

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

## DISSERTATION

# **EINFLUSS DER INHIBITION VON PROLYL 4-HYDROXILASEN AUF KARDIALE HYPERTROPHIE UND FIBROSE BEI EXPERIMENTELLER DRUCKBELASTUNG**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars Roman Herda  
aus Hamm



Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek  
2. Prof. Dr. med. R. E. Schmieder  
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 07.12.2007

---

## 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 Remodeling in rats with thoracic aortic banding; Eur J Heart Fail. 2007 Apr; 9(4): 336-42
2. Brokat S, Thomas J, Herda LR, Knosalla C, Pregla R, Brancaccio M, Accornero F, Tarone G, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Altered Melusin Expression in Human Hearts of Aortic Stenosis Patients. Eur J Heart Fail. 2007 Apr 27; doi:10.1016/j.ejheart.2007.02.009

### 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; 24<sup>th</sup> 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 Remodeling 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 Remodeling 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; Willebrock, R; Regitz-Zagrosek V; Reduced left ventricular Remodeling in rats with thoracic aortic constriction by Prolyl 4-hydroxylase inhibition; 16<sup>th</sup> European Student's Conference, Berlin, Germany, 2005.

Postervorträge:

1. Doller, A; Mahmoodzahdeh, S; Herda, LR; Regitz-Zagrosek, V; Effekte von Östrogenen und Testosteronen auf die Matrixsynthese; Workshop Geschlechterforschung in der universitären Medizin Berlins; 2003; Abstract 19
2. 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

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>2 FRAGESTELLUNG</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
3.1 Tiermodell und experimenteller Verlauf	16
3.2 Organmorphologie, Echokardiographie und hämodynamische Daten	17
3.2.1 Echokardiographie	17
3.2.2 Hämodynamik	17
3.2.3 Organmorphologie	17
3.3 Zellisolation und Kultivierung humaner kardialer Fibroblasten sowie Zellstimulation	18
3.4 Proteinanalyse	19
3.4.1 Proteinextraktion	19
3.4.2 Quantifizierung der Proteinmenge	19
3.4.3 Western Blot	20
3.4.4 Strippen der Membran	23
3.4.5 Spezifische Kollagen-Quantifizierung	24
3.4.6 TGF- $\beta$ 1 Quantifizierung mittels ELISA	24
3.4.7 MMP1, TIMP1, TIMP2 und Kollagen I-ELISA	25
3.4.8 Zymographie	26
3.4.9 Densitometrie und Auswertung	28
3.5 mRNA Quantifizierung	28
3.5.1 RNA-Extraktion	28
3.5.2 DNase-I-Verdau	30
3.5.3 DNA- Negativkontrolle	30
3.5.4 Reverse Transkription	31
3.5.5 Real-Time Polymerase Ketten Reaktion	31
3.6 Statistik	33
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
4.1 Organmorphologie, Echokardiographie und hämodynamische Daten	35
4.1.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB	35
4.1.2 Veränderung bei Druckbelastung und gleichzeitiger Gabe des C-P4HI FG0041	36
4.1.3 Veränderung bei Druckbelastung und gleichzeitiger Gabe des HIF-P4HI FG2216	37
4.2 Regulation der Wachstumsfaktoren TGF $\beta$ 1, CTGF, ITG $\beta$ 1, OPN, HIF1 und 2	39
4.2.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB	39
4.2.2 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041	40
4.2.3 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216	41
4.3 Regulation von Komponenten der extrazellulären Matrix	42

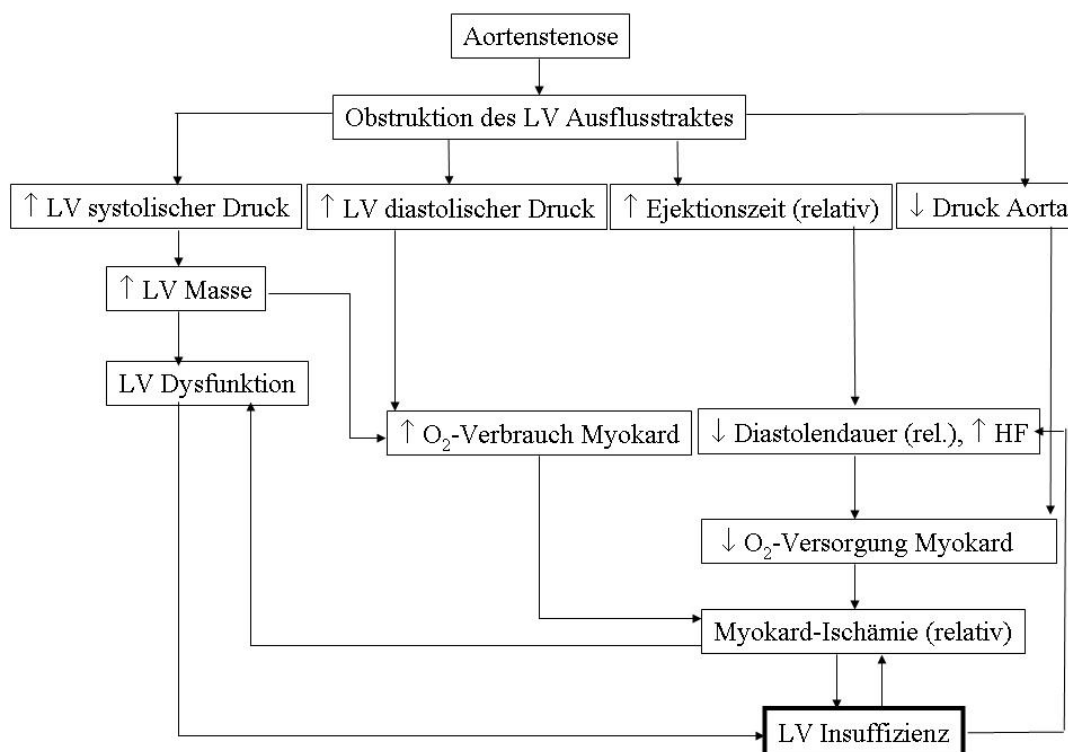
4.3.1	Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB	42
4.3.2	Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041	44
4.3.3	Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216	46
<b>4.4</b>	<b>Regulation von Kollagen Typ I und III</b>	<b>47</b>
4.4.1	Identifikation der Kollagene im Western-Blot	47
4.4.2	Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB	48
4.4.3	Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041	50
4.4.4	Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216	50
<b>4.5</b>	<b>Regulation der Hormone und Rezeptoren des Endothelin- und Angiotensinsystems</b>	<b>51</b>
4.5.1	Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB	51
4.5.2	Einfluss auf mRNA-Expression durch Gabe des C-P4HI FG0041	51
4.5.3	Einfluss auf mRNA-Expression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216	52
<b>4.6</b>	<b>Regulation von Melusin bei Druckbelastung durch AoB</b>	<b>52</b>
<b>4.7</b>	<b>Korrelationen</b>	<b>53</b>
4.7.1	Korrelationen zwischen Genexpression und Morphologiedaten	53
4.7.2	Korrelation zwischen Genexpression und Hämodynamikdaten	55
4.7.3	Korrelation zwischen Proteinexpression und Morphologiedaten	57
4.7.4	Korrelation zwischen Proteinexpression und Hämodynamik	57
4.7.5	Korrelation innerhalb der Expression der untersuchten Gene	57
4.7.6	Korrelation innerhalb der Expression der untersuchten Proteine	60
<b>4.8</b>	<b>Voruntersuchungen zur Stimulation von Zellkulturen</b>	<b>63</b>
<b>4.9</b>	<b>Expression von ECM-Proteinen in humanen kardialen Fibroblasten aus Spender- und DCM-Herzen</b>	<b>63</b>
4.9.1	Basis-Charakterisierung der Herkunft der Zellen	63
4.9.2	RNA-Expression von ECM-Proteinen in hFib unter Stimulation	64
4.9.3	Protein-Expression von ECM-Proteinen in hFib unter Stimulation	65
4.9.4	Enzymaktivität der MMPs in hFib unter Stimulation	66
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>Veränderungen durch AoB und P4HI auf morphologischer und hämodynamischer Ebene</b>	<b>67</b>
<b>5.3</b>	<b>Veränderungen durch AoB und P4HI bei Wachstumsfaktoren</b>	<b>69</b>
<b>5.4</b>	<b>Veränderungen durch AoB und P4HI in der ECM</b>	<b>70</b>
<b>5.5</b>	<b>Veränderungen durch AoB und P4HI bei neurohumoralen Faktoren</b>	<b>73</b>
<b>5.6</b>	<b>Die Regulation und Rolle von Melusin im Rahmen der druckinduzierten Hypertrophie</b>	<b>75</b>
<b>5.7</b>	<b>Der Wachstumsfaktor TGF<math>\beta</math>1 im Rahmen der Kollagen-Synthese bei hochgradig eingeschränkter LV-Funktion</b>	<b>76</b>

<b>5.8 Hemmung der C-P4H bei chronischer Druckbelastung durch AoB im Tiermodell – eine therapeutische Alternative?</b>	<b>78</b>
<b>5.9 Hemmung der HIF-P4H bei chronischer Druckbelastung durch AoB im Tiermodell – (k)eine therapeutische Alternative?</b>	<b>79</b>
<b>5.10 Limitationen</b>	<b>80</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>82</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>91</b>
<b>9 LEBENSLAUF</b>	<b>92</b>



## 1 Einleitung

Die häufigste Ursache der erworbenen Aortenstenose ist die altersbedingte Degeneration. Echokardiographisch konnte in unterschiedlichen Studien eine Inzidenz der degenerativen Aortenstenose von 2% bis 9% bei über 65-jährigen Studienteilnehmern nachgewiesen werden, eine Aortenklappensklerose ohne relevante Stenose fand sich bei 29% der Patienten [1-3]. Das Risiko einer Aortenstenose steigt mit zunehmendem Alter auf durchschnittlich 4% bei 85-jährigen Patienten. Risikofaktoren der altersbedingten Kalzifikation sind erhöhtes LDL und Lp(a) im Serum, Diabetes mellitus, Rauchen und arterieller Hypertonus [4]. Diese tritt daher gehäuft in Koinzidenz mit atherosklerotisch bedingten Erkrankungen auf. Prognostisch besteht eine deutlich erhöhte kardiovaskuläre Mortalität mit einem relativen Risiko von 1,66 bei bereits vorhandener sklerotischer Aortenklappe gegenüber Patienten mit normaler Klappe [3]. Die Aortenklappenstenose ist somit von erheblicher epidemiologischer Relevanz.



**Abb. 1: Pathophysiologie der Aortenstenose (modifiziert nach [4])**

Pathophysiologisch bewirkt die degenerative Aortenstenose eine sich langsam entwickelnde Obstruktion des linksventrikulären (LV) Ausflusstraktes, die zu einer Druckbelastung des LV führt. Die myokardiale Adaptation zur Gewährleistung der LV Auswurfleistung äußert sich in konzentrischer Hypertrophie. Es kommt zu zunehmender isometrischer Kontraktion der Muskulatur sowie verminderter Compliance durch Fibrose. Durch die erhöhte Resistenz

gegenüber der Ventrikelfüllung bei mangelnder Elastizität kommt es zur diastolischen Dysfunktion, die bei etwa 50% aller Patienten mit Aortenstenose und normaler systolischer Funktion auftritt [5]. Korrelat dieser Dysfunktion ist ein erhöhter LV enddiastolischer Druck (LVEDP) und eine verminderte maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $dp/dt_{\min}$ ). Durch negative Korrelation der LV Funktion zur LV Relaxation und myokardialen Compliance scheint die diastolische Dysfunktion der Systolischen vorgeschaltet zu sein [6]. Zeitgleich erhöhen sich systolischer und diastolischer LV Druck bei vermindertem Druck in der Aorta und verminderter Dauer der Diastole durch die erhöhte LV Ejektionszeit in der Systole. Bei Progredienz vermindern sich Ejektionsfraktion, Schlagvolumen und linksventrikulärer Druckgradient bei erhöhten Drücken des linken Atriums, der pulmonalen Kapillaren, des rechten Ventrikels sowie rechten Atriums. Dies führt einerseits zu erhöhtem myokardialen Sauerstoff-Verbrauch, andererseits bedingt durch den verminderten koronaren Fluss zu einer verminderten Sauerstoffversorgung des Myokards. Hierdurch wird die Entwicklung einer relativen Myokardischämie begünstigt, die in Zusammenhang mit der Hypertrophie zur LV systolischen und diastolischen Dysfunktion führt. Bei fortbestehendem Stimulus kann der Übergang in Herzinsuffizienz erfolgen [4] (Abb. 1).

Die Entwicklung einer LV Hypertrophie (LVH) und myokardialen Fibrose durch Druckbelastung sind frühe Ereignisse der Aortenstenose und führen als unabhängige kardiale Risikofaktoren zu erhöhter Morbidität und Mortalität [7-10]. Als „Remodeling“ bezeichnet man neben der Myozytenhypertrophie Umbauprozesse der extrazellulären Matrix (ECM), die mit LVH assoziiert sind und zu Kollagen-Akkumulation führen, welche die Substanz der Fibrose ist. Änderungen der Kollagenarchitektur und -menge sind mit systolischer und diastolischer Dysfunktion assoziiert [11]. Auf molekularer Ebene kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Genexpressionen und Proteine. Kontinuierliche Stimulation profibrotischer Signalwege kann linksventrikuläre Dysfunktion und Herzinsuffizienz auslösen [12]. Durch Druckbelastung verursachtes linksventrikuläres Remodeling beinhaltet die Aktivierung neuroendokriner Systeme, wie z.B. das Endothelin- oder Renin-Angiotensin-System, erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren und ein dysreguliertes Gleichgewicht von Umbauprozessen der ECM. So werden beispielsweise Endothelin-1 (ET1) und der entsprechende Endothelin-Rezeptor Typ A ( $ETR\alpha$ ) durch Druckbelastung [13] und konsekutive Herzinsuffizienz [14] hochreguliert. Weiterhin wirken neuroendokrine Systeme durch Induktion von Wachstumsfaktoren wie Transforming growth factor beta 1 ( $TGF\beta 1$ ) und Connective tissue growth factor (CTGF) auf die myokardiale Funktion. Diese induzieren und unterhalten pathologische ECM Umbauprozesse [15]. Remodeling-Prozesse werden durch

---

eine Dysbalance der Matrix-Enzymsysteme gelenkt [16-20]. Hauptfaktoren hierbei sind Matrix Metalloproteinasen (MMP) und deren endogene Inhibitoren, Tissue Inhibitors of MMP (TIMP). MMPs sind Metalloproteinasen, die vor allem Strukturkollagene, wie z.B. Kollagen Typ I und III, abbauen. Die Enzymaktivität wird durch Interaktion mit den gewebspezifischen TIMPs kontrolliert. TIMPs sind daher zur Verhinderung eines übermäßigen ECM Abbaus bedeutsam. In gesundem Myokard stehen Auf- und Abbau der ECM in einem Gleichgewicht, was durch ein bestimmtes Verhältnis von MMP zu TIMP erreicht wird. Verschiebt sich dieses Verhältnis, so werden die normalen Umbauprozesse gestört - es kommt zu Kollagen-Akkumulation bei LVH. So konnte gezeigt werden, dass es bei humaner Aortenstenose zu einer Hochregulation des Renin-Angiotensin-Systems und der Kollagene Typ I und III [21] bei gesteigerter Expression von MMP2 und 3 sowie TIMP3 kommt, während MMP1 und 9 sowie TIMP1 herabreguliert werden [22], was eine spezifische Regulation dieses Systems nahe legt. Zu den Auswirkungen der chronischen Druckbelastung auf die Genexpression der ECM inklusive Wachstumsfaktoren, Neurohormonen und MMPs / TIMPs liegen bereits unterschiedliche Befunde vor (Tab. 1). Zentrale Effektor-Zellen innerhalb der ECM sind kardiale Fibroblasten. So ist bekannt, dass TGF $\beta$ 1 als profibrotischer Wachstumsfaktor die Expression von Kollagen Typ I und III in humanen kardialen Fibroblasten auf transkriptioneller Ebene heraufreguliert [23] und so zu kardialer Fibrose beiträgt. Über die Furin-Konvertase werden sowohl TGF $\beta$ 1 als auch MT1MMP aktiviert, was wiederum zu einer Aktivierung von MMP2 führt und damit das kardiale Remodeling moduliert [24].

Eine wichtige Rolle innerhalb der ECM Proteine, die durch Druckbelastung beeinflusst werden, nehmen Integrin beta 1 (ITG $\beta$ 1) und Osteopontin (OPN) ein, die pathophysiologisch als Stressmediator profibrotische und hypertrophe Signaltransduktionswege beeinflussen [25-28]. Sie wirken durch Verbindung von ECM Proteinen mit dem Zytoskelett als Sensor der mechanischen Muskelarbeit. Ein Knock-Out der Integrin-Funktion führt zu kardialer Hypertrophie und Insuffizienz [29].

Evidenz	Untersuchungsmodell	Referenz
Erhöhte Expression von Kollagen I, Kollagen III und MMP2	AoB bei Mäusen	[30]
Erhöhte Expression von Kollagen I und Kollagen III; Kollagen III höher exprimiert	hAS	[31]
Erhöhte Expression von $\alpha 1$ , $\alpha 5$ und $\beta 1$ Integrin	AoB bei Mäusen	[32]
ET-1, ETR $\alpha$ und ETR $\beta$ in RV höher exprimiert	Druckbelastung RV bei Ratten	[33]
OPN 2-fach erhöht in AoB ohne Insuffizienz, 8-fach erhöht bei AoB mit Insuffizienz	AoB in Ratten	[34]
TGF $\beta 1$ erhöht, TGF $\beta 2$ unverändert, TGF $\beta 3$ erniedrigt in LV	AoB in Ratten	[35]
MMP2, 3, TIMP1 hochreguliert; MMP1, 9, TIMP2, 3 herunterreguliert, TIMP4 unverändert.	hAS	[22]
MMP-1, -2, -3, -9, -13, und -14 heraufreguliert; TIMP-1, -2 heraufreguliert, TIMP4 herunterreguliert.	hAS	[36]

**Tab. 1: Durch Druckbelastung induzierte Veränderung der Genexpression; hAS: humane Aortenstenose; RV: rechter Ventrikel**

Melusin ist ein neu beschriebenes, muskelspezifisches Protein und interagiert mit dem zytoplasmatischen Anteil des ITG $\beta 1$  durch Translokation zu Zellmembran-Strukturproteinen [37]. Nachgeschaltete Signaltransduktionswege beinhalten die Phosphorylierung von AKT und SER9 sowie die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  [38]. Melusin nimmt innerhalb der Pathophysiologie als Interaktionspartner für ITG $\beta 1$  durch Vernetzung der ECM mit dem Zytoskelett eine zentrale Stellung ein. Durch Knock-Out des Melusin-Gens wird die Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie verhindert und Kardiomyozyten reagieren inadäquat auf Druckbelastung mit dilatativer Kardiomyopathie und kontraktile Dysfunktion. Melusin Überexpression führt zu reduzierter Apoptose und verlängerter kompensatorischer Hypertrophie mit geringerer Wahrscheinlichkeit einer Insuffizienz [37-39]. Dies legt nahe, dass Melusin zur Erhaltung der systolischen Funktion und Vorbeugung einer Dilatation des LV eine Rolle spielt. Zum Zeitpunkt der Dissertation lagen keine Daten zu Veränderungen von Melusin bei druckbelastungs-induzierter Hypertrophie vor. Diese Information wäre jedoch sowohl für diagnostische Maßnahmen als auch für eventuell neue therapeutische Interventionen hilfreich. Weitere Aufgabe dieser Studie war es daher zu untersuchen, ob und

wie Melusin bei chronischer Druckbelastung durch aortales Banding in Ratten reguliert wird und inwieweit Beziehungen zu hämodynamischen Veränderungen und Regulationen der extrazellulären Matrix bestehen.

Therapeutisch ist bei hochgradiger Stenose der Aortenklappe mit deutlicher Einschränkung der systolischen LV Funktion ( $EF < 30\%$ ), ausgeprägter Symptomatik und / oder stark reduzierter Klappenöffnungsfläche ( $< 1,0 \text{ cm}^2$ ) die Indikation zur Versorgung durch interventionelle (perkutane) Valvuloplastie oder operativen Klappenersatz gegeben. Medikamentös lässt sich in der Frühphase der Erkrankung eine beginnende Herzinsuffizienz durch Gabe von Diuretika und ACE-Hemmern zur Reduktion der Nachlast behandeln; letztere reduzieren zudem das LV Remodeling, können den Fortschritt der Erkrankung jedoch nur verlangsamen. Ebenso gibt es Evidenz, dass die Gabe von  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren die Progression der degenerativen Aortenstenose verlangsamen könnte [40]. Medikamentöse therapeutische Alternativen zur Behandlung der pathophysiologischen Veränderungen aufgrund einer Aortenstenose bestehen jedoch zurzeit nicht.

Einen neuen therapeutischen Ansatz könnte hierbei das frühe Eingreifen in die Entwicklung der Hypertrophie und nachfolgenden Fibrose, welche durch linksventrikuläre Druckbelastung verursacht werden, darstellen. Ein möglicher Ansatzpunkt stellt dabei die Hemmung der Isoenzyme der Prolyl 4-Hydroxylase (P4H) dar. Posttranslationelle Modifikation von Proteinen durch die P4H spielt bei linksventrikulären Remodeling Prozessen eine Rolle, indem die Synthese, Funktion und Aktivität von Proteinen reguliert wird. Die Kollagen P4H (C-P4H) ist ein Schlüsselenzym in der Kollagensynthese, durch dessen Einwirkung Prolin-Reste in alpha-Monomeren hydroxiliert werden. Dieser Synthese-Schritt sichert die thermische Stabilität der Kollagen-Tripelhelix. Eine Hemmung der Kollagen P4H (P4HI) führt daher zur Synthese instablen Kollagens innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, welches nachfolgend intrazellulär lysosomal abgebaut wird [41, 42]. Bereits verfügbar ist die Substanz FG0041, ein Phenantrolinon P4H Inhibitor; durch Inhibition der Asparagin-Hydroxilierung wird P4H inhibiert, es kommt zu Synthetisierung thermal instablen Kollagens und somit zu einer Beeinflussung pathologischer Fibrose-Prozesse [43]. Durch die Gabe von FG0041 konnte das ECM Remodeling nach akutem experimentellem Myokardinfarkt in Ratten reduziert werden [44]. Die Rolle der P4H bei myokardialer Hypertrophie durch Druckbelastung ist zwar noch unklar, jedoch konnten aufgrund der vorgenannten Studie positive Effekte auf kardiale Hypertrophie und Fibrose unterstellt werden. Die Hemmung der P4H könnte somit eine therapeutische Alternative zur Behandlung der durch Druckbelastung des LV hervorgerufenen Effekte darstellen.

---

Eine weitere Rolle der Isoenzyme der P4H besteht im Abbau des Hypoxia-inducible Factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ). HIF1 $\alpha$  wird im Myokard durch mechanischen Stress sowie hypoxämische Bedingungen durch Phosphorylierung der Phosphatidylinositol 3-kinase induziert und wirkt als Transkriptionsfaktor auf die Induktion verschiedener Gene [45]. HIF1 $\alpha$  hat auf die Sauerstoffversorgung des Myokards einen indirekten positiven Effekt durch Steigerung der Expression von Erythropoetin und Hochregulation von Sauerstoffträgern. Direkte Wirkung von HIF1 $\alpha$  ist unter anderem die Induktion des proangiogenetischen Faktors VEGF, der die Kapillarisation steigert und dadurch die Sauerstoff-Versorgung verbessert [46]. FG2216 ist ein ebenfalls oral verfügbares Molekül, welches die HIF-Prolyl 4 Hydroxylase inhibiert, die HIF1 $\alpha$ -Degradation somit vermindert und HIF1 $\alpha$  stabilisieren kann [43]. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes zur Hemmung der HIF-P4H für FG2216 (Ki-Wert) ist im Vergleich zu FG0041 hoch, somit handelt es sich bei FG0041 um eine relativ spezifische Substanz zur Hemmung der Kollagen-Hydroxilierung, bei FG2216 um eine relativ spezifische Substanz zur Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ . FG2216 befindet sich zurzeit in einer Phase-I Studie zur Behandlung der renalen Anämie. Studien zur Verbesserung der O<sub>2</sub>-Versorgung des Myokards, insbesondere bei Hypertrophie durch Druckbelastung, existieren jedoch nicht. Da die O<sub>2</sub>-Versorgung des Myokards bei der Aortenstenose durch verminderte koronare Perfusion erniedrigt ist, könnte eine erhöhte HIF1 $\alpha$  Expression positive Effekte auf den Verlauf der Erkrankung haben. Ziel der vorliegenden Studie war es somit, zwei Inhibitoren der P4H mit unterschiedlichem Wirkspektrum hinsichtlich der Beeinflussung von kardialer Hypertrophie und Fibrose bei experimenteller Druckbelastung zu beurteilen.

## 2 Fragestellung

Der Effekt der Inhibition der P4H auf die Komponenten der druckinduzierten neuroendokrinen Aktivierung, Wachstumsfaktor-Expression sowie der Fibrose war bisher nicht Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, inwieweit die Inhibition der P4H durch Einfluss auf die Hemmung der Kollagen-Synthese bzw. Induktion einer HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung den Verlauf einer experimentellen chronischen Druckbelastung in Ratten beeinflussen kann. Weitere Aufgabe der vorliegenden Studie war es, Veränderungen pro-hypertropher und profibrotischer Faktoren im Myokard bei chronischer Druckbelastung im Tiermodell der Ratte zu untersuchen, da zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten keine Daten zu Veränderungen der Melusin-Expression im Myokard bei chronischer Druckbelastung existierten. Kardiale Fibroblasten nehmen eine zentrale Rolle in der Erhaltung des Gleichgewichtes der ECM sowie als Mediatoren bei fibrotischen Umbauprozessen ein. Zur Beschreibung des Einflusses der genannten profibrotischen Wachstumsfaktoren auf die ECM sollte der Effekt der Stimulation von humanen kardialen Fibroblasten mit TGF $\beta$ 1 aus Herzen mit schwerer Funktionseinschränkung charakterisiert werden.

Zusammenfassend führte dies zu folgenden Aufgabenstellungen für die vorliegende Arbeit:

1. Im Tiermodell einer linksventrikulären Druckbelastung durch aortales Banding (AoB) sollte das Myokard hinsichtlich profibrotischer und hypertropher Faktoren (Wachstumsfaktoren, neurohumorale Faktoren und extrazelluläre Matrix, insbesondere Melusin) auf transkriptioneller und translationeller Ebene untersucht werden.
2. Der Effekt der Inhibition der C-P4H und HIF-P4H auf druckinduzierte Hypertrophie innerhalb des AoB-Modells sollte anhand funktioneller Daten sowie der Gen- und Proteinexpression charakterisiert werden.
3. Der Effekt des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 auf die Gen- und Proteinexpression von Komponenten der ECM sollte durch Stimulationen humaner kardialer Fibroblasten aus Herzen mit schwerer Funktionseinschränkung als weiterführendes Modell analysiert werden.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Tiermodell und experimenteller Verlauf

Die operative und postoperative Behandlung der Tiere erfolgte durch die AG Prof. 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 (80 – 100g KG) wurden in einem randomisierten Verfahren der Kontrollgruppe mit Sham – Operation (Sham) oder der Banding - Gruppe (AoB) zugeteilt. Die Anästhesie wurde durch Chloralhydrat (400 mg/kg KG i.p.) eingeleitet, das jeweilige Tier wurde orotracheal intubiert und maschinell beatmet. Zum experimentellen Endpunkt wurden das Körpergewicht sowie die Organengewichte aufgezeichnet, der linke Ventrikel separiert und bei – 80 °C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren biochemischen Aufarbeitung schockgefroren. Zur Erzeugung eines Druckgradienten zwischen linkem Ventrikel und Aorta als Modell der chronischen Druckbelastung wurde ein Tantalum Clip (innerer Durchmesser: 0,51 mm; Ethicon, USA) um die thorakale Aorta, etwa 0,5 – 1cm distal der Aortenklappe, platziert. Hierdurch erfolgte eine Lumeneinengung der Aorta mit daraus resultierender Druckbelastung. Das Verfahren wurde bereits ausführlich in [47] beschrieben und erfolgte bei n = 21 Ratten in der AoB-Gruppe sowie n = 30 in den Medikationsgruppen FG0041 sowie FG2216. Sham-operierte Tiere erfuhren die gleiche Behandlung, jedoch ohne Anbringen des Tantalum Clips, und erhielten die FG-Trägersubstanz Carboxymethylcellulose. Die perioperative Mortalität betrug 10%. Von Tag 2 bis Tag 28 erhielten Ratten der AoB-Gruppe randomisiert eine der folgenden Behandlungen:

C-P4HI FG 0041 in der Dosierung 25 mg/kg KG/d (FG 0041; n=17)

P4HI FG2216 in der Dosierung 30 mg/kg KG/d (FG 2216; n=13)

Trägersubstanz Carboxymethylcellulose (CMC für AoB; n=21)

Die Applikation erfolgte jeweils oral. Das Verfahren wurde durch die zuständige Tierschutzbehörde genehmigt und erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien des „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“ [48].



## 3.2 Organmorphologie, Echokardiographie und hämodynamische Daten

### 3.2.1 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde für sämtliche Gruppen am 28. Tag des Versuchsablaufes 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 gespeichert, endsystolischer (LVESD) und enddiastolischer (LVEDD) Diameter des LV sowie die Wanddicke der Hinterwand (PW) wurden ermittelt. Die LV Ejektionsfraktion wurde mittels der Teichholz-Formeln ( $EDV = (7/(2,4+LVEDD)) \cdot LVEDD^3$ ;  $ESV = (7/(2,4+LVESD)) \cdot LVESD^3$ ;  $EF = (EDV-ESV)/EDV \cdot 100$ ) anhand der M-Mode Aufnahmen berechnet. Alle echokardiographischen Messungen wurden durch einen Untersucher durchgeführt, der bezüglich Gruppierung der Tiere blind war. Die Messungen orientierten sich an den Richtlinien der American Society of Echocardiography [49].

### 3.2.2 Hämodynamik

30 Tage nach Durchführung des aortalen Bandings wurden die Tiere 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 platziert. Der arterielle Blutdruck wurde über ein in der linken A. carotis liegendes Drucksystem gemessen. Zur Erhebung linksventrikulärer hämodynamischer Daten wurde anschließend erneut eine Thorakotomie durchgeführt. Nach Präparation des Herzens, insbesondere des LV, wurde ein weiterer PE 50-Katheter unter Anwendung der Seldinger-Technik mittels einer 14G Nadel durch das Myokard der linksventrikulären Wand im LV platziert. Diese Technik verhinderte den Einsatz hochsensibler Katheter. Linksventrikulär endsystolischer (LVESP) und enddiastolischer (LVEDP) Druck wurden mit einem Statham Messwandler (P23XL) und einem Goldham Verstärker (AMP 4600) registriert. Die linksventrikuläre Kontraktilität wurde über die LV Druckkurven berechnet.

### 3.2.3 Organmorphologie

Nach Euthanasie der Tiere wurde zunächst das Körpergewicht bestimmt. Herz und Lunge wurden dem Thorax entnommen und die Gewichte mittels einer Feinwaage registriert. Das Herz wurde entsprechend den Grenzen des rechten und linken Atriums bzw. Ventrikels geteilt, die separaten Kammern wurden noch einmal gesondert abgewogen.

### 3.3 Zellisolation und Kultivierung humaner kardialer Fibroblasten sowie Zellstimulation

Linksventrikuläres Myokard (5-10g) von gesunden Spender-Herzen, welche nicht zur Transplantation geeignet waren bzw. explantierten Herzen von DCM-Patienten wurde direkt nach intraoperativer Entnahme gekühlt und aufgearbeitet. Die Anzahl der Fibroblasten-Isolationen von Spender-Herzen betrug n=9, die der DCM-Herzen betrug n=11. Vor der Explantation und weiteren Verwendung wurde von den Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung des Materials in wissenschaftlichen Studien abgegeben. Sämtliche Arbeitsprozesse erfolgten unter Kühlung auf Eis. Das Myokard wurde in kleine Stücke zerteilt und drei Mal in PBS (Bio Whittaker, USA) gewaschen. Anschließend erfolgte die 20-minütige Inkubation bei 37°C mit 5 mL Collagenase-Dispase (1 mg/ml; Merck, Deutschland). Der entstehende Überstand wurde abgetrennt, die Inkubation des Sediments mit Collagenase-Dispase-Lösung wurde weitere zwei Mal durchgeführt. Der entstandene Überstand wurde je Isolation gepoolt, 5 min. bei 1200 rcf, 4°C zentrifugiert und der nun zellarme Überstand entfernt. Die im Sediment vorhandenen Fibroblasten wurden zu gleicher Menge auf Zellkulturschalen ausgesät und nach Zugabe von 15 mL Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Karlsbad) für eine Stunde bei 37°C sedimentiert. Anschließend wurde das DMEM entfernt, die Schale zweimalig mit 10 mL PBS gewaschen, mit je 10 mL DMEM, welches mit 10% fötalem Kälber-Serum (DMEM-FCS, Gibco, Karlsbad) versetzte war, gefüllt und erneut in den Brutschrank bei 37°C überführt. Die so erhaltenen humanen kardialen Fibroblasten wurden unter einem zwei Mal pro Woche stattfindenden Mediumwechsel bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Passage der Zellen. Hierzu wurden die Zellen vom Schalenboden nach Entfernung des DMEM unter Zugabe von 1,5 mL Trypsin (0,1 mg/ml, Biochrom, Berlin) für 5 min. bei 37°C gelöst. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 7,5 mL DMEM-FCS gestoppt, die so losgelösten Zellen wurden anschließend auf mehrere Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C sedimentiert, das DMEM-FCS entfernt, einmalig mit PBS gewaschen und erneut 10 mL DMEM-FCS hinzu gegeben. Diese Passagierung erfolgte insgesamt drei Mal.

Die Stimulation der humanen kardialen Fibroblasten erfolgte nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz der dritten Passage. Hierzu wurde das DMEM-FCS erneut entfernt und mit frischem DMEM ersetzt. Hiernach wurde dem Medium TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL; Calbiochem, Deutschland) hinzugefügt und für 6h, 12h oder 24h inkubiert. Schließlich wurde das jeweilige Medium entfernt und bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Untersuchungen zur Etablierung der Zellstimulation erfolgten analog an Zellkulturen der

---

Fibrosarkom-Zell-Linie HT1080 (European Collection of Animal Cell Cultures, Wiltshire, UK).

### **3.4 Proteinanalyse**

#### *3.4.1 Proteinextraktion*

Gefrorene Myokardproben (ca. 50 – 80 mg) wurden in autoklavierte 1,5 mL Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Deutschland) überführt, das Gewicht wurde auf einer Feinwaage (Fa. Eppendorf, Deutschland) ermittelt und die Proben in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Myokardstücke wurden in ein Reaktionsgefäß „Lysis Matrix Typ D“ umgefüllt, welches zweierlei Arten von Keramik-Kügelchen enthielt, die zum mechanischen Aufschluss der Myokardproben dienten. Es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  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 von Gewebe und Puffer erfolgte 30 Sekunden lang bei 2000 rpm mit dem FastPrep Gerät (FP 120, Bio101 Thermo Savant). Dieser Schritt wurde zwei bis drei Mal bis zur vollständigen Homogenisation des Gewebes wiederholt. Das Lysis Matrix-Gefäß wurde zwischen den Wiederholungen auf Eis gestellt, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 0,05 mM SDS (Fa. Roth, Deutschland) zur Fällung der Proteine. Der Ansatz wurde gemischt, 10 min. auf Eis gekühlt und bei 14.000 U/min., 10 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und nach Abnahme von 20 $\mu\text{l}$  zur Proteinmessung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Proteinextraktion aus Zellkulturen erfolgte durch Zugabe des Protein-Extraktions-Doppel-Detergenz-Lysis Puffers sowie des Proteinase-Inhibitor-Cocktail auf die Zellkulturschalen und mechanischem Aufschluss mittels eines Zellschabers. Die weitere Behandlung erfolgte analog den o. g. Schritten.

#### *3.4.2 Quantifizierung der Proteinmenge*

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde ein vorgefertigtes Reaktionsgemisch (BCA-Essay-Kit #23225, Fa. Pierce, Rockford, USA) auf der Basis der Bradford-Reaktion verwendet. Als Leerwert diente der unter 3.4.1 verwendete Lysis-Puffer. Zur Berechnung des

Proteingehaltes der Proben diente eine Verdünnungsreihe einer kommerziellen Albumin-Lösung (2000 $\mu\text{g}$  / mL; Fa. Pierce, #23209) von 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Die jeweiligen Proben wurden in je 2 $\mu\text{l}$  und 5 $\mu\text{l}$  einer 1:1 und 1:10-Verdünnung gemessen. Die Verdünnung erfolgte mit HPLC-Grad gereinigtem Wasser. Sämtliche Proben wurden auf eine 96-Well-ELISA-Platte (Fa. Biozym, Deutschland) aufgetragen. Die Probenvolumina wurden auf 20 $\mu\text{l}$  mit HPLC Wasser aufgefüllt. Mittels einer Multipipette (Fa. Eppendorf, Deutschland) wurde anschließend 300 $\mu\text{l}$  des BCA-Reaktions-Farbstoffgemisches (24,5ml BCA Protein Assay Reagent A, 500 $\mu\text{l}$  BCA Protein Assay Reagent B) pro Well hinzugegeben und 30 min. 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 562nm Wellenlänge, die Messung des Hintergrundes erfolgte unter Verwendung eines 550nm Filters. Die Einzel-Werte wurden in den Verdünnungsstufen gemittelt, um die entsprechenden Verdünnungsfaktoren korrigiert und der Blank-Hintergrund-Wert subtrahiert. Die Myokard-Proteinisolationen wurden schließlich auf eine einheitliche Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gebracht, aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 Western Blot

Die Detektion und Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mittels semiquantitativem Western Blot. Zunächst erfolgte hierzu eine diskontinuierliche Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Als vorbereitender Schritt wurde die Gel-Vorrichtung, bestehend aus 2 kleinen Glasplatten, 2 großen Glasplatten, 4 Spacern 0,75mm und 2 Gelkämme mit 10 – 24 Slots (System „Mini- Protean“, Fa. BioRad, Deutschland bzw. System „DPR“, Fa. VWR International, Deutschland) gewaschen, um Fett- und Gelreste zu entfernen. Es wurden SDS-PAGE Gele unterschiedlicher Dichte, entsprechend der Größe des zu detektierenden Proteins verwendet. Für ein 10% SDS-Page Trenn-Gel wurden 3,3ml 30% Acrylamid Mix (Fa. Roth, Deutschland), 2,5ml 1,5M TRIS pH 8,8 (Fa. Roth), 4,0ml Wasser (Millipore), 100 $\mu\text{l}$  10% SDS, 100 $\mu\text{l}$  10% APS (Fa. Roth) und 4 $\mu\text{l}$  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, 80 $\mu\text{l}$  10% SDS, 80 $\mu\text{l}$  10% APS und 8 $\mu\text{l}$  TEMED gegossen und darin ein Kamm luftblasenfrei eingebracht. Zur Probenvorbereitung wurden je nach Protein-Optimum ca. 10 $\mu\text{g}$  Protein je Probe mit nicht-reduzierendem Gelladepuffer (Rotiload 2, Fa. Roth, Deutschland) gemischt, 5

min. bei 95°C im Thermoblock denaturiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die in das SDS-PAGE Gel einzusetzenden Proteinmengen wurden in Vorarbeiten bestimmt (siehe Optimierungsschritte). Die erste Tasche wurde mit 5µl eines Molekulargewichts-Markers (MBI Fermentas, Prestained Protein Marker 10-180 kDa) befüllt, um einen Größenvergleich innerhalb des Gels zu gewährleisten, die restlichen Taschen wurden mit den jeweiligen Proben beladen. Die Elektrophorese der SDS-PAGE Gele erfolgte bei 100V, 350mA (Stromtransformator EPS 301/200, Fa. Amersham Pharmacia,) in einer Elektrophoresekammer (Fa. Biozym), welche mit ca. 1 l Elektrophoresepuffer (15.1g TRIS-Base, 94g Glycerin, 50ml 10% SDS, pH 8.3) gefüllt war. Die Laufzeit betrug zwischen 2 ½ h und 3 ½ h. 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-HCl pH 8.3, 200ml Methanol, Wasser ad 1000ml) gewaschen (3 mal 15min.) 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 Gitter wurde in die Blot-Apparatur eingespannt und mit 1 l Transferpuffer umspült. Das Blotten 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 1 min. gefärbt. Danach wurde die Membran 2-5 min. mit Aqua dest. Gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Vor der Hybridisierung des 1. Antikörpers (AK) wurde die Membran eine Stunde in 5% Blocking Reagenz (BR; 5g Milchpulver in 100ml TBS-T: 20mM TRIS-Base, 137mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der 1. AK wurde entsprechend der in den Optimierungsschritten ermittelten optimalen Konzentration verdünnt (Tab. 2), die Membran wurde hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation des 1. AK wurde die Membran einmal 15 min. und zweimal 5 min. in TBS-T gewaschen und anschließend mit dem mit horse-raddish-peroxidase (HRP) markierten 2.AK inkubiert. Nach Hybridisierung des 2. AK wurde die Membran erneut einmal 15 min. und zweimal 5 min. in TBS-T gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung eines Reaktions-Kits (ECL Kit, Fa. Amersham Phamacia). Die Membranen wurden mit der Reaktionslösung für 4 min. überschichtet, was eine Farbreaktion durch HRP

an den spezifisch gebundenen Stellen bewirkte (Abb. 2, A). Anschließend wurden die Membranen getrocknet, in Cellulose luftdicht verpackt und lichtgeschützt zusammen mit einer Filmfolie (Kodak Biomax Light-1, Fa. Kodak, Deutschland) in eine Filmkassette gelegt. Die Dauer der Entwicklung war abhängig von der Intensität der Chemilumineszenzreaktion und dauerte zwischen 30 Sec und 12h. Die Filmentwicklung erfolgte mit einer Entwicklermaschine Protec 45 compact Typ 1120 (Fa. Protec Gerätebau GmbH, Deutschland).

#### Optimierungsschritte:

1. Die Polyacrylamid-Gehalt des Gels wurde entsprechend der Größe des zu detektierenden Proteins festgelegt. Für Proteine mit einem geringen 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. Collagen I, 180kDa) wurde ein 8% Gel angefertigt. Da auch für Kollagen GAPDH (35 kDa) als Standard notwendig war, wurde parallel ein 12,5%iges Gel angefertigt.
2. Zur Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge wurden Verdünnungsreihen für jedes Protein angefertigt und mit dem jeweils spezifischen Antikörper detektiert. Die Verdünnungsreihe bestand aus einem Pool derjenigen Proben, die zu quantifizieren waren. Die optische Dichte der Banden der entwickelten Filme wurde mittels AlphaEase-Software ausgewertet und grafisch gegen die Konzentration dargestellt. Anhand der so erhaltenen Kalibrationskurve wurde eine Proteinmenge bestimmt, die sich im linear ansteigenden Bereich der Verdünnungsreihe befand.
3. Die Antikörperkonzentration 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
TIMP1 (24)	Santa Cruz SC5538 Rabbit; 1: 200 in TBS-T	Dianova; Donkey anti- rabbit; 1: 60.000 in BlockingReagenz	8%	15µg
TIMP3 (36)	Chemicon AB802 Rabbit; 1: 1.000 in TBS-T	1: 80.000 in BlockingReagenz	12,5%	15µg
TIMP4 (23)	DPC Biermann DP073 Rabbit; 1: 400 in TBS-T	1: 60.000 in BlockingReagenz	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
Collagen 1 (210) Collagen 3 (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 BlockingReagenz	Entsprechend bzw. 12,5%	entsprechend

**Tab. 2: 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).**

#### 3.4.4 Strippen der Membran

Das Strippen der Membran ist die Entfernung des 1. und 2. AK von der Western Blot-Membran. Nach Detektion des Proteins und durchgeführtem Stripping wurde der externe Standard GAPDH auf der gleichen Blot-Membran detektiert, um so eine Korrektur ggf. geringfügig unterschiedlicher Proteinmengen zu gewährleisten. Die Membranen wurden dazu über Nacht in Stripping Puffer (15g Glycin, 1g SDS, 10ml TWEEN 20 ad 1000 mL, pH 2.2) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Nitrozellulosemembranen zweimal 30 min. in TBS-T gewaschen und anschließend mit Ponceau-Rot S angefärbt. Es folgten erneut Blocken mit 5% Blocking-Reagenz, Inkubation mit 1. (GAPDH) und 2. AK und Entwicklung der Filme (siehe 3.4.3).



### 3.4.5 Spezifische Kollagen-Quantifizierung

Die Größe der Kollagen-Proteine Typ I und III (210 bzw. 130 kDa) erschwerte die spezifische Quantifizierung dieser Proteine. Zusätzlich traten unspezifische Bindungen des 1. Antikörpers auf, was eine eindeutige Identifizierung des Proteins verhinderte. Zur Identifikation der spezifischen Bande wurde daher zusätzlich ein Kollagenase-Verdau eingeführt, um so durch Verschwinden der potentiell spezifischen Bande eine eindeutige Identifikation derselben zu ermöglichen.

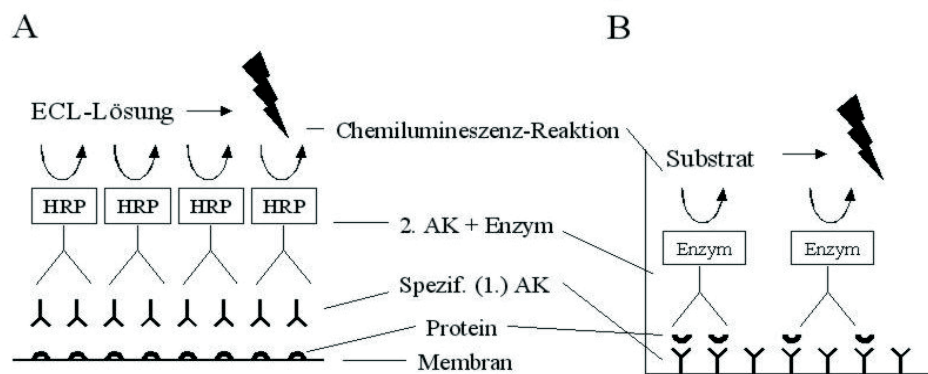
Kollagenase-I spaltet insbesondere Kollagen Typ I, II und III. 200mg lyophilisierter Kollagenase-I (Roche Applied Biosciences, EC 3.4.24.3) wurden in 10ml PBS gelöst. Zur Aktivierung der Kollagenase wurden 120µl 0,1M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Da die Kollagen-Positiv-Kontrollen zur Lösung in einen sauren pH-Bereich gebracht wurden, wurde diese auf einen pH von 7,2 bis 7,5 mit 0.1 bis 0.4M Tris titriert, da ein saures Milieu Kollagenase irreversibel inhibieren würde. Protein-Proben wurden ebenfalls auf einen basischen pH-Bereich titriert. Zum Verdau wurden 10µl der Kollagenase-I-Lösung zu den Kontrollen und Protein-Proben gegeben und bei 37°C für 2,5 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 – 40 µl 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 beschrieben unterzogen.

### 3.4.6 TGF-β1 Quantifizierung mittels ELISA

Die TGF-β1 Quantifizierung erfolgte durch einen direkten solid-phase-ELISA (Fa. Quantikine) als Sandwich-Immunoassay (Abb. 2, B). 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 wurde zu 30µl Protein (entsprechend 150µg Protein) 6µl 1N HCl gegeben und der Ansatz 10 min. 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: 2000 pg/ml) diente zur Erstellung der Eichkurve und zur Berechnung der jeweiligen Menge des Proteins in den Proben. 200µl der Standard-Verdünnungsreihe (2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml) und jeweils 200µl der aktivierten Proben wurden in die Wells der Microtiterplatte pipettiert und dort für 3 Stunden inkubiert, wodurch TGF-β1 an die



Rezeptoren gebunden wurde. Der Inhalt der Wells wurde gründlich entfernt und diese dreimal mit 400µl Waschpuffer (mitgeliefert) gewaschen. Anschließend wurde je 200µl TGF-β1-Konjugat in jedes Well pipettiert und 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 400µl Waschpuffer wurde je 200µl Substratlösung in jedes Well gegeben und für 20 min. in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Die so entstehende Färbung der Lösung war proportional zur TGF-β1-Menge der Proben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50µl 1N Schwefelsäure gestoppt. Die Microtiterplatte wurde kurz geschüttelt, um den Farbstoff gleichmäßig zu verteilen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem ELISA Platten Reader bei 450 nm. Eine Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 540 nm bzw. 570 nm zur Verringerung optischer Schwankungen.



**Abb. 2: Prinzip des Western Blots (WB; 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.

### 3.4.7 MMP1, TIMP1, TIMP2 und Kollagen I-ELISA

Die Quantifizierung von MMP1, TIMP1, TIMP2 und Kollagen I erfolgte in den Proben der Zellkultur aufgrund des geringeren verfügbaren Materials durch einen direkten solid-phase-ELISA (MMP1: Oncogene, # QIA55; TIMP1: Oncogene, # QIA54; TIMP2: Oncogene, # QIA40; Kollagen-1: Chondrex, Arthrogen-CIA, #1024) entsprechend dem TGF-β1-ELISA (3.4.6, Abb. 2B). Eine Aktivierung der Proteine war nicht notwendig, es wurde das jeweilige native Protein verwendet. Ein gegen das jeweilige Protein gerichteter, monoklonaler

Antikörper war auf der jeweiligen ELISA-Platte immobilisiert. Ein zweiter, mit HRP konjugierter Antikörper wurde nach einem Wasch-Schritt hinzugegeben. Nach Zugabe des Farbstoffes (Tetramethylbenzidin) und Stopp der Farbreaktion mittels einer sauren Lösung konnte die Extinktion entsprechend dem spezifischen Proteingehalt und der jeweiligen Standard-Verdünnungsreihe des mitgelieferten Proteins bei 450nm gemessen werden.

### 3.4.8 Zymographie

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Gelatinase-Untergruppe 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 eine homogene Masse mit dem Polyacrylamid-Mix einzugehen. Die Gelvorrichtung wurde entsprechend 3.4.3 vorbereitet. Einem 10% SDS-PAGE Gel Ansatz (3,9ml Aqua bidest., 3,3ml 30% Acrylamid-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 3.4.3) und der Kamm eingebracht. Je 6µl (entspricht 30 µg) Protein der Proben wurden mit 18µl Aqua bidest. und 6µl nicht-reduzierendem Gel-Ladepuffer gemischt und zur Trennung von Komplexen 5 min. bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt, zentrifugiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (Fa. Biozym, Deutschland) eingespannt, die Pufferkammern wurden mit ca. 1 l TRIS-Glycin Elektrophoresepuffer (siehe 3.4.3) gefüllt. In die erste Proben-Tasche des Gels wurde 5µl eines Molekulargewichts-Markers (MBI Fermentas, Prestained Protein Marker 10-180 kDa), 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 2,5 - 4 Stunden unter ständiger Kühlung der Kammer durch einen Eis-Akku. Hierdurch wurden die Proteine, und somit auch die MMPs, der Größe nach getrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel zweimal 30 min. in 2,5% Triton-X-100 (Roth, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert, um SDS aus dem Gel zu entfernen und die Enzyme zu renaturieren. Nach Abgießen des Triton-X-100 wurden 100ml Enzym-Puffer nach Kleiner (50mM Tris-HCl pH 7,5, Fa. Merck, Deutschland; 200mM NaCl, Fa. Merck, Deutschland; 5mM CaCl<sub>2</sub> Fa. Roth, Deutschland; 0,2% Brij-35, Fa. Sigma) dazugegeben und die Schalen

bei 37°C 18 Stunden lang in einem Inkubator mit Schüttler (GFL 3003) bei 50-60 U/min. inkubiert. 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; 10% Eisessig, Fa. Roth, Deutschland) 3 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur angefärbt. Das Entfärben der degradierten Gelatine erfolgte durch Entfärberlösung (50% Methanol und 10% Eisessig) in 2 - 3 Schritten (15, 30 und ggf. 60 min.). Es wurden weiße Banden gegen einen blauen Hintergrund sichtbar, welche die Stellen der Gelatine-Degradation darstellten und deren Größe sowie Intensität proportional zur Enzymaktivität war. Schließlich wurden die Gele mit Fixationspuffer (30% Ethanol; 10% Glycin, Fa. Roth, Deutschland) über 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert und in Cellophan-Folie versiegelt. Zur Normalisierung wurde der jeweilige Gehalt des Proteins  $\beta$ -Actin der Proben herangezogen. Hierzu wurde ein 10%iges SDS-PAGE Gel gegossen und ein Aliquot der jeweiligen Proben einer Elektrophorese (analog 3.4.3) unterzogen. Das Gel wurde durch Coomassie-Blau angefärbt, überschüssige Farbe durch Entfärbung entfernt. Das Gel wurde fixiert und densitometrisch ausgewertet.

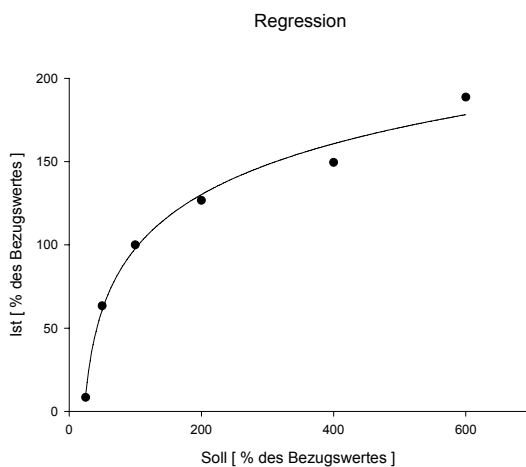
#### Optimierungsschritte:

1. Zur Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge wurden Verdünnungsreihen aus einem Pool der jeweiligen Proben angefertigt. Die optische Dichte der Banden wurde ausgewertet und grafisch gegen die Proteinkonzentration dargestellt. Anhand der so erhaltenen Kalibrationskurve wurde eine Proteinmenge bestimmt, die sich im linear ansteigenden Bereich der Verdünnungsreihe befand.
2. Bei gleich bleibender Proteinmenge wurde anschließend die Gelatinekonzentration im Gel (0,05%, 0,1%, 0,5% und 1%) variiert, um eine höhergradige 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.

### 3.4.9 Densitometrie und Auswertung

Die entwickelten Filme und Gele wurden mit Hilfe eines Durchsichtscanners (ScanJet 4600 mit Transparenzadapter, Fa. HP, Deutschland) eingescannt und densitometrisch mit der Software AlphaEase Version 5.5 (Alpha Innotec, USA) vermessen. Hierbei wurde eine konstante Fläche über jeder spezifischen Bande eines Gels bestimmt, Menge sowie Intensität der Schwarz- bzw. Weißpunkte addiert und bezüglich der Fläche integriert. Hiervon subtrahiert wurde der Wert der Schwarz- bzw. Weißpunkte einer gleich großen Fläche über dem nicht-angefärbten Hintergrund. Es resultierte ein Zahlenwert, welcher die optische Dichte (OD) der Bande angab.

Eine separate Eichgerade jeder Versuchsreihe diente zur Korrektur von interexperimentellen Varianzen. Hierbei wurde die relative Steigerung der mitgeführten Eichgerade 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.  $\beta$ -Actin (Zymographie) in Beziehung gesetzt, woraus die relative Proteinmenge resultierte.



**Abb. 3: Regression einer Eichkurve; aufgetragen ist die relative Proteinsteigerung der Ausgangsmenge (X-Achse; „Soll“) gegen die relative OD (Y-Achse; „Ist“). Durch Ermittlung der Regressionskurve wurde eine Korrekturformel errechnet, die als Eichgeraden-Bezug diente.**

## 3.5 mRNA Quantifizierung

### 3.5.1 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 (#9780, Fa. Ambion, Austin,

USA) behandelt. Reaktionsgefäße wurden mit 0,1%iger DEPC-Lösung behandelt und anschließend bei 1 atü und 121 °C 30 min. lang autoklaviert.

Nach Bestimmung des Myokardgewichtes (Tab. 3) wurde die jeweilige Probe in ein mit Keramikkügelchen gefülltes Reaktionsgefäß (Lysis Matrix Typ A) gegeben und 600 µl RNazol B (Invitrogen RNA Bee CS 105B) hinzugefügt. Das Gewebe im Lysis Matrix A Gefäß wurde im FASTPREP-Gerät (FP 120 von BIO 101 Thermo Savant) 30 Sekunden lang homogenisiert; nach Beendigung wurde erneut 400 µl RNazol hinzugegeben, um ein Gesamtvolumen von 1000 µl pro Gefäß zu erreichen.

Der Zellaufschluss zur RNA-Extraktion in Zellkulturen erfolgte durch Zugabe von 1mL RNazol B auf die Zellkulturschalen und mechanischer Bearbeitung mittels eines Zellschabers. Die weitere Behandlung erfolgte analog den u. g. Schritten.

Die Gefäße wurden im Kühlraum bei 4°C, 30min lang bei 300 rpm auf einem dafür vorgesehenen Gerät (Fa. Eppendorf, Deutschland) geschüttelt. Zu diesen Ansätzen wurde 200µl eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (1:24, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) pipettiert. Die Ansätze wurden 2 min. gemischt, zur Phasentrennung 5 min. auf Eis gelagert und 10 min. bei 4°C und 14.000 U/min (Fa. Eppendorf, Deutschland) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren konnten drei Phasen abgegrenzt werden: am Boden des Gefäßes eine blaue Phase, darüber eine weißliche dünne Interphase (Zelldebris 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 gekühlt. Nach erfolgter Fällung wurde die RNA über 30min. bei 4°C und 14.000 U/min zentrifugiert, das dabei entstehende RNA-Pellet zweimal mit 500µl 80% Ethanol gewaschen und bei 4°C, 7.500 U/min für 5 min. zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und je nach Größe des Pellet in 25-50 µl DEPC- behandeltem Wasser resuspendiert.

Der Nukleotid- (OD 260) und Proteingehalt (OD 280) wurden im Photometer über die OD bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$  bzw.  $\lambda = 280\text{nm}$  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 ( $\mu\text{g RNA} / \text{mg Myokard-Feuchtgewicht}$ ) ist in Tab. 3 dargestellt.

### 3.5.2 DNase-I-Verdau

Die unter 3.5.1 isolierte RNA wurde einem DNase-I- Verdau unterzogen. Hierzu wurde die gesamte RNA-Lösung (20- 45µl) verwendet. Pro Mikrogramm RNA wurden 2 Units DNase-I (Fa. Boehringer-Ingelheim), 1mM MnCl<sub>2</sub> und 40 Units RNAsin (RNase out, Invitrogen, Karlsbad) eingesetzt. Alle Proben wurden mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein einheitliches Endvolumen gebracht. Die Reaktion erfolgte bei 37°C in einem Thermoblock und wurde nach 10min mit 1000µl RNAzol B (RNABee CS 105B, Invitrogen) gestoppt. Die nachfolgende RNA-Extraktion, Präzipitation, Ethanolwaschung und Photometermessung erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben, die RNA-Ausbeute ist in Tab. 3 wiedergegeben. Es bestand kein signifikanter Unterschied der RNA-Ausbeute vor und nach DNase-I Verdau zwischen den Gruppen. Für die weitere Verwendung wurden die Proben auf 125ng RNA/µl verdünnt und bei -80°C eingefroren.

	n	FG (mg)	vor DNase-I Verdau (µg RNA/mg FG)	nach DNase-I Verdau (µg RNA/mg FG)	Ausbeute (%)
Sham	20	23,4 ± 4,7	0,76 ± 0,20	0,53 ± 0,17	68,1 ± 15,7
AoB	15	25,5 ± 6,6	0,75 ± 0,22	0,53 ± 0,20	73,9 ± 27,7
FG0041	14	23,9 ± 6,7	0,83 ± 0,22	0,63 ± 0,29	70,5 ± 24,8
FG2216	7	25,0 ± 5,3	0,84 ± 0,23	0,57 ± 0,16	69,5 ± 15,7

**Tab. 3: Daten der RNA-Extraktion und des DNase-I Verdau; (FG: Feuchtgewicht des Myokards). Die RNA-Ausbeute war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.**

### 3.5.3 DNA- Negativkontrolle

100ng der DNase-I verdauten RNA wurde von jeder Probe für die Durchführung der DNA-Negativkontrolle aufbewahrt. Aus der 125 ng/µl Verdünnung wurde abermals eine 1:25-Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt und für die folgende PCR verwendet.

Es wurde zunächst ein Mastermix mit 2,55 µl RNA-freiem Wasser, 2,5µl 5xPuffer (Fa. Invitrogen), 0,75µl (50mM) MgCl<sub>2</sub>, 4µl (1,25mM) dNTP und 0,2µl Taq-Polymerase je Probe hergestellt. In DEPC-behandelten 0,5ml Reaktionsgefäßen wurde pro PCR-Ansatz 16 pMol des GAPDH-Primer-Mixes und darüber ca. 10µl heißes Wachs gegeben. Über das erstarrte Wachs wurden 10µl des Mastermixes und 5µl (50ng RNA) der jeweiligen DNase-verdauten Probe gegeben. Als Positivkontrolle wurde 5µl (entspricht 50ng) 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. Das Gel wurde der Elektrophorese-Vorrichtung entnommen und unter UV-Licht 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 3.5.2).

#### *3.5.4 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, 10 min. bei 70°C erhitzt und auf Eis gekühlt. 4µl 5xRT-Puffer (250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3), 2µl 100mM DTT, 1µl 0,5mM dNTP, 1µl (40 U/µl) RNAsin und 1µl (200U/µl) Superscript RNase H-Reverse Transkriptase (jeweils Invitrogen, Karlsbad) je Probe wurden zu einem Mastermix zusammengegeben und je 9µl jedem Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde gemixt, zentrifugiert, 10 min. bei Raumtemperatur und anschließend 50 min. 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 auf Eis. Nach erfolgter RT wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 5ng/µl mit DEPC-behandeltem Wasser eingestellt. Die Erstellung einer RT-Positiv- sowie Negativkontrolle erfolgte analog des unter 3.5.3 beschriebenen Verfahrens, wobei eine Positivkontrolle bestätigt wurde, wenn im photometrischen Bild eine Bande nachgewiesen werden konnte.

#### *3.5.5 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 Ziel-Gen wurden unter Zuhilfenahme der Software „DNAsis 2.1“ sowie „PrimerExpress“ (PE Applied Biosystems) erstellt und sind in Tab. 4 wiedergegeben. 12,5µl SYBR Green (PE Applied Biosystems), ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, sowie eine jeweils optimierte Menge an Primer-Mix (Invitrogen), Wasser und MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) wurden zu einem Mastermix von 20µl je Probe



zusammengemischt. Der Mastermix sowie 5 µl cDNA je Probe (entspricht 50ng) wurde in 96-Well Platten (Fa. Biozym) gegeben. 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 Ziel-Gen optimiert (allgemeines Thermoprofil: 45sec. 95°C, 60sec. 60°C, 45sec. 72°C). Für die Quantifizierung der mRNA wurden die Ansätze 40 Zyklen lang mit den jeweils spezifischen Primern amplifiziert. Als endogener Standard („Housekeeping Gene“) wurde GAPDH (209bp) im gleichen Pipetierschema wie das zu untersuchende Gen im Doppelansatz mitgeführt. Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression 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. Während der Detektionsphase erfolgte eine kontinuierliche pseudolineare Aufzeichnung der Fluoreszenz. Durch den Maximalwert der Steigungsänderung des Fluoreszenzanstieges wurde der ct-Wert errechnet. Zur Korrektur etwaiger Varianzen zwischen den Proben bezüglich mRNA-Extraktion bzw. RT-Effizienz wurde die gemessene Expression durch den ct-Wert des stabil exprimierten Referenz-Gens GAPDH normalisiert. Dieser Quotient wurde wiederum gegenüber der Kalibrationskurve normalisiert und resultierte in der relativen mRNA-Expression (delta – delta – ct Methode).

#### Optimierungsschritte:

1. Zur Optimierung der Annealing-Temperatur wurde eine PCR mittels Gradientencycler (Fa. Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 12,5 µl SYBR-Green, 2 µl Primer-Mix und 5,5 µl Wasser, denen 25ng cDNA aus gepoolten Proben in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß hinzugefügt wurde. Der Temperaturgradient betrug von 60°C ausgehend  $\pm 6^\circ\text{C}$  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 Ziel-Gens weiterverwendet.

2. Zur Optimierung des Primerverhältnisses wurden 4 verschiedene Reaktionsansätze mit einem Verhältnis von Forward- und Reverseprimer von 1:1, 1:3 und 3:1 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, Übereinstimmung der



Doppelansätze und Reinheit der Negativkontrolle sowie Höhe, Breite und Spezifität der Maximalpunkte der Schmelzkurve.

3. Zur Optimierung der  $MgCl_2$  Konzentration wurden drei Reaktionsansätze mit 5mM, 4mM und 2,5mM  $MgCl_2$  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.

### **3.6 Statistik**

Alle Messwerte sind, sofern nicht anders ausgewiesen, als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen des Mittelwertes (SEM) angegeben. Differenzen wurden im Falle der Zellkultur-Untersuchungen mit dem Wilcoxon bzw. Mann-Whitney U-Test, im Falle der Untersuchungen zur Prolyl-4 Hydroxylase-Inhibition mittels ein-faktorieller ANOVA und Tukey post-hoc Test nach Prüfung der Normalverteilung verglichen. Ein Wert von  $p < 0.05$  wurde als signifikant definiert. Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson ermittelt. 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.

Gen	Forward Primer Sequenz	Reverse Primer Sequenz	Grösse	Index Nr.
AT-1	5'- cat gct gaa gac tgt gg -3'	5'- aag gaa cac act ggc gta ga -3'	186 bp	NM_030985.1
Collagen I	5'- tga cct tga ggt gga cac ta -3'	5'- cag tca gag tgg cac atc tt -3'	125 bp	RNCAITI
Collagen III	5'- ctc aag agc gga gaa tac -3'	5'- atc tgt cca cca gfg ctt -3'	140 bp	AJ005395
CTGF	5'- tat gat gcg agc caa ctg -3'	5'- ctg acc atg cag aga ega -3'	140 bp	AB023068.1
ECE-1	5'- ctc cac act cat caa cag ca -3'	5'- gaa ctt ctc atc ggc atc ct -3'	117 bp	NM_053596
ET-1	5'- agc tga gaa gga agt gca ga -3'	5'- agg tgg cag aag tag aca ca -3'	113 bp	NM_012548
ETR $\alpha$	5'- gaa egc cac tct cct aag aa -3'	5'- cea cgt aga taa ggt ctc ca -3'	100 bp	NM_012550
ETR $\beta$	5'- aga gca atc ctc aga ggt gt -3'	5'- gtc gta tcc gtg atc gtt ag -3'	238 bp	X57764
GAPDH	5'- cat gcc atc act gcc act ca -3'	5'- ggc gca tgt cag atc cac aa -3'	209 bp	AF106860
ITG $\beta$ 1	5'- cct act tct gca cga tgt ga -3'	5'- aag cag ctg ttg tgg ttg gat ctg -3'	162 bp	NM_017022.1
MMP-1	5'- gtg acc tcc aca gtt gac ag -3'	5'- aca tca ggc act cca cat ct -3'	121 bp	BT006874.1
MMP-2	5'- tac gat gat gac egg aag tg -3'	5'- gga agt tct tgg tgt agg tg -3'	153 bp	NM_031054
MMP-9	5'- tcg act cca gta gac aat cc -3'	5'- gag act tcc aat acc gac c -3'	103 bp	NM_031055
MT-1 MMP	5'- gga cac gat gaa ggc tat ga -3'	5'- cat tat gct gcc act tga gg -3'	102 bp	NM_031056
OPN	5'- ata gct tgg ctt acg gac tg -3'	5'- ttg ata gcc tca teg gac tc -3'	126 bp	M99252
TGF- $\beta$ 1	5'- cct gga tac caa cta ctg ct -3'	5'- aag gac ctt gct gta ctg tg -3'	183 bp	NM_021578.1
TIIMP-1	5'- cct ctg gca tcc tct tgt -3'	5'- ata acc agg tcc gag ttg -3'	102 bp	U06179
TIIMP-2	5'- tgc aat gca gac gta gtg -3'	5'- tgt cct tgt cag gtc ctt -3'	141bp	NM_021989
TIIMP-3	5'- gca gta cat tca cac gga ag -3'	5'- caa ggc aag tag tag cag ga -3'	227 bp	NM_012886
TIIMP-4	5'- atc cag tga gaa ggt agt cc -3'	5'- cac cac aga ggg aag agt ca -3'	154 bp	BC064046.1

Tab. 4: Primer-Sequenz, -grösse und -Index Nr.; AT-1 bezeichnet Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, CTGF - Connective Tissue Growth Factor, ECE-1 - Endothelin Converting Enzyme 1, ET-1 - Endothelin 1, ETR $\alpha$  - Endothelin Rezeptor alpha, ETR $\beta$  - Endothelin Rezeptor beta, GAPDH - Glycer-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase, ITG $\beta$ 1 - Integrin  $\beta$ 1, MMP - Matrixmetalloproteinase, MT-1 MMP - Membrane Type 1 MMP, OPN - Osteopontin, TGF- $\beta$ 1 - Transforming Growth Factor  $\beta$ 1, TIIMP - Tissue Inhibitor of MMP.

## 4 Ergebnisse

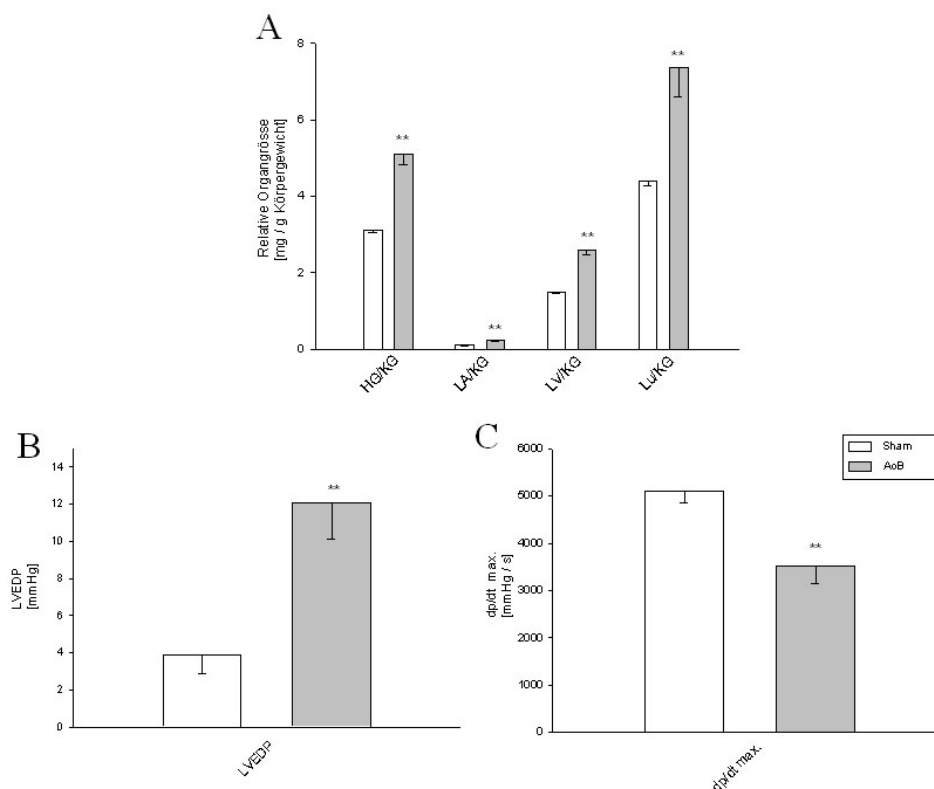
### 4.1 Organmorphologie, Echokardiographie und hämodynamische Daten

#### 4.1.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB

Druckbelastung in der AoB-Gruppe induzierte einen signifikanten Anstieg des relativen Herzgewichtes von  $3,11 \pm 0,1$  mg/g auf  $5,15 \pm 0,3$  mg/g. Das Gewicht des linken Vorhofs stieg von  $0,09 \pm 0,02$  mg/g auf  $0,22 \pm 0,09$  mg/g, des linken Ventrikels von  $1,49 \pm 0,2$  mg/g auf  $2,59 \pm 0,6$  mg/g. Das relative Lungengewicht betrug in der AoB-Gruppe  $7,36 \pm 3,4$  mg/g, was eine signifikante Erhöhung gegenüber der Sham-Gruppe ( $4,38 \pm 0,5$  mg/g) bedeutete (Abb. 4, A). Die Dicke der linksventrikulären Hinterwand betrug in der Sham-Gruppe  $0,99 \pm 0,03$  mm, in der AoB-Gruppe  $1,62 \pm 0,1$  mm und zeigte einen signifikanten Unterschied. Endsystolischer und enddiastolischer Diameter waren geringfügig kleiner als in der Sham-Gruppe, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion war mit  $88,78 \pm 2,3$  % in der AoB-Gruppe höher als in der Sham-Gruppe ( $83,17 \pm 1,7$  %,  $p < 0,05$ ), ebenso der systolische Blutdruck (Tab. 5). Druckbelastung durch AoB induzierte mit  $12,0 \pm 2,0$  mmHg einen deutlich höheren linksventrikulären enddiastolischen Druck als in der Sham-Gruppe ( $3,9 \pm 1,0$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit war durch AoB deutlich vermindert ( $3508,3 \pm 349$  mmHg/s vs. Sham:  $5096,9 \pm 251$  mmHg/s; Abb. 4, B und C). Insgesamt zeigte sich somit eine konzentrische Hypertrophie mit erhaltener systolischer Funktion.

	PW (mm)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)	LVEF (%)	Sys (mmHg)
<b>Sham</b>	$0,99 \pm 0,03$	$3,88 \pm 0,2$	$7,36 \pm 0,2$	$83,17 \pm 1,7$	$96,1 \pm 4,5$
<b>AoB</b>	$1,62 \pm 0,1^{**}$	$3,10 \pm 0,3$	$7,07 \pm 0,2$	$88,78 \pm 2,3^*$	$112,7 \pm 4,0^*$

**Tab. 5:** Dargestellt sind die echokardiographischen Daten der Gruppen Sham und AoB: Dicke der linksventrikulären Hinterwand (PW), linksventrikulärer endsystolischer (LVESD) und enddiastolischer (LVEDD) Diameter, linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie der systolische Blutdruck (Sys). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  Sham vs. AoB; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB.



**Abb. 4: A – Kardio-morphologische Daten der Gruppen Sham und AoB. Dargestellt sind relatives Herzgewicht (HG/KG), relatives Gewicht des linken Vorhofs (LA/KG) bzw. Ventrikels (LV/KG) sowie relatives Lungengewicht (Lu/KG). B/C – Hämodynamische Daten; LVEDP bedeutet linksventrikulärer enddiastolischer Druck, dp/dt max. bedeutet maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit. Die Sham-Gruppe ist als weißer, die AoB-Gruppe als grauer Balken dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB.**

#### 4.1.2 Veränderung bei Druckbelastung und gleichzeitiger Gabe des C-P4HI FG0041

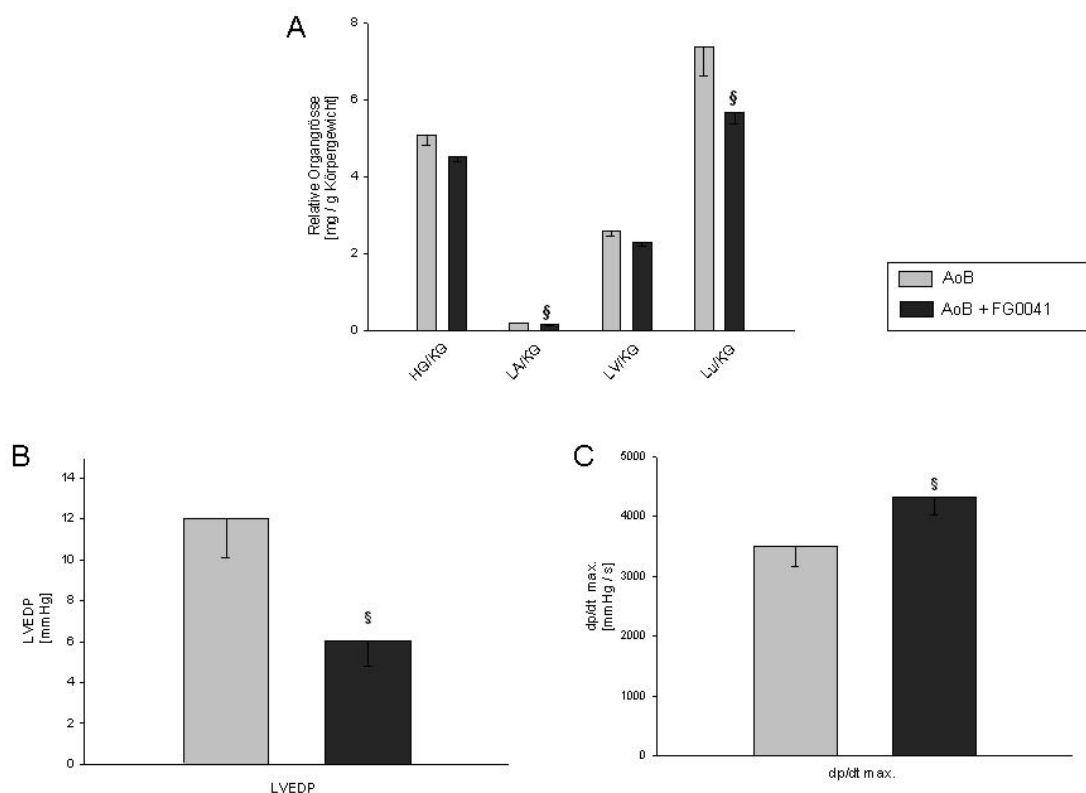
Die Gabe des C-P4HI FG0041 bewirkte keine signifikante Veränderung des relativen Herzgewichtes. Zwar senkte FG0041 den Quotienten HG/KG auf  $4,57 \pm 0,2$  mg/g, doch war dies kein signifikanter Unterschied zur AoB-Gruppe. Auch das Gewicht des linken Ventrikels zeigte unter FG0041 eine Tendenz zur Reduktion ( $2,31 \pm 0,4$  mg/g). Signifikant reduziert wurden die relativen Gewichte von linkem Vorhof ( $0,16 \pm 0,05$  mg/g) sowie der Lunge ( $5,68 \pm 1,2$  mg/g). Echokardiographisch zeigte sich auch unter FG0041-Medikation eine ähnlich verdickte Hinterwand wie in der AoB-Gruppe; es konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. LVESD und LVEDD zeigten bei Gabe von FG0041 eine Tendenz zur Reduktion. Die LVEF zeigte unter FG0041 eine Tendenz zur Steigerung auf  $92,16 \pm 1,9\%$ . FG0041B veränderte den systolischen Blutdruck nicht (Tab. 6).

Durch Gabe von FG0041 wurde der durch AoB gesteigerte LVEDP auf  $6,0 \pm 1,2$  mmHg gesenkt. Die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit konnte auf  $4325,3 \pm 294$  mmHg/s

gesteigert werden (Abb. 5, B und C). Somit ergaben sich Hinweise auf eine verbesserte systolische (dp/dt max.) und diastolische (Lu/KG, LVEDP) Funktion.

	PW (mm)	LVEDD (mm)	LVEDD (mm)	LV-EF (%)	Sys (mmHg)
<b>AoB</b>	1,62 ± 0,1	3,10 ± 0,3	7,07 ± 0,2	88,78 ± 2,3	112,7 ± 4,0
<b>AoB+FG0041</b>	1,65 ± 0,1	2,58 ± 0,3	6,61 ± 0,3	92,16 ± 1,9	117,8 ± 3,8

**Tab. 6: Echokardiographische Daten von AoB und der Medikationsgruppe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.**



**Abb. 5: A – Kardio-morphologische Daten von AoB und Medikationsgruppe FG0041. B/C – Hämodynamische Daten. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer, FG0041 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM; § p < 0,05 AoB vs. Medikationsgruppe.**

#### 4.1.3 Veränderung bei Druckbelastung und gleichzeitiger Gabe des HIF-P4HI FG2216

Im Vergleich zur AoB-Gruppe bewirkte FG2216 eine deutliche Steigerung des relativen Herzgewichtes auf  $6,23 \pm 0,2$  mg/g. Korrespondierend stieg das relative LV-Gewicht auf  $2,98 \pm 0,1$  mg/g. Die Gewichte des linken Vorhofs sowie der Lunge waren unter FG2216 unverändert ( $0,28 \pm 0,11$  mg/g bzw.  $8,89 \pm 1,1$  mg/g, p = n.s; Abb. 6, A). Bezüglich echokardiographischer Daten zeigte ausschließlich der LVEDD eine signifikante Veränderung gegenüber der AoB-Gruppe und sank auf  $6,11 \pm 0,2$  mm. Hinterwanddicke,

LVESD, LVEF und systolischer Blutdruck waren unverändert (Tab. 7). Ein Unterschied der hämodynamischen Parameter war nicht detektierbar. Der LVEDP stieg leicht auf  $15,1 \pm 2,8$  mmHg, die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit sank auf  $3094,1 \pm 430$  mmHg/s, jedoch waren beide Unterschiede aufgrund der großen Schwankungen nicht signifikant (Abb. 6, B und C). Insgesamt zeigte sich somit eine weiterhin bestehende konzentrische Hypertrophie mit eingeschränkter diastolischer Funktion.

	PW (mm)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)	LV-EF (%)	Sys
<b>AoB</b>	$1,62 \pm 0,1$	$3,10 \pm 0,3$	$7,07 \pm 0,2$	$88,78 \pm 2,3$	$112,7 \pm 4,0$
<b>AoB+FG2216</b>	$1,48 \pm 0,1$	$2,56 \pm 0,2$	$6,11 \pm 0,2$ §§	$90,91 \pm 2,1$	$105,2 \pm 8,7$

Tab. 7: Echokardiographische Daten von AoB und Medikationsgruppe FG2216. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; §§  $p < 0,01$  AoB vs. Medikationsgruppen.

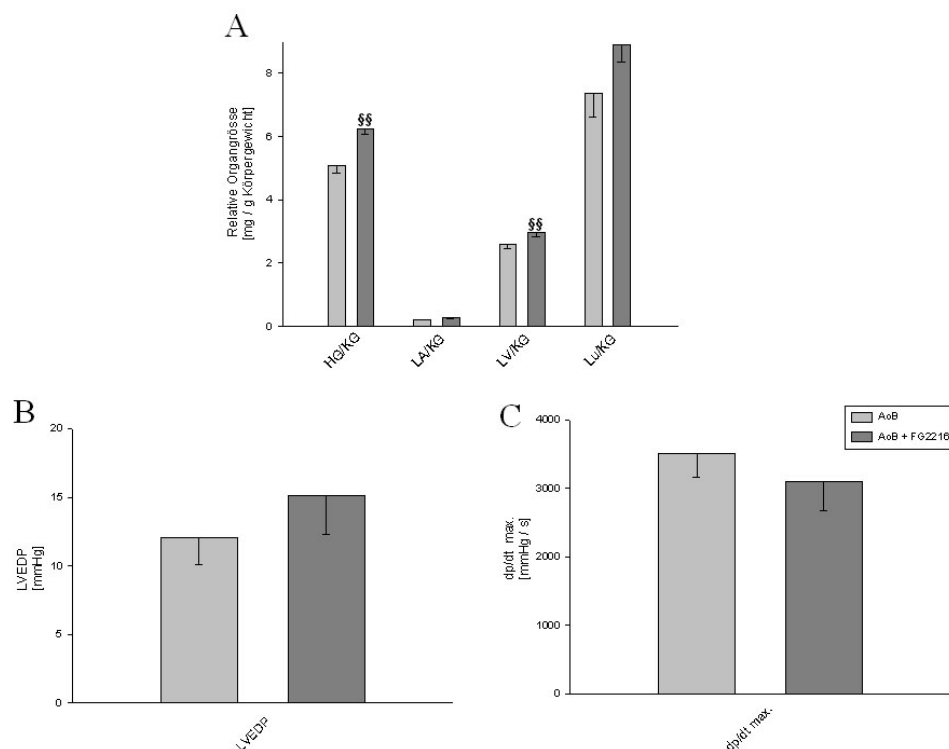


Abb. 6: A – Kardio-morphologische Daten von AoB und FG2216. B/C – Hämodynamische Daten. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer, FG2216 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; §§  $p < 0,01$  AoB vs. Medikationsgruppen.

## 4.2 Regulation der Wachstumsfaktoren TGF $\beta$ 1, CTGF, ITG $\beta$ 1, OPN, HIF1 und 2

### 4.2.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB

Die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1;  $251.8 \pm 41\%$ ), Connective Tissue Growth Factor (CTGF;  $1521.1 \pm 298\%$ ), Integrin  $\beta$ 1 (ITG $\beta$ 1;  $200.7 \pm 35\%$ ) und Osteopontin (OPN;  $805.0 \pm 216\%$ ) wurden durch Druckbelastung infolge AoB signifikant heraufreguliert ( $p$  jeweils  $< 0,01$ , Abb. 7A). HIF1 und HIF2 mRNA zeigten eine leicht erhöhte Expression mit einer signifikanten Steigerung von HIF2 auf das 1,3-fache ( $p < 0,05$ , Tab. 8). Der Anstieg der TGF $\beta$ 1-Expression war auf Proteinebene nicht signifikant. Die Proteinexpression von ITG $\beta$ 1 zeigte zwar im Mittelwert den gleichen Anstieg wie ITG $\beta$ 1 mRNA ( $187,0 \pm 31\%$ , Abb. 8), war jedoch aufgrund der höheren Streuung ebenfalls nicht signifikant (Abb. 7B). Unter Druckbelastung war somit die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren sowie von HIF2 erhöht.

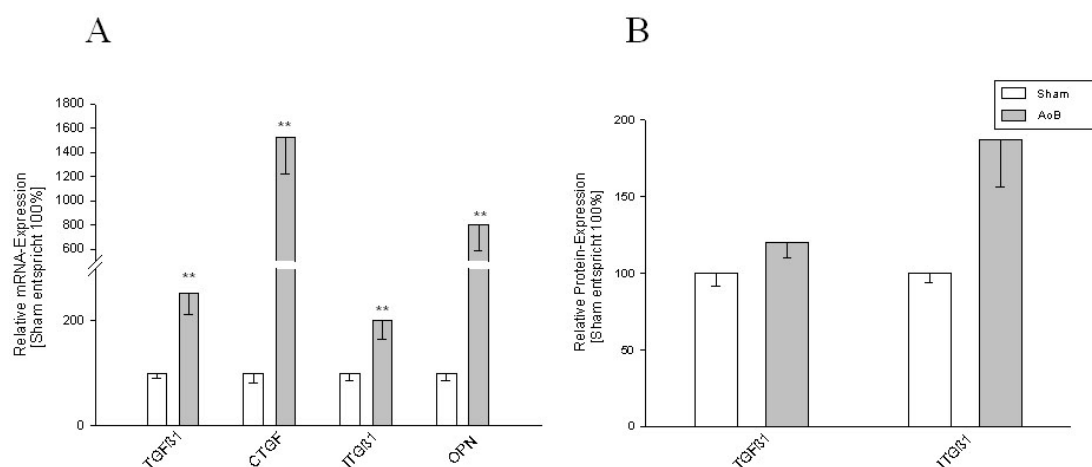
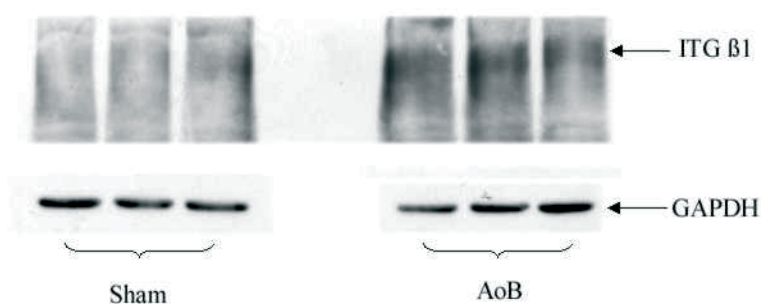


Abb. 7: Relative mRNA- und Proteinexpression von TGF $\beta$ 1, CTGF, ITG $\beta$ 1 und OPN. mRNA und Proteinexpression wurden in Bezug zu GAPDH Expression normalisiert. Der Mittelwert der Sham Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB. Die Sham Gruppe ist als weißer Balken, die AoB Gruppe als hellgrauer Balken dargestellt.

	HIF1	HIF2
Sham	100,0 $\pm$ 7	100,0 $\pm$ 7
AoB	133,8 $\pm$ 18	126,9 $\pm$ 13*

Tab. 8: Relative mRNA-Expression von HIF 1 und 2. Die Expression wurde in Bezug zur GAPDH-Expression normalisiert. Der Mittelwert der Sham-Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB-Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  Sham vs. AoB.



**Abb. 8: Western Blot des Proteins ITGβ1 zum Vergleich der Expression von Sham- und AoB-Tieren: In der oberen Ebene der Film des ITGβ1 Blots, links je 3 Proben der Sham-Gruppe, rechts je 3 Proben der AoB-Gruppe. Die AoB-Gruppe zeigt einen deutlichen Anstieg der optischen Dichte und somit des ITGβ1 Proteins. Untere Ebene: Western Blot der gleichen Membran nach Stripping zur Detektion von GAPDH: die Expression des Referenzproteins GAPDH war im Gegensatz zur erhöhten ITGβ1 Expression gleich. Es resultierte ein erhöhtes normalisiertes ITGβ1 Protein Niveau, im Vergleich zu Sham jedoch nicht signifikant.**

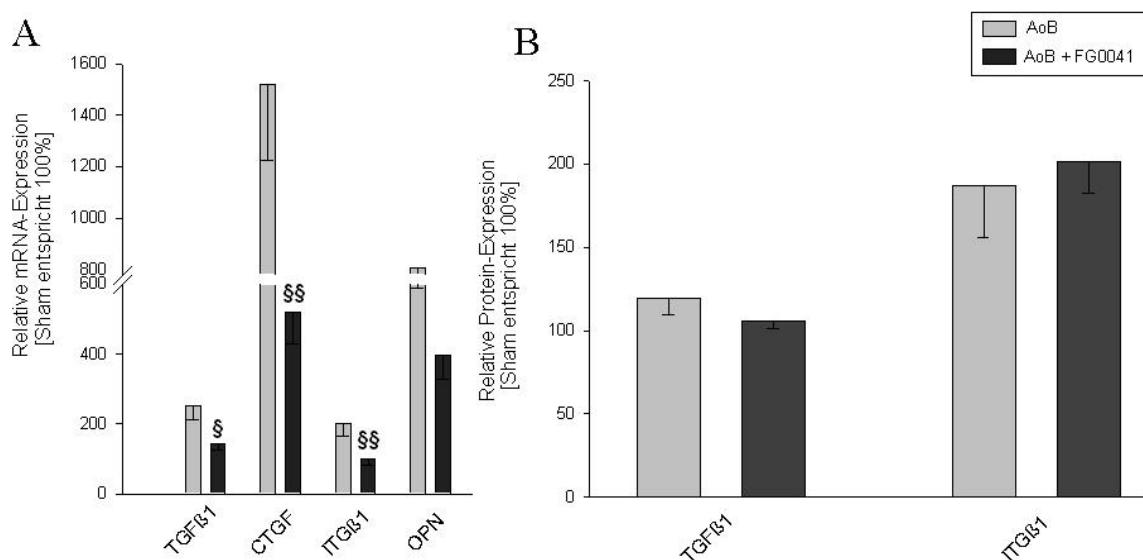
#### 4.2.2 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041

Die Gabe des C-P4HI FG0041 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch AoB induzierten mRNA Expression der Wachstumsfaktoren TGFβ1, CTGF und ITGβ1. TGFβ1 sank auf  $142.1 \pm 17\%$ , CTGF auf  $519.8 \pm 92\%$  und ITGβ1 auf  $101.1 \pm 19\%$  ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ). Die Reduktion der mRNA Expression von OPN erreichte keine Signifikanz (AoB:  $805.0 \pm 216\%$  vs. FG0041:  $397.6 \pm 70\%$ ; Abb. 9A). Die mRNA Expression von HIF1 und 2 war unter FG0041-Medikation unverändert (Tab. 9). Die Gabe des C-P4HI FG0041 hatte keinen Effekt auf die Proteinexpression von TGFβ1 und ITGβ1 (Abb. 9B). Insgesamt zeigte sich somit eine Reduktion der mRNA Expression der Wachstumsfaktoren, ein Effekt auf die HIF mRNA Expression bestand nicht.

	HIF1	HIF2
<b>AoB</b>	$133,8 \pm 18$	$126,9 \pm 13$
<b>AoB+FG0041</b>	$120,4 \pm 9$	$98,9 \pm 12$

**Tab. 9: Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von HIF1 und 2 in der AoB-Gruppe sowie unter FG0041 Medikation. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; §§  $p < 0,01$  AoB vs. Medikationsgruppe; §  $p < 0,05$  AoB vs. Medikationsgruppe. Weitere Details siehe Tab. 6.**





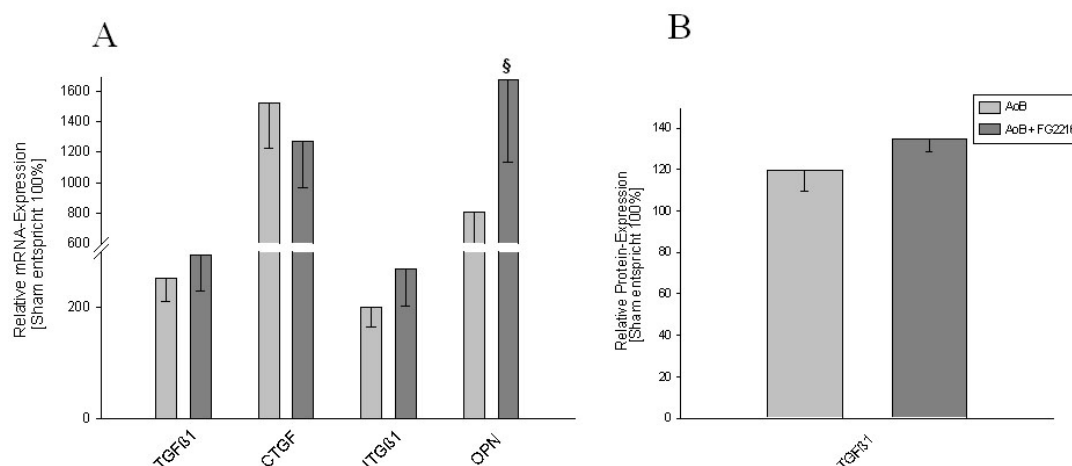
**Abb. 9: Relative mRNA- und Proteinexpression von TGFβ1, CTGF, ITGβ1 und OPN in der AoB-Gruppe sowie unter FG0041 Medikation. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM; §§ p < 0,01 AoB vs. Medikationsgruppe; § p < 0,05 AoB vs. Medikationsgruppe. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, FG0041 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 7.**

#### 4.2.3 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216

Durch Gabe des HIF-P4HI FG2216 ergab sich keine signifikante Reduktion der erhöhten mRNA Expressionsniveaus der Wachstumsfaktoren. FG2216 erhöhte signifikant das induzierte mRNA Niveau von OPN auf  $1674.2 \pm 540\%$ . Dieser Trend zeigte sich ebenfalls bei TGFβ1 und ITGβ1 mRNA (Abb. 10) sowie TGFβ1 Protein (Abb. 10B), war hier jedoch nicht signifikant. HIF1 und 2 mRNA zeigten eine etwa 2-fach erhöhte Expression, jedoch war diese nicht signifikant gegenüber der AoB-Gruppe (Tab. 10).

	HIF1	HIF2
<b>AoB</b>	$133,8 \pm 18$	$126,9 \pm 13$
<b>AoB+FG2216</b>	$217,8 \pm 38$	$285,0 \pm 66$

**Tab. 10: Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von HIF1 und 2 in der AoB- und FG2216-Gruppe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.**



**Abb. 10: Relative mRNA (A)- und Proteinexpression (B) von TGFβ1, CTGF, ITGB1 sowie OPN in der AoB-Gruppe sowie unter FG2216 Medikation. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM; § p < 0,05 AoB vs. FG2216. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, FG2216 dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 7.**

### 4.3 Regulation von Komponenten der extrazellulären Matrix

#### 4.3.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB

Bezüglich der mRNA-Expression der Matrix Metalloproteinasen (MMP) zeigte MMP2 mit einem 2,7-fachen Anstieg im Vergleich zur Sham Gruppe die deutlichste Regulation durch Druckbelastung. MT1-MMP, MMP8 und MMP9 waren um etwa das 2-fache heraufreguliert ( $p$  jeweils < 0,05). Die endogenen Inhibitoren der MMPs, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen, TIMPs, zeigten bezüglich mRNA Expression im Hinblick auf Typ 1 und 2 ebenfalls einen deutlichen Anstieg auf das 7- bzw. 2-fache des Sham Ausgangsniveaus ( $p$  < 0,05). Die Genexpression von TIMP3 und 4 war hingegen unverändert. (Abb. 11A). Diese Veränderung resultierte in einem verminderten MMP-TIMP-Quotienten zwischen MMP2 und TIMP1 mRNA (Sham:  $1,121 \pm 0,1$  vs. AoB:  $0,535 \pm 0,1$ ;  $p$  < 0,05) sowie MMP9 und TIMP1 mRNA (Sham:  $1,223 \pm 0,3$  vs. AoB:  $0,471 \pm 0,1$ ;  $p$  < 0,05). Deutlich erhöht hingegen war der Quotient zwischen MMP2 und TIMP3 mRNA (Sham:  $1,459 \pm 0,2$  vs. AoB:  $3,386 \pm 0,6$ ;  $p$  < 0,05) sowie TIMP4 mRNA (Sham:  $1,377 \pm 0,2$  vs. AoB:  $4,220 \pm 0,6$ ;  $p$  < 0,05).

Entsprechend der mRNA Regulation zeigte die Messung von MMP2 Protein einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Sham Gruppe um das 1,6-fache. MMP1 Protein wurde sowohl in der latenten als auch in der aktiven Form herunterreguliert. TIMP1 (Abb. 11, B), TIMP3 und 4 präsentierten auf Proteinebene einen deutlichen Abfall der Expression, am stärksten sichtbar bei TIMP4 auf ein Drittel der Ausgangsexpression in der Sham-Gruppe (Tab. 11, A). Im Gegensatz zum mRNA MMP-TIMP-Quotienten stieg der MMP2 - TIMP1

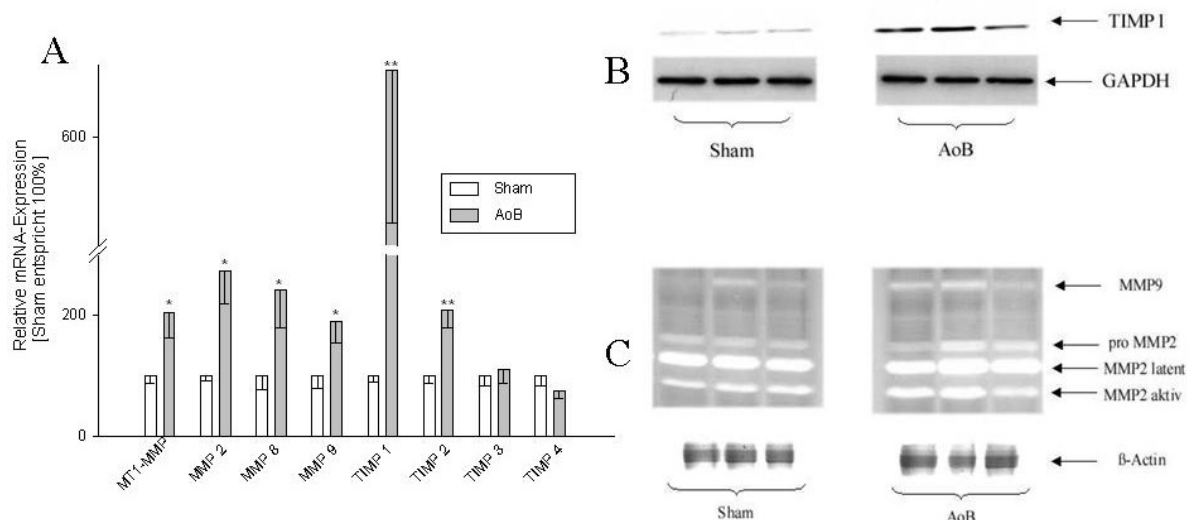
Quotient des Proteins an (Sham:  $1,011 \pm 0,1$  vs. AoB:  $2,745 \pm 0,3$ ;  $p < 0,05$ ). Die Quotienten MMP2 – TIMP3 (Sham:  $1,134 \pm 0,1$  vs. AoB:  $2,531 \pm 0,5$ ;  $p < 0,05$ ) und MMP2 - TIMP4 (Sham:  $2,342 \pm 0,8$  vs. AoB:  $19,339 \pm 6,4$ ;  $p < 0,05$ ) zeigten eine deutliche Induktion. Ebenfalls erhöht war der Quotient zwischen MMP1 latent/aktiv - TIMP4 (latent – Sham:  $1,636 \pm 0,3$  vs. AoB:  $7,289 \pm 2,2$ ; aktiv – Sham:  $1,380 \pm 0,2$  vs. AoB:  $4,702 \pm 1,3$ ; beide  $p < 0,05$ ).

Eine erhöhte Enzymaktivität ließ sich für alle drei zu messenden Formen von MMP2 – pro-Form, latentes und aktives MMP2 – sowie für MMP9 messen. Die Steigerung der Aktivität entsprach hierbei etwa der Steigerung der mRNA- bzw. Proteinexpression auf das 2-fache (Abb. 11C; Tab. 11B). Entsprechend der Proteinregulation zeigte sich bei Bildung des MMP2 – TIMP1 Quotienten bezüglich aller drei Aktivitätsformen von MMP2 eine Steigerung gegenüber der Sham-Gruppe (proMMP2 - Sham:  $1,094 \pm 0,1$  vs. AoB:  $4,112 \pm 0,6$ ; MMP2 latent – Sham:  $1,089 \pm 0,1$  vs. AoB:  $3,454 \pm 0,5$ ; MMP2 aktiv – Sham:  $1,079 \pm 0,1$  vs. AoB:  $3,568 \pm 0,4$ ; alle  $p < 0,05$ ). Der MMP9 – TIMP1 – Quotient zeigte ebenfalls eine signifikante Heraufregulation (Sham:  $1,084 \pm 0,1$  vs. AoB:  $3,921 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Weiterhin waren die Quotienten MMP2 – TIMP3, MMP9 – TIMP3, MMP2 – TIMP4 und MMP9 – TIMP4 hochreguliert (Daten nicht gezeigt).

A	MMP1 latent	MMP1 aktiv	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4
Sham	$100,0 \pm 10$	$100,0 \pm 14$	$100,0 \pm 5$	$100,0 \pm 8$	$100,0 \pm 11$	$100,0 \pm 19$
AoB	$72,5 \pm 5^*$	$58,1 \pm 5^*$	$159,1 \pm 21^*$	$57,9 \pm 6^{**}$	$70,5 \pm 5^*$	$32,2 \pm 9^*$

B	proMMP2	MMP2 latent	MMP2 aktiv	MMP9
Sham	$100,0 \pm 4$	$100,0 \pm 3$	$100,0 \pm 5$	$100,0 \pm 6$
AoB	$176,2 \pm 17^{**}$	$189,5 \pm 17^{**}$	$211,4 \pm 22^{**}$	$201,8 \pm 25^{**}$

Tab. 11: Dargestellt ist die relative Proteinexpression (A) sowie Enzymaktivität (B) von Matrix Metalloproteinase (MMP) 1 latente und aktive Form, MMP2 pro-, latente- und aktive Form, MMP9 sowie Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (TIMP) 1 bis 4. Die Proteinexpression wurde in Bezug zu GAPDH-Expression, die Aktivität in Bezug zu  $\beta$ -Actin normalisiert. Der Mittelwert der Sham-Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzelwerte der Sham- und AoB-Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB; \*  $p < 0,05$  Sham vs. AoB.



**Abb. 11: A - Relative mRNA-Expression von Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP), MMP2, MMP8, MMP9 sowie Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (TIMP) 1 bis 4. Die Expression wurde in Bezug zur GAPDH-Expression normalisiert. Der Mittelwert der Sham-Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB-Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB; \*  $p < 0,05$  Sham vs. AoB. Die Sham Gruppe ist als weißer Balken, die AoB Gruppe als hellgrauer Balken dargestellt. B - Western Blot des Proteins TIMP1 zum Vergleich der Expression von Sham- und AoB-Tieren: In der oberen Ebene der Film des TIMP1 Blots, links je 3 Proben der Sham-Gruppe, rechts je 3 Proben der AoB-Gruppe. Untere Ebene: Western Blot der gleichen Membran nach Stripping zur Detektion von GAPDH. C - Zymographie zur Messung der Enzymaktivität der Gelatinasen MMP2 und 9: In der oberen Ebene eingescanntes Gelatine-Gel nach Fixation, links je 3 Proben der Sham-Gruppe, rechts je 3 Proben der AoB-Gruppe. Untere Ebene: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel zur Messung von  $\beta$ -Actin; die Expression des Referenzproteins  $\beta$ -Actin war nahezu unverändert. Es resultierte ein erhöhtes Niveau der normalisierten Enzymaktivitäten.**

#### 4.3.2 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041

Durch Gabe des C-P4HI FG0041 zeigte sich tendenziell eine Reduktion der MMP mRNA. MMP2 wurde signifikant herabreguliert ( $127,4 \pm 10,0\%$ ,  $p < 0,01$ ). TIMP mRNA zeigte unter Gabe von FG0041 eine deutliche Reduktion auf das 3- (TIMP1) bzw. 1,2-fache (TIMP2) im Vergleich zur Sham-Gruppe ( $p < 0,05$ ). TIMP3 und 4 waren unverändert gegenüber AoB (Abb. 12). Hieraus resultierend zeigte sich in den MMP-TIMP-Quotienten zwar eine Tendenz zur Verminderung gegenüber AoB, die jedoch in keiner MMP-TIMP-Kombination signifikant war (Daten nicht gezeigt).

Die Proteinexpression von MMP1 (latente und aktive Form) zeigte zwar eine Tendenz zur Reduktion unter FG0041, die jedoch nicht signifikant war. MMP2 Protein veränderte sich im Vergleich zur AoB-Gruppe nicht. TIMP1 Protein veränderte sich wie auch TIMP3 unter

FG0041 nicht. TIMP4 Protein zeigte unter FG0041 einen Trend zur Heraufregulation (Tab. 12A). Bezüglich des MMP-TIMP-Quotienten zeigte sich bei der Proteinexpression keine Veränderung der MMP2-TIMP(1, 2, 4)-Quotienten, welche unter AoB bereits erhöht waren. Eine deutliche Reduktion entstand unter FG0041-Medikation im Hinblick auf die Quotienten MMP1 (latent) – TIMP4 (AoB:  $7,289 \pm 2,2$  vs. FG0041:  $2,179 \pm 0,6$ ,  $p < 0,05$ ), MMP1 (aktiv) – TIMP4 (AoB:  $4,702 \pm 1,3$  vs. FG0041:  $1,536 \pm 0,4$ ,  $p < 0,05$ ) sowie der unter AoB jedoch unveränderte Quotient MMP1 (latent) – TIMP1 (AoB:  $1,385 \pm 0,1$  vs. FG0041:  $0,819 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$ ).

Die Enzymaktivität veränderte sich nach Gabe von FG0041 nicht signifikant gegenüber der AoB-Gruppe in allen 4 gemessenen Enzymformen (Tab. 12B). Es ließ sich kein veränderter MMP-TIMP-Quotient in der Aktivitätsmessung feststellen (Daten nicht gezeigt).

A	MMP1 latent	MMP1 aktiv	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4
<b>AoB</b>	$72,5 \pm 5$	$58,1 \pm 5$	$159,1 \pm 21$	$57,9 \pm 6$	$70,5 \pm 5$	$32,2 \pm 9$
<b>AoB+FG0041</b>	$60,9 \pm 7$	$50,0 \pm 7$	$152,4 \pm 33$	$74,3 \pm 6$	$73,6 \pm 7$	$52,3 \pm 12$

B	proMMP2	MMP2 latent	MMP2 aktiv	MMP9
<b>AoB</b>	$176,2 \pm 17$	$189,5 \pm 17$	$211,4 \pm 22$	$201,8 \pm 25$
<b>AoB+FG0041</b>	$154,7 \pm 24$	$167,1 \pm 26$	$170,7 \pm 33$	$163,0 \pm 32$

Tab. 12: Dargestellt ist die relative Proteinexpression (A) sowie Enzymaktivität (B) von MMP 1 latente und aktive Form, MMP2 pro-, latente- und aktive Form, MMP9 sowie TIMP 1 bis 4 in den Gruppen AoB und FG0041-Medikation. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Weitere Details siehe Tab. 11.

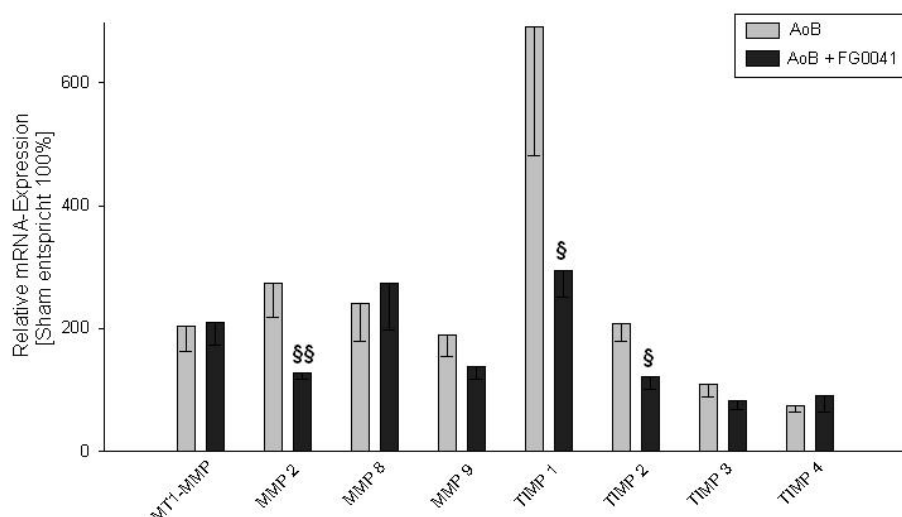


Abb. 12: Relative mRNA-Expression von MT1-MMP, MMP2, MMP8, MMP9 sowie TIMP1 bis 4 in den Gruppen AoB und FG0041-Medikation. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; §§  $p < 0,01$  AoB vs. Medikationsgruppe; §  $p < 0,05$  AoB vs. Medikationsgruppe. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, AoB + FG0041 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 11.

### 4.3.3 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216

Durch Applikation des HIF-P4HI FG2216 zeigte sich eine teilweise hochsignifikante Hochregulation der mRNA-Expression der MMPs. Insbesondere MT1MMP und MMP9 stiegen hierbei auf das 6,5- bzw. 5-fache des Sham-Ausgangswertes. Die MMP2 und MMP8 Expression stieg zwar ebenfalls merkbar an, war aber gegenüber der AoB-Gruppe nicht signifikant. Derselbe Trend ließ sich bezüglich der TIMP mRNA feststellen. Hierbei zeigte sich bei der TIMP1-Expression eine Erhöhung auf das 11,5-fache des Ausgangswertes, diese Veränderung war aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. TIMP2 bis 4 zeigten dieselbe Tendenz (Abb. 13). Somit resultierten deutlich erhöhte MMP-TIMP-Quotienten, die sich insbesondere bei MMP2-TIMP3 (AoB:  $3,386 \pm 0,6$  vs. FG2216:  $9,126 \pm 4,4$ ,  $p < 0,05$ ) sowie MMP9-TIMP3 (AoB:  $2,594 \pm 0,8$  vs. FG2216:  $9,086 \pm 3,5$ ,  $p < 0,05$ ) zeigten. Die jeweiligen MMP-TIMP4-Quotienten waren ebenfalls tendenziell erhöht (Daten nicht gezeigt).

Die Proteinexpression der MMPs und TIMPs zeigte eine Übereinstimmung mit der mRNA-Expression. Insbesondere bei der latenten und aktiven Form von MMP1 wurde eine signifikante Steigerung der Expression auf das Niveau der Sham-Gruppe (im Vergleich zur AoB-Gruppe) gefunden. TIMP1 Protein war gegenüber der AoB-Gruppe signifikant heraufreguliert, TIMP3 und 4 zeigten dieselbe Tendenz (Tab. 13A). Insbesondere bei den MMP-TIMP-Quotienten zeigte sich nun eine Normalisierung bzw. Reduktion zuvor erhöhter Quotienten. Hierbei wurden die Quotienten MMP1 (latent) – TIMP4 (AoB:  $7,289 \pm 2,2$  vs. FG2216:  $2,004 \pm 0,5$ ,  $p < 0,05$ ), MMP2 – TIMP1 (AoB:  $2,745 \pm 0,3$  vs. FG2216:  $0,565 \pm 0,1$ ,  $p < 0,05$ ), MMP2 – TIMP3 (AoB:  $2,531 \pm 0,5$  vs. FG2216:  $1,086 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ) sowie MMP2 – TIMP4 (AoB:  $19,339 \pm 6,4$  vs. FG2216:  $2,852 \pm 1,5$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur AoB-Gruppe reduziert. Weiterhin wurden die Quotienten MMP1 (latent) – TIMP1 sowie MMP1 (aktiv) – TIMP1 herabreguliert. Übrige MMP-TIMP-Quotienten zeigten ebenfalls tendenziell eine Herabregulation (Daten nicht gezeigt).

Die Enzymaktivität von proMMP2 nahm im Vergleich zur AoB-Gruppe signifikant zu. MMP2 latente und aktive Form sowie MMP9 zeigten dieselbe Tendenz, waren aber nicht signifikant (Tab. 13B). Aufgrund des proportional höheren TIMP1-Proteins resultierte ein signifikant erniedrigter Quotient zu TIMP1 bei proMMP2 (AoB:  $4,112 \pm 0,6$  vs. FG2216:  $1,710 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ), MMP2 latent (AoB:  $3,454 \pm 0,5$  vs. FG2216:  $1,382 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ), MMP2 aktiv (AoB:  $3,568 \pm 0,4$  vs. FG2216:  $1,381 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ) sowie MMP9 (AoB:  $3,921 \pm 0,6$  vs. FG2216:  $1,418 \pm 0,2$ ,  $p < 0,05$ ). Auch Quotienten zu TIMP4 wurden deutlich im

Vergleich zur AoB-Gruppe reduziert, waren aber aufgrund der Schwankungen beider Gruppen nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

A	MMP1 latent	MMP1 aktiv	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4
<b>AoB</b>	72,5 ± 5	58,1 ± 5	159,1 ± 21	57,9 ± 6	70,5 ± 5	32,2 ± 9
<b>AoB+FG2216</b>	100,5 ± 12 <sup>§</sup>	93,0 ± 15 <sup>§</sup>	92,5 ± 10	179,9 ± 19 <sup>§§</sup>	83,6 ± 7	66,5 ± 14

B	proMMP2	MMP2 latent	MMP2 aktiv	MMP9
<b>AoB</b>	176,2 ± 17	189,5 ± 17	211,4 ± 22	201,8 ± 25
<b>AoB+FG2216</b>	234,4 ± 37 <sup>§</sup>	231,3 ± 32	290,8 ± 41	251,2 ± 46

Tab. 13: Dargestellt ist die relative Proteinexpression (A) sowie Enzymaktivität (B) von MMP 1 latente und aktive Form, MMP2 pro-, latente- und aktive Form, MMP9 sowie TIMP 1 bis 4 in den Subgruppen AoB und FG2216. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM; §§ p < 0,01 AoB vs. FG2216; § p < 0,05 AoB vs. FG2216. Weitere Details siehe Tab. 11.

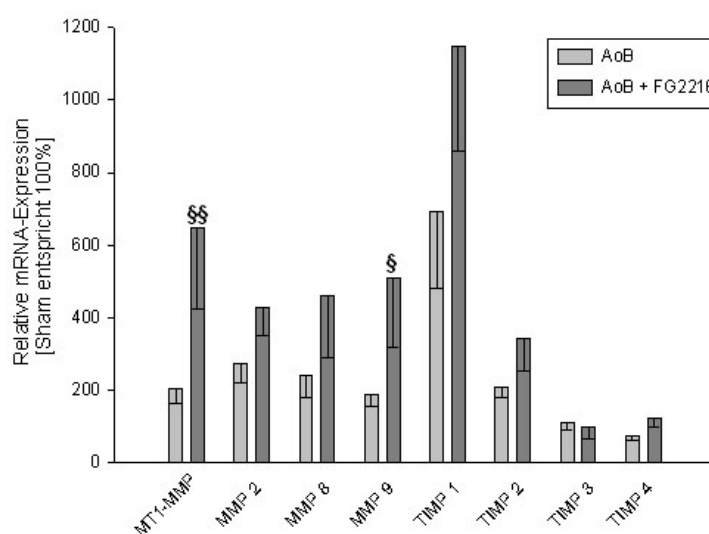


Abb. 13: Relative mRNA-Expression von MT1-MMP, MMP2, MMP8, MMP9 sowie TIMP1 bis 4 in den Subgruppen AoB und FG2216. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM; §§ p < 0,01 AoB vs. FG2216; § p < 0,05 AoB vs. FG2216. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, AoB + FG2216 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 11.

## 4.4 Regulation von Kollagen Typ I und III

### 4.4.1 Identifikation der Kollagene im Western-Blot

Um die Kollagen-Banden im Western Blot eindeutig zu identifizieren, wurde ein Kollagenase-Verdau durchgeführt, da der Antikörper gegen Kollagen I und III unspezifische

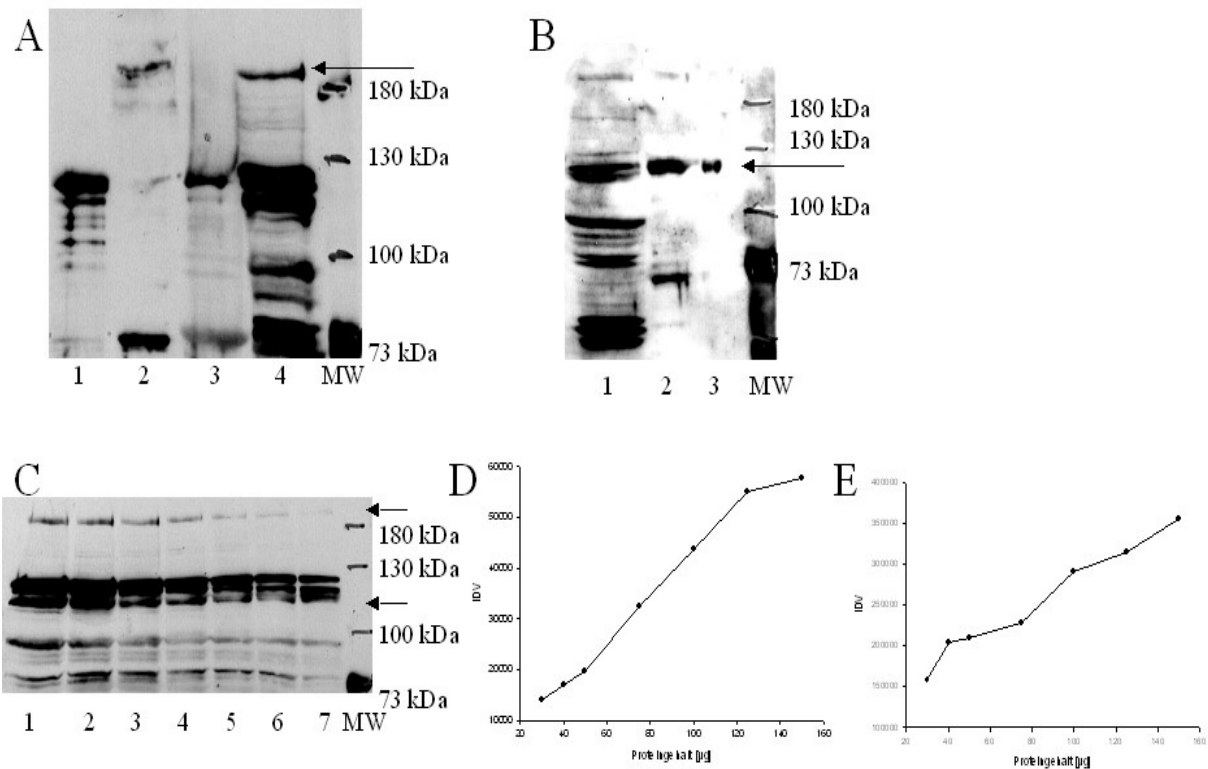
Banden, insbesondere im Bereich zwischen ca. 73 und ca. 130 kDa, zeigte (Abb. 14A). Durch Zusatz von Kollagenase verschwand die Bande bei 210 kDa, andere Banden wurden stark abgeschwächt. Es traten vermehrt Banden zwischen ca. 130 und 100 kDa bei der Positiv-Kontrolle auf (Abb. 14A, Slot 1 und 3). Es handelte sich bei der Bande bei ca. 210 kDa somit eindeutig um Kollagen Typ I, da das Protein durch die Kollagenase degradiert wurde und somit nicht mehr zu detektieren war. Die Größe von 210 kDa entsprach der Größe von Kollagen I. Die Banden zwischen 130 und 100 kDa entsprachen am ehesten Kollagen-Spaltprodukten, da diese nach dem Verdau vermehrt auftraten.

Bezüglich Kollagen III zeigte sich bei der unverdauten Protein-Probe dasselbe Bild wie im Kollagen I Blot. Eine Bande bei ca. 130 kDa (entsprechend dem Molekulargewicht von Kollagen III) wurde durch Kollagenase-Verdau stark abgeschwächt (Abb. 14B, Slot 1 und 2). Die Kollagen III Positiv-Kontrolle zeigte keinerlei unspezifische Banden und erlaubte eine eindeutige Zuordnung des Proteins (Abb. 14A, Slot 3). Der Unterschied der Bandenauflösung zwischen Kollagen Typ I und III ließ sich durch die höhere Spezifität der Kollagenase-I für Kollagen Typ I erklären (Kollagen I > Kollagen II > Kollagen III). Eine anschließend angefertigte Verdünnungsreihe einer Protein-Probe (150µg – 30µg; Abb. 14C) und Auswertung der zuvor ermittelten Banden zeigte eine annähernd lineare Beziehung der Banden-Intensität von Kollagen I und III zur eingesetzten Protein-Menge (Abb. 14D und E). Somit konnten Kollagen I und III mit Hilfe des Kollagenase-Verdau eindeutig identifiziert werden.

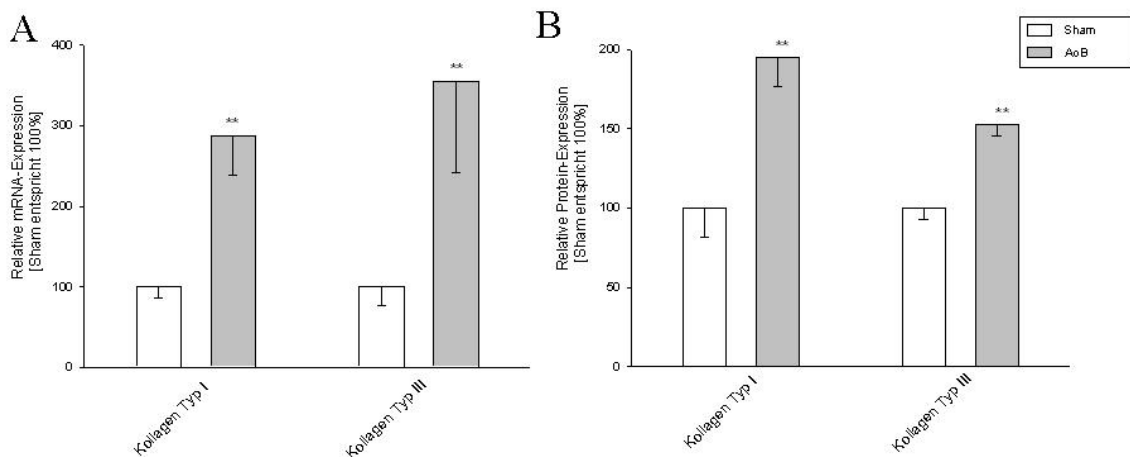
#### *4.4.2 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB*

Die mRNA-Expression von Kollagen Typ I und III wurden durch Druckbelastung infolge AoB signifikant heraufreguliert ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ). Kollagen Typ III zeigte einen leicht höheren Anstieg (3,5-fach) als Kollagen Typ I (3-fach) (Abb. 15A). Der Anstieg der Proteinexpression der Kollagene auf Proteinebene war ebenfalls signifikant (Kollagen I: 2-fach, Kollagen III 1,5-fach;  $p < 0,01$ , Abb. 15B).





**Abb. 14: Western-Blots zur Identifikation von Kollagen Typ I und III mittels Kollagenase-Verdau. A:** Etablierung von Kollagen I; Slot 4 zeigt das Ergebnis von 100µg einer Protein-Probe vor Kollagenase-Verdau. In Slot 3 wurde bei derselben Probe ein Kollagenase-Verdau durchgeführt. Die Bande bei 210 kDa verschwindet, es treten mehrere Banden unter 130 kDa auf. Slot 2 zeigt 30µg Kollagen Typ I Positiv-Kontrolle mit 2 Banden bei 210 und ca. 75 kDa vor Kollagenase-Verdau. Slot 1 zeigt 30µg Kollagen I Positiv-Kontrolle nach Kollagenase-Verdau. **B:** Slot 1 zeigt 100µg Protein-Probe vor Kollagenase-Verdau, Slot 2 100µg Protein-Probe nach Kollagenase-Verdau, Slot 3 30µg Kollagen III ohne Kollagenase-Verdau. **C:** Verdünnungsreihe (Slot 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.

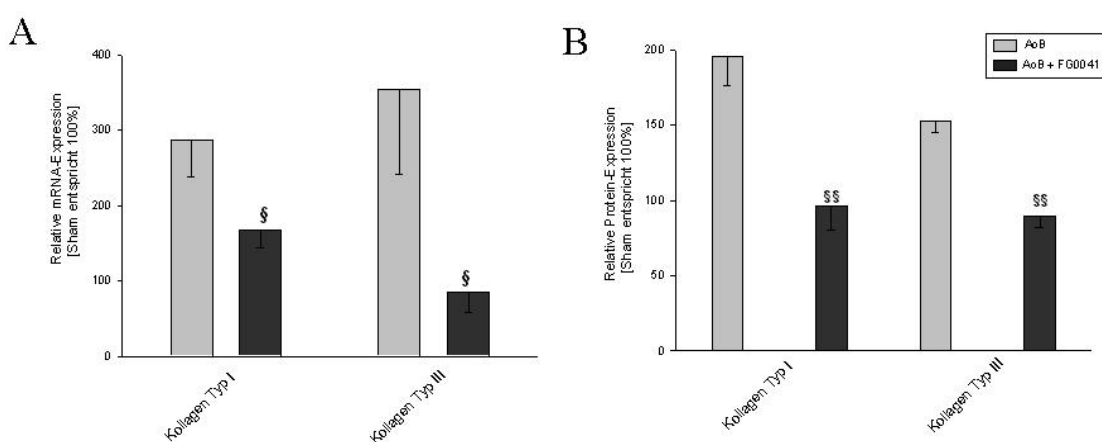


**Abb. 15: Relative mRNA (A)- und Proteinexpression (B) von Kollagen Typ I und III. Der Mittelwert der Sham Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB; \*  $p <$**

**0,05 Sham vs. AoB. Die Sham Gruppe ist als weißer Balken, die AoB Gruppe als hellgrauer Balken dargestellt.**

#### 4.4.3 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des C-P4HI FG0041

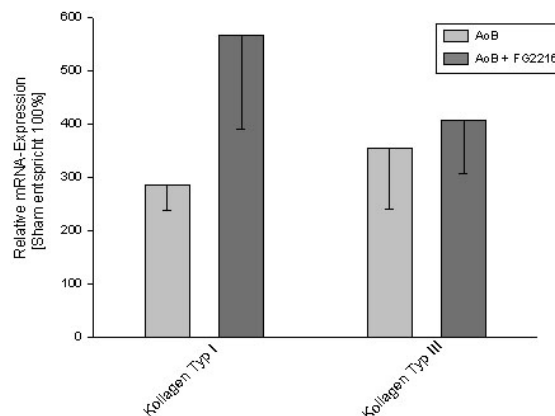
Die Gabe des C-P4HI FG0041 führte zu einer signifikanten Reduktion der durch AoB induzierten mRNA Expression der Kollagene Typ I und III. (Abb. 16A). Derselbe Effekt spiegelte sich in der Proteinexpression von Kollagen I und III wider, beide Kollagen-Typen waren in der Gruppe FG0041 signifikant gegenüber der AoB-Gruppe vermindert (Abb. 16B).



**Abb. 16: Relative mRNA-(A) und Protein-(B) Expression von Kollagen Typ I und III in der AoB- und C-P4HI Medikationsgruppe. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; §§  $p < 0,01$  AoB vs. Medikationsgruppen; §  $p < 0,05$  AoB vs. Medikationsgruppe. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, AoB + FG0041 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 15.**

#### 4.4.4 Einfluss auf mRNA- und Proteinexpression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216

Durch Gabe des HIF-P4HI FG2216 ergab sich keine signifikante Regulation der erhöhten mRNA Expressionsniveaus der Kollagene gegenüber der AoB-Gruppe, es zeigte sich jedoch ein Trend zur Steigerung der Expression (Abb. 17). Aufgrund Materialmangels wurde die Proteinexpression nicht untersucht.



**Abb. 17:** Relative mRNA-Expression von Kollagen I und III in den Subgruppen AoB und FG2216. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die AoB-Gruppe ist als hellgrauer Balken, AoB + FG2216 als dunkelgrauer Balken dargestellt. Weitere Details siehe Abb. 15.

## 4.5 Regulation der Hormone und Rezeptoren des Endothelin- und Angiotensinsystems

### 4.5.1 Veränderung durch Druckbelastung mittels AoB

Endothelin 1 zeigte in der AoB-Gruppe eine Erhöhung der mRNA-Expression auf  $308.3 \pm 95\%$  gegenüber der Sham-Gruppe. Endothelin Converting Enzyme 1 mRNA war mit  $177.0 \pm 30\%$  gegenüber Sham ebenfalls signifikant verändert. Die Genexpression der Endothelin-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  war auf  $192.3 \pm 31\%$  (ETR $\alpha$ ) bzw.  $231.1 \pm 47\%$  (ETR $\beta$ ) heraufreguliert. Bezüglich des Renin-Angiotensin-Systems zeigte der Angiotensin II Rezeptor Typ 1 einen Anstieg auf  $181.6 \pm 31\%$  (p jeweils  $< 0,05$ ; Tab. 14).

	ET1	ECE1	ETR $\alpha$	ETR $\beta$	AT1
Sham	100.0 $\pm$ 16	100.0 $\pm$ 13	100.0 $\pm$ 9	100.0 $\pm$ 22	100.0 $\pm$ 15
AoB	308.3 $\pm$ 95 *	177.0 $\pm$ 30 *	192.3 $\pm$ 31 *	231.1 $\pm$ 47 *	181.6 $\pm$ 31 *

**Tab. 14:** Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von Endothelin-1 (ET1), Endothelin Converting Enzyme 1 (ECE1), Endothelin Rezeptor alpha (ETR  $\alpha$ ), Endothelin Rezeptor beta (ETR  $\beta$ ) und Angiotensin II Rezeptor Typ 1 (AT1). Die mRNA-Expression wurde in Bezug zur GAPDH-Expression normalisiert. Der Mittelwert der Sham-Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB-Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \* p  $< 0,05$  Sham vs. AoB.

### 4.5.2 Einfluss auf mRNA-Expression durch Gabe des C-P4HI FG0041

Die Gabe des C-P4HI FG0041 bewirkte hinsichtlich der Expression von ECE1 ( $105.9 \pm 10\%$ ) sowie von ETR $\beta$  ( $91.2 \pm 24\%$ ) eine signifikante Reduktion auf die Ausgangswerte vor AoB

( $p < 0,05$ ). Auch ET1 zeigte eine Tendenz zur Herunterregulation ( $183.4 \pm 28$ ,  $p = \text{n.s.}$ ). AT1 ( $161.2 \pm 24\%$ ) sowie ETR $\alpha$  ( $149.4 \pm 18\%$ ) waren gegenüber der AoB-Gruppe nicht signifikant verändert (Tab. 15).

	ET1	ECE1	ETR $\alpha$	ETR $\beta$	AT1
<b>AoB</b>	308.3 $\pm$ 95	177.0 $\pm$ 30	192.3 $\pm$ 31	231.1 $\pm$ 47	181.6 $\pm$ 31
<b>AoB+FG0041</b>	183.4 $\pm$ 28	105.9 $\pm$ 10 <sup>s</sup>	149.4 $\pm$ 18	91.2 $\pm$ 24 <sup>s</sup>	161.2 $\pm$ 24

**Tab. 15:** Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von ET1, ECE1, ETR  $\alpha$  und  $\beta$  sowie AT1 in AoB und FG0041. §  $p < 0,05$  AoB vs. Medikationsgruppe. Weitere Details siehe Tab. 14.

#### 4.5.3 Einfluss auf mRNA-Expression durch Gabe des HIF-P4HI FG2216

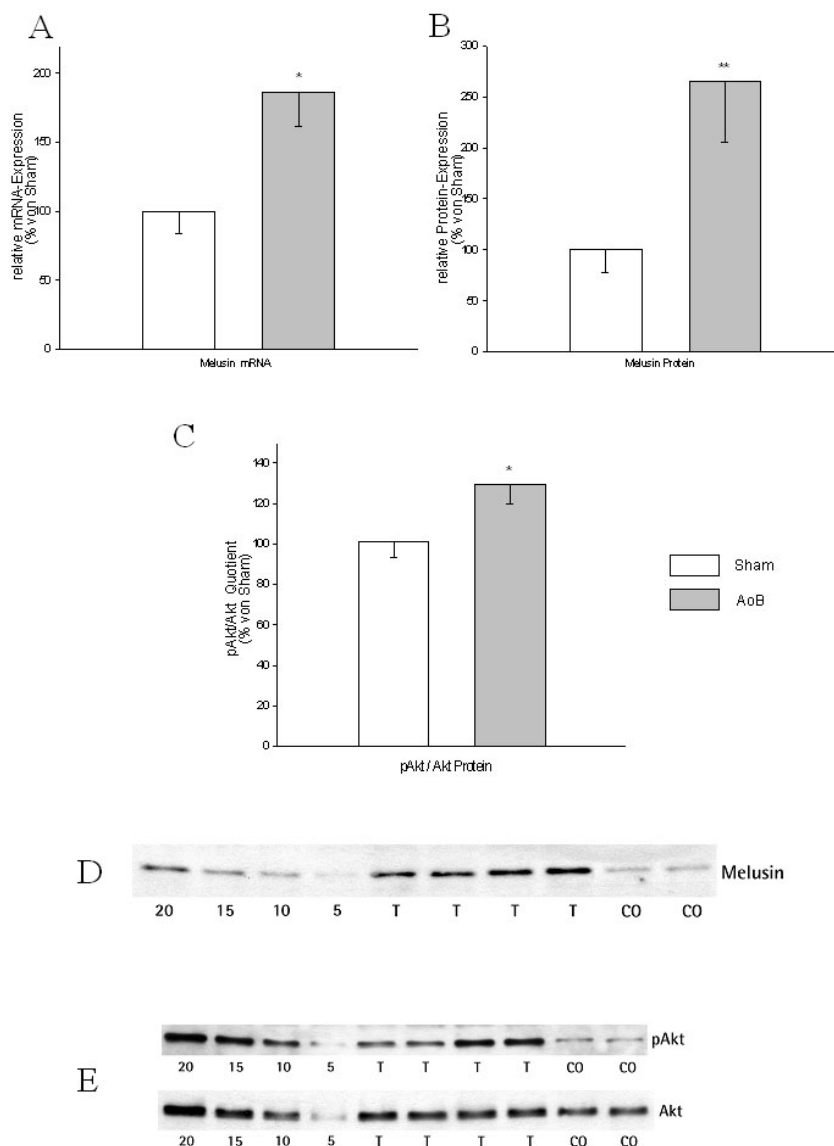
Der HIF-P4HI FG2216 führte gegenüber der AoB-Gruppe zu keiner signifikanten Regulation. Tendenziell wurden bestehende Veränderungen durch Druckbelastung verstärkt, insbesondere bezüglich ET1 ( $517.2 \pm 117\%$ ), ECE1 ( $268.1 \pm 75\%$ ) sowie ETR $\alpha$  ( $274.0 \pm 47\%$ ). ETR $\beta$  und AT1 waren im Mittel nahezu unverändert (Tab. 16).

	ET1	ECE1	ETR $\alpha$	ETR $\beta$	AT1
<b>AoB</b>	308.3 $\pm$ 95	177.0 $\pm$ 30	192.3 $\pm$ 31	231.1 $\pm$ 47	181.6 $\pm$ 31
<b>AoB+FG2216</b>	517.2 $\pm$ 117	268.1 $\pm$ 75	274.0 $\pm$ 47	248.5 $\pm$ 90	178.4 $\pm$ 68

**Tab. 16:** Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von ET1, ECE1, ETR  $\alpha$  und  $\beta$  sowie AT1 in AoB und FG2216. Weitere Details siehe Tab. 14.

#### 4.6 Regulation von Melusin bei Druckbelastung durch AoB

Melusin wurde nach Druckbelastung durch AoB signifikant heraufreguliert. Die Heraufregulation zeigte sich sowohl auf mRNA- (Sham:  $100,0 \pm 14,8\%$  vs. AoB:  $185,8 \pm 22,8\%$ ;  $p < 0,05$ ) als auch auf Proteinebene (Sham:  $100,0 \pm 21,5\%$  vs. AoB:  $265,7 \pm 57,7\%$ ;  $p < 0,01$ ; Abb. 18A, B, D). Der Quotient pAkt / Akt, welcher auf das Verhältnis von Phosphorylierung der Proteinkinase B zu Akt hinweist, war in der AoB-Gruppe ebenfalls signifikant gegenüber der Sham-Gruppe erhöht (Sham:  $100,0 \pm 7,8\%$  vs. AoB:  $129,6 \pm 9,7\%$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 18C, E).



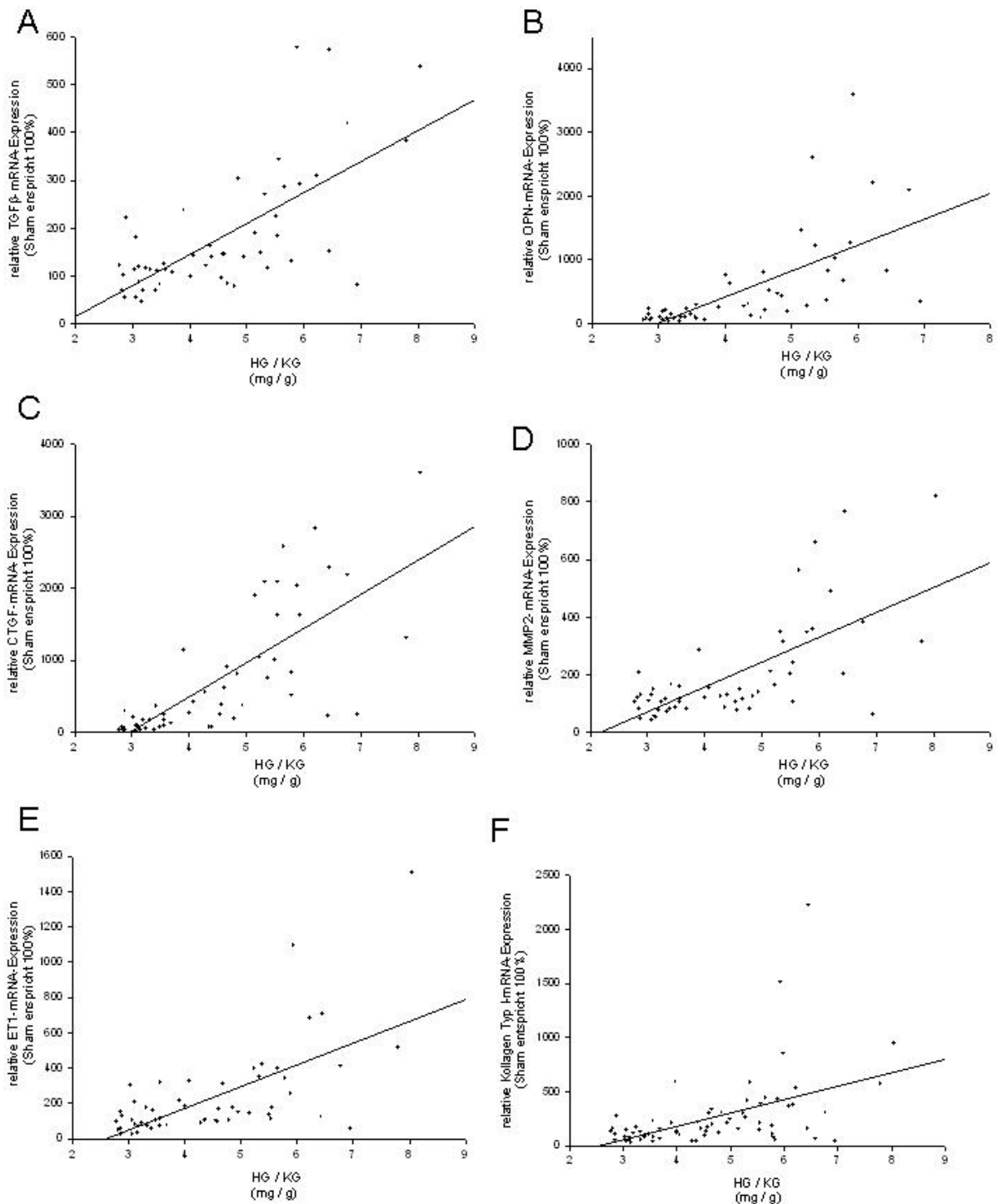
**Abb. 18:** Relative mRNA (A)- und Proteinexpression (B) von Melusin sowie Proteinexpression des Quotienten pAkt/Akt (C). Der Mittelwert der Sham Gruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt und die Einzeltiere der Sham- und AoB Gruppe hierzu in Bezug gesetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  Sham vs. AoB; \*  $p < 0,05$  Sham vs. AoB. Die Sham Gruppe ist als weißer Balken, die AoB Gruppe als hellgrauer Balken dargestellt. D, E: Western Blots der Proteine Melusin, phosphoryliertes Akt und unphosphoryliertes Akt. Dargestellt sind je zwei Proben der Sham-Gruppe (CO) sowie 4 Proben der AoB-Gruppe (T) und eine Verdünnungsreihe der Proteine von 5 – 20  $\mu$ g.

## 4.7 Korrelationen

### 4.7.1 Korrelationen zwischen Genexpression und Morphologiedaten

Die mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren zeigten einen starken Zusammenhang mit den gemessenen morphologischen Daten. TGF $\beta$ 1, OPN und CTGF korrelierten mit dem relativen Herzgewicht (Abb. 19A bis C). Ähnlich starke Korrelationen zeigten sich für TGF $\beta$ 1, CTGF

und OPN mit dem relativen Gewicht des LA, des LV sowie dem relativen Lungengewicht. Eine enge Beziehung zu den relativen Organgewichten wiesen auch MMP2 mRNA (Abb. 19D), Kollagen Typ I mRNA (Abb. 19E) und ET1 mRNA (Abb. 19F) auf. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 17 wiedergegeben.



**Abb. 19: A-E: Korrelation der relativen Genexpression von TGF $\beta$ 1, OPN, CTGF, MMP2, ET1 und Kollagen Typ 1 mit relativem Herzgewicht.**

#### 4.7.2 Korrelation zwischen Genexpression und Hämodynamikdaten

Der LVEDP korrelierte eng mit der mRNA-Expression von TGF $\beta$ 1 (Abb. 20A), ITG $\beta$ 1, CTGF (Abb. 20B), OPN (Abb. 20C), MMP2 (Abb. 20D) und ECE1. TGF $\beta$ 1 mRNA (Abb. 20E) und CTGF mRNA (Abb. 20F) zeigten eine signifikante Beziehung zur maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 18 wiedergegeben.

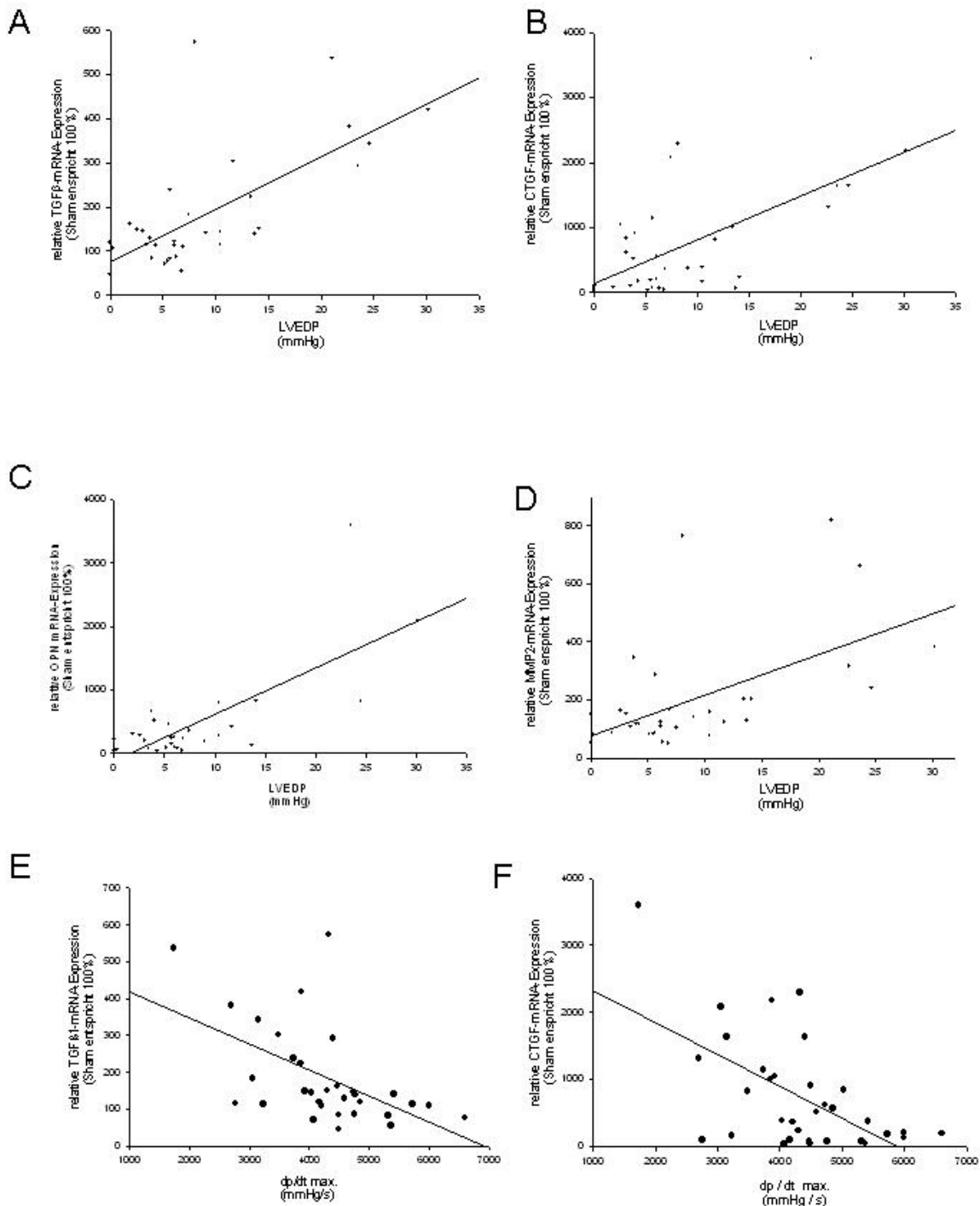


Abb. 20: A-E: Korrelation der relativen Genexpression von TGF $\beta$ 1, OPN, CTGF und MMP2 mit LVEDP.

	TGFβ1	ITGβ1	CTGF	OPN	MMP2	MMP9	Koll. 1	Koll. 3	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	ET1	ETRα	ETRβ	ECE1	AT1	HIF1	HIF2	MMP8	MT1MMP
rel. HGW	r	<b>0,696</b>	<b>0,746</b>	<b>0,655</b>	<b>0,680</b>	<b>0,430</b>	<b>0,477</b>	<b>0,335</b>	<b>0,619</b>	<b>0,558</b>	0,014	-0,121	<b>0,635</b>	<b>0,602</b>	<b>0,344</b>	<b>0,434</b>	0,267	<b>0,401</b>	<b>0,385</b>	<b>0,470</b>	<b>0,408</b>
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,005	0,000	0,000	0,917	0,380	0,000	0,000	0,013	0,000	0,051	0,001	0,003	0,000	0,000
rel. LV-Gew.	r	<b>0,689</b>	<b>0,506</b>	<b>0,750</b>	<b>0,629</b>	<b>0,415</b>	<b>0,486</b>	<b>0,328</b>	<b>0,621</b>	<b>0,521</b>	-0,145	-0,232	<b>0,536</b>	<b>0,557</b>	<b>0,320</b>	<b>0,406</b>	0,252	<b>0,386</b>	<b>0,356</b>	<b>0,355</b>	<b>0,405</b>
	p	0,000	0,001	0,000	0,000	0,012	0,000	0,019	0,000	0,000	0,346	0,125	0,000	0,000	0,039	0,003	0,095	0,006	0,015	0,011	0,002
rel. LA-Gew.	r	<b>0,734</b>	<b>0,588</b>	<b>0,757</b>	<b>0,519</b>	<b>0,293</b>	<b>0,420</b>	<b>0,314</b>	<b>0,517</b>	<b>0,570</b>	0,010	-0,137	<b>0,537</b>	<b>0,605</b>	<b>0,323</b>	<b>0,348</b>	0,191	<b>0,353</b>	<b>0,342</b>	<b>0,308</b>	<b>0,356</b>
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000	0,009	0,000	0,000	0,944	0,320	0,000	0,000	0,019	0,003	0,167	0,004	0,008	0,016	0,002
rel. Lu.-Gew.	r	<b>0,638</b>	<b>0,485</b>	<b>0,682</b>	<b>0,452</b>	<b>0,293</b>	<b>0,380</b>	<b>0,200</b>	<b>0,390</b>	<b>0,453</b>	0,034	-0,063	<b>0,582</b>	<b>0,560</b>	<b>0,238</b>	<b>0,399</b>	0,249	<b>0,361</b>	<b>0,312</b>	<b>0,338</b>	<b>0,304</b>
	p	0,000	0,000	0,000	0,001	0,048	0,001	0,102	0,004	0,001	0,808	0,646	0,000	0,000	0,089	0,001	0,070	0,003	0,016	0,008	0,010

Tab. 17: Korrelationen zwischen mRNA (horizontal) und Morphologie-Parametern (vertikal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0.05$ ) auf.

	TGFβ1	ITGβ1	CTGF	OPN	MMP2	MMP9	Koll. 1	Koll. 3	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	ET1	ETRα	ETRβ	ECE1	AT1	HIF1	HIF2	MMP8	MT1MMP
LVESD	r	-0,238	-0,025	-0,082	-0,158	-0,099	-0,21	-0,16	-0,222	-0,125	<b>-0,313</b>	-0,295	-0,24	-0,28	-0,02	-0,13	-0,30	-0,12	-0,09	-0,202	-0,181
	p	0,145	0,881	0,616	0,342	0,059	0,164	0,270	0,174	0,450	0,049	0,062	0,137	0,077	0,904	0,380	0,055	0,434	0,580	0,165	0,187
LVEDD	r	-0,266	-0,016	-0,149	-0,246	-0,105	-0,14	-0,1	-0,251	-0,148	-0,293	<b>-0,451</b>	-0,29	<b>-0,37</b>	0,031	-0,12	-0,19	-0,13	-0,16	-0,200	-0,173
	p	0,101	0,924	0,359	0,136	0,028	0,559	0,335	0,123	0,369	0,066	0,003	0,068	0,019	0,854	0,419	0,229	0,411	0,322	0,169	0,205
LVPW	r	<b>0,563</b>	<b>0,350</b>	<b>0,596</b>	<b>0,384</b>	<b>0,393</b>	0,123	0,236	<b>0,367</b>	<b>0,379</b>	0,072	-0,228	0,286	<b>0,350</b>	0,205	0,106	0,272	0,271	0,087	0,221	0,246
	p	0,000	0,029	0,000	0,017	0,012	0,495	0,111	0,258	0,022	0,017	0,658	0,151	0,073	0,027	0,218	0,477	0,086	0,072	0,594	0,126
LVEF	r	0,193	-0,001	0,030	0,086	0,252	0,094	0,229	0,189	0,179	0,067	0,254	0,208	0,229	0,005	0,141	0,290	0,081	0,053	0,210	0,189
	p	0,239	0,997	0,855	0,608	0,116	0,601	0,122	0,203	0,275	0,685	0,114	0,177	0,197	0,155	0,975	0,345	0,066	0,595	0,746	0,148
sys. RR	r	0,335	0,344	0,225	0,360	0,320	0,282	0,286	<b>0,402</b>	<b>0,355</b>	0,076	0,099	0,210	0,319	0,345	0,218	0,312	<b>0,407</b>	0,261	0,167	0,286
	p	0,057	0,054	0,200	0,055	0,070	0,154	0,077	0,127	0,023	0,670	0,579	0,241	0,070	0,057	0,177	0,072	0,011	0,124	0,309	0,060
LVEDP	r	<b>0,683</b>	<b>0,714</b>	<b>0,614</b>	<b>0,740</b>	<b>0,548</b>	<b>0,508</b>	<b>0,462</b>	<b>0,306</b>	<b>0,581</b>	0,038	0,249	<b>0,515</b>	<b>0,627</b>	<b>0,542</b>	<b>0,603</b>	0,315	<b>0,346</b>	<b>0,422</b>	<b>0,490</b>	<b>0,420</b>
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,007	0,029	0,003	0,088	0,000	0,833	0,155	0,002	0,000	0,002	0,069	0,033	0,010	0,002	0,004
dp/dt max.	r	<b>-0,551</b>	-0,202	<b>-0,587</b>	-0,169	<b>-0,418</b>	-0,200	-0,10	-0,26	-0,171	-0,131	-0,020	0,014	<b>-0,44</b>	0,056	-0,23	-0,19	-0,07	-0,12	<b>-0,375</b>	-0,202
	p	0,001	0,266	0,000	0,381	0,015	0,317	0,527	0,105	0,351	0,466	0,910	0,938	0,011	0,005	0,766	0,157	0,284	0,681	0,483	0,188

Tab. 18: Korrelationen zwischen mRNA (horizontal) und Hämodynamik-Parametern (vertikal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0.05$ ) auf.



#### 4.7.3 Korrelation zwischen Proteinexpression und Morphologiedaten

TGFβ1 Protein zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem relativen Herzgewicht (Abb. 21A) sowie den relativen Gewichten des LA, LV und der Lunge. ITGβ1 Protein korrelierte mit dem relativen Herzgewicht (Abb. 21B) sowie den relativen Gewichten des LA, LV und der Lunge. Die Kollagen Typ III Protein-Expression wies einen Bezug zum relativen Herzgewicht (Abb. 21C), LA-Gewicht, LV-Gewicht und der Lunge auf. Die Aktivitäten von proMMP2, MMP2 – latente Form, MMP2 – aktive Form und MMP9 korrelierten mit dem relativen Herzgewicht sowie den anderen gemessenen morphologischen Faktoren. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 19 wiedergegeben.

#### 4.7.4 Korrelation zwischen Proteinexpression und Hämodynamik

Der LVEDP korrelierte mit der Aktivität von proMMP2 (Abb. 21D), MMP2 – latente Form, MMP2 – aktive Form (Abb. 21E) und MMP9 (Abb. 21F). Negative Korrelationen ergaben sich zwischen TGFβ1 und LVEDD sowie zwischen Kollagen Typ III und LVEF. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 20 wiedergegeben.

#### 4.7.5 Korrelation innerhalb der Expression der untersuchten Gene

Bezüglich Korrelationen innerhalb der mRNA-Expression wies TGFβ1 enge Beziehungen zu CTGF (Abb. 22A), ITGβ1, OPN, MMP2 (Abb. 22B) und Kollagen Typ I auf. Auch CTGF mRNA korrelierte mit OPN und MMP2 mRNA. OPN mRNA zeigte einen Zusammenhang mit TIMP1 und 2 mRNA, MMP2 mRNA und Kollagen Typ I mRNA. ITGβ1 korrelierte mit TIMP2. TIMP1 und 2 zeigten – im Gegensatz zu TIMP3 und 4 mRNA – eine enge Korrelation mit Kollagen I (Abb. 22C und D) und Kollagen III. Im Endothelinsystem korrelierte ET1 mRNA mit TIMP1, CTGF, MMP2, MMP9 (Abb. 22E) und Kollagen I und III. Innerhalb des Endothelinsystems zeigten sich weitere stark signifikante Korrelationen zwischen ETRα und MMP2 sowie ECE1 und MMP2 und MMP9 (Abb. 22F). AT1 zeigte einen Zusammenhang mit ET1 sowie ECE1. HIF1 und 2 zeigten einen positiven Zusammenhang mit MMP2 sowie MMP9. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 21 wiedergegeben. Weiterhin zeigte Melusin mRNA Korrelationen mit CTGF ( $r = 0,622$ ), ITGβ1 ( $r = 0,659$ ), OPN ( $r = 0,659$ ) und ET1 ( $r = 0,565$ ; alle  $p < 0,05$ ).

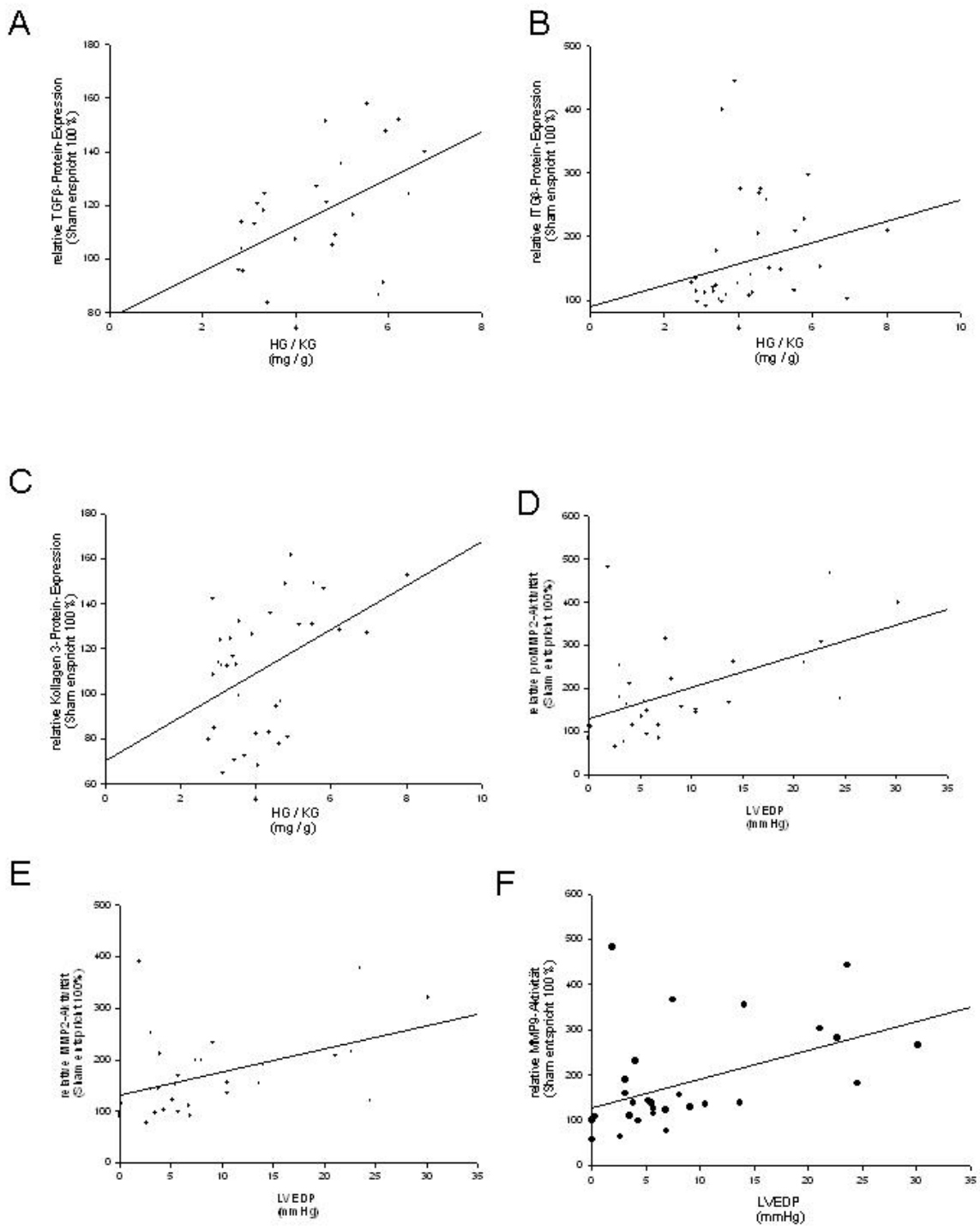


Abb. 21: A-C: Korrelation der relativen Proteinexpression von TGF $\beta$ 1, ITG $\beta$ 1 und Kollagen III mit relativem Herzgewicht. D-F: Korrelation der Aktivität von proMMP2, MMP2 und MMP9 mit LVEDP.

	TGFβ1	ITGβ1	Koll. 1	Koll. 3	MMP1 lat.	MMP1 act.	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4	MMP2 lat.	MMP2 act.	proMMP2	MMP9
relatives Herz-Gew.	r	<b>0,700</b>	0,115	<b>0,511</b>	-0,129	-0,200	0,078	0,247	-0,210	-0,241	<b>0,572</b>	<b>0,582</b>	<b>0,638</b>	<b>0,583</b>
	p	0,000	0,497	0,002	0,381	0,182	0,607	0,098	0,170	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000
relatives LV-Gew.	r	<b>0,661</b>	<b>0,603</b>	<b>0,056</b>	<b>0,498</b>	-0,171	<b>0,062</b>	<b>0,157</b>	<b>-0,217</b>	<b>-0,293</b>	<b>0,613</b>	<b>0,622</b>	<b>0,671</b>	<b>0,610</b>
	p	0,002	0,000	0,765	0,007	0,298	0,710	0,339	0,197	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000
relatives LA-Gew.	r	<b>0,588</b>	<b>0,577</b>	0,172	<b>0,520</b>	-0,136	0,100	0,131	-0,159	-0,171	<b>0,468</b>	<b>0,527</b>	<b>0,547</b>	<b>0,441</b>
	p	0,002	0,000	0,309	0,002	0,356	0,508	0,387	0,304	0,255	0,001	0,000	0,000	0,002
relatives Lungen-Gew.	r	<b>0,519</b>	<b>0,516</b>	0,269	<b>0,484</b>	-0,113	<b>0,127</b>	<b>0,177</b>	<b>-0,090</b>	<b>-0,136</b>	<b>0,362</b>	<b>0,403</b>	<b>0,446</b>	<b>0,410</b>
	p	0,008	0,001	0,107	0,004	0,443	0,402	0,238	0,562	0,369	0,011	0,004	0,001	0,003

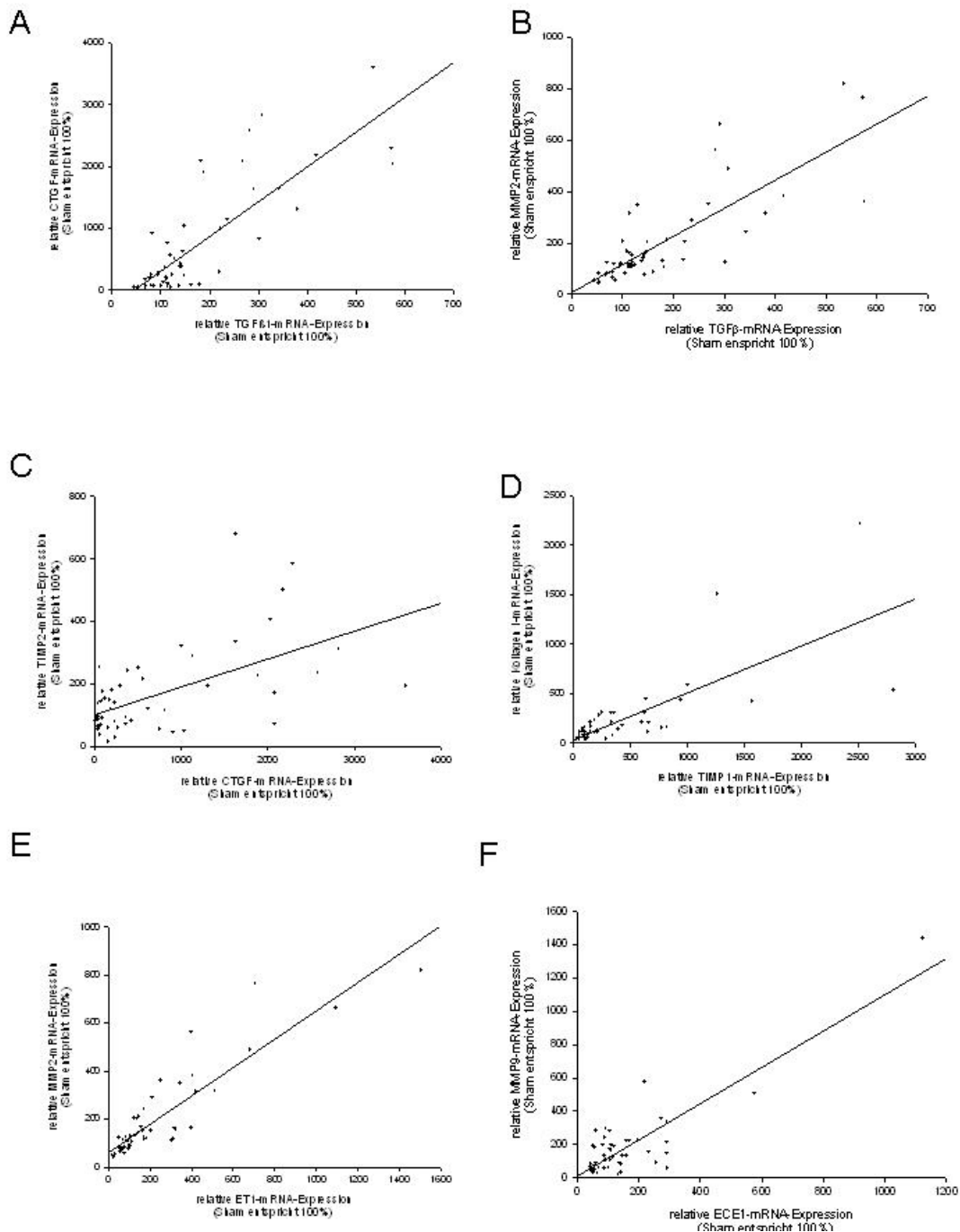
Tab. 19: Korrelationen zwischen Proteinexpression (horizontal) und Morphologie-Parametern (vertikal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) auf.

	TGFβ1	ITGβ1	Koll. 1	Koll. 3	MMP1 lat.	MMP1 act.	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4	MMP2 lat.	MMP2 act.	proMMP2	MMP9
LVESD	r	-0,451	-0,084	0,028	0,382	0,049	-0,051	0,016	0,127	0,135	0,004	0,035	0,012	-0,015
	p	0,069	0,659	0,889	0,075	0,780	0,774	0,928	0,974	0,482	0,983	0,840	0,944	0,930
LVEDD	r	<b>-0,595</b>	<b>0,053</b>	<b>0,141</b>	<b>0,275</b>	<b>-0,073</b>	<b>-0,117</b>	<b>-0,230</b>	<b>-0,174</b>	<b>0,203</b>	<b>0,142</b>	<b>-0,035</b>	<b>0,029</b>	<b>-0,080</b>
	p	0,012	0,781	0,475	0,183	0,676	0,510	0,191	0,317	0,257	0,415	0,840	0,866	0,643
LVPW	r	0,271	<b>0,426</b>	-0,104	0,180	-0,162	-0,323	0,162	-0,209	-0,283	<b>0,440</b>	<b>0,482</b>	<b>0,443</b>	<b>0,367</b>
	p	0,292	0,019	0,600	0,389	0,351	0,063	0,360	0,228	0,110	0,026	0,007	0,003	0,028
LVEF	r	0,432	0,173	-0,048	<b>-0,424</b>	-0,073	0,066	-0,150	-0,050	-0,054	-0,045	-0,064	-0,057	-0,031
	p	0,084	0,361	0,809	0,035	0,677	0,712	0,397	0,773	0,884	0,760	0,792	0,740	0,859
sys. RR	r	0,372	<b>0,395</b>	<b>0,090</b>	<b>0,247</b>	<b>-0,090</b>	<b>-0,099</b>	<b>-0,034</b>	<b>0,168</b>	<b>0,169</b>	<b>0,045</b>	<b>0,259</b>	<b>0,402</b>	0,182
	p	0,190	0,062	0,691	0,307	0,650	0,623	0,866	0,383	0,410	0,174	0,031	0,093	0,346
LVEDP	r	0,414	0,272	0,421	0,296	0,203	0,095	0,040	0,264	-0,042	<b>0,036</b>	<b>0,477</b>	<b>0,449</b>	<b>0,462</b>
	p	0,141	0,209	0,051	0,218	0,300	0,639	0,843	0,166	0,837	0,857	0,009	0,015	0,003
dp/dt max.	r	-0,394	-0,305	-0,054	-0,116	0,013	0,053	-0,292	-0,104	0,191	0,111	-0,169	-0,104	-0,287
	p	0,164	0,157	0,811	0,638	0,946	0,794	0,139	0,592	0,349	0,572	0,382	0,591	0,268

Tab. 20: Korrelationen zwischen Proteinexpression (horizontal) und Hämodynamik (vertikal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) auf.

#### 4.7.6 Korrelation innerhalb der Expression der untersuchten Proteine

Innerhalb der Proteinexpression zeigte sich eine enge Korrelation zwischen TGF $\beta$ 1 und TIMP3. Eine negative Korrelation zeigten die aktive Form von MMP1 und Kollagen III. TIMP3 und 4 zeigten bezüglich der aktiven Form von MMP1 eine positive Korrelation. Kollagen III zeigte eine enge Beziehung zur Enzymaktivität von proMMP2, MMP2 und MMP9. Die vollständigen Korrelationsdaten sind in Tab. 22 wiedergegeben. Melusin Protein korrelierte mit MMP1 und MMP2 Protein ( $r = 0,751$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $r = -0,660$ ,  $p < 0,05$ ).



**Abb. 22: Korrelationen innerhalb der gemessenen relativen mRNA-Expression von TGF $\beta$ 1, CTGF, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, Kollagen 1, ET1 und ECE1.**

	TGFβ1	ITGβ1	OPN	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	CTGF	MMP2	MMP9	Koll.1	Koll.3	ET1	ETRα	ETRβ	ECE1	AT1	HIF1	HIF2	MMP8	
ITGβ1	r	<b>0,761</b>																			
	p	0,000																			
OPN	r	<b>0,619</b>	<b>0,496</b>																		
	p	0,000	0,000																		
TIMP1	r	<b>0,662</b>	<b>0,411</b>	<b>0,796</b>																	
	p	0,000	0,003	0,000																	
TIMP2	r	<b>0,700</b>	<b>0,876</b>	<b>0,674</b>	<b>0,572</b>																
	p	0,000	0,000	0,000	0,000																
TIMP3	r	0,075	0,197	0,139	0,196	0,232															
	p	0,594	0,161	0,341	0,164	0,098															
TIMP4	r	-0,049	0,015	0,103	0,050	0,024	<b>0,479</b>														
	p	0,729	0,913	0,479	0,724	0,867	0,000														
CTGF	r	<b>0,824</b>	<b>0,577</b>	<b>0,740</b>	<b>0,770</b>	<b>0,571</b>	0,153	-0,087													
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,269	0,533														
MMP2	r	<b>0,804</b>	<b>0,559</b>	<b>0,834</b>	<b>0,820</b>	<b>0,675</b>	0,207	<b>0,888</b>	<b>0,829</b>												
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,138	0,525	0,000												
MMP9	r	<b>0,443</b>	<b>0,394</b>	<b>0,682</b>	<b>0,406</b>	<b>0,673</b>	0,053	<b>0,068</b>	<b>0,437</b>	<b>0,674</b>											
	p	0,002	0,008	0,000	0,006	0,000	0,724	0,652	0,002	0,000											
Koll.1	r	<b>0,702</b>	<b>0,460</b>	<b>0,807</b>	<b>0,740</b>	<b>0,689</b>	0,044	0,004	<b>0,599</b>	<b>0,839</b>	<b>0,743</b>										
	p	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,754	0,979	0,000	0,000	0,000										
Koll.3	r	<b>0,302</b>	0,261	<b>0,536</b>	<b>0,713</b>	<b>0,384</b>	<b>0,400</b>	0,262	<b>0,417</b>	<b>0,399</b>	0,254	<b>0,323</b>									
	p	0,031	0,064	0,000	0,000	0,005	0,003	0,058	0,002	0,003	0,097	0,008									
ET1	r	<b>0,663</b>	<b>0,395</b>	<b>0,818</b>	<b>0,746</b>	<b>0,508</b>	0,256	0,105	<b>0,731</b>	<b>0,889</b>	<b>0,720</b>	<b>0,749</b>	<b>0,361</b>								
	p	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,065	0,450	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000								
ETRα	r	<b>0,749</b>	<b>0,572</b>	<b>0,739</b>	<b>0,553</b>	<b>0,659</b>	0,161	0,103	<b>0,754</b>	<b>0,874</b>	<b>0,676</b>	<b>0,678</b>	0,254	<b>0,806</b>							
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,248	0,459	0,000	0,000	0,000	0,069	0,000	0,000							
ETRβ	r	<b>0,486</b>	<b>0,788</b>	<b>0,485</b>	<b>0,378</b>	<b>0,761</b>	0,265	0,076	<b>0,369</b>	<b>0,335</b>	<b>0,366</b>	<b>0,348</b>	<b>0,360</b>	<b>0,244</b>	<b>0,323</b>						
	p	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,060	0,591	0,008	0,015	0,016	0,012	0,010	0,081	0,019						
ECE1	r	<b>0,506</b>	<b>0,461</b>	<b>0,712</b>	<b>0,424</b>	<b>0,645</b>	<b>0,292</b>	<b>0,274</b>	<b>0,513</b>	<b>0,696</b>	<b>0,861</b>	<b>0,608</b>	<b>0,474</b>	<b>0,761</b>	<b>0,727</b>	<b>0,441</b>					
	p	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,032	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001					
AT1	r	<b>0,275</b>	0,192	<b>0,441</b>	<b>0,301</b>	<b>0,410</b>	<b>0,382</b>	0,092	<b>0,369</b>	<b>0,486</b>	<b>0,683</b>	<b>0,465</b>	<b>0,376</b>	<b>0,603</b>	<b>0,554</b>	0,247	<b>0,725</b>				
	p	0,049	0,173	0,002	0,032	0,003	0,005	0,509	0,007	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,080	0,000				
HIF1	r	<b>0,474</b>	<b>0,373</b>	<b>0,612</b>	<b>0,515</b>	<b>0,581</b>	<b>0,460</b>	0,158	<b>0,540</b>	<b>0,715</b>	<b>0,763</b>	<b>0,489</b>	<b>0,356</b>	<b>0,753</b>	<b>0,660</b>	0,238	<b>0,710</b>	<b>0,664</b>			
	p	0,001	0,008	0,000	0,000	0,000	0,001	0,268	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,104	0,000	0,000			
HIF2	r	0,255	0,251	<b>0,525</b>	<b>0,344</b>	<b>0,387</b>	0,290	0,266	0,225	<b>0,383</b>	<b>0,499</b>	<b>0,279</b>	<b>0,421</b>	<b>0,386</b>	<b>0,326</b>	0,130	<b>0,514</b>	0,279	<b>0,696</b>		
	p	0,091	0,096	0,000	0,022	0,008	0,051	0,071	0,133	0,009	0,001	0,034	0,001	0,008	0,027	0,399	0,000	0,060	0,000		
MMP8	r	<b>0,385</b>	0,219	<b>0,494</b>	<b>0,318</b>	<b>0,349</b>	0,092	0,117	<b>0,450</b>	<b>0,524</b>	<b>0,745</b>	<b>0,529</b>	0,219	<b>0,692</b>	<b>0,592</b>	0,181	<b>0,671</b>	<b>0,597</b>	<b>0,575</b>	<b>0,333</b>	
	p	0,003	0,099	0,000	0,015	0,008	0,487	0,367	0,000	0,000	0,000	0,096	0,000	0,000	0,183	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	
MT1MMP	r	<b>0,536</b>	<b>0,351</b>	<b>0,568</b>	<b>0,566</b>	<b>0,581</b>	0,034	0,017	<b>0,501</b>	<b>0,737</b>	<b>0,766</b>	<b>0,910</b>	0,196	<b>0,691</b>	<b>0,636</b>	<b>0,309</b>	<b>0,702</b>	<b>0,485</b>	<b>0,619</b>	<b>0,331</b>	<b>0,630</b>
	p	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,781	0,887	0,000	0,000	0,000	0,107	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000

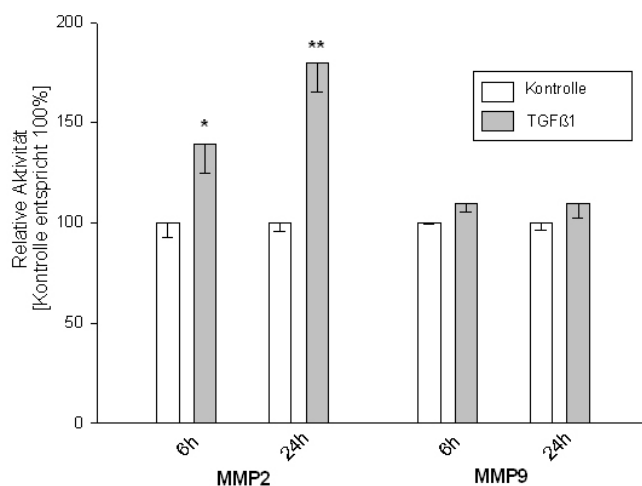
Tab. 21: Korrelationen innerhalb der mRNA-Expressionsdaten (vertikal und horizontal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0.05$ ) auf.

	TGFβ1	ITGβ1	Koll.1	Koll.3	MMP1lat.	MMP1act.	MMP2	TIMP1	TIMP3	TIMP4	MMP2lat.	MMP2act.	proMMP2
ITGβ1	r	0,488											
	p	0,055											
Koll.1	r	0,167	-0,083										
	p	0,523	0,631										
Koll.3	r	0,080	0,069	<b>0,503</b>									
	p	0,768	0,704	0,002									
MMP1lat.	r	0,141	-0,236	0,157	-0,192								
	p	0,512	0,153	0,353	0,277								
MMP1act.	r	0,214	-0,098	0,049	<b>-0,358</b>	<b>0,753</b>							
	p	0,316	0,570	0,780	0,045	0,000							
MMP2	r	-0,058	0,141	-0,050	0,141	-0,023	-0,230						
	p	0,792	0,399	0,767	0,426	0,878	0,133						
TIMP1	r	0,349	-0,193	-0,098	-0,284	<b>0,356</b>	<b>0,332</b>	-0,067					
	p	0,095	0,252	0,568	0,109	0,016	0,030	0,664					
TIMP3	r	<b>0,442</b>	-0,076	0,111	-0,308	<b>0,512</b>	<b>0,546</b>	<b>-0,321</b>	0,116				
	p	0,035	0,664	0,534	0,091	0,000	0,036	0,458					
TIMP4	r	0,003	0,004	0,044	<b>-0,351</b>	<b>0,619</b>	<b>0,695</b>	<b>-0,407</b>	<b>0,167</b>	<b>0,614</b>			
	p	0,988	0,982	0,797	0,045	0,000	0,006	0,274	0,000	0,000			
MMP2lat.	r	0,097	0,177	0,036	<b>0,382</b>	-0,140	-0,234	0,082	0,192	-0,216	-0,285		
	p	0,644	0,289	0,834	0,026	0,344	0,117	0,586	0,201	0,159	0,055		
MMP2act.	r	0,091	0,302	0,061	<b>0,360</b>	-0,193	-0,291	0,214	0,147	-0,180	<b>-0,316</b>	<b>0,939</b>	
	p	0,664	0,065	0,719	0,036	0,189	0,050	0,153	0,330	0,242	0,032	0,000	
proMMP2	r	0,178	0,208	0,110	<b>0,450</b>	-0,134	-0,229	0,078	0,215	-0,197	-0,277	<b>0,986</b>	<b>0,944</b>
	p	0,395	0,211	0,517	0,008	0,363	0,126	0,608	0,152	0,201	0,062	0,000	0,000
MMP9	r	0,225	0,210	0,042	<b>0,413</b>	-0,089	-0,140	0,086	0,184	-0,187	-0,253	<b>0,927</b>	<b>0,841</b>
	p	0,280	0,207	0,804	0,015	0,546	0,354	0,571	0,222	0,224	0,090	0,000	0,000

Tab. 22: Korrelationen innerhalb der Protein-Expressionsdaten (vertikal und horizontal). Schwarz hervorgehobene Korrelationen weisen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) auf.

## 4.8 Voruntersuchungen zur Stimulation von Zellkulturen

Zur Untersuchung des Effektes der Stimulation von humanen Fibroblasten mit Wachstumsfaktoren auf die MMP-Synthese wurden Voruntersuchungen mit der Fibroblasten-Zelllinie HT1080 (Anzahl der Stimulationen, n=6) durchgeführt. Es fand sich eine signifikante Steigerung der Synthese von MMP2 ( $139,4\% \pm 13,4$  vs. Kontrolle:  $100,0\% \pm 6,5$ ;  $p < 0,05$ ) nach 6-stündiger Stimulation mit TGF $\beta$ 1. Nach 24-stündiger Stimulation nahm die MMP2-Aktivität der TGF $\beta$ 1-stimulierten Zellen auf  $179,9 \pm 12,8\%$  (Kontrollen:  $100,0\% \pm 3,6$ ,  $p < 0,01$ ) zu (Abb. 23). Bezüglich der MMP9-Aktivität zeigte sich kein Unterschied zu den Kontrollen nach 6 ( $109,3\% \pm 4,4$  vs  $100,0\% \pm 0,8$ ;  $p = 0,1$ ) und 24 Stunden ( $109,9\% \pm 5,6$  vs.  $100,0\% \pm 3,0$ ;  $p = 0,3$ ; Abb. 23) unter TGF $\beta$ 1-Stimulation.



**Abb. 23: Relative Aktivität von MMP2 und 9 in HT1080-Zellen nach 6 bzw. 24-stündiger Stimulation mit TGF $\beta$ 1. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0,01$  TGF $\beta$ 1-Stimulation vs. Kontrollgruppe, \*  $p < 0,05$  Gruppe TGF $\beta$ 1-Stimulation vs. Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe ist als weißer Balken, die TGF $\beta$ 1-Gruppe als grauer Balken dargestellt.**

## 4.9 Expression von ECM-Proteinen in humanen kardialen Fibroblasten aus Spender- und DCM-Herzen

### 4.9.1 Basis-Charakterisierung der Herkunft der Zellen

Die Anzahl der Spender-Herzen betrug n=9, die der DCM-Herzen n=11. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Alters (Spender:  $40,3$  Jahre  $\pm 8,9$  vs. DCM:  $49,1$  Jahre  $\pm 3,2$ ;  $p = 0,46$ ). Eine vorherige hämodynamische Untersuchung der Spender konnte aus gegebenem Anlass nicht durchgeführt werden. In der

DCM-Gruppe betrug der LVEDD  $74,3\text{mm} \pm 4,0$ , der LVESD  $66,7\text{mm} \pm 5,0$  und die LVEF  $20,0\% \pm 2,4$ . Diese Werte können jedoch mit in der Literatur angegebenen Referenz-Werten in der Bevölkerung für LVEDD (37 – 56mm) und LVEF ( $67\% \pm 8$ ) verglichen werden [50].

#### 4.9.2 RNA-Expression von ECM-Proteinen in hFib unter Stimulation

Die Genexpression von Kollagen Typ I zeigte sowohl innerhalb der Spender-Gruppe als auch innerhalb der DCM-Gruppe keine signifikante Regulation unter Stimulation mit TGF $\beta$ 1 nach 6 und 12 Stunden bzw. 24 Stunden. Im Vergleich zwischen Fibroblasten von Spender- und DCM-Herzen zeigte sich in der DCM-Gruppe eine signifikant höhere Kollagen I Expression nach 6 Stunden in der Kontroll-Stimulation. Unter Stimulation mit TGF $\beta$ 1 zeigte sich eine niedrigere Kollagen I Expression, es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Spender- und DCM-Herzen (Tab. 23).

	Spender		DCM		
	6h	12h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	$0,894 \pm 0,04$	$1,247 \pm 0,1$	$1,229 \pm 0,12$ §	$1,471 \pm 0,09$	$1,130 \pm 0,03$
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	$0,980 \pm 0,13$	$0,799 \pm 0,03$	$0,945 \pm 0,1$		$0,984 \pm 0,1$

**Tab. 23:** Dargestellt ist die mRNA-Expression von Kollagen Typ 1 in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit einem Trägerstoff (Kon) und Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) nach 6, 12 und 24 Stunden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM nach Bildung des GAPDH-Quotienten; §  $p < 0,05$  Spender vs. DCM.

TGF $\beta$ 1-Stimulation hatte keinen Effekt auf die Genexpression von MMP2. In der DCM-Gruppe ließ sich ebenfalls kein Effekt von TGF $\beta$ 1 auf MMP2 nachweisen. Im direkten Vergleich zwischen Spender- und DCM-Herzen zeigte sich eine tendenziell niedrigere Expression von MMP2, die jedoch nicht signifikant war (Tab. 24).

	Spender		DCM		
	6h	12h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	$1,204 \pm 0,06$	$1,211 \pm 0,1$	$1,082 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,1$	$1,282 \pm 0,08$
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	$1,231 \pm 0,22$	$0,939 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,05$		$0,857 \pm 0,09$

**Tab. 24:** Dargestellt ist die mRNA-Expression von MMP2 in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit Kon und TGF $\beta$ 1 nach 6, 12 und 24 Stunden. Weitere Details siehe Tab. 23.



#### 4.9.3 Protein-Expression von ECM-Proteinen in hFib unter Stimulation

Kollagen Typ I Protein zeigte innerhalb der Gruppe der Spenderherzen eine Steigerung unter TGF $\beta$ 1 Stimulation nach 12h auf 234,2%  $\pm$  28,4 im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Innerhalb der Gruppe der DCM-Herzen zeigte Kollagen Typ I Protein unter TGF $\beta$ 1-Stimulation eine Tendenz zur Heraufregulation. Im Vergleich zwischen den DCM- und Spenderherzen war die Kollagen I Proteinmenge in der Spender-Gruppe nach 6 und 12 Stunden Kontrollsubstanz-Stimulation höher als in der DCM-Gruppe. Tendenziell bestand dieser Unterschied auch unter TGF $\beta$ 1 (Tab. 25).

	Spender			DCM		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	164,4 $\pm$ 28,1	127,9 $\pm$ 15,1	73,8 $\pm$ 14,1	111,9 $\pm$ 18,5§	52,7 $\pm$ 7,8§	61,4 $\pm$ 12,4
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	184,8 $\pm$ 17,4	234,2 $\pm$ 28,4*		150,8 $\pm$ 29,5		182 $\pm$ 25,2

Tab. 25: Dargestellt ist die Protein-Expression von Kollagen Typ 1 in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit einem Trägerstoff (Kon) und Transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) nach 6, 12 und 24 Stunden. Die Expression zum Zeitpunkt 0 wurde als 100% gesetzt und die jeweils gemessenen Expressionen hierauf bezogen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  Kon vs. Stimulationssubstanz; §  $p < 0,05$  Spender vs. DCM.

MMP1 zeigte bezüglich der Proteinexpression keinen signifikanten Unterschied unter Stimulation mit TGF $\beta$ 1 nach 6, 12 und 24 Stunden in der Spender- und DCM-Gruppe. Es konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen der Spender- und DCM-Gruppe detektiert werden (Tab. 26).

	Spender			DCM		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	0,038 $\pm$ 0,01	0,032 $\pm$ 0,01	0,063 $\pm$ 0,01	0,113 $\pm$ 0,06	0,062 $\pm$ 0,02	0,473 $\pm$ 0,25
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	0,044 $\pm$ 0,01	0,011 $\pm$ 0,01		0,047 $\pm$ 0,01		

Tab. 26: Dargestellt ist die Protein-Expression von MMP1 (ng/ml) in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit Kon und TGF  $\beta$  1 nach 6, 12 und 24 Stunden. Weitere Details siehe Tab. 25.

Die Proteine TIMP1 und 2 zeigten innerhalb der Gruppe der Spenderherzen keine signifikante Regulation unter Stimulation mit TGF $\beta$ 1. In der DCM-Gruppe war TIMP2 nach 6 und 24 Stunden unter TGF $\beta$ 1 signifikant vermindert (6h: 8,03  $\pm$  1,3 vs. 20,48  $\pm$  5,3 bzw. 12h: 6,45  $\pm$  0,1 vs. 53,28  $\pm$  14,5;  $p$  jeweils  $< 0,05$ ; Tab. 27, 28). Im Vergleich fand sich eine höhere TIMP1 Expression nach 6 Stunden unter Kontroll-Stimulation in der DCM-Gruppe (0,78  $\pm$  0,12 vs. 0,382  $\pm$  0,03;  $p < 0,05$  war dieser im Vergleich zur Spender-Gruppe vermindert (1,132

$\pm 0,16$  vs.  $1,91 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ; Tab. 27). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Spender- und DCM-Gruppe in der TIMP2-Proteinmenge (Tab. 28).

	Spender			DCM		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	$0,382 \pm 0,03$	$0,909 \pm 0,25$	$1,91 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,12§$	$1,163 \pm 0,23$	$1,132 \pm 0,16§$
<b>TGFβ1</b>	$0,412 \pm 0,04$	$0,648 \pm 0,12$		$0,458 \pm 0,1$		$1,44 \pm 0,12$

Tab. 27: Dargestellt ist die Protein-Expression von TIMP1 (ng/ml) in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit Kon und TGFβ1 nach 6, 12 und 24 Stunden. Weitere Details siehe Tab. 25.

	Spender			DCM		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	$10,47 \pm 1,3$	$31,56 \pm 9,6$	$63,16 \pm 9,2$	$20,48 \pm 5,3$	$75,23 \pm 17,2$	$53,28 \pm 14,5$
<b>TGFβ1</b>	$11,79 \pm 1,7$	$18,65 \pm 4,1$		$8,03 \pm 1,3^*$		$6,45 \pm 0,1^*$

Tab. 28: Dargestellt ist die Protein-Expression von TIMP2 (ng/ml) in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit Kon und TGFβ1 nach 6, 12 und 24 Stunden. Weitere Details siehe Tab. 25.

#### 4.9.4 Enzymaktivität der MMPs in hFib unter Stimulation

Innerhalb der Spender-Gruppe führte TGFβ1-Stimulation keiner signifikanten Veränderung der MMP2-Aktivität. In der DCM-Gruppe führte TGFβ1 nach 6 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der MMP2-Aktivität gegenüber der Kontrollstimulation. Im direkten Vergleich zeigte sich eine höhere Aktivität der DCM-Gruppe nach 6 Stunden TGFβ1-Stimulation (Tab. 29).

	Spender			DCM		
	6h	12h	24h	6h	12h	24h
<b>Kon</b>	$100,0 \pm 6,3$	$100,0 \pm 2,2$	$100,0 \pm 2,5$	$100,0 \pm 3,2$	$100,0 \pm 3,5$	$100,0 \pm 7,7$
<b>TGFβ1</b>	$95,5 \pm 14,0$	$89,0 \pm 7,6$		$137,2 \pm 8,1^*§$		$77,3 \pm 11,8$

Tab. 29: Dargestellt ist die Enzymaktivität von MMP2 in hFib aus Spender- und DCM-Herzen unter Stimulation mit einem Trägerstoff (Kon) und Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) nach 6, 12 und 24 Stunden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Der jeweils identische Zeitpunkt der Kontrollstimulation wurde 100% gesetzt und die Einzelwerte der Stimulationen darauf bezogen; \*  $p < 0,05$  Kon vs. Stimulationssubstanz; §  $p < 0,05$  Spender vs. DCM.

Insgesamt zeigte sich somit eine differentielle Regulation der ECM Proteine mit einer gesteigerten MMP2-Aktivität in der DCM-Gruppe bei unveränderter mRNA-Expression, tendenziell verminderter TIMP-Expression sowie unveränderter Gen- und Proteinexpression von Kollagen I im Vergleich zur Spender-Gruppe. TGFβ1 zeigte hinsichtlich der Kollagen-Expression nur bei Spender-Herzen einen Effekt auf RNA- und Proteinexpression. DCM-Herzen wurden durch TGFβ1 nur bezüglich gesteigerter MMP2-Aktivität bei verminderter TIMP-Expression beeinflusst.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Inhibition der P4H den Verlauf einer experimentellen chronischen Druckbelastung in Ratten beeinflussen kann. Als Indikatoren dienten neben morphologischen und hämodynamischen Parametern der Einfluss der Druckbelastung und Medikation auf neuroendokrine Aktivierung, Wachstumsfaktorauslenkung und Veränderung der Balance des extrazellulären Matrix Systems auf translationeller und transkriptioneller Ebene. Die vorliegende Studie zeigt erstmalig, dass ein oral verfügbarer Prolyl 4-hydroxylase-Inhibitor den Veränderungen der myokardialen Funktion durch chronische Druckbelastung mittels AoB in der Frühphase der Hypertrophieentwicklung auf hämodynamischer und molekularer Ebene entgegenwirkt und eine druckinduzierte Gen- und Proteinexpression reprimiert.

### 5.2 Veränderungen durch AoB und P4HI auf morphologischer und hämodynamischer Ebene

Die frühe Phase der Hypertrophie innerhalb der chronischen Druckbelastung in diesem Tiermodell war charakterisiert durch einen Erhalt der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei gleichzeitig bestehender Wanddickenzunahme und Abnahme der linksventrikulären Diameter mit Zunahme des relativen Herzgewichtes. Hämodynamisch zeigten sich eine reduzierte Kontraktilität, ein erhöhter LVEDP und ein erhöhter systolischer Blutdruck. Diese hämodynamischen Veränderungen spiegelten sich auch in einem erhöhten relativen Lungengewicht wieder. Dies spricht für die Entwicklung einer LV Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion. Diese ist definiert durch einen erhöhten LV Füllungsdruck bei erhaltener systolischer Funktion. Die systolische Funktion erschien beginnend durch die vermehrte Steifheit des LV eingeschränkt zu sein, da zwar LVEF und FS unverändert waren, die Kontraktionsgeschwindigkeit jedoch deutlich vermindert war. Obwohl direkte Parameter der diastolischen Dysfunktion und der LV Rigidität in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurden (z.B. Steifigkeitskonstante, Relaxationsgeschwindigkeit, peak filling rate), entsprechen der erhöhte LVEDP und das erhöhte relative Lungengewicht dennoch diesen Kriterien. Diese Daten entsprechen auch dem klinischen Verlauf, da Druckbelastung, wie z.B. bei der Aortenstenose (AS), begleitet ist von einem Anstieg der systolischen

---

Wandbelastung und der Entwicklung von konzentrischer LV Hypertrophie. LVH wiederum ist begleitet von einer eingeschränkten Relaxation bei gleichzeitig bestehender Rigidität des LV [11]. 90% aller Patienten mit AS entwickeln eine diastolische Dysfunktion trotz normaler LV Funktion, die sich in Belastungsdyspnoe und vermindertem maximalem O<sub>2</sub>-Verbrauch äußert. Auffällig bleibt, dass im Rahmen dieses Modells keine manifeste LV systolische Funktionsstörung bestand. Dies ist am ehesten auf die beschränkte Dauer der Druckbelastung zurückzuführen. Echokardiographische Studien an ähnlichen AoB-Tiermodellen zeigen vergleichbare Ergebnisse [51].

Hemmung der C-P4H führte zu einer Reduktion des durch Druckbelastung erhöhten LVEDP und des relativen Lungengewichtes sowie zu einer - durch Anstieg der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit gezeigten - Verbesserung der myokardialen Kontraktilität, die durch AoB eingeschränkt wurde. Morphologisch zeigten sich hingegen keine Veränderungen, Wanddickenzunahme und linksventrikuläre Diameter sowie das relative Herzgewicht waren unverändert. Dies spricht – für sich betrachtet – für eine Verbesserung der diastolischen Compliance des LV mit Abnahme der myokardialen Steifigkeit, da die LV Relaxation eng mit dem Grad der Hypertrophie korreliert ist [11]. Offensichtlich kann die Hypertrophie allein nicht ursächlich für die diastolische Funktionsstörung sein. Hypertrophie wird durch die fortbestehende Druckbelastung aufrechterhalten. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine hämodynamische Entlastung des LV nach Gabe von FG0041 durch Verbesserung der kontraktilen Eigenschaften und Regredienz der diastolischen Funktionsstörung. Hinsichtlich dieser Ergebnisse könnte die Hemmung der Aktivität der C-P4H eine neue therapeutische Alternative darstellen.

Hemmung der HIF-P4H führte zu einem deutlich erhöhten relativen Herzgewicht, was auf eine Stimulation der Hypertrophie deutet. Die Wanddicken des LV waren dennoch unverändert. Auch eine hämodynamische Entlastung des LV durch HIF-P4HI erfolgte nicht, Veränderungen unter AoB wurden tendenziell verstärkt. Da HIF1 $\alpha$  und dessen im Rahmen transkriptioneller Regulation vorhandene Zielgene wie z. B. VEGF [53] nach Druckbelastung durch Wandstress hochreguliert sind [45], ist es möglich, dass die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  kein therapeutisches Ziel in einem frühen Zeitraum der LV Druckbelastung nach Entwicklung von Hypertrophie und Fibrose darstellt. Diese Ergebnisse deuten auf eine fehlende hämodynamische Entlastung bei bestehender diastolischer Funktionsstörung unter Gabe von FG2216 bei fortbestehender Druckbelastung.

### 5.3 Veränderungen durch AoB und P4HI bei Wachstumsfaktoren

Auf molekularer Ebene kam es unter AoB zu einer Induktion der Gen- und Proteinexpression der hier gemessenen Wachstumsfaktoren. Auffällig waren eine deutliche Induktion von CTGF und TGF $\beta$ 1 sowie ein enger Zusammenhang der Wachstumsfaktoren mit morphologischen und hämodynamischen Parametern. Hypertrophe Stimuli induzieren TGF $\beta$ 1, dessen Blockade myokardiale Fibrose und diastolische Dysfunktion nach Druckbelastung durch fehlende Einwirkung auf Fibroblasten vermindern kann [56]. Insofern ist die Induktion der gemessenen Wachstumsfaktoren durch Druckbelastung nachzuvollziehen. Zwischen pro-hypertrophen und profibrotischen Wachstumsfaktoren besteht eine enge regulative Beziehung. So kann z. B. CTGF durch TGF $\beta$ 1 induziert werden, wodurch eine Steigerung der Synthese von ECM Proteinen (Kollagen Typ I, Fibronectin) induziert wird [57]. Die Korrelation der Wachstumsfaktoren untereinander deutet auf eine regulative Beziehung innerhalb dieses Systems. Integrine üben eine primäre Funktion als Adhäsionsmoleküle aus und binden an extrazelluläre Matrix-Komponenten [58].  $\beta$ 1-Integrin ist vor allem in Kardiomyozyten exprimiert [59]. Durch hypertrophe Reize im Rahmen einer chronischen Druckbelastung zeigte sich auch in vorherigen Arbeiten eine Heraufregulation im Myokard [32]. Eine spezifische Hemmung der  $\beta$ 1-Integrin-Funktion durch Unterdrückung der Genexpression führte zu früher Herzinsuffizienz unter Druckbelastung [60]. Auch die erhöhte Expression von OPN deutet auf eine kompensatorische Hypertrophie durch Druckbelastung, da die Ablation des OPN-Gens eine inadäquate hypertrophe Antwort des LV erzeugt [61]. Insofern ist die hier gesehene Induktion im AoB-Modell nachzuvollziehen.

Die funktionelle Verbesserung nach Gabe von FG0041 wurde von einer Reduktion der druckinduzierten Genexpression der Wachstumsfaktoren begleitet. Dies könnte in Zusammenhang mit der hämodynamischen Entlastung des LV auf eine verminderte Aktivierung von Hypertrophie und Fibrose, die Effekte der vermehrten Faktorexpression sind, deuten, da der hämodynamische Reiz in diesem Modell fortbestand. Auch die reduzierte Expression von  $\beta$ 1-Integrin innerhalb des Verlaufes unter Inhibition der P4H könnte auf einen verminderten hypertrophen Reiz bzw. eine vermindert notwendige Anpassungsreaktion auf die hämodynamische Belastung durch verbesserte myokardiale Kontraktilität bei abnehmender Fibrosierung deuten. Auffällig bleibt, dass die Proteinregulation divergent von der Genexpression war. Es ist jedoch möglich, dass die Dauer der Behandlung nicht ausreichend war, um eine Reduktion der initial induzierten Proteinexpression zu bewirken und die reduzierte mRNA-Expression somit einer später folgenden verminderten

Proteinexpression vorangeht, da die Hypertrophie fortbestand. Hierauf deutet – trotz Tendenz zur Reduktion - auch die letztlich unveränderte Expression von OPN.

Unter Gabe des HIF-P4HI FG2216 zeigte sich hinsichtlich der Genexpression der Wachstumsfaktoren tendenziell keine Veränderung im Vergleich zu AoB bzw. eine Verstärkung der bereits bestehenden Induktionen (z.B. OPN). Da HIF1 $\alpha$  direkt die Expression von CTGF [62] und TGF $\beta$ 1 [63] induziert, ist es möglich, dass so die bestehenden Veränderungen unter Druckbelastung auch nach Gabe von FG2216 aufrecht erhalten wurden. Die unverändert bestehende erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren könnte so über die bestehende bzw. geförderte Hypertrophie und Fibrose zu einer fehlenden Entlastung des LV und somit zu einem fehlenden Effekt der HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung auf Hypertrophie und Fibrose beigetragen haben.

Hinsichtlich der Expression von HIF 1 und 2 zeigte sich nach Gabe von FG2216 tendenziell eine erhöhte Expression beider Faktoren. Diese war zwar nicht signifikant gegenüber der AoB-Gruppe, jedoch ist dies bei einer 2-fachen Induktion gegenüber der Sham-Gruppe am ehesten durch die hohe Schwankungsbreite zu erklären. Trotzdem wird im Vergleich zur Expression beider Faktoren unter FG0041 die höhere Spezifität von FG2216 zur HIF-Stabilisierung bzw. von FG0041 zur Hemmung der C-P4H verdeutlicht [64].

#### **5.4 Veränderungen durch AoB und P4HI in der ECM**

Im Rahmen der Untersuchung der ECM zeigte sich eine Induktion der Gen- und Proteinexpression von Matrix Metalloproteinasen durch Druckbelastung des LV. TIMP1 und 2 wurden ebenfalls induziert. Bei TIMP3 und 4 zeigte sich keine Veränderung. In der Untersuchung der entsprechenden Quotienten zeigte sich entsprechend ein deutlich höherer Quotient zwischen MMPs und TIMPs unter Druckbelastung, was auf einen erhöhten ECM-Umsatz hindeutet. Der 8-fache Anstieg der TIMP-1 Expression kann die Balance im MMP-TIMP-Gleichgewicht verschieben, wie dies z.B. in humanem Myokard bei Vorliegen von Herzinsuffizienz infolge Aortenstenose der Fall ist [22]. Dies wurde auch gestützt von einem vermehrten Kollagen-Gehalt an Kollagen Typ I und III. Die hier beschriebene Regulation von MMPs, TIMPs und Kollagen durch AoB entspricht den in bereits veröffentlichten Studien beobachteten Veränderungen [20, 44]. Die Veränderung des Kollagen-Abbaus führt zu einem vermehrten Anfall von Kollagen-Abbau-Produkten. Diese könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Genexpression haben. Diese Regulation wurde bereits bezüglich des Einflusses von Kollagen Typ IV-Fragmenten auf die Expression von MT1-MMP [65] sowie des C-

terminalen pro-Peptids von Typ II Prokollagen auf die Regulation von Prokollagen Typ II [66] beschrieben. Die ECM besteht aus vielen Proteinen, u. a. Fibronectin, Laminin und Kollagen. Hauptkomponente der myokardialen ECM sind jedoch die Kollagene Typ I und III. Funktionell dient die ECM als Struktur- und Verbindungskomponente zu Kardiomyozyten, Kraft-Mediator und passiv funktionelle Komponente im Rahmen der diastolischen Festigkeit [67]. 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 [68]. Fibrose bei Druckbelastung ist ein früh auftretender Prozess, der sowohl durch Vermehrung der Synthese von ECM-Proteinen als auch durch Proliferation von Fibroblasten bedingt ist [69]. Insofern liegt es nahe, dass die im AoB-Modell der Druckbelastung gesehene diastolische Funktionsstörung durch LV Fibrose bei vermehrter Kollagen-Expression bedingt ist. Alternativ kann die Kollagen-Speicherung durch einen eingeschränkten Kollagen-Metabolismus entstehen. Substrat des Kollagen-Metabolismus sind MMPs und TIMPs, deren Balance zwischen Kollagenspeicherung und -abbau entscheidet. So können die im hämodynamisch unbeeinflussten Herzen vorhandenen Kollagen-Proteine zunächst durch eine erhöhte MMP-Aktivität abgebaut werden und durch eng vernetzte Kollagen-Proteine im Rahmen der konzentrischen Hypertrophie [70] bzw. wenig vernetzte Proteine im Falle einer LV Dilatation [71] im Rahmen der interstitiellen Fibrose ersetzt werden. MMPs zeigen bei myokardialen Erkrankungen ein spezifisches Regulationsmuster [72]. Die Induktion der MMP-Expression erfolgt durch eine für das jeweilige Gen spezifische Promotor-Region mit verschiedenen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, z. B. der ActivatorProtein-1 Bindungsstelle [73]. TGF $\beta$ 1 kann die Expression von MMPs über das TGF $\beta$ 1 inhibitory element (TIE) beeinflussen [74]. Hierüber erfolgt zwar einerseits die Induktion von MMP2 und 9, andererseits jedoch auch die TIMP-Expression, was zu einer Drosselung der proteolytischen Gesamtaktivität im MMP-TIMP-System führt [75]. In der vorliegenden Studie bestand ebenfalls ein enger Zusammenhang zwischen Zytokin- und Genexpression der MMPs und TIMPs. Es zeigte sich auch eine Induktion der proteolytischen Gesamtaktivität unter erhöhter Wachstumsfaktorexpression, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die hier gesehenen Veränderungen durch weitere Faktoren beeinflusst werden. Es liegt nahe, dass der erhöhte Wandstress innerhalb des LV durch erhöhten LVEDP hierfür verantwortlich ist, da dieser die Induktion von MMP2 und 9 in Fibroblasten bewirken kann [76].

Veränderungen der Genexpression in der ECM zeigten sich unter Inhibition der C-P4H in einer reduzierten Induktion von MMP2 sowie einer verminderten Expression der durch AoB



induzierten Gene von TIMP1 und 2. Auffällig war, dass sich - trotz der deutlichen Induktion weiterer MMPs und trotz Regredienz der hämodynamischen Veränderungen und des Kollagengehaltes - die übrigen hier gemessenen kollagenolytischen Enzyme weiterhin auf erhöhtem Niveau befanden. Auch eine deutlich verminderte Proteinexpression ließ sich bei den MMPs nicht finden. Im Rahmen der Proteinexpression kam es dennoch zu verminderten MMP-TIMP-Quotienten, was bei verminderter MMP-Aktivität auf eine regrediente Fibrose bei vermindertem ECM-Umsatz deutet [77]. Unter Gabe von FG0041 kam es somit zu einem verminderten LV Remodeling. King et al. untersuchten 2003 den Effekt eines selektiven MMP1-Inhibitors bei chronischer Herzinsuffizienz infolge anhaltender Tachykardien im Tiermodell. Unter Hemmung von MMP1 kam es dabei zu einer Reduktion der linksventrikulären Dysfunktion und Remodelings [78]. Insofern kann spekuliert werden, dass die Reduktion der druck-induzierten Veränderungen im MMP-TIMP-System zu den positiven hämodynamischen Effekten durch C-P4H-Inhibition beigetragen hat. Das verminderte Remodeling spiegelte sich ebenfalls in einem verminderten myokardialen Kollagengehalt wider, der auf das Sham-Ausgangsniveau reduziert werden konnte. Somit konnte durch Inhibition der C-P4H ein Effekt auf die myokardiale Fibrose und das LV Remodeling erreicht werden, der der Wirkung von ACE-Inhibitoren bei myokardialer Fibrose durch Hypertension vergleichbar ist [79]. Bisherige neue therapeutische Alternativen zur Behandlung pathologischen LV Remodelings zielten auf eine spezifische Inhibition der vermehrten MMP-Aktivität [78] bzw. Hemmung der Stimulation dieser Aktivität durch Zytokin-Inhibition. In der o. g. Studie zeigte sich eine Verbesserung der myokardialen Funktion durch Reduktion der myokardialen Steifheit bei verminderter Kollagen-Speicherung nach MMP-Inhibition. Eine vermehrte Kollagen-Speicherung durch eine erhöhte Genexpression könnte hierdurch jedoch nicht beeinflusst werden, da durch die Aktivität von Wachstumsfaktoren die Synthese-Aktivität von Fibroblasten weiterhin stimuliert würde. Auch in Zusammenhang mit der reduzierten Expression der profibrotischen Wachstumsfaktoren könnte FG0041 somit eine neue therapeutische Alternative bei myokardialer Fibrose durch chronische Druckbelastung bzw. bei diastolischer Dysfunktion mit LV Restriktion darstellen.

Durch Inhibition der HIF-P4H wurde die Genexpression der MMPs tendenziell weiter induziert, was sich auch auf Proteinebene widerspiegelte. Im Gegensatz zur Gabe von FG0041 kam es hierbei zu einer signifikant erhöhten MMP-Aktivität. Gleichzeitig erfolgte ebenfalls eine Heraufregulation von TIMP1. Dies führte einerseits zu erhöhten MMP-TIMP-Quotienten auf mRNA-Ebene, andererseits jedoch zu reduzierten Quotienten auf Protein- und Aktivitätsebene. Vor dem Hintergrund einer weiterhin verminderten myokardialen



Compliance in dieser Gruppe scheint jedoch die Fibrose fortzubestehen. Hierauf deutet auch, dass die Kollagenexpression tendenziell erhöht war. Festzuhalten bleibt, dass unter FG2216 eine diskordante Regulation auf translationeller und transkriptioneller Ebene besteht. Dies erscheint insofern schlüssig, als dass MMPs auf translationeller und transkriptioneller Ebene bei hypoxischen Bedingungen unterschiedlich reguliert werden. Dieser Effekt wird durch die HIF-P4H vermittelt [80]. Somit könnte dieser Effekt direkt durch die HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung erreicht worden sein. Ebenso kommt es unter hypoxischen Bedingungen neben der Induktion von HIF zu einer vermehrten Synthese von Kollagen Typ I und einer Induktion von TIMP-1 in Fibroblasten [81]. Somit wurden das fortbestehende LV Remodeling und die Fibrose am ehesten durch eine fortbestehende MMP-TIMP-Dysbalance verursacht. Aufgrund der fortbestehenden Veränderungen der ECM und der augmentierten Fibrose erscheint daher die Hemmung der HIF-P4H, auch vor dem Hintergrund der fortbestehenden LV Restriktion, im Rahmen einer LV Druckbelastung nicht erstrebenswert.

### **5.5 Veränderungen durch AoB und P4HI bei neurohumoralen Faktoren**

Unter LV Druckbelastung zeigte sich im Rahmen des AoB-Modells eine neurohumorale Aktivierung des Endothelin- und Angiotensinsystems mit vermehrter Expression der Neurohormone und Rezeptoren. Bekannt ist, dass bei chronischer Druckbelastung humorale Faktoren wie das Renin-Angiotensin-System sowie das Endothelinsystem den Prozess der Hypertrophie modulieren können [82]. Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor, der über die Induktion von early-immediate Genen auch eine Stimulation des Myozyten-Wachstums bewirken kann [83]. Es zeigt dabei eine biphasische Regulation mit Induktion der mRNA-Expression sowohl im frühen als auch im fortgeschrittenen Stadium konzentrischer Hypertrophie bei Druckbelastung des LV [13]. Dies wird durch mehrere Regulationsmechanismen möglich, die auf die ET-Expression wirken. So kann Wandstress, der bei Druckbelastung akut erhöht ist, die ET1-Expression induzieren. Auch Angiotensin II, das bei chronischer LV-Belastung durch arteriellen Hypertonus induziert ist, kann über cis-Promotor Elemente die mRNA-Expression von ET1 stimulieren [84]. ET1 wird im letzten Schritt durch ECE-1 aktiviert. Auch ECE-1 wird durch chronische Druckbelastung induziert [13]. Insofern erscheint die hier gezeigte Regulation schlüssig. Endothelin vermittelt seine Effekte über ETR $\alpha$  und ETR $\beta$ . Beide sind G-Protein gekoppelte membrane-gebundene Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität. ETR $\alpha$  ist vor allem auf Kardiomyozyten und glatten Gefäßmuskelzellen vorhanden. Seine Aktivierung bewirkt Gefäßkonstriktion und

Zellproliferation. ETR $\beta$  ist vor allem auf Endothelzellen exprimiert und übt eine vasodilatatorische Funktion durch Induktion der NO-Produktion aus. In gewisser Weise agieren ETR $\alpha$  und ETR $\beta$  somit antagonistisch. Dies wird auch dadurch gestützt, dass eine kombinierte ETR $\alpha$ /ETR $\beta$ -Inhibition in experimentellen Modellen von kardiovaskulären Erkrankungen keine Effekte auf das LV Remodeling, Blutdruck oder Hämodynamik zeigt [85]. Durch Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems kommt es zu einer Verschiebung der Rezeptor-Expression, so dass diese Dysbalance pathologische Effekte vermittelt [86]. Insofern überrascht, dass in dieser Studie sowohl ETR $\alpha$  als auch ETR $\beta$  nach Druckbelastung induziert waren. Zwar ist bekannt, dass ETR $\alpha$  durch AoB induziert wird, es gibt jedoch nur wenige Erfahrungen hinsichtlich der Expression von ETR $\beta$  im Modell der chronischen Druckbelastung. Die Hochregulation von ETR $\alpha$  kann auf die Notwendigkeit der Erhöhung der myokardialen Kontraktilität deuten, was sich hämodynamisch in der AoB-Gruppe in einer erhaltenen systolischen LV-Funktion zeigte. Der chronische Einfluss des aktivierten Endothelinsystems könnte eine hypertrophe Reaktion des Myokards und eine Verhinderung von Apoptose bewirkt haben [87]. Die Induktion von ETR $\beta$  könnte auf die Notwendigkeit einer vasodilatatorischen Wirkung - bei gleichzeitig vorhandenen vasokonstriktorischen Effekten von ETR $\alpha$  - deuten. Letztendlich kann jedoch die Frage nach den genauen Effekten dieser dualen Induktion nicht geklärt werden. Insgesamt zeigt sich in dem hier vorliegenden Modell eine Aktivierung des Endothelin- und Angiotensin-Systems, was auf die hämodynamische Belastung nach AoB mit Entwicklung einer hypertrophen Reaktion deutet. Unter Inhibition der C-P4H war die neuroendokrine Aktivierung vermindert. Die Expression von ECE1 und ETR $\beta$  war signifikant reduziert. Auffällig ist, dass die Induktion von ETR $\alpha$  bestehen blieb. Dies könnte die persistierende Hypertrophie trotz hämodynamischer Entlastung des LV in dieser Medikationsgruppe erklären. Zwar zeigte ET-1 eine Tendenz zur Reduktion im Vergleich zu AoB, jedoch blieb der Einfluss des Peptids weiterhin bestehen. Dies könnte partiell durch die Herabregulation von ETR $\beta$  zu erklären sein, da eine weitere Funktion des Rezeptors in der Elimination des zirkulierenden Peptids besteht [88]. Die Korrelation zwischen ET-1 und dem relativen Herzgewicht deutet ebenfalls hierauf. Ebenso könnte aufgrund des genannten Einflusses von Angiotensin auf die Expression von ET-1 die persistierende Induktion von AT-1 hierzu beigetragen haben. Die verminderte Expression von ECE-1 in diesem Rahmen kann durch verminderte Aktivierung von ET-1 zur frühen hämodynamischen Entlastung beigetragen haben, da die Aktivierung von ECE-1 langsam erfolgt. Ebenso deuten die in dieser Gruppe gesehenen Expressions-Veränderungen vor dem Hintergrund eines persistierenden Einflusses von ECE-1 und ETR $\beta$  nach Gabe von FG2216

auf einen signifikanten Einfluss auf die hämodynamische Entlastung. Hierauf deutet auch die enge Korrelation zwischen ECE-1 und LVEDP. Dennoch kann allein aufgrund der Expressionsdaten kein endgültiger Schluss bezüglich des funktionellen Einflusses dieser Regulation gezogen werden. Insgesamt zeigte sich somit unter Gabe von FG0041 eine moderate Entlastung der Stimulation der neurohumoralen Faktoren bei persistierendem Einfluss von ET-1 auf die Hypertrophie des LV.

Im Rahmen der HIF-P4HI bestanden keine signifikanten Veränderungen auf neurohumoraler Ebene im Vergleich zur AoB-Gruppe. Obwohl es keine spezifischen Daten für die Regulation der hier untersuchten neurohumoralen Faktoren unter Gabe eines HIF-P4HI gibt, ist anzunehmen, dass die beobachteten Effekte direkt auf die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  zurückzuführen sind. Grund hierfür ist die vermehrte Expression von ET-1 in Endothelzellen nach Administration von Hydralazin, welches ebenfalls HIF1 $\alpha$  stabilisiert [89]. Dies könnte zu den persistierenden hämodynamischen und morphologischen Veränderungen unter Gabe von FG2216 beigetragen haben. Hierauf deutet auch, dass im Vergleich zur Gabe von FG0041 kein Unterschied sowohl auf neurohumoraler als auch auf hämodynamischer Ebene zu detektieren war. Die in dieser Gruppe gesehene verstärkte Hypertrophie könnte ebenfalls durch den persistierenden Einfluss von ET-1 zu erklären sein. Insgesamt bleibt somit festzuhalten, dass die Inhibition von HIF-P4H in einer fehlenden Entlastung hinsichtlich der erhöhten Expression neurohumoraler Faktoren resultierte, so dass die Gabe dieser Substanz unter chronischer Druckbelastung unter diesem Aspekt nicht erstrebenswert erscheint.

## **5.6 Die Regulation und Rolle von Melusin im Rahmen der druckinduzierten Hypertrophie**

Melusin wurde durch chronische Druckbelastung im Rahmen dieses Tiermodells induziert. Auch die nachfolgende Signalkaskade zeigte eine Aktivierung durch eine erhöhte Expression von phosphoryliertem Akt.

Die genetische Hemmung von Melusin wird begleitet von einer verminderten Antwort auf hypertrophe Reize. Melusin knock-out Mäuse entwickeln eine linksventrikuläre Dilatation und Herzinsuffizienz als Antwort auf Druckbelastung durch aortales Banding. Dies deutet auf eine Rolle von Melusin im Rahmen der Entwicklung kompensatorischer myokardialer Hypertrophie durch biomechanische Stimuli [37]. Zum Zeitpunkt dieser Studie existierten jedoch keine Daten bezüglich der Regulation von Melusin durch Hypertrophie beim Menschen oder in Tiermodellen. Ziel der Untersuchung von Melusin im Rahmen dieser Studie war es daher, die Regulation von Melusin nach Druckbelastung zu untersuchen. Es

zeigte sich eine Hochregulation sowohl der Melusin-Expression auf translationeller und transkriptioneller Ebene als auch des zugehörigen phosphorylierten Signalkaskaden-Proteins Akt. Es kann daher spekuliert werden, dass die Melusin-Regulation in der frühen Phase der Druckbelastung zur Erhaltung der myokardialen Funktion über die Aktivierung von Akt beiträgt, da die Ejektionsfraktion erhalten war und keine linksventrikuläre Dilatation stattfand. Diese Vermutung wird zumindest von bereits vorliegenden Daten früherer Studien unterstützt, da Melusin knock-out zu einer Verminderung von Akt- und GSK-3 $\beta$ -Phosphorylierung führt. Akt ist eine Kinase, die GSK-3 $\beta$  phosphoryliert und inaktiviert [90]. Diese Inaktivierung erlaubt die nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren NFAT und GATA4, welche im Rahmen der hypertrophen Antwort für die Expression weiterer, Hypertrophie-verbundener Gene benötigt sind [91]. Interessanterweise zeigten sich im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls eine Hochregulation von MMPs sowie ein enger Zusammenhang zwischen der MMP-Expression, den gemessenen Wachstumsfaktoren und Melusin. Obwohl sich die Regulation von MMPs und TIMPs im Tiermodell von der Regulation beim Menschen unterscheidet [22], lässt sich hier auf eine Abfolge von Ereignissen spekulieren, bei denen mechanischer Stress und Hypertrophie zunächst zu einem vermehrten ECM-Umsatz unter vermehrter Melusin- und MMP-Expression führt. In einem späteren Stadium könnten diese Veränderungen zu einer Reduktion der Melusin Expression und MMP-Inaktivierung mit nachfolgender Fibrosierung und ventrikulärer Dilatation führen. Die Hochregulation von Melusin und die damit verbundenen Aktivität der Signalkaskade könnten somit zum Erhalt der myokardialen Funktion in diesem Tiermodell beitragen haben. Eine Hemmung dieser Kaskade könnte daher neue therapeutische Strategien eröffnen.

### **5.7 Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 im Rahmen der Kollagen-Synthese bei hochgradig eingeschränkter LV-Funktion**

Kardiale Fibroblasten sind in die Synthese und den Umbau des kardialen Interstitiums involviert. Sie synthetisieren Kollagene und Matrix-Enzyme, welche zur mechanischen Unterstützung sowohl der Funktion einzelner Myozyten als auch der gesamten mechanischen Funktion des Herzens notwendig sind. Erhöhte Speicherung von Proteinen der ECM im Herzen führt jedoch zu pathologischen Veränderungen. Eine systolische Dysfunktion ist gekennzeichnet durch einen erhöhten myokardialen Kollagen-Gehalt. Im Rahmen der DCM ist der Gehalt an LV Kollagen ebenfalls erhöht [92]. Der Einfluss von TGF $\beta$ 1 könnte hier eine mögliche Rolle spielen. Bekannt ist, dass bei DCM-Patienten der Plasma-Spiegel von TGF $\beta$ 1

doppelt so hoch wie bei Kontroll-Personen ist [93]. Die Aktivierung von Ziel-Genen von TGF $\beta$ <sub>1</sub>, z.B. SMAD2 und SMAD4, ist ebenfalls mit kardialer Fibrose, erhöhtem Kollagen-Umsatz und der Entwicklung einer DCM assoziiert [94]. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von TGF $\beta$ <sub>1</sub> bei der Entwicklung einer systolischen Dysfunktion im Rahmen der sich entwickelnden Fibrose. Unbekannt jedoch ist, in wie weit TGF $\beta$ <sub>1</sub> Einfluss auf die Expression von ECM-Proteinen in Fibroblasten aus Herzen von DCM-Patienten hat. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, diesen Effekt zu charakterisieren.

Im Rahmen der Zellkulturuntersuchungen zeigte sich eine differentielle Induktion von Kollagen mit einer höheren Expression bei Zellen aus Herzen mit systolischer Funktionseinschränkung. Dies entspricht den Ergebnissen der oben genannten Studie, die ebenfalls eine erhöhte Kollagen Typ1 Gen- und Proteinexpression in DCM-Herzen nachweisen konnte. Ausschlaggebende Zellen scheinen hierfür Fibroblasten zu sein, die in dieser Untersuchung in Reinkultur untersucht wurden. TGF $\beta$ <sub>1</sub> hatte auf die Genexpression von Kollagen Typ 1 keinen Effekt, es konnte jedoch eine Stimulation der Proteinexpression in Zellen aus Spender-Herzen nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass Spender-Herzen sensibler für eine Stimulation mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> sind. Durch die bereits vorhandene Induktion der Kollagen-Expression in DCM-Herzen ist es jedoch möglich, dass der zusätzlich stimulierende Effekt von TGF $\beta$ <sub>1</sub> maskiert wurde. TGF $\beta$ <sub>1</sub> hatte keinen Effekt auf die Expression von MMPs. Dies erscheint zunächst in Widerspruch zu bereits durchgeführten Studien zu stehen [24]. Fibroblasten-Kulturen anderer Organe zeigen jedoch ein ähnliches Expressions-Profil von MMPs unter TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation wie die hier untersuchten Zellen [95], so dass der Einfluss weiterer Faktoren nicht ganz ausgeschlossen werden kann. Ebenso ist es möglich, dass die maximale Stimulationszeit von 24 Stunden zu kurz für eine signifikante Expressionsregulation der MMPs war. Hinsichtlich der MMP-Aktivität zeigte sich jedoch eine Induktion in DCM-Fibroblasten unter TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation. Auch die absolute MMP2-Aktivität war im Vergleich zu Spender-Fibroblasten erhöht. Dies spricht für einen erhöhten ECM-Umsatz in Fibroblasten von DCM-Patienten, der zumindest innerhalb der Stimulationszeit von 24 Stunden durch Aktivierung des bereits vorhandenen Enzyms, nicht durch Steigerung der Expression, erreicht wird. Hinsichtlich der Regulation der TIMPs hatte TGF $\beta$ <sub>1</sub> keinen Effekt auf die TIMP1-Expression, wohingegen TIMP2 bei DCM-Patienten unter Stimulation signifikant vermindert war. Dies deutet auf einen erhöhten MMP-TIMP-Quotienten bei DCM-Patienten und somit auf einen erhöhten ECM-Umsatz bei eingeschränkter LV-Funktion. Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass nach TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Stimulation eine differentielle Regulation des MMP-TIMP-Systems erfolgt, die bei

eingeschränkter LV-Funktion zu einem erhöhten ECM-Umsatz und nachfolgend zu einer vermehrten Kollagen-Speicherung führt. Fibroblasten scheinen im Prozess der Wachstumsfaktor-vermittelten Fibrose eine wesentliche Rolle zu spielen. Zudem unterstützen diese Daten die Rolle der Regulation der profibrotischen Wachstumsfaktoren des AoB-Modells und den positiven Einfluss der C-P4H-Inhibition nach Regredienz der erhöhten Wachstumsfaktor-Expression.

### **5.8 Hemmung der C-P4H bei chronischer Druckbelastung durch AoB im Tiermodell – eine therapeutische Alternative?**

Kollagen-Prolyl 4-Hydroxylasen sind Schlüsselenzyme der Kollagen-Synthese, welche die Hydroxylierung von Prolin-Resten katalysieren und so die Synthese einer thermo-stabilen Kollagen-Helix bewirken. Die Inhibition der P4H führt daher zur Produktion von thermoinstabilem Kollagen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, welches anschließend abgebaut werden kann. Der oral verfügbare P4H-Inhibitor FG0041, welcher in der vorliegenden Studie verwendet wurde, reduzierte die Kollagen-Hydroxilierung, das LV Remodeling und verbesserte die Mortalität nach akutem Myokardinfarkt im Tiermodell der Ratte [44]. Zuvor konnte gezeigt werden, dass weitere Substanzen (zuvor charakterisiert als C-P4HI) gleichfalls die drei Isoformen der HIF-P4H inhibieren [43]. Die  $K_i$ -Werte für die Hemmung der HIF-P4H waren jedoch 5-fach (im Falle der HIF-P4H-Isoformen 2 und 3) bzw. 15-fach (im Falle der HIF-P4H Isoform 1) höher verglichen mit den  $K_i$ -Werten für die Hemmung der C-P4H ( $K_i$  2  $\mu$ M, [64]). Dies zeigt, dass FG0041 ein deutlich spezifischerer Inhibitor der C-P4H als der HIF-P4H ist.

In unserer Studie reduzierte FG0041 den durch AoB induzierten LVEDP sowie das relative Lungengewicht und verbesserte die maximale Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt$ , was auf eine Reduktion der LV Festigkeit und eine Verbesserung der LV systolischen und diastolischen Funktion deutet. FG0041 reduzierte auch die mRNA- und Proteinexpression von Kollagen Typ I und III, die durch AoB induziert wurden. Es liegt daher im Rahmen der Möglichkeiten, dass diese Veränderung auf molekularer Ebene für die funktionelle Verbesserung verantwortlich ist. Analog den Effekten von Lathyrogen-B Aminopronitril („BAPN“; [96]), konnte – ebenfalls durch Hemmung der Kollagensynthese – eine progrediente diastolische Steifheit des Ventrikels bzw. progrediente diastolische Dysfunktion verhindert werden. Der Anstieg von TIMP1 wurde durch Gabe des P4HI rückgängig gemacht. Dies kann ebenfalls zur Reduktion des Kollagen-Gehaltes beigetragen haben. Die Gabe des

C-P4HI führte zu einer Herunterregulation der AoB-induzierten Expression der Wachstumsfaktoren und reduzierte die Aktivierung des Endothelinsystems. Jedoch konnten weder die LV Wanddicke noch das relative Herzgewicht innerhalb der 4-wöchigen Studiendauer in den mit C-P4HI behandelten Tieren normalisiert werden. Die während der Behandlung fortbestehende Druckbelastung führte vermutlich zu einer vermehrten systolischen Wandbelastung und zu einer Aktivierung des lokalen Renin-Angiotensin-Systems, welches durch bereits vorliegende Studien bekannt ist und auch durch Erhöhung des AT1 in der vorliegenden Studie nahe gelegt wird [21, 97]. Dies führte vermutlich zu einer Persistenz der Hypertrophie. Es liegt daher nahe, dass die 4-wöchige Studiendauer zu kurz für eine signifikante Reduktion der LV Hypertrophie war. Insgesamt stellt die Inhibition der C-P4H somit eine neue Alternative zur Therapie der fibrotischen Veränderungen des LV durch Druckbelastung dar, jedoch sind Studien mit längerer Untersuchungsdauer notwendig, um den Effekt der Inhibition der C-P4H auf eine mögliche Regredienz der druckinduzierten Hypertrophie zu untersuchen.

### **5.9 Hemmung der HIF-P4H bei chronischer Druckbelastung durch AoB im Tiermodell – (k)eine therapeutische Alternative?**

Inhibition von HIF-P4H verhindert die Bindung einer OH-Gruppe (Hydroxylierung) an Prolin-Reste des Proteins HIF-1 $\alpha$ . Fehlende Hydroxilierung von HIF-1 $\alpha$  führt zu einer verminderten Bindung des Enzyms Ubiquitin-Protein Isopeptid Ligase, dem von-Hippel-Lindau-Protein. Dies führt zu einer fehlenden Ubiquitynylierung des Proteins und damit zu einer fehlenden Degradation durch das Proteasom. Nach der Stabilisierung kann HIF-1 $\alpha$  mit HIF-1 $\beta$  heterodimerisieren, an Hypoxie-responsive Elemente binden und so bestimmte Gene aktivieren [98]. Durch die pathophysiologischen Veränderungen bei chronischer Druckbelastung kommt es unter anderem zu erhöhtem myokardialen Sauerstoff-Verbrauch sowie zu koronarer Minderperfusion, wodurch in Zusammenhang mit der LV Hypertrophie eine relative Myokardischämie begünstigt wird.

In unserer Studie konnten die hämodynamischen Veränderungen unter AoB nach Gabe von FG2216 nicht antagonisiert werden, diastolische und beginnende systolische Dysfunktion bestanden weiterhin. Zudem wurde die bereits bestehende LV Hypertrophie aggraviert. Die weiterhin bestehende Kollagen-Akkumulation könnte zu den beobachteten morphologischen und hämodynamischen Veränderungen beigetragen haben. Ebenfalls kam es zu einem verminderten ECM-Umsatz mit Abfall der MMP-TIMP-Quotienten sowie erhöhter TIMP-



Expression. Unter AoB bestehende Veränderungen der Wachstumsfaktor-Expression konnten ebenfalls nicht rückgängig gemacht werden. In der Medikationsgruppe des HIF-P4HI bestand die Aktivierung des Angiotensin- und Endothelinsystems fort, was ebenfalls zur fehlenden hämodynamischen Entlastung des LV beigetragen haben kann.

Festzuhalten bleibt somit, dass die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  in der frühen Phase der chronischen Druckbelastung keine positiven Effekte auf Morphologie und Hämodynamik des LV sowie die profibrotische und pro-hypertrophe Gen- und Proteinexpression zeigt. Ein weiterer Effekt der HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung ist die vermehrte Expression von Erythropoetin, was zu einer Stimulation der Hämoglobin-Bildung führt [99]. Obgleich bei bereits vorhandener LV Hypertrophie ein höherer Hämoglobin-Wert positiven Einfluss auf die Hypertrophie hat, kann dieser die LV Geometrie negativ beeinflussen, zu arterieller Hypertension und einer Progression der Symptome der diastolischen Dysfunktion führen [100]. Diese Effekte könnten somit zu den beobachteten Veränderungen unter HIF-P4HI beigetragen haben. Da in dieser Phase HIF1 $\alpha$  bereits vermehrt exprimiert wird, ist es möglich, dass die Effekte der endogenen Expression zur Kompensation der relativen Myokardischämie ausreichen bzw. diese Ischämie in der frühen Phase der Druckbelastung keinen signifikanten Einfluss auf die Progression der LV Veränderungen hat. Somit stellt die Gabe eines HIF-P4HI derzeit keine therapeutische Alternative zur Therapie der fibrotischen und hypertrophen Veränderungen des LV durch Druckbelastung dar.

### **5.10 Limitationen**

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der P4H Hemmung auf das myokardiale Remodeling innerhalb der frühen Phase der durch AoB induzierten Druckbelastung untersucht. Linksventrikuläre Hypertrophie ist bei Patienten jedoch ein sich über längere Zeit entwickelnder Prozess und myokardiales Remodeling sowie Fibrose sind zumeist zum Zeitpunkt des Entstehens einer klinischen Symptomatik fundiert. Ein Schluss, ob Inhibition der P4H positive Effekte zeigt, wenn eine fundierte Fibrose bereits präsent ist, kann daher nicht gezogen werden. Weitere Studien müssen diesen Punkt adressieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist weiterhin festzustellen, dass die Druckbelastung des Herzens im Tiermodell der Ratte untersucht wurde. Auf Grund der Spezies-Unterschiede sind die Ergebnisse daher nur eingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Da eine Charakterisierung der untersuchten Medikationen im Rahmen der Druckbelastung 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.

Eine weitere Limitierung liegt in der Art der induzierten Druckbelastung. Durch supraaortale Platzierung des Tantalum-Clips besteht zunächst eine akute, erst im weiteren Verlauf eine chronische Druckbelastung des Herzens. Dieser zeitliche Verlauf entspricht nicht dem klinischen Verlauf einer Druckbelastung im Menschen, z. B. durch Aortenstenose. Zwar hätte nach aktueller Literaturlage ein langsam progredientes Modell der Druckbelastung konstruiert werden können, (iTAC, modifiziert nach [101]) jedoch wäre dies nicht etabliert gewesen und ist mit einer hohen Mortalität (>80%) belegt.

Hinsichtlich der Ergebnisse im Zellkulturmodell ist zu beachten, dass eine genaue Charakterisierung der Kontrollgruppe nicht möglich war und auf Grund der gegebenen Anonymität der Spender nur sehr eingeschränkte epidemiologische Daten vorlagen. Es bestand zwar eine normale systolische Funktion der Herzen, eine myokardiale Vorerkrankung, Begleitmedikation bzw. Einschränkung der Interpretation der Ergebnisse durch die Lagerzeit des Organs ist jedoch nicht ganz auszuschließen. Eine bessere Kontrollgruppe wären daher z.B. Myokard-Biopsien von gesunden Probanden gewesen, deren Durchführung jedoch aus offensichtlichen ethischen Gründen nicht möglich ist.

## 6 Zusammenfassung

Druckbelastung des LV führt zu myokardialem Remodeling mit Speicherung von Kollagen, LV Hypertrophie, neurohumoraler Aktivierung und myokardialer Dysfunktion. P4H sind Schlüsselenzyme des Kollagen- und HIF-Metabolismus. Durch Hemmung der P4H bei experimentellem Myokardinfarkt konnte gezeigt werden, dass LV Remodeling reduziert und das Überleben verbessert werden konnte. Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die Rolle der P4H bei durch Druckbelastung induziertem myokardialem Remodeling zu charakterisieren. Hierzu wurden Wistar-Ratten mit aortalem Banding behandelt und anschließend über 28 Tage mit einer Träger-Substanz bzw. dem C-P4HI FG0041 oder dem HIF-P4HI FG2216 behandelt. Zum experimentellen Endpunkt wurden echokardiographische und hämodynamische Daten sowie nach Entnahme des Herzens die Expression von ECM-Proteinen, Wachstumsfaktoren sowie Neurohormonen innerhalb des LV untersucht. AoB führte hierbei zu LV Hypertrophie und diastolischer Dysfunktion mit erhöhtem LVEDP und Lungengewicht bei erhaltener systolischer LV-Funktion. Die Gabe von FG0041 konnte die diastolische Dysfunktion, jedoch nicht die LV Hypertrophie normalisieren. FG2216 zeigte keine hämodynamische Entlastung bei vermehrter LV Hypertrophie. AoB führte zu einer Dysregulation der ECM-modulierenden Enzyme, vermehrter Expression von Wachstumsfaktoren, Induktion von Melusin und Aktivierung des neurohumoralen Systems. Hierbei konnte ein Einfluss von TGF $\beta$ 1 auf die Sekretion von Matrix-modulierenden Enzymen nachgewiesen werden. C-P4HI konnte die Veränderungen der ECM-modulierenden Enzyme teilweise rückgängig machen. Die Induktion von Wachstumsfaktoren wurde gehemmt, die durch AoB induzierte Überexpression von ETR $\beta$  und ECE-1 wurde normalisiert. Die Kollagen-Expression war unter der Medikation im Vergleich zu Sham nicht induziert. HIF-P4HI führte zu gleich bleibend erhöhter Expression von Wachstumsfaktoren, einer erhöhten Expression und Aktivität von ECM-modulierenden Proteinen, erhöhter Kollagen-Expression sowie persistierender Aktivierung von Neurohormonen. C-P4HI führt zu einer Verbesserung der durch chronische Druckbelastung induzierten LV Dysfunktion und vermindert die Dysbalance des profibrotischen ECM Remodelings sowie der hypertrophie-assoziierten Genexpression. Im Gegensatz zu HIF-P4HI könnte die Inhibition der C-P4H daher als therapeutische Alternative zur Behandlung des myokardialen Remodelings, welche druckinduzierte Hypertrophie begleitet, darstellen. Jedoch sind längerfristige Studien zur Evaluation, ob C-P4HI auch LV Hypertrophie reduziert, notwendig.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Stewart, B.F., et al., *Clinical factors associated with calcific aortic valve disease: Cardiovascular Health Study*. J Am Coll Cardiol, 1997. **27**: p. 630-634.
- [2] Iung, B., et al., *Working Group Report: Recommendations on the management of the asymptomatic patient with valvular heart disease*. Eur Heart J, 2002. **23**: p. 1253-1266.
- [3] Otto, C.M., et al., *Association of aortic valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. N Engl J Med, 1999. **341**(3): p. 142-7.
- [4] Zipes, D.P., et al., *Braunwald's Heart Disease*. 7 ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. 2181.
- [5] Hess, O.M., B. Villari, and H.P. Krayenbuehl, *Diastolic dysfunction in aortic stenosis*. Circulation, 1993. **87**(5 Suppl): p. IV73-6.
- [6] Villari, B., et al., *Effect of aortic valve stenosis (pressure overload) and regurgitation (volume overload) on left ventricular systolic and diastolic function*. Am J Cardiol, 1992. **69**(9): p. 927-34.
- [7] Verdecchia, P., et al., *Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(7): p. 1829-35.
- [8] Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* Circulation, 2004. **109**(13): p. 1580-9.
- [9] Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
- [10] Mathew, J., et al., *Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1615-21.
- [11] 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): p. 1477-84.
- [12] Boluyt, M.O., et al., *Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components*. Circ Res, 1994. **75**(1): p. 23-32.
- [13] Schunkert, H., et al., *The cardiac endothelin system in established pressure overload left ventricular hypertrophy*. J Mol Med, 1999. **77**(8): p. 623-30.

- 
- [14] Sakai, S., et al., *Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart.* Circulation, 1996. **93**(6): p. 1214-22.
- [15] Ito, H., et al., *Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes.* Circ Res, 1991. **69**(1): p. 209-15.
- [16] Walther, T., et al., *Regression of left ventricular hypertrophy after surgical therapy for aortic stenosis is associated with changes in extracellular matrix gene expression.* Circulation, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. I54-8.
- [17] Spinale, F.G., et al., *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.* Circulation, 2000. **102**(16): p. 1944-9.
- [18] Lindsey, M.L., et al., *Extracellular matrix remodeling following myocardial injury.* Ann Med, 2003. **35**(5): p. 316-26.
- [19] Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart.* Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.
- [20] Iwanaga, Y., 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 Cardiol, 2002. **39**(8): p. 1384-91.
- [21] Fielitz, J., et al., *Activation of the cardiac renin-angiotensin system and increased myocardial collagen expression in human aortic valve disease.* J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(5): p. 1443-9.
- [22] Fielitz, J., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis.* J Mol Med, 2004. **82**: p. 809-820.
- [23] Eghbali, M., et al., *Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors.* Circ Res, 1991. **69**(2): p. 483-90.
- [24] Stawowy, P., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase.* Cardiovasc Res, 2004. **63**(1): p. 87-97.
- [25] Balzac, F., et al., *Expression and functional analysis of a cytoplasmic domain variant of the beta 1 integrin subunit.* J Cell Biol, 1993. **121**(1): p. 171-8.

- [26] Hanks, S.K., et al., *Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8487-91.
- [27] Lin, T.H., et al., *Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts*. J Cell Biol, 1997. **136**(6): p. 1385-95.
- [28] Graf, K., et al., *Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy*. Circulation, 1997. **96**(9): p. 3063-71.
- [29] 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.
- [30] Gao, X.M., et al., *Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2702-7.
- [31] Piper, C., et al., *Remodeling of the cardiac extracellular matrix differs between volume- and pressure-overloaded ventricles and is specific for each heart valve lesion*. J Heart Valve Dis, 2003. **12**(5): p. 592-600.
- [32] Babbitt, C.J., et al., *Modulation of integrins and integrin signaling molecules in the pressure-loaded murine ventricle*. Histochem Cell Biol, 2002. **118**(6): p. 431-9.
- [33] Ueno, M., et al., *Effects of physiological or pathological pressure load in vivo on myocardial expression of ET-1 and receptors*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. R1321-30.
- [34] Singh, K., et al., *Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure*. Hypertension, 1999. **33**(2): p. 663-70.
- [35] Li, J.M. and G. Brooks, *Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(8): p. 2213-24.
- [36] Polyakova, V., et al., *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(8): p. 1609-18.
- [37] Brancaccio, M., et al., *Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29282-8.
- [38] Brancaccio, M., et al., *Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload*. Nat Med, 2002. **9**(1): p. 68-75.

- [39] De Acetis, M., et al., *Cardiac overexpression of Melusin protects from dilated cardiomyopathy due to long-standing pressure overload*. *Circ Res*, 2005. **96**: p. 1087-1094.
- [40] Rosenhek, R., et al., *Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis*. *Circulation*, 2004. **110**(10): p. 1291-5.
- [41] 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. **353**: p. 333-338.
- [42] Aoyagi, M., et al., *Prolyl hydroxylation regulates intracellular procollagen degradation in cultured rat cardiac fibroblasts*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. **27**(8): p. 1459-73.
- [43] Ivan, M., et al., *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13459-64.
- [44] Nwogu, J.I., 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**(18): p. 2216-21.
- [45] Kim, C.H., et al., *Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway*. *Circ Res*, 2002. **90**(2): p. E25-33.
- [46] Askainen, T.M., et al., *Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2005. **38**(8): p. 1002-13.
- [47] Knecht, M., et al., *Increased expression of renal neutral endopeptidase in severe heart failure*. *Life Sci*, 2002. **71**(23): p. 2701-12.
- [48] NationalResearchCouncil, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 7 ed. 1996, Washington, D.C.: National Academy Press.
- [49] Gardin, J.M., et al., *Recommendations for a standardized report for adult transthoracic echocardiography: a report from the American Society of Echocardiography's Nomenclature and Standards Committee and Task Force for a Standardized Echocardiography Report*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2002. **15**(3): p. 275-90.
- [50] Braunwald, E., *Heart disease, a textbook of cardiovascular medicine*. 5 th. ed. 2001: W. B. Saunders Company.

- [51] Liao, Y., et al., *Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1703-8.
- [52] Villari, B., et al., *Normalization of diastolic dysfunction in aortic stenosis late after valve replacement*. Circulation, 1995. **91**(9): p. 2353-8.
- [53] Liu, Y., et al., *Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer*. Circ Res, 1995. **77**(3): p. 638-43.
- [54] Shyu, K.G., et al., *Carvedilol prevents cardiac hypertrophy and overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in pressure-overloaded rat heart*. J Biomed Sci, 2005. **12**(2): p. 409-20.
- [55] Friehs, I., et al., *Vascular endothelial growth factor delays onset of failure in pressure-overload hypertrophy through matrix metalloproteinase activation and angiogenesis*. Basic Res Cardiol, 2006. **101**(3): p. 204-13.
- [56] Kuwahara, F., et al., *Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats*. Circulation, 2002. **106**(1): p. 130-5.
- [57] 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): p. 1805-19.
- [58] Carson, J.A. and L. Wei, *Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2000. **88**(1): p. 337-43.
- [59] Carver, W., et al., *Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart*. J Histochem Cytochem, 1994. **42**(2): p. 167-75.
- [60] Shai, S.Y., et al., *Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 458-64.
- [61] Xie, Z., M. Singh, and K. Singh, *Osteopontin modulates myocardial hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice*. Hypertension, 2004. **44**(6): p. 826-31.
- [62] Higgins, D.F., et al., *Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(6): p. F1223-32.
- [63] 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): p. 73-80.
- [64] Hirsila, M., et al., *Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30772-80.



- 
- [65] 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): p. 167-75.
- [66] 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**: p. 307-8.
- [67] Weber, K.T., et al., *Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(3): p. 279-92.
- [68] Gaasch WH, A.C., *Diastolic properties of the left ventricle*, in *The Ventricle: Basic and Clinical Aspect*. 1985. p. 143.
- [69] Bishop, J.E., et al., *Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(10): p. 1581-5.
- [70] Norton, G.R., et al., *Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats*. Circulation, 1997. **96**(6): p. 1991-8.
- [71] Gunja-Smith, Z., et al., *Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links*. Am J Pathol, 1996. **148**(5): p. 1639-48.
- [72] Spinale, F.G., 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**(4): p. 482-95.
- [73] 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): p. 1753-7.
- [74] 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): p. 27-34.
- [75] 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): p. 4577-81.



- [76] 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): p. H2002-9.
- [77] 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*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 214-24.
- [78] 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): p. 177-85.
- [79] 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): p. 269-75.
- [80] 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): p. 119-26.
- [81] Norman, J.T., I.M. Clark, and P.L. Garcia, *Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts*. Kidney Int, 2000. **58**(6): p. 2351-66.
- [82] Bruckschlegel, G., et al., *Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 250-9.
- [83] Neyses, L., et al., *Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes*. J Hypertens, 1993. **11**(9): p. 927-34.
- [84] Paul, M., et al., *Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter*. Hypertension, 1995. **25**(4 Pt 2): p. 683-93.
- [85] 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): p. 287-301.
- [86] Haynes, W.G. and D.J. Webb, *Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease*. J Hypertens, 1998. **16**(8): p. 1081-98.
- [87] Penna, C., et al., *Effect of endothelins on the cardiovascular system*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2006. **7**(9): p. 645-52.
- [88] Fukuroda, T., et al., *Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(3): p. 1461-5.

- 
- [89] 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): p. 162-9.
- [90] Antos, C.L., et al., *Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 907-12.
- [91] Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(10): p. 769-76.
- [92] Brooks, A., et al., *Interstitial fibrosis in the dilated non-ischaemic myocardium*. *Heart*, 2003. **89**(10): p. 1255-6.
- [93] Sanderson, J.E., et al., *Transforming growth factor-beta(1) expression in dilated cardiomyopathy*. *Heart*, 2001. **86**(6): p. 701-8.
- [94] Dixon, I.M., et al., *Effect of chronic AT(1) receptor blockade on cardiac Smad overexpression in hereditary cardiomyopathic hamsters*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 286-97.
- [95] Eickelberg, O., et al., *Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 1): p. L814-24.
- [96] Bing, O.H., et al., *The effect of lathyrogen beta-amino propionitrile (BAPN) on the mechanical properties of experimentally hypertrophied rat cardiac muscle*. *Circ Res*, 1978. **43**(4): p. 632-7.
- [97] Dzau, V.J., *Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure*. *Arch Intern Med*, 1993. **153**(8): p. 937-42.
- [98] Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(5): p. 343-54.
- [99] Bunn, H.F., *New agents that stimulate erythropoiesis*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 868-73.
- [100] Narayan, P., et al., *Association of hemoglobin delivery with left ventricular structure and function in hypertensive patients: Losartan Intervention for End Point Reduction in Hypertension Study*. *Hypertension*, 2006. **47**(5): p. 868-73.
- [101] Perrino, C., et al., *Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1547-60.

## **8 Danksagung**

Frau Prof. V. Regitz-Zagrosek danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die finanzielle Unterstützung während meiner experimentellen Arbeiten. Ihre intensive und freundliche Betreuung bei der Vorbereitung, Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit haben wesentlich zum Gelingen und zur Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Jens Fielitz danke ich ebenfalls für die persönliche, intensive Betreuung in vielerlei theoretischer und praktischer Hinsicht während der experimentellen Arbeiten. Seine klinische und wissenschaftliche Erfahrung fördern auch heute noch mein Interesse an der Kardiologie.

Herrn Dr. Sebastian Philipp und der AG von Prof. Dr. R. Willenbrock danke ich für die Unterstützung im Rahmen des Tierversuchsprojektes.

Frau Britta Hannack und Frau Jenny Thomas seien herzlich für die Anleitung bei den Laborarbeiten gedankt.

Meinen Doktoranden-Kollegen Evelyn Schuch und Johannes Nordmeyer danke ich für die anregenden Diskussionen und den logistischen Beistand.

Meinen Eltern und meiner Frau danke ich für die fortwährende Unterstützung und das fürsorgliche Verständnis während der vielen Arbeitsstunden in Studium und der Fertigung der Dissertation. Ohne Eueren moralischen Beistand wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Ich, Lars Roman Herda, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der Inhibition von Prolyl 4-Hydroxylasen auf kardiale Hypertrophie und Fibrose bei experimenteller Druckbelastung“ 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.

(Lars Roman Herda)