%ige Gelatine (Porcine Skin Type A Gelatine, Sigma-Aldrich, UK) wurde durch kurzes Erhitzen bei 150°C in einen flüssigen Zustand überführt, um sich homogene mit dem Polyacrylamid-

Gel zu vermischen. Die Gelvorrichtung wurde entsprechend 3.3.3 vorbereitet. Einem 10% Gel Ansatz (3,9ml Aqua bidest, 3,3ml 30% Polyacrylamid-Mix, 2,5ml 1,5M TRIS-Base pH 8,8, 100µl 10% SDS, 100µl 10% APS und 4µl TEMED p.a) wurde 100µl Gelatine hinzugefügt. Dieses Gel diente als Trenn- und Substrat-Gel. Nach vollständiger Polymerisation wurde hierüber ein 5%iges Sammel-Gel gegossen (siehe 2.3.3) und der Kamm eingebracht. Je 30µg Protein (Volumen 6µl) pro Probe wurde mit 18µl Aqua bidest. und 6µl nicht-reduzierendem Gel-Ladepuffer gemischt und zur Denaturierung 5min bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt, zentrifugiert und bei Raumtemperatur abgekühlt.

3.3.8.1 Elektrophorese:

Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (Fa. Biozym, Deutschland) eingespannt, die Pufferkammern wurden mit ca. 1* TRIS-Glycin Elektrophoresepuffer pH 8,3 (siehe 3.3.3.1) gefüllt. In die erste Proben-Tasche des Gels wurde 5µl eines Molekulargewichts-Markers (MBI Fermentas, Prestained Protein Marker 10kDa-180kDa), in die letzte Proben-Tasche 5µl einer MMP2 und MMP9 enthaltenden, 1:50 verdünnten Positiv-Kontrolle (Fa. Sigma) pipettiert, in die Taschen dazwischen die vorbereiteten Proben. Die Elektrophorese erfolgte durch Anschluss an einen Stromtransformator (Fa. Amersham Pharmacia, EPS 301/200) bei 100V, 40mA für 2,5h-4h unter ständiger Kühlung der Kammer durch einen Eis-Akku. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 2x30min in 2,5% Triton-X-100 (Roth, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert, um die Enzyme zu renaturieren. Es folgte die Inkubation des Gels in 100ml Enzym-Puffer nach Kleiner (50mM Tris-HCl pH 7,5 (Fa. Merck, Deutschland), 200mM NaCl (Fa. Merck, Deutschland), 5mM CaCl₂ (Fa. Roth, Deutschland) und 0,2% Brij-35 (Fa. Sigma) bei 37°C für 18h in einem Inkubator mit Schüttler (GFL 3003) bei 50-60U/min. Der Enzympuffer bewirkte optimale Bedingungen für die Enzyme, die während der Inkubationszeit die im Gel enthaltene Gelatine degradierten. Zur anschließenden Gelatine-Anfärbung wurden die Gele in 0,5% Coomassie-Blau (0,5% Coomassie- Blau R-250 (Fa. Bio-Rad), 30% Methanol (Fa. Roth, Deutschland) und 10% Eisessig (Fa. Roth, Deutschland) 3h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur angefärbt. Das Entfärben der Gele erfolgte durch Entfärberlösung (50% Methanol und 10% Eisessig) die 2-3-mal gewechselt wurden (15min, 30min und ggf. 60min lang). Es wurden nicht angefärbte weiße Banden (welche die Stellen der Gelatine-Degradation darstellten und deren Größe proportional zur Enzymaktivität war) gegen einen blauen Hintergrund sichtbar. Schließlich wurden die Gele mit Fixierungspuffer (30% Ethanol; Fa. Roth, Deutschland), 10% Glycin (Fa. Roth, Deutschland) über 1h bei Raumtemperatur fixiert und in Cellophan-Folie versiegelt. Zur Normalisierung wurde der jeweilige Gehalt des Proteins β -Actin herangezogen. Hierzu wurde ein 10%iges SDS-PAGE Gel gegossen und ein Aliquot

der jeweiligen Proben einer Elektrophorese (analog 2.3.3) unterzogen. Das Gel wurde durch Coomassie-Blau angefärbt, überschüssige Farbe durch Entfärbung entfernt (siehe 2.3.6). Das Gel wurde fixiert und entsprechend densitometrisch ausgewertet.

Optimierungsschritte:

1. Zur Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge wurden Verdünnungsreihen aus einem Pool der jeweiligen Proben angefertigt. Die optische Dichte der Banden wurde ausgewertet und graphisch gegen die Proteinkonzentration der Verdünnungsreihe dargestellt. Anhand der Kalibrationskurve wurde die Proteinmenge berechnet. Es wurde darauf geachtet, dass die Quantifizierung der Proben im linear ansteigenden Bereich der Verdünnungsreihe erfolgte.
2. Bei gleich bleibender Proteinmenge wurde anschließend die Gelatinekonzentration im Gel (0,05%, 0,1%, 0,5% und 1%) variiert, um eine höher gradigen Trennung der Enzyme und ein optimales Kontrast-Verhältnis von Bande und Hintergrund zu erhalten. Nach Auswertung des Schwarz-Weiß-Kontrastes und der OD- Größe im digitalen Bild wurden die besten Bedingungen für eine Gelatine-Konzentration von 0,1% festgestellt.
3. Durch Variation der Inkubationszeit (12h, 18h, 24h, 36h, 72h) konnte bei schwacher Aktivität bzw. geringer Proteinmenge die Intensität der Bande durch längere Einwirkzeit verbessert werden. Da sich die Proben zueinander proportional verhielten und zu späteren Zeitpunkten keine wesentliche Steigerung der Aktivität gefunden wurde, wurde 18h als optimaler Zeitpunkt bestimmt.

3.3.9 Densitometrie und Auswertung

Die entwickelten Filme und Gele wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (ScanJet 4600 mit Transparenzadapter, Fa. HP, Deutschland) eingescannt und densitometrisch mit der Software AlphaEase Version 5.5 (Alpha Innotec, USA) ausgewertet. Hierbei wurde eine konstante Fläche über jeder Bande eines Gels bestimmt und Menge sowie Intensität der Schwarz- bzw. Weißpunkte addiert und bezüglich der Fläche integriert. Es resultierte ein Zahlenwert, welcher die optische Dichte (OD) angab.

Eine separate Eichgerade jeder Versuchsreihe diente zur Korrektur von interexperimentellen Varianzen. Hierbei wurde die relative Steigerung gegen die gemessenen Werte aufgetragen. Durch Regression wurde eine Korrekturformel der zunächst bestimmten OD ermittelt, die als Eichgeraden-Bezug diente (Abb.3). Die so ermittelte relative OD wurde zum endogenen Standard-Protein GAPDH (Western-Blot) bzw. β -Actin (Zymographie) in Beziehung gesetzt, woraus die relative Proteinmenge resultierte.

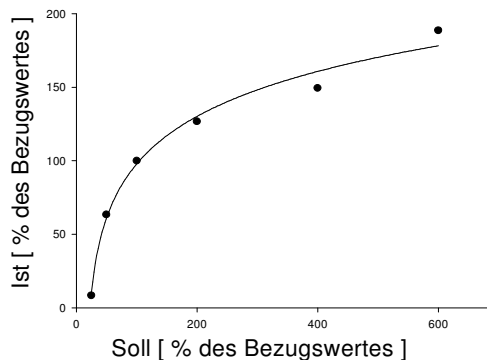


Abb. 3: Regression einer Eichkurve; aufgetragen ist die eingesetzte Proteinmenge als relative Proteinmenge (X-Achse; „Soll“) gegen die tatsächlich ermittelte relative OD (Y-Achse; „Ist“). Durch Regressionskurve wurde durch eine Korrekturformel ermittelt Die gemessene OD in den Proben wurde auf die Regressionskurve bezogen und diente so der Quantifizierung der Proteinmenge.

3.4 mRNA Quantifizierung

3.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA Extraktion erfolgt unter räumlicher Trennung von den Laborabschnitten, in denen mit PCR-Amplifikaten experimentiert wurde und unter ständiger Kühlung der jeweiligen Myokard-Proben. Alle zur RNA- Extraktion verwendeten Geräte wurden vor Beginn der Aufarbeitung mit 0,2%iger Schwefelsäure und RNase-ZAP (Nr. 9780, Fa. Ambion, Austin, USA) behandelt. Reaktionsgefäße wurden mit 0,1%iger DEPC-Lösung behandelt und anschließend bei 1atü und 121°C 30min lang autoklaviert.

Nach Bestimmung des Myokardgewichtes wurde die jeweilige Probe in ein mit Keramikkügelchen gefülltes Reaktionsgefäß (Lysis Matrix Typ A) gegeben und 600µl RNAzol B (Invitrogen RNA Bee CS 105B) gegeben. Das Herzgewebe im Lysis Matrix A Gefäß wurde im FASTPREP-Gerät (FP 120 von BIO 101 Thermo Savant) 30sec lang homogenisiert. Nach Beendigung wurden erneut 400µl RNAzol hinzu gegeben, um ein Gesamtvolumen von 1ml pro Gefäß zu erreichen. Die Gefäße wurden im Kühlraum bei 4°C, 30min lang bei 300rpm (Fa. Eppendorf, Deutschland) geschüttelt. Zu den Reaktionsansätzen wurden nun 200µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (1:24, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) pipettiert. Die Ansätze wurden 2min gemischt, zur Phasentrennung 5min auf Eis gelagert und 10min bei 4°C und 14.000U/min in einer Kühlzentrifuge (Fa. Eppendorf, Deutschland) zentrifugiert. Nach dem zentrifugieren konnten drei Phasen abgegrenzt werden: am Boden des Gefäßes eine organische Phase (blau), darüber eine dünne Interphase (Zelltrümmer und DNA) und als dritte Phase ein wässriger Überstand (hauptsächlich RNA). Der wässrige Überstand (ca. 500µl) wurde zusammen mit 500µl Isopropanol in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, kurz gemischt und zur Fällung der RNA über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach erfolgter Fällung wurde die RNA über 30min, bei 4°C und 14.000U/min zentrifugiert, das dabei entstehende RNA-Pellet wurde zweimal mit 500µl 80% Ethanol gewaschen und bei 4°C, 7.500U/min für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und je nach Größe des Pellet in 25-50µl DEPC- behandeltem Wasser resuspendiert.

Der Nukleinsäuregehalt wurde im Photometer über die OD bei der Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ (DNA) bzw. $\lambda = 280\text{nm}$ (RNA) bestimmt. Für die Messung wurden 5µl der RNA Lösung und 95µl DEPC behandeltes Wasser gemischt (1:20 Verdünnung), in eine Quarzküvette gegeben und die OD im Photometer gemessen. Bei OD-Werten > 1 wurde erneut verdünnt (1: 40). Die so erhaltene RNA-Ausbeute wurde in µgRNA/ mgMyokard-Feuchtgewicht berechnet.

3.4.2 DNase-I-Verdau

Die unter 3.4.1 isolierte RNA wurde einem DNase-I-Verdau unterzogen. Pro Mikrogramm RNA wurden 2 Units DNase-I (Fa. Boehringer-Ingelheim), 1mM MnCl_2 und 40Units RNAsin (RNase out, Invitrogen, Carlsbad) eingesetzt. Alle Proben wurden mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein einheitliches Endvolumen gebracht. Die Reaktion erfolgt bei 37°C in einem Thermoblock und wurde nach 10min mit 1000µl RNAzol B (RNA-Bee CS 105B, Invitrogen) gestoppt. Die nachfolgende RNA-Extraktion, Präzipitation, Ethanolwaschung und Photometermessung erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben. Es bestand kein signifikanter

Unterschied der RNA-Ausbeute vor und nach DNase-I-Verdau zwischen den Gruppen. Für die weitere Verwendung wurden die RNA-Proben auf 125ng/µl verdünnt und bei –80°C gelagert.

3.4.3 DNA- Negativkontrolle

100ng der DNase-I-verdauten RNA wurde von jeder Probe für die Durchführung der DNA-Negativkontrolle aufbewahrt. Aus der 125ng/µl Verdünnung wurde abermals eine 1:25-Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt und für die folgende PCR verwendet. Es wurde zunächst ein Mastermix mit 2,55µl RNA-freiem Wasser, 2,5µl 5xPuffer (Fa. Invitrogen), 0,75µl (50mM) MgCl₂, 4µl (1,25mM) dNTP und 0,2µl Taq-Polymerase je Probe hergestellt. In DEPC-behandelten 0,5ml Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf, Deutschland) wurde pro PCR-Ansatz 16pMol des GAPDH-Primer-Mixes gegeben und darüber ca. 10µl heißes Wachs. Über das erstarrte Wachs wurden 10µl des Mastermixes und 5µl der jeweiligen DNase-verdauten Probe gegeben (entspricht 50ng RNA pro Reaktionsgefäß). Als Positivkontrolle wurde 5µl (entspricht 50ng) Ratten-cDNA separat mitgeführt, als Negativkontrolle DNA- freies Wasser. Nach erfolgter Programmierung des Thermocyclers (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600) und Steigerung der Temperatur auf 95°C – Durchführung als „Hot-Start PCR“ - wurden die Proben für 40 Zyklen amplifiziert. Das Zyklusprofil für GAPDH (209bp) wurde in vorherigen Arbeiten wie folgt optimiert: 30sec 95°C, 30sec 60°C und 30sec 72°C. Anschließend erfolgte die Auftragung der Proben auf ein 2%iges Agarose-Gel mit nachfolgender Elektrophorese in TBE-Elektrophoresepuffer bei 100V und 350mA. Das Gel wurde der Elektrophorese-Vorrichtung entnommen, unter UV-Licht betrachtet und photometrisch ausgewertet. Die Proben wurden als DNA-frei angesehen, wenn keine Bande bei den Proben nachgewiesen werden konnte. Waren DNA-Banden bei den Proben zu erkennen, wurde diese erneut einem DNase-Verdau unterzogen (siehe 2.4.2).

3.4.4 Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription (RT) wurden 500ng der DNase-I-verdauten RNA (entspricht 10µl) und 600ng Random-Hexamer-Primer (entspricht 2µl) zusammengeführt, die Reaktionskomponenten wurden durchmischt, zentrifugiert, 10min bei 70°C erhitzt und auf Eis gekühlt. Die restlichen Reagenzien - 4µl 5xRT-Puffer (250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, pH 8.3; Invitrogen), 2µl 100mM DTT (Invitrogen), 1µl 0,5mM dNTP (Invitrogen), 1µl (40 U/µl) RNAsin (Invitrogen) und 1µl (200U/µl) Superscript RNase H-Reverse Transkriptase (Invitrogen) je Probe - wurden zu einem Mastermix zusammengegeben und 9µl dieses Mastermixes jedem Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde gemixt, zentrifugiert, 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 50min bei 42°C in einem Thermoblock (Fa.

Eppendorf) inkubiert. Die Beendigung der RT erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes für 5 min auf 95°C und anschließender Kühlung der Proben auf Eis. Nach erfolgter RT wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 5ng/µl mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. RT-Positiv- sowie Negativkontrolle erfolgten analog des unter 2.4.3 beschriebenen Verfahrens, wobei eine Positivkontrolle bestätigt wurde, wenn im photometrischen Bild eine Bande nachgewiesen werden konnte.

3.4.5 Optimierung der PCR-Bedingungen

Zur Optimierung der Annealing-Temperatur wurde eine PCR mittels Gradientencycler (Fa. Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 12,5µl SYBR-Green, 2µl Primer-Mix und 5,5µl Wasser, denen 25ng cDNA aus gepoolten Proben in ein 0,5ml Reaktionsgefäß hinzugefügt wurde. Der Temperaturgradient betrug von 60°C ausgehend $\pm 6^\circ\text{C}$, jeweils in 2°C-Schritten. Eine Negativ- und Positivkontrolle wurde bei 60°C mitgeführt. Nach erfolgter Amplifikation wurden die Reaktionsansätze auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, einer Elektrophorese unterzogen und anschließend unter UV-Fluoreszenz photometrisch hinsichtlich Bandenstärke sowie Nebenprodukten beurteilt; die jeweils optimale Temperatur wurde bei der weiteren Untersuchung des Zielgens weiterverwendet.

Zur Optimierung der Vorwärts- und Rückwärtsprimerverhältnisse wurden 4 verschiedene Reaktionsansätze mit einem Verhältnis von 1:1, 1:3 3:1 und 3:3 verwendet. Es wurde 25ng cDNA aus gepoolten Proben hinzugefügt. Als Gerät wurde der ABI PRISM 7700 TaqMan verwendet. Die Bestimmung des optimalen Primerverhältnisses erfolgte unter Begutachtung der Amplifikations- und Schmelzkurven. Auswahlkriterien hierbei waren Amplifikations- und Zykluszahl, Anstieg und Verlauf der Kurve, Genauigkeit der Übereinstimmung der Doppelansätze und Reinheit der Negativkontrolle sowie Höhe, Breite und Spezifität der Maximalpunkte der Schmelzkurve.

Zur Optimierung der MgCl₂ Konzentration wurden drei Reaktionsansätze mit 2,5mM, 4,0mM und 5mM MgCl₂ mit den vorgenannten optimierten Bedingungen einer PCR unterzogen. Die Amplifikations- und Schmelzkurve wurde unter den genannten Gesichtspunkten beurteilt und die entsprechend optimale Konzentration für die Quantifizierung des Zielgens in den Proben weiter verwendet.

3.4.6 Real-Time Polymerase Ketten-Reaktion

Die Real-Time Polymerase Ketten Reaktion (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) zur mRNA Quantifizierung wurde bezüglich jedes Genes in jeder Probe im Doppelansatz durchgeführt. Primer für das jeweilige Zielgen wurden unter Zuhilfenahme der Software „DNAsis 2.1“ sowie „PrimerExpress“ (PE Applied Biosystems) erstellt und sind in Tab.3 wiedergegeben.

12,5µl SYBR Green (PE Applied Biosystems), sowie eine jeweils optimierte Menge an Primer-Mix (Tab.2; Invitrogen), Wasser und MgCl₂ (Invitrogen) wurden zu einem Mastermix von 20µl je Probe zusammengemischt. Der Mastermix wurde in 96-Well Platten (Fa. Biozym) gegeben und 5µl cDNA je Probe (entspricht 50ng) dazugegeben. Die RT-PCR erfolgte durch das Gerät ABI PRISM 7700 TaqMan (Fa. Perkin Elmer) im „Hot Start“-Modus (Erhöhung der Spezifität und genaue Quantifizierung durch Errechnen am Gerät). Die Thermoprofile wurden zuvor je Zielgen optimiert (allgemeines Thermoprofil: 45sec 95°C, 60sec 60°C, 45sec 72°C). Für die Quantifizierung der Gene wurden die Ansätze 40 Zyklen lang mit den jeweils spezifischen Primern amplifiziert. Als endogener Standard („Housekeeping Gene“) wurde GAPDH (209bp) in einer zusätzlich durchgeführten PCR gemessen.

Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde bei jedem RT-PCR Ansatz eine Eichkurve (50ng, 25ng, 12.5ng, 6.25ng, 3.125ng und 1,563ng) mit aus allen Proben gepoolter cDNA mitgeführt. Zur Korrektur etwaiger Varianzen zwischen den Proben bezüglich mRNA-Extraktion bzw. RT-Effizienz wurde die gemessene Expression auf das stabil exprimierten Referenz- Gens GAPDH normalisiert.

Gen	Forward Primer Sequenz	Reverse Primer Sequenz	Größe	Primer Verhältnis	MgCl	Index Nr.
GAPDH	5'-cat ggc aac act ggc act ca -3'	5'-ggc gca tgt cag aac caa -3'	209 bp	1:1	4mM	AF106860
Kollagen I	5'-tga cct tga ggt gga cac ta -3'	5'-cag taa gag tgg cac aac tt -3'	125 bp	1:1		RNCA171
Kollagen III	5'-ctc aag agc gga gaa tac -3'	5'-aac tgt cca ora gtc ctt -3'	140 bp	1:1		AJ005395
TGF-β1	5'-cct gga tac caa cta ctg ct -3'	5'-aag gac ctt gct gta ctg tg -3'	183 bp	1:1		NM_021578-1
CTGF	5'-tat gat ggc agc caa ctg -3'	5'-ctg acc atg cag aga cga -3'	140 bp	1:3	/	AB023068.1
ITGB1	5'-cct act tct gca cga tgt ga -3'	5'-aag cag ctg tgg tgg tgg gat ctg -3'	162 bp	1:1		NM_017022-1
OPN	5'-ata gct tgg ctt acg gac tg -3'	5'-tgg ata ggc taa tgg gac tc -3'	126 bp	1:1		M99252
MMP-1	5'-gtg acc tcc aca gtt gac ag -3'	5'-aca taa ggc act cca cat ct -3'	121 bp	3:1	/	BT006874.1
MMP-2	5'-tac gat gat gac cgg aag tg -3'	5'-gga agttct tgg tgt aag tg -3'	153 bp	1:3		NM_031054
MMP-9	5'-tgg act ora gta gac aat or -3'	5'-gag act tcc aat acc gac c -3'	103 bp	1:1	4mM	NM_031055
MT-1	5'-gga cac gad gaa ggc tad ga -3'	5'-cattat gct ggc act tga gg -3'	102 bp	3:1		NM_031056
MMP						
TIMP-1	5'-cct ctg gca tcc tct tgt -3'	5'-ata acc agg tcc gag tgg -3'	102 bp	1:3		U06179
TIMP-2	5'-tgc aat gca gac gta gtc -3'	5'-tgt cct tgt cag gtc ctt -3'	141 bp	3:1		NM_021989
TIMP-3	5'-gca gta cat taa cac gga ag -3'	5'-caa ggc aag tag tag cag ga -3'	227 bp	3:1	4mM	NM_012886
TIMP-4	5'-atc cag tga gaa ggt agt cc -3'	5'-cac cac aga ggg aag agt ca -3'	154 bp	1:1	/	BC064046.1
AT-1	5'-cat gaa gct gaa gac tgt gg -3'	5'-aag gaa cac act ggc gta ga -3'	186 bp	1:1	4mM	NM_080985-1
ET-1	5'-agc tga gaa gga agt gca ga -3'	5'-agg tgg cag aag tag aca ca -3'	113 bp	1:1		NM_012548
ETRA	5'-gaa cgc cac tct cct aag aa -3'	5'-cca cgt aga taa ggt ctc ca -3'	100 bp	1:1		NM_012550
ETRB	5'-aga gca atc ctg aga ggt gt -3'	5'-gtc gta tcc gtc atc gtt ag -3'	238 bp	1:1		X57764
ECE-1	5'-ctc cac act cat caa cag ca -3'	5'-gaa ctt ctc atc ggc atc ct -3'	117 bp	1:1		NM_053596

Tab. 2: Darstellung von üblichen Primer-Sequenzen, Amplicifkationsbedingungen und Index Nummern; AT-1 bezeichnet Arginensin II Typ 1 Rezeptor, CTGF - Connective Tissue Growth Factor, ECE-1 - Endothelin Converting Enzyme 1, ET-1 - Endothelin 1, ETRA - Endothelin Rezeptor A, ETRB - Endothelin Rezeptor B, GAPDH - Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase, ITGB1 - Integrin beta 1, MMP - Matrixmetalloproteinase, MT-1 MMP - Membrane Type 1 MMP, OPN - Osteopontin, TGF β 1 - Transforming Growth Factor beta 1, TIMP - Tissue Inhibitor of MMP.

Statistik

Alle Messwerte sind, sofern nicht anders ausgewiesen, als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Differenzen wurden mit dem Wilcoxon und dem Mann-Whitney U-Test verglichen. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als signifikant definiert. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson ermittelt ($p < 0.05$). Statistik, Textverarbeitung und Gestaltung der Grafiken wurden unter Verwendung kommerziell erhältlicher Programme (Microsoft Windows XP, Microsoft Office 2000, SigmaPlot Version 8.0, SPSS Version 11.0) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Organmorphologie, Echokardiografie und hämodynamische Daten

4.1.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS

Die chronische Volumenbelastung in der ACS-Gruppe induzierte eine signifikante Vergrößerung des relativen Herzgewichtes (Herzgewicht zu Körpergewicht; HG/KG) im Vergleich zu der Sham-Gruppe (Tab.3). Analog nahmen die relativen Gewichte des rechten Atriums (RA/KG), des rechten Ventrikels (RV/KG), des linken Atriums (LA/KG) und des linken Ventrikels (LV/KG) in der ACS-Gruppe signifikant zu (Tab.3). Das relative Lungengewicht war ebenfalls erhöht. Sowohl die rechte als auch linke Niere waren signifikant größer in der ACS-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe (Tab.3).

	HG/KG (mg/g)	RA/KG (mg/g)	RV/KG (mg/g)	LA/KG (mg/g)	LV/KG (mg/g)
Sham (n=14)	2,64 ± 0,04	39,3 ± 1,4	170,8 ± 5,5	27,6 ± 1,4	472,7 ± 16,4
ACS (n=15)	5,31 ± 0,17**	120,4 ± 23,6*	401,5 ± 24,1*	69,1 ± 2,3*	805,3 ± 26,8*

	Lunge/KG (mg/g)	RN/KG (mg/g)	LN/KG (mg/g)
Sham (n=14)	1498,4 ± 45,2	1189 ± 27,3	1191 ± 27,1
ACS (n=15)	2275,5 ± 104,8*	1102 ± 28,2*	1098 ± 27,4*

Tab. 3: Kardiomorphologische Daten der Gruppen Sham und ACS: HG, Herzgewicht; Lunge, relatives Lungengewicht; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikels; LA, linkes Atrium; LV, linken Ventrikel; RN, rechten Niere; LN, linken Niere; KG, Körpergewicht für alle **p<0,01; *p<0,05 im Vergleich zu Sham.

Echokardiografie:

Das interventrikuläre Septum (IVS) und die Hinterwand (HW) präsentierten eine signifikante Verdickung in der ACS-Gruppe. Der linksventrikuläre enddiastolische (LVEDD) und endsystolische Durchmesser (LVESD) waren in der ACS-Gruppe signifikant größer als in der Sham-Gruppe. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LV-EF) und die LV-Fraktional Shortening (FS) zeigten in der ACS-Gruppe eine signifikante Abnahme gegenüber der Sham-Gruppe. (Tab.4).

	IVS (mm)	HW (mm)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LV-FS (%)	LV-EF (%)
Sham (n=14)	1,0 ± 0,02	1,1 ± 0,03	6,94 ± 0,27	3,69 ± 0,29	47,5 ± 2,3	82,88 ± 2,2
ACS (n=15)	1,2 ± 0,1*	1,3 ± 0,05*	9,82 ± 0,18**	6,03 ± 0,18**	39,0 ± 1,1**	73,87 ± 1,21**

Tab. 4: Echokardiografische Daten der Sham -und ACS -Gruppe; IVS, Interventrikularseptum HW, Hinterwand;; LVEDD, links-ventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD, links-ventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LV-FS, links-ventrikuläre Fraktionale Shortening; LV-EF, links-ventrikuläre Ejektionsfraktion; *p<0,05; ** p<0,01 im Vergleich zu Sham

Hämodynamik:

Der systolische Blutdruck (RRsys) fiel nach chronischer Volumenbelastung signifikant ab. Der zentral venöse Druck (ZVD) stieg signifikant an (Tab.5). Die maximale und die minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit waren durch ACS deutlich verringert, zeigten jedoch keine Signifikanz im Vergleich zu der Sham-Gruppe (Tab.5). Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die Herzfrequenz (Daten nicht gezeigt) blieben unverändert.

	RRsys (mmHg)	ZVD (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dpdt/max (mmHg/s)	dpdt/min (mmHg/s)
Sham (n=14)	91,5 ± 3,7	1,4 ± 0,3	10,4 ± 1,4	3339,1 ± 240,2	3172,3 ± 274,8
ACS (n=15)	78,6 ± 3,9**	5,5 ± 0,5**	10,6 ± 1,3	2742,8 ± 257,8	2673,4 ± 334,5

Tab. 5: Hämodynamikdaten der Sham -und ACS -Gruppe; RRsys, systolischer Blutdruck, ZVD, zentralvenöser Druck; LVEDP, linksventrikulärer enddiastolische Druck; dpdt/max, maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit; dpdt/min, minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit; **p<0,01 im Vergleich zu Sham

4.1.2. Veränderungen bei ACS und Behandlung mit P4HI FG0041

Organmorphologie:

Die Behandlung der chronisch Volumen-belasteten Tiere mit P4HI FG0041 bewirkte keine signifikante Veränderung des relativen Herzgewichtes. Zwar senkte FG0041 den HG/KG Quotienten, doch war dies kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten ACS-Gruppe (Tab.6). Signifikante Veränderungen bewirkte die Applikation von FG0041 bei den relativen

Gewichten des linken und rechten Atriums sowie der Lunge im Vergleich zu der unbehandelten ACS-Gruppe. Das relative Gewicht des rechten und linken Ventrikels wurde in der FG0041-Gruppe tendenziell reduziert (Tab. 6). Das Gewicht der rechten und linken Niere blieb unter FG0041-Behandlung unverändert im Vergleich zu der ACS-Gruppe.

	HG/KG (mg/g)	RA/KG (mg/g)	RV/KG (mg/g)	LA/KG (mg/g)	LV/KG (mg/g)	Lunge (mg/g)
ACS (n=15)	5,31±0,17	120,4 ± 7,1	401,5 ± 24,1	69,1 ± 2,3	805,3 ±26,8	2275,7 ±104,8
ACS+ FG0041 (n=10)	5,0±0,2	110,4 ± 8,0*	343,6 ±23,6	65,2 ± 4,8**	753,8 ± 44,3	1972,9± 86,1*

Tab. 6: Kardiomorphologischen Daten der Gruppen Sham und ACS: HG, Herzgewicht; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikels; LA, linkes Atrium; LV, linker Ventrikel; KG, Körpergewicht; Lunge, relatives Lungengewicht; *p<0,05; **p<0,01

Echokardiografie:

Echokardiografisch stellt sich unter FG0041-Medikation keine Änderung der ACS induzierten Verdickung der Hinterwand dar. LVESD und LVEDD zeigten bei Administration von FG0041 eine Tendenz zur Reduktion, blieben jedoch nicht signifikant gegenüber der unbehandelten ACS-Gruppe. Die LV-EF und LV-FS wurden unter FG0041-Behandlung signifikant gesteigert (Tab.7).

	IVS (mm)	HW (mm)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LV-EF (%)	LV-FS (%)
ACS (n=15)	1,21 ± 0,05	1,318 ± 0,0	9,825 ± 0,1	6,033 ± 0,1	73,87 ± 1,21	38,7 ± 1,0
ACS+ FG0041 (n=10)	1,19 ± 0,05	1,36 ± 0,0	9,7 ± 0,4	5,7 ± 0,3	76,8 ± 0,9*	42,0 ± 1,0*

Tab. 7: Echokardiografische Daten der unbehandelten und der mit FG0041 behandelten ACS-Gruppe; IVS, Interventrikularseptum; HW, Hinterwand; LVEDD, links-ventrikulärer enddiastolischer Durchmesser; LVESD, links-ventrikulärer endsystolischer Durchmesser; LV-FS, links-ventrikuläre Fractional Shortening; LV-EF, links-ventrikuläre Ejektionsfraktion; *p<0,05 im Vergleich zur ACS-Gruppe.

Hämodynamik:

Der systolische Blutdruck (RRsys) und der Zentralvenöse Druck (ZVD) änderten sich unter FG0041 Behandlung nicht. Die maximale und minimale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dpdt/max und dpdt/min), zeigten unter Behandlung mit FG0041 keine signifikante

Veränderung gegenüber der unbehandelten ACS-Gruppe, tendenziell allerdings eine Steigerung auf Sham-Gruppen Ausgangswerte. Der links-ventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wurde unter FG0041-Medikation nicht signifikant gesteigert (Tab.8).

	RRsys (mmHg)	ZVD (mmHg)	LVEDP (mmHg)	dpdt/max (mmHg/s)	dpdt/min (mmHg/s)
ACS (n=15)	78,6±3,9	5,5±0,8	10,6±1,3	2742,8±257,8	2673,4±334,5
ACS+FG0041 (n=10)	84,0±3,8	5,9±0,7	12,2±2,9	3199,8±405,7	3033,0±467,9

Tab. 8: Hämodynamikdaten der ACS -und der ACS+FG0041-Gruppe; RRsys, systolischer Blutdruck, ZVD, zentralvenöser Druck; LVEDP, linksventrikulärer enddiastolische Druck; dpdt/max, maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit; dpdt/min, minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit;

4.1.3. Veränderungen bei ACS und Behandlung mit P4HI FG 2216

Organmorphologie:

Im Vergleich zur ACS-Gruppe bewirkte die Behandlung mit FG2216 eine signifikante Abnahme des unter ACS erhöhten Herzgewichtes. Das relative LV-Gewicht reduzierte sich signifikant von 805,3±26,8mg/g auf 612,5±37,1mg/g, ebenso das relative Gewicht des linken Atriums (ACS: 69,1±2 mg/g; ACS+FG2216: 47,9±3,4mg/g) sowie der Lunge von 2275,5±104,8mg/g auf 1865,0±69,4mg/g (Abb.4). Das relative Gewicht des rechten Atriums wurde in der behandelten FG2216-Gruppe signifikant verringert (ACS: 120,4±7,1mg/g; ACS+FG2216: 106,5±10,5mg/g). Der rechte Ventrikel zeigte tendenziell eine Reduktion des relativen Gewichtes im Vergleich zur unbehandelten ACS-Gruppe (ACS: 401,5±24,1mg/g; ACS+FG2216: 386,4±27,2 mg/g). Das relative Gewicht der rechten Niere wurde durch FG2216 Administration signifikant verringert (ACS:1102,2±28,2mg/g vs.FG2216: 1000,5±33,7), das der linken Niere zeigte die gleichen Veränderung, blieb allerdings unter Signifikanzniveau (ACS:1098,8±27,4mg/g vs.FG2216: 1035,3±47,8mg/g).

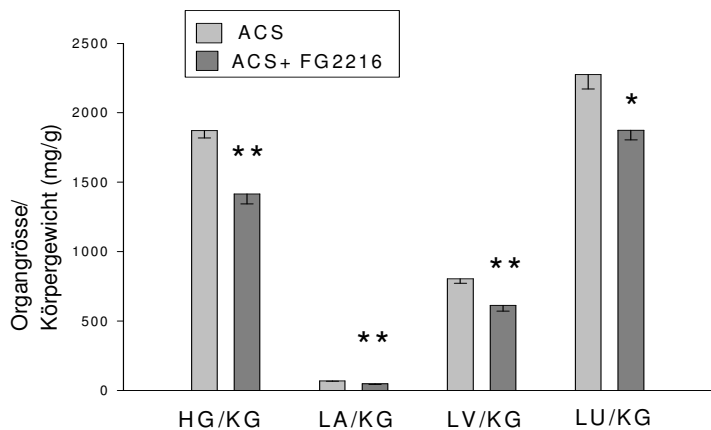


Abb.4: Kardiomorphologische Daten der ACS-Gruppe und FG2216-Gruppe; HG, Herzgewicht; Lunge, relatives Lungengewicht; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikel; LA, linkes Atrium; LV, linken Ventrikel; KG, Körpergewicht; **p<0,01; *p<0,05 ACS vs. FG2216

Echokardiografie:

Die echokardiografischen Parameter LVEDD und LVESD wiesen eine signifikante Reduktion nach Behandlung mit FG2216 auf (LVEDD: ACS: $9,8 \pm 0,18$ mm vs. ACS+FG2216: $7,9 \pm 0,18$ mm, $p < 0,05$; LVESD: ACS: $6,0 \pm 0,18$ mm vs. ACS+FG2216: $4,1 \pm 0,02$ mm, $p < 0,05$). Die LV-EF und LV-FS stiegen signifikant an (LV-EF: ACS: $73,8 \pm 1,2\%$ vs. ACS+FG2216 $84,6 \pm 1,0\%$, $p < 0,01$ und für LV-FS: ACS: $38,7 \pm 1,0\%$ vs. ACS+FG2216: $48,9 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$). IVS und HW zeigten in der ACS+FG2216-Gruppe tendenziell eine Reduktion gegenüber der ACS-Gruppe.

Hämodynamik:

Die maximale und minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit stiegen beide an (dpdt/max ACS-Gruppe: $2742,8 \pm 257,8$ mmHG vs. ACS+FG2216: $3196,3 \pm 257,8$ mmHG/s; dpdt/min ACS: $2673,4 \pm 334,5$ vs. ACS+FG2216: $2957 \pm 294,9$) jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Der systolische Blutdruck und der ZVD änderten sich in der behandelten ACS+FG2216-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten ACS-Gruppe nicht. Der LVEDP zeigte unter FG2216-Behandlung eine Abnahme, die nicht signifikant war (ACS: $10,6 \pm 1,5$ mmHG vs. FG2216: $7,6 \pm 1,0$ mmHG; n.s.).

4.1.3 Zusammenfassung des Kapitels

Der aortocavale Shunt induzierte einen signifikanten Anstieg des relativen Herzgewichtes, sowie der Gewichte des rechten Atriums, des rechten Ventrikels, des linken Atriums und des linken Ventrikels. Die Gabe des K-PH4I FG0041 bewirkte eine signifikante Verringerung des relativen Gewichtes des linken und rechten Atriums. Eine Tendenz zur Reduktion zeigte sich für die relativen Gewichte des linken und rechten Ventrikels im Vergleich zur unbehandelten ACS-Gruppe.

Nach Gabe des HIF1 α P4HI FG2216 reduzierte sich das durch ACS erhöhte LV-Gewicht signifikant im Vergleich zur ACS-Gruppe. Das Gewicht verminderte sich auf Werte die mit der sham-operierten Gruppe vergleichbar waren. Durch die Behandlung mit FG2216 wurde das Gewicht des linken und rechten Atriums signifikant verringert, im Vergleich zur ACS-Gruppe (Abb.5).

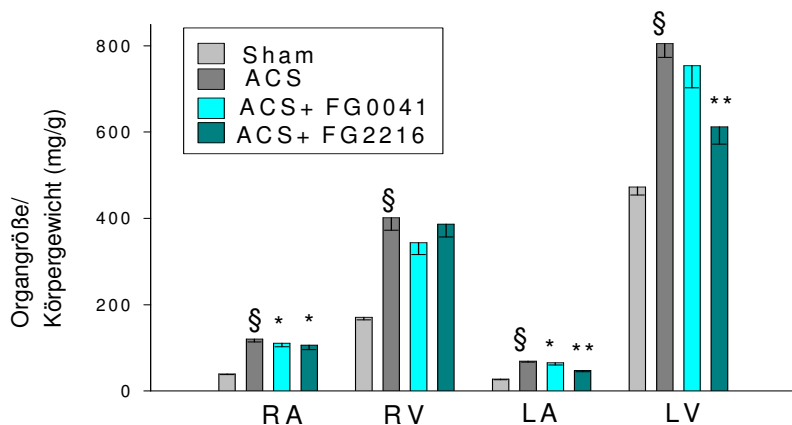


Abb.5: Kardiomorphologische Daten von Sham-, ACS- und Medikationsgruppen; HG, Herzgewicht; RA, rechtes Atrium; RV, rechter Ventrikels; LA, linkes Atrium; LV, linken Ventrikel; KG Körpergewicht; n.s. nicht signifikant; § $p < 0,05$ Sham vs. ACS; * $p < 0,05$ ACS vs. ACS+FG0041/FG2216; **= $p < 0,01$ ACS vs. ACS+FG0041/FG2216

Das relative Lungengewicht nahm durch ACS deutlich zu im Vergleich zur sham-operierten Gruppe. FG0041 bewirkte eine signifikante Verringerung des durch ACS gesteigerten relativen Lungengewichtes. Der gleiche Effekt zeigte sich in der ACS+FG2216 Gruppe im Vergleich zu der ACS-Gruppe (Abb.6A).

Der ACS bewirkte eine Verringerung von dpdt/max und dpdt/min im Vergleich zu Sham operierten Tieren, welche allerdings nicht signifikant war. Unter FG0041- und FG2216-Gabe stiegen dpdt/max und dpdt/min wieder an und erreichten Werte die vergleichbar mit der Sham-

Gruppe waren. Sie blieben aber unter Signifikanzniveau. Die weiteren hämodynamisch bestimmten Parameter, wie ZVD, RRsys und LVEDP zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Sham-, ACS- oder Therapiegruppen.

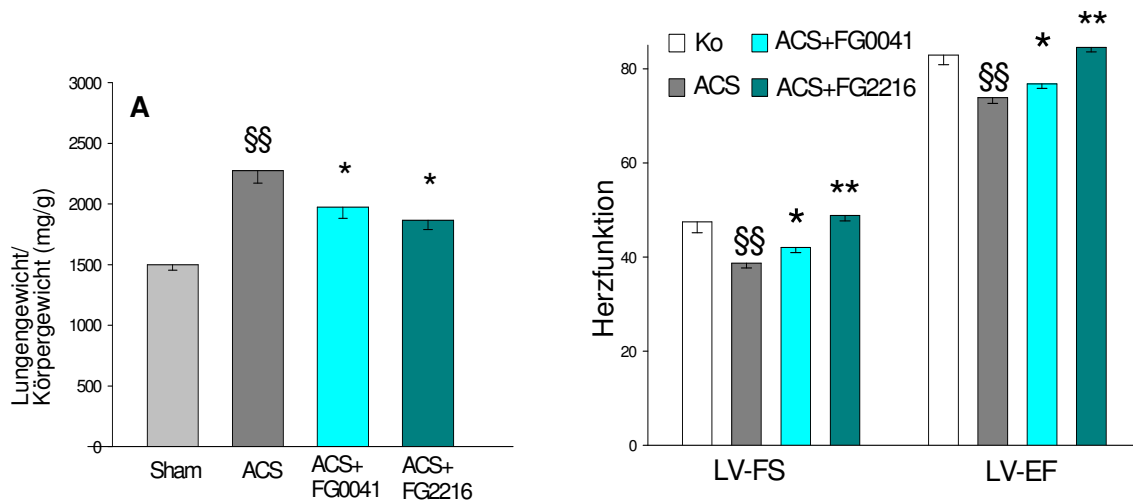


Abb.6: Relatives Lungengewicht (A) und linksventrikuläre *Fraktional Shortening* und *Ejektionsfraktion* (LV-FS und LV-EF) von Sham-; ACS-; und Medikationsgruppen (FG0041 und FG2216); §§ p <0,01 Sham vs. ACS; * p<0,05 ACS vs. FG0041/FG2216, ** p< 0,01 ACS vs. FG0041/FG2216

In der Echokardiographie stellte sich ein signifikant vergrößerter LVESD und LVEDD in der ACS-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe dar. Die Behandlung mit FG0041 bei ACS hatte keinen Einfluss auf diese Parameter. Durch die FG2216-Medikation reduzierten sich signifikant der LVEDD und der LVESD auf Werte welche vergleichbar mit der Sham-Gruppe waren.

Die LVEF und LVFS wurden in der ACS-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant reduziert. Beide Parameter wurden durch Behandlung mit dem P4HI FG0041 und FG2216 gesteigert, wobei es nur in der FG2216 behandelten Gruppe zu einer Signifikanz kam und Ausgangswerte erreicht wurden (Abb.6).

HW nahm in der ACS-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe signifikant zu. Diese Zunahme wurde durch FG0041 nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu reduziert FG2216 die Dicke der Hinterwand tendenziell auf Sham-Gruppen Niveau (Tab.9).

	Sham	ACS	ACS+ FG0041	ACS+FG2216
HW (mm)	1,117 ± 0,0	1,318 ± 0,0 *	1,36 ± 0,0	1,21 ± 0,0 *

Tab.9: Echokardiografische Daten der Dicke der LV Hinterwand (HW); * p<0,05; Sham vs. ACS; ACS vs. ACS+FG0041/ FG2216

4.2. Regulation der neuroendokrinen Hormone und der Rezeptoren des Angiotensin- und Endothelin- Systems

4.2.1. Veränderungen der neuroendokrinen Systeme durch ACS

Der Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 wurde durch ACS auf $313,8 \pm 34,9\%$ induziert. Allerdings war dies statistisch nicht signifikant. Die Endothelin 1 (ET1), *Endothelin Converting Enzyme 1* (ECE1) und die Endothelin-Rezeptoren A (ETRA) und B (ETRB) mRNA-Expression wurde durch ACS signifikant gegenüber der Sham-Gruppe gesteigert (Abb.6)

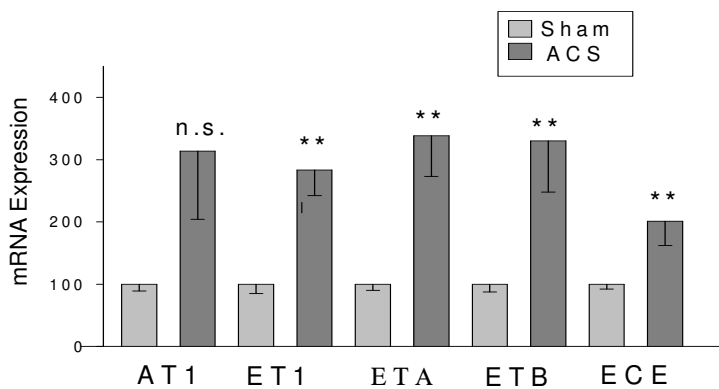


Abb.6: - Relative mRNA-Expression von Angiotensin II Rezeptor Typ1 (AT1), Endothelin-1 (ET1), Endothelin Rezeptor A (ETRA), Endothelin Rezeptor B (ETRB) und *Endothelin Converting Enzyme1* (ECE1). Die mRNA-Expression wurde zur GAPDH-Genexpression normalisiert und zur Sham-Gruppe in Bezug gesetzt ** $p < 0,01$ Sham vs. ACS; n.s. nicht signifikant.

4.2.2. Einfluss des P4HI FG0041 und FG 2216 auf die mRNA- Expression

Die Behandlung der ACS-Gruppe mit FG0041 führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der mRNA Expression der oben genannten neuroendokrinen Faktoren. Tendenziell konnte man bei AT1, ETRB und ECE 1 eine Verringerung feststellen.

Auch die Administration von FG2216 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression der o.g. Komponenten des Angiotensin- und Endothelienystems. Die ETRA, ETRB und ECE 1 mRNA- Expression blieben auf dem Niveau der ACS-Gruppe. Die AT1 und ET1 mRNA- Expression zeigten eine Erhöhung über das ACS-Niveau hinaus, waren aber nicht signifikant (Tab.11)

	AT1	ET1	ETRA	ETRB	ECE 1
ACS (n=15)	313,8 ± 34,9	283,4 ± 12,6	338,7 ± 17,5	330,1 ± 22,6	201,4 ± 18,9
ACS+FG0041 (n=10)	149,9 ± 14,3	331,3 ± 17,0	369,1 ± 18,4	262,5 ± 18,1	160,7 ± 14,4
ACS+FG2216 (n=10)	561,4 ± 30,7	405,6 ± 19,8	304,6 ± 18,0	307,2 ± 16,9	198,4 ± 8,4

Tab. 11: Relative mRNA-Expression von Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1), Endothelin-1 (ET1), Endothelin Rezeptor A (ETRA), Endothelin Rezeptor B (ETRB) und *Endothelin Converting Enzyme*1 (ECE1). Die mRNA-Expression wurde zur GAPDH-Genexpression normalisiert. Die ACS-Gruppe wurde zu der Sham-Gruppe (100%) in Bezug gesetzt.

4.3. Regulation der Wachstumsfaktoren TGFβ1, CTGF, ITGβ1, OPN und HIF1α

4.3.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS

Die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren *Transforming Growth Factor β1* (TGFβ1: 237,8%±24,4), *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF: 546,2%±107,6), *Integrin β1* (ITGβ1: 237,2%±37,8) und *Osteopontin* (OPN: 535,3%±76,3) wurden durch ACS signifikant heraufreguliert (p jeweils <0,01). CTGFβ und OPN zeigten dabei die stärkste Steigerung im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb.7). Die HIF1α Genexpression zeigte keinen Anstieg (128,5%±14,0) (Abb.7).

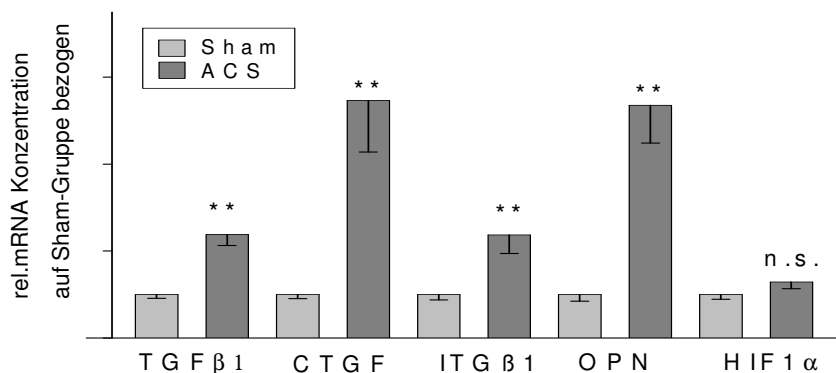


Abb.7: Relative mRNA-Expression von TGFβ1, CTGF, ITGβ1, OPN und HIF1α. Die Genexpression wurden in Bezug zu GAPDH Expression normalisiert. Der Mittelwert der Sham Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die ACS-Gruppe hierzu in Bezug gesetzt; ** p<0,01 Sham vs. ACS; n.s. nicht signifikant.

Die Proteinexpression von TGFβ1 und ITGβ1 war (TGFβ1: 121,3±8,4; ITGβ1: 140,4±34,7) im Vergleich zur Sham- Gruppe unverändert (Abb.8).

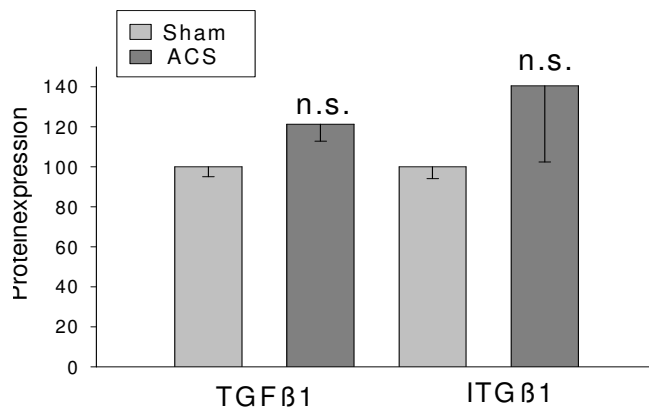


Abb.8: Relative Protein-Expression von TGFβ1 und ITGβ1; n.s. nicht signifikant.

4.3.2. Einfluss des P4HI FG0041 bzw. FG2216 auf mRNA- und Proteinexpression

Der P4HI FG0041 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch ACS induzierten Genexpression der Wachstumsfaktoren TGFβ1, CTGF und OPN. Die Reduktion der ITGβ1mRNA-Expression erreichte keine statistische Signifikanz (Tab.12).

FG2216 bewirkte eine signifikante Reduktion der TGFβ1 mRNA-Expression. Die CTGF und OPN mRNA-Expression wurde durch FG2216 weiter, jedoch statistisch nicht signifikant gesteigert. Die ITGβ1 Genexpression blieb unverändert (Tab.12).

Die Genexpression von HIF1α zeigte einen tendenziellen Anstieg durch ACS, jedoch ohne Signifikanz. Unter FG0041-Medikation blieb HIF1α unverändert und unter HIF-P4HI FG2216 konnte tendenziell eine Erhöhung der HIF1α mRNA-Expression gesehen werden (Tab.12).

	TGFβ1	CTGF	ITGβ1	OPN	HIF1α
ACS (n=15)	237,8 ± 25,1	546,2 ± 123,0	237,2 ± 43,2	535,3 ± 87,2	119,0 ± 15,5
ACS+FG0041 (n=10)	172,0 ± 17 **	265,2 ± 43,5 *	173,9 ± 12,7	291,5 ± 60,6 **	106,7 ± 13,5
ACS+FG2216 (n=10)	190,2 ± 35,4 *	822,1 ± 190,7	246,6 ± 88,9	1195,5 ± 324,5	127,0 ± 15,0

Tab.12: Relative mRNA-Expression von TGFβ1, CTGF, ITGβ1, OPN und HIF1α in der ACS-, ACS+FG0041- und ACS+FG2216-Gruppe bezogen auf die ACS-Gruppe als 100%-Bezugspunkt. Die Expression wurde auf die Genexpression von GAPDH normalisiert, **p<0,01 ACS vs. ACS+FG0041/FG2216; * p<0,05 ACS vs. ACS+FG0041/FG2216.

Die Proteinexpressionen von TGFβ1 und ITGβ1 zeigten in der ACS-Gruppe einen Anstieg, welcher nicht signifikant war. Eine Zunahme der TGFβ1-Proteinexpression war in der ACS+FG0041-Gruppe sichtbar. In der ACS+FG2216-Gruppe wurde eine tendenzielle Abnahme beobachtet (ACS: 121,3±8,4 vs. ACS+FG0041: 136,7±9,4 vs. ACS+FG2216: 97,94±9,2).

Die ITGβ1-Proteinexpression wurde durch die Applikation von FG0041 weiter induziert im Vergleich zur ACS-Gruppe (ACS: 140,5±38,0 vs. FG0041: 263,8±43,6; $p < 0,05$). Die ITGβ1 Regulation in der ACS+FG2216-Gruppe wurde nicht bestimmt.

4.4 Regulation von Kollagen I und III

4.4.1 Identifikation der Kollagene im Western-Blot

Ohne Kollagenase I-Verdau zeigten die mit dem Antikörper gegen Kollagen I und III detektierte Western-Blots unspezifische Banden, insbesondere im Bereich zwischen ca. 73kDa und ca. 130kDa. Es trat ebenfalls eine Bande bei ca. 210kDa auf, die auch in der Positiv-Kontrolle vorhanden war. Jedoch konnte durch Vorhandensein anderer Banden die Zuordnung nicht eindeutig geklärt werden (Abb.9A, Bahnen 2 und 4). Durch Zusatz von Kollagenase I wurden insbesondere die Bande bei 210kDa komplett eliminiert. Andere wurden dagegen stark abgeschwächt, und es traten vermehrt Banden zwischen ca. 100kDa und 130kDa in der Positiv-Kontrolle auf (Abb.9A, Bahnen 1 und 3). Es handelte sich bei der Bande bei ca.210kDa somit höchst wahrscheinlich um Kollagen I und bei den Banden zwischen 100kDa und 130kDa vermutlich um Kollagen-Spaltprodukte, die durch den Antikörper ebenfalls detektiert wurden. Bezüglich Kollagen III zeigte sich in der unverdauten Protein-Probe dasselbe Bild wie im Kollagen I-Blot. Eine Bande bei ca.130kDa (entsprechend dem Molekulargewicht von Kollagen III) wurde durch Kollagenase I-Verdau stark abgeschwächt (Abb.9B, Bahnen 1 und 2). Die Kollagen III-Positiv-Kontrolle zeigte keinerlei unspezifische Banden und erlaubte eine eindeutige Zuordnung des Proteins (Abb.9A, Bahn 3). Der Unterschied der Bandenauflösung zwischen Kollagen I und III lässt sich durch die höhere Spezifität der Kollagenase- I für Kollagen I erklären (Kollagen I > Kollagen II > Kollagen III). Die Verdünnungsreihe einer Protein-Probe (150µg–30µg; Abb.9C) und Auswertung der zuvor ermittelten Banden zeigte eine annähernd lineare Beziehung der Banden-Intensität von Kollagen I und III zur eingesetzten Protein-Menge (Abb.9D und E).

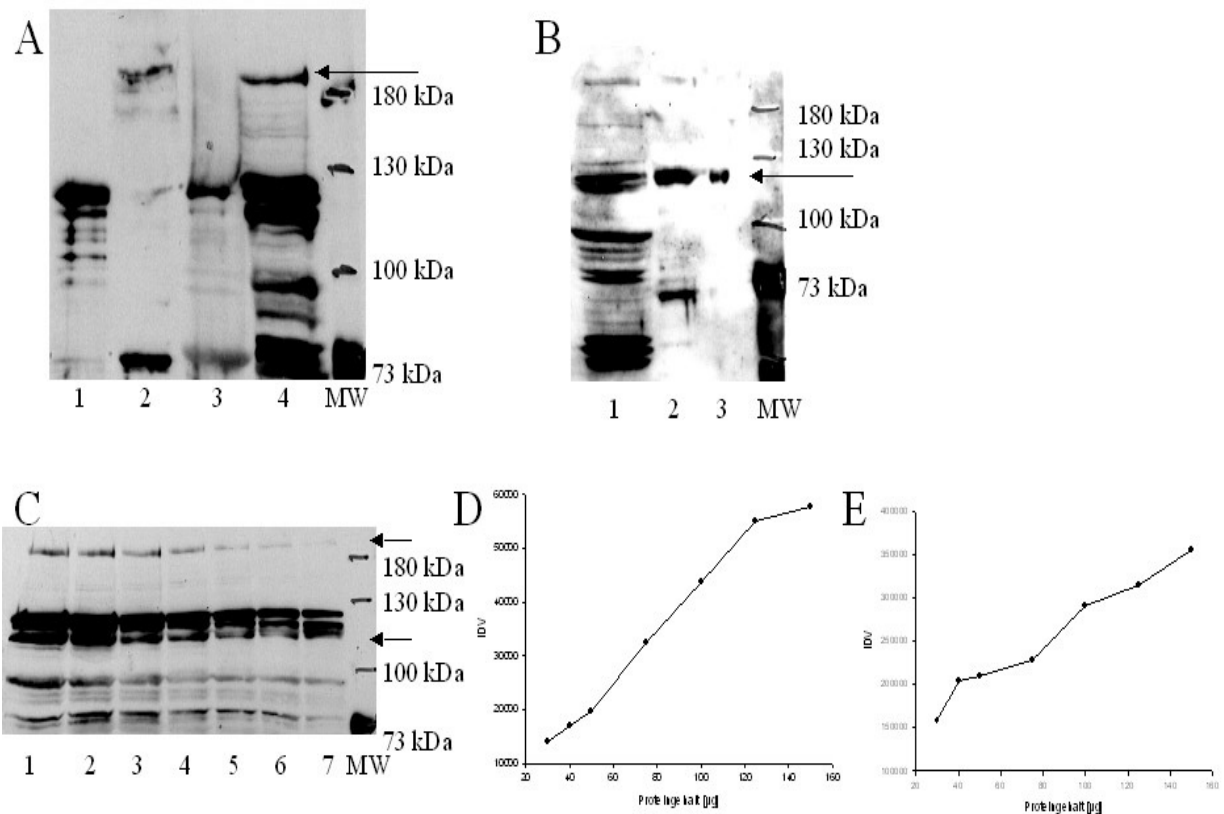


Abb. 9: Western-Blots zur Identifikation von Kollagen I und III mittels Kollagenase I-Verdau. **A:** Etablierung von Kollagen I; Bahn 4 zeigt das Ergebnis von 100µg einer Protein-Probe vor Kollagenase I-Verdau. In Bahn 3 wurde bei derselben Probe ein Kollagenase I-Verdau durchgeführt. Die Bande bei 210kDa verschwindet, es treten mehrere Banden unter 130kDa auf. Bahn 2 zeigt 30µg Kollagen I Positiv-Kontrolle mit 2 Banden bei 210kDa und ca. 75kDa vor Kollagenase I-Verdau. Bahn 1 zeigt 30µg Kollagen I Positiv-Kontrolle nach Kollagenase I-Verdau. **B:** Bahn 1 zeigt 100µg Protein-Probe vor Kollagenase I-Verdau, Bahn 2 100µg Protein-Probe nach Kollagenase-Verdau, Bahn 3 30µg Kollagen III ohne Kollagenase I-Verdau. **C:** Verdünnungsreihe (Bahn 1-7: 150µg, 125µg, 100µg, 75µg, 50µg, 40µg, 30µg) einer Proteinprobe von Kollagen I und III. **D:** Kalibrationskurve Kollagen Typ I entsprechend Western-Blot in C. **E:** Kalibrationskurve Kollagen Typ III entsprechend Western-Blot in C.

4.4.2. Veränderungen der Kollagenexpression durch Volumenbelastung mittels ACS

Die Kollagen I und III mRNA-Expression wurde ACS signifikant heraufreguliert (p jeweils <0,01). Kollagen III zeigte dabei einen höheren Anstieg (3,5-fach) als Kollagen I (2,5-fach) (Abb.10A).

Auf Proteinebene konnten jedoch keine signifikante Veränderungen beobachtet werden. Für Kollagen III zeigte sich ein Trend zur Heraufregulation (Sham: $100 \pm 7,8$ vs. ACS: $134,0 \pm 10,7$). Kollagen I Protein wurde nicht signifikant herunter reguliert (Sham: $100 \pm 7,1$ vs. ACS: $76,3 \pm 6,0$) (Abb.10B).

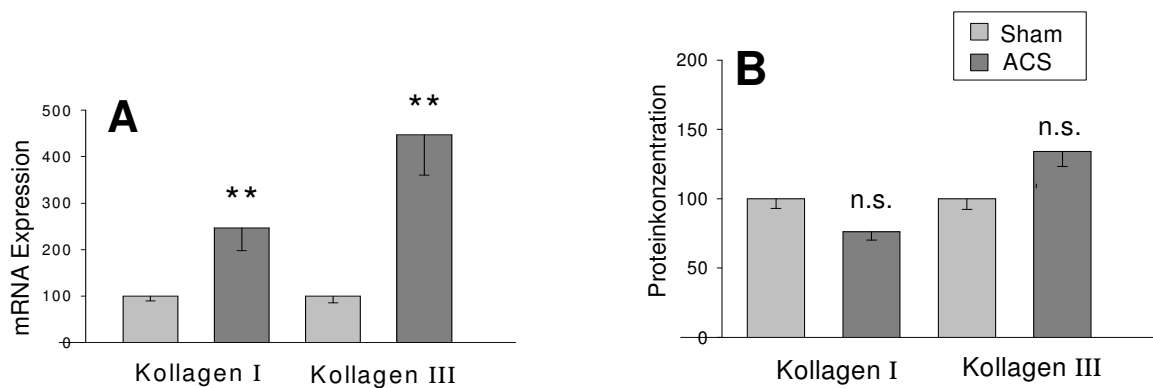


Abb.10: **A:** Relative mRNA-Expression (**A**) und Proteinexpression (**B**) von Kollagen I und III; ** p<0,01 Sham vs.ACS; * p<0,05 Sham vs. ACS.

4.4.3. Einfluss des P4HI FG0041 und FG2216 auf mRNA- und Proteinexpression

Die Applikation des K-P4HI FG0041 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch ACS induzierten Kollagen I und III mRNA Expression. FG2216 bewirkte keine signifikante Veränderung der Kollagen mRNA-Expression, es zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zur gesteigerten Kollagen Expression (Tab.13).

mRNA	Kollagen I	Kollagen III
Sham (n=14)	100 ± 10,3	100 ± 13,5
ACS (n=15)	246,5 ± 44,5 §§	447,2 ± 73,2 §§
ACS+FG0041 (n=10)	135,7 ± 14,6 *	136,1 ± 28,4 *
ACS+FG2216 (n=10)	363,7 ± 119,0	491,3 ± 121,9

Tab.13: Relative mRNA- Expression von Kollagen (Kol) I und III; §§ p<0,01 Sham vs.ACS; * p<0,05 ACS vs. FG0041

Die Proteinexpression von Kollagen I und III war zwischen der ACS und Sham Gruppe nicht unterschiedlich. Für Kollagen III zeigte sich ein Trend zur Heraufregulation. Kollagen I-Protein war nicht signifikant verringert. In der FG0041-Gruppe wurde Kollagen III signifikant reduziert. Kollagen I-Protein zeigte einen signifikanten Anstieg auf Proteinebene (Abb.11B). Die Proteinexpression in der PH4HI FG2216-Gruppe wurde nicht untersucht.

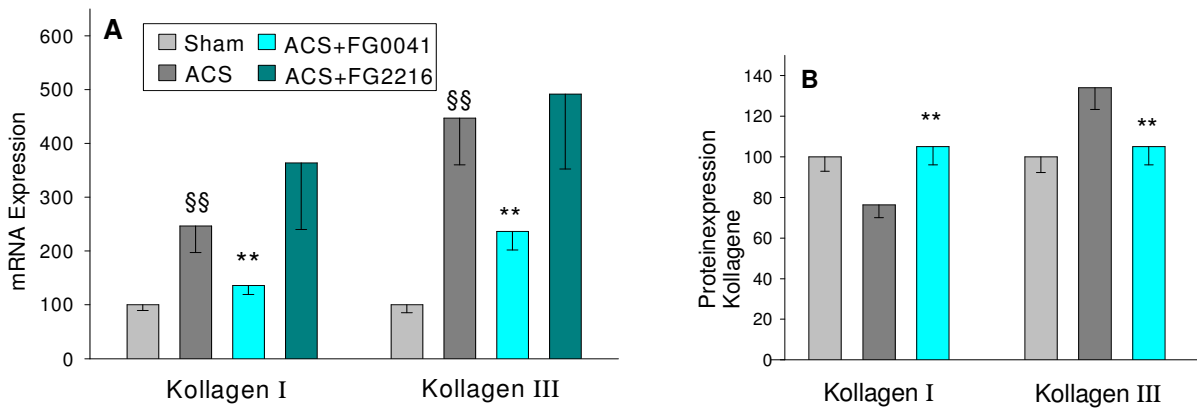


Abb.11A: Relative mRNA (A) und Protein-(B) Expression von Kollagen I und III in den Sham-, ACS-, und P4HI Medikationsgruppen; §§ p<0,01 Sham vs. ACS; ** p<0,01 ACS vs. FG0041/FG2216.

4.5 Regulationen von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM)

4.5.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS

Genexpression:

Die mRNA-Expression der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2), sowie der Membrane-Type Matrixmetalloproteinase 1 (MT1-MMP) wurden ACS signifikant heraufreguliert (p jeweils <0,01). MMP2 und MT1-MMP wurden im Vergleich zur Sham-Gruppe 2-fach induziert. Die endogenen Inhibitoren der MMPs, *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, TIMPs, TIMP 1 und 2 mRNA-Expression waren um das 3,5- bzw. 2,9-fache des Sham-Ausgangsniveaus gesteigert. Die TIMP3 Expression war unverändert und TIMP4 war signifikant herunterreguliert. (Abb.12).

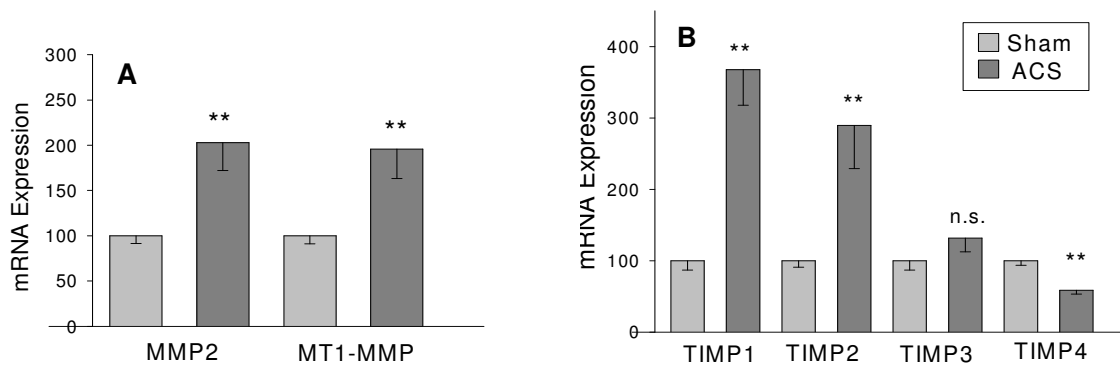


Abb.12: Relative mRNA-Expression von MMP2 und Membrane-Type 1 Matrixmetalloproteinase (A) (MT1-MMP) und *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase* (B) (TIMP) 1 bis 4 in der Sham- und ACS-Gruppe. Die Sham-Gruppe entspricht 100%; MMP, Matrixmetalloproteinase; TIMP, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase; ** p<0,01 Sham vs. ACS; * p<0,05 Sham vs. ACS.

Die stärkere Heraufregulation der TIMP1-Genexpression im Verhältnis zur MMP2 Genexpression resultierte in einem verminderten mRNA MMP2-TIMP1-Quotienten (Sham:1,156±0,11 vs. ACS:0,636±0,077; p<0,01). Deutlich erhöht zeigte sich der mRNA-Quotient von MMP2- und TIMP4 (Sham:1,0356±0,113 vs. ACS: 4,361±0,994; p<0,05). Keine Signifikanz ergab sich für den MMP2-TIMP3-Quotienten (Sham:1,2108±0,211, ACS:2,265±0,620).

Proteinexpression:

Die MMP2 Proteinexpression zeigte entsprechend der mRNA-Regulation einen 2-fachen Anstieg im Vergleich zur Sham-Gruppe. MMP1-Protein wurde im Gegensatz dazu, sowohl in der latenten als auch in der aktiven Form, herunterreguliert. Dabei kam es nur in latenter Form zu einem signifikanten Ergebnis. TIMP1 (Tab.13), TIMP3 sowie TIMP4 präsentierten auf Proteinebene einen deutlichen Abfall der Expression, der für TIMP1 am stärksten sichtbar ausgeprägt war. Die Expression von TIMP1 sank auf zwei Drittel der Ausgangsexpression in der Sham-Gruppe (Tab.13).

	MMP2	MMP1 _{aktiv}	MMP1 _{latent}	TIMP1	TIMP3	TIMP4
Sham (n=14)	100±14,4	100±10,9	100±6,8	100±12,9	100±8,2	100± 5,9
ACS (n=15)	198,0±31,4*	88,0±9,7	69,9±5,2**	59,8±5,7**	85,7±7,9	90,9±8,0

Tab.13: Relative Proteinexpression der *Matrixmetalloproteinasen* (MMP) 2, MMP1_{latent}, MMP1_{aktiv} sowie *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase* (TIMP) 1, 3 und 4 in den Gruppen Sham und ACS normalisiert zur GAPDH-Proteinexpression. Die Sham-Gruppe stellt den 100%-Bezugspunkt dar; ** p<0,01 Sham vs.ACS; * p<0,05 Sham vs.ACS.

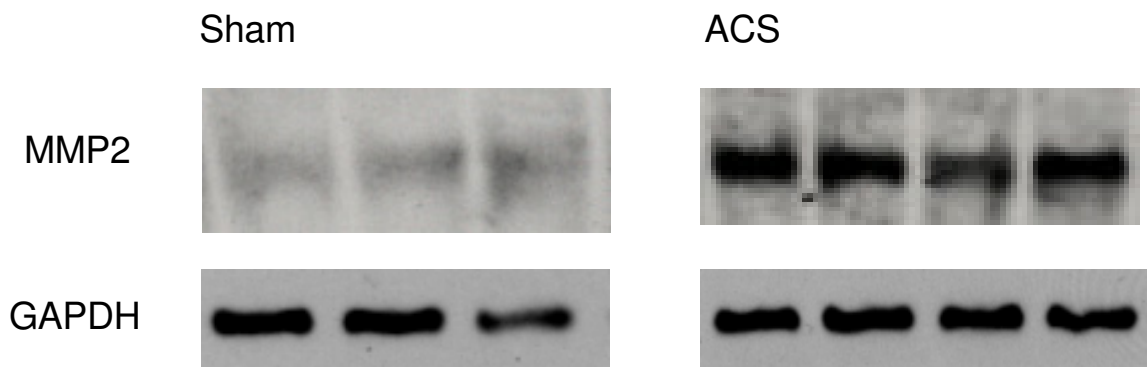


Abb.13: MMP2 Western Blot zum Vergleich der Expressionen von Sham- und ACS-Gruppe: Oben: links je 3 Proben der Sham-Gruppe, rechts 4 Proben der ACS-Gruppe. Die ACS-Gruppe zeigte einen deutlichen Anstieg der MMP2-Proteinexpression. Unten: Western Blot der gleichen Membran nach Stripping zur Detektion von GAPDH: die GAPDH Expression war zwischen der Sham- und ACS-Gruppe unverändert, so dass die GAPDH als Referenzen verwendet werden konnte.

Im Gegensatz zum mRNA MMP2-TIMP1-Quotienten stieg der MMP2-TIMP1-Quotient auf Proteinebene nach Volumenbelastung an (Sham:1,172±0,2 vs. ACS:4,143±0,9; p<0,01). Ebenso signifikant stiegen die Quotienten von MMP2-TIMP3 (Sham:1,101±0,170 vs.ACS:2,626±0,56; p<0,05) und MMP2-TIMP4 (Sham:1,019±0,13 vs. ACS:2,352±0,38; p<0,01) an. Gleichfalls erhöht war der MMP1_{aktiv}-TIMP1-Quotient (Sham:1,068±0,1 vs. ACS:1,565±0,19; p<0,05).

Enzymaktivität:

Eine gesteigerte Enzymaktivität ließ sich in allen 3 gemessenen Formen von MMP2, sowie in MMP9 nachweisen. Die Zunahme der Aktivität war bei MMP2_{latent} und pro-MMP2 etwa 1,5-fach und bei MMP9 etwa 3-fach (Tab.14).

	MMP2 _{latent}	pro-MMP2	MMP9
Sham (n=14)	100 ± 5,3	100 ± 4,5	100 ± 19,0
ACS (n=15)	154,6 ± 10,5**	140,9 ± 5,7**	288,8 ± 29,3**

Tab.14: Relative Enzymaktivität von *Matrixmetalloproteinase* (MMP) 2 pro- und latente Form sowie MMP9 in Bezug zu β -Actin. Die Sham-Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die ACS-Gruppe darauf bezogen; ** p<0,01 Sham vs.ACS

Entsprechend der Proteinregulation zeigte sich bei Bildung des MMP2–TIMP1 Quotienten in beiden Aktivitätsformen von MMP2 durch ACS eine Steigerung gegenüber der Sham-Gruppe (pro-MMP2-Sham: 1,147±0,13 vs. ACS: 2,870±0,3; MMP2_{latent}: Sham: 1,165±0,14 vs. ACS: 3,132±0,42%; alle p<0,01). Sowohl bei dem pro-MMP2–TIMP3/TIMP4–Quotienten, als auch bei dem MMP2_{latent}-TIMP3/TIMP4-Quotienten zeigte sich eine signifikante Zunahme (Daten nicht gezeigt).

Die MMP9-Quotienten mit TIMP1, TIMP3 und TIMP4 zeigten eine deutlich signifikante Erhöhung (MMP9-TIMP1:Sham: 1,189±0,26 vs. ACS: 5,951±0,84; MMP9-TIMP3 Sham: 1,075±0,3 vs. ACS: 4,105±0,56; MMP9-TIMP4 Sham: 1,044±0,21 vs. ACS: 3,526±0,49; für alle p<0,01).

4.5.2. Einfluss von FG0041 und FG2216 auf mRNA- Enzym und Proteinexpression

Genexpression:

Die mRNA Expression von MMP2 und MT1-MMP wurden durch ACS signifikant erhöht. Die MMP2 und MT-MMP1 mRNA Expression zeigten einen 2-fachen Anstieg im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die Behandlung mit K-P4HI FG0041 ergab tendenziell eine Verringerung der durch ACS erhöhten mRNA der MMPs, wobei nur MMP2 einen signifikanten Wert erreichte. MT-MMP1 zeigte unter FG0041 einen Trend zu einer Abnahme im Vergleich mit der ACS-Gruppe, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

Durch Applikation des HIF 1 α P4HI FG2216 wurde die Genexpression der MMPs zum Teil signifikant erhöht. Die MT-MMP1 und MMP2 mRNA Expression stiegen auf das 2-fache des Sham-Ausgangswertes. Gegenüber der ACS-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb.14).

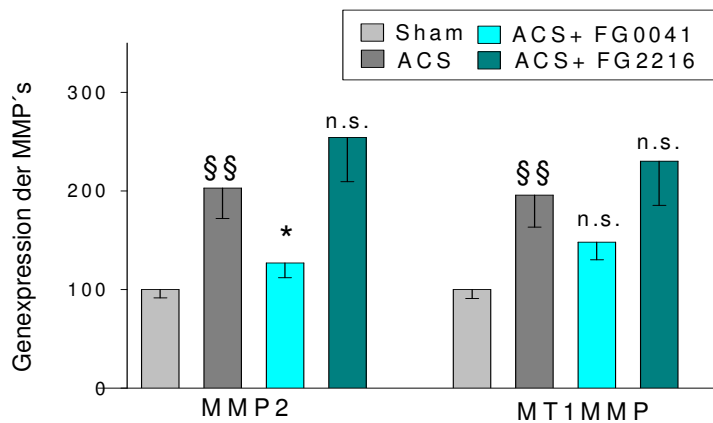


Abb.14: Relative mRNA-Expression von MMP2 und Membrane-Type1 Matrixmetalloproteinase (MT-MMP1) normalisiert auf GAPDH-Genexpression; §§ $p < 0,01$ Sham vs.ACS; * $p < 0,05$ ACS vs.ACS+ FG0041

Die TIMPs zeigten bezüglich der Genexpression für TIMP 1 und 2 eine Induktion durch den ACS auf das 3,5- bzw. 2,9-fache des Sham-Ausgangsniveaus. TIMP3 wurde durch ACS herauf reguliert, blieb allerdings unter dem Signifikanzniveau. TIMP4 entwickelte sich in der ACS-Gruppe gegenläufig und wurde signifikant herunter reguliert im Vergleich zu der Sham-Gruppe (Abb.15).

FG0041 hemmte die durch ACS induzierte Hochregulation der mRNA von TIMP1 und TIMP2. TIMP1 fiel auf das 2-fache und TIMP2 auf das 1,5-fache ab. Die Werte erreichten dabei das Niveau der Sham-Gruppe. Die mRNA von TIMP3 und 4 blieben gegenüber der ACS-Gruppe unter Behandlung mit FG0041 unverändert (Abb.15).

Durch Behandlung mit dem HIF 1α P4HI FG2216 kam es zu einem gegenläufigen Trend im Vergleich zur der FG0041-Gruppe. Insbesondere TIMP1 mRNA zeigte unter Applikation von FG2216 eine weitere Steigerung der bereits durch ACS induzierten Hochregulation. Die TIMP1 Genexpression wurde durch FG2216 induziert und stieg so auf das 7-fache der Sham-Gruppe an, blieb aber im Vergleich zur Sham- sowie ACS-Gruppe nicht signifikant. TIMP3- und TIMP4-mRNA zeigten in der ACS+FG2216-Gruppe denselben Trend zur Elevation, blieben aber im Vergleich zu der Sham- und ACS-Gruppe auch unter Signifikanzniveau. TIMP2 zeigte nach Medikation mit FG2216 gegenüber der ACS-Gruppe eine Tendenz zur Abnahme der Genexpression. Auch hier blieben die Unterschiede unter Signifikanzniveau (Abb.15).

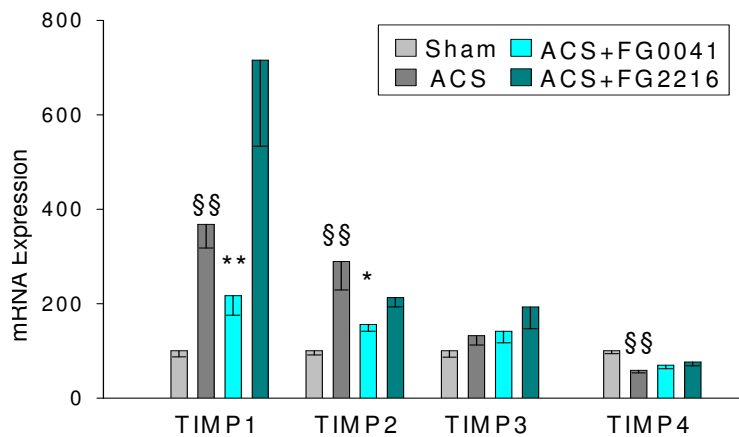


Abb.15: Relative mRNA-Expression der *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase* (TIMP) 1 bis 4, auf GAPDH-Expression normalisiert; §§p<0,01 Sham vs. ACS; **p<0,01 ACS vs. ACS+FG0041; *p<0,05; ACS vs. FG0041.

In der FG0041-Gruppe blieben die Quotienten von MMP2-TIMP1/TIMP2 unverändert gegenüber der ACS-Gruppe. Für den MMP2-TIMP3/TIMP4 Quotienten zeigte sich ein Trend zur Erniedrigung, welcher statistisch keine Signifikanz erreichte (Daten nicht gezeigt).

In der FG2216-Gruppe resultierten bei den MMP-TIMP-Quotienten keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell konnte man bei den Quotienten der FG2216-Gruppe einen Anstieg der Genexpression erkennen, im Vergleich zu den Quotienten in der ACS-Gruppe.

Proteinexpression:

Die MMP2 Proteinexpression zeigte in der ACS-Gruppe, entsprechend der mRNA Regulation, einen signifikanten Anstieg um das 2-fache im Vergleich zur Sham-Gruppe. Unter FG0041 kam es zu einer weiteren Erhöhung der MMP2-Expression, über das ACS-Niveau (Tab15), ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zu ACS-Gruppe und eine signifikante Heraufregulation verglichen mit der Sham-Gruppe. In der FG2216 Gruppe wurde MMP2 im Vergleich zur ACS-Gruppe reduziert, erreichte aber nicht den Ausgangswert der Sham-Gruppe und keine Signifikanz gegenüber der ACS-Gruppe (Tab15). MMP1-Protein wurde durch ACS sowohl in der latenten als auch in der aktiven Form herunterreguliert, wobei es nur in latenter Form zu einem signifikanten Ergebnis kam. In der FG0041-Gruppe zeigte die Proteinexpression von MMP1_{aktiv} analog eine signifikante Reduktion gegenüber der unbehandelten ACS-Gruppe. MMP1_{latent} dagegen zeigte tendenziell eine Abnahme (Tab.15). In der ACS+FG2216-Gruppe ergab sich bei MMP1_{latent} eine weitere signifikante Absenkung im Vergleich zur ACS-Gruppe. Im Verhältnis mit der Sham-Gruppe zeigte sich für MMP1_{latent} unter FG2216 Applikation eine signifikante Verringerung des Wertes um die Hälfte des Sham-Ausgangswertes. Für aktives

MMP1 ergaben sich in der FG2216-Gruppe verglichen mit der ACS-Gruppe keine signifikanten Veränderungen (Tab.15).

TIMP1 zeigte auf Proteinebene durch die chronische Volumenbelastung eine verminderte Expression (Tab.15). Die TIMP3 und 4 Proteinexpression wurden durch die Volumenbelastung nicht beeinflusst. FG0041 erhöhte signifikant TIMP4-Protein im Vergleich zu der ACS-Gruppe. TIMP1 und 3 zeigten in der FG0041-Gruppe eine Tendenz zur Heraufregulation der durch ACS erniedrigten Proteinexpression, was für TIMP1 eine zu der mRNA-Expression abweichende Regulation darstellte. In der FG2216-Gruppe zeigte sich eine Übereinstimmung mit der Genexpression. Es kam zu einer Erhöhung der durch ACS erniedrigten mRNA Expression von TIMP1 und somit Heraufregulation auf Sham-Gruppen Niveau. FG2216 bewirkte eine signifikante Steigerung der TIMP4-Genexpression und verdoppelte die mRNA- Expression im Vergleich zur ACS-Gruppe (Tab.15). TIMP3 stieg, wie auch schon in der FG0041-Gruppe, unter Behandlung mit FG2216 weiter an, blieb allerdings unter Signifikanzniveau.

	MMP1 _{aktiv}	MMP1 _{latent}	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4
ACS (n=15)	88,0 ± 9,7	69,9 ± 5,2	198 ± 31,4	59,8 ± 5,7	85,7 ± 7,9	90,0 ± 8,0
ACS+ FG0041 (n=10)	66,2 ± 10,4	55,0 ± 2,5*	225,1 ± 44,6	77,7 ± 13,9	122,9 ± 28,5	116,3 ± 16,0
ACS+FG2216 (n=10)	84,1 ± 25,9	49,0 ± 3,4*	159,4 ± 19,9	96,5 ± 23,1	135,1 ± 31,6	197,2 ± 40,1**

Tab.15: Relative Proteinexpression der *Matrixmetalloproteinase* (MMP) 1 in der latenten und aktiven Form, MMP2 sowie *Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase* (TIMP) 1,3 und 4 in den Subgruppen ACS; ACS+FG0041; ACS+FG2216; **p<0,01 ACS vs.ACS+FG2216; *p<0,05 ACS vs.FG0041/FG2216.

Durch die Behandlung mit den Substanzen FG0041 und FG2216 zeigte sich tendenziell für die MMP2-TIMP1 und 3-Quotienten eine Absenkung. Der MMP2-TIMP4-Quotient stieg weiter an. Die MMP1_{aktiv}/MMP1_{latent}-TIMP1-Quotienten wurden durch die chronische Volumenbelastung nach ACS erhöht. Durch Behandlung mit FG0041 sanken die Werte wieder auf Kontrollniveau. In der behandelten FG2216-Gruppe sanken die Quotienten unter Kontrollniveau (ACS:1,369±0,18 vs. FG2216:0,764±0,11, p<0,05; MMP1_{aktiv}-TIMP1:ACS:1,565±0,19 vs. FG2216: 0,608±0,19; p<0,05). Der MMP1_{aktiv}/MMP1_{latent}-TIMP3-Quotient wurde durch Induktion der Volumenbelastung reduziert und durch Applikation der Medikamente FG0041 und FG2216 noch stärker verringert. MMP1_{aktiv}-TIMP4 zeigte in der ACS-Gruppe kaum eine Regulation, mit Administration von FG0041 eine Erniedrigung und durch Behandlung mit FG2216 einen Anstieg. Für den MMP1_{latent}-TIMP4-Quotienten zeigte sich in allen Gruppen eine Verminderung der Werte (Daten nicht gezeigt).

Enzymaktivität:

Der ACS führte zu einer signifikanten Steigerung der Enzymaktivität aller 3 zu messenden MMP2 Aktivitätsformen und MMP9. Die gesteigerte MMP2_{latent} und pro-MMP2-Enzymaktivität wurde weder durch Behandlung mit FG0041 noch durch FG2216-Medikation beeinflusst. MMP9 wies nach FG2216-Administration eine signifikante Verminderung der durch ACS induzierten Enzymaktivität auf. (Abb.16).

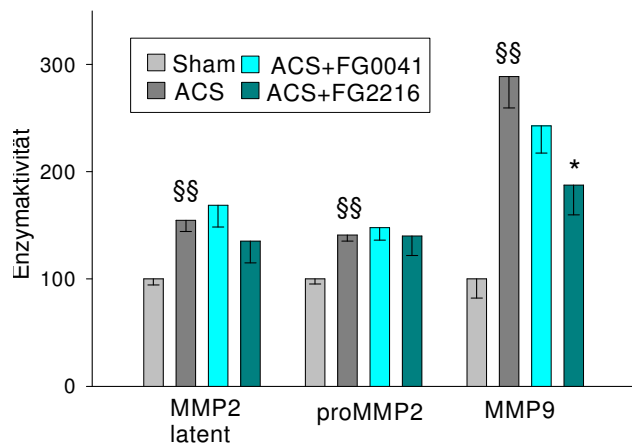


Abb.16: Relative Enzymaktivität von MMP2 (latente und pro Form) und MMP9 in den Gruppen Sham, ACS, FG0041 und FG2216; §§ p<0,01 Sham vs. ACS; * p<0,05 ACS vs. FG2216

Entsprechend der Proteinregulation zeigte sich sowohl für die pro-MMP2–TIMP1/TIMP3/TIMP4–Quotienten, als auch bei den MMP2_{latent}–TIMP1/TIMP3/TIMP4–Quotienten ein signifikanter Anstieg. Die MMP9–Quotienten (Sham vs. ACS) mit TIMP1, TIMP3 und TIMP4 zeigten ebenfalls eine signifikante Elevation. Durch FG0041-Medikation ließen sich keine veränderten MMP–TIMP–Quotienten in der Aktivitätsmessung feststellen, verglichen mit den ACS–Gruppen Quotienten. Dafür resultierte in der ACS+FG2216–Gruppe ein signifikant geringerer Quotient für MMP9–TIMP1 gegenüber der ACS–Gruppe (ACS: 5,951±0,84 vs. FG2216: 2,585±0,45, p<0,05) und MMP9–TIMP3 (ACS: 4,105±0,56 vs. FG2216: 1,688±0,27, p<0,01). Ebenfalls wurden die MMP2_{latent} und pro–Form–TIMP1/3/4–Quotienten in der FG2216–Gruppe verringert verglichen mit den ACS–Gruppen Quotienten. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. MMP2_{latent}–TIMP1: ACS:3,132±0,42 vs. FG2216:2,049±0,38; MMP2_{latent}–TIMP3: ACS:2,153±0,24 vs. FG2216:1,435±0,27; pro–MMP2–TIMP1:ACS:2,870±0,29 vs. FG2216:2,048±0,33; pro–MMP2–TIMP3:ACS:1,904±0,18 vs. FG2216:1,375±0,2).

4.6. Regulation der Fettstoffwechselmetabolite

4.6.1. Veränderungen durch Volumenbelastung mittels ACS

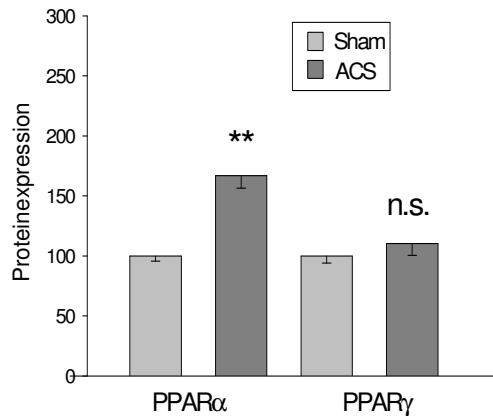


Abb.17: Relative Protein-Expression von Peroxisome-Proliferator-Activator-Rezeptor α und γ in den Gruppen Sham und ACS; ** $p < 0,01$ Sham vs.ACS.

In der ACS-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der PPAR α Proteinexpression auf $166,9 \pm 10,0\%$ (Abb.17). Für PPAR γ ergab sich keine signifikante Erhöhung der Protein-Expression gegenüber der Sham-Gruppe. (Abb.17).

4.6.2. Einfluss des P4HI FG0041 und FG2216 auf die Proteinexpression

Die Applikation des K-P4HI FG0041 führte gegenüber der ACS-Gruppe bei PPAR α zu keiner signifikante Veränderung der Proteinexpression. (Abb.18).

Der Einfluss von FG2216 auf die Proteinexpression von PPAR α und PPAR γ wurde nicht untersucht.

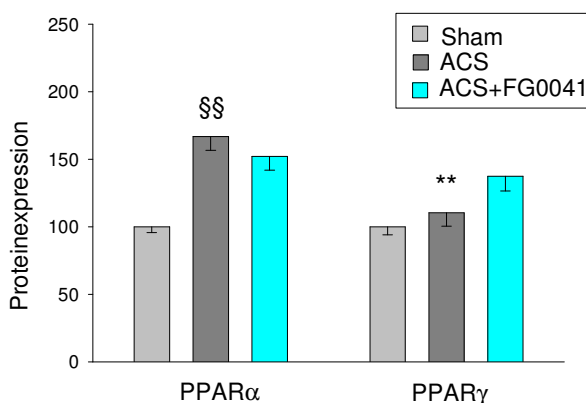


Abb.18: Relative Protein-Expression der Peroxisome-Proliferator- Activator- Rezeptors α und γ in Sham, ACS und ACS+ FG0041; \$\$ $p < 0,01$ Sham vs.ACS. ** $p < 0,01$ ACS vs.ACS+FG0041; * $p < 0,05$ ACS vs.ACS+ FG0041

4.7. Korrelationen

4.7.1 Korrelationen innerhalb der ACS-Gruppe

Um zu untersuchen, ob die durch ACS bedingten Änderungen der morphologischen Parameter sowie die Änderungen der Gen- und Proteinexpression der untersuchten Faktoren in einem direkten Zusammenhang miteinander stehen, wurde eine Korrelationsanalyse der in der ACS-Gruppe ermittelten Befunde durchgeführt.

In der ACS-Gruppe ergaben sich direkte Korrelationen zwischen HG/KG und OPN sowie ET1. Des Weiteren korrelierte ET1 mit RA/KG, RV/KG, ZVD und IVS. LA/KG korrelierte indirekt mit TGF β 1- und direkt mit OPN-mRNA. Lunge/KG korrelierte mit Kol III. RRsyst korrelierte mit Kol I und III, ET1, MT-MMP1 und HIF1 α mRNA (Tab.16).

Der LVEDP stand in Wechselwirkung mit TIMP1 und MT-MMP1. Der ZVD zeigte Korrelationen mit Kol I und III, AT1, ET1 und HIF1 α . IVS und HW korrelierten mit OPN und TIMP1. Der LVESD, LV-EF und LV-FS zeigten Korrelation mit TIMP2- und HIF1 α mRNA. LV-EF und LV-FS korrelierten mit der Expression von ETRA (Tab.16).

TGF β 1 korrelierte mit der Genexpression von ITG β 1-, MMP2-, TIMP2-, TIMP3-, ET1, ETRA, ECE1 und HIF1 α (Tab.17).

Starke Korrelationen ergaben sich ebenfalls für CTGF β 1 und Kol I, Kol III, MMP2-, MT-MMP1- und HIF1 α - mRNA Expression. ITG β 1- und OPN-mRNA korrelierten beide signifikant mit TIMP3 (Tab.17).

Die Kol I und III Expression war miteinander eng korreliert, zudem zeigten sich Korrelationen zwischen Kol I - MMP2 und MT-MMP1. Analog Kol III mit MT-MMP1 (Tab.17).

MMP2 war signifikant mit der TIMP2 und MT-MMP1 Expression korreliert (Tab.17).

AT1 korrelierte mit Kol I, Kol III, MMP2, TIMP2, TIMP4, ET1 und ETRB. Weiterhin war ET1 mit Kol 1, 3, MMP2 und ETRB korreliert. ETRA war seinerseits mit TGF β 1 und TIMP2 assoziiert. ETRB hatte Bezug zu TIMP4. ECE1 zu TGF β 1- und TIMP2- und 4-mRNA (Tab.17). Die Expression von HIF1 α korrelierte mit TGF β und CTGF, Kol I, Kol III, MMP2, TIMP2 und MT-MMP1 (Tab.17).

	TGFβ1	ITGB1	OPN	KOL1	KOL3	TIMP1	TIMP2	MT-MMP1	AT1	ET1	ETRA	HIF1α
HG/KG			,670*							,653**		
RA/KG										,838**		
LA/KG	-,606*		,611*									
RV/KG										,723**		
Lunge/KG					,589*							
Sys (mmHG)				-,567*	-,832**			-,671*		-,685**		-,733**
LVEDP						,735**		,530*				
ZVD				,679**	,989**				,559*	,831**		,846**
IVS(mm)			,689**			,620*				,881**		,664*
HW(mm)		,875**	,658*			,931**						
LVESD							-,568*					,511*
LV-EF							,585*				,802**	-,581*
LV-FS							,561*				,766**	-,590*

Tab.16: Korrelationen der organomorphologischen, hämodynamischen und echokardiographischen Parameter mit der mRNA-Expression der ACS-Gruppe. Korrelation nach Pearson. Signifikanz (2-seitig); **p<0,01; * p<0,05

	TGFβ1	CTGFβ	ITGB1	OPN	KOL1	KOL3	MMP2	TIMP1	TIMP2	TIMP4	MT-MMP1	AT1	ET1
ITGB1	,742**												
KOL I		,948**											
KOL III		,855**			,930**								
MMP2	,754**	,801**			,800**	,684*							
TIMP1		,676*		,677*	,678*	,635*							
TIMP2	,818**						,912**			,670*			
TIMP3	,703**		,776**	,693**				,638		,570*		,588*	,614*
MT1 MMP		,843**			,807**	,768**	,870**		,815**				
AT1		,617*			,697**	,765**	,690**		,748**	,694**			
ET1	,650*				,725**	,859**	,712**	,638*				,707**	
ETRA	,842**		,684*				,647*		,821**				
ETRB		,621*		,629*	,656*	,666*				,705*		,933**	,725**
ECE1	,813**		,602*						,643*	,754**		,603*	
HIF 1α	,692**	,711**			,711**	,741**	,845**		,790**		,912**		

Tab.17: Korrelationen der mRNA-Konzentration in der ACS-Gruppe. Korrelation nach Pearson. Signifikanz (2-seitig); ** p<0,01; * p<0,05

Korrelation der Proteinkonzentrationen:

In der ACS-Gruppe ergaben sich auf Proteinebene Korrelationen zwischen HG/KG und TGFβ1. Analog dazu wurden direkte und indirekte Korrelationen zwischen LA/KG, bzw. dem ZVD, IVS, LVEDD, LVESD, LV-EF, LV-FS mit TGFβ1 und ITGβ1 ermittelt (Tab.18).

Dpdt/min und der ZVD korrelierten mit TIMP3. Das relative Gewicht der Lunge, dpdt/max und der ZVD zeigten indirekte Verbindungen mit der Aktivität von MMP2_{latent}, LVEDP präsentierte eine direkte Verbindung mit MMP2_{latent}. Dpdt/max korrelierte außerdem mit MMP9. IVS korrelierte mit der Aktivität von pro-MMP2. Mit PPARγ präsentierte dpdt/min und der LVEDD einen Zusammenhang (Tab.18).

	TGFβ1	ITGβ1	TIMP3	MMP2 Latent	pro- MMP2	MMP9	ET1	PPARγ
HG/KG								
LA/KG	,594*	-,629*						
Lunge/KG				-,641**				
LVEDP		-,627*		,636*				
dpdt/max				-,630*		-,590*	,638*	
dpdt/min			,814**					-,524*
ZVD	-,561*		,695**	-,615*				
IVS (mm)	-,799**				-,628*			
LVEDD	-,969**							,566*
LVESD	-,937**	-,670**						
LV-EF	,769**	,740**						
LV-FS	,762**	,726**						

Tab.18: Korrelationen der Protein- Konzentration der ACS-Gruppe mit Organmorphologie, Hämodynamik und echokardiographischen Daten. Korrelation nach Pearson. Signifikanz (2-seitig); ** p<0,01; * p<0,05

Auf Protein-Ebene zeigten sich direkte und indirekte Zusammenhänge zwischen TGFβ1 und ITGβ1, Kol I und III, sowie TGFβ1 und PPARα. ITGβ1-Protein korrelierte weiterhin mit MMP1_{aktiv}, TIMP4 und pro-MMP2. Kol I zeigte signifikante Korrelationen zu TIMP1, TIMP3 und TIMP4. Kol III korrelierte mit ET1 (Tab.19).

Aktives MMP1-Protein korrelierte mit der Proteinexpression von TIMP1 und TIMP4. MMP1_{latent}-Protein ergab Korrelationen mit der Aktivität von MMP2_{latent} und pro-MMP2. TIMP1 und TIMP3 standen in Wechselwirkung mit TIMP4. Die Aktivität von MMP2_{latent} korrelierte mit pro-MMP2 und MMP9 (Tab.19).

Des Weiteren bestanden Korrelationen zwischen den Enzymen des Fettstoffwechsels, PPAR α , mit MMP1_{aktiv}-, TIMP4- und ITG β 1-Protein (Tab.19).

	TGF β	ITG β	MMP1 aktiv	MMP1 latent	MMP2 latent	TIMP1	TIMP3	TIMP4	ET1	PPAR α
ITGβ	,793**									
KOL I	,996**					-,732*	-,706*	,740**		
KOL III	- ,901**								,685**	
MMP1 aktiv		- ,700**								
TIMP1			,580*			,733*	-,651**			
TIMP4		,609*	- ,745**			-,581*	,652**			
MMP2 latent				,553*		-,541*				
pro- MMP2		,831**			-,569*					,593*
MMP9				,581*	,720**					-,552*
PPARα	-,635*		-,572*					,575*		

Tab.19: Korrelationen der Proteinkonzentration in der ACS-Gruppe. Korrelation nach Pearson. Signifikanz (2-seitig); ** p<0,01; * p<0,05

5. DISKUSSION

5.1. Veränderungen durch ACS

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die Hemmung von K- und HIF P4H den Verlauf einer exzentrischen kardialen Hypertrophie durch experimentelle chronische Volumenbelastung in Rattenherzen beeinflussen kann. Als Indikatoren dienten neben morphologischen und hämodynamischen Parametern der Einfluss der chronischen Volumenbelastung und Medikationen auf neuroendokrine Aktivierung, Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und des myokardialen Energiestoffwechsels. Unsere Studie zeigt, dass sowohl ein oral verfügbarer Kollagen- als auch ein HIF P4HI der, durch Volumenbelastung hervorgerufenen Einschränkung der myokardialen Funktion auf hämodynamischer und molekularer Ebene entgegenwirkt.

Ein Ziel der Arbeit war die Analyse der mit einer kardialen Hypertrophie in Verbindung stehenden Gene in volumenbelasteten Herzen. Wir fanden, dass die veränderte Gen- und Proteinregulation nach chronischer Volumenbelastung durch beide P4HI FG0041 und FG2216 beeinflusst wird.

Eine pathologische Volumenbelastung bewirkt morphologische Veränderungen des Herzens um den Bedarf an zirkulierendem Blut und Sauerstoff aufrecht zu erhalten. Diese so genannte exzentrische *Hypertrophie* wird durch verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel durch eine Klappeninsuffizienz oder einen aortocavalen Shunt induziert [14; 16]. Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die der exzentrischen Hypertrophie zugrunde liegen, haben wir die Herzen von Ratten, bei denen eine chronische Volumenbelastung durch einen aortocavalen Shunt induziert wurde untersucht. In der Tat führte die chronische Volumenbelastung, übereinstimmend mit der Literatur [14], zu einer exzentrischen Hypertrophie mit ventrikulärer Dilatation, eingeschränkter systolischer Herzfunktion [14], Verringerung der LV-EF und LV-FS, einer Zunahme der LVEDD, LVESD, des IVS und der HW. Diese Befunde wurden durch die Zunahme des Herzgewichtes bestätigt. Hämodynamisch waren eine reduzierte Kontraktilität des LV, ein erhöhter ZVD und ein verringerter sysRR bei ACS evident. Demgegenüber blieb der LVEDP unverändert. Diese Veränderungen wurden von einem erhöhten relativen Lungengewicht begleitet. Zusammenfassend sprechen diese Befunde für die Entwicklung einer exzentrischen kardialen Hypertrophie mit beginnender Dilatation und kardialer Insuffizienz, was mit dem klinischen Verlauf von Patienten mit Aortenklappeninsuffizienz (AI) vergleichbar ist [89].

Bei der kardialen Hypertrophie kommt es frühzeitig zu einer Aktivierung von gewebständigen neuroendokrinen Systemen, zu denen das kardiale Renin-Angiotensin–Aldosteron- und das

Endothelin-System gehören. Die Aktivierung dieser Systeme führt zu einer Heraufregulation von Wachstumsfaktoren, was die Entstehung einer LVH mit myokardialen Umbau fördert [29]. Die Induktion der ET1 und ETRA-Genexpression durch chronische Volumenbelastung wurde bereits beschrieben und konnte durch unsere Ergebnisse bestätigt werden [72]. Diese Befunde werden erweitert durch die hier gezeigte ACS bedingte Heraufregulation von AT1, ETRB und ECE-1, sowie der neutralen Endopeptidase (NEP) nach Volumenbelastung.

ET1 aktiviert über den ETRA-Rezeptor TGF β 1 und bedingt so eine Kollagen- und Fibronectinakkumulation im Herzen [1]. TGF β 1, das ebenfalls auch durch hypertrophe Stimuli induziert werden kann, bewirkt eine myokardiale Fibrose und diastolische Dysfunktion und seine Blockade kann das Auftreten einer myokardialen Fibrose und diastolischen Dysfunktion vermindern [51]. Die in unserer Studie gemessene Heraufregulation von Wachstumsfaktoren durch Volumenbelastung bestätigen diese Befunde.

Anderweitig aktiviert ET1 über den ETRA-Rezeptor den *Connecting Tissue Growth Factor* (CTGF) [70], der ebenfalls die Kollagensynthese steigert. Eine Hemmung von CTGF kann den Anstieg der Kollagen I-Expression blockieren [70]. Diese Daten zeigen, dass die myokardiale Aktivierung des Endothelinsystems eng mit der Aktivierung der myokardialen Wachstumsfaktoren verbunden ist, und dass CTGF an der ET1-vermittelten myokardialen Fibrose beteiligt ist. Das aktivierte Endothelinsystem ist daher teilweise an den durch ACS vermittelten hohen Anstieg der CTGF- und TGF β 1-Expression beteiligt und könnte darüber hinaus die gesteigerte Kollagenexpression unter ACS vermitteln.

Integrinrezeptoren, speziell die kardiale Isoform ITG β 1, sind an der Detektion und Umwandlung von kardialen Stress in intrazelluläre Signale beteiligt. Unterstützt wird der ITG β 1-Rezeptor hierbei durch seinen intrazellulären Bindungspartner *Osteopontin* (OPN) [37]. Kardialen Myozyten exprimieren hauptsächlich ITG β 1. Unsere Daten und andere Daten [86] zeigen eine Heraufregulation von ITG β 1 als Antwort auf myokardiale Stresssituationen unter ACS. Ebenso konnten wir und andere Arbeitsgruppen [37] eine Heraufregulation von OPN im hypertrophierten Herzen nachweisen. Diese Daten zeigen, dass ITG β 1 und OPN einen Knotenpunkt zur Sensibilisierung des Herzens auf Stress darstellt und an der durch ACS bedingten LV Funktionseinschränkung mit Dilatation und beginnender kardialer Insuffizienz beteiligt ist

Die vermehrte myokardiale Kollagenexpression unter chronischer Volumen- und Druckbelastung wurde bereits in der Literatur beschrieben [27; 23]. Die Kollagenakkumulation ist ein wesentlicher Faktor, der bei der pathologischen LVH zu myokardialer Steifheit und kardialer Dysfunktion beiträgt. Das Ausmaß der Kollagenakkumulation ist eng mit dem

Schweregrad der funktionellen kardialen Schädigung und dem LVEDP verbunden. Bei Patienten mit AS wurde gezeigt, dass die chronische kardiale Druckbelastung zu einer pathologischen Steigerung des LVEDP führt [28]. Dies trifft jedoch auf Patienten mit AI nicht zu. Wir konnten zeigen, dass es trotz der signifikanten Erhöhung der Kollagen I und III mRNA-Expression durch ACS es keinen Anstieg des Kollagenproteingehaltes gibt. Es scheint daher in diesem Tiermodell der exzentrischen LVH zu einer geringeren Kollagenakkumulation innerhalb des Herzens zu kommen. Dieser Unterschied der Kollagenakkumulation könnte den Erhalt der diastolischen Funktion des Herzens, gemessen durch den LVEDP, in unserem ACS-Rattenmodell erklären. Möglich wäre, anhand unserer Daten, ein vermehrter Kollagen-Abbau durch die erhöhte Genexpression von MT1-MMP und MMP2, welches im Komplex mit der gesteigerten TIMP1 Genexpression die Aktivität der Enzyme, wie pro-MMP2 und MMP9 erhöht was den Abbau von Kollagen fördert [75]. Einem Anstieg von Kollagen-Spalt-Produkten wiederum beeinflussen ebenfalls die Genexpression der MMPs. Beispielsweise steigern Kollagen Typ IV-Fragmente die Expression vom MT1-MMP [59]. Weiterhin scheint die erhöhte Expression von TIMP2 zu der Verminderung des Kollagenproteingehaltes beitragen zu können, was zu einer geringeren Kollagenakkumulation im Myokard führen und letztendlich den LVEDP stabilisierten könnte. Die Bedeutsamkeit von TIMP1 bei myokardialen Umbauprozessen wurde dadurch gezeigt, das eine Keimbahndeletion von TIMP1 die LV Kontraktilität verringert und der Grad der LVH größer ist als bei den Wildtypen [22].

Die linksventrikulären Umbauprozesse bei ACS sind eng mit Veränderungen der Expression und Aktivität der MMPs und TIMPs verbunden [76,78]. Die Volumenbelastung führte zu einer Fehlregulation von MMPs und TIMPs, was zu einer Anhäufung extrazellulärer Matrixproteine und zu interstitieller Fibrose [78,43] führt. Es liegt nahe, dass unter Anderem der erhöhte LV Wandstress hierfür verantwortlich ist, da dieser die Induktion von MMP2, MT1MMP und MMP9 in Fibroblasten bewirken kann [18]. Da diese Enzyme eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Umbauprozessen im Herzen spielen, könnte diese Fehlregulation einen Einfluss auf die durch den ACS bedingte kardiale Dilatation und Funktionseinschränkung in unserem Modell haben. In der vorliegenden Arbeit fanden wir eine mit der Literatur übereinstimmende Regulation der MMPs und TIMPs, die in ihrer Gesamtheit eine Aktivierung der MMPs bewirken sowie eine Induktion der proteolytischen Gesamtaktivität gezeigt hat, hinweisend durch den erhöhten MMP/TIMP Quotienten unter Volumenbelastung. Dies lässt auf einen erhöhten ECM-Umsatz schließen. Das Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs könnte für die übermäßige Umwandlung der ECM verantwortlich sein, da bereits beschrieben wurde, dass die TIMPs die durch die MMPs induzierte Umwandlung der ECM [69] verhindern.

Der Anstieg von TIMP1 auf mRNA-Ebene einerseits und dessen Abfall auf Proteinebene andererseits lassen vermuten, dass posttranskriptionelle Mechanismen, wie eine veränderte translatorische Effizienz, eine verringerte Proteinstabilität und oder eine gesteigerte Proteindegradation, bei der Entstehung von exzentrischer LVH eine Rolle spielen könnten. Weiterhin könnten dies auf die Aktivierung von Kompensationsmechanismen (wie oben beschrieben) bei der exzentrischen LVH hindeuten. Die hier beschriebene Regulation von MMPs, TIMPs und Kollagen durch ACS entspricht der von bereits veröffentlichten Studien [43, 65]. Als spezifisches Regulationsmuster [75] zeigt sich bei myokardialen Erkrankungen eine Induktion der MMP-Expression u.a. durch den Transkriptionsfaktor *Activator Protein-1* [19]. TGF β 1 kann die Expression von MMPs über das *TGF β 1 inhibitory element* (TIE) beeinflussen [24]; hierüber erfolgt eine Induktion von MMP2 und 9, was die durch den ACS bedingte kardiale Dilatation und Funktionseinschränkung in unserem Modell ebenfalls fördern kann. Des Weiteren fanden wir eine Induktion der Proteinexpression von PPAR α durch ACS. PPAR α , ist der vorherrschende PPAR-Rezeptor im Herzen und ist an der Vermittlung der physiologischen und pathologischen Hypertrophie beteiligt [54]. Eine Induktion der PPAR α -Aktivität kann zu kontraktile Dysfunktion führen [16], wodurch teilweise die hier gefundene Abnahme von LV-EF und LV-FS erklärt werden könnte. Bei chronisch herzinsuffizienten Patienten kommt es zu einer Akkumulation von Lipiden im Herzen, hervorgerufen durch die verminderte Oxidation von Fettsäuren [6]. Dies führt zu einer Zunahme der myokardialen Steifigkeit, Dysfunktion und Fibrose des Herzens. Somit könnte die PPAR α Aktivierung unter ACS ein weiterer Regulationsweg in der Vermittlung hypertropher und profibrotischer Faktoren darstellen.

5.2. Veränderungen durch ACS und P4HI auf morphologischer und hämodynamischer Ebene:

Die Hemmung der K-P4H mit FG0041 und HIF-P4H durch FG2216 führte zu einer Abnahme der relativen Gewichte des rechten und linken Atriums, rechten und linken Ventrikel und der Lunge. Weiterhin kam es zu einer Steigerung der hämodynamischen Parameter wie dpdt/max und dpdt/min, LV-EF und LV-FS. Die Behandlung mit dem K-P4HI FG0041 führte zu einer Verbesserung der myokardialen Kontraktilität und einer Abnahme der myokardialen Steifigkeit, was für eine hämodynamische Entlastung des LV spricht im Vergleich zur ACS-Gruppe. Zusätzlich zu den vorher genannten Faktoren reduzierte sich unter dem HIF-P4HI das HG. Diese Reduktion war stärker unter FG2216 als unter FG0041. LVEDD, LVESD und HW wurden durch FG2216 stärker verringert als durch den K-P4H FG0041. Diese Ergebnisse lassen

auf einen Rückgang der kardialen Hypertrophie und Dilatation schließen und implizieren dass die Stabilisierung von HIF1 α und damit verbesserte Oxygenierung des Myokards in der akuten Phase eine größere Rolle in der Entstehung einer durch Volumenbelastung induzierte Herzinsuffizienz spielt, als die Verhinderung der Kollagenakkumulation und myokardialen Fibrose durch den K-P4HI. Interessanterweise konnten Studien bereits eine verzögerte Entwicklung von Herzinsuffizienz bei Druckbelastung durch Stabilisierung von HIF1 α nachweisen, was mit den hier beschriebenen Befunden übereinstimmt [33]. Somit könnte die Hemmung der HIF-P4H eine neue Therapieform zur Verhinderung der LVH und Dilatation und möglicherweise dem Übergang der exzentrischen LVH zur Herzinsuffizienz durch chronische Volumenbelastung darstellen.

5.3. Veränderungen durch ACS und P4HI auf neuroendokriner Ebene

Bei LVH kommt es frühzeitig zu einer Aktivierung neuroendokriner Systeme, zu denen das kardiale Renin-Angiotensin–Aldosteron- und das Endothelin-System gehören. Diese Aktivierung kann zu einer LVH mit myokardialen Umbau führen [29]. Endothelin 1 ist ein potenter Vasokonstriktor, der durch die Induktion von early-immediate Genen und der Induktion der mRNA Expression von Wachstumsfaktoren, wie TGF β und CTGF β das Wachstum von Myozyten stimuliert [10]. Die ET1 Expression kann durch Ang II (z.B. durch arterielle Hypertonie) oder durch ein pathologisch erhöhter kardialer Wandstress, wie er bei chronischer Volumenbelastung besteht, induziert werden [66]. ET1 vermittelt seine Effekte über die Endothelinrezeptoren ETRA und ETRB. ETRA und ETRB sind G-Protein gekoppelte, membran-ständige Rezeptoren und zeigen eine unterschiedliche Spezifität. So bewirkt eine Aktivierung von ETRA, der vor allem auf Kardiomyozyten und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, eine Gefäßkonstriktion und Zellproliferation. Demgegenüber bewirkt ETRB, der vor allem auf Endothelzellen exprimiert wird, unter anderem eine Vasodilatation durch Induktion der NO-Produktion. Somit haben ETRA und ETRB antagonistische Funktionen. Klinisch wird dieser Befund dadurch gestützt, dass eine kombinierte ETRA/ ETRB-Inhibition in experimentellen Modellen von kardiovaskulären Erkrankungen keine Effekte auf das LV Remodelling, Blutdruck oder Hämodynamik zeigt [80]. Durch Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems kommt es zu einer Verschiebung der Endothelinrezeptor-Verteilung mit einem Anstieg von ETRA und einer Reduktion von ETRB [38]. Diese Dysbalance fördert eine ETRA vermittelte Vasokonstriktion und Zellproliferation und kann so pathologische Effekte vermitteln [38]. Insofern überrascht, dass in unserer Studie sowohl ETRA als auch ETRB nach Volumenbelastung induziert waren. Zwar ist bekannt, dass

ET1 und ETRA durch chronische Volumenbelastung induziert werden [72], die Regulation von ETRB bei ACS ist unbekannt. Die Hochregulation von ETRA kann auf die Notwendigkeit der Erhöhung der myokardialen Kontraktilität hindeuten, was sich hämodynamisch in einer zwar erniedrigten aber erhaltenen systolischen LV-Funktion in der ACS-Gruppe zeigte. Die Aktivierung des Endothelinsystems könnte die myokardiale Hypertrophie bewirkt haben [67]. Die Induktion von ETRB könnte auf die Notwendigkeit einer vasodilatatorischen Wirkung - bei gleichzeitig vorhandenen vasokonstriktorisches Effekten von ETRA - hindeuten. In neueren Studien wird von einer zusätzlichen vasokonstriktiven Wirkung von ETRB gesprochen. Letztendlich kann jedoch die Frage nach den genauen Effekten dieser dualen Induktion von ETRA und ETRB nicht geklärt werden. Der K-P4HI FG0041 führte zu einer Verringerung dieser neuroendokrinen Aktivierung des RAAS- und Endothelinsystems. AT1 und ECE-1 aktivieren unter pathologisch erhöhten Wandstress ET1 [66]. Daher ist es denkbar, dass die reduzierte AT1 und ECE-1 Expression unter FG0041 zu einer Verminderung von aktiven ET1 sowie ET1-vermittelten Effekten wie die MMP- Aktivierung und die Synthese von Kollagenproteinen [52] führen könnte. Ebenso könnte die Reduktion von ETRB unter FG0041 eine Verringerung des zirkulierenden ET1 bewirken, da eine Funktion dieses Rezeptors in der Elimination von zirkulierendem ET1-Peptides besteht [34]. Somit könnte die beginnende hämodynamische Entlastung des Herzens unter dem K-P4HI durch die Abnahme der Aktivierung des RAAS- und Endothelinsystems erklärt werden. Dies müsste allerdings mit weiteren Studien über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Der HIF-P4HI bewirkt keine signifikanten Veränderungen der durch ACS induzierten neurohumoralen Aktivierung. FG2216 führte sogar zu einem Anstieg von AT1 und ET1, sowie einer Stabilisation von ETRA, ETRB und ECE-1. Es ist davon auszugehen, dass diese Effekte auf die Stabilisierung von HIF1 α zurückzuführen sind. So konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass eine Stabilisierung von HIF1 α in Endothelzellen zu einer gesteigerten ET1 Expression führt [49], was wiederum über die vorherige Aktivierung von AT1 und ECE-1 erfolgt sein könnte. So kann angenommen werden, dass die alleinige HIF1 α Stabilisierung zu den günstigeren hämodynamischen und morphologischen Veränderungen beigetragen hat. Zusammenfassend führt die Hemmung von HIF-P4H zu keiner Normalisierung der ACS induzierten neuroendokrinen Aktivierung.

5.4. Veränderungen durch ACS und P4HI auf die Wachstumsfaktoren

Auf molekularer Ebene kam es unter ACS zu einer Induktion der Wachstumsfaktoren. Die gesteigerte Expression der Wachstumsfaktoren korrelierte eng mit den morphologischen und hämodynamischen Parametern. Die Mechanismen die diese Heraufregulation vermitteln und die Rezeptoren die diese Volumenbelastung perzeptieren sind gegenwärtig unklar. Zwischen pro-hypertrophen und pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren besteht eine enge regulative Beziehung; so kann z. B. CTGF durch TGF β 1 induziert werden, wodurch die Expression von ECM Proteinen (Kollagen I, Fibronectin) gesteigert wird [17]. Die enge Korrelation dieser Wachstumsfaktoren untereinander deutet auf einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus oder deren regulative Wechselwirkung hin.

Integrine wirken als Adhäsionsmoleküle auf der Zellmembran und binden an extrazelluläre Matrix-Komponenten [12]; β 1-Integrin ist vor allem in Kardiomyozyten exprimiert [13]. Durch hypertrophe Reize bei chronischer Volumen- oder Druckbelastung kommt es zu einer Heraufregulation von β 1-Integrin im Myokard [5; 86], eine spezifische Hemmung der β 1-Integrin-Funktion durch Unterdrückung der Genexpression führt zu myokardialer Fibrose und frühzeitiger Herzinsuffizienz unter Druckbelastung [46] was für eine antifibrotische Funktion von ITG β 1 und eine Rolle bei der Progression von LVH zur Herzinsuffizienz spricht.

Auch OPN, ein intrazellulärer ITG β 1 Bindungspartner spielt eine antihypertrophe Rolle im Herzen, da dessen Ablation eine inadäquate hypertrophe Antwort bewirkt [86]. Beide antihypertrophe Faktoren waren in volumbelasteten Herzen induziert, was auf eine Aktivierung myokardialer Kompensationsmechanismen hindeutet.

Die funktionelle Verbesserung durch Behandlung mit dem K-P4HI FG0041 wurde von einer Reduktion der volumeninduzierten Expression der Wachstumsfaktoren begleitet; dies könnte in Zusammenhang mit der hämodynamischen Entlastung des LV stehen und auf eine verminderte Aktivität von prohypertrophen und profibrotischen Signaltransduktionswegen hindeuten. Auch die reduzierte Expression von ITG β 1 unter K-P4HI könnte auf einen verminderten hypertrophen Reiz bzw. eine verminderte notwendige Anpassungsreaktion auf die hämodynamische Belastung hinweisen. Auffällig bleibt, dass die Proteinregulation von ITG β 1 unter FG0041 Behandlung divergent von der Genexpression war. Es ist jedoch möglich, dass entweder die Dauer der Behandlung nicht ausreichend war, um eine Reduktion der induzierten Proteinexpression von ITG β 1 zu bewirken oder das Kompensationsmechanismen, die die Translation effizient beeinflussen, aktiviert wurden.

Unter Gabe des HIF-P4HI ergab sich ebenfalls eine Reduktion der Wachstumsfaktore. Da HIF1 α direkt die Expression von CTGF [40] und TGF β 1 [45] induziert scheint es, dass die

HIF1 α Stabilisierung eine Reduktion der volumeninduzierten Expression der Wachstumsfaktoren bewirken kann und dass dies von einer verbesserten kardialen Funktion begleitet wurde. Weiterhin konnte unter dem HIF P4HI eine Zunahme von OPN gesehen werden, was auf eine Aktivierung myokardialer Kompensationsmechanismen hindeutet.

Die deutliche Verbesserung der hämodynamischen und morphologischen Parameter unter dem HIF- P4HI und die damit verbundene Entlastung des Herzens durch einen Rückgang der kardialen Hypertrophie und myokardialen Fibrose ist mit der beginnender Normalisierung des Wachstumsfaktore TGF β 1 und der stärkeren Aktivierung von OPN in Einklang zu bringen. Möglich wäre, dass die Dauer der Behandlung nicht ausreichend war um eine Reduktion von CTGF nachzuweisen oder das HIF1 α eine stärkere Affinität oder Wechselwirkung mit TGF β 1 hat. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass CTGF β über weitere Regulationswege aktiviert wird auf die der HIF-P4HI keinen Einfluss hat.

Hinsichtlich der Expression von HIF1 α zeigte sich unter FG0041 keine Regulation und unter FG2216 eine Induktion von HIF1 α mRNA. Dies scheint die bereits in der Literatur beschriebene Spezifität des HIF-P4IH FG2216 zur HIF- Stabilisierung zu bestätigen [41].

5.5. Veränderungen durch ACS und P4HI auf die Komponente der ECM

Die Balance zwischen MMPs und TIMPs ist entscheidend für das Gleichgewicht zwischen Kollagenspeicherung und –Abbau. So könnten die im hämodynamisch unbeeinflussten Herzen vorhandenen Kollagen-Proteine durch MMPs abgebaut werden und durch eng vernetzte Kollagen-Proteine im Rahmen der LVH [23; 44; 79] bzw. wenig vernetzte Proteine im Falle einer LV Dilatation [15; 23] im Rahmen der interstitiellen Fibrose ersetzt werden. Die ECM besteht u. a. aus Fasern (Fibronectin, Laminin und Kollagen), Glykoproteinen und Zwischensubstanz (z.B. Hyaluronsäure, Proteoglykane). Hauptkomponenten der myokardialen ECM sind jedoch die Kollagene I und III. Funktionell dient die ECM als Struktur- und Verbindungskomponente zu Kardiomyozyten, Kraft-Mediator und passive funktionelle Komponente im Rahmen der diastolischen Festigkeit [83]. Hinsichtlich der myokardialen Funktion hängt die ventrikuläre Gewebs-Elastizität (tissue compliance) nicht nur von der myokardialen Kollagenkonzentration, sondern auch von der Kollagen-Vernetzung, dem vorherrschenden Kollagen-Typ und dem Grad der Fibrose ab [35]. Dilatation und Fibrose sind bei Volumenbelastung früh auftretende Prozesse, die sowohl durch Vermehrung der Synthese von ECM-Proteinen als auch durch Proliferation von Fibroblasten bedingt ist [23]. Insofern liegt es nahe, dass die im ACS-Modell der Volumenbelastung gesehene Dilatation durch einen

Umbau der ECM und Veränderung der Kollagenvernetzung bei vermehrter Kollagen-mRNA Expression bedingt sein könnte. Alternativ kann die Kollagen-Speicherung durch einen eingeschränkten Kollagen-Metabolismus entstehen.

Änderungen der Kollagenarchitektur und -menge sind mit systolischer und diastolischer Dysfunktion assoziiert [44, 81] was deutlich wird in unsere Studie mit der zunehmenden Verschlechterung der morphologischen und hämodynamischen Parameter, wie LVEDP, LV-EF und LV-FS. Der K-P4HI FG0041 bewirkte eine Reduktion der durch ACS induzierten mRNA-Expression von Kollagen I- und III-mRNA. Diese Daten stimmen mit einer früheren Publikation überein, wo FG0041 Kollagen-mRNA- und Proteinexpression reduzierte [65]. FG0041 reduziert die bei chronischer Volumenbelastung bestehende ineffiziente und überschüssige Expression von Kollagen I und III bzw. bewirkt eine Synthese von instabilen Kollagen welches schneller lysosomal abgebaut werden kann, was heißt, dass trotz der weiterhin bestehenden chronischen Volumenbelastung eine Kollagenakkumulation im Herzmuskel ausbleibt. Die Reduktion des Kollagengehaltes durch FG0041 könnte somit verantwortlich für die Verbesserung der diastolischen und systolischen Funktion des Herzens, trotz der weiterhin bestehenden chronischen Volumenbelastung, sein. In der Tat zeigte sich dies durch eine Steigerung der kardialen Funktion. Wir konnten mit der Literatur übereinstimmend zeigen, dass der P4HI FG0041 die Hydroxylierung von Prolinrestes innerhalb des Herzens reduziert und damit den Abbau der Kollagene fördert [65], was eine Erklärung für den Rückgang der myokardialen Steifigkeit des Kollagengerüsts unter FG0041 wäre. Weiterhin führte die Inhibition der K-P4H zu einer Reduktion der MMP Genexpression. Auffällig war, dass mit der verbesserten hämodynamischen Situation des Herzens unter FG0041 auch die Kollagenexpression und die Genexpression der TIMPs reduziert wurden. Es zeigte sich weiterhin ein reduzierter MMP-TIMP-Quotient, was zu einer verminderter MMP-Aktivität und einer Reduktion des ECM-Umsatzes führen könnte [56]. FG0041 könnte dadurch die kardialen Umbauprozesse (Remodeling) verringert und die Verbesserung der LV Funktion bewirkt haben. Interessanterweise führt die selektive Hemmung von MMP1 bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Reduktion der LV Dysfunktion und des Remodellings [48]. Der Einfluss von P4HI auf die ACS vermittelten Veränderungen im MMP-TIMP-System könnte somit teilweise für die positiven hämodynamischen Effekten von FG0041 mitverantwortlich sein. In unserer Studie konnten wir durch Hemmung der K-P4H die Fehlregulation der MMPs und TIMPs reduzieren und somit das MMP-TIMP Gleichgewicht stabilisieren. Dies könnte eine Abnahme der Kollagenakkumulation im Myokard bewirken und die myokardiale Kontraktilität verbessern. Weiterhin konnten wir durch Behandlung mit dem K-P4HI eine reduzierte Expression der pro-

fibrotischen Wachstumsfaktoren in Zusammenhang mit der Reduktion der Kollagenexpression darstellen und somit könnte FG0041 eine neue therapeutische Alternative bei myokardialer Fibrose durch chronische Volumenbelastung bzw. bei diastolischer Dysfunktion darstellen durch direktes Eingreifen in prohypertrophe Mechanismen.

Unter Inhibition der HIF-P4H erfolgte eine Reduktion der Enzymaktivität bei unveränderter Genexpression der MMPs, sowie eine teilweise Induktion der TIMPs. Dies könnte auf einen Versuch der Kompensation des MMP-TIMP Gleichgewicht und beginnende Stabilisierung der MMP-TIMP-Dysbalance hindeuten. Dieser Effekt der TIMP1 Heraufregulation könnte durch HIF1 α Stabilisierung vermittelt worden sein, da bereits in der Zellkultur gezeigt werden konnte, dass die HIF1 α Stabilisierung zu einer gesteigerten TIMP1 Expression führt [64].

So zeigte sich eine verbesserte myokardiale Compliance in dieser Gruppe. Festzuhalten bleibt, dass unter FG2216 eine diskordante Regulation der Quotienten auf translationeller und transkriptioneller Ebene besteht. Dies erscheint insofern schlüssig, als dass MMPs auf translationeller und transkriptioneller Ebene bei hypoxischen Bedingungen unterschiedlich reguliert werden und dieser Effekt durch die P4H vermittelt wird [25]. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es neben der Induktion von HIF1 α zu einer vermehrten Synthese von Kollagen I und TIMP1 [64] in Fibroblasten. Da der hier verwendete HIF-P4HI FG2216 zu einer Stabilisierung von HIF1 α führt und somit hypoxische Verhältnisse nachahmt [64], könnten die hier beobachtete Kollagen I/ III und TIMP1 Heraufregulationen auf einen direkten HIF1 α vermittelten Effekt hindeuten. Die Hemmung der HIF-P4H erscheint vor dem Hintergrund der verbesserten hämodynamischen und morphologischen Parameter bei chronischer Volumenbelastung sinnvoll allerdings lässt dies vermuten, dass die LVH und Fibrose nicht alleine durch die hier untersuchten Faktoren beeinflusst wird oder, dass die Stabilisierung von HIF1 α sowohl prohypertrophe als auch antihypertrophe Wirkungen hat.

5.6. Einfluss des P4HI auf die Metaboliten des Fettstoffwechsels

Da es unter dem K-P4HI zu keiner Reduktion der durch ACS erhöhten Proteinexpression des im Herzen vorherrschenden PPAR α kam, scheint der K-P4HI keinen Einfluss auf den myokardialen Stoffwechsel zu haben. Da eine Aktivierung von PPAR α in chronisch Druckbelasteten Herzen zu einer kontraktilen Dysfunktion führt [87] und in unserer Studie unter chronischer Volumenbelastung eine Hochregulation von PPAR α gesehen werden konnte, könnte dies die Verschlechterung der hämodynamischen und morphologischen Situation mit erklären. Dies bedarf jedoch weiterer Studien.

5.7. Hemmung der Kollagen P4H- eine therapeutische Alternative ?

Post-translationale Veränderung des Kollagenproteins durch die K-P4H ist verbunden mit LV Umbauprozessen. K-P4H ist ein Schlüsselenzym in der Kollagensynthese. Durch Hydroxylierung der Prolinreste fördert die K-P4H die Entstehung thermostabiler Kollagenhelixe und somit eines stabilen Kollagennetzwerkes. Demzufolge kommt es durch Hemmung der P4H zu einer Produktion von instabilen Kollagen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, welches dann degradiert wird. Das dieser Effekt von K-P4H FG0041 therapeutisch genutzt werden könnte wird dadurch verdeutlicht, dass die Prolinhydroxylierung von Kollagen reduziert und LV Umbauprozesse im Verlaufe eines akuten Myokardinfarktes verhindert werden konnte [65].

Die spezifische Hemmung der K-P4H durch FG0041 bewirkte eine Verbesserung der LV Pumpfunktion, eine Reduktion der rechts- und linksatrialen Masse und des Lungengewichtes. In der Folge war unter FG0041 eine Verbesserung der myokardialen Kontraktilität und eine Abnahme der LVH zu sehen. Da FG0041 die Kollagen I und III Expression reduzierte, könnte diese Veränderung auf molekularer Ebene für die funktionelle Verbesserung verantwortlich sein. Die FG0041-Substanz reduziert somit signifikant die bei chronischer Volumenbelastung bestehende ineffiziente und überschüssige Kollagenproduktion. Die Reduktion des Kollagengehaltes durch FG0041 könnte für die Verbesserung der diastolischen und systolischen kardialen Funktion verantwortlich sein. Dies zeigte sich durch eine Verringerung des LVEDP und einer Steigerung der LV-EF und LV-FS. Der Anstieg von TIMP1 unter ACS war durch FG0041 regredient; dies kann ebenfalls zur Reduktion auf mRNA-Ebene bzw. Stagnation des Kollagengehaltes auf Proteinebene beigetragen haben.

Eine enge Verbindung zwischen dem Endothelinsystem und den Wachstumsfaktoren wurde bereits in der Literatur beschrieben [41]. So führt ET1 durch Induktion von TGF β 1 zu einer gesteigerten Fibronectin und Kollagenablagerung im Herzen [1]. Ebenso vermittelt ET1 die Kollagen I-Expression durch Induktion von CTGF β [70]. Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit dem K-P4HI FG0041 die Genexpression von Kollagen I reduzierte. FG0041 bewirkte eine Erniedrigung der Expression der profibrotisch und prohypertrophisch wirkenden Wachstumsfaktoren und reduzierte teilweise die Aktivierung des RAAS- und Endothelin-Systems. Damit könnte die Reduktion der links- und rechtsatrialen Masse, der Lunge und der Ventrikel der K-P4HI behandelten Ratten erklärt werden. Die bedingt reduzierte Aktivität des RAAS- und ET Systems ist vermutlich aufgrund der fortbestehenden Volumenbelastung, vermehrten systolischen Wandspannung und der dadurch fortwährenden Aktivierung zu erklären.

Die durch chronische Volumenbelastung signifikant gesteigerte mRNA-Expression der MMPS und TIMPs verschob das MMP-TIMP Gleichgewicht in Richtung MMP- Aktivierung [28]. Durch die Behandlung mit FG0041 kam es zu einem Rückgang der Expression der MMPs und TIMPs und so zu einer Stabilisierung des MMP-TIMP Gleichgewichtes. Dies könnte eine Abnahme der Kollagenakkumulation im Myokard bewirken und so die myokardiale Kontraktilität verbessert haben.

Insgesamt stellt die Inhibition der K-P4H eine neue Alternative zur Therapie der pathologischen LVH und Dilatation des LV durch chronische Volumenbelastung dar. Es sind jedoch Studien mit längerer Untersuchungsdauer notwendig, um die Effekte weiter zu untersuchen.

5.8. Hemmung der HIF P4H- eine therapeutische Alternative ?

Inhibition von HIF-P4H verhindert die Bindung einer OH-Gruppe (Hydroxylierung) an Prolin-Reste von HIF1 α . Unhydroxyliertes HIF1 α kann nicht durch das Ubiquitin Proteasom System abgebaut werden. Nach der Stabilisierung kann HIF-1 α mit HIF-1 β heterodimerisieren, an Hypoxie-responsive Elemente in der Promoter Region von bestimmten Gene binden und diese aktivieren [71]. Myokardiale Stresssituationen steigern den myokardialen Sauerstoff-Verbrauch und führen zu einer koronaren Minderperfusion, wodurch eine relative Myokardischämie begünstigt wird.

Der HIF-P4HI FG2216 reduzierte das relative Gewicht des Herzens, des rechten und linken Atrium, des LV, der Lungen sowie der rechten und linken Nieren auf Sham-Gruppen Niveau. Auch LVEDD und LVESD reduzierten sich unter FG2216 Applikation, die LV-EF und LV-FS wurden über Sham-Gruppen Niveau gesteigert. Somit führte FG2216 zu einem Rückgang der LVH und Dilatation, zu einer Abnahme der myokardialen Steifigkeit, Verbesserung der myokardialen Kontraktilität und zu einer hämodynamischen Entlastung des LV. FG2216 hat größere und bessere Wirkung auf die durch ACS induzierten myokardialen Umbauprozesse und bewirkte schneller einen hämodynamischen sowie organmorphologischen Effekte als FG0041. Beide P4HI hatten allerdings nur bedingt Einfluss auf die Expression des RAAS- und ET Systems. Die durch ACS hervor gerufene Veränderung der Wachstumsfaktoren-Expression wurde nur teilweise reduziert. Es zeigte sich in dem Punkt eine Überlegenheit des K-P4HI FG0041.

Zusammenfassend verbessert die Stabilisierung von HIF1 α durch FG2216 die kardiale Pumpfunktion und reduziert die kardiale Hypertrophie. Diese Effekte sind allerdings nur bedingt abhängig von der mRNA- und Proteinexpression der Wachstumsfaktoren, des Kollagens, der MMP und TIMPs sowie des RAAS- und ET Systems, so dass ein eindeutiger

Zusammenhang nicht sichtbar war. Schlussfolgernd könnte die Gabe des HIF-P4HI eine therapeutische Alternative darstellen, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

5.9. Limitationen

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt einer P4H Hemmung auf das myokardiale Remodelling während der frühen Phase der ACS-induzierten Volumenbelastung untersucht. Die LVH ist bei Patienten jedoch ein sich über längere Zeit entwickelnder Prozess und myokardiales Remodelling sowie Fibrose sind zumeist zum Zeitpunkt des Entstehens einer klinischen Symptomatik bereits etabliert. Ein Schluss, ob die Hemmung der K-P4H als auch der HIF-P4H positive Effekte zeigt wenn eine myokardiale Fibrose bereits präsent ist, kann daher nicht gezogen werden. Weitere Studien müssen diesen Punkt adressieren.

Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit erfolgt im Tiermodell. Die Ergebnisse sind daher nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Da eine Charakterisierung der untersuchten Medikationen im Rahmen der Volumenbelastung des Herzens jedoch bisher nicht erfolgte und Daten zur Wirksamkeit bzw. generellen Effekten nicht vorlagen, hätte eine Prüfung der Substanzen am Patienten aus ethischen Gründen nicht erfolgen können.

Die Behandlung mit dem K-P4HI sowie dem HIF-P4HI erfolgte lediglich in den Gruppen mit ACS, eine Kontrollgruppe die nur die Behandlung erfuhr wurde nicht verwendet. Dadurch konnte nicht untersucht werden welche Effekte diese Substanzen am ungestressten Herzen haben

Eine weitere Limitierung liegt in der Art der induzierten Volumenbelastung. Durch Erzeugung einer Verbindung zwischen Aorta abdominalis und Vena cava inferior mittels Kanülierung besteht zunächst eine akute, erst im weiteren Verlauf eine chronische Volumenbelastung des Herzens; dieser zeitliche Verlauf entspricht nicht dem klinischen Verlauf einer Volumenbelastung im Menschen, z. B. durch AI.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Chronische Volumenbelastung führt zu einer exzentrischen LVH, myokardialer Fehlfunktion, neurohormonaler Aktivierung, Kollagenakkumulation und myokardialen Umbauprozessen. Mitverantwortlich für diese Umbauprozesse sind die Reorganisation der extrazellulären Matrix und eine gesteigerte Kollagensynthese. Prolyl-4-Hydroxylasen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser myokardialen Umbauprozesse. Diese P4H beeinflussen, in Abhängigkeit vom Isotyp, sowohl die Quervernetzung der Kollagen, K-P4H, als auch den Abbau von HIF1 α , HIF-P4H. Um die Rolle der P4H bei chronischer Volumenbelastung näher zu untersuchen benutzten wir zwei unterschiedliche P4H Inhibitoren: den Kollagen-P4HI FG0041 und den HIF-P4HI FG2216, die in einem Rattenmodell der Volumenbelastung durch ACS untersucht wurden. Der oral verfügbare K-P4HI FG0041 verhindert die Hydroxylierung der Kollagene, LV Umbauprozesse und verbessert die Überlebensrate bei Ratten mit akutem Myokardinfarkt [65]. Der HIF-P4HI FG2216 bewirkt eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors *Hypoxie inducible Factor* (HIF) und wurde bisher noch nicht unter chronischer Volumenbelastung untersucht.

Ziel dieser Studie ist die Bewertung der Rolle der Kollagen- und HIF-P4H auf die pathologischen Umbauprozesse in chronisch volumenbelasteten Herzen.

Methoden: Bei 28-Tage alten, männlichen Wistar Ratten wurde eine aortocavalen Shuntoperation durchgeführt. Es erfolgte eine 28-tägige Behandlung der ACS-operierten Ratten mit dem K-P4HI FG0041, oder HIF-P4HI FG2216, oder einem Vehicle. Sham-Tiere erfuhren die gleiche Operation ohne Shunt Anlage und anschließender Behandlung mit der FG-Trägersubstanz Carboxymethylcellulose.

Echokardiografische und hämodynamische Messungen erfolgten am 28. und 30. Behandlungstag. Neurohormonale Marker, Wachstumsfaktoren, Kollagen und *Matrix Metalloproteinasen* (MMP) sowie deren Inhibitoren (TIMPs) wurden im Myokard auf mRNA, Protein- und Aktivitätsebene quantifiziert.

Ergebnisse: Chronische Volumenbelastung steigerte signifikant das Gewicht von Herz und Lunge, führte zu einer Verdickung der Herzhinterwand und des interventrikularen Septums, zu einer Vergrößerung des LV enddiastolischen und endsystolischen Durchmessers und zu einer Abnahme der LV *Ejektionsfraction*, des *Fractional Shortening* sowie des systolischen Blutdruckes. Der K-P4HI FG0041 bewirkte eine Steigerung der LV-EF und LV-FS und hatte keinen Einfluss auf LVEDD und LVESD. Die Behandlung mit dem HIF-P4HI FG2216 reduzierte die Vergrößerung des LV enddiastolischen und endsystolischen Durchmessers und

führt zu einer deutlichen Verbesserung der LV-EF und LV-FS bei chronischer Volumenbelastung. Die Gewichte von Herz und Lunge, als Kennzeichen der Herzinsuffizienz wurden durch FG0041 gegenüber der ACS-Gruppe reduziert. FG2216 konnte diese Parameter ebenfalls senken, in einer stärkeren Größenordnung wie FG0041.

Das RAAS- und ET System zeigte nach Anlage des ACS eine signifikante Aktivierung, in Form einer verstärkten Genexpression von AT1, ET1, ETRA, ETRB und ECE-1. Die Genexpression der Wachstumsfaktoren, der Kollagene, und der Komponente der ECM wurde durch ACS signifikant gesteigert. Die Kollagene wiesen eine gesteigerte mRNA Expression auf, ohne Regulation auf Proteinebene. Unter FG0041 ergab sich eine Abnahme des RAAS- und ET System was durch eine tendenzielle Reduktion von AT1, ETB und ECE1 sichtbar war. Die Gen- und Proteinexpression der Kollagene wurde signifikant durch FG0041 verringert. Die gleiche Regulation zeigte sich für die Wachstumsfaktoren, sowie die Komponente der ECM. Die Medikation mit FG2216 hatte nur bedingt Einfluss auf die Gen- bzw. Proteinexpression der zuvor genannten Faktoren. TGF β 1 konnte gesenkt werden bei unveränderter Kollagen mRNA Expression im Vergleich zur ACS-Gruppe. Die Proteinexpression von MMP1 und Enzymaktivität von MMP9 wurden durch FG2216 reduziert und die TIMP1 und TIMP4 mRNA- und Proteinexpression gesteigert.

Diskussion: Wir konnten zeigen, dass oral verfügbare Hemmer der Kollagen sowie der HIF *Prolyl-4-hydroxylase* (P4H) den pathologischen Veränderungen der kardialen Funktion durch Aktivierung hypertrophe und profibrotische Faktoren bei chronischer Volumenbelastung entgegenwirkt. Die Hemmung beider P4H, durch die Substanzen FG0041 und FG2216, führte zu einer Verringerung der durch Volumenbelastung vergrößerten relativen Gewichte des Herzens und der Lunge und verbesserte die myokardiale Kontraktilität, was eine Verbesserung der (LV)- Pumpfunktion des Herzen bedeutet. Ein Zusammenhang zwischen der funktionalen Verbesserung und der Reduktion der profibrotischen und hypertrophen Faktoren scheint es lediglich nach Behandlung mit FG0041 zu geben. Die K-P4Hen sind Schlüsselenzyme in der Kollagensynthese. Sie katalysieren die Hydroxylierung der Prolinreste, was zu einer Bildung thermostabilen Kollagentriplets führt. Somit könnte unter Anderem die Hemmung der P4H die Produktion instabiler Kollagene innerhalb des endoplasmatischen Retikulums fördern, welche dann schneller abgebaut werden. Dadurch könnte eine Kollagenakkumulation im Herzen verringert und der, trotz bestehenden ACS, stabile LVEDP unter FG0041 erklärt werden.

Inhibition von HIF-P4H verhindert die Bindung einer OH-Gruppe (Hydroxylierung) an Prolin-Reste von HIF1 α . Myokardiale Stresssituationen steigern den myokardialen Sauerstoff-Verbrauch und führen zu einer koronaren Minderperfusion, wodurch eine relative

Myokardischämie begünstigt wird und es zum Zelltod der nicht versorgten Muskelzellen kommt. Dies könnte eine weitere Ursache für die pathologischen Umbauprozesse im hypertrophen Herzen zu sein. HIF1 α verbessert die myokardiale Sauerstoffversorgung und wirkt so dem chronischen myokardialen Sauerstoffmangel entgegen. Da unter dem HIF-P4HI nur eine geringer Beeinflussung der durch ACS erhöhten profibrotischen und hypertrophen Faktoren zu sehen war, scheint die Verbesserung der kardiale Pumpfunktion und Reduktion der kardialen Hypertrophie hauptsächlich über die HIF1 α Stabilisierung erfolgt zu sein.

Schlussfolgerung: Der K-P4HI FG0041 könnten eine neue therapeutische Option für die Behandlung von myokardialen Umbauprozessen durch Volumenüberlastung darstellen.

Der HIF-P4HI FG2216 könnte eine mögliche therapeutische Option zur Normalisierung der morphologischen und hämodynamischen Veränderungen des Herzens unter chronischer Volumenüberlastung darstellen

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [01] Ammarguella et al.; *Circulation*; 2002
- [02] Asakawa M, Takano H, Nagai T, et al. "Peroxisome proliferator- activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophie in vitro and in vivo" *Circulation*.2002;105:1240-1246
- [03] Aoyagi, M., et.al." Prolyl hydroxylation regulates intracellular procollagen degradation in cultured rat cardiac fibroblasts" *J Mol Cell Cardiol*,1995,27:1459-73
- [04] Askainen, T.M., et.al.. "Stimulation of HIF-1 α , HIF-2 α and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells" *Free Radic Biol Med*, 2005.38:1002-13
- [05] Babbitt, C.J., et al. "Modulation of integrins and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle" *Histochem Cell Biol*, 2002. 118(6): 431-9.
- [06] Barger PM, Kelly DP, "PPAR signalling in the control of cardiac energy metabolism" *Trends Cardiovascular Med*.2000;10: 238-245
- [07] Bradham SW, Bozkurt B, Gunasinghe H, Mann D, Spinal FG, "Tumor negrosis factors alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective." *Cardiovasc.Research*;2002;5: 822-830
- [08] Brilla, C.G., L. Matsubara, and K.T. Weber, "Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis" *Hypertension*, 1996. 28(2): 269-75.
- [09] Brown, R.D.; Ambler, S.K.; Mitchell, M.D.; Long, C.S.; "The cardiac Fibroblast: Therapeutic Target in Myocardial Remodeling and Failure" *Annu.Rev.Toxicol*.2005;45:657-87
- [10] Bruckschlegel, G.,et.al." Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats" *Hypertension* 1995;25:250-9
- [11] Bunn, H.F., "New agents that stimulate erythropoiesis" *Blood*, 2007. 109(3): 868-73.
- [12] Carson, J.A. and L. Wei, "Integrin signalling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle" *J Appl Physiol*, 2000. 88(1): 337-43.
- [13] Carver, W., et al. "Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart" *J Histochem Cytochem*, 1994. 42(2): 167-75.

- [14] Cantor EJ, Babick AP, et.al. "A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload" *J Mol Cell Cardiol* 2005;38(5):777-86
- [15] Caulfield JB, Norton P, Weaver RD, "Cardiac dilatation associated with collagen alterations" *Mol Cell Biochem.*; 1992; 118:171-179
- [16] Chancey AL, Brower GL, et.al. "Effects of matrix metalloproteinases inhibition on ventricular remodeling due to volume overload" *Circulation* 2002;105(16):1983-8
- [17] Chen, M.M., et al., "CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis" *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32(10): 1805-19.
- [18] Chesler, N.C., D.N. Ku, and Z.S. Galis, „Transmural pressure induces matrix degrading activity in porcine arteries ex vivo“ *Am J Physiol*, 1999. 277(5 Pt 2): H2002-9.
- [19] Conca, W., P.B. Kaplan, and S.M. Krane „Increases in levels of procollagenase messenger RNA in cultured fibroblasts induced by human recombinant interleukin 1 beta or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis“ *J Clin Invest*, 1989. 83(5): 1753-7
- [20] Creemers EEJM, Cleutjens JPM, Smits JFM, Daemen MJAP, "Matrix Metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?" *Circ.Res.*2001; 89:201-210
- [21] Creemers et al, Review, *Circ Res* 2001
- [22] Creemers EEJM, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P., Cleutjens JPM, Spinale FG, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H364-H371
- [23] Dolgilevich SM; Siri FM, et.al. "Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of aortocaval fistula in rats" *Am J Physio Heart Physiol* 2001;281(1):H207-14
- Shigematsu H., Hirooka Y., et.al. "Endogenous angiotensinII in the NTS contributes to sympathetic activation in rats with aortocaval shunt" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280(6):R1665-73 ;
- McGowan BS, Scott CB, et.al. "Unloading-induced remodeling in the normal and hypertrophic left ventricle" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2003;284(6):H2061-8
- [24] Duivenvoorden, W.C., H.W. Hirte, and G. Singh, „Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone metastasizing cancer cells“ *Clin Exp Metastasis*, 1999. 17(1): 27-34.

- [25] Fahling, M., et al., „Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia“ *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2004. 139(1-3): 119-26.
- [26] Felker GM, Thompson RE, et.al. ”Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy” *N Eng.J Med* 2000;342(15):1077-84
/Bart BA, Shaw LK, et.al.”clinical determinants of mortality in patients with angiographically diagnosed ischemic or nonischemic cardiomyopathy” *J Am Coll Cardiol* 1997;30(4):1002-8
- [27] Fielitz J, Hein S, Mitrovic V, Pregla R,Warnecke C, Regitz- Zagrosek V, ”Activation of the cardiac Renin- Angiotensin System and Increased Myocardial Collagen Expression in Human Aortic Valve Disease” *J Am Coll Cardiol*,2001;Vol37,1443-1449
- [28] Fielitz J., Leuschner M., et.al.“Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis” *J Mol Med* 2004;82(12):809-20
- [29] Francis GS ”Neurohumoral activation and progression of heart failure: hypothetical and clinical considerations” *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32,Suppl 1:S16-21
- [30] Franklin,T.J.,et.al., „Inhibition of prolyl 4-hydroxylase in vitro and in vivo by members of a novel series of phenantrolinones“*Biochem J*,2001, 333-338
- [31] Frey N, Katus HA, Olson EN, et al.,„Hypertrophy of the heart:a new therapeutic target; *Circulation*; 2004;109:1580-9
- [32] Frey N, Olson EN, ”Cardiac hypertrophy:the good, the bad and the ugly” *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 45-79
- [33] Friehs, I., et.al. „vascular endothelin growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophie through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis“ *Basic Re Cardial*, 2006.101: 204-13
- [34] Fukuroda, T., et al.”Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats” *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 199(3): 1461-5.
- [35] Gaasch WH, A.C., “Diastolic properties of the left ventricle, in *The Ventricle: Basic and Clinical Aspect*“ 1985. 143.
- [36] *Goldberg,R.J.2005 #45/* et Levy DS, Kenchaiah S., et.al.”Long-term trends in the incidence and survival with heart failure” *N Engl J Med* 2002;347(18):1397-402
- [37] Graf K, Do YS, Ashizawa N, et.al.”Myocardial Osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy” *Circulation* 1997;96:3036-71
- [38] Haynes, W.G. and D.J. Web, ”Endothelin as a regulator of cardiovascular function in

- health and disease" *J Hypertens*, 1998. 16(8): 1081-98.
- [39] Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. "Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overload human heart: structural deterioration and compensatory mechanism" *Circulation* 2003;107:984-91
- [40] Higgins, D.F., et al., "Hypoxic induction of CTGF is directly mediated by HIF-1" *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 287(6): F1223-32.
- [41] Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, et al. "Characterization of the human prolyl-4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor" *J Biol Chem* 2003;278:30772-80
- [42] Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, et al. "Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor" *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13459-64
- [43] Iwanaga Y, Aoyama T, et al. "Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats" *J Am Coll Card* 2002;39(8):1384-91
- [44] Janicki JS, Brower GL, Henegar JR; "Interstitial collagen remodeling in chronic heart failure" *Basic Appl Myol*, 1995;5: 339-346
- [45] Jiang, Y., et al., "Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1alpha" *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007. 39(1): 73-80.
- [46] Keller RS, Shai SY, et al. "Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis and abnormal cardiac performance" *Am J Pathol* 2001;158(3):1079-90
- Shai SY, Harpf AE, et al. "Cardiac myocytes-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure" *Circ Res* 2002;90(4):458-64
- [47] Kim, C.H., et al. "Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway." *Circ.Res*, 2002.90: E25-33
- [48] King, M.K., et al., "Selective matrix metalloproteinase inhibition with developing heart failure: effects on left ventricular function and structure" *Circ Res*, 2003. 92(2):177-85
- [49] Knowles, H.J., et al. "Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases" *Circ Res*, 2004. 95(2):162-9.
- [50] Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Regitz-Zagrosek V, "Angiotensin II directly increases transforming growth factor β 1 and

- osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart”
Cradiovasc.Research,2000;
- [51] Kuwahara, F., et al., “Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats” *Circulation*, 2002. 106(1): 130-5.
- [52] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA, “Early Expression of Angiogenesis Factors in Acute Myocardial Ischemia and Infarction” *N Engl J Med*.2000;342:626-633
- [53] Lehman JJ, Kelly DP, ”Gene regulatory mechanisms covering energy metabolism during cardiac hypertrophie growth” *Heart Fail Rev.*;2002;7: 175- 185
- [54] Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, et. al. “Peroxisome proliferator- activated receptor gamma coaktivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis” *J Clin Inves*.2000;106:847-856
- [55] Li YY, Feldmann AM, Sun Y, Mc Tiernan CF, “Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart” *Circulation* 1998; 98: 1728- 1734
- [56] Li, Y.Y., C.F. McTiernan, and A.M. Feldman, “Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling” *Cradiovasc Res*, 2000. 46(2): 214-24.
- [57] Lin, TH, Aplin AE, et.al.”Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK:evidence for dual integrin signaling pathway in fibroblast” *J Cell Biol*.1997;136(6):1385-95
- [58] Mann DL, Spinale FG, “Activation of matrix metalloproteinases in the failing human heart: breaking the tie that binds” *Circulation* 1998; 98: 1699- 1702
- [59] Martinella-Catusse, C., et al. „Down-Regulation of MT1-MMP expression by the alpha3 chain of type IV collagen inhibits bronchial tumor cell line invasion“ *Lab Invest*, 2001. 81(2): 167-75.
- [60] Maxwell PH, Radcliffe PJ, ”Oxygen sensors and angiogenesis” *Seminar in Cell and Developmental Biology*.2002;13:29-37
- [61] Nagase H, ”Activational mechanisms of matrix metalloproteinases” *Biol.Chem* 1997, 378: 151-150
- [62] Nakata, K., et al., The c-propeptide of type II procollagen binds to the enhancer region of the type II procollagen gene and regulates its transcription. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. 785: 307-8.

- [63] National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
- [64] Norman, J.T., I.M. Clark, and P.L. Garcia, „Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts“ *Kidney Int*, 2000. 58(6): 2351-66.
- [65] Nwogu JI, Greenen D, Bean M, et al, „Inhibition of collagen synthesis with prolyl-4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction” *Circulation* 2001;104:2216-21
- [66] Paul M., et.al.”Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter” *Hypertension* 1995.25: 683-93
- [67] Penna, C., et al. “Effect of endothelins on the cardiovascular system” *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2006. 7: 645-52.
- [68] Peterson JT, Hallak H, Johnson L, et al., “Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure” *Circulation*.2001;103:2303- 2309
- [69] Polyakova V, Hein S, et.al.”Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure- overload human myocardium during heart failure progression” *J Am Coll Cardiol*.2004;44(8):1609-18
- [70] Rodriguez-Vita J., Ruiz-Ortega M., et al. ”Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells” *Circ.Res*.2005;97(2):125-34
- [71] Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, ”Oxygen sensing by HIF hydroxylases” *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(5): 343-54.
- [72] Schunkert H., Orzechowski HD, et.al. ”The cardiac endothelin system in established pressure overload left ventricular hypertrophy” *J Mol Med*1999;77(8):623-30
Brown LA, Nunez DJ, et.al. ”Selective increase in endothelin-1 and endothelin A receptor subtype in the hypertrophied myocardium of the aortocaval fistula rat” *Cardiovasc Res* 1995;29(6):768-74
- [73] Semenza GL, ”HIF-1 and mechanism of hypoxia sensing” *Current opinion in Cell Biology*.2001;13:167-171
- [74] Shai, S.Y., et.al., „Cardiac myocyte- specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure”, *Circ Res*, 2002.90:p.458-464
- [75] Spinale FG., Coker M., Thomas C., et al; “Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function” *Circ Res*.1998; 82: 482-495

- [76] Spinale FG, Coker ML, et.al."A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure" *Circ.* 2000;102(16):1944-9
- [77] Spinale et al, Review, *Circ Res* 2001
- [78] Spinale FG, Gunasinghe H, et.al."Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure" *J Card Fail* 2002;8(6Suppl):S332-8
- [79] Takashi Namba MD, Hiroyuki T, Hirofumi T, et al. "Regulation of the Fibrillar Collagen Gene Expression and Protein Accumulation in Volume- Overload Cardiac Hypertrophy" *Circ.*1997;95:2448-2454;
- [80] Tostes, R.C. and M.N. Muscara " Endothelin receptor antagonists: another potential alternative for cardiovascular diseases" *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005. 5(4): 287-301.
- [81] Villari, B., et al., "Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease" *J Am Coll Cardiol*, 1993. 22(5):1477-84.
- [82] Wahl, S.M., et al., „Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(10): 4577-81.
- [83] Weber, K.T., et al., „Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms" *J Mol Cell Cardiol*, 1994. 26(3): 279-92.
- [84] Willenbrock R, Pagel I., et al., "Renal function in high-output heart failure in rats : role of endogenous natriuretic peptides" *J Am Soc Nephrol* 10(3):572-70
- [85] Woessner JF, Nagase H., "Introduction to the Matrix Metalloproteinases and TIMPs" Oxford, UK: Oxford University Press;2000: 1-10
- [86] Xie Z., Singh M., et.al. "Osteopontin modulates myocardial hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice" *Hypertension* 2004;44(6):826-31
- [87] Young ME, Laws FA, Goodwin GW, et al,"Reactivation of peroxisome proliferator activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart" *J Biol Chem*, 2001. 276: 44390-95
- [88] Zile MR, Tomita M, Ishara K, et al; "Changes in diastolic function during development and correction of chronic LV volume overload produced by mitral regurgitation" *Circulation*: 1993; 87, 1378- 1388
- [89] Zipes, D.P.,et al., "Braunwald's Heart Disease" 7 ed.2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 2181

8. DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Regitz-Zagrosek für die Überlassung des Themas und die finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr.med. Jens Fielitz für die intensive und fachlich herausragende Betreuung ohne die diese Niederschrift nicht möglich gewesen wäre.

Jenny Thomas und Britta Fielitz für die hervorragende Einarbeitung, die gute Aufnahme in das Team und die großartige Unterstützung in schwierigen Phasen des Projektes.

Meinem Mitdoktoranten Lars Roman Herda für die ideenbringenden Diskussionen und gemeinsamen Lösungsfindungen.

Ich danke meinen Eltern Christina und Norbert Pfannstiel, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben sowie für ihr Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

9. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. EID

Ich, Evelyn Schuch, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der Inhibition von Kollagen und HIF 1 α Prolyl 4-Hydroxylasen auf Volumenbelastung induzierte myokardiale Umbauprozesse“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

(Evelyn Schuch)