

**Aus dem  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Institut für Pharmakologie,  
Center for Cardiovascular Research,  
Charité-Universitätsmedizin Berlin**

**Untersuchung des Effekts der Deletion von *Biglykan*  
auf das kardiale ‚Remodelling‘ nach experimentellem  
Myokardinfarkt**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Christian Petrik  
Tierarzt  
aus Stralsund**

**Berlin 2008**

**Journal-Nr.: 3200**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jens. W. Fischer  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Unger

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

mice, knockout (MeSH), animal models, disease models, myocardial infarction,  
extracellular spaces, proteoglycans, biglycan (MeSH)

Tag der Promotion: 06.06.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-415-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008  
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen  
daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner  
Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet  
werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne  
besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und  
Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden  
dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization  
of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# **Meinen Eltern**



# I Inhaltsverzeichnis

<b>II</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1.	Extrazelluläre Matrix	13
1.2.	Myokardinfarkt	17
1.3.	Myokardinfarkt und Extrazelluläre Matrix	18
1.4.	Biglykan und Myokardinfarkt	19
1.5.	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System	21
1.6.	Fragestellung	22
<b>2.</b>	<b>Materialien</b>	<b>24</b>
2.1.	Geräte	24
2.2.	Laborverbrauchsmaterialien	25
2.3.	Kits	25
2.4.	Chemikalien und Enzyme	25
2.5.	Standardpufferlösungen	27
2.6.	Primer	27
2.7.	Software	28
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
3.1.	Studiendesign	29
3.2.	Mausstämme	29
3.3.	Tierhaltung	30
3.4.	Tierzucht	30
3.5.	Genotypisierung	31
3.6.	Polymerase-Kettenreaktion	33
3.7.	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.8.	Experimenteller Myokardinfarkt	35
3.9.	Invasive Hämodynamikmessung	37
3.9.1.	Technik des Konduktanz-Katheters	37
3.9.2.	Narkose	38
3.9.3.	Intubation und Beatmung	38
3.9.4.	Linksventrikuläre Katheterisierung	38
3.9.5.	Kalibrierung des Konduktanz-Volumen-Signals	39

3.9.6.	Aufzeichnung der Hämodynamik	40
3.9.6.1.	sytolische Herzfunktion	41
3.9.6.2.	diastolische Herzfunktion	42
3.10.	Organentnahme	44
3.11.	mRNA-Isolierung aus Gewebe	45
3.12.	mRNA-Qualitätskontrolle	45
3.13.	RT-Reaktion zur cDNA-Synthese	46
3.14.	Real-Time RT-PCR	46
3.15.	Auswertung der Real-Time PCR – Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ - Methode	48
3.16.	Bestimmung der interstitiellen Fibrose	50
3.16.1.	Einbettung der Gewebeproben	51
3.16.2.	Anfertigung histologischer Schnitte	51
3.16.3.	Färbung der Schnitte mit Sirius Rot	51
3.16.4.	Quantitative Auswertung der gefärbten Schnitte	52
3.17.	Mortalität	52
3.18.	Statistische Auswertung	52
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1.	Beschreibung eines kardialen Phänotyps der BGN-KO Mäuse	55
4.1.1.	Untersuchungen zu Herzgewicht, Körpergewicht und Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis	55
4.1.1.1.	Herzgewicht (HGW), Körpergewicht (KGW) und HGW / KGW-Verhältnis im Alter von 6 Monaten	55
4.1.1.2.	Herzgewicht (HGW), Körpergewicht (KGW) und HGW / KGW-Verhältnis im Alter von 15 Monaten	57
4.1.2.	Analyse der mRNA-Expression relevanter Gene im Vergleich bei 3 und 6 Monate alten Tieren	59
4.1.2.1.	Analyse der kardialen mRNA Expression von Kollagen I im Alter von 3 und 6 Monaten	59
4.1.2.2.	Analyse der kardialen mRNA Expression von Kollagen III im Alter von 3 und 6 Monaten	61
4.1.2.3.	Analyse der kardialen mRNA Expression von Tgf-beta1 im Alter von 3 und 6 Monaten	62
4.1.2.4.	Analyse der kardialen mRNA Expression von Decorin im Alter von 3 und 6 Monaten	64
4.1.3.	Analyse der kardialen interstitiellen Fibrose	65
4.1.4.	Basale Hämodynamikmessungen	66

4.2.	Untersuchung kardialer Veränderungen nach experimentellem Myokardinfarkt (MI)	67
4.2.1.	Herzgewicht (HGW), Körpergewicht (KGW) und HGW/KGW Verhältnis 21 Tage nach experimentellem MI	67
4.2.2.	Analyse der mRNA Expression relevanter Gene 21 Tage nach experimentellem MI	71
4.2.3.	Hämodynamische Untersuchungen 21 Tage nach experimentellem MI	80
4.2.4.	Untersuchung der Mortalität bis zum Zeitpunkt 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt	92
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
5.1.	Ziel der Arbeit	94
5.2.	Herzgewicht, Körpergewicht und das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht unter basalen Bedingungen	94
5.3.	Basale kardiale Expressionsanalysen relevanter Gene	95
5.4.	Basale kardiale interstitielle Fibrose	96
5.5.	Basale Hämodynamikmessungen	97
5.6.	Kardialer Phänotyp der BGN-KO Mäuse	100
5.7.	Herzgewicht, Körpergewicht und das Verhältnis von Herzgewicht/Körpergewicht nach experimentellem MI	100
5.8.	Expressionsanalysen relevanter Gene in linkem Ventrikel und im Septum nach experimentellem MI	101
5.9.	Hämodynamik nach experimentellem MI	104
5.10.	Mortalität nach experimentellem MI	105
5.11.	Unterschiede im kardialen Remodelling nach einem Myokardinfarkt.	106
<b>6.</b>	<b>Quellenangaben</b>	<b>107</b>
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>V</b>	<b>Summary</b>	<b>118</b>
	<b>Anhang</b>	<b>119</b>
	Danksagung	119
	Selbstständigkeitserklärung	120
	Eigene Publikationen	121

## II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

1. Schematische Darstellung eines Proteoglykans und der extrazellulären Matrix
2. Schematische Darstellung Biglykan
3. Schematische Darstellung der Biglykan-Lokalisation, des *target*-Vektors und der Rekombination
4. Schematische Darstellung des Zuchtprinzips
5. Agarose-Gel im UV-Strahlengang mit elektrophoretischer amplifizierter gDNA
6. Einführen des Konduktanzkatheters in die *Arteria carotis*
7. Anstieg des Konduktanzsignals während Applikation eines 10% NaCl-Bolus
8. Druck-Volumen-Kurven einer Maus während der Vorlastreduktion
9. enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), lineare Annäherung
10. enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung, exponentielle Annäherung
11. mRNA- Qualitätskontrolle mittels eines TBE-Agarosegels
12. Zyklusprogramm einer Standard-Real-Time RT-PCR
13. Herzgewicht 6 Monate
14. Körpergewicht 6 Monate
15. Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht 6 Monate
16. Herzgewicht 15 Monate
17. Körpergewicht 15 Monate
18. Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht 15 Monate
19. relative kardiale Kollagen I mRNA Expression 3 Monate
20. relative kardiale Kollagen I mRNA Expression 6 Monate
21. relative kardiale Kollagen III mRNA Expression 3 Monate
22. relative kardiale Kollagen III mRNA Expression 6 Monate
23. relative kardiale Tgf-beta1 mRNA Expression 3 Monate
24. relative kardiale Tgf-beta1 mRNA Expression 6 Monate
25. relative kardiale Decorin mRNA Expression 3 Monate
26. relative kardiale Decorin mRNA Expression 6 Monate
27. kardiale interstitielle Fibrose im Alter von 6 Monaten
28. Druck-Volumen Kurven mit Darstellung der EDPVR im Alter von 6 Monaten
29. Herzgewicht 21 Tage nach MI
30. Körpergewicht 21 Tage nach MI
31. Verhältnis von Herzgewicht/Körpergewicht 21 Tage nach MI
32. relative Kollagen I mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

33. relative Kollagen I mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
34. relative Kollagen III mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
35. relative Kollagen III mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
36. relative Tgf-beta1 mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
37. relative Tgf-beta1 mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
38. relative Decorin mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
39. relative Decorin mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
40. Herzfrequenz 21 Tage nach experimentellem MI
41. maximaler linksventrikulärer Druck 21 Tage nach experimentellem MI
42. linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit 21 Tage nach experimentellem MI
43. Schlagvolumen 21 Tage nach experimentellem MI
44. Herzminutenvolumen 21 Tage nach experimentellem MI
45. Ejektionsfraktion 21 Tage nach experimentellem MI
46. endsystolisches Volumen 21 Tage nach experimentellem MI
47. enddiastolisches Volumen 21 Tage nach experimentellem MI
48. linksventrikulärer enddiastolischer Druck 21 Tage nach experimentellem MI
49. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit 21 Tage nach experimentellem MI
50. Tau 21 Tage nach experimentellem MI
51. enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung 21 Tage nach experimentellem MI
52. Prozentuale Mortalitätsrate im Zeitverlauf bis 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

## Tabellenverzeichnis

1. vergleichende relative kardiale Kollagen I mRNA Expression im Alter von 3 und 6 Monaten
2. vergleichende relative kardiale Kollagen III mRNA Expression im Alter von 3 und 6 Monaten
3. vergleichende relative kardiale Tgf-beta1 mRNA Expression im Alter von 3 und 6 Monaten

4. vergleichende relative kardiale Decorin mRNA Expression im Alter von 3 und 6 Monaten
5. Herzgewichte 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
6. Körpergewichte 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
7. Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnisse 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
8. relative Kollagen I mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
9. relative Kollagen I mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
10. relative Kollagen III mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
11. relative Kollagen III mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
12. relative TGF-beta1 mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
13. relative TGF-beta1 mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
14. relative Decorin mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
15. relative Decorin mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
16. Herzfrequenz 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
17. maximaler linksventrikulärer Druck 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
18. linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
19. Schlagvolumen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
20. Herzminutenvolumen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
21. Ejektionsfraktion 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
22. endsystolisches Volumen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
23. enddiastolisches Volumen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
24. linksventrikulärer enddiastolischer Druck 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
25. linksventrikuläre minimale Druckabfallsgeschwindigkeit 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
26. Tau 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt
27. enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

### III Abkürzungsverzeichnis

ACE:	Angiotensin Converting Enzyme	i.p.:	intraperitoneal
Ang:	Angiotensin	KCl:	Kaliumchlorid
AT <sub>1</sub> / AT <sub>2</sub> :	Angiotensin-1 / Angiotensin-2	kDa:	Kilodalton
bgn:	Biglykan	kg:	Kilogramm
bp:	Basenpaare	KGW	Körpergewicht
cDNA:	complementary DNA	KO:	Knockout
CO:	cardiac output	LDL:	Low density Lipoprotein
Col I / III:	Kollagen I / III	LSD:	least significant difference
DCN:	Decorin	LVEDP:	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
DEPC:	Diethylpyrocarbonat	LVP <sub>max</sub> :	maximaler linksventrikulärer Druck
dNTP:	Dexoxyribonukleosidtriphosphat	MgCl <sub>2</sub> :	Magnesiumchlorid
dP/dt:	linksventrikuläre Druckanstiegs- geschwindigkeit	MI:	Myokardinfarkt
EZM:	Extrazelluläre Matrix	min:	Minute
etc	<i>et cetera</i>	mm:	Millimeter
EDTA:	Ethyldiamintetraessigsäure	mmHg:	Millimeter Quecksilbersäule
EDPVR:	endiastolische Druck- Volumenrelation	MMP:	Matrix-Metalloproteinasen
EDV:	endiastolisches Volumen	ml:	Milliliter
EF	Ejektionsfraktion	mRNA:	messenger Ribonukleinsäure
ESPVR:	endsystolische Druck- Volumenrelation	n:	Zahlenwert der Gruppengröße
FAM	Fluorescein	NaCl	Natriumchlorid
GAG:	Glykosaminoglykan	NO:	Stickstoffmonoxid
gDNA:	genomische Deoxy- ribonukleinsäure	p:	Wert des Signifikanzniveaus
HDL :	high density lipoproteine	PBS:	phosphate buffered saline
HET:	heterozygot	PCR:	Polymerasekettenreaktion
HF:	Herzfrequenz	PDGF:	platelet derived growth factor
HGW:	Herzgewicht	PG:	Proteoglykan
HMV:	Herzminutenvolumen	PGK:	Phosphoglyzeratkinase
His-Leu:	Histidin-Leucin	pH:	<i>potentia hydrogenii</i>
		PROCAM:	Prospektive Cardiovasculäre Münster Studie

## Abkürzungsverzeichnis

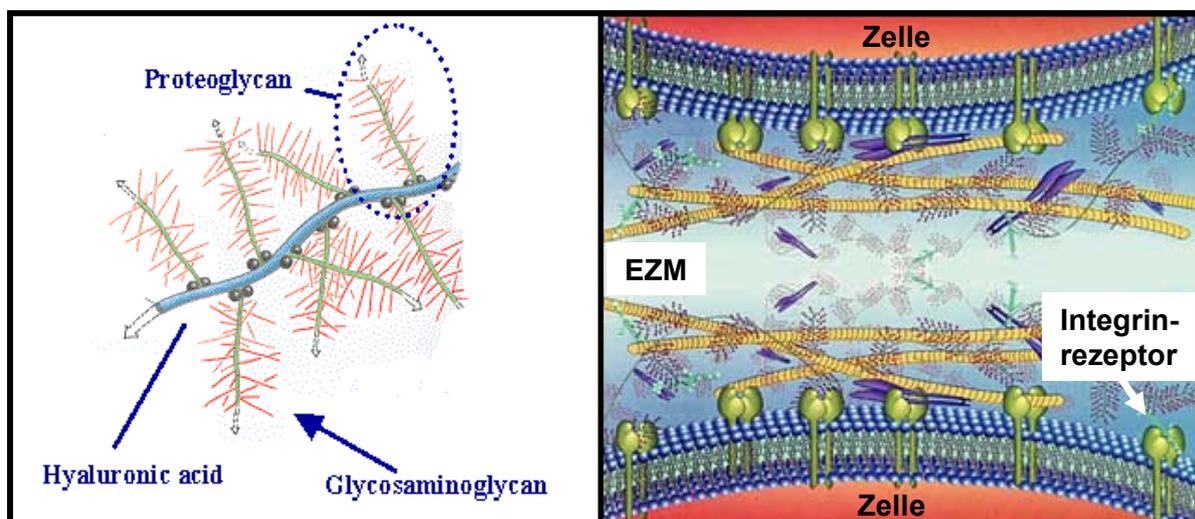
---

RAAS:	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	metalloproteases
		TNF- $\alpha$ : Tumor Nekrose Faktor alpha
RNasin:	RNase-Inhibitor	TRIS: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
rRNA:	ribosomale Ribonukleinsäure	
s:	Sekunde	Upm: Umdrehungen pro Minute
s.c.:	subkutan	UV: ultraviolett
SD	Standardabweichung	Vol: Volumen
Sham:	scheinoperiert	Vol%: Volumenprozent
SLRP's:	kleine leucinreiche Proteoglykane	vs.: versus
SV:	Schlagvolumen	WHO: World Health Organization
TAE:	Tris-Acetat-EDTA	WT: Wildtyp
TAMRA	Rhodamin	z.B.: zum Beispiel
TBE:	Tris-Borat-EDTA	$\mu$ l: Mikroliter
Tgf-beta1:	transforming growth factor- $\beta$ -1	$\mu$ M: Mikromol
TIMP:	tissue inhibitor of matrix-	

# 1. Einleitung

## 1.1. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein dreidimensionales Netzwerk, welches den Raum zwischen den Zellen aller Gewebe ausfüllt. Lange Zeit galt die Matrix als eine Art festes Geflecht, in dem die jeweiligen Zellen mehr oder weniger fest verankert sind. Heutzutage weiß man, dass alle körpereigenen Zellen (außer Erythrozyten) aktiv in Beziehung zur umgebenden Extrazellulärmatrix stehen. Aufbau und Funktion der Matrix variieren analog zu den unterschiedlichen Gewebetypen und funktionellen Ansprüchen. Auch darf man die Verbindung der Zellen zur Matrix nicht allzu statisch interpretieren. Im Rahmen der Embryogenese, des Wachstums, der Gewebsalterung und physiologischen Gewebsmauserung, sowie, im Falle der hier vorliegenden Arbeit, der Wundheilung bzw. des kardialen ‚Remodellings‘- unterliegt die extrazelluläre Matrix einem ständigen Auf- und Abbau. Dieser wird zum größten Teil von Matrix-Metallo-proteinasen (MMPs) bewerkstelligt, welche wiederum von anderen Enzymen, den sog. TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinasen) reguliert werden. (1) (2) (3) (4).



**Abb. 1:** schematische Darstellung eines Proteoglykans mit den typischen GAG-Seitenketten, sowie der extrazellulären Matrix zwischen zwei Zellen mit den transmembranen Integrinrezeptoren. (Die Verwendung der Bilder erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Mark ten Breteler / University of Twente / Enschede / NL)

Die Matrix besteht aus Kollagenen, retikulären und elastischen Fasern (aufgebaut aus Elastin und Mikrofibrillen), Glycosaminoglykanen (GAGs), Proteoglykanen (PGs) wie Biglykan oder Decorin, Adhäsionsglykoproteinen und extrazellulärer Flüssigkeit.

Die Verbindung der funktionalen Zellen eines Gewebes zur Matrix kommt entweder durch Bindungsstellen (transmembranäre Integrin-Rezeptoren) an der Zelloberfläche - über Interaktion dieser Rezeptoren mit bestimmten EZM-Komponenten - oder durch Vermittlung zwischengeschalteter Adhäsionsglykoproteine (z.B. Fibronectin oder Laminin) zustande.

Diese Zell-Matrix Verbindungen dienen einerseits der mechanischen Verankerung der Zellen im Gewebsverband, sind andererseits aber auch elementar für zahlreiche Zellfunktionen wie Ernährung, Abwehr und Reparatur (5).

Kardiales Gewebe besteht zu einem Drittel aus kardialen Myozyten und zu zwei Dritteln aus so genannten *Nichtkardiomyozyten*, wie Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen, sowie den Matrixkomponenten (6). Die interstitiellen Fibroblasten sind verantwortlich für Synthese und Degradation des extrazellulären Netzwerkes (7). Von den fünf bislang im Herzen identifizierten Kollagentypen (I, III, IV, V und VI) spielen die Kollagene I und III mit über 90% Anteil die größte Rolle, wobei Kollagen I hier den dominierenden Part übernimmt. Drei sich umeinander windende Tropokollagenstränge bilden das Kollagen-Molekül. Die bei der Zusammenlagerung dieser Stränge entstehenden Kollagenfibrillen weisen eine enorme Zugfestigkeit auf.

Die Menge und Anordnung der Kollagenfibrillen sind entscheidend für das Ausmaß der kardialen interstitiellen Fibrose, welche im gesunden Herzen ein, je nach Beanspruchung, fein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der struktur- und festigkeitsgebenden Elemente des Gewebes darstellt. Im Falle von drucküberlasteten Herzen (chron. Bluthochdruck) oder nach einem Myokardinfarkt kommt es zur Akkumulation von Kollagenen, die im Falle des Infarktes nicht auf das Infarktgebiet beschränkt bleibt, sondern in unterschiedlichem Ausmaße alle Herzbereiche betrifft. (8)

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix sind die Proteoglykane. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe glykolisierter Proteine, welche kovalent mit sulfatierten Glykosaminoglykanen, den so genannten „GAGs“, verbunden sind. Die wichtigsten Vertreter der GAGs sind Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat.

Proteoglykane bestehen grundsätzlich aus einem Proteinanteil (Kerngerüst) und einer variablen Anzahl von GAG-Seitenketten. Der variierende Proteinanteil ist entscheidend für die teilweise unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Proteoglykane. Neben den GAG-Seitenketten vermittelt das Kernprotein z.B. die Interaktion mit anderen Komponenten des extrazellulären Netzwerkes, wie z.B. Kollagen, und gibt somit den PGs die Fähigkeit, Eigenschaften der extrazellulären Matrix zu modulieren.

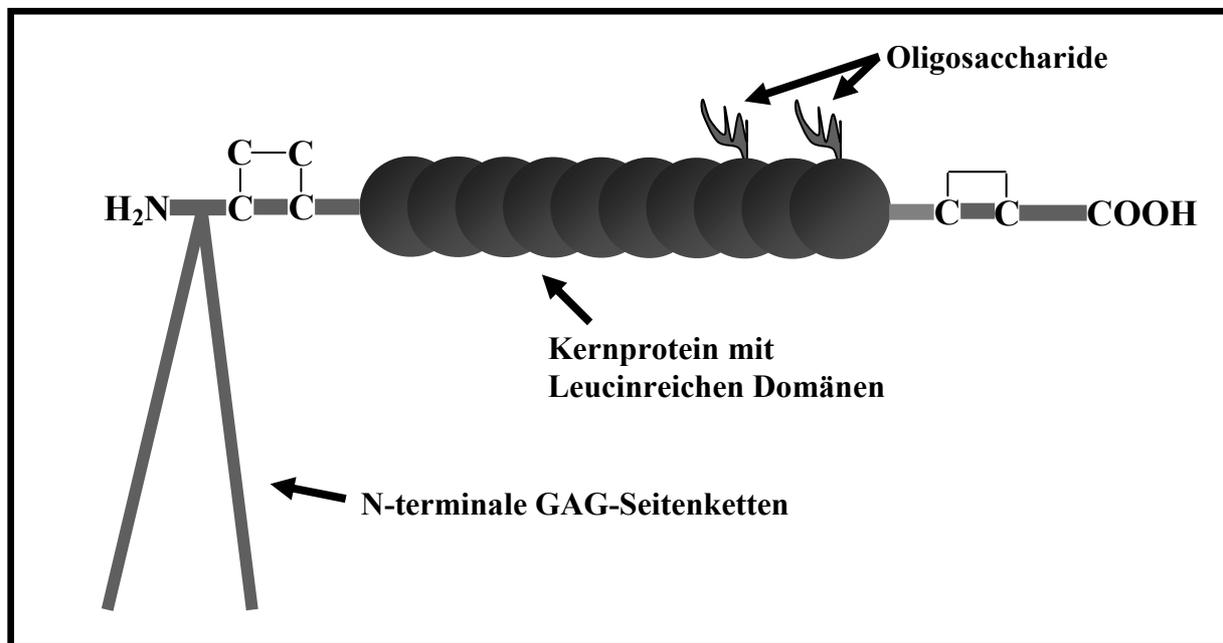
Die GAG-Ketten der Proteoglykane sind sulfatierte Polysaccharidketten, welche aus sich 40–100x wiederholenden Disacchariden bestehen, wobei sich die Disaccharide aus einem Hexuronsäuremolekül und einem Aminozucker zusammensetzen.

Proteoglykane werden nach ihrer Synthese (in der Regel durch Fibroblasten) in den extrazellulären Raum sezerniert und dort in die bestehende Matrix integriert.

Decorin und Biglykan gehören zu den sogenannten kleinen leucinreichen Proteoglykanen (small leucine rich Proteoglykans – SLRPs). Beiden ist der Proteinanteil gemeinsam, der zu ca. 70% aus sich wiederholenden leucinreichen Regionen besteht. Das Kernprotein von Biglykan besitzt ein Molekulargewicht von ca. 38 kDa. Aufgrund erheblicher Homologien im Aufbau der Kernproteine postulierte Oldberg, dass Biglykan, Decorin und Fibromodulin ein gemeinsames Vorläufer-Gen haben (9).

Die am Aufbau der beiden PGs beteiligten GAG-Seitenketten, bestehend aus Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, weisen als gemeinsamen Grundbaustein den Aminozucker N-Acetyl-D-Galactosamin auf, unterscheiden sich jedoch durch eine Epimerisierung an der Position C5 der D-Gluconsäure im Chondroitinsulfat, wodurch Dermatansulfat entsteht. Trägt ein Proteinkern mehrere Seitenketten, bzw. sind diese sehr lang oder stark sulfatiert, so erhöht sich somit aufgrund der hydrophilen Sulfatgruppen das Wasserbindungsvermögen, was sich wiederum auf die biomechanischen Eigenschaften des entsprechenden Gewebes auswirkt.

Während Decorin nur eine N-terminale GAG-Seitenkette besitzt, weist Biglykan zwei dieser für den Proteoglykan-Aufbau typischen Polysaccharidstrukturen auf (10).



**Abb. 2: schematische Darstellung des Proteoglykans Biglykan (eigene Darstellung)**

Biglykan wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, unter anderem in Knochen, Knorpel, Skelettmuskulatur, Sehnen, Mucosa (Magen), vaskulären Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Dentin, Gingiva, Haut, Astrozyten etc. (11) (12)

Hauptsächlich wird Biglykan von Fibroblasten gebildet und sezerniert. Für Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen und vaskuläre Endothelzellen wurde nachgewiesen, dass diese ebenfalls in der Lage sind Biglykan zu synthetisieren (13) (14) (15).

Der Grad der Epimerisierung und Sulfatierung des Biglykans kann in den unterschiedlichen Geweben variieren. (16)

Es konnte gezeigt werden, dass Biglykan und Decorin aufgrund ihrer ähnlichen Struktur oft ähnliche Effekte aufweisen, andererseits auch als Gegenspieler auftreten können. So ist zum Beispiel in abdominalen Aortenaneurismen ein stark erniedrigter Biglykan mRNA-Spiegel nachgewiesen worden, wogegen die Decorin mRNA hier vermehrt exprimiert wird (17). Hausser *et al.* konnten zeigen, dass Biglykan von Zellen durch Endozytose aufgenommen werden kann. Dieser Effekt wird *in vitro* durch Anwesenheit von Decorin aufgehoben (18).

Welche Rolle Proteoglykane, insbesondere Biglykan, bei Neoplasien spielen, ist noch weitgehend unklar. Bei einem Karzinom der Speicheldrüse konnten fünf Gene nachgewiesen werden, die überexprimiert werden. Dazu gehören unter anderem die für Fibronectin und Biglykan codierenden Gene. Auf der anderen Seite konnten Chen *et al.* zeigen, dass Biglykan Smad4-abhängig in der Lage ist, das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen (Adenokarzinom) zu inhibieren (19).

Moscatello *et al.* wiesen nach, dass Decorin durch Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor) ebenfalls Tumorstadium unterdrücken kann, wohingegen Biglykan hier keine Effekte hatte (20).

Eine weitere wichtige Rolle scheint Biglykan im Rahmen der Atherosklerose zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Biglykan im Gefäßendothel eine Affinität zu den im Blut zirkulierenden Lipoproteinen aufweist (21).

Santiago-Garcia *et al.* konnten im Jahr 2002 zeigen, dass Biglykan und Decorin an den SR-A Rezeptor von endothelständigen Makrophagen binden, welche dadurch aktiviert werden und dazu übergehen, zirkulierende LDL-Lipoproteine in die Gefäßwand einzubauen. Somit tragen sie zur Erzeugung von Plaques in den Gefäßwänden bei, mit den bekannten Konsequenzen atherosklerotischer Veränderungen, inklusive eines erhöhten Herzinfarkttrisikos (22).

Ferner sind Biglykan und Decorin in der Lage N-terminal an Kollagen VI zu binden und dieses *in vitro* in hexadimensionale Netzwerke zu organisieren (23) (24).

Für Biglykan und Decorin konnte mehrfach gezeigt werden, dass sie phosphatierungs- und sulfatierungsabhängig *in vitro* an Kollagen I und III binden können und auch in der Lage sind, die Fibrillogenese zu beeinflussen (25).

Andere Autoren wiesen für beide Proteoglykane eine Kollokalisierung mit Kollagen I und III in verschiedenen Geweben nach (26) (27).

Insgesamt scheint Biglykan bei einer Vielzahl von mit Fibrose verbundenen Prozessen involviert zu sein, wobei in den meisten Fällen zwar eine Beteiligung des Biglykans nachgewiesen werden konnte, die genaue Funktion aber oft noch unklar ist (28) (29) (30) (31).

## 1.2. Myokardinfarkt

Nach weltweiten statistischen Erhebungen zählen Erkrankungen des Herzkreislaufsystems mit Abstand zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen (32).

Auch Deutschland bildet hier keine Ausnahme. Von 830227 Verstorbenen im Jahre 2005 erlagen 367361 Menschen Krankheiten des Herzkreislaufsystems (gemäß der *Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*; 10. Revision).

Aufgrund einer sich stetig verbessernden Prophylaxe, Früherkennung und Therapie sind diese Zahlen leicht rückläufig, stellen aber immer noch einen Spitzenwert in der Statistik der Todesursachen in Deutschland dar (33).

Ein Myokardinfarkt ist immer die Folge der Minderdurchblutung des Myokards, meist verursacht durch eine Koronarthrombose infolge atherosklerotischer Veränderungen der Koronargefäße. Andere Ursachen können zum Beispiel Koronarspasmen, Endokarditisbedingte Embolien, Tumore oder Blutungen sein.

Bereits im 19. Jahrhundert war bekannt, dass koronare Stenosen zum Tode führen können. In ersten Tierexperimenten mit Unterbindung von Koronararterien und einigen humanen *post mortem* - Untersuchungen wurde ersichtlich, welche Konsequenzen eine Minderdurchblutung des Myokards nach sich ziehen kann.

Im Jahre 1901 wies der deutsche Arzt Ludolf von Krehl erstmals nach, dass ein Myokardinfarkt nicht immer tödlich enden muss. Diese Erkenntnis konnte im 1910 von den russischen Forschern V.P. Obratsov und N.D. Strazhesko bestätigt werden. Gleichzeitig erkannten sie auch die *Angina pectoris* als Differentialdiagnose. Der amerikanische Mediziner James B. Herrick führte 1912 als diagnostische Möglichkeit die von dem holländischen Physiologen Willem Einthoven entwickelte Elektrokardiographie ein und verordnete seinen Patienten mehrwöchige Bettruhe. Dieses Therapieprinzip blieb bis in die fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts erhalten (34) (35).

Im Lauf der Jahre kamen neben der neuartigen Behandlungsstrategie der *frühen Mobilisation* auch eine Vielzahl von Wirkstoffen, wie zum Beispiel Digitalispräparate,

Koffein, Campher, Morphin, Chinidin, Adrenalin, g-Strophantin und Nitrate, als Medikamente zur Behandlung des Myokardinfarktes zum Einsatz.

Mit der Ballondilatation von Herzgefäßen, modernen Lyse-Therapien, Stent-Implantationen und pharmakologischen Entwicklungen wie Diuretika, Beta-Blockern, ACE-Hemmern und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten stehen heutzutage neben der verbesserten Früherkennung und therapeutischen Nachsorge insgesamt effektive Werkzeuge zur Behandlung des MI und seiner Folgen zur Verfügung. So hat sich die Sterblichkeit infolge eines akuten Herzinfarktes in Berlin von 13 Prozent im Jahre 1999 auf acht Prozent im Jahr 2004 verringert (36).

In verschiedenen Studien (PROCAM, Framingham-Heart Study etc.) konnten Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht, Blutdruck, Konzentration an HDL / LDL Cholesterol im Blut, Zigarettenrauch, Diabetes Mellitus, erbliche Faktoren, Übergewicht, Bewegungsmangel etc. determiniert werden (37).

Der bei einem Myokardinfarkt vorherrschende Sauerstoff- und Nährstoffmangel im ischämischen Bereich führt zur absoluten Leistungseinschränkung der kardialen Pumpfunktion. Zur Kompensation werden das sympathische Nervensystem (38) und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, was unter anderem durch die resultierende Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des peripheren Widerstands und dadurch zu einer Mehrbelastung des vorgeschädigten Herzmuskels führt (39).

### 1.3. Myokardinfarkt und extrazelluläre Matrix

Aufgrund der bei einem Myokardinfarkt vorliegenden lokalen Unterversorgung mit Blut, und damit auch mit Sauerstoff und Nährstoffen, kommt es im betroffenen Gebiet zu einem Gewebsuntergang. Diesem begegnet der Körper mit Umbauprozessen, die auch als kardiales ‚Remodelling‘ bezeichnet werden. Dabei wird das im direkten ischämischen Bereich gelegene Gewebe durch eine kollagenreiche Infarkttnarbe ersetzt.

Im gesunden Herzmuskel konnte man die kardialen Fibroblasten als diejenigen Zellen identifizieren, die für die Produktion und Sezernierung der Bestandteile der extrazellulären Matrix und auch der meisten ihrer Regulatoren verantwortlich sind (40).

Normalerweise stehen Deposition und Abbau der Matrixkomponenten, je nach funktioneller Beanspruchung, in einem fein ausbalancierten Verhältnis. Induktoren der extrazellulären Matrix wie z.B. Tgf-beta1, Angiotensin II oder Endothelin stehen Gegenspieler wie Stickstoffmonoxid (NO), bestimmte Zytokine und Bradykinin gegenüber (41).

Bei einer Schädigung des Myokards gerät dieses Gleichgewicht aus der Balance. Neben dem Abbau der nekrotischen Zellen im untergegangenen Gewebsbereich erscheinen proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Tgf-beta1. Das Renin-Angiotensin-

Aldosteron-System wird sowohl, im Infarktgebiet und näherer Umgebung, als auch auf systemischer Ebene aktiviert. Myofibroblasten erscheinen vermehrt im Infarktgebiet und sezernieren wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix, um so den nekrotischen Bereich möglichst schnell zu stabilisieren und auf diese Weise einer Dilatation des Infarktgebietes entgegen zu wirken. Andererseits bewirkt eine übersteigerte Fibrose eine erhöhte Gewebssteifigkeit und was negative Auswirkungen auf die kardiale Pumpleistung des betroffenen Ventrikels hat.

Entgegen der jahrzehntelang verbreiteten Ansicht, eine Infarktnarbe sei ein inertes Gewebe, wird die Infarktnarbe mittlerweile eher als ein dynamisches Gewebe angesehen, in welchem noch viele Wochen nach erfolgtem Infarkt Auf- und Abbauprozesse mit entsprechenden funktionellen Konsequenzen stattfinden. Die beschriebenen Prozesse bleiben auch nicht auf den Infarktbereich beschränkt, sondern erfolgen auch in den Grenzbereichen des Infarktes und anderen Herzbereichen, wie z.B. im Septum oder in der rechten Ventrikelwand (42) (43).

## 1.4. Biglykan

Das kleine leucinreiche Proteoglykan Biglykan gilt, wie unter 1.1. beschrieben, als funktionell wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es ist in der Lage, an Kollagene zu binden und die Fibrillogenese dieser zu modulieren (44). Yamamoto *et al.* konnten 1998 nachweisen, dass der Biglykan mRNA-Spiegel im Infarktgebiet steigt. *In situ* Hybridisierungsstudien zeigten, dass Biglykan und Kollagen I im Infarktgebiet kolokalisiert sind. Als Quelle beider wurden als spindelförmige mesenchymale Zellen die Myofibroblasten identifiziert. (45) Andere Autoren wiesen einen Anstieg von Biglykan- und Decorin-mRNA im Infarktgebiet bei Ratten nach (46).

Des Weiteren ist erwiesen, dass Angiotensin II via AT-1a Rezeptor nicht nur Effekte auf die Kollagen-Synthese und -Deposition hat, sondern auch die Proteoglykansynthese *in vitro* induzieren kann (47). Shimizu-Hirota *et al.* wiesen nach, dass diese Proteoglykansynthese unter anderem auch von Angiotensin II gesteuert wird (48).

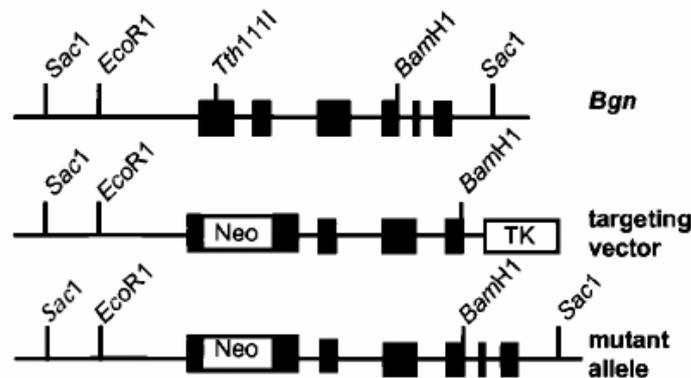
Andere Autoren zeigten, dass die Biglykan mRNA Expression nach experimentellem Myokardinfarkt nicht nur in der Infarktnarbe, sondern im gesamten Herzen ansteigt, und dass dieser Effekt durch AT-1 Rezeptor-Antagonisten beeinflussbar ist (49).

Tiede *et al.* zeigten im gleichen Jahr, dass Angiotensin II *in vitro* in der Lage ist, die Biglykan mRNA Expression in kardialen Fibroblasten zu induzieren. Dieser Effekt wird durch den AT-1a Rezeptor vermittelt und funktioniert via autokriner Freisetzung des Wachstumshormons Tgf-beta1 in den Fibroblasten. (50) (51)

Neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sind an den Umbauprozessen des Myokards nach einem Infarkt noch weitere Faktoren beteiligt, für die eine Interaktion mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix nachgewiesen wurde. So vermögen auch der *platelet-derived growth factor* (PDGF) (52), *tumor-necrosis factor-alpha* (TNF-alpha) (53) (54) (55) und Interleukine, wie z.B. *Interleukin-1beta* (IL-1beta) mit Biglykan, Decorin und anderen Matrixbestandteilen zu interagieren oder zumindest Effekte auf deren Produktion auszuüben (56) (57). Unbeantwortet blieb bislang die Frage welche Rolle das kleine leucinreiche Proteoglykan Biglykan in kardialer Hinsicht, insbesondere beim Remodelling-Prozeß nach einem Myokardinfarkt spielt.

Um die Funktion des Biglykans (bgn) genauer untersuchen zu können, wurde durch Dr. Marian F. Young, vom National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, ein Biglykan-*knockout* Modell in der Maus erzeugt.

Hierzu wurde zunächst eine 129Sv Maus-Genbibliothek (Stratagene™) mit einer bgn-Ratten-cDNA Sonde „gescreent“. Das selektionierte 4,3-kB Fragment des Maus-Biglykans, welches die kodierenden Sequenzen der Exons 2-5 enthält, wurde dann benutzt, um einen sogenannten Inaktivierungsvektor (target-Vektor) zu konstruieren. Der Biglykan-Genlocus wurde in diesem Vektor durch Einsetzen einer PGK-Neomycin Kasette ins Exon 2 an Stelle Tth111I ersetzt (*knockout*). Um den Einbau der Sequenz an der richtigen Stelle zu überprüfen, wurde als Marker außerdem das Gen für die Thymidinkinase (TK) eingesetzt. Die PGK-TK Kasette diente somit später der Negativselektion (siehe Abbildung 3). Embryonale Stammzellen (ES) (J1) wurden anschließend mit dem linearisierten Inaktivierungsvektor transfiziert. Die Übertragung des mutierten Gens erfolgt hier durch homologe Rekombination. Die positiven ES wurden dann mittels Southern-Blot Hybridisierung identifiziert und in Mausblastozysten der Linie C57Bl/6 injiziert, welche wiederum in eine pseudogravide Empfängermaus gepflanzt wurden, um Chimären zu erzeugen. Durch nachfolgende Rückkreuzung mit C57Bl/6 Wildstämmen wurden heterozygote Tiere generiert, bei deren Verpaarung untereinander homozygote Tiere mit dem Biglykan-Defekt entstanden. Die Geninformation für Biglykan befindet sich auf dem X-Chromosom. Wildtyp-Mäuse besitzen folglich einen Genotyp BGN<sup>+/0</sup> (männlich) und bgn<sup>+/+</sup> (weiblich). Die Gen-mutierten Mäuse weisen den Genotyp BGN<sup>-/0</sup> (männlich) und bgn<sup>-/-</sup> (weiblich) auf.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biglykan-Lokalisation, des *targeting*-Vektors und der Rekombination. (Abbildung: Laurent Ameye / Marian F. Young)**

An dem von der Arbeitsgruppe um Marian F. Young erzeugten Biglykan-*knockout* Modell konnten schon einige Erkenntnisse über die Funktion des Biglykans in anderen Geweben gewonnen werden. So scheinen die *knockout*-Mäuse insgesamt kleiner und leichter als ihre Wildtypgeschwister zu sein. Gleichzeitig entwickeln die genmutierten Tiere im Alter osteoporoseähnliche Krankheitsbilder (58).

Möglicherweise kann das Biglykan-*knockout* Modell auch als neues Forschungsmodell für Krankheiten des Muskelapparates und des Skelettsystems dienen (59) (60).

Bislang hat noch niemand die kardiale Auswirkung der Deletion des Biglykan-Gens untersucht und es ist nichts über die kardiale Funktion des Proteoglykans Biglykan im ‚Remodelling‘-Prozess des Herzens nach einem Myokardinfarkt bekannt.

## 1.5. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Wie unter 1.3 und 1.4 beschrieben, sind das RAAS und EZM-Komponenten, wie z.B. Biglykan, an den Prozessen nach einem Myokardinfarkt beteiligt und interagieren miteinander. Beim Renin-Angiotensin-Aldosteron-System handelt es sich um ein endokrines und integratives Hormonsystem, das kardiovaskuläre und renale Funktionen vereint und sowohl den Salz- und Wasserhaushalt als auch den Blutdruck kontrolliert. Neben einem globalen RAAS, welches seinen Anfang im juxtaglomerulären Apparat der Niere nimmt, gibt es inzwischen auch Erkenntnisse über die Existenz lokaler Renin-Angiotensin-Systeme, so z.B. im Herz, in Gefäßwänden, Nebenniere und dem Gehirn (61).

Renin ist eine Aspartylprotease, die in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen der afferenten Arteriolen in der Niere aus inaktiven Vorstufen - Preprorenin und Prorenin - synthetisiert wird. Aktives Renin kann in diesen Zellen gespeichert werden und wird nach Bedarf ins Blut sezerniert. Hier spaltet es enzymatisch von dem hauptsächlich in der Leber synthetisierten Protein Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab.

Durch das vor allem im Gefäßendothel, aber auch im Herzen, Niere und Hoden nachgewiesene Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) wird vom Dekapeptid Angiotensin I carboxyterminal ein Dipeptid (His-Leu) abgespalten, wobei das Oktapeptid Angiotensin II, als Effektorsubstanz entsteht.

Neben Angiotensin II können auch weitere Angiotensin-Fragmente, wie Ang 2-8, Ang 3-8 und Ang 1-7 entstehen. Die Inaktivierung und der Abbau der Metabolite erfolgt durch Angiotensinasen.

Fast alle physiologischen Effekte des Angiotensins (Vasokonstriktion, Natriumretention, Zellwachstum etc.) werden durch den membranständigen AT-1 Rezeptor vermittelt, welcher nach Klonierungs- und Bindungsstudien in einen AT-1a und AT-1b Subtyp unterteilt werden kann.

Weiterhin konnte die Existenz eines AT-2 Rezeptors nachgewiesen werden, welcher nachweislich bei der Embryogenese und Differenzierung eine Rolle spielt und weiterhin als „Gegenspieler“ des AT-1 Rezeptors angesehen wird. Beide Rezeptoren und Subtypen wurden in unterschiedlicher Distribution in praktisch allen Gewebstypen nachgewiesen – mit unterschiedlichen Aufgaben (62)

Aldosteron ist ein Steroidhormon. Es wird von den Zona glomerulosa Zellen der Nebennierenrinde produziert. Die wesentlichen Funktionen von Aldosteron liegen in der Kontrolle des Natrium- und Kaliumgleichgewichts und damit des Salz- und Wasserhaushaltes sowie der Homöostase des Säure-Basen Haushaltes. Der Hauptwirkungsort sind die epithelialen Zellen im distalen Nephron. Aldosteron verstärkt dort die Natriumresorption und die Ausscheidung von Wasserstoff- und Kaliumionen.

Das RAAS interagiert mit anderen Hormonsystemen. Inhibitoren des RAAS sind das antidiuretische Hormon (synonym: Vasopressin), atriales natriuretisches Peptid und das *brain natriuretic peptide*. Stimulatoren sind Adrenalin und Noradrenalin (61).

## 1.6. Fragestellung

Aus den vorangegangenen Ausführungen ergeben sich für diese Arbeit zwei grundlegende Fragestellungen:

- Besitzt das Biglykan-*knockout* Modell einen kardialen Phänotyp ?

- Sind, bedingt durch die Gendeletion, Unterschiede im kardialen *Remodelling* nach experimentell erzeugtem Myokardinfarkt zu beobachten und ergeben sich daraus funktionelle Konsequenzen und welchen Einfluss hat diese Gendeletion auf die Mortalität nach einem MI im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ?

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten physiologische Daten wie Körpergewicht, Herzgewicht und das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht erhoben. Auf histologischem Wege sollte die Frage einer eventuell unterschiedlichen kardialen Fibrosierung geklärt werden. Durch molekularbiologische Untersuchungen sollte nachgewiesen werden, inwieweit sich die Expression der relevanten Gene, wie z.B. Kollagen I und III, Tgf-beta1 und Decorin, bedingt durch die Gendeletion, ändert.

Funktionelle Aspekte sollten mittels hämodynamischer Messungen untersucht werden.

## 2. Materialien

### 2.1. Geräte

#### Tierhaltung

- Mäusekäfige: Makrolonkäfig Typ II
- Tierwaage: Model CS 200, Ohaus, Gießen, D

#### Chirurgische Eingriffe

- Operationsmikroskop: Vision Manthis<sup>®</sup>, Vision Engineering, Emmering, D
- Beatmungsgerät: Mouse Minivent, Hugo Sachs Elektronik/ Harvard Apparatus, March-Hugstetten, D
- chirurgische Instrumente : Fa. Aesculap, Tuttlingen, D und Fine Science Tools, Heidelberg, D
- Konduktanzkatheter: Millar Instruments, Houston, USA
- Operationstisch: Typ 872/3 F, Hugo Sachs Elektronik / Harvard Apparatus, March-Hugstetten, D

#### RNA-Expressionsbestimmung

- UV-Spektrometer: DU 530, Beckmann, Fullerton, USA
- RT-PCR-Cycler: i-Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
- Realtime-PCR-Cycler: ABI-7000, Applied Biosystems, Darmstadt, D
- Elektrophoresekammer: Model 250 EX, Whatman, Brentford, GB
- Gel-Betrachter: Biorad-Chemidoc, Biorad Laboratories, Hercules, USA

#### Histologie

- Mikrotom: HM 325, Leica Microsystems, Wetzlar, D
- Wasserbad: Störk-Tronic, Bavimed / D
- Einbettung: Microm EC 350-1 und EC 350-2, Microm AG, Volketswil, CH
- Trockenofen: B6 Heraeus, Hanau, D
- Mikroskop: Olympus BH-2, Olympus AG, Hamburg, D
- Kamera: Scion Mod. CFW-1310C, Scion-Corporation, Frederick, USA

#### Laborgeräte

- Thermomixer: Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, D
- Laborschüttelgerät: Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
- Pipetten: Eppendorf, Hamburg / D
- Heizmagnetrührer: RET basic C, IKA-Werke Staufen, D

- Millipore-Wasserfilter: TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, D
- Autoklav: System 2540 EL, System, Wettenberg, D
- Zentrifugen: Mikro 20, Hettich, Tuttlingen, D  
Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, D

## 2.2. Laborverbrauchsmaterialien

- Pipettenspitzen: Sarstedt, Nürnberg, D
- Reaktionsgefäße: Sarstedt, Nürnberg, D
- 96-well Platten: Applied Biosystems, Darmstadt, D
- Objektträger und Deckgläschen: Carl Roth, Karlsruhe, D
- Glasaufbewahrungsflaschen: Schott, Mainz, D
- Kryoröhrchen: nunc<sup>TM</sup>-Cryotubes, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D

## 2.3. Kits

- Invisorb<sup>®</sup> Spin Cell Mini Kit, Invitrogen, Berlin, D

## 2.4. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden „reinst“ oder in analytischer Qualität bezogen. Der Begriff H<sub>2</sub>O steht grundsätzlich für *aqua bidest.* und wurde entweder von Invitrogen bezogen (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D) oder mittels einer Reinstwasseranlage der Firma TKA Wasseraufbereitungssysteme hergestellt.

- PCR-Puffer und MgCl<sub>2</sub> : Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D oder Promega GmbH, Mannheim, D
- RT-Puffer: Promega GmbH, Mannheim, D
- Real-Time Taqman Mastermix: Applied Biosystems, Darmstadt, D
- dNTPs: Sigma, Taufkirchen, D; MBI Fermentas, St Leon-Rot, D; Promega GmbH, Mannheim, D
- DNase: Promega, Mannheim, D
- M-MLV RT-RNase H Minus : Promega, Mannheim, D
- AMV Reverse Transkriptase: Promega, Mannheim, D
- RNasin: Promega, Mannheim, D
- Superscript-II-Reverse-Transcriptase: Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D

## Material und Methoden

---

- Taq-Polymerase: Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D und Invitex, Berlin, D)
- Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder: MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
- Trizol<sup>®</sup>: Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, D
- Pikrinsäure: Merck, Darmstadt, D
- Paraffin: Carl Roth, Karlsruhe, D
- Ethidiumbromid: Carl Roth, Karlsruhe, D
- Xylol: Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
- Ethanol absolut und 96%: Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
- Aceton: Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
- Chloroform: Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
- 2-Propanol: Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
- Agarose: Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
- Glycerol: Carl Roth, Karlsruhe, D
- Orange G: Carl Roth, Karlsruhe, D
- 6x Ladepuffer für Gelelektrophorese: MBI Fermentas, St Leon-Rot
- PBS: PAA Laboratories, Pasching, AT
- RNase-ZAP: Ambion, Cambridgeshire, UK
- Ketamin 10 %: Ketavet<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe, D
- Xylazin 2%: Bayer, Leverkusen, D
- Glucose G 40, B. Braun, Melsungen, D
- NaCl 0,9 %: B. Braun, Melsungen, D
- Ethibond 6-0, Ethicon, Hamburg, D
- Mersilene 5-0, Ethicon, Hamburg, D
- Perma Handseide 7-0, Ethicon, Hamburg, D
- Isofluran, (Florene<sup>®</sup>), Abbott Laboratories, Wiesbaden, D
- Tramadol, (Tramal<sup>®</sup>) 100 Injektions Lösung, Winthrop, Fürstentalsbruck, D
- Thiopental, (Trapanal<sup>®</sup>), Altana, Konstanz, D
- Isoproterenol, Glaxo-Smith-Kline, München, D
- Paraformaldehyd 4% PBS-gepuffert, Carl Roth, Karlsruhe, D
- Paraffin Typ 6, Carl Roth, Karlsruhe, D
- Paraffin Typ 9, Carl Roth, Karlsruhe, D
- Sirius Red F3B 25g GURR, BDH chemicals., Poole, UK
- Pikrinsäure, Merck, Darmstadt, D
- Entellan<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, D

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Sigma (Taufkirchen, D)

## 2.5. Standardpufferlösungen

### Agarose-Gelelektrophorese-Puffer

50x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 40 mM Tris-HCl  
 5 mM Na-Acetat  
 1 mM EDTA  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O pH-Wert 8,0

TBE (Tris-Borat-EDTA) 89 mM Tris  
 89 mM Borsäure  
 2 mM EDTA  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O pH-Wert 8,0

## 2.6. Primer

Alle Primer wurden mit dem Programm Primerexpress 2.0 der Firma Applied Biosystems entworfen, welches optimierte Algorithmen für die Benutzung mit dem Taqman Real-Time PCR System hat. Sowohl der ‚forward‘ (5‘-3‘-Richtung) - als der ‚reverse‘ (3‘-5‘-Richtung) - Primer des jeweiligen Gens wurden gegen das gesamte Organismusgenom und somit auf die mögliche Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

Bei Real-Time RT-PCRs wurden Systeme mit Sonden benutzt (siehe Tabelle). Alle Sonden wurden mit 5‘-FAM als Farbstoff und 3‘-TAMRA als Quencher gelabelt (XT als Verbindungsbase). Alle Primer wurden bei Tib-MolBiol (Berlin, D) oder Sigma (Taufkirchen, D) synthetisiert.

Gen	forward 5‘- 3‘	reverse 3‘- 5‘	Sonde 5‘- 3‘	Annealing-Temp. (C°)
<b>bgn</b> (Biglykan)	CAGGAACA- TTGACCATG	GAAAGGACAC- ATGGCACTGA- AG	-----	56
<b>pgk1</b> (Phospho- glycerat- kinase-1)	TGGATGTGG- AATGTGTGC- GAGG	-----	-----	56

<b>dcn</b> (Decorin)	CCTACCGAT- GCCAGTGTC- ATC	TGGTGTCGGG- TGGAAAATCC	AGTGGTGCAGTGT- TCTGATCTGGGTT- TGGT-XT	60
<b>col I</b> (Kollagen I)	CCAAGGGTA- ACAGTGGTG- AACCT	GGCTCCTCGT- TTTCCTTCTTC	CCAGGTCCCCCA- GGCCTGC-XT	60
<b>col III</b> (Kollagen III)	CAATGTAAA- GAAGTCTCT- GAAGCTGATG	CAAAGACTGTC- TTGCTCCATT- CC	TCACTTACACAGT- TCTAGAGGTGGC- TGTACTAAACACA- C-XT	60
<b>tgf-beta1</b> (trans- forming growth factor beta-1)	GACCCTGCC- TATATTTGGA	CGCCCCGGG- TTGTGTTG	CACAGTACAGCA- AGGTCCTTGCCC- TCTACA-XT	60
<b>18S rRNA</b>	ACCTGGTTG- ATCCTGCCA- GTAG	TTAATGAGCCA- TTCGCAGTTTC	TGCATGTCTAAGT- ACGCACGGCCGT- XT	60

## 2.7. Software

Folgende Computerprogramme wurden bei der Erstellung der Doktorarbeit benutzt:

- Microsoft Windows 2000 und XP
- Microsoft Office 2000 und XP professional
- Adobe Acrobat Professional 6.0
- Image J 1.30
- Sigma Plot 8.0
- Adobe Photoshop 6.0
- WinStat
- EndNote

## 3. Methoden

### 3.1. Studiendesign

Es wurden Untersuchungen an Biglykan-defizienten Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen (aus der gleichen Zucht stammend) durchgeführt.

Die Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben „G192/02“, welche am 09.12.2002 erteilt wurde. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des Deutschen Ethikrates und der US-Gesundheitsbehörde NIH und mit Billigung der Ethikkommission der Humboldt-Universität zu Berlin / Campus Charité Mitte und der Freien Universität Berlin / Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

Die basalen Untersuchungen wurden an 3, 6 und teilweise 15 Monate alten Tieren vorgenommen. Der experimentelle Herzinfarkt wurde bei Tieren im Alter von 12 Wochen durchgeführt. Die Gruppengröße betrug jeweils mindestens 6 – 10 Tiere.

Die Tiere der Gruppen für den experimentellen Myokardinfarkt wurden vor Beginn der Studie randomisiert in folgende Gruppen eingeteilt.

1. Gruppe :Wildtyp-Maus (WT-MI)

2. Gruppe: Biglykan-*knockout* Maus (KO-MI)

3. Gruppe: Wildtypmaus scheinoperiert (WT-Sham)

4. Gruppe: Biglykan-*knockout* Maus scheinoperiert (KO-Sham)

### 3.2. Mausstämme

In dieser Studie wurden transgene Mäuse verwendet, bei denen das für „Biglykan“ (bgn) kodierende Gen mittels ‚*Knockout*‘-Technologie ausgeschaltet wurde. Das bgn-Gen wird in diesen Tieren nicht mehr transkribiert (siehe 1.4.). Sowohl die transgenen Mäuse als auch die Kontrolltiere (Wildtyp) beruhen auf dem Stamm „C 57Bl6/J“ und entstammen der gleichen Zucht.

Die Verwendung der Tiere erfolgte mit Genehmigung von Dr. Marian F. Young, vom National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Zur Verfügung gestellt wurden die Tiere freundlicherweise von Dr. Elke Schönherr, Matrix Biology and Tissue Repair Research Unit, Cardiff University Dental School, Cardiff, GB.

### 3.3. Tierhaltung

Alle Mäuse wurden während des gesamten Versuchszeitraums in einem Tierstall der Sicherheitsstufe S1 gehalten. Die Räume standen unter Überdruck und wurden nur nach Händedesinfektion mit Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz und Kopfhaube betreten. Die Tiere wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in einem „Makrolonkäfig“ des Typs II gehalten. Die Raumtemperatur lag konstant bei 20°C mit 50-60 % Luftfeuchtigkeit. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser. Die Besatzdichte mit adulten Tieren betrug 5 Tiere pro Käfig. Der Gesundheitszustand wurde täglich durch das Pflegepersonal sowie durch monatliche veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

### 3.4. Tierzucht

Geschlechtsreife männliche hemizygote Biglykan-*knockout* Mäuse wurden mit geschlechtsreifen heterozygoten Biglykan-*knockout* Weibchen verpaart, um für die tierexperimentellen Arbeiten sowohl männliche Biglykan-*knockout* Tiere, als auch Wildtyp-Mäuse gleichen genetischen Hintergrundes (sog. ‚littermates‘) zur Verfügung zu haben. Ein Teil der Tiere wurde auch für die Weiterzucht verwendet. In Abbildung 4 ist das Zuchtprinzip dargestellt.

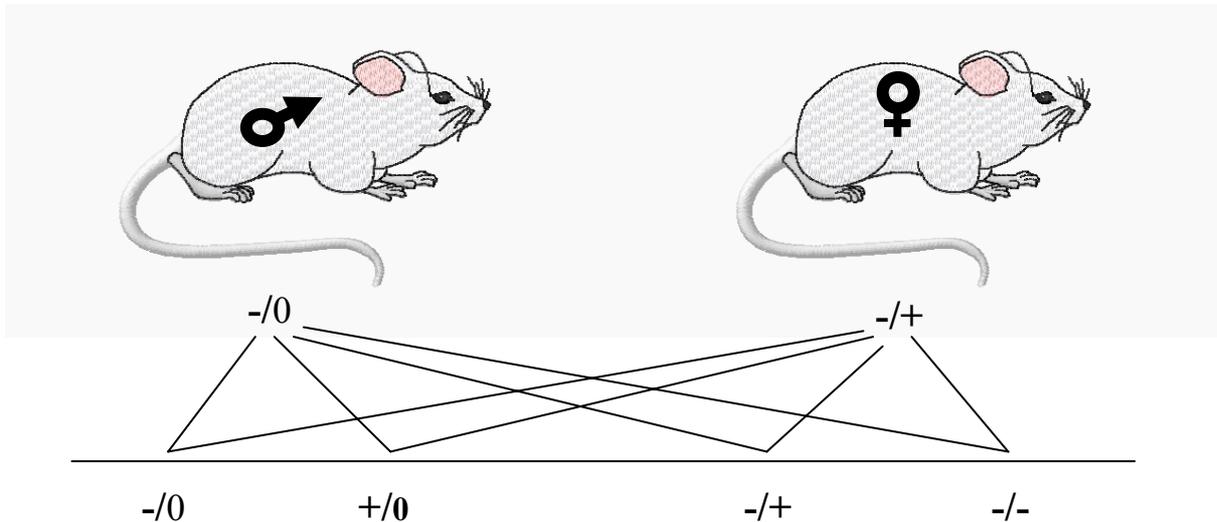


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zuchtprinzips (eigene Darstellung)

### 3.5. Genotypisierung

#### Grundsätzliches Schema der Genotypisierung:

Gewinnung biologischen Materials > DNA-Extraktion > PCR > Gelelektrophorese

#### Ablauf der Genotypisierung

Zur sicheren Feststellung des Genotypes wurden alle Mäuse im Alter von ca. 3 Wochen nach Geschlechtern sortiert und mit Ohrmarken fortlaufend nummeriert. Anschließend wurde eine Schwanzbiopsie durchgeführt. Die ca. 3 mm großen Schwanzstückchen wurden umgehend in, mit entsprechenden Nummern versehenen, Aufbewahrungsröhrchen (Eppendorf-Reaktionsgefäße) verbracht und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Gewinnung der genomischen DNA erfolgte mit dem *Invisorb® Spin Tissue Mini Kit* (Invitek) nach folgender Vorgehensweise:

Inkubieren des Gewebestückes mit 400 µl Lyse-Puffer und 40 µl Proteinase-K bei 52°C bei konstantem Schütteln im Thermomixer bis zur kompletten Lyse der Probe. Darauf erfolgt eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm, anschließend Transfer des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von Bindungs-Puffer, vortexen für ca. 10 Sekunden.

Transfer der Lösung auf ein Filterröhrchen (in neuem Reaktionsgefäß) und Inkubation für 1 Minute, 2 min Zentrifugation bei 12.000 Upm und Verwurf des Zentrifugates.

Zweimalige Spülung des Filterröhrchens mit 550 µl Wasch-Puffer, jeweils mit folgender einminütiger Zentrifugation bei 12.000 Upm und Verwurf des Zentrifugates, abschließende dreiminütige Zentrifugation

Inkubation des Filterröhrchens (in neuem Reaktionsgefäß) mit 20 µl vorgewärmten Elutions-Puffer für 3 min bei 52°C im Thermomixer, Zentrifugation für 3 min bei 10.000 Upm.

Die Pufferlösung mit der nun enthaltenen genomischen DNA wurde stichprobenweise im UV-Spektrophotometer auf Gehalt und Qualität hin vermessen (Prinzip siehe auch unter RNA-Qualitätskontrolle) und bis zur weiteren Verwendung (PCR) im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

Die Genotypisierung fand nach folgendem PCR Protokoll statt:

PCR-Protokoll Genotypisierung (Ansatz für 25 µl)

2,5 µl PCR-Puffer (10x)  
0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50mM)  
1,0 µl bgn -forward Primer (10mM)  
1,0 µl bgn -reverse Primer (10mM)  
1,0 µl PGK-1 Primer (10mM)  
0,75 µl dNTP (10mM)  
0,125 µl Taq-Polymerase  
1,0 µl gDNA (ca. 200-300 ng/µl)  
*ad 25 µl aqua bidest.*

Die Reaktionsgefäße wurden im Sammelbehälter für 2 min bei 5000 U/min zentrifugiert und zur folgenden PCR in die PCR-Maschine (Thermocycler) verbracht. Probenansatz, Zentrifugation und Transport erfolgten auf Eis, bzw. bei 4°C. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen (Latex- oder Nitrilhandschuhe, autoklaviertes Verbrauchsmaterial, regelmäßige Desinfektion der Arbeitsflächen, Geräte und Hände mit 70% Ethanol oder *RNAse-Zap*) statt.

Die Proben wurden nach Beendigung des PCR Programms bis zur Beladung der Geltaschen zur Elektrophorese konstant bei einer Temperatur von 4°C gehalten bzw. auf Eis transportiert.

PCR Programm Genotypisierung	
4 min 94°C	
1 min 94°C	} x 35 Zyklen
30 sek 56°C	
30 sek 72°C	
10 min 72°C	
Kühlung 4°C	

### 3.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Fragmenten. Benötigt werden eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen Matrizen-DNA (gDNA oder cDNA), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's), Oligonukleotid-Primer und geeignete Pufferbedingungen. Der PCR-Zyklus besteht im ersten Schritt aus der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges. Nach der Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige DNA (Annealing) beginnt die Polymerase vom freien 3'-OH Ende des Primers aus, einen neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Der eigentliche Schritt der Amplifikation liegt in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die vorhandene Menge an DNA exponentiell vermehrt wird. Für die automatisierte Durchführung ist eine thermostabile DNA-Polymerase notwendig. Im Allgemeinen wird dazu die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase besitzt keine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch eine Korrekturaktivität („proof reading“) nicht gegeben ist.

### 3.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese kann zu analytischen und auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Grundprinzip ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Dies erfolgt mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates der DNA-Fragmente. Die Mobilität der DNA ist größtenteils von Fragmentgröße und Konformation abhängig. Kompakte, superhelikale Fragmente bewegen sich entsprechend schneller als weniger kompakte, relaxierte Formen.

Anders verhält es sich bei linearisierter DNA. Hier erfolgt die Auftrennung ausschließlich nach Fragmentgröße. Größere Fragmente bewegen sich langsamer als kleinere. Die analysierbare Fragmentgröße hängt von der Porengröße eines Gels und somit von der Konzentration an Agarose, einem aus Rotalgen gewonnenem Polysaccharid, ab. Gebräuchliche Konzentrationen an Agarose sind 1,5 % bis 2 %. Hierzu werden z.B. 100 ml 1 x TAE Lösung mit 1,5 g Agarosepulver aufgeköcht (Mikrowelle).

Anschließend wird dieses Gemisch auf einem Heizrührer mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,2 µg/ml) und in Formen (mit eingestecktem Kamm zur Bildung der Geltaschen) gegossen.

Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und ermöglicht so die Detektion dieser bei Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Transilluminator mit Fotografier-Einheit).

Die DNA-Proben werden im Verhältnis 5:1 mit einem Ladepuffer (10% Glycerol, 0,01% Orange G) versetzt, und mehrfach resuspendiert.

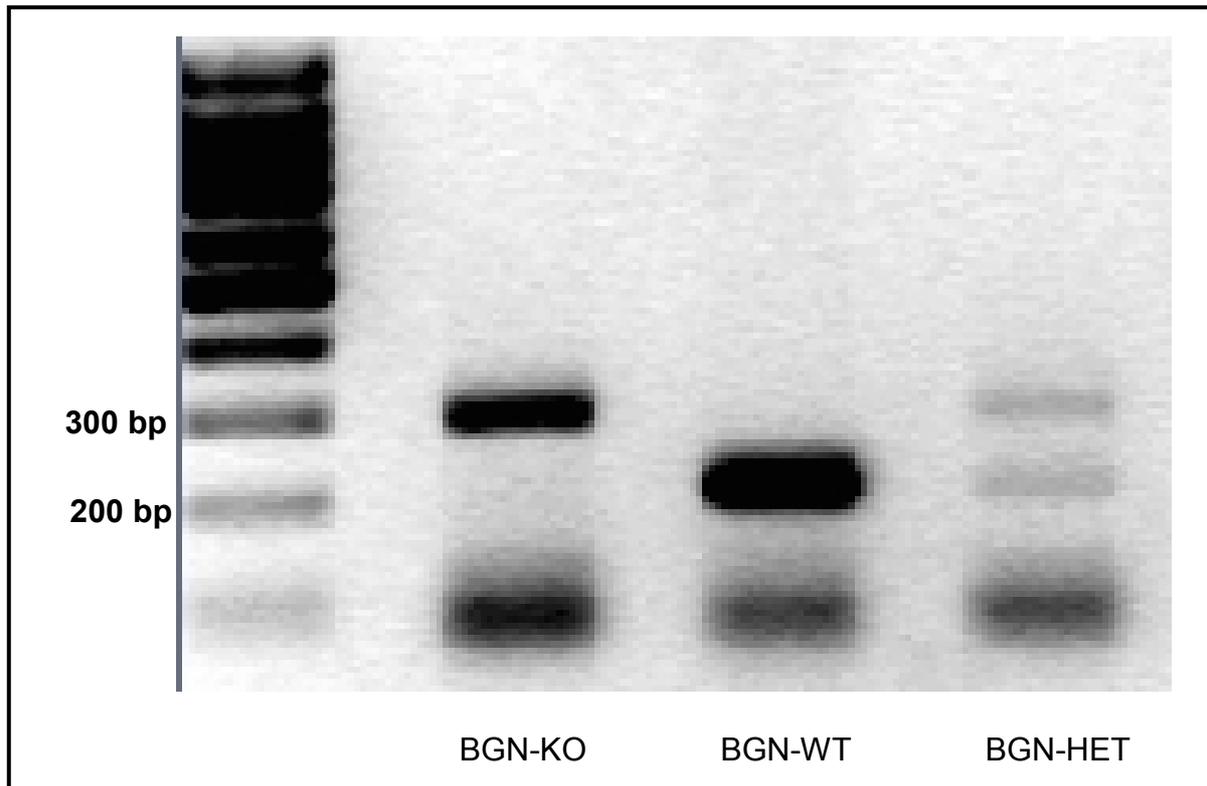
Anschließend werden 10 - 15 µl der Suspension (je nach Taschengröße) in die im Gel vorhandenen Taschen pipettiert. Zur Bestimmung der Größe des zu analysierenden Fragmentes wird ein Längenstandard mit aufgetragen.

Die eigentliche Gelelektrophorese findet in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 80 - 100V in 1x TAE-Puffer für 45 bis 60 Minuten statt.

Die Gelelektrophorese zur Genotypisierung erfolgte mit einem 1,5 % TAE-Gel bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von 45 Minuten. Als Längenstandard wurde eine 100 bp (base pairs / Basenpaare) DNA-Leiter benutzt.

In Abbildung 5 ist das Foto eines Agarose-Gels nach Gelelektrophorese, aufgenommen im UV-Strahlengang, dargestellt. Auf der linken Bildseite ist eine DNA-Leiter zum Größenvergleich dargestellt. Daneben zeichnen sich die DNA-Banden der Biglykan-*knockout* Mäuse, der Wildtyp-Mäuse und der heterozygoten Tiere ab.

Aufgrund der unterschiedlichen Amplikongrößen ließen sich auf diese Weise hemizygoten *Knockout*-Tiere (bgn-KO) (310 bp) und Wildtyp-tiere (bgn-WT) (212 bp), sowie heterozygote Weibchen (bgn-HET) (Doppelbande bei 310 bp und 212 bp) sicher voneinander unterscheiden.



**Abbildung 5: Foto eines Agarose-Gels nach der Elektrophorese im UV-Strahlengang. Ausgehend von der DNA-Leiter stellen sich von links nach rechts die DNA-Banden der Biglykan-*knockout* Mäuse (310 bp), der Wildtyp-Mäuse (212 bp) und der heterozygoten Tiere (Doppelbande bei 310 und 212 bp). In der unteren Reihe der Abbildung sind unspezifische Banden zu sehen.**

### 3.8. Experimenteller Myokardinfarkt

Sämtliche chirurgischen Eingriffe in Zusammenhang mit dem experimentellen Myokardinfarkt und den hämodynamischen Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Dr. Dirk Westermann in den Arbeitsräumen der Arbeitsgruppe Tschöpe, Forschungseinrichtung experimentelle Medizin (FEM), Kraemerstr. 6 in 12207 Berlin.

Die Mäuse (ca. 12 Wochen alt) wurden mit einem Ketamin-Xylazin Gemisch (100mg/kg / 20mg/kg) durch eine intraperitoneale Injektionsnarkose anästhesiert und auf einer Wärmeplatte in Rückenlage fixiert.

Ketamin 10%: 0,5 ml

Xylazin 2%: 0,1 ml

NaCl 0,9%: 4,4 ml

 5,0 ml

0,1 ml / 10 g KGW i.p.

Die Überprüfung der chirurgischen Toleranz erfolgte anhand der Flexorreflexe (Schwanzreflex, Zwischenzehenreflex). Die Körperinnentemperatur wurde permanent mittels einer Rektalsonde gemessen, welche mit der Heizplatte gekoppelt war. Die Körperinnentemperatur wurde somit automatisch auf einem Wert von konstant 38°C gehalten. Um einer Austrocknung der Kornea vorzubeugen wurde mit einsetzender Narkose eine polymerhaltige Tränenersatzflüssigkeit (Thilo-Tears®) auf die Hornhaut appliziert.

Anschließend erfolgte die orotracheale Intubation mittels einer Venenverweilkanüle (ohne Stahlmandrin) der Größe 22G (blau) oder eines speziellen Tubus der Fa. Harvard Apparatus. Zur besseren Sichtkontrolle wurde der ventrale Halsbereich mittels einer Kaltlichtquelle durchleuchtet und der Tubus während der Inspirationsphase vorgeführt.

Die Tuben wurden mittels eines Y-Adapters mit der Beatmungsmaschine verbunden. Die maschinelle Beatmung der Mäuse erfolgte mit einem Sauerstoff-Isfluran Gemisch (Isflurankonzentration 2,5 – 2,0 Vol.%) bei einer Frequenz von ca. 130 Atemhüben/min und einem Atemzugvolumen von 200 – 300 µl. Die Einstellungen der Atemfrequenz und des Atemzugvolumens variierten, abhängig von Größe und Gewicht der Tiere. Der Erfolg der Intubation wurde durch visuelle Kontrolle der Thoraxbewegung kontrolliert.

### **OP-Technik des experimentellen Myokardinfarktes der Maus**

Nach linksseitiger parasternaler Schnitinzision erfolgt eine stumpfe Präparierung der Brustmuskulatur bis auf die Rippenmuskulatur. Nach Durchtrennung der Zwischenrippenmuskulatur erfolgt eine Thorakotomie im Bereich der 3./4. oder 4./5. Rippe unter Schonung der Lungenflügel.

Anschließend wird das Perikard chirurgisch entfernt und die linke Koronararterie mit einem Faden (Perma-Handseide 7-0) umschlungen und ligiert. Der Erfolg der Infarktinduktion wird durch makroskopische Veränderung des Herzgewebes im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels kontrolliert.

Bei der Schein-Operation wird analog verfahren, nur dass hierbei ein Knoten auf dem Gewebe des linken Ventrikels gesetzt wird, ohne eine Gewebsquetschung zu verursachen, und somit möglicherweise das Abbinden einer Koronararterie zu induzieren.

Folgend wird der Thorax durch Adaption der vormals getrennten Rippenbögen mittels Einzelheften (Mersilene 5-0) verschlossen. Beim Setzen des letzten Heftes wird das

Atemvolumen an der Beatmungsmaschine maßvoll erhöht und das Gerät kurz in der Phase der maximalen Inspiration angehalten. Hiermit wird gewährleistet, dass ein möglichst geringes Residualvolumen in der Thoraxhöhle verbleibt. Die restliche verbliebene Luft wird aufgrund der hohen Stoffwechselrate der Maus zügig resorbiert, so dass gegen Ende des chirurgischen Eingriffes schon wieder ein physiologisches Vakuum im Brustkorb herrscht.

Anschließend wird die Brustmuskulatur *in situ* über der Thoraxnaht platziert und die Haut mittels fortlaufender Naht verschlossen.

Die mit Ketamin begonnene Analgesie wird mit Tramadol (15 mg/kg s.c.) fortgeführt. Zusätzlich wird ein Depot von 1 ml eines NaCl-Glucose-Gemisches subkutan appliziert. Die Mäuse werden nun ausschließlich mit Raumluft beatmet um das Isofluran schneller abfluten zu lassen. Im Gegensatz zur Beatmung mit reinem Sauerstoff wird hierdurch auch das Atemzentrum schneller wieder angeregt.

Nach schrittweiser Entwöhnung von der künstlichen Beatmung werden die Tiere beim Einsetzen stabiler selbstständiger Atemrhythmik extubiert.

Um den postoperativen Stress soweit wie möglich zu reduzieren, werden die Mäuse bis zum vollständigen Erwachen in einen auf 25°C temperierten und belüfteten Brutschrank gesetzt.

### 3.9. Invasive Hämodynamikmessung

Die Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve mittels der Konduktanzmethode ist die genaueste Methode um die linksventrikuläre systolische und diastolische Pumpfunktion des Herzens zu beschreiben. Eine große Anzahl von volumenabhängigen und auch volumenunabhängigen Parametern steht durch diese Analyse zur Verfügung, welche einen genauen Rückschluss auf die kardiale Funktion zulassen. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven gilt daher als „Goldstandard“ der Hämodynamik-Messung bei Menschen und großen Tieren.

Durch die Entwicklung eines Konduktanz-Katheters für Kleintiermodelle ist es gelungen, diese Druck-Volumen-Kurven auch *in vivo* im Maus- und Rattenmodell aufzuzeichnen. Die Methode ist insbesondere geeignet, den kardialen Phänotyp genetisch veränderter Kleintiere zu untersuchen.

#### 3.9.1. Technik des Konduktanz-Katheters

Der Druck-Volumen-Katheter kann durch Messung der Konduktanz, also der Leitfähigkeit des Blutes, das Volumen im linken Ventrikel bestimmen. Der Katheter besteht aus vier Elektroden und einem Drucksensor. Die Elektroden sind paarweise über und unter dem

Drucksensor angebracht. Die Messung von kardialen Blutvolumina mittels dieser Elektroden beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußeren Elektroden im linken Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich aufgezeichnet, um so die Konduktanz zwischen den Elektroden im Ventrikel zu messen.

Durch die Formel

$$V_i(t) = (1/\alpha) (\rho L^2) [G_i(t) - G_{pi}]$$

wird nun das intraventrikuläre Volumen  $V_i$  errechnet. Hierbei ist  $\alpha$  ein Volumen-Kalibrationsfaktor,  $\rho$  der elektrische Widerstand des Blutes,  $L$  der Abstand zwischen den Elektroden,  $G_i$  beschreibt die Gesamt-Konduktanz und  $G_{pin}$  die Konduktanz des umgebenden Gewebes, die so genannte „parallele Konduktanz“. Durch diese Berechnung ist es möglich, in Echtzeit und *in vivo* Druck und Volumen aufzuzeichnen, um so Druck-Volumen-Kurven zu erstellen.

### 3.9.2. Narkose

Zur Induktion der Narkose für die hämodynamischen Messungen wurde Thiopental verwendet. (125 µg/kg KGW i.p.)

Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz (Zwischenzehenreflex) gesetzt und die Dosis bei Bedarf um 10% erhöht.

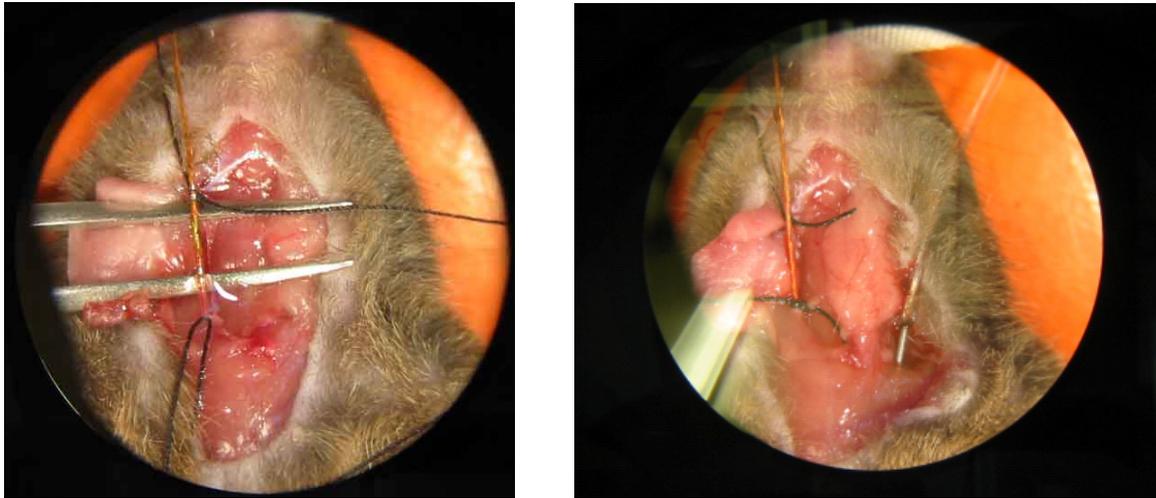
### 3.9.3. Intubation und Ventilation

Die Mäuse wurden wie unter dem Punkt „experimenteller Myokardinfarkt intubiert. Die Ventilation mit Raumluft wurde mit einem Hubvolumen von 8 µl/g (200-300 µl/ Zug und Tier) Körpergewicht und 200 Zügen pro Minute durchgeführt.

### 3.9.4. Linksventrikuläre Katheterisierung

Es wurde ein Hautschnitt in Längsrichtung von kaudal nach kranial durchgeführt und sowohl die Halsmuskulatur als auch die Speicheldrüsen durchtrennt, wobei ein Blutverlust konsequent vermieden wurde. Eventuelle Blutungen wurden koaguliert. Die rechte *Arteria carotis communis* wurde dargestellt und sowohl proximal als auch distal wurden Blutsperrern angelegt. Mit Mikroinstrumentarium wurde der Konduktanzkatheter in das Gefäß eingebracht

und danach retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und durch ständige Kontrolle der Druck-Volumen-Kurve optimal platziert.



**Abbildung 6: Einführen des Konduktanzkatheters in die *Arteria carotis***

### 3.9.5. Kalibrierung des Konduktanz-Volumen-Signals

Wie beschrieben ist das aufgezeichnete Volumensignal ein Gesamtvolumen aus der Konduktanz des Blutes und der parallelen Konduktanz. Durch Infusion von hypertoner Kochsalzlösung kann die parallele Konduktanz ermittelt und so das reale Blutvolumen errechnet werden (63). Hierzu wird die linke *Vena jugularis* punktiert. Anschließend werden 5 $\mu$ l 10%-NaCl infundiert. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nimmt durch den Einstrom der hypertonen NaCl-Lösung rapide zu, obwohl das Volumen unverändert bleibt. Das zeigt, dass das Konduktanzsignal die Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel angibt und daraus das Blutvolumen errechnet werden kann.

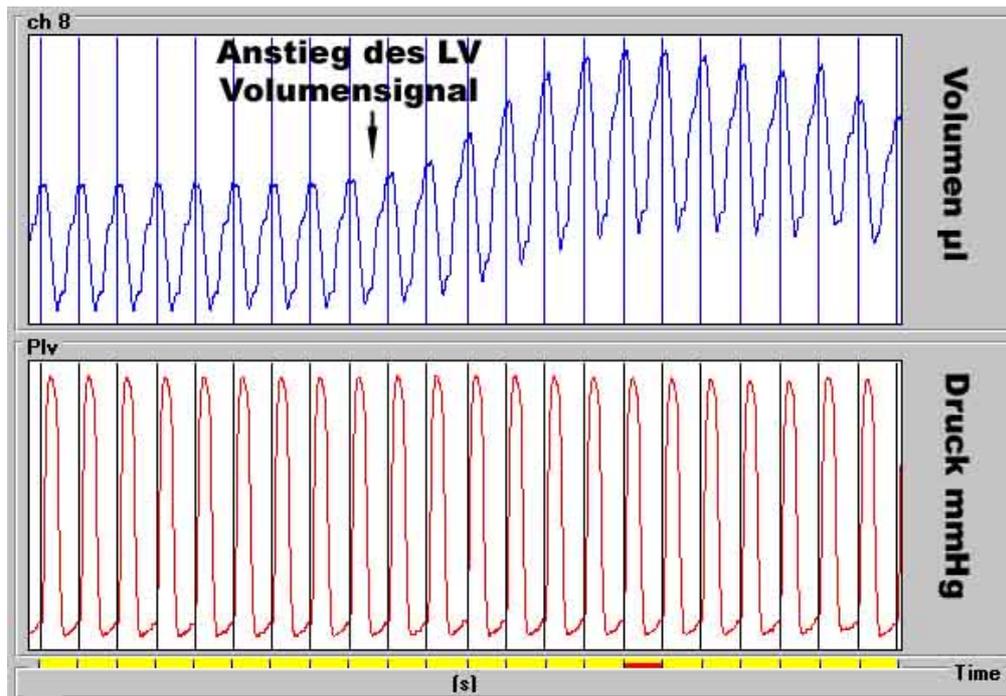
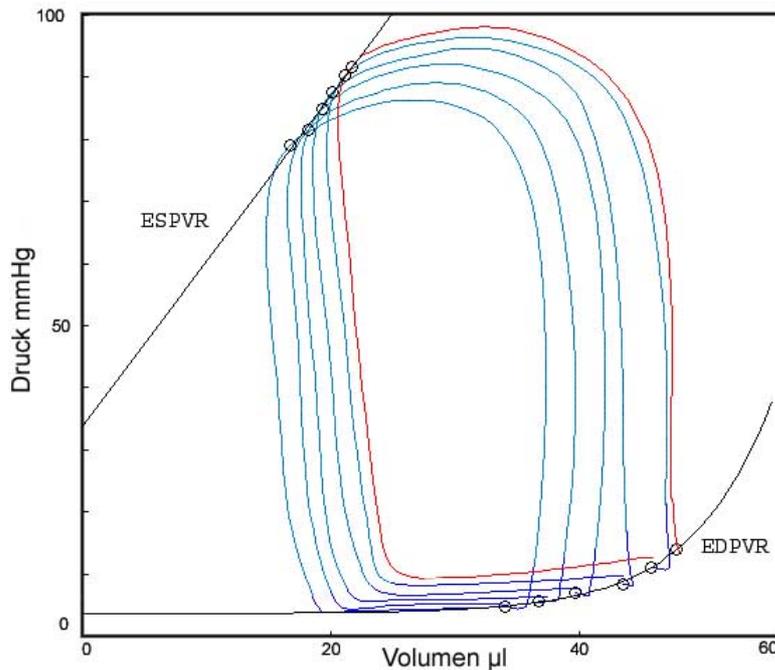


Abbildung 7: Anstieg des Konduktanzsignals während Applikation eines 10% NaCl-Bolus

### 3.9.6. Aufzeichnung der Hämodynamik

Zur Aufzeichnung der basalen Hämodynamik wurde der Katheter im linken Ventrikel platziert und danach fixiert. Für jede Aufzeichnung der Hämodynamik wurde die Ventilation für etwa fünf Sekunden abgestellt und in Apnoe-Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet. Die dabei gewonnenen ca. 30 Herzschläge wurden später analysiert und als Mittelwert aller Schläge ausgewertet.

*Vena-cava*-Okklusions-Hämodynamik: Zur Aufzeichnung von vorlastunabhängigen Hämodynamik-Parametern wurde die Vorlast gesenkt und gleichzeitig die Hämodynamik im linken Ventrikel gemessen. Zur Senkung der Vorlast wurde die *Vena cava inferior* nach der Eröffnung des Peritoneums mit einer Pinzette für etwa 3 Sekunden abgeklemmt. Dadurch fiel der Druck im linken Ventrikel und das Volumen verringerte sich, so dass die Druck-Volumen-Kurven abfielen und nach links verschoben wurden.



**Abbildung 8: Druck-Volumen-Kurven einer Maus während der Vorlastreduktion.**  
Eingezeichneter ESPVR (linear) und EDPVR (exponentielle Funktion)

### 3.9.6.1. Werte der systolischen Herzfunktion

Aus diesen Messungen wurden als Maß für die *systolische Funktion* folgende Werte analysiert:

#### Herzfrequenz

Die Herzfrequenz (HF) zeigt die Herzschläge pro Minute an und wird in Schlägen pro Minute angegeben (b/min).

#### Maximaler linksventrikulärer Druck

Der maximale linksventrikuläre Druck (LVP max.) ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel und ist daher ein Parameter der systolischen Herzfunktion. Der maximale linksventrikuläre Druck wird in mmHg angegeben.

#### Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt$  max.) ist ein Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels. Dieser Parameter wird mathematisch aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und stellt daher die Geschwindigkeit der Veränderungen des Drucks im Ventrikel

dar. Die Drucksanstiegsgeschwindigkeit wird durch die Einheit mmHg / Sekunde (mmHg/s) beschrieben.

### **Schlagvolumen**

Das Schlagvolumen (SV) ist das Volumen, das während der Ejektion aus dem Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird. Man errechnet es, indem man das enddiastolische Volumen vom endsystolischen Volumen subtrahiert:  $ESV - EDV = SV$ . Angegeben wird das Schlagvolumen bei der Maus in  $\mu\text{l}$ .

### **Herzminutenvolumen bzw. Cardiac output**

Das Herzminutenvolumen (HMV) wird in der Literatur häufig auch als Cardiac Output (CO) bezeichnet und stellt einen Effektivitätsparameter dar, welcher beschreibt, welches Volumen ( $\mu\text{l}$ ) pro Zeiteinheit (Minuten) aus dem linken Ventrikel befördert werden können. Das Herzminutenvolumen wird in  $\mu\text{l}/\text{min}$  angegeben.

### **Ejektionsfraktion**

Die Ejektionsfraktion (EF) ist die prozentuale Auswurfsfraktion des maximalen, also des enddiastolischen Volumens des linken Ventrikels. Es wird durch folgende Formel:

$$(\text{Maximales Volumen} - \text{minimales Volumen}) / (\text{maximales Volumen} \times 100) = EF$$

errechnet und stellt einen wichtigen Faktor der systolischen Funktion dar. Dabei ist es wichtig zu wissen, dass die Ejektionsfraktion von der Vor- und Nachlast und somit vom Volumen abhängig ist. Angegeben wird die EF in Prozent (%).

### **Endsystolisches Volumen**

Das endsystolische Volumen (ESV) ist das minimale Volumen, das nach dem Auswurf des Blutes im linken Ventrikel verbleibt. Im Mausmodell wird das Volumen, wie alle Volumina im Herzen, in  $\mu\text{l}$  angegeben.

### **3.9.6.2. Werte der diastolischen Herzfunktion**

Als Maß für die **diastolische Funktion** wurden aus diesen Messungen folgende Parameter analysiert:

#### **Linksventrikulärer enddiastolischer Druck**

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter der diastolischen Funktion. Er ist der Druck, der am Ende der

Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird. Der LVEDP wird in mmHg angegeben.

### **Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit**

Die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{min}$ ) ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation. Er wird analog zur maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit aus der 1. Ableitung der Druckkurve errechnet und daher in mmHg/s angegeben.

### **Tau**

Tau ist ein Parameter der frühen diastolischen Funktion. Es bezeichnet den Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, wenn der Druck noch 10% des maximalen LVP ist und stellt somit einen weiteren Relaxationsparameter dar. TAU wird in Millisekunden (ms) angegeben.

### **Enddiastolisches Volumen**

Das enddiastolische Volumen (EDV) ist das minimale Volumen, das nach dem Ende der Diastole im linken Ventrikel verbleibt.

Im Mausmodell wird das Volumen, wie alle Volumina im Herzen, in  $\mu$ l angegeben.

### **Enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung**

Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) ist ähnlich wie die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) ein vor- und nachlastunabhängiger Parameter und so nur durch die Vorlastsenkung während der *Vena-Cava*-Okklusion zu gewinnen. Mit diesem Parameter kann die intrinsische Steifigkeit während der diastolischen Dehnung des linken Ventrikels bestimmt werden. Die Errechnung der EDPVR ist durch verschiedene mathematische Annäherungen möglich. Es wird eine lineare oder eine exponentielle Funktion durch die enddiastolischen Druck-Volumen-Kurven gebildet. Dabei wird entweder die Steigung der linearen Funktion oder die exponentielle Steilheit der Kurve als Wert für die EDPVR gedeutet. Besonders im Mausmodell wird die exponentielle Funktion benutzt, da die EDPVR sich so genauer ausdrücken lässt. Dieser Parameter wurde nur bei den basalen Hämodynamikmessungen und bei den Sham-operierten Tieren erhoben, da die Mortalitätsrate bei infarzierten Tieren zu groß ist, um statistisch auswertbare Daten bei akzeptablen Gruppengrößen zu gewinnen.

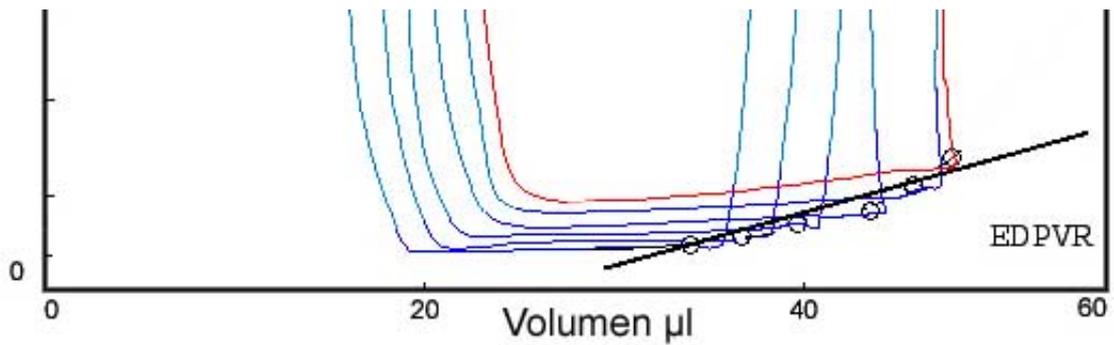


Abbildung 9: EDPVR, lineare Annäherung

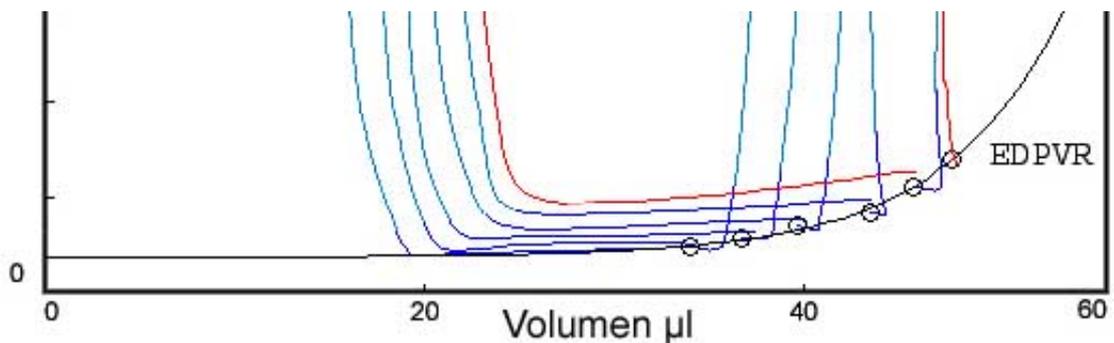


Abbildung 10: EDPVR, exponentiale Annäherung

### 3.10. Organentnahme

Die Organentnahmen erfolgten entweder in Narkose (Thiopental 250 µg/kg KGW i.p.) mit nachfolgender zervikaler Dislokation, oder nach Beendigung der invasiven Hämodynamikmessung im Anschluss an eine finale KCl-Bolusinjektion.

Unmittelbar nach Herzstillstand erfolgte die Organentnahme. Dazu wurde das Herz unverzüglich freipräpariert und die zu- und abführenden Gefäße (*Vv. cavae*, *Truncus pulmonalis*, *Vv. pulmonales*, *Arcus aortae*) herzbasisnah durchtrennt.

Anschließend wurde das Organ dreimalig in PBS-Lösung gewaschen, wobei insbesondere restliches vorhandenes Blut aus dem Herzlumen durch Spülung mit PBS-Lösung entfernt wurde. Die Waschlösung wurde regelmäßig erneuert. Organentnahme und Organpräparation erfolgten unter sterilen Bedingungen und - soweit vom Arbeitsablauf her möglich - auf Eis.

Dazu wurden Handschuhe, Arbeitsflächen und Instrumente vor jeder Organentnahme mit 70% Ethanol und RNase-ZAP desinfiziert.

Das entnommene Herz wurde gewogen und in einem speziellen Schnittblock mit Rasierklingen in gleich starke Scheiben geschnitten. Die beiden Scheiben mit dem größten Durchmesser wurden für die weitere Auswertung wie folgt aufbereitet:

Der Herzquerschnitt für die histologische Probenauswertung wurde in beschrifteten Einbettungskassetten in 4 % PBS-gepuffertes Formaldehyd (Formalin) eingelegt.

Für die molekularbiologische Analysen wurde die andere Herzscheibe dreifach in PBS-Lösung gewaschen und anschließend Proben aus der linken Ventrikelwand und dem Septum gewonnen. Bei infarzierten Tieren wurde aus der linken Ventrikelwand ausschließlich Infarktarnbengewebe entnommen.

Die Proben für molekularbiologische Analysen wurden umgehend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die endgültige Aufbewahrung erfolgte im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Herzen, die nach den Querschnitten keinen transmuralen Infarkt aufwiesen, wurden nicht in die spätere Auswertung der hämodynamischen Daten einbezogen.

### 3.11. mRNA-Isolierung aus Gewebe

Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Die Gewebestückchen wurden im mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mechanisch zerkleinert.

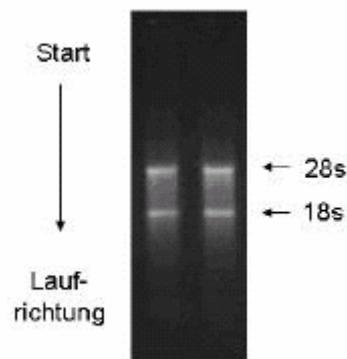
Die Weiterverarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur nach folgendem Protokoll:

50-100 mg Gewebe wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, 200  $\mu\text{l}$  Trizol<sup>®</sup> dazu pipettiert und das Trizol<sup>®</sup>-Gewebe-Gemisch homogenisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit Trizol auf 1000  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und ca. 5 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform dazu pipettiert. Nun wurde die Probe ca. 15 sek vorsichtig geschüttelt und dann für 3 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min ( $4^{\circ}\text{C}/12000$  Upm). Anschließend wurde der klare RNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hier wurden 500  $\mu\text{l}$  2-Propanol dazugeben, 10 min inkubiert und wieder für 10 min ( $4^{\circ}\text{C}/12000$  Upm) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde nun verworfen und zum verbliebenen RNA-Pellet 1ml Ethanol hinzugegeben. Auf einer Laborrüttelmaschine (Vortex) wurde die Probe erneut für 10 s gemischt und folgend für 5 min zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}/7500\text{g}$ ). Der Überstand wurde wiederholt verworfen und das entstandene Pellet getrocknet (bis es milchig wurde). Anschließend erfolgte ein vorsichtiges Auflösen des Pellets durch Resuspendieren mit ca 50  $\mu\text{l}$  DEPC- Wasser.

### 3.12. mRNA-Qualitätskontrolle

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde im UV-Spektrophotometer der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis der Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm zu der bei einer Wellenlänge von  $\lambda=280$  nm lässt auf die Reinheit der RNA schließen und sollte idealerweise bei 1,8 liegen.

Als weitere Kontrolle diente ein 1 % TBE-Agarose Gel (3,5 µl / 50 ml Gel-Ansatz), auf das 1 µg mRNA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wird. Die prominenten Untereinheiten 18S-rRNA und 28S-rRNA sind als Banden durch Ethidiumbromideinlagerung sichtbar, wie in Abbildung 11 zu sehen ist. Degradation bzw. Rückstände von genomischer DNA-Verunreinigung in den Taschen können auf diese Weise visuell identifiziert werden.



**Abbildung 11: mRNA- Qualitätskontrolle mittels eines TBE-Agarosegels.**

### 3.13. RT-Reaktion zur cDNA- Synthese

1µg mRNA wurde mit 1µg Random-Primern in einem Volumen von 13,5 µl versetzt und die Mixtur 5 Minuten bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde sofort auf Eis überführt und nach Abkühlung dort mit den folgenden Reagenzien versetzt:

0,5 µl RNasin

4 µl 5x First strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>)

1 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl M-MLV RT RNase H Minus

20 µl Gesamtvolumen

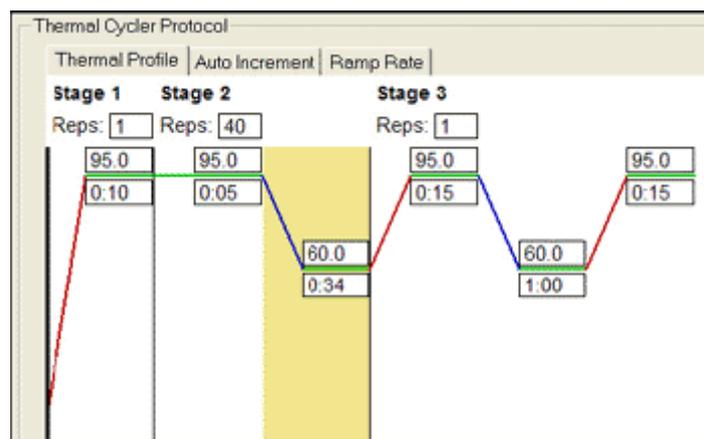
Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Analyse der cDNA durch Real Time RT-PCR.

### 3.14. Real-Time RT-PCR

Im Gegensatz zur semiquantitativen RT-PCR kann bei der Real-Time RT-PCR der gesamte Amplifikationsprozeß verfolgt werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge

einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Es wurden spezifisch markierte Sonden eingesetzt. Die höhere Genauigkeit und Sensitivität dieser SONDENSYSTEME resultiert aus der sequenzspezifischen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals. Die SONDENSYSTEME erhalten durch Hybridisierung an die Zielsequenz und Trennung der räumlichen Nähe des Quenchers vom Farbstoff durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Polymerase die Fähigkeit zur Fluoreszenz. Zur Messung wurde ein *ABI7000 Sequence Detection System* verwendet, ausgerüstet mit der geräteeigenen Software in der Version 2.0.

Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen wobei die Annealingtemperatur, entsprechend den Primereigenschaften, angepasst wurde. In Abbildung 12 ist beispielhaft der Ablauf eines solchen Temperaturprogramms dargestellt. In einem ersten Schritt findet die Denaturierung der cDNA und der Primer bei 95°C für 10 Sekunden statt. Im zweiten Zyklus, der sich in seiner Gesamtheit 40-mal wiederholt, kommt es nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 Sekunden zum eigentlichen Amplifikationsschritt bei einer Temperatur von 60°C über einen Zeitraum von 34 Sekunden. Als terminalen Schritt nach Durchlaufen der 40-maligen Zykluswiederholung kommt es zu nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden zu einer letztmaligen Amplifikation bei 60°C über einen Zeitraum von einer Minute und wird abgeschlossen durch ein Erhitzen der Probe auf 95°C für 15 Sekunden, bevor die Probe rasch und dauerhaft auf 4°C gekühlt wird. Die beispielhaft angegebenen Temperaturen, Zykluszahlen und Zeiten können primerabhängig variieren und wurden in Vorversuchen für jedes zu amplifizierende Gen als Optimum ermittelt.



**Abbildung 12: Beispiel eines Zyklusprogramms einer Standard-Real-Time RT-PCR.**

Die Amplikons wurden jeweils mittels 2% TAE-Agarosegelen auf die richtige Größe kontrolliert

### Standard-Real-Time RT-PCR Reaktionsansatz:

~ 10 ng cDNA

12,5 µl 2x Taqman-Mastermix

0,25 µl 20 µM Forward-Primer

0,25 µl 20 µM Reverse-Primer

0,25 µl 20 µM Sonde

ddH<sub>2</sub>O *ad* 25 µl

Jede Probe wurde mindestens dreifach gemessen und dann auf die Expression eines stabil exprimierten Genes ('housekeeping gene'), in diesem Falle auf die ribosomale Untereinheit 18S, bezogen.

## 3.15. Auswertung der Real-Time RT-PCR – Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -

### Methode

Die geläufigsten Methoden zur Analyse von Real-time RT-PCR-Daten sind die absolute und die relative Quantifizierung. Eine absolute Quantifizierung bestimmt die eingesetzte Kopienzahl an Molekülen durch Vergleich des PCR-Signals mit einer Standardkurve. Bei der relativen Quantifizierung wird zum Beispiel das PCR-Signal des Zieltranskriptes einer Behandlungsgruppe mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ist ein effizienter Weg, um die relativen Veränderungen der Genexpression aus Real-time RT-PCR-Daten zu bestimmen.

Die folgende Gleichung beschreibt die exponentielle Amplifikation einer PCR mit:

$$X_n = X_0 \times (1 + E)^n,$$

$X_n$ : Anzahl der Zielmoleküle bei Zyklus n der Reaktion,

$X_0$ : Anzahl der Zielmoleküle zum Zeitpunkt Null.

$E_x$ : Effizienz der Zielgenamplifikation,

$n$ : Anzahl der Zyklen.

Der  $C_T$ -Wert beschreibt den Zyklus  $c_T$ , bei dem die hervorgerufene Fluoreszenz  $S$  und somit die Targetmenge  $X_T$ , einen festen Schwellenwert erreicht. Wie viele Amplifikationszyklen erforderlich sind, um die Menge  $X_T$  zu bilden, ist von der PCR-Effizienz  $E$  und der Ausgangsmenge an cDNA  $X_0$  abhängig. Es gilt:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

- $X_T$ : Threshold-Nummer der Zielmoleküle,  
 $C_{T,X}$ : Threshold-Nummer der Zielgenamplifikation,  
 $K_X$ : Konstante.

Für das endogene Referenzgen (internes Kontrollgen, *housekeeping gene*, hier 18S rRNA) gilt:

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R,$$

- $R_T$ : Threshold-Nummer der Referenzmoleküle,  
 $R_0$ : Anzahl der Referenzmoleküle zum Zeitpunkt Null,  
 $E_R$ : Effizienz der Referenzgenamplifikation,  
 $C_{T,R}$ : Threshold-Nummer der Referenzgenamplifikation,  
 $K_R$ : Konstante.

Wird  $X_T$  durch  $R_T$  dividiert, erhält man folgende Gleichung:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K.$$

Nimmt man an, dass die Effizienzen des Ziel- und Referenzgens gleich sind, erhält man:

$$E_X = E_R = E$$

$$\frac{X_0}{R_0} = (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K,$$

oder

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K,$$

- $X_N$ : entspricht dem normalisierten Betrag an Zielgen ( $X_0/R_0$ )  
 $\Delta C_T$ : entspricht der Differenz der Threshold-Zyklen  
 von Ziel- und Referenzgen ( $C_{T,X} - C_{T,R}$ )

Ein Umstellen dieser Formel ergibt:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta CT}.$$

Der letzte Schritt besteht darin,  $X_N$  für jede Probe  $q$  durch  $X_N$  für den Kalibrator (cb) zu dividieren:

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta CT,q}}{K \times (1 + E)^{-\Delta CT,cb}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta CT}.$$

Damit ist  $-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$ .

Für Amplifikate, die kleiner als 150 Basenpaare (bp) sind und deren Primer- und  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen optimiert wurden, ist die Effizienz nahezu eins, d.h. eine Verdopplung des PCR-Produktes hat mit jedem Zyklus stattgefunden. Deshalb ist der Betrag des Zielgens, normalisiert zu einer endogenen Referenz und relativ zu einem Kalibrator, gegeben durch:

$$\text{Betrag des Zielgens} = 2^{-\Delta \Delta CT}.$$

Die Ermittlung der  $C_T$ -Werte erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Aus den daraus berechneten  $2^{-\Delta \Delta CT}$ -Werten wurde anschließend das arithmetische Mittel bestimmt. Das Expressionsniveau wurde jeweils relativ zu einer Probe, die als Standard mit 100% gesetzt wurde, angegeben.

Die erhaltenen Werte wurden in Excel-Tabellen übernommen, die Graphiken mit Sigma-Plot erstellt.

### 3.16. Bestimmung der interstitiellen Fibrose

Zur Bestimmung der interstitiellen Fibrose (Grad der bindegewebigen Struktur eines Gewebes) wurden die ca. 3 mm starken Herzquerschnitte in mit 4% PBS-gepufferten Formalin eingelegt (siehe 3.10. Organentnahme). Spätestens 1 Woche nach der Fixierung wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden nach der Sirius-Rot Methode (selektive Anfärbung von Kollagenfasern) gefärbt und anschließend quantitativ ausgewertet.

### 3.16.1. Einbettung der Gewebeproben

Vor der Einbettung wurden die Herzquerschnitte nach folgendem Protokoll dehydriert:

Jeweils eine Stunde Lagerung der Herzscheiben in Ethanol 70%, Ethanol 80%, Ethanol 96%. Es folgte dreimalig eine Lagerung in Ethanol 100% für je eine Stunde, gefolgt von einem Bad in reinem Aceton für 20 min. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde in Paraffin Typ 6 verbracht. Daraufhin erfolgte eine Lagerung in Paraffin Typ 9 über mindestens 12 Stunden.

Anschließend wurden die paraffingetränkten Herzquerschnitte in histologische Ausgießschalen verbracht. Diese wurden unter Vermeidung von Lufteinschlüssen mit Paraffin Typ 9 gefüllt. Folgend wurde die mit der zugehörigen Nummer versehene Einbettungskassette in das Ausgußschälchen gelegt. Im anschließenden Abkühlungsprozeß erstarrt das Paraffin zu einem Block und ist somit zum Anfertigen von Schnitten geeignet.

### 3.16.2. Anfertigung histologischer Schnitte

Die bei Raumtemperatur gelagerten Paraffinblöcke wurden im Mikrotom eingespannt. Nachfolgend wurden Serienschnitte in 3 µm Dicke angefertigt und zur Glättung erst in ein Wasserbad mit Raumtemperatur, nachfolgend in ein auf 45°C temperiertes Wasserbad überführt. Hier wurden die Schnitte auf Superfrost-Objektträger aufgenommen und anschließend über Nacht im belüfteten Trockenofen bei 60°C hitzefixiert.

### 3.16.3. Färbung der Schnitte mit Sirius Rot

Sirius Rot ist ein Farbstoff der insbesondere Kollagenstrukturen sichtbar macht (intensive Rotfärbung). Andere Gewebestrukturen erscheinen nach dem Färbevorgang gelblich.

Die Färbung der Paraffinschnitte erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zweimaliges Bad für je 10 min in Xylol. Es folgte ein jeweils 2 minütiges Bad in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 %), anschließend wurde in *aqua bidest.* 2-5 min gespült. Nun wurde die Anfärbung der kollagenen Fasern in Sirius Rot 0,1 % ( in gesättigter Pikrinsäure) für eine Stunde durchgeführt, gefolgt von einem 1-2 minütigem Waschvorgang in 0,01 N HCl. Darauf schloß sich wieder eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %) für je 2 Minuten an. Vor dem Eindecken der Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> wurden alle Proben noch zweimalig für je 10 min in Xylol getaucht.

### 3.16.4. Quantitative Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Auswertung der interstitiellen Fibrose erfolgte an den mit Sirius-Rot gefärbten Herzquerschnitten mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungssystems bei einer Vergrößerung von 1:320 x. Alle Auswertungen wurden mit den gleichen Licht- und Blendeneinstellungen, Grünfilter und der optimalen ‚Threshold‘-Einstellung (Schwellenwert) durchgeführt.

Die Schnitte wurden in mäanderförmiger Vorgehensweise betrachtet. Kollagenanreicherungen in der Umgebung von Gefäßen etc. wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da diese den Prozentsatz der interstitiellen Fibrose verfälschen. Von jedem Präparat wurden mittels Digitalkamera 30 Aufnahmen angefertigt. Die weitere Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Makros, welches freundlicherweise vom Verfasser, Dr. Michael Godes (Arbeitsgruppe Hoher, Center for Cardiovascular Research, Charité) zur Verfügung gestellt wurde.

Um kamerabedingte Artefakte zu minimieren, wurde aus den 30 Einzelbildern der Kamera vom Programm Image J ein Durchschnittsbild errechnet, welches weiter bearbeitet wurde. Bindegewebe wurden im digitalen Photo als schwarze Fläche dargestellt, wobei Interstitium als weiße Fläche zu sehen war. Nach dem Zufallsprinzip wurde von dem Programm eine Auswahl von Schnitten getroffen (mindestens 15 % aller Schnitte). Um den Anteil an kollagenhaltiger Matrix zu bestimmen, wurde eine Schwarz/Weiß-Grenze (zwischen 0 und 255 Graustufen) festgelegt. Dann wurde manuell die optimale ‚Threshold‘-Einstellung (Graustufe) für jeden Schnitt bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert aller ‚Threshold‘-Werte gebildet. Dieser wurde in das Makro integriert und dann für alle Analysen verwendet.

Der Computer ermittelte sowohl die gesamte, als auch die Sirius Red positive Fläche in Bildpunkten (Pixel). Es wurde der prozentuale Anteil an Sirius Red positiver Fläche berechnet.

#### Beispiel-Rechnung:

Der gemessene Bildausschnitt hat eine Fläche von 800.000 Pixel,  
die gemessene Sirius Red positive Fläche beträgt 240.000 Pixel.

$$\text{Sirius Red positiver Flächenanteil} = \frac{240000}{800000} \times 100 = 30 (\%)$$

### 3.17. Mortalität

Zur Erfassung einer evtl. erhöhten oder erniedrigten Mortalität nach experimentellem Myokardinfarkt wurde die Anzahl verstorbenen Tiere, der Todeszeitpunkt (in Tagen) und – soweit ersichtlich – die Todesursache (z.B. Ruptur des Ventrikels) erfasst. Die Darstellung der Mortalitätsdaten erfolgte in Form einer Kaplan-Meier Kurve.

### 3.18. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede erfolgte mittels eines zweiseitigen Student t-Tests. Im Falle von mehr als zwei Gruppen wurde die ANOVA-Auswertungsmethode („analysis of variance“) nach dem LSD-Verfahren („least significant difference“) auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angewendet. Alle hierbei als signifikant bewerteten Unterschiede wurden zur Bestimmung des Signifikanzniveaus einem zweiseitigen Student t-Test im Sinne eines *post-hoc*-Tests unterzogen.

Für die hier verwendeten Tests wurde hinsichtlich der Signifikanz eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant, Werte von  $p < 0,01$  als hochsignifikant und Werte  $p < 0,001$  als sehr hochsignifikant gewertet.

Das minimal erreichte Signifikanzniveau wurde im Ergebnisteil in den Abbildungsbeschreibungen ausgewiesen.

In den entsprechenden Säulendiagrammen wurden für die unterschiedlichen p-Werte folgende Symbole verwendet:

Signifikanzbereich	Symbol
$p \geq 0,05$	n.s.
$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	#

Bei Abbildungen mit 4 Gruppen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit die Signifikanzsymbole und dazugehörigen Bezugslinien nicht in die Säulendiagramme übernommen. Die Mittelwerte  $\pm$  SD (Standardabweichung), die jeweilige Gruppengröße und die erreichten Signifikanzniveaus sind in diesen Fällen der Abbildungsbeschreibung in Tabellenform beigefügt.

## 4. Ergebnisse

Ziel dieser Studie war es, im Tiermodell zu klären, welche kardialen Auswirkungen die Deletion des Biglykan-Gens hat. Hierbei galt es als erstes festzustellen ob die Biglykan-*knockout* Mäuse (bgn-KO) einen kardialen Phänotyp, möglicherweise bedingt durch Veränderungen der extrazellulären kardialen Matrix (EZM), besitzen.

Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Daten von Körpergewicht, Herzgewicht erhoben und das Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis errechnet.

Mögliche Veränderungen der EZM wurden auf molekularbiologischer Ebene durch Analyse der mRNA-Expression einiger ihrer wichtigsten Komponenten und Modulatoren untersucht.

Weiterhin war von Interesse, ob sich auch Veränderungen in der Gewebemorphologie ergeben. Hierzu wurde der Grad der interstitiellen Fibrose im kardialen Gewebe histologisch untersucht und quantitativ analysiert.

Da die EZM eine wichtige Rolle im Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt spielt, sollte in einem zweiten Schritt dieser Studie geklärt werden, welche Konsequenzen sich nach einem experimentellen Myokardinfarkt aufgrund der Deletion des Biglykan-Gens ergeben.

Untersucht wurden hierbei Veränderungen der Hämodynamik und der mRNA-Expression der relevanten Gene, analog zu den basalen Untersuchungen zur Feststellung eines kardialen Phänotyps des Biglykan-*knockout* Modells. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Mortalität nach experimentellem Myokardinfarkt untersucht und Daten von Herzgewicht, Körpergewicht und des daraus resultierenden Verhältnisses erhoben, um eventuelle Anzeichen bzw. Unterschiede einer kardialen Hypertrophie zu dokumentieren.

## 4.1. Kardialer Phänotyp der Biglykan-*knockout* Mäuse

### 4.1.1. Untersuchungen zu Herzgewicht, Körpergewicht und HGW/ KGW-Verhältnis

#### 4.1.1.1. Herzgewicht (HGW), Körpergewicht (KGW) und HGW / KGW-Verhältnis im Alter von 6 Monaten.

Aus der Literatur (57) ist bekannt, dass sich Wildtyp- und Biglykan-*knockout* Mäuse (bgn-KO) hinsichtlich des Körpergewichts bis zu einem Alter von ca. 12 Wochen kaum unterscheiden. Dies konnte bei der routinemäßigen Erfassung o.g. Parameter während der Organentnahme für die spätere molekularbiologische Untersuchungen bestätigt werden. Die bgn-KO Mäuse und Wildtyp-Mäuse (bgn-WT) wogen im Alter von drei Monaten zwischen 26 und 32 Gramm. Insgesamt zeigt sich eine Tendenz der bgn-KO Mäuse zu einem etwas geringeren Körper- und Herzgewicht, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. In dem HGW / KGW-Verhältnis, als Indikator einer kardialen Hypertrophie, zeigten sich überhaupt keine Unterschiede.

In Abbildung 13 ist eine Gegenüberstellung des Herzgewichtes von Wildtyp- (WT) und Biglykan-*knockout* (KO) Mäusen im Alter von 6 Monaten zu sehen.

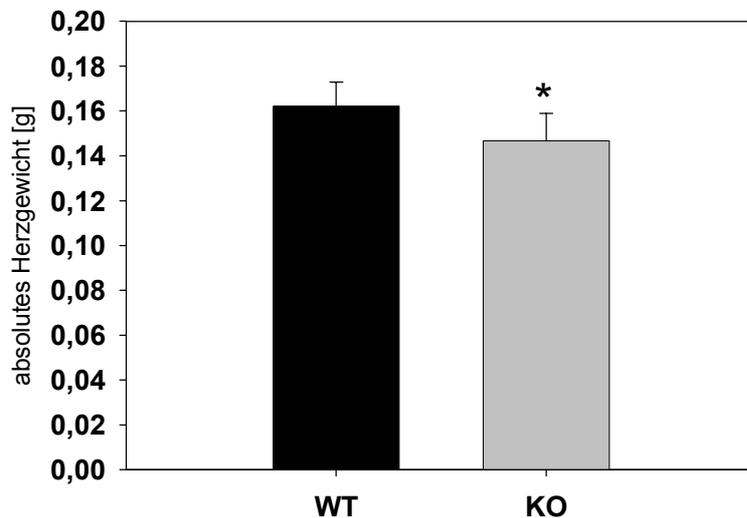
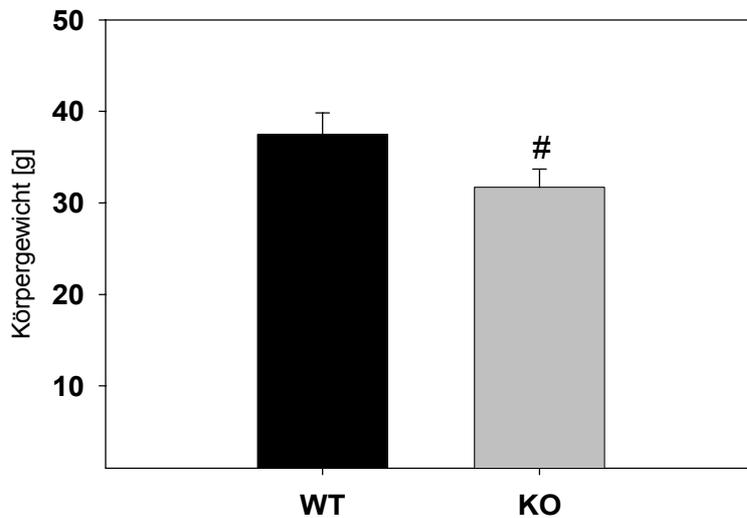


Abb. 13:

Herzgewicht von bgn-WT (0,162 ± 0,01 SD; n=7) und bgn-KO (0,146 ± 0,012 SD; n=8) im Alter von 6 Monaten; p < 0,05

Im Alter von 6 Monaten weisen die bgn-*knockout* Mäuse ein signifikant geringeres Herzgewicht als die Wildtyp-Geschwistertiere auf.

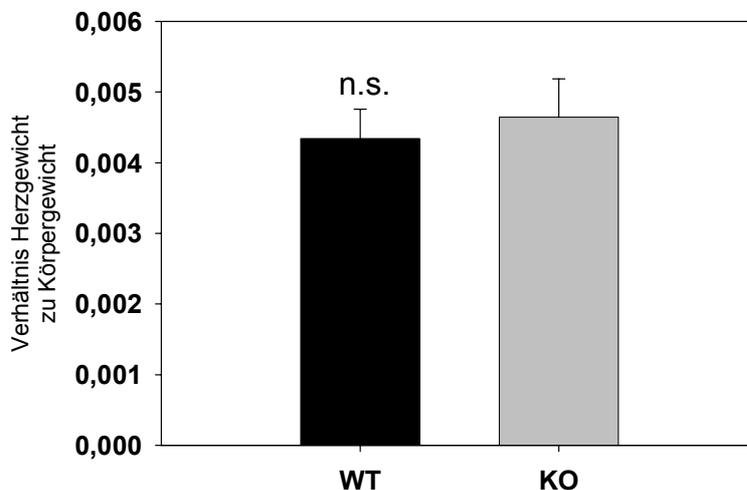
In Abbildung 14 sind die Körpergewichte der Wildtyp- und Biglykan-defizienten Mäuse im Alter von 6 Monaten dargestellt.



**Abb. 14 :**  
Körpergewicht von BGN-WT ( $37,5 \pm 2,35$  SD; n=7) und BGN-KO ( $31,7 \pm 1,98$  SD; n=8) im Alter von 6 Monaten;  $p < 0,001$

Das Körpergewicht der 6 Monate alten bgn-KO Mäuse ist im Vergleich zu den Kontrolltieren hochsignifikant geringer.

Der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht erlaubt eine Aussage über das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht des betreffenden Tieres. Relativ erhöhte Herzgewichte sind oft Anzeichen einer kardialen Hypertrophie. In Abbildung 15 sind die durchschnittlichen Herzgewicht / Körpergewicht-Quotienten von 6 Monate alten bgn-KO und bgn-WT Mäusen dargestellt.



**Abb. 15:**  
Verhältnis Herzgewicht / Körpergewicht von bgn-WT ( $0,0043 \pm 0,0004$  SD; n=7) und bgn-KO ( $0,0046 \pm 0,0005$  SD; n=8) im Alter von 6 Monaten;  $p > 0,05$

Im Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht, als Parameter einer eventuellen kardialen Hypertrophie, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Biglykan-*knockout* und Wildtyp feststellen.

#### 4.1.1.2. Herzgewicht, Körpergewicht und HGW / KGW-Verhältnis im Alter von 15 Monaten.

In Abbildung 16 ist das Herzgewicht der bgn-KO und bgn-WT Tiere im Alter von 15 Monaten dargestellt.

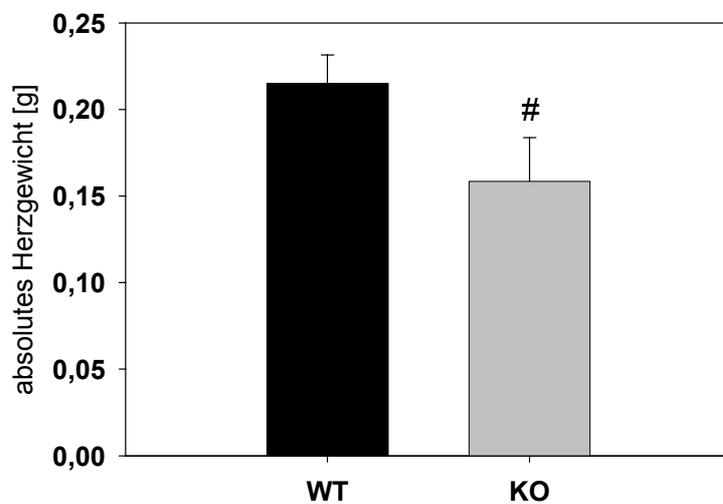


Abb. 16:

Herzgewicht von bgn-WT (0,214 ± 0,016 SD; n=10) und bgn-KO (0,158 ± 0,025 SD; n=8) im Alter von 15 Monaten;  $p < 0,001$

Im Alter von 15 Monaten ist das Herzgewicht der bgn-*knockout* Mäuse signifikant geringer als das der Wildtyp-Geschwistertiere. Der Unterschied fällt im Vergleich zu den 6 Monate alten Gruppen deutlicher aus.

In Abbildung 17 sind die unterschiedlichen Körpergewichte der bgn-WT und bgn-KO Mäuse im Alter von 15 Monaten dargestellt.

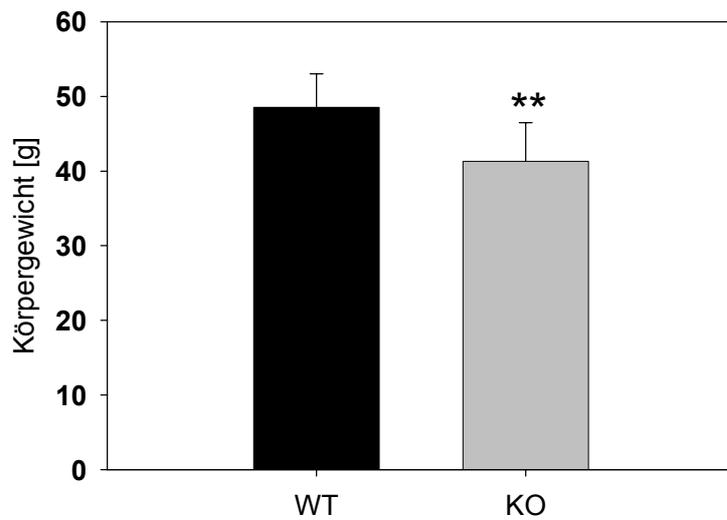


Abb. 17:

Körpergewicht von bgn-WT (48,52 ± 4,53 SD; n=10) und bgn-KO (41,33 ± 5,16 SD; n=8) im Alter von 15 Monaten;  $p < 0,01$

Das Körpergewicht der 15 Monate alten *Knockout*-Tiere ist signifikant geringer als das der gleichaltrigen Wildtyp-Kontrollgruppe, der Unterschied ist jedoch im Vergleich zu den 6 Monate alten Vergleichsgruppen ist nicht ganz so ausgeprägt.

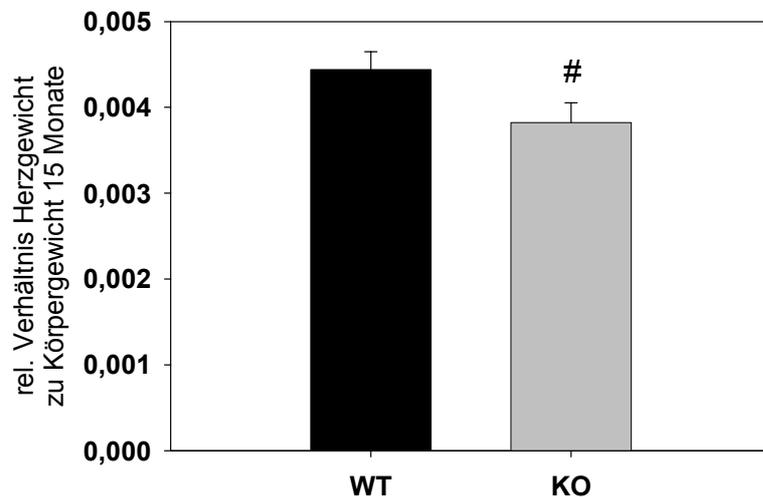


Abb. 18:

Verhältnis HGW / KGW bei bgn-WT (0,0044 ± 0,00021 SD; n=10) und bgn-KO (0,0038 ± 0,00023 SD; n=8) im Alter von 15 Monaten;  $p < 0,001$

Das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht stellt sich bei den 15 Monate alten Tieren in hochsignifikantem Maße unterschiedlich dar und ist bei den bgn-KO Mäusen kleiner als bei der Kontrollgruppe.

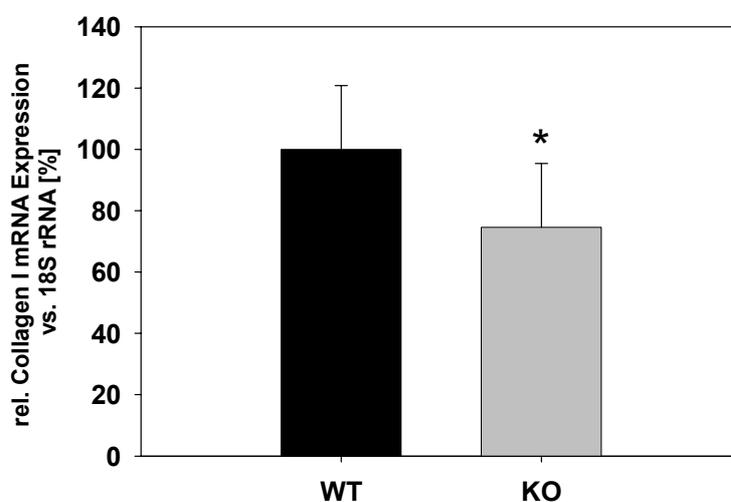
#### 4.1.2. Analyse der mRNA-Expression relevanter Gene im Vergleich bei 3 und 6 Monate alten Tieren

Zur Feststellung eines deletionsbedingten kardialen Phänotyps wurde auf molekularbiologischer Ebene die Genexpression von Kollagen I und Kollagen III als Hauptstrukturbildner der extrazellulären Matrix untersucht. Des Weiteren war die kardiale mRNA Expression von Decorin als fast strukturhomologes Proteoglykan mit seinen, im Verhältnis zu Biglykan, teils synergistischen, teils antagonistischen Effekten, sowie von Tgf-beta1, als Induktor der Biglykan-mRNA Expression (via AT-1a Rezeptor), Gegenstand der Untersuchungen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt für jede Altersgruppe (3 und 6 Monate) in separaten Säulendiagrammen, gekennzeichnet mit den entsprechenden Signifikanzsymbolen. Für den Vergleich der Expressionswerte der jeweiligen Altersgruppen untereinander sind im Anschluss an die Diagramme die Werte in Tabellenform (relativ, bezogen auf Biglykan-Wildtyp, 3 Monate) dargestellt. In den Tabellen sind die Signifikanzniveaus als p-Wert angegeben.

##### 4.1.2.1. Analyse der kardialen mRNA Expression von Kollagen I im Alter von 3 und 6 Monaten

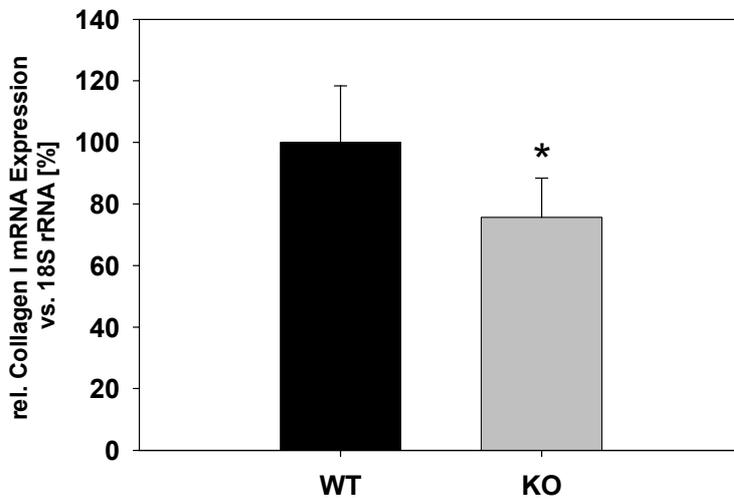
In Abbildung 19 und 20 ist jeweils die relative kardiale Kollagen I mRNA Expression bei bgn-Wildtyp Mäusen und bgn-*knockout* Mäusen dargestellt.



**Abb. 19:**  
relative kardiale  
Kollagen I mRNA  
Expression von bgn-WT  
(100 ±20,8 SD; n=8) und  
bgn-KO  
(74,5 ±20,78 SD; n=7)  
im Alter von 3 Monaten;  
p < 0,05

Die drei Monate alten Biglykan-*knockout* Mäuse weisen mengenmäßig in kardialem Gewebe signifikant weniger Kollagen I mRNA auf als ihre Wildtyp-Geschwistertiere.

Folgend ist die relative kardiale Kollagen I mRNA Expression bei den 6 Monate alten Tieren dargestellt:



**Abb. 20:**  
relative kardiale Kollagen I mRNA Expression von bgn-WT (100 ±18,40 SD; n=7) und bgn-KO (75,70 ±12,69 SD; n=8) im Alter von 6 Monaten; p < 0,05

Die Entwicklung der kardialen Kollagen I mRNA Expressionsrate mit zunehmendem Lebensalter ist in Tabelle 1 dargestellt. Auch im Alter von 6 Monaten ist bei den Biglykan-*knockout* Mäuse im Herzen eine signifikant geringere Kollagen I mRNA Expression als bei den gleichaltrigen Wildtypen zu beobachten.

**Tabelle 1:**

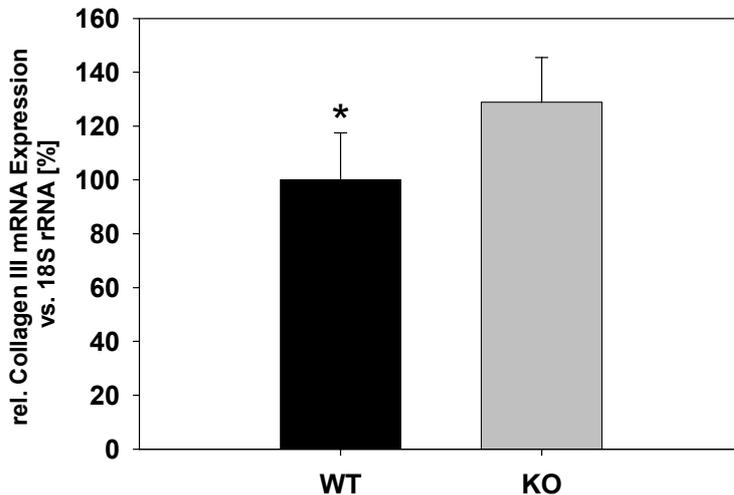
**Vergleichende relative kardiale Kollagen I mRNA Expression von bgn-WT und bgn-KO im Alter von 3 und 6 Monaten [%]**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
BGN-WT 3 Monate n = 8	BGN-KO 3 Monate n = 7	BGN-WT 6 Monate n = 7	BGN-KO 6 Monate n = 8	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-KO 3 Monate	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-WT 6 Monate	BGN-KO 3 Monate vs. BGN-KO 6 Monate	BGN-WT 6 Monate vs. BGN-KO 6 Monate
100 ± 20,8	74,51 ± 15,49	191,3 ± 35,41	146,08 ± 18,49	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

Mit steigendem Lebensalter erhöht sich auch die kardiale Kollagen I mRNA Expression in beiden Gruppen auf nahezu das Doppelte. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und *Knockout* fallen innerhalb der jeweiligen Altersgruppe signifikant; im Vergleich zwischen den Altersgruppen (Wildtyp 3 Monate vs. Wildtyp 6 Monate und bgn-*knockout* 3 Monate vs. *Knockout* 6 Monate) sogar hochsignifikant aus.

#### 4.1.2.2. Analyse der kardialen mRNA Expression von Kollagen III im Alter von 3 und 6 Monaten

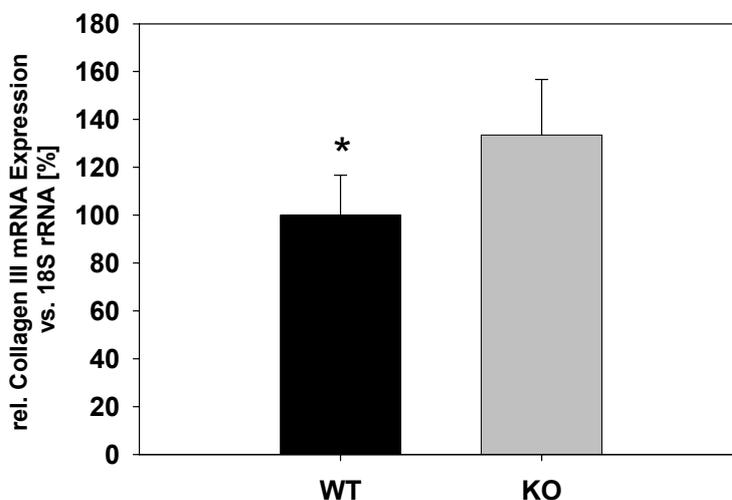
In den Abbildungen 21 und 22 sind die relativen kardialen Kollagen III mRNA Expressionen im Alter von 3 und 6 Monaten dargestellt:



**Abb. 21:**

relative kardiale Kollagen III mRNA Expression von bgn-WT ( $100 \pm 17,54$  SD;  $n=8$ ) und bgn-KO ( $128,86 \pm 16,64$  SD;  $n=7$ ) im Alter von 3 Monaten;  $p < 0,05$

Wie in Abbildung 21 ersichtlich bietet sich, im Vergleich zu Kollagen I, bei der kardialen Kollagen III mRNA Expression ein umgekehrtes Bild. Die drei Monate alten bgn-KO Tiere weisen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen im Herzen einen signifikant höheren Anteil an kardialer Kollagen III mRNA auf. In der folgenden Abbildung ist der kardiale Kollagen III mRNA Gehalt für die 6 Monate alten Tiere dargestellt:



**Abb. 22:**

relative kardiale Kollagen III mRNA Expression von bgn-WT ( $100 \pm 16,74$  SD;  $n=7$ ) und bgn-KO ( $133,41 \pm 23,26$  SD;  $n=8$ ) im Alter von 6 Monaten;  $p < 0,05$

Auch im Alter von sechs Monaten exprimieren die bgn-KO Mäuse im Herzgewebe signifikant mehr Kollagen III mRNA als die Wildtypmäuse.

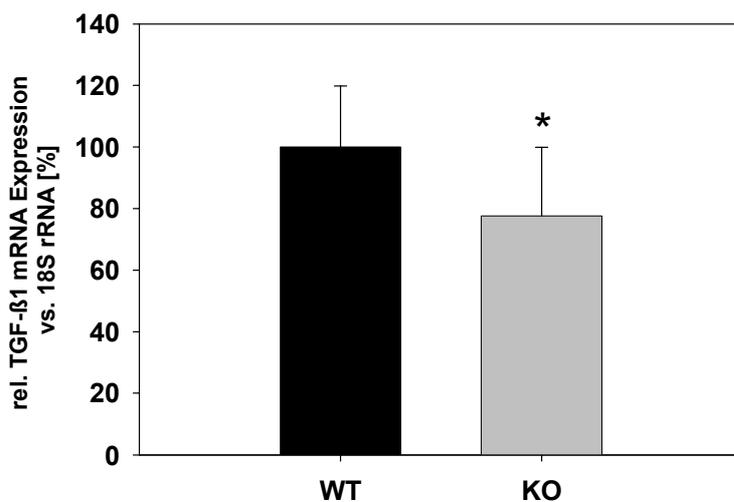
**Tabelle 2:**  
**vergleichende relative kardiale Kollagen III mRNA Expression von bgn-WT und bgn-KO im Alter von 3 und 6 Monaten [%]**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
BGN-WT 3 Monate  n = 8	BGN-KO 3 Monate  n = 7	BGN-WT 6 Monate  n = 7	BGN-KO 6 Monate  n = 8	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-KO 3 Monate	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-WT 6 Monate	BGN-KO 3 Monate vs. BGN-KO 6 Monate	BGN-WT 6 Monate vs. BGN-KO 6 Monate
<b>100</b> ± 17,54	<b>128,86</b> ± 16,64	<b>56,70</b> ± 9,49	<b>75,45</b> ± 17,58	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

Im Vergleich der beiden Alterstufen exprimieren sowohl Wildtypmäuse als auch die BGN-KO Tiere im Alter von sechs Monaten, hochsignifikant weniger kardiale Kollagen III mRNA als die drei Monate alten Tiere der jeweiligen Vergleichsgruppen. Das Verhältnis der Kollagen III mRNA Expression von BGN-WT und BGN-KO liegt bei der 3 Monate alten Gruppe bei 1:1,28 und in der 6 Monate alten Gruppe bei 1:1,33.

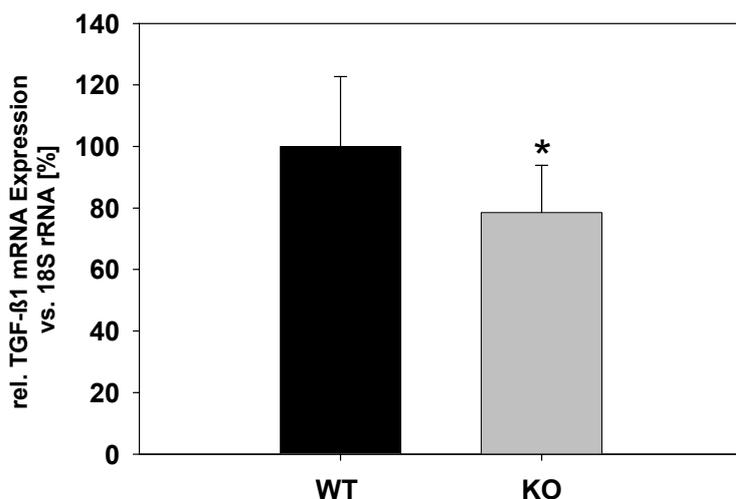
#### 4.1.2.3. Analyse der kardialen mRNA Expression von Tgf-beta1 im Alter von 3 und 6 Monaten

In den Abbildungen 23 und 24 sind die kardiale TGF-beta1 mRNA Expressionswerte der Wildtypmäuse und der Biglykan-defizienten Tiere in den jeweiligen Altersgruppen einander gegenübergestellt:



**Abb. 23:**  
**relative kardiale Tgf-beta1 mRNA Expression von bgn-WT (100 ±19,83 SD; n=8) und bgn-KO (77,64 ±19,32 SD; n=7) im Alter von drei Monaten; p < 0,05**

Die kardiale Tgf-beta1 mRNA-Expression liegt bei den 3 Monate alten Biglykan-knockout Mäusen signifikant unter der der Wildtypen. Auch im Alter von 6 Monaten exprimieren die bgn-KO Mäuse signifikant weniger kardiale Tgf-beta1 mRNA als die gleichaltrigen Wildtypmäuse, wie in Abbildung 24 ersichtlich ist:



**Abb. 24:**  
relative kardiale Tgf-  
beta1 mRNA Expression  
von bgn-WT  
(100 ±2,7 SD; n=7)  
und bgn-KO  
(78 ±15,42 SD; n=8) im  
Alter von 6 Monaten;  
p < 0,05

Zum Vergleich der beiden Altersgruppen sind in Tabelle 3 alle Messwerte, in Relation zum bgn-Wildtyp im Alter von 3 Monaten (100 %) aufgezeigt:

**Tabelle 3:**

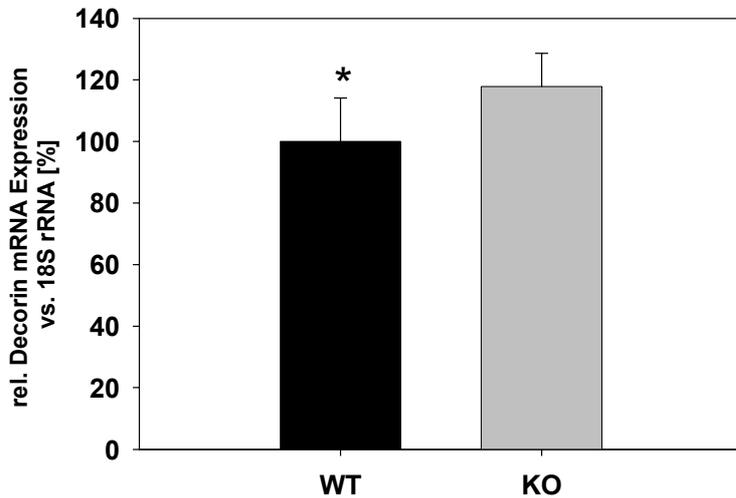
**Vergleichende relative kardiale Tgf-beta1 mRNA Expression von bgn-WT und bgn-KO im Alter von 3 und 6 Monaten [%]**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
BGN-WT 3 Monate  n = 8	BGN-KO 3 Monate  n = 7	BGN-WT 6 Monate  n = 7	BGN-KO 6 Monate  n = 8	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-KO 3 Monate	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-WT 6 Monate	BGN-KO 3 Monate vs. BGN-KO 6 Monate	BGN-WT 6 Monate vs. BGN-KO 6 Monate
<b>100</b> ± 19,83	<b>77,64</b> ± 19,32	<b>361,34</b> ± 81,84	<b>281,51</b> ± 43,59	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

Bei vergleichender Betrachtung der 3 und 6 Monate alten Gruppen fällt auf, dass die Gesamtmenge an kardialer Tgf-beta1 mRNA bei den Wildtypen vom dritten bis zum sechsten Lebensmonat signifikant auf das ca. 3,6fache ansteigt. Der Unterschied zwischen den drei Monate alten bgn-KO Tieren und der entsprechenden sechs Monate alten Vergleichsgruppe ist ebenfalls signifikant. An der Relation der kardialen Tgf-beta1 mRNA Expression (Wildtyp im Verhältnis zu bgn-knockout) ändert sich jedoch kaum etwas. Im Altersvergleich der jeweiligen Gruppen beträgt der Anteil auch im 6. Lebensmonat ca. 78% der Menge Tgf-beta1 mRNA der korrespondierenden Wildtyp-Geschwistertiere (3 Monate).

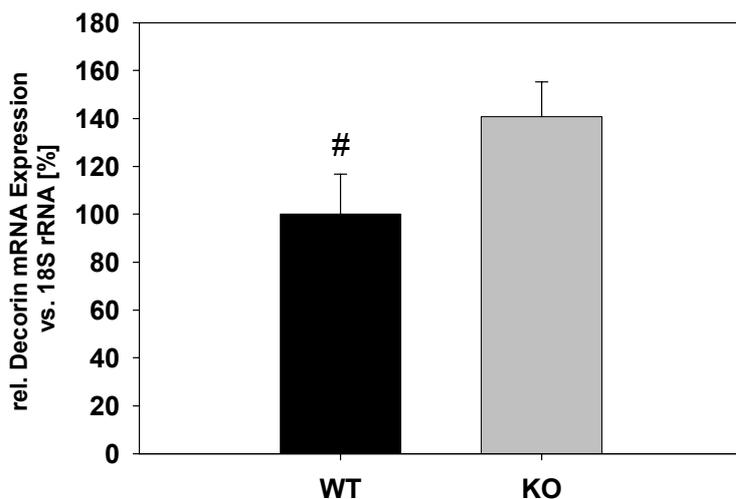
#### 4.1.2.4. Analyse der kardialen mRNA Expression von Decorin im Alter von 3 und 6 Monaten

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die kardiale Expression von Decorin mRNA bei Wildtyp-Mäusen und *bgn-knockout* Tieren im Alter von 3 oder 6 Monaten.



**Abb. 25:**  
relative kardiale Decorin mRNA Expression von *bgn*-WT (100 ±14,11 SD; n=8) und *bgn*-KO (117,833 ±10,84 SD; n=7) im Alter von 3 Monaten;  $p < 0,05$

Die Biglykan-*knockout* Mäuse weisen im Alter von 3 Monaten kardial signifikant mehr Decorin mRNA auf als ihre gleich alten Wildtyp-Geschwister.



**Abb. 26:**  
relative kardiale Decorin mRNA Expression von *bgn*-WT (100 ±6,65 SD; n=7) und *bgn*-KO (140,75 ±14,46 SD; n=8) im Alter von 6 Monaten;  $p < 0,001$

Im Alter von 6 Monaten hat sich der relative Unterschied der kardialen Decorin mRNA Expression weiter verstärkt und fällt nun hochsignifikant aus.

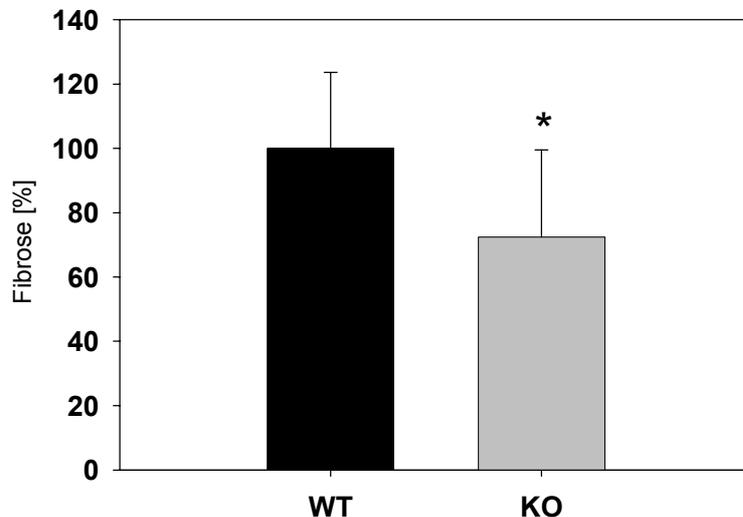
**Tabelle 4:**

**vergleichende relative kardiale Decorin mRNA Expression von bgn-WT und bgn-KO im Alter von 3 und 6 Monaten [%]**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
BGN-WT 3 Monate n = 8	BGN-KO 3 Monate n = 7	BGN-WT 6 Monate n = 7	BGN-KO 6 Monate n = 8	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-KO 3 Monate	BGN-WT 3 Monate vs. BGN-WT 6 Monate	BGN-KO 3 Monate vs. BGN-KO 6 Monate	BGN-WT 6 Monate vs. BGN-KO 6 Monate
<b>100</b> $\pm$ 14,11	<b>117,52</b> $\pm$ 10,84	<b>112,5</b> $\pm$ 19,55	<b>162,5</b> $\pm$ 23,90	p < 0,05	n.s.	p < 0,001	p < 0,001

Beim Vergleich der Altersgruppen fällt auf, dass sich der Anteil kardial exprimierter Decorin mRNA mit fortschreitendem Alter bei den Wildtypen nicht signifikant erhöht (+ ca. 12%), während er in der BGN-KO Gruppe hochsignifikant auf das 1,4 fache ansteigt

#### 4.1.3. Analyse der kardialen interstitiellen Fibrose



**Abb. 27:**

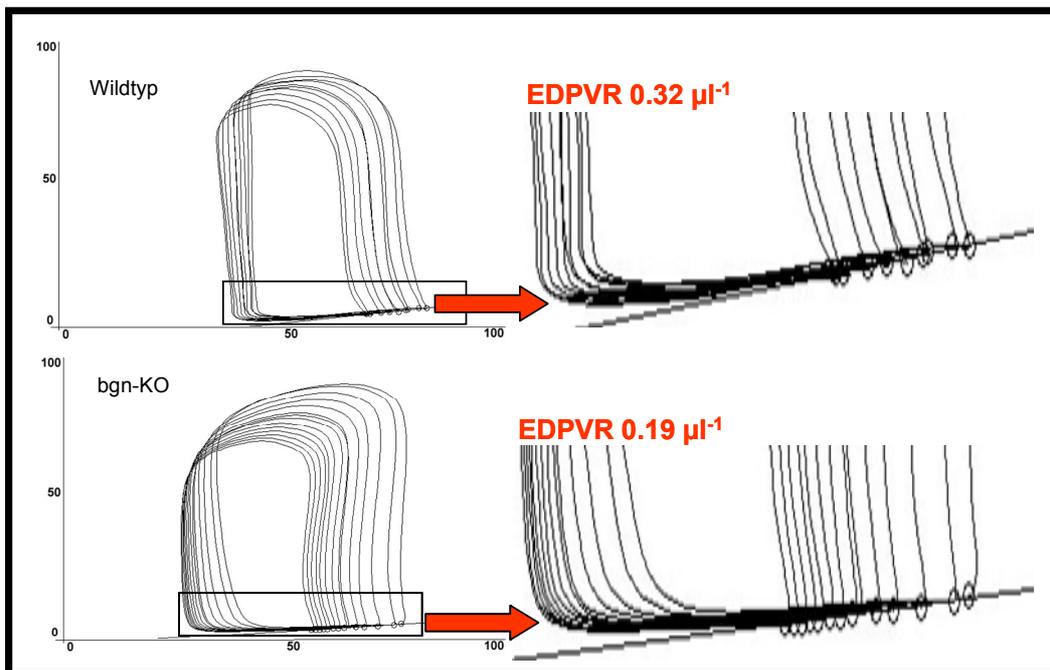
**relative kardiale interstitielle Fibrose von BGN-WT (100  $\pm$ 23,62 SD; n=10) und BGN-KO (72,36  $\pm$ 27,19 SD; n=10) im Alter von 6 Monaten; p < 0,05**

Der Grad der interstitiellen kardialen Fibrosierung liegt bei ausgewachsenen gesunden Biglykan-defizienten Mäusen signifikant unter dem der Wildtypmäuse. Trotz der relativ hohen Streuung innerhalb der Gruppen lässt sich bei einer Anzahl von n = 10, was bei 30 unterschiedlichen Fotos / Schnitt eine Gesamtzahl von 600 ausgewerteten Fotos ergibt, ein signifikantes Ergebnis ableiten. Anzumerken ist, dass bei der angewendeten Färbung der

Gesamtkollagengehalt dargestellt wird, ohne eine Unterscheidung der verschiedenen Kollagen-Typen zu treffen. Da Kollagen I mengenmäßig den größten Anteil in kardialem Gewebe ausmacht, korreliert das dargestellte Ergebnis mit den Ergebnissen der mRNA Expressionsanalysen, insbesondere zu Kollagen I und Kollagen III.

### 4.1.4. Basale Hämodynamikmessungen

Wie unter 3.9. beschrieben, wurden invasive Hämodynamikmessungen bei 3 und 6 Monate alten Wildtypmäusen und gleichaltrigen *bgn-knockout* Mäusen durchgeführt. Aufgrund der geringen Gruppengröße von  $n=6$  und relativ hohen Standardabweichungen innerhalb der Messgruppen wurde auf die komplette Übernahme der Daten in diese Studie verzichtet. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich hinsichtlich funktioneller kardialer Parameter die *bgn-knockout* Mäuse nicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren unterscheiden. Lediglich die enddiastolische Druck-Volumen-Verhältnis (EDPVR), ein Parameter der sog. intrinsischen Steifigkeit, weist signifikante Unterschiede auf, wie in Abbildung 28 dargestellt ist:



**Abb. 28:**

**Druck-Volumen Kurven mit Darstellung der EDPVR (endiastolic pressure-volume ratio) von *bgn*-WT und *bgn*-KO im Alter von 6 Monaten, während basaler Hämodynamikmessung.**

***bgn*-WT ( $0,32 \pm 0,11$  SD); *bgn*-KO ( $0,19 \pm 0,07$  SD);  $n=6$ ;  $p<0,05$**

Bei einer Vielzahl früherer Versuche der Arbeitsgruppe Tschöpe mit experimentellen MI bei Mäusen und nachfolgender hämodynamischer Charakterisierung konnte festgestellt werden, dass sich das Körpergewicht und die kardialen Parameter (Hämodynamik-Meßwerte,

Herzgewicht etc.) scheinoperierter Tiere nicht von denen gleichaltriger Tiere ohne entsprechenden Eingriff unterscheiden. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgend aufgeführten Experimenten, nicht zuletzt aus Tierschutz-Gründen, auf eine weitere invasiv-hämodynamische Auswertung von gesunden (nicht operierten) Tieren verzichtet. Die jeweils gemessenen Parameter der scheinoperierten Tiere des entsprechenden Genotyps wurden als Basalwert verwendet, da die Tiere bis auf die Ligatur der linken Koronararterie gleichen Bedingungen wie die infarzierten Tiere ausgesetzt waren.

## 4.2. Untersuchung kardialer Veränderungen nach experimentellem Myokardinfarkt (MI)

21 Tage nach dem experimentell erzeugtem Myokardinfarkt wurden bei den *bgn-knockout* Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistertieren invasive hämodynamische Messungen durchgeführt, Herzgewicht (HGW) und Körpergewicht (KGW) erfasst und vergleichbare Gewebeproben für die Genanalysen aus Septum und Infarktgebiet (im Falle der Sham-operierten Gruppen aus der linken Ventrikelwand an gleicher Lokalisation) entnommen und dem jeweiligen Verwendungszweck entsprechend aufbereitet.

Die Ergebniswerte der Experimente sind mit den entsprechenden Abweichungen (SD), Gruppengrößen (n) und jeweiligen Signifikanzniveaus (p) in Tabellenform aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind deshalb in den darauf folgenden grafischen Darstellungen der Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen keine Signifikanzniveaus mit den dazugehörenden Bezugslinien symbolisch dargestellt.

Scheinoperierte Tiere werden in den Tabellen und Abbildungen als WT-Sham (Wildtyp) oder KO-Sham (*bgn-knockout*) bezeichnet, infarzierte Tiere entsprechend als WT-MI oder KO-MI.

### 4.2.1. Herzgewicht, Körpergewicht und HGW / KGW Verhältnis 21 Tage nach experimentellem MI

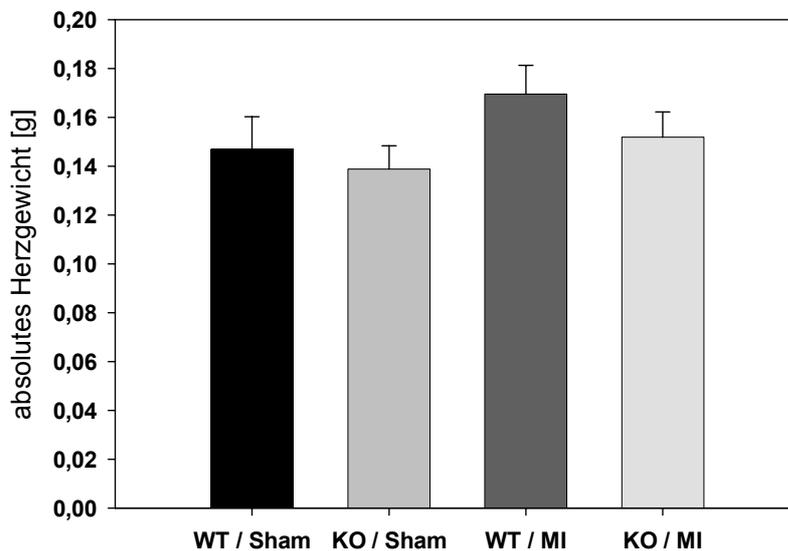
In Tabelle 5 sind die Mittelwerte der Herzgewichte, inklusive der Anzahl der jeweils verwendeten Tiere und der entsprechenden Signifikanz-Niveaus, der scheinoperierten Wildtyp- und *Biglykan-knockout* Mäusen den Werten von infarzierten Wildtyp-Mäusen und *Biglykan-knockout* Mäusen mit Infarkt gegenübergestellt.

**Tabelle 5:**

**Herzgewichte (in g) scheinoperierter Wildtyp- und bgn-*knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und bgn-*knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>0,147</b> ± 0,01	<b>0,139</b> ± 0,009	<b>0,169</b> ± 0,012	<b>0,152</b> ± 0,01	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

In Abbildung 29 sind die Ergebniswerte aus Tabelle 5 nochmals grafisch dargestellt:



**Abbildung 29:**

**Herzgewichte (in g) scheinoperierter Wildtyp- und bgn-*knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und bgn-*knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Die basalen Herzgewichte von bgn-WT und bgn-KO unterscheiden sich (Vergleich der sham-operierten Tiere) nicht signifikant. Dies bestätigt die Daten der basalen Versuche (Gruppen ohne Myokardinfarkt, siehe auch 4.1.1.). Nach experimentellem Myokardinfarkt kommt es makroskopisch zu einer kardialen Hypertrophie mit Dilatation des linken Ventrikels in beiden Infarktgruppen (bgn-WT und bgn-*knockout*). Hinsichtlich der Herzgröße konnten keine erheblichen Unterschiede festgestellt werden. So ist der linke Ventrikel war bei den infarzierten bgn-*knockout* Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen mit Infarkt makroskopisch nur geringradig vergrößert.

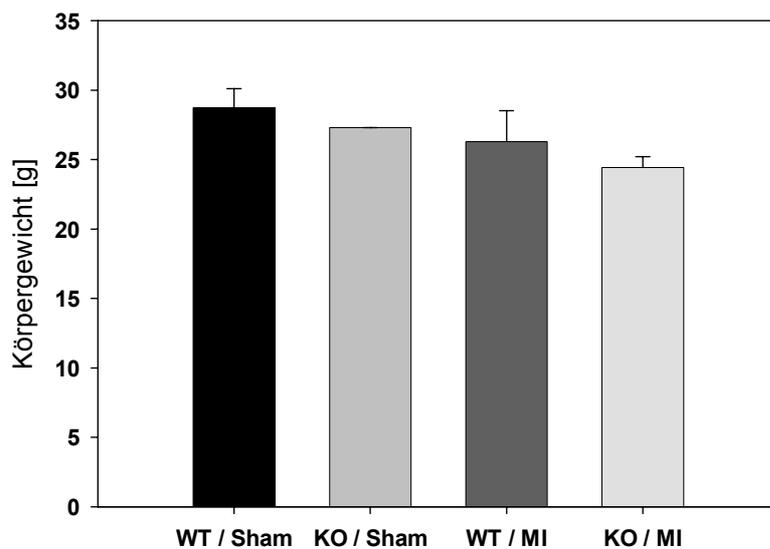
Die folgende Tabelle zeigt das Körpergewicht der verschiedenen scheinoperierten und infarzierten Gruppen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt.

**Tabelle 6:**

**Körpergewichte (in g) scheinoperierter Wildtyp- und *bgn-knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und *bgn-knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
28,71 $\pm$ 1,38	27,29 $\pm$ 0,01	26,29 $\pm$ 2,21	24,43 $\pm$ 0,79	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	n.s.

In Abbildung 30 sind die Ergebniswerte aus Tabelle 6 nochmals grafisch dargestellt:



**Abb. 30:**

**Körpergewichte (in g) scheinoperierter Wildtyp- und *bgn-knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und *bgn-knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Hinsichtlich des Körpergewichtes unterscheiden sich Wildtyp und *bgn-knockout* unter basalen Bedingungen nicht. Nach dem Myokardinfarkt verlieren die Tiere an Gewicht. Innerhalb der Infarktgruppe besteht jedoch 21 Tage nach MI kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Biglykan-defizienten Mäusen.

Die folgende Tabelle zeigt das Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis der verschiedenen scheinoperierten und infarzierten Gruppen 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt:

Tabelle 7: :

**Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis scheinoperierter Wildtyp- und bgn-*knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und bgn-*knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>0,0051</b> ± 0,00027	<b>0,0050</b> ± 0,00016	<b>0,0065</b> ± 0,00018	<b>0,0062</b> ± 0,00026	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

In Abbildung 31 sind die Ergebniswerte aus Tabelle 7 nochmals grafisch dargestellt:

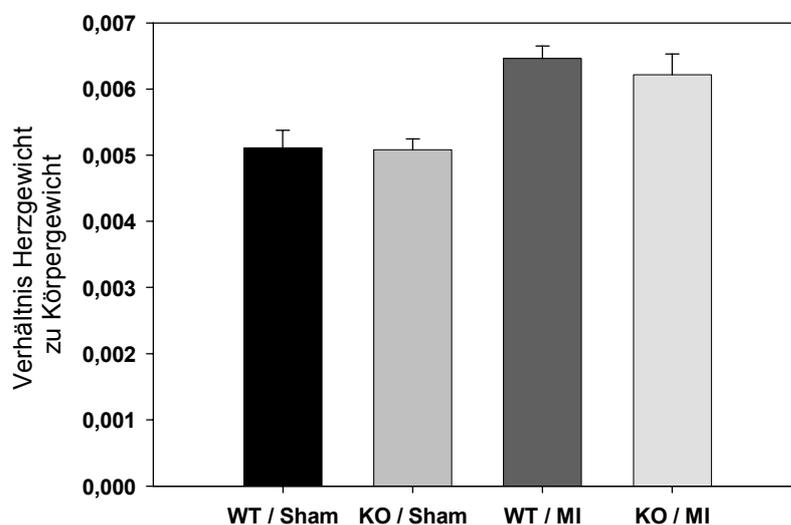


Abbildung 31:

**Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis scheinoperierter Wildtyp- und bgn-*knockout* Mäuse, sowie von Wildtyp-Mäusen und bgn-*knockout* Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt 21 Tage nach MI**

Auch im Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht ist kein basaler Unterschied zwischen bgn-WT und bgn-KO feststellbar. Bedingt durch die kardiale Hypertrophie nach einem Myokardinfarkt ändert sich das Verhältnis zwischen den jeweiligen Sham-Gruppen im Vergleich zu den korrespondierenden Infarktgruppen (WT-Sham vs. WT-MI und KO-Sham vs. KO-MI). Innerhalb der Infarktgruppe besteht ein signifikanter Unterschied, d.h., die Herzen der Wildtypmäuse erscheinen, in Relation zum Körpergewicht, im Vergleich zu den Herzen der bgn-*knockout* Mäuse etwas hypertropher,.

#### 4.2.2. Analyse der mRNA Expression relevanter Gene 21 Tage nach experimentellem MI

Wie bei den basalen Genexpressionsanalysen auch, wurden 21 Tage nach erzeugtem Myokardinfarkt die im Gewebe enthaltene Mengen mRNA für Kollagen I und III, Decorin und Tgf-beta1 gemessen. Um Veränderungen im ischämischen Bereich zu dokumentieren, wurden Gewebeproben aus der Mitte der stark ausgedünnten Infarkt Narbe entnommen (bei scheinoperierten Tieren an entsprechender Lokalisation der linken Ventrikelwand). Eine Vergleichsprobe stammte jeweils aus der Mitte des Septums.

Alle angegebenen Messwerte sind relativ auf den scheinoperierten Wildtyp (entspricht 100 %) bezogen. Auch hier sind die Daten zuerst tabellarisch angegeben und werden anschließend in einem Säulendiagramm dargestellt. Die Mittelwerte, samt Abweichungen (SD), Signifikanzniveaus (p) und Gruppengrößen (n) sind jeweils den Tabellen zu entnehmen

#### Analyse der kardialen Kollagen I mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem MI

In Tabelle 8 und Abbildung 32 sind die jeweiligen relativen kardialen Kollagen I mRNA Expressionsmengen (bezogen auf 18S rRNA) in der linken Ventrikelwand dargestellt:

**Tabelle 8:**  
**relative Kollagen I mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>100</b> ± 25,99	<b>68,63</b> ± 18,36	<b>8917,93</b> ± 1711,25	<b>27931,35</b> ± 4548,84	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

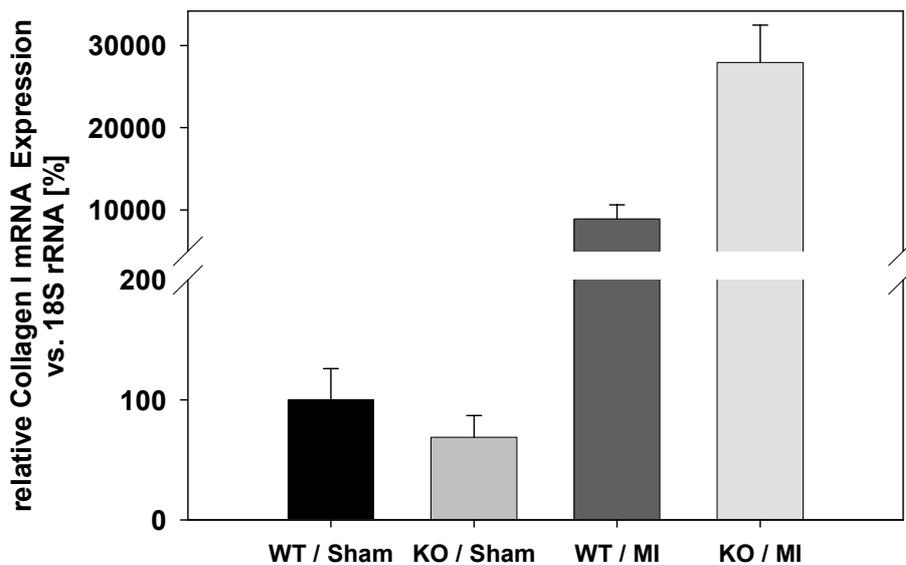


Abb. 32:

**relative Kollagen I mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Scheinoperierte Biglykan-*knockout* Mäuse weisen analog zu den basalen Genexpressionsanalysen im Vergleich zu den WT-Sham-Tieren einen geringeren Kollagen I mRNA Spiegel auf. Dieser steigt in der Infarkt Narbe hochsignifikant an. Der Anstieg im Vergleich Sham vs. Infarkt ist bei den Biglykan-*knockouts* Mäusen größer, als bei den Wildtypen. Während die Sham-KO Tiere (im Vergleich zu den Sham-WT's) nur etwa 2/3 der Menge an Kollagen I mRNA enthalten, kehrt sich das Verhältnis bei den Infarkt Tieren um: die infarzierten *bgn-knockouts* weisen in der Infarkt Narbe dreimal so viel Kollagen I mRNA auf als die Tiere der Wildtyp-Kontrollgruppe mit Infarkt.

### **Analyse der kardialen Kollagen I mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem MI**

Da sich die kardialen Umbauprozesse nach Myokardinfarkten in der Regel nicht auf die Infarkt Narbe allein beschränken, sondern vielmehr das gesamte kardiale Gewebe, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, betreffen, wurden auch im Septum die Expressionsraten der in dieser Arbeit relevanten Gene untersucht. Die Ergebnisse für Kollagen I mRNA sind in Tabelle 9 und Abbildung 33 dargestellt:

Tabelle 9:

relative Kollagen I mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
100 18,57	73,96 $\pm$ 12,06	515,79 $\pm$ 82,22	565,82 $\pm$ 57,53	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	n.s.

Die in Tabelle 9 aufgezeigten Daten sind zur besseren Übersicht folgend noch einmal grafisch dargestellt:

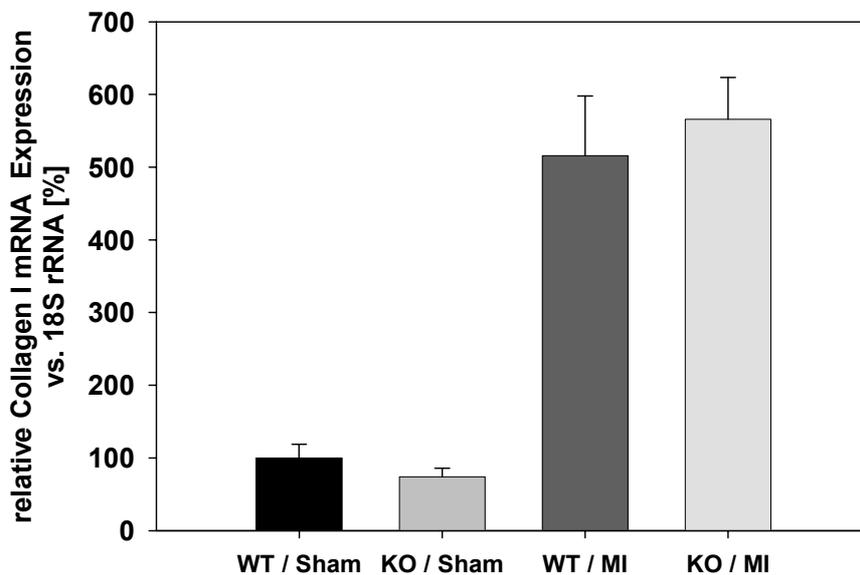


Abb. 33:

relative Kollagen I mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Im Septum weisen die BGN-*Knockouts* basal im Vergleich zum Wildtyp einen geringfügig höheren prozentualen Anteil an Kollagen I mRNA als im linken Ventrikel auf. Auch im nicht-infarzierten Bereich des Herzens kommt es zu einem Anstieg der Expression von mRNA der an den kardialen *Remodelling*-Prozessen beteiligten Gene, d.h. die Umbauprozesse sind nicht allein auf das Gebiet der Infarkt Narbe beschränkt. Da im Septum nicht soviel Gesamt-Kollagen wie in einer (Infarkt-)Narbe deponiert wird, steigt die Menge exprimierter Kollagen I mRNA entsprechend weniger als im Infarktgebiet an. Die relative Änderung ist bei den transgenen Mäusen (KO-Sham vs. KO-MI) deutlich größer als bei den Wildtypen (Faktor 5,16 bei den WT und Faktor 7,6 bei den *Knockouts*). Dabei sind die Unterschiede zwischen

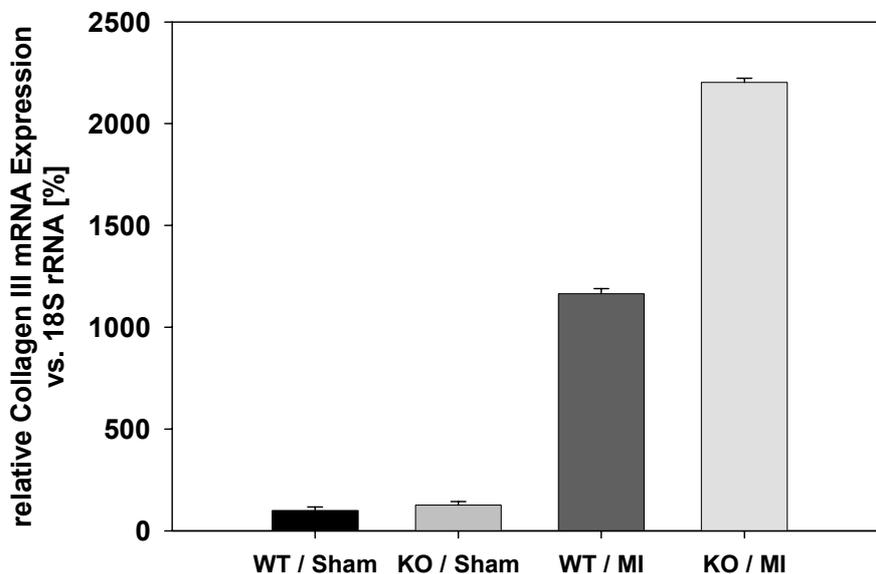
den Gruppen hochsignifikant. Der Kollagen I mRNA Spiegel von infarziertem Wildtyp und BGN-KO mit Infarkt unterscheidet sich jedoch nicht signifikant.

### Analyse der kardialen Kollagen III mRNA Expression in der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem MI

In Tabelle 10 und Abbildung 34 sind die jeweiligen relativen kardialen Kollagen III mRNA Expressionsmengen (bezogen auf 18S rRNA) in der linken Ventrikelwand dargestellt:

**Tabelle 10:**  
relative Kollagen III mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
100 ± 17,25	126,68 ± 20,34	1164,87 ± 289,77	2202,09 ± 461,97	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001



**Abb. 34:**  
relative Kollagen III mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Die scheinoperierten *bgn-knockout* Tiere exprimieren im linken Ventrikel mehr Kollagen III mRNA als die scheinoperierten Wildtypen, was die Ergebnisse der basalen Genanalyse widerspiegelt.

Dieser Anteil steigt nach experimentellem Myokardinfarkt bei den Wildtypen um das elffache und bei den Biglykan-*knockout* Mäusen um das siebzehnfache.

Die transgenen Mäuse exprimieren 21 Tage nach Myokardinfarkt in der Infarktnarbe ca. 1,7 mal mehr Kollagen III mRNA wie die Wildtypkontrollgruppe mit Infarkt, der Unterschied fällt ebenfalls hochsignifikant aus.

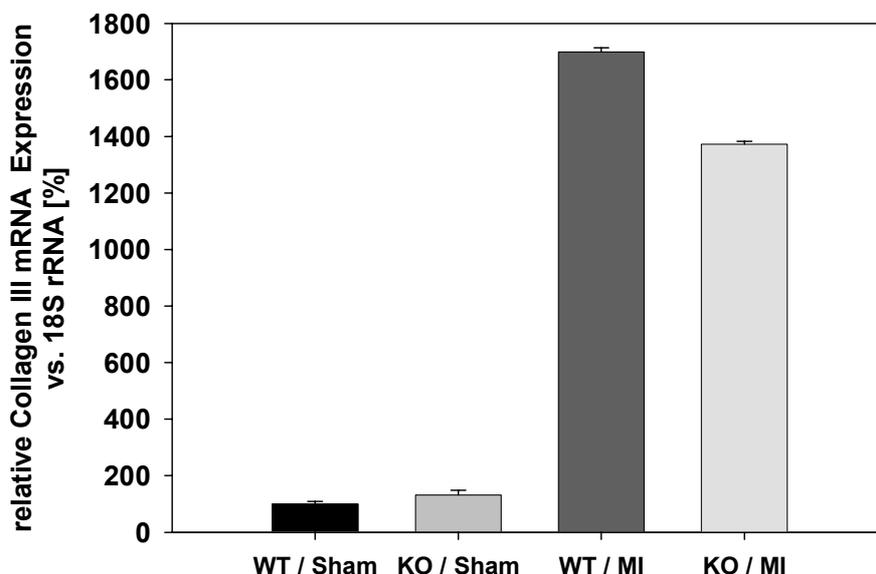
## Analyse der kardialen Kollagen III mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem MI

Auch für Kollagen III wurden die mRNA Daten, analog zu Kollagen I, im Septum erhoben. Diese sind in Tabelle 11 und Abbildung 35 dargestellt

**Tabelle 11:**

**relative Kollagen III mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
100 $\pm$ 9,05	131,50 $\pm$ 16,85	1699,3 $\pm$ 14,45	1371,92 $\pm$ 10,80	n.s.	P < 0,001	p < 0,001	p < 0,05



**Abb. 35:**  
relative Kollagen III  
mRNA Expression  
im Septum, 21  
Tage nach  
experimentellem  
Myokardinfarkt

Bei den scheinoperierten Tieren ähneln die Expressionsverhältnisse im Septum denen in der linken Ventrikelwand. Dies ändert sich nach erfolgtem Myokardinfarkt. Bei Wildtyp- und bgn-*knockout*-Maus steigen die Kollagen III mRNA-Spiegel infarktbedingt stark an; bei den Wildtypen um ca. das siebzehnfache, bei den bgn-*knockout* Mäusen um das ca. zehnfache.

Der Unterschied zwischen infarziertem Wildtyp und *bgn-knockout*-Maus mit Infarkt fällt signifikant aus.

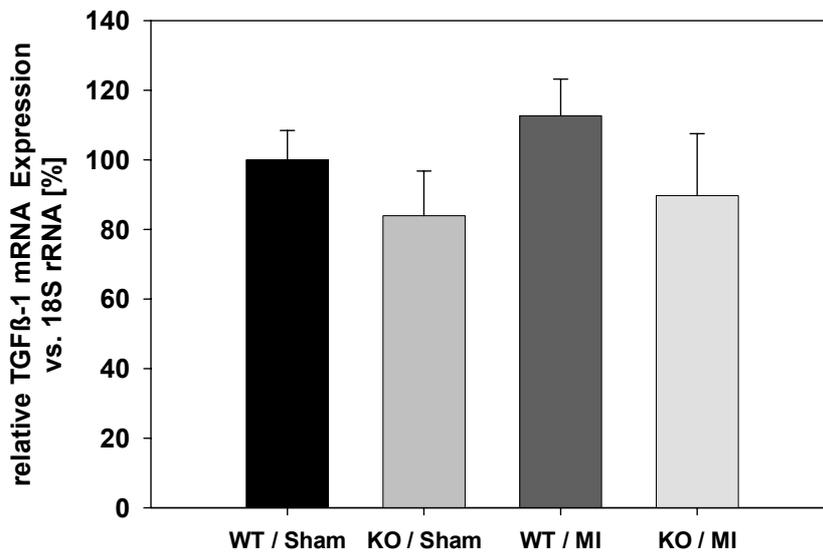
### Analyse der kardialen Tgf-beta1 mRNA Expression der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem MI

Folgend sind die relativen kardialen TGF-beta1 mRNA Expressionsdaten aus Proben der linken Ventrikelwand von scheinoperierten Wildtypen und *bgn-knockout* Mäusen denen von infarzierten Wildtyp- und *bgn-knockout* Mäusen gegenübergestellt:

**Tabelle 12: relative Tgf-beta1 mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
<b>100</b> ± 8,46	<b>83,93</b> ± 12,87	<b>112,63</b> ± 10,54	<b>89,73</b> ± 17,78	p < 0,05	p < 0,05	n.s.	p < 0,05

Die Messwerte aus Tabelle 12 sind zur besseren Übersicht nochmals in Abbildung 36 grafisch dargestellt:



**Abb. 36:**  
relative Tgf-beta1 mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

In der linken Ventrikelwand exprimieren die scheinoperierten *Biglykan-knockout* Mäuse, analog zu den gesamt-kardialen basalen Genexpressionsanalysen (siehe 4.1.1.2.) signifikant weniger Tgf-beta1 mRNA als die scheinoperierten Wildtypen. 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt ist das Tgf-beta1 mRNA Level in beiden Gruppen (WT-MI, KO-MI) erhöht, bei den *bgn-knockouts* fällt der Anstieg im Vergleich zu den Wildtypen allerdings weniger stark

aus. Dabei ist der Unterschied zur jeweiligen Sham-Gruppe bei den Wildtypen signifikant, bei den Biglykan-*knockout* Mäusen nicht. An der Relation im Gehalt von Tgf-beta1 mRNA ändert sich auch nach Infarkt im linken Ventrikel nichts, die infarzierten Wildtypen exprimieren signifikant mehr Tgf-beta1 mRNA als die bgn-KO Mäuse.

Auch für TGF-beta1 stellte sich die Frage, ob es nach einem Myokardinfarkt im Septum zu Veränderungen der mRNA Expression kommt. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden nachfolgend in Tabelle 13 und Abbildung 37 gezeigt:

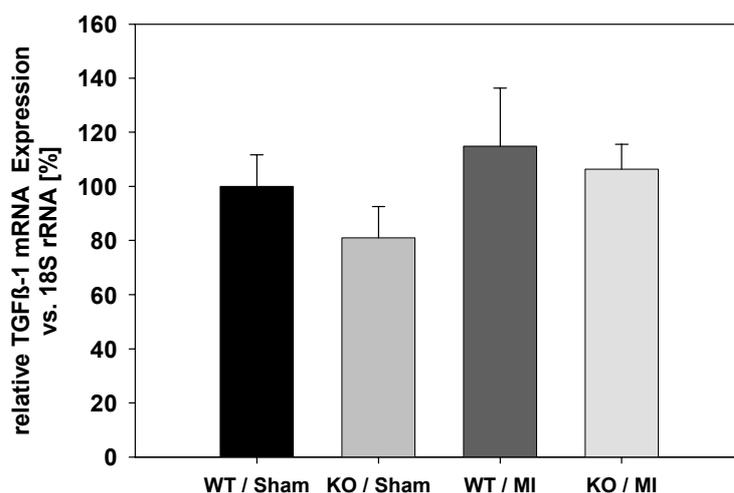
### Analyse der kardialen Tgf-beta1 mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem MI

**Tabelle 13:**

**relative Tgf-beta1 mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
100 $\pm$ 11,71	81,01 $\pm$ 11,52	114,80 $\pm$ 21,56	106,43 $\pm$ 9,14	p < 0,05	n.s.	p < 0,01	n.s.

Die Daten aus Tabelle 13 sind in Abbildung 37 grafisch dargestellt:



**Abbildung 37:**  
**relative Tgf-beta1**  
**mRNA Expression im**  
**Septum, 21 Tage nach**  
**experimentellem**  
**Myokardinfarkt**

Auch im Septum stellen sich die Verhältnisse bei den Sham-Gruppen ähnlich wie im linken Ventrikel dar. In beiden Infarktgruppen (Wildtyp und bgn-*knockout*) ist die Tgf-beta1 mRNA Expression erhöht.

Der Unterschied fällt bei den Wildtypen (WT-Sham vs. WT-MI) allerdings nicht signifikant aus, wogegen er bei den bgn-KO Tieren (KO-Sham vs. KO-MI) hochsignifikant ist.

Bedingt durch die vermehrte relative Zunahme der Tgf-beta1 mRNA Expression bei den Biglykan-*knockout* Mäusen besteht im septalen Gewebe 21 Tage nach Infarkt kein signifikanter Unterschied in der Tgf-beta1 mRNA Menge zwischen Wildtyp und *Knockout* mehr.

### Analyse der kardialen Decorin mRNA Expression der linken Ventrikelwand 21 Tage nach experimentellem MI

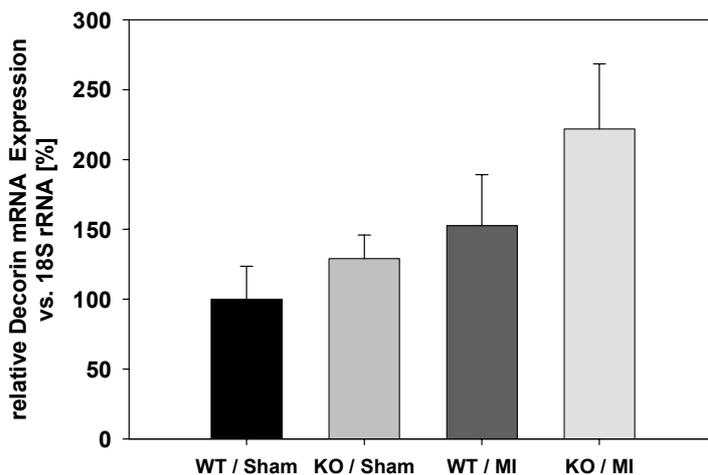
In Tabelle 14 und Abbildung 38 werden die Ergebnisse der Messungen der relativen kardialen Decorin mRNA Expression 21 Tage nach experimentell erzeugtem Myokardinfarkt gezeigt:

**Tabelle 14:**

**relative Decorin mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
<b>100</b> ± 23,56	<b>129</b> ± 16,87	<b>152,53</b> ± 36,65	<b>221,88</b> ± 46,56	n.s.	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05

Die Messwerte werden in Abbildung 38 nochmals in Diagrammform dargestellt:



**Abb. 38:**  
**relative Decorin mRNA Expression in der linken Ventrikelwand, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Der Vergleich der Decorin mRNA-Expression von Scheinoperierten zu infarzierten Wildtyp-Mäusen zeigt eine infarktbedingte Induktion der Decorin mRNA Expression. Diese ist bei den Biglykan-defizienten Tieren signifikant höher als bei den infarzierten Wildtyp-Tieren. Dieser Unterschied ist durch den Infarkt bedingt, wie der Vergleich der Werte scheineroperierter Biglykan-defizienter Mäuse mit den Werten scheineroperierter Wildtyp-Mäuse zeigt.

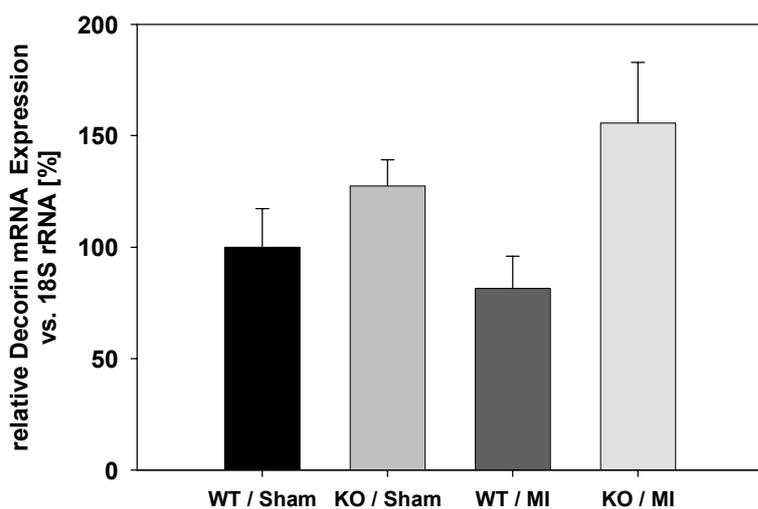
## Analyse der kardialen Decorin mRNA Expression im Septum 21 Tage nach experimentellem MI

Auch für Decorin wurden Daten der mRNA Expressionsniveaus im Septum, nach Myokardinfarkt, erhoben:

**Tabelle 15:**

**relative Decorin mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>100</b> $\pm$ 17,33	<b>127,38</b> $\pm$ 11,76	<b>81,46</b> $\pm$ 14,54	<b>155,66</b> $\pm$ 27,26	n.s.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,001



**Abb. 39:**

**relative Decorin mRNA Expression im Septum, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Im Septum zeigen sich 21 Tage nach Infarkt bei den Wildtypmäusen eine signifikant geringere Decorin mRNA-Expression in Relation zur scheinoperierten Wildtyp-Gruppe. Bei den infarzierten Biglykan-*knockout*-Mäusen steigt das mRNA-Expressionsniveau des Decorins signifikant im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe an.

### 4.2.3. Hämodynamische Untersuchungen 21 Tage nach experimentellem MI

Bei den Tieren wurden 21 Tage nach dem experimentellen Myokardinfarkt, wie im Methodenteil beschrieben, die invasiven Hämodynamikmessungen durchgeführt.

Da die bereits vorher an 6 Monate alten Tieren erfolgten basalen Messungen bestimmte Tendenzen erkennen ließen, wurden bei den sham-operierten Tieren sowohl basale Hämodynamikmessungen als auch Messungen mittels Okklusion der *Vena-cava* durchgeführt. Hintergrund waren, wie bereits erwähnt, Daten aus ersten Messungen, die Hinweise auf eine veränderte intrinsische Steifigkeit (siehe 4.1.4.) ergaben. Mit diesem Experiment sollte ein bestehender kardialer Phänotyp nachgewiesen werden. Ausgangspunkt waren Erfahrungswerte aus vorangegangenen Experimenten, welche bestätigten, dass sich basal gemessene Werte von den Hämodynamikwerten sham-operierter Tiere nicht unterscheiden, zumal die Messbedingungen auf allen Ebenen als gleich einzustufen sind. In den Abbildungs- und Tabellenbeschreibungen werden daher die Begriffe ‚basal‘ und ‚scheinoperiert‘ synonym benutzt.

Wie schon bei den vorigen Ergebnissen sind auch hier die Messdaten in tabellarischer Form dargestellt. Alle weiteren Angaben wie Gruppengröße (n), Signifikanzniveaus (p) und Abweichungen (SD) sind ebenfalls den Tabellen zu entnehmen. Im Anschluß an die tabellarische Darstellung sind zur besseren Visualisierung die Messwerte der Gruppen in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Auch hier wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit bewusst auf die Darstellung von Signifikanzsymbolen und deren Bezugslinien verzichtet.

#### **Systolische Herzfunktion**

Ein wichtiger Parameter für eine Herzmehrarbeit ist die Herzfrequenz. Nachfolgend werden die Ergebnisse für scheinoperierte Wildtyp- und *bgn-knockout* Mäuse, sowie für die infarzierten Gruppen gezeigt:

Tabelle 16:

## Herzfrequenz in b/min, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>442</b> $\pm$ 32,9	<b>436</b> $\pm$ 23,1	<b>433</b> $\pm$ 34,2	<b>484</b> $\pm$ 56	n.s.	n.s.	p < 0,05	p < 0,05

Abbildung 40 zeigt die Messwerte nochmals in grafischer Form:

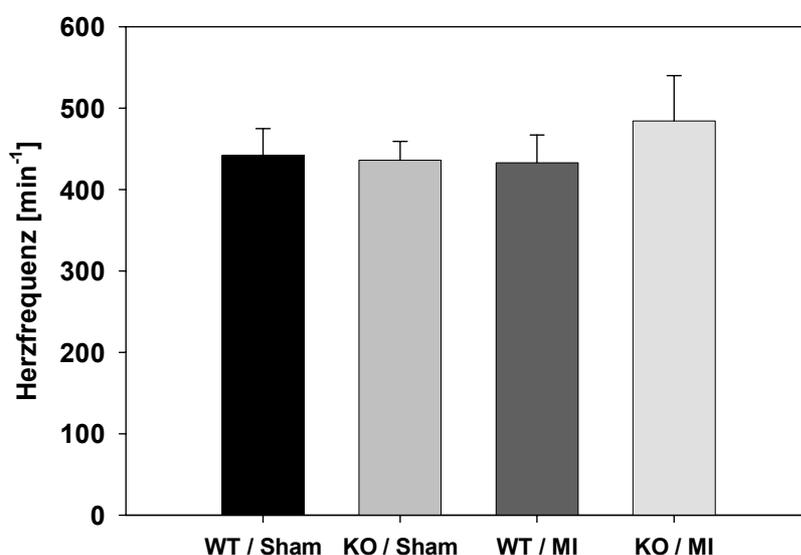


Abb. 40:

## Herzfrequenz in b/min, 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Beim Vergleich der basalen Werte (Sham) ist zwischen den *bgn-knockout* Tieren und den Wildtypmäusen kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Auch nach dem Myokardinfarkt ist bei den Wildtypen keine wesentliche Änderung der Herzfrequenz feststellbar. Ganz anders sieht es bei den *bgn-KO* Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten *Knockout* Mäusen aus. Hier kommt es 21 Tage nach experimentell erzeugtem Myokardinfarkt zu einem Anstieg der Herzfrequenz. Im Vergleich zwischen infarziertem Wildtyp und *bgn-KO* mit Infarkt besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied.

Ein weiterer wichtiger Parameter der systolischen Herzfunktion ist der maximale linksventrikuläre Druck. Die Messdaten 21 Tage nach erfolgtem Myokardinfarkt sind im Folgenden dargestellt:

Tabelle 17:

**maximaler linksventrikulärer Druck (LVP max. in mmHg), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
<b>104,5</b> $\pm$ 6,4	<b>104,9</b> $\pm$ 14,6	<b>73,4</b> $\pm$ 11,8	<b>63,9</b> $\pm$ 3,9	n.s.	p < 0,01	p < 0,01	n.s.

Grafische Darstellung der Meßwerte für LVP max 21 Tage nach MI:

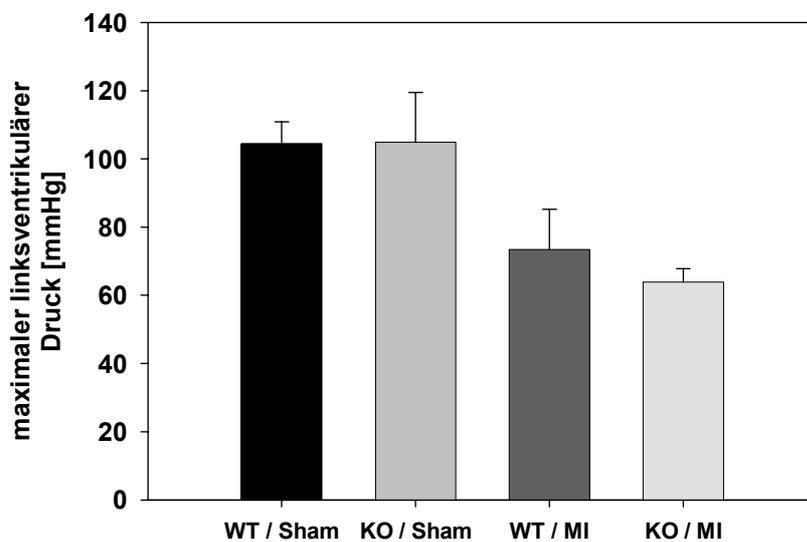


Abb. 41:

**maximaler linksventrikulärer Druck (LVP max. in mmHg), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel, wobei sich Wildtyp und *bgn-knockout*-Modell basal (Sham) in diesem Parameter nicht unterscheiden. Auf Grund der Dilatation des linken Ventrikels nach einem transmuralen Myokardinfarkt kommt es bei den infarzierten Tieren zu einem Druckabfall. Die Unterschiede zwischen Sham-operierten Gruppen und den MI-Gruppen fallen signifikant aus. Die infarzierten Biglykan-*knockout* Mäuse weisen eine Tendenz zu einem geringeren linksventrikulären maximalen Druck auf als die Wildtypmäuse mit Myokardinfarkt. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,07 jedoch nicht signifikant.

Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist ein Parameter der systolischen Herzfunktion und dient insbesondere der Bewertung der Kontraktilität des linken Ventrikels. In Tabelle 18 und der dazugehörigen Abbildung 42 sind die erhaltenen Daten aufgezeigt:

Tabelle 18:

linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max in mmHg/s), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
7554 ± 2163	6890 ± 976	4045 ± 1310	3240 ± 994	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	n.s.

Abbildung 42 stellt die Daten in Form von Säulendiagrammen dar:

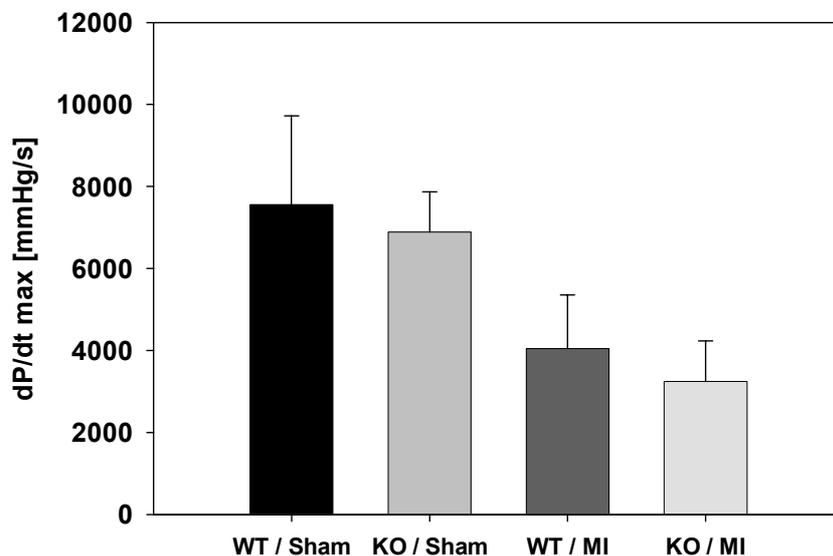


Abbildung 42:

linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt max in mmHg/s), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Die Kontraktilität der scheinoperierten Wildtyp-Mäuse und die der Biglykan-defizienten Tiere unterscheidet sich kaum voneinander. 21 Tage nach erfolgtem Myokardinfarkt sinkt die linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit bei Wildtyp-Mäusen und Biglykan-defizienten Tieren ab, d.h. die Kontraktilität hat hier deutlich abgenommen. Es bestehen hochsignifikante Unterschiede zwischen Sham-Gruppen und infarzierten Tieren, und ersichtliche, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen *bgn-knockout* und Wildtyp.

Das Schlagvolumen ist das Volumen, das während der Ejektion aus dem Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird und besitzt als hämodynamischer Messparameter eine wichtige Aussagekraft über die Effektivität der Pumpleistung des Ventrikels.

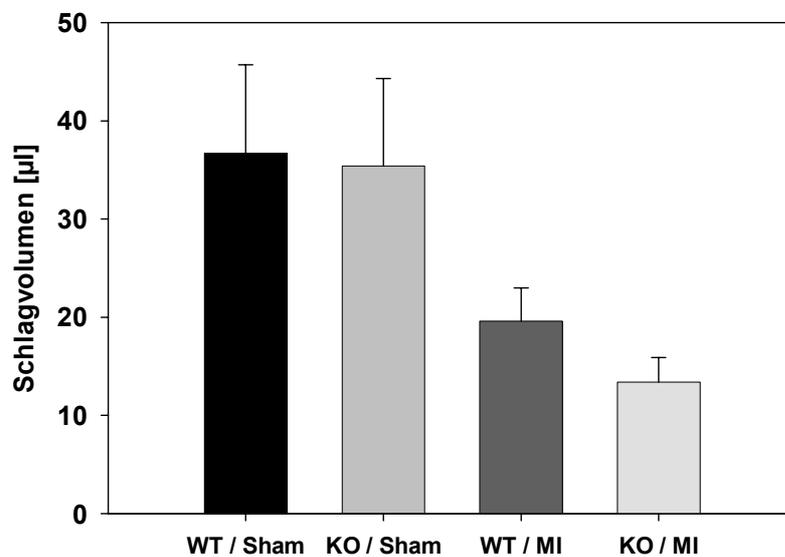
Tabelle 19 und Abbildung 43 zeigen die gewonnenen Meßwerte 21 Tage nach MI:

**Tabelle 19:**

**Schlagvolumen (SV in  $\mu\text{l}$ ) , 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
36,7 $\pm$ 9,0	35,4 $\pm$ 8,9	19,6 $\pm$ 3,4	13,4 $\pm$ 2,5	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

Grafische Darstellung der Werte aus Tabelle 19:



**Abbildung 43:**

**Schlagvolumen (SV in  $\mu\text{l}$ ) , 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

21 Tage nach dem experimentell erzeugten Myokardinfarkt fällt das Schlagvolumen in beiden Infarktgruppen, verglichen mit den scheinoperierten Mäusen, deutlich geringer aus. Während beim Vergleich der scheinoperierten Gruppen untereinander kein Unterschied zwischen Wildtypmaus und Biglykan-*knockout* Modell festzustellen ist, zeigt sich nach Infarkt eine ausgeprägte Differenz beim Vergleich der Schlagvolumina von Wildtyp und *bgn-knockout* Maus.

Das Herzminutenvolumen, in der Literatur auch oft als ‚Cardiac Output‘ bezeichnet, ist ein Effektivitätsparameter, der beschreibt wieviel  $\mu\text{l}$  in einer Zeiteinheit (min) aus dem linken Ventrikel befördert werden können.

Tabelle 20 und Abbildung 44 zeigen die gewonnenen Daten 21 Tage *post infarctionem*:

Tabelle 20:

Herzminutenvolumen (HMV in  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
13162 $\pm$ 4126	13645 $\pm$ 4887	8450 $\pm$ 1394	6281 $\pm$ 1071	n.s.	$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.

Folgend die Darstellung der Meßwerte als Säulendiagramm:

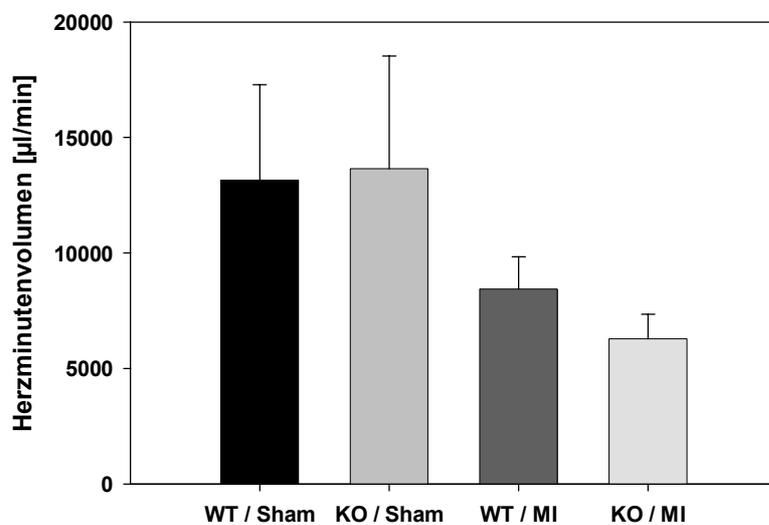


Abbildung 44:

Herzminutenvolumen (HMV in  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

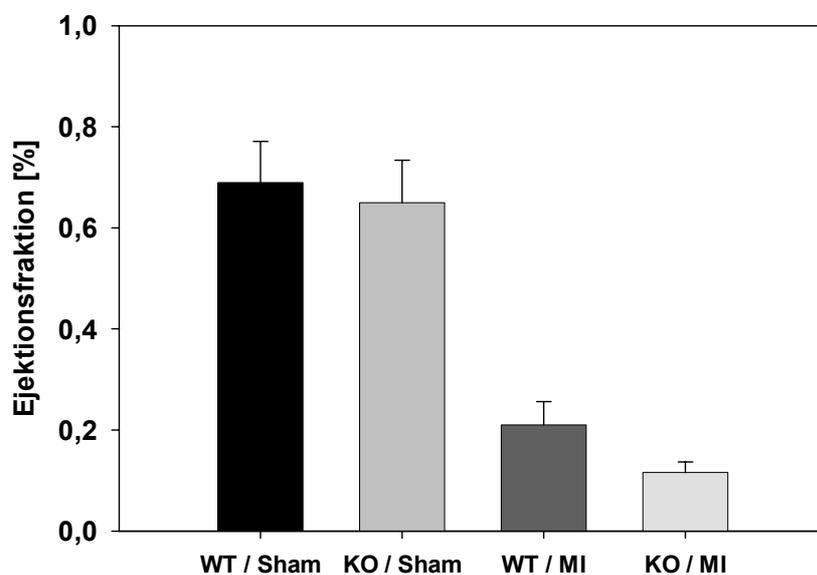
Wie bei den meisten anderen gemessenen kardialen Parametern, unterscheiden sich scheinoperierte Wildtyp- und *bgn-knockout* Mäuse auch nicht beim Herzminutenvolumen. Nach Myokardinfarkt sinkt in beiden operierten Gruppen das Herzminutenvolumen signifikant. Ebenso zeigt sich eine Tendenz zu einem Unterschied im Herzminutenvolumen zwischen infarziertem Wildtyp-Maus und *bgn-knockout* Maus mit Infarkt, der jedoch nicht signifikant ausfällt.

Die Ejektionsfraktion ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen Volumen des linken Ventrikels, welches dem enddiastolischen Volumen entspricht.

**Tabelle 21:****Ejektionsfraktion (EF in %), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>0,69</b> $\pm$ 0,081	<b>0,65</b> $\pm$ 0,084	<b>0,21</b> $\pm$ 0,046	<b>0,116</b> $\pm$ 0,021	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Die Werte aus Tabelle 21 sind nachfolgend grafisch dargestellt:

**Abbildung 45:****Ejektionsfraktion (EF in %), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Während im Vergleich der Sham-Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind, ist nach Infarkt ein Nachlassen der Ejektionsfraktion in beiden Genotyp-Gruppen zu beobachten. Die Verschlechterung der Auswurfleistung nach Infarkt ist bei den transgenen Mäusen deutlich ausgeprägter als bei den Wildtyp-Mäusen.

Das endsystolische Volumen ist das minimale Volumen, das nach dem Auswurf des Blutes im linken Ventrikel verbleibt. Es ist abhängig von der Auswurfleistung und Kontraktilität des Ventrikels. Ein vergrößertes endsystolisches Volumen zeigt eine Verschlechterung der Herzarbeit an.

Tabelle 22 und Abbildung 46 zeigen die erhobenen Daten 21 Tage nach MI:

Tabelle 22:

endsystolisches Volumen (ESV in  $\mu\text{l}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
28,2 $\pm$ 9,28	31,4 $\pm$ 8,53	75,3 $\pm$ 11,06	102,9 $\pm$ 6,29	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

In Abbildung 46 sind die Messdaten grafisch dargestellt:

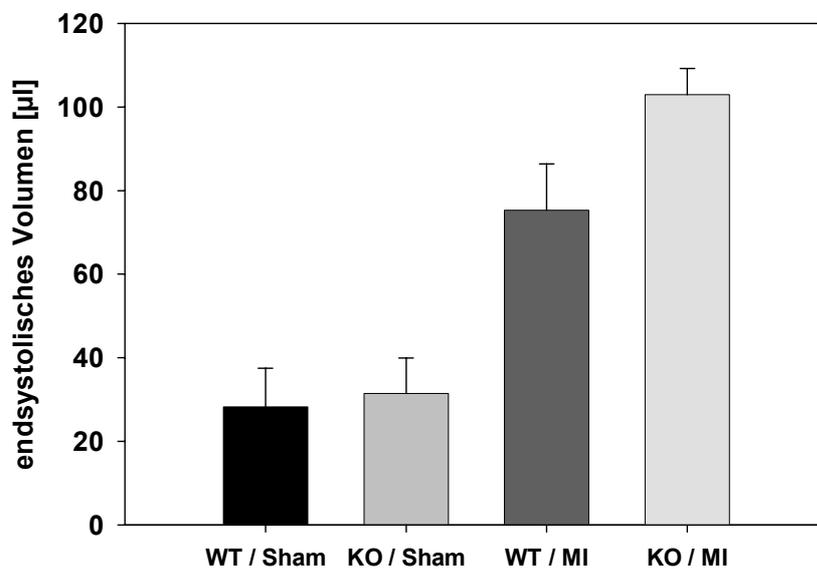


Abbildung 46:

endsystolisches Volumen (ESV in  $\mu\text{l}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Basal unterscheiden sich Wildtyp und *bgn-knockout*-Modell nicht. Bedingt durch die Ventrikeldilatation kommt es nach Infarkt zu größeren Residualvolumina, wobei der Unterschied zwischen den infarzierten Wildtypen und der *bgn*-KO Gruppe mit Infarkt hochsignifikant ausfällt, das heisst, dass das Maß der Restvolumensteigerung nach erfolgter Systole infolge erhöhter Dilatation bei den *bgn*-KO Mäusen noch größer ist.

### Diastolische Herzfunktion

Einer der wichtigen Parameter der diastolischen Herzfunktion ist das enddiastolische Volumen. Dabei handelt es sich um das minimale Volumen, welches nach dem Ende der Diastole im linken Ventrikel verbleibt.

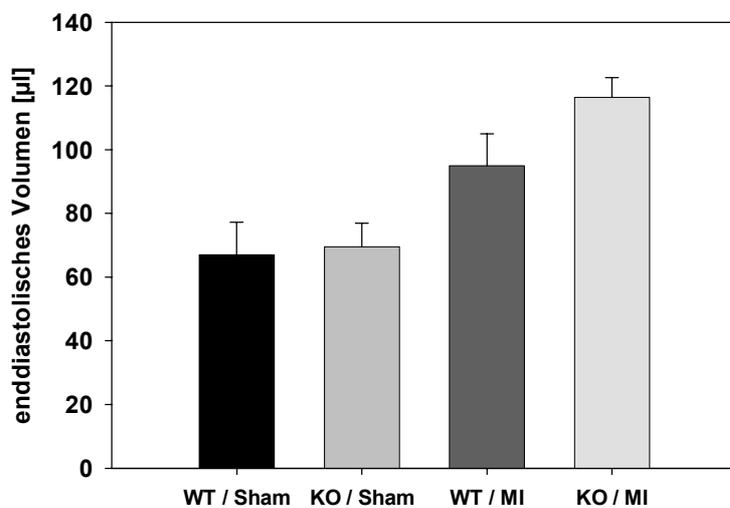
Tabelle 23 und Abbildung 47 veranschaulichen die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen 21 Tage nach MI

**Tabelle 23:**

**enddiastolisches Volumen (EDV in  $\mu\text{l}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
<b>67,01</b> $\pm$ 10,22	<b>69,45</b> $\pm$ 7,44	<b>94,92</b> $\pm$ 10,01	<b>116,39</b> $\pm$ 6,20	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

In Abbildung 47 wurden die Ergebnisse in Form von Säulendiagrammen aufgetragen:



**Abbildung 47:**

**enddiastolisches Volumen (EDV in  $\mu\text{l}$ ), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Zwischen beiden scheinoperierten Gruppen sind keine Unterschiede festzustellen. Dilatationsbedingt kommt es nach Infarkt zu größeren Restvolumina mit entsprechenden, hochsignifikanten Unterschieden bei den Infarkttieren im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen. Das enddiastolische Volumen in der Gruppe der Biglykan-defizienten Mäuse mit Infarkt ist im Vergleich zu den infarzierten Wildtyp-Mäusen erhöht.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter der diastolischen Funktion. Es handelt sich um den Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird.

Tabelle 24 und Abbildung 48 zeigen die Messwerte 21 Tage post MI:

Tabelle 24:

linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHg), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
2,84 $\pm$ 0,55	2,92 $\pm$ 0,42	15,23 $\pm$ 2,65	21,75 $\pm$ 2,77	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05

In Abbildung 48 sind die Werte grafisch dargestellt:

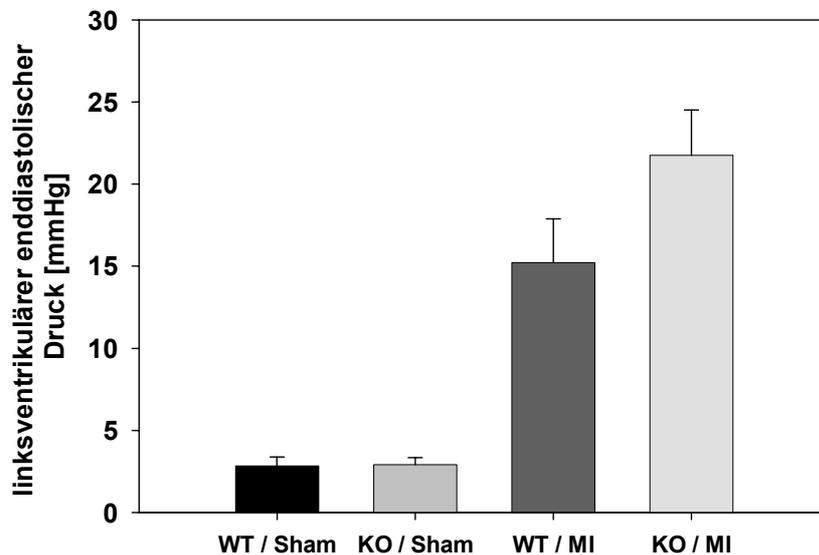


Abbildung 48:

linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP in mmHg), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Aufgrund der schlechten Auswurfleistung infarzierter Ventrikel ist der verbleibende linksventrikuläre enddiastolische Druck im Vergleich zu den basalen Werten stark erhöht. Dabei besteht ein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich innerhalb der Infarktgruppe (WT-MI vs. KO-MI).

Die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation und somit ein wichtiger Parameter der diastolischen Herzfunktion.

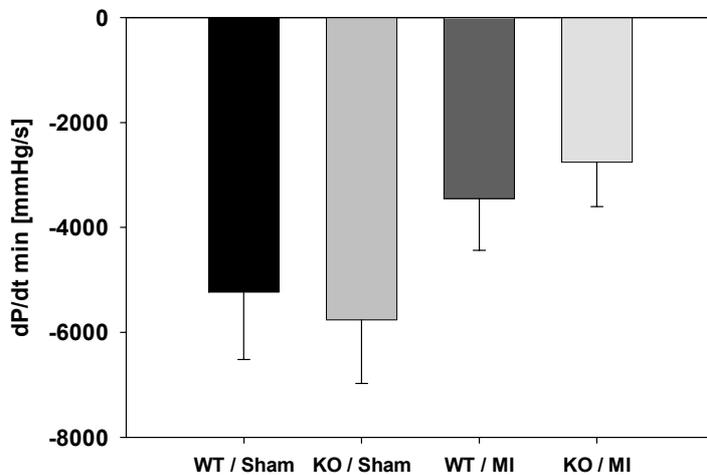
In Tabelle 25 und Abbildung 49 werden die Ergebnisse der Messung dieses Parameters 21 Tage nach experimentellem Infarkt gezeigt:

**Tabelle 25:**

**linksventrikuläre minimale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min mmHg/s), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Mittelwert ± SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
<b>-5231</b> ± 1284	<b>-5763</b> ± 1214	<b>-3446</b> ± 993	<b>-2757</b> ± 847	n.s.	p < 0,01	p < 0,001	n.s.

Darstellung der Messwerte dP/dt min als Säulendiagramm:



**Abbildung 49:**

**linksventrikuläre minimale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min mmHg/s), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt**

Die Werte der verschiedenen scheinoperierten Gruppen unterscheiden sich kaum voneinander. Die Unterschiede zwischen Infarkt- und Sham-Gruppen fallen im Gruppenvergleich der Wildtyp-Tiere signifikant, bei den *bgn-knockout* Mäusen hochsignifikant aus. Beim Vergleich der beiden Gruppen mit Myokardinfarkt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Relaxation.

Tau ist ein Parameter der frühen diastolischen Funktion. Es bezeichnet den Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, wenn der Druck noch 10 % des maximalen linksventrikulären Druckes aufweist. Somit ist Tau ein weiterer Relaxationsparameter.

Die Ergebnisse der Messungen für diesen Parameter sind in Tabelle 25 und Abbildung 50 dargestellt.

Tabelle 26:

Tau (ms), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham	KO-Sham	WT-MI	KO-MI	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
n = 7	n = 8	n = 10	n = 6				
<b>13,79</b> $\pm$ 1,86	<b>13,29</b> $\pm$ 2,08	<b>17,43</b> $\pm$ 2,41	<b>17,00</b> $\pm$ 3,34	n.s.	p < 0,01	p < 0,01	n.s.

Abbildung 50 zeigt die Daten aus Tabelle 26 in Form eines Säulendiagramms:

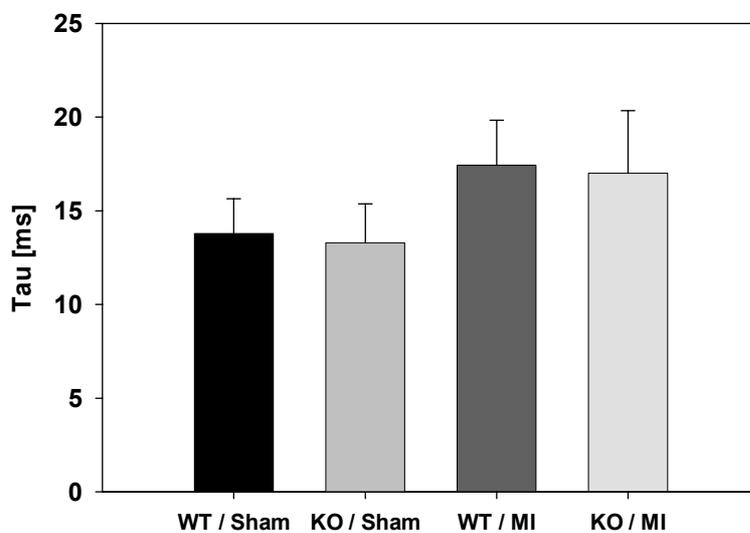


Abb. 50:

Tau (ms), 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Der Unterschied zwischen den jeweiligen Infarktgruppen und den korrespondierenden scheinoperierten Gruppen fällt signifikant aus. Dabei ist Tau deutlich verlängert. Innerhalb der Infarktgruppe (WT-MI vs. KO-MI) besteht kein Unterschied. Zwischen den scheinoperierten Gruppen konnte auch keine signifikante Differenz der Tau-Werte festgestellt werden.

Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung ist ein vor- und nachlastunabhängiger Parameter und durch die Vorlastsenkung während der *Vena-cava*-Okklusion zu gewinnen (siehe 3.9.6). Mit diesem Parameter kann die intrinsische Steifigkeit während der diastolischen Dehnung des linken Ventrikels bestimmt werden. Da Messungen mittels *Vena-cava*-Okklusion bei infarzierten Tieren mit einer extrem hohen Mortalitätsrate einhergehen, wurden in diesem Falle Daten ausschließlich bei scheinoperierten Mäusen erhoben. Auf diese Weise ist dem Tierschutzgedanken Rechnung getragen und es lassen sich trotzdem wichtige Erkenntnisse über eine mögliche veränderte intrinsische Steifigkeit der linken Ventrikelwand bei den *bgn-knockout* Mäusen gewinnen.

Tabelle 27:

enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), bei scheinoperierten Mäusen

Mittelwert $\pm$ SD				Signifikanz			
WT-Sham n = 7	KO-Sham n = 8	WT-MI n = 10	KO-MI n = 6	WT-Sham vs. KO-Sham	WT-Sham vs. WT-MI	KO-Sham vs. KO-MI	WT-MI vs. KO-MI
0,0332 $\pm$ 0,01	0,0195 $\pm$ 0,006	-----	-----	p < 0,01	-----	-----	-----

Grafische Darstellung der EDPVR-Werte:

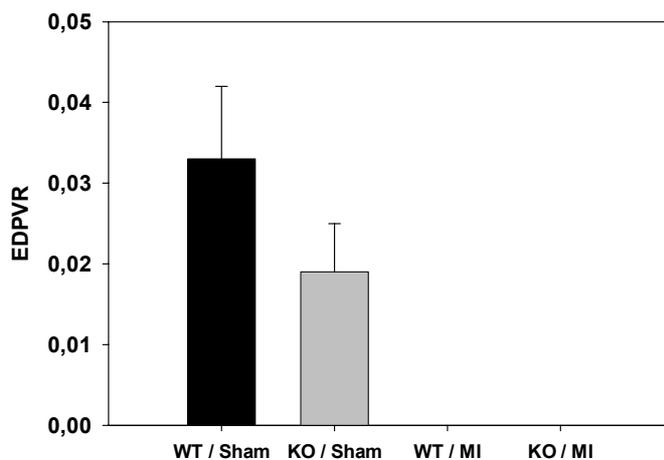


Abbildung 51:

enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), bei scheinoperierten Mäusen

Wie schon bei vorausgegangenen Messungen beobachtet (siehe 4.1.4.), fällt das enddiastolische Druck-Volumen Verhältnis bei den Biglykan-defizienten Tieren niedriger aus. Das kardiale Gewebe der *bgn-knockout* Mäuse weist somit eine geringere intrinsische Steifigkeit auf.

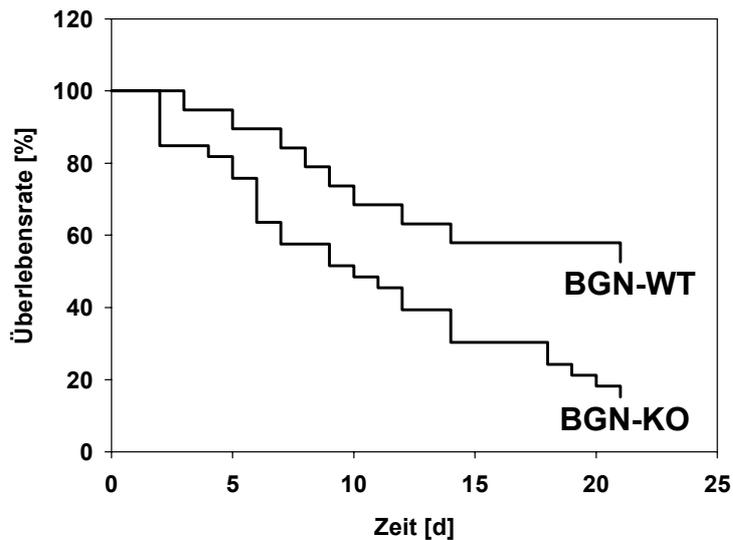
#### 4.2.4. Untersuchung der Mortalität bis zum Zeitpunkt 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt

Zur Bewertung unterschiedlicher Mortalitätsraten nach experimentellem Myokardinfarkt wurde die jeweilige Anzahl der verstorbenen Tiere im Zeitverlauf nach dem operativen Eingriff festgehalten und nach Sektion eventuell erkennbare Ursachen des Todes protokolliert.

Ausgehend von einer erfahrungsgemäß zu erwartenden Mortalitätsrate von bis zu 50 % (bei Wildtypmäusen) nach experimentellem Myokardinfarkt wurden in jeder Infarktgruppe 20 Tiere operiert, um in späteren Untersuchungen ausreichend überlebende Tiere zur

Verfügung zu haben. Aufgrund der deutlich höheren Mortalitätsrate nach experimentellem Myokardinfarkt mussten in der *bgn-knockout* Gruppe mit Infarkt noch Tiere nachoperiert werden. Von den 20 operierten Wildtyp-Mäusen überlebten bis zum 21. Tag nach MI, dem Datum der hämodynamischen Messungen und der Organentnahme, 11 Tiere.

Von den insgesamt 33 operierten Biglykan-defizienten Mäusen lebten am 21. Tag nach dem chirurgischen Eingriff noch 6 Tiere. Der Anteil rupturierter Herzen (an oder in der Infarktnarbe) war dabei bei den Biglykan-defizienten Mäusen deutlich erhöht ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 52:** Darstellung der prozentualen Überlebensrate im Zeitverlauf bis 21 Tage nach experimentellem Myokardinfarkt.

Ausgangszahl der Wildtyp-Mäuse:  $n=19$ ; Ausgangszahl der *bgn-knockout* Mäuse:  $n=33$

## 5. Diskussion

### 5.1. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines *Knockout*-Tiermodells zu untersuchen, welche Funktion das kleine leucinreiche Proteoglykan Biglykan in der extrazellulären Matrix des Herzens, insbesondere im Reparaturprozess des kardialen Gewebes nach einem Myokardinfarkt, hat.

Zwei Aspekte standen hierbei im besonderen Fokus:

- 1.) Welcher kardiale Phänotyp entwickelt sich im Biglykan-*knockout* Mausmodell?
- 2.) Welchen Einfluß hat die Deletion des für Biglykan kodierenden Gens auf den kardiale ‚Remodelling‘-Prozesse nach experimentell erzeugtem Myokardinfarkt?

### 5.2. Herzgewicht, Körpergewicht und das Verhältnis von Herzgewicht/Körpergewicht unter basalen Bedingungen

Xu et al. (58) berichten, dass sich bgn-WT und bgn-KO Mäuse im Alter von 12 Wochen nicht im Körpergewicht unterscheiden, die Wachstumsrate der genmutierten Mäuse dann aber signifikant nachlässt. Diese Daten wurden während der routinemäßigen Erfassung der Gewichtsdaten von Herz und Körper, im Verlauf der Organentnahmen im Alter von 12 Wochen, bestätigt. Biglykan-*knockout*-Mäuse und die Wildtyp-Geschwistertiere wogen zwischen 26 und 32 Gramm, wobei sich bei den Biglykan-defizienten Mäusen ein nicht signifikanter Trend zu einem etwas geringern Gewicht sowohl des Herzens als auch des Körpers zeigte. In dem Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, als allgemein hin anerkannten Indikator einer kardialen Hypertrophie (64), zeigte sich dagegen kein Unterschied. Mit zunehmendem Alter stagniert das Wachstum der BGN-KO Mäuse, so dass bei ihnen im Alter von 6 Monaten sowohl ein signifikant erniedrigtes Körpergewicht, als auch Herzgewicht dokumentiert werden konnte. Im Verhältnis von Herzgewicht und Körpergewicht war allerdings kein Unterschied festzustellen. Folglich wirkt sich die Deletion den Biglykan-Gens in gleichem Maße auf das Körpergewicht und das Herzgewicht aus, an der Relation ändert sich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen jedoch nichts.

Weiterhin berichten die Xu et al. (58), dass dieser signifikante Unterschied im Körpergewicht zwischen Biglykan-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Alter von ca. 9 Monaten nicht mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die

*bgn-knockout* Mäuse im Alter von 15 Monaten signifikant leichter (und kleiner) als die Wildtypmäuse waren. Korrelierend dazu fiel auch das Herzgewicht geringer aus. Das Herzgewicht der *bgn-knockout* Mäuse war im Verhältnis zum Körpergewicht hochsignifikant geringer, was ein Hinweis darauf sein kann, dass, bedingt durch die Gendelektion, eine Strukturänderung der extrazellulären kardialen Matrix erfolgte, die sich in messbaren physiologischen Parametern äußert. Die Herzen der Wildtypmäuse erscheinen also im Vergleich zu den *bgn-knockout* Mäusen hypertropher, was allerdings nicht bedeutet, dass Wildtypmäuse einer kardialen Hypertrophie unterliegen, sondern gegenteilig, dass die Herzen, in Relation zum Körper, bei den Biglykan-defizienten Mäusen entweder kleiner sind und / oder dass die genmutierten Mäuse eine andere kardiale Gewebemorphologie mit einer möglicherweise veränderten kardialen Gewebedichte besitzen.

### 5.3. Basale kardiale Expressionsanalysen relevanter Gene

Eine mögliche Erklärung für das, in Relation zum Körpergewicht, geringere Herzgewicht bei den Biglykan-*knockout* Mäuse könnte der geringere kardiale Kollagen I mRNA-Spiegel sein, der auch schon bei den 3 Monate alten Tieren zu verzeichnen war. Mit steigendem Lebensalter (6. Lebensmonat) nimmt der kardiale Anteil an Kollagen I mRNA in beiden Gruppen auf fast das Doppelte zu. Die Relation bleibt im Gruppenvergleich der beiden Alterstufen jedoch ungefähr gleich, da die Biglykan-*knockout* Tiere auch im Alter von 6 Monaten kardial nur ca. 75 % der Menge an Kollagen I mRNA der Wildtypmäuse aufweisen. Biglykan-*knockout* Mäuse exprimieren im Alter von 3 Monaten mehr Kollagen III mRNA als die Wildtyp-Kontrolltiere. Da Kollagen III im Herzen nach Kollagen I das am häufigsten vorkommende Kollagen ist, im Vergleich zu Kollagen I aber einen deutlich geringeren Anteil am Gesamtgehalt der extrazellulären Matrix hat, spielt es hinsichtlich des Herzgewichtes eine eher untergeordnete Rolle. (65) (66)

Unterschiede im Kollagen III Gehalt machen sich möglicherweise mehr in den biomechanischen Eigenschaften eines Gewebes bemerkbar, denen hinsichtlich der funktionellen kardialen Parameter eine besondere Rolle zukommt.

Die Genexpression für Kollagen III sinkt hochsignifikant bei Wildtypmäusen und den Biglykan-*knockout* Tieren mit Erreichen des 6. Lebensmonats. Dennoch weisen auch bei den nun ausgewachsenen Tieren die Biglykan-defizienten Mäuse einen signifikant höheren kardialen Kollagen III mRNA Spiegel als ihre Wildtyp-Geschwister auf.

Die Biglykan-*knockout* Mäuse exprimieren im Alter von 3 Monaten signifikant mehr Decorin mRNA als gleichalte Wildtypmäuse. Während sich die Decorin Expression bei den Wildtypen mit zunehmendem Alter kaum noch ändert (+ ca. 12%), steigt diese bei den Biglykan-defizienten Mäusen bis zum Erreichen des 6. Lebensmonats um das ca. 1,4-fache. Das

Messen der Decorin mRNA-Level stand in dieser Arbeit in einem besonderen Fokus. Hintergrund ist die Tatsache, dass Decorin und Biglykan eine hinsichtlich Bau und Funktion eine hohe Homologie aufweisen. Bezüglich der Modulation der Fibrillogenese besitzen diese beiden Proteoglykane ähnliche Eigenschaften, wie sich sich beim Decorin/Biglykan Doppel-*knockout* Modell gezeigt hat (67). Andererseits können Decorin und Biglykan durchaus auch Unterschiede aufzeigen, beispielsweise in der Hinsicht auf ihre Induktion durch Tgf-beta1 (68). Die Biglykan-defizienten Mäuse weisen in allen Alterstufen einen erhöhten kardialen Decorin mRNA Spiegel auf. Aufgrund der hohen Homologie der Biglykan- und Decorinmoleküle ist davon auszugehen, dass dies kompensatorisch auf das Fehlen des Biglykans geschieht.

Für Tgf-beta1, einem potenten Zytokin, Wachstumsfaktor sowie Induktor (kardialer) Fibrose ist bekannt, dass Biglykan in der Lage ist, *in vitro* daran zu binden und die Aktivität dieses Zytokines zu hemmen. *In vivo* wurde der Beweis hierfür bislang nur für Decorin erbracht. (69) Über Tgf-beta1 ist aber auch bekannt, dass es in der Lage ist, die Syntheserate von Proteoglykanen in kardialen Fibroblasten *in vitro* zu modulieren. (51) Ergänzend dazu konnten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Jens W. Fischer aufzeigen, dass Tgf-beta1 *in vitro* die Biglykan-mRNA Expression in kardialen Fibroblasten induzieren kann. (50) Aus diesem Grunde stellte sich die Frage, ob sich die Deletion des Biglykan-Gens auf den kardialen Tgf-beta1 mRNA Spiegel auswirkt, was mögliche Konsequenzen hinsichtlich der Gewebsstruktur nach sich ziehen könnte.

Die Biglykan-*knockout* Mäuse exprimieren sowohl im Alter von 3 Monaten als auch 6 Monaten deutlich weniger Tgf-beta1 mRNA als die gleichaltrigen Wildtyp-Kontrolltiere. Im Altersvergleich konnte bei Wildtypen und genmutierten Mäusen ein Anstieg der kardialen Tgf-beta1 mRNA Expression festgestellt werden. Die Relation im Vergleich zu den Wildtypen änderte sich jedoch nicht; in beiden Alterstufen exprimierten die BGN-KO Mäuse ca. 78% der Menge kardialer Tgf-beta1 mRNA. Über mögliche *feedback*-Mechanismen, die einen Einfluss des Proteoglykans Biglykan auf die Tgf-beta1 mRNA Expression haben könnten, ist bislang nichts bekannt. Eine mögliche Folge des erniedrigten TGF-beta1 mRNA Spiegels könnte die geringere kardiale interstitielle Fibroserate sein.

## 5.4. Basale kardiale interstitielle Fibrose

Bei der quantitativen Auswertung der Herzquerschnitte der Mäuse (Wildtyp vs. *Knockout* im Alter von 6 Monaten) konnte festgestellt werden, dass der Grad der interstitiellen Fibrosierung Biglykan-defizienter Mäuse signifikant unter dem der Wildtypmäuse liegt. Ursache dafür ist vermutlich die Tatsache, dass die Biglykan-*knockout* Mäuse in geringerem Maße Kollagen I mRNA exprimieren. Desweiteren konnte eine verminderte mRNA-

Expression von Tgf-beta1 gezeigt werden, welches als profibrotischer Faktor einzustufen ist. Da Kollagen III in kardialen Gewebe in geringeren Mengen vorkommt als Kollagen I, steht auch die erhöhte Expression der Kollagen III mRNA bei den BGN-KO Mäusen nicht im Widerspruch zu einem insgesamt erniedrigten kardialen Fibrosegrad.

## 5.5. Basale Hämodynamikmessungen

Das Konduktanzmessverfahren zur Evaluierung der kardialen Funktion durch Analyse der Druck-Volumen-Kurven ist bei Menschen seit den 80er Jahren etabliert (70) (71) (72). Allerdings konnte es sich wegen des hohen technischen Aufwands, den im Gegensatz zu einem konventionellen Druckkatheter erhöhten Kosten und vor allem wegen der schwierigeren Interpretation und Auswertung der Daten nicht in der Routine der Klinik durchsetzen, sondern wurde nur für wenige wissenschaftliche Fragestellungen angewandt. Seit der Entwicklung von Konduktanzkathetern für das Kleintiermodell vor wenigen Jahren steht die Druck-Volumen-Analyse jedoch wieder im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses zur Erfassung der kardialen Herzfunktion (73) (74).

Gerade im Hinblick auf die steigende Zahl von genetisch veränderten Tieren ist die genaue kardiale Phänotypisierung immer entscheidender geworden. Die Genauigkeit des Konduktanzmessverfahrens ist mit anderen Messtechniken wie der Echokardiographie abgeglichen und bestätigt worden (73).

Besonders aber in Hinsicht auf die Analyse der vor- und nachlast- unabhängigen Parameter wie z.B. dem enddiastolischen Druck-Volumen-Verhältnis (EDPVR) zeigen sich die Vorteile des Konduktanzverfahrens erst wirklich. Die Herzfunktion ist wesentlich abhängig von der aktuellen Volumensituation im Kreislauf. Besonders die diastolische Funktion und Parameter wie der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) sind davon betroffen. Leicht können durch Senkung des Kreislaufvolumens der LVEDP gesenkt und daher bestehende kardiale Dysfunktionen übersehen werden. Dieser therapeutisch beim Menschen gewünschte Effekt ermöglicht Fehlinterpretationen im Tiermodell. Diese Fehlinterpretationen lassen sich durch die Analyse von vor- und nachlastunabhängigen Parametern verkleinern. Daher gilt der EDPVR mit seiner Aussage über die intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikels während der diastolischen Dehnung durch die Blutfüllung, hier unabhängig von der Volumensituation, als robust (75) (76).

Somit kann die Druck-Volumen-Messung per Konduktanzmessmethode, wie sie auch in dieser Studie angewandt wurde, heute als „Goldstandard“ der kardialen Funktionsmessung im Kleintier betrachtet werden. Leider müssen die Tiere dazu anästhesiert werden, so dass auf den Einfluss der Narkose auf das Herzkreislaufsystem Rücksicht genommen werden muss.

Es gibt jedoch schon neue Ansätze der intraventrikulären Druckmessung am wachen Tier, auch wenn diese zum heutigen Zeitpunkt noch nicht als allgemein etabliert gelten (77). Daher wurden in dieser Studie die hämodynamischen Messungen ausschließlich an anästhesierten Tieren durchgeführt. Es wurde ebenfalls Wert darauf gelegt, dass alle Tiere ausreichend sediert waren und so ein eventueller Einfluss von Schmerzreizen auf die kardiale Funktion minimiert werden konnte.

Obwohl ein diskutierter Einfluss des Thiopentals, welches zur Anästhesie verwendet wurde, auf die Nachlast im Menschen nicht nachgewiesen werden konnte (78), wurde in der Maus gezeigt, dass der kardiale Index gegenüber nicht anästhesierten Tieren signifikant reduziert war (79).

Da aber in dieser Studie die Mäuse in allen Gruppen der gleichen Narkose ausgesetzt waren, handelt es sich um einen Fehler systematischer Art, welcher die Relation der Unterschiede und damit die Ergebnisse nicht verfälscht.

Wie im Ergebnisteil unter 4.1.4. bereits geschrieben wurden bei 6 Monate alten Mäusen (Wildtyp vs. Biglykan-*knockout*) basale Hämodynamikmessungen durchgeführt. Aufgrund einer Murines-Herpesvirus-bedingten Keulung eines Großteils des Zuchtbestandes konnten nur geringe Stückzahlen pro Messgruppe in entsprechendem Alter aufgebracht werden, was sich in entsprechend hohen Standardabweichungen der hämodynamischen Meßwerte niederschlug.

Die basalen hämodynamischen Messwerte unterscheiden sich nicht von denen scheinoperierter (gleichaltriger) Tiere. Diese Erkenntnis bestätigt sich in den Ergebnissen der Hämodynamikmessungen der Arbeitsgruppe Tschöpe (Abteilung für Kardiologie und Pulmologie, Charité, Campus Benjamin Franklin), welche jahrelange Erfahrung mit Hämodynamikmessungen mittels Konduktanzkatheter aufweisen kann. Bei der Schein-Operation wird ein Knoten über dem Gewebe des linken Ventrikels gesetzt, ohne das Abbinden einer Koronararterie zu induzieren oder eine Gewebsquetschung hervorzurufen. Die Begründung für die Vergleichbarkeit der Messwerte liegt also darin, dass bei der Schein-Operation eine Narbengewebsbildung lediglich im Stichkanal der feinen Nadel erfolgt. Es handelt sich um eine mikroskopisch kleine, lokale Fibrosierung, welche die biomechanischen Eigenschaften des linken Ventrikels nicht messbar beeinträchtigt. Da außerdem beide Gruppen, Wildtypmäuse und Biglykan-*knockout* Mäuse, der gleichen Schein-Operation unterzogen wurden, ist der „Fehler“ systematisch und somit die Relation der Unterschiede ohne Einschränkung vergleichbar.

Aus dieser Ausgangsüberlegung heraus wurde, im Sinne des Tierschutzes, auf die erneute Zucht und nochmalige Messung der basalen Hämodynamikwerte (mit größeren Gruppenzahlen) verzichtet. In die Auswertung flossen stattdessen die Ergebnisse aus den hämodynamischen Messungen beider Schein-OP Gruppen (Sham-WT vs. Sham-KO).

Bei allen basalen hämodynamischen Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der systolischen Funktion aufgezeigt werden.

Die diastolische Funktion unterscheidet sich zwischen dem Biglykan-Wildtyp und den Biglykan-*knockout* Mäusen nur in dem vor- und nachlastunabhängigen Parameter der enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) signifikant. Keiner der anderen konventionellen Parameter der diastolischen Funktion konnte in dieser Arbeit eine diastolische Dysfunktion aufzeigen. Das heißt also, dass sowohl der LVEDP, wie auch Tau und der Relaxationsparameter  $dP/dt$  min nicht signifikant verändert waren. Teilweise ließen sich aber gewisse Trends zu einer erhöhten Relaxation des linken Ventrikels ( $dP/dt$  min) aufzeigen.

Der Parameter EDPVR gilt als einer der sensitivsten der diastolischen Funktion (72) (74). Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, um diesen Parameter zu berechnen. Eine Variante besteht darin, aus einzelnen Herzschlägen ohne direkte Vorlastsenkung die EDPVR zu errechnen. Allerdings gilt nur die direkte Erfassung der Relation hintereinander folgender Herzschläge während einer Vorlastsenkung als genau und zuverlässig (78).

Daher bietet sich diese Messung besonders im Tiermodell an. Zur Berechnung der enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung gibt es unterschiedliche Wege: Eine Methode ist entweder eine lineare oder eine exponentielle Funktion durch die einzelnen enddiastolischen Druck-Volumen-Punkte zu legen. Die Unterscheidung zwischen linearer und exponentieller Funktion besteht traditionell und ist vor allem in technischen Problemen aus den Zeiten der analogen Messung der Druck- und Volumen-Kurven begründet. Heute ist es problemlos möglich durch mathematische Annäherungen eine genaue exponentielle Funktion durch diese Punkte zu legen und so präzisere Analysen zu ermöglichen. In dieser Untersuchung wurde daher die exponentielle Annäherung berechnet.

Was ist die Ursache dieser verminderten Steifigkeit?

Unterschiede in der enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung können unterschiedliche Ursachen haben (81). Diskutiert werden zum einen Veränderungen in der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel erniedrigte kardiale Fibrose (82) und kardiale Hypertrophie (83), zum anderen Veränderungen im Kardiomyozyten selber (84) (85).

Die EDPVR, auch als intrinsische Ventrikelsteifigkeit bekannt, lag bei den *bgn-knockout*-Mäusen hochsignifikant unter der der Wildtypmäuse.

Da es keine Erkenntnisse über deletionsbedingte Veränderungen im Bereich der kardialen Myozyten gibt und anhand der Messdaten auch keine Hinweise auf eine kardiale Hypertonie existieren, ist davon auszugehen, dass die geringere Steifheit der linksventrikulären Wand durch den geringeren kardialen Fibrosierungsgrad zustande kommt, welcher durch die histologische Untersuchung der Herzquerschnitte und quantitative Erfassung der kardialen interstitiellen Fibrosierung bestätigt werden konnte. Unterstützt werden diese Daten durch die Messwerte zum Relaxationsparameter  $dP/dt$  min, die einen Trend zu mehr Relaxation in der

Diastole erkennen lassen. Da die Hämodynamikparameter EDPVR, TAU und  $dP/dt$  min in erster Linie von den biomechanischen Eigenschaften eines Gewebes abhängig sind, ergänzen sich die diesbezüglichen Meßwerte mit den Erkenntnissen aus den Untersuchungen zum Fibrosierungsgrad der Herzen der genmutierten Mäuse.

### 5.6. Kardialer Phänotyp der BGN-KO Mäuse

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen:

Biglykan defiziente Mäuse besitzen auf histologischer, molekularbiologischer und funktioneller Ebene einen kardialen Phänotyp.

Das Herzgewicht ist in Relation zum Körpergewicht bei den genmutierten Mäusen geringer; der interstitielle Fibrosierungsgrad liegt signifikant unter dem der Wildtypmäuse; der kardiale mRNA-Gehalt an Kollagen I und Tgf-beta1 ist geringer, während der von Kollagen III und Decorin erhöht ist, wobei die genauen Ursachen der unterschiedlichen Genregulation bislang noch nicht aufgeklärt werden konnten. Des Weiteren ist intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikels im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt, bei einer Tendenz zu einer etwas erhöhten Relaxationsfähigkeit. Der kardiale Phänotyp der Biglykan-defizienten Maus zeigt sich vor allem in der diastolischen Herzfunktion.

Diese Daten korrelieren mit der histologisch festgestellten erniedrigten interstitiellen kardialen Fibrose. Als Ursache der geringeren Fibrose und der unterschiedlichen hämodynamischen Parameter ist ein Einfluss der Biglykan-Deletion auf die Struktur der extrazellulären Matrix auf molekularbiologischer Ebene anzusehen.

### 5.7. Herzgewicht, Körpergewicht und das Verhältnis von Herzgewicht/Körpergewicht nach experimentellem MI

Bei allen überlebenden Mäusen mit experimentell erzeugtem Myokardinfarkt und allen scheinoperierten Tieren, wurden nach 21 Tagen die hämodynamischen Daten erfasst. Anschließend wurden die Herzen entnommen, gewogen und für die weitere Aufbereitung für spätere molekularbiologische Analysen aufbewahrt. Der Zeitpunkt von 21 Tagen nach MI wurde gewählt, da hier bei Mäusen (nach MI) die Narbengewebebildung im Bereich des linken Ventrikels weitestgehend abgeschlossen ist und sich auch die meisten systolischen und diastolischen Parameter nicht mehr signifikant ändern (86).

Die ischämischen Bereiche haben sich 21 Tage nach einem transmuralen Myokardinfarkt in großflächiges, teilweise papierdünnes Narbengewebe umgewandelt, wobei sich dieses in beiden Infarktgruppen über ausgedehnte Bereiche des linken Ventrikels erstreckte und im Durchschnitt mehr als 50 % der linken Ventrikelfläche betraf. Makroskopisch war in beiden

Infarktgruppen eine kardiale Hypertrophie bei gleichzeitiger Dilatation des linken Ventrikels (insbesondere im Narbenbereich) zu verzeichnen. Dies wurde durch die erhöhten Herzgewichte bestätigt. Beim Vergleich der Sham-Gruppen zeigten sich, analog zu den Herzgewichten bei den basalen Messungen der dreimonatigen Tiere, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Herzgewichtes. Im Vergleich mit den scheinoperierten Tieren konnte bei den Wildtypmäusen mit Infarkt eine Zunahme des Herzgewichtes um ca. 15% und bei den *bgn-knockout* Mäusen um ca. 9% beobachtet werden.

Auch das Körpergewicht unterscheidet sich bei den drei Monate alten Sham-Tieren (Wildtyp *versus* *bgn-knockout* Maus) nicht.

Zum gewählten Zeitpunkt nach erfolgtem Myokardinfarkt haben Wildtypmäuse und Biglykan-*knockout* Mäuse an Körpergewicht verloren. Als eine mögliche Ursache hierfür kann der postoperative Stress und die Belastung durch den erlittenen Schaden am Herzen angesehen werden.

Die Verringerung des Körpergewichtes nach MI betrifft Wildtypen und Biglykan-defiziente Tiere gleichermaßen, so dass der Vergleich der Infarktgruppen keinen signifikanten Unterschied zeigt.

Beim Vergleich des Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnisses als bekannter Indikator einer kardialen Hypertrophie lassen sich basal (beim Vergleich der Schein-OP-Gruppen) keine Unterschiede feststellen. Nach erfolgtem Myokardinfarkt ändert sich das Verhältnis in beiden Gruppen und dient als Beweis für die kardialen Umbauprozesse und der daraus resultierenden kardialen Hypertrophie. So besteht 21 Tage nach Myokardinfarkt ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *bgn-knockout* Modell. Die infarzierten Wildtyp Herzen sind in Relation zum Körpergewicht hypertropher als die der Biglykan-defizienten Mäuse.

Sowohl die Unterschiede im absoluten Herzgewicht nach MI als auch in dem Herzgewicht / Körpergewicht-Verhältnis sind kennzeichnend für unterschiedlich ablaufende kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt. Somit ergeben sich erste Indizien dafür, dass das Proteoglykan Biglykan eine wichtige Rolle im kardialen ‚Remodelling‘-Prozeß nach Myokardinfarkt spielt.

## 5.8. Expressionsanalysen relevanter Gene in linkem Ventrikel und im Septum nach experimentellem MI

Nach der vorliegenden Literatur ist bei Mäusen 21 Tage nach Myokardinfarkt der Umbau des ischämischen Ventrikelbereiches zur Infarktnarbe weitgehend abgeschlossen, während im Septum auch bis zu 4 Monate nach Infarkt noch Änderungen im Gesamt-Kollagenhaushalt beobachtet werden können (83).

Bei den scheinoperierten Tieren ist, analog zu den Daten der Beschreibung eines kardialen Phänotypes, in Septum und linkem Ventrikel, eine geringere Kollagen I mRNA Expression der *bgn-knockout* Mäuse zu verzeichnen. Da Narbengewebe mengenmäßig zu einem sehr hohen Prozentsatz aus Kollagenen besteht, steigt in auch beiden Infarktgruppen der Kollagen I mRNA Gehalt im Bereich der Infarktnarbe um ein Vielfaches an. Auch im Bereich des Septums kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Kollagen I mRNA Expressionsrate. Während hier aber der Anstieg des Kollagen I mRNA Expressionsniveaus in beiden Infarktgruppen in gleichem Ausmaß erfolgt (kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Biglykan-*knockout* Maus), bestehen erhebliche Unterschiede in der Kollagen I mRNA Expressionsrate in der Infarktnarbe. Hier ist bei den Biglykan-defizienten Mäusen ein weitaus höherer Kollagen I mRNA Spiegel zu verzeichnen.

Die kardialen Umbauprozesse nach einem Myokardinfarkt finden überall im Herzen, also im Infarktgebiet, den Randbereichen und auch in nicht direkt betroffenen Herzbereichen (Septum, rechter Ventrikel) statt, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Da die Infarktnarbe zwar relativ großflächig ist, aber im Verhältnis zu Septum und intakten Ventrikelwänden extrem dünn ausfällt, steht der hier verzeichnete relativ erhöhte Kollagen I mRNA Gehalt der *bgn-knockout* Mäuse nicht im Widerspruch zur festgestellten erhöhten kardialen Hypertrophie bei den infarzierten Wildtypen.

Das Kollagen III mRNA Expressionsniveau liegt bei den Biglykan-defizienten Mäusen in linkem Ventrikel und Septum über dem der Wildtypmäuse. Nach einem Myokardinfarkt kommt es in der Infarktnarbe und im Septum zu einem erheblichen Anstieg an Kollagen III mRNA. Auch hier ist eine unterschiedliche Regulierung der Kollagen III mRNA Syntheserate zu verzeichnen. Die *BGN-knockout* Mäuse exprimieren in der Infarktnarbe fast doppelt so viel Kollagen III mRNA wie die Wildtypen. Im Septum hingegen, liegt der relative Kollagen III mRNA Gehalt der *Knockouts* signifikant unter dem der Wildtypmäuse.

Zwar ist bekannt, dass Biglykan und Decorin in der Lage sind, die Fibrillogenese der Kollagentypen I und III zu beeinflussen (22), und auch der Beweis einer Kolo-kalisation der kleinen, leucinreichen Proteoglykane Biglykan und Decorin mit Kollagen I und III wurde erbracht (23) (24), aber bislang existieren keine gesicherten Daten, die einen direkten Einfluss des Biglykans hinsichtlich einer Änderung der Syntheserate von Kollagen I und III zeigen konnten. Decorin vermag *in vitro* den Fibrillen-Durchmesser bei beiden Kollagentypen zu reduzieren. (27) Inzwischen gibt es auch erste Hinweise darauf, dass Biglykan in der Lage zu sein scheint Einfluss auf die Fibrillogenese bzw. die Fibrillen-anordnung der Kollagene zu nehmen.

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer Induktion von Decorin und Biglykan mRNA (46). Die genauen Regulationsmechanismen sind hierfür noch nicht ausreichend erforscht, aber die Hauptursache ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems zu sehen (47) (48) (49).

Decorin mRNA wird sowohl basal, als auch nach Myokardinfarkt, von den Biglykan-defizienten Mäusen vermehrt exprimiert. Im Bereich der Infarktnarbe kommt es bei den genveränderten Mäusen, im Vergleich mit den Sham-Gruppen, zu einer Steigerung der Decorin mRNA Expression um mehr als 70 %, während die auch bei den infarzierten Wildtypmäusen zu verzeichnende Induktion der Decorin mRNA Expression weitaus geringer ausfällt.

Im Bereich des Septums ist bei den Wildtypmäusen 21 Tage nach Infarkt sogar eine geringere Decorin mRNA Expression zu verzeichnen (im Vergleich zur korrespondierenden Schein-OP Gruppe), wogegen die Expressionsrate bei den Biglykan-*knockout* Mäusen auch hier noch gesteigert ist. Möglicherweise haben das Fehlen des Biglykans und die gleichzeitig erhöhte Decorin mRNA Syntheserate einen Einfluss auf die Fibrillogenese der Kollagene I und III und somit auch einen Effekt auf die biomechanischen Eigenschaften des kardialen Gewebes. Ein unter Umständen reduzierter Fibrillen-Durchmesser könnte eine Erklärung für die unterschiedliche kardiale Gewebssteifigkeit, die bei den basalen Hämodynamikmessungen beobachtet wurde, sein.

Der schon bei den basalen Messungen festgestellte geringere kardiale Tgf-beta1 mRNA-Gehalt der Biglykan defizienten Mäuse konnte bei der Genanalyse der 3 Monate alten Sham-Tiere in Septum und linkem Ventrikel bestätigt werden.

In beiden Herzwandregionen sind 21 Tage nach Myokardinfarkt in den Infarktgruppen der Wildtypen und auch der bgn-KO Mäuse erhöhte mRNA Spiegel für Tgf-beta1 zu verzeichnen.

Hinsichtlich Tgf-beta1 ist der Anstieg des mRNA-Expressionsniveaus im Infarktgebiet bei den Biglykan-*knockout* Mäusen nur geringfügig erhöht, wogegen er im Septum wesentlich deutlicher ausfällt. Trotzdem bleibt das Niveau der Tgf-beta1 mRNA Expression immer unter dem der Wildtypen.

Tgf-beta1 ist aus der Literatur hinreichend als profibrotischer Faktor (41) bekannt. Aus diesem Grunde müsste bei den Biglykan-*knockout* Mäusen die Syntheserate von EZM-Molekülen, wie den Kollagenen und Proteoglykanen unter der der Wildtypmäuse liegen. Dies ist messbar am mRNA-Expressionsniveau der betreffenden Gene. Eine Bestätigung dafür ergaben die ähnlichen Messergebnisse bei der mRNA-Analyse der Sham-Tiere. Korrelierend dazu wurde basal eine geringere interstitielle Fibrosierung festgestellt, die sich auch in einer geringeren linksventrikulären Wandsteifigkeit (EDPVR) messbar niederschlug.

Nach Myokardinfarkt treffen diese Aussagen bei den Biglykan-*knockout* Mäusen nur noch teilweise zu, da in der Infarktnarbe, trotz (im Vergleich zum Wildtyp mit Infarkt) niedrigerer mRNA Spiegel für Tgf-beta1 höhere mRNA-Expressionsniveaus für Kollagen I und III festgestellt wurden. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das Tgf-beta1 mRNA-Expressionsniveau schon wieder absinkt, jedoch noch ein ausreichend hoher lokaler Proteinspiegel dieses Zytokines vorhanden ist.

## 5.9. Hämodynamik nach experimentellem MI

Nach einem transmuralen Myokardinfarkt kommt es zu kardialen Umbauprozessen, die nicht nur auf das Infarktgebiet beschränkt bleiben. So sind 21 Tage nach dem experimentell erzeugten Myokardinfarkt aus hämodynamischer Sicht zwei Hauptgruppen zu unterscheiden: Einerseits die scheinoperierten Tiere (Wildtyp und *bgn-knockout*), die sich untereinander, wie bereits festgestellt, nur in der diastolischen Herzfunktion unterscheiden – und andererseits die infarzierten Tiere (Wildtyp und *bgn-knockout*), die 21 Tage nach MI schwerwiegende hämodynamische Veränderungen aufweisen.

Während die Herzfrequenz bei den Wildtypmäusen auch nach dem Myokardinfarkt nicht sonderlich verändert erscheint, ist diese bei den *Biglykan-knockout* Mäusen erhöht. Aufgrund der insgesamt schlechteren Auswurfleistung der infarzierten *Biglykan*-defizienten Mäuse kommt es hier zu einer kompensatorischen Tachykardie, welche im Normalfall eine stärkere Fibrosierung des kardialen Gewebes nach sich zieht. Dadurch ändern sich wiederum die biomechanischen Eigenschaften des Herzens, mit der Folge einer weiteren Verschlechterung der systolischen und diastolischen Herzfunktion.

Neben der erhöhten Herzfrequenz lassen sich im Bereich der systolischen Funktion ein, durch die dilatative kardiale Hypertrophie bedingter, stark erniedrigter linksventrikulärer Druck (LVPmax), eine gesenkte Kontraktilität ( $dP/dt \max$ ) sowie auch stark reduzierte Werte für die Ejektionsfraktion (EF), das Herzminutenvolumen bzw. Cardiac Output (CO) und das Schlagvolumen (SV) beobachten. Dilatationsbedingt ist weiterhin das endsystolische Volumen erhöht.

Auch in der diastolischen Funktion sind 21 Tage nach MI gravierende Unterschiede zu den aus hämodynamischer Sicht „gesund“ erscheinenden Schein-OP Gruppen feststellbar.

Ebenfalls dilatationsbedingt ist das enddiastolische Volumen, also das minimale Volumen, welches nach dem Ende der Diastole im linken Ventrikel verbleibt, vergrößert.

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck, als einer der wichtigsten konventionellen Parameter der diastolischen Herzfunktion, ist stark erhöht. Die Ursache ist hier in der schlechten Auswurfleistung der infarzierten Ventrikel zu sehen. Infolge der ‚Remodelling‘-bedingten Fibrosierung des kardialen Gewebes kommt es zu einer verschlechterten Relaxation ( $dP/dt \min$ ). Auch TAU, ein weiterer Relaxationsparameter der frühen diastolischen Funktion, der den Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation bezeichnet (zu dem Zeitpunkt, bei dem der Druck noch 10% des LVPmax hat), ist erhöht und gibt somit einen Hinweis auf eine erhöhte Gewebssteifigkeit *post infarctionem*.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es nach einem Myokardinfarkt zu kardialen Umbauprozessen kommt, die eine stark verschlechterte Herzfunktion nach sich ziehen. Durch Kompensationsversuche des Herzens zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen des

Körpers gerät das Ganze schließlich in einen *circulus vitiosus* von Herzmehrarbeit, darauf folgender gewebemorphologischer Anpassung, welche wieder Herzmehrarbeit erforderlich macht. Am Ende kommt es ohne pharmakologische Intervention meist zu einer Überlastung des Herzens, mit oft tödlichem Ausgang.

Welchen Einfluß hat nun aber die Deletion des *Biglykan*-Gens auf den kardialen ‚Remodelling‘-Prozess?

Drei Wochen nach dem experimentell erzeugten Myokardinfarkt sind zwischen Wildtyp und *bgn-Knockout* teils erhebliche Unterschiede in der Hämodynamik nachweisbar.

Im Vergleich der infarzierten Wildtypmäuse mit den infarzierten *Biglykan-defizienten* Mäusen fällt in der systolischen Funktion ein erniedrigter linksventrikulärer Druck (LVPmax) auf. Der Unterschied ist zwar nicht signifikant, gibt aber trotzdem einen ersten Hinweis auf funktionelle Konsequenzen der, z.B. auf molekularbiologischer Ebene unterschiedlich ablaufenden Prozesse im kardialen ‚Remodelling‘ nach MI. Auch die Kontraktilität ( $dP/dt_{max}$ ) ist erniedrigt, allerdings fällt auch dieser Unterschied nicht signifikant aus.

Bedingt durch das unterschiedliche kardiale ‚Remodelling‘ zeigt sich beim *Biglykan-knockout* Modell ein Trend zur erhöhten Dilatation, was auch zu einer Verschlechterung des Schlagvolumens (SV), der Ejektionsfraktion (EF) und des Herzminutenvolumens (HMV) führt. Ebenfalls, bedingt durch die erhöhte Dilatation, kommt es zu einer Erhöhung des verbleibenden Residualvolumens am Ende der Systole.

In der diastolischen Funktion ist aus den gleichen Gründen das enddiastolische Volumen erhöht. Dadurch bedingt, steigt der linksventrikuläre enddiastolische Druck bei den *bgn-knockout* Mäusen auch in höherem Maße als bei den Wildtypmäusen an.

Aufgrund der veränderten Organisation der extrazellulären Matrix 21 Tage nach MI lässt sich auch eine verschlechterte Relaxation ( $dP/dt_{min}$ ) im Vergleich zum Wildtyp nachweisen, wogegen TAU hier nicht wesentlich verändert erscheint (im Vergleich zum infarzierten Wildtypen).

## 5.10. Mortalität nach experimentellem Myokardinfarkt

Die unterschiedliche Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt ist eines der einfachsten und auch effektivsten Kriterien zur Beurteilung eines deletionsbedingten Unterschiedes im kardialen ‚Remodelling‘, vorausgesetzt, dass sämtliche Konditionen für die Versuchsgruppen gleich sind. Dies wurde insofern gewährleistet, dass die männlichen Wildtypen und *bgn-knockout* Tiere in gemischten Gruppen in den Käfigen gehalten wurden. Die Aufteilung in die entsprechenden Gruppen erfolgte erst zur Auswertung der hämodynamischen Daten. Die Identifizierung in Wildtyp bzw. *Knockout* war anhand der Ohrmarken und der Tabellen mit den entsprechenden Genotypisierungsergebnissen möglich.

Lediglich für die nachzuoperierenden Tiere wurden dann gezielt *bgn-knockout* Mäuse herausgesucht.

Die Mortalitätsrate der *Biglykan*-defizienten Mäuse ist erheblich erhöht, wobei der Anteil rupturierter Herzen in dieser Gruppe ebenfalls signifikant erhöht war. Die Rupturstelle lag meist in der Infarkt Narbe selber, oder am Übergang in die Grenzregion zum restlichen Ventrikelgewebe. Ursache dessen ist die Tatsache, dass es sich bei der Infarkt Narbe zwar um ein relativ stabiles Narbengewebe handelt, dieses aber sehr dünn ausfällt und relativ unelastisch ist, was bei einer Beanspruchung von über 400 Herzaktionen in der Minute zu Gewebsermüdung und Rissen führen kann.

### 5.11. Bestehen Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und *Biglykan*-defizienten Mäusen im kardialen ‚Remodelling‘ nach einem Myokardinfarkt ?

Wenn man die Datenlage der verschiedenen Untersuchungen bis zu 21 Tage nach dem experimentellen Myokardinfarkt zusammenfasst, lässt sich diese Frage eindeutig mit JA beantworten. Bedingt durch die Deletion des für *Biglykan* codierenden Gens kommt es zu signifikanten Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene. Im Fokus standen dabei Faktoren, die, wie auch *Biglykan*, entweder Bestandteil der extrazellulären Matrix sind, oder in der Lage sind die Organisation der EZM zu beeinflussen.

Resultat der unterschiedlichen mRNA-Expressionen sind morphologische Veränderungen des kardialen Gewebes auf Ebene der extrazellulären Matrix. Dies hat für die *Biglykan*-defizienten Mäuse gravierende funktionelle Konsequenzen, insbesondere im Bereich diastolischen Herzfunktion. Die Überlebensrate der *Biglykan-Knockouts* ist nach einem Myokardinfarkt, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant reduziert.

Insgesamt lässt sich die Aussage ableiten, dass die Deletion des *Biglykans* einen kardialen Phänotyp verursacht und *Biglykan* auch im kardialen ‚Remodelling‘-Prozess eine essentielle Rolle spielt.

Auf welche Art und Weise dies im Einzelnen geschieht, insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, muss Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Untersuchungen sein.

## 6. Quellenangaben

- 1 Wight TN, Heinegard DK, Hascall HV: Cell Biology of Extracellular Matrix, Second Edition, *Plenum Press*, New York, 1991
- 2 Franke, R.P., Die extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion, *Hartmann Wundforum* 3/95, S. 21-24.
- 3 Wight TN: The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995, 6:326-34.
- 4 Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: Degradation of small leucine-rich repeat Proteoglykans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglykan cleavage site. *Arthritis Res Ther* 2006, 8:R26.
- 5 Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, Knuutila S: Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. *Cancer Genet Cytogenet* 2005, 156:104-13.
- 6 Weber KT: A whisper on the wind spawns a storm. *Cardiovasc Res* 2000, 46:211-3.
- 7 Laurent GJ: Dynamic state of Kollagen: pathways of Kollagen degradation in vivo and their possible role in regulation of Kollagen mass. *Am J Physiol* 1987, 252:C1-9.
- 8 Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, Samuel JL: Extracellular matrix and cardiac remodelling. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2002, 95:1226-9.
- 9 Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D: A Kollagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial Proteoglykans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *Embo J* 1989, 8:2601-4.
- 10 Iozzo RV: The biology of the small leucine-rich Proteoglykans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 1999, 274:18843-6.
- 11 Fisher LW, Termine JD, Young MF: Deduced protein sequence of bone small Proteoglykan I (biglykan) shows homology with Proteoglykan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 1989, 264:4571-6.

- 12 Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG: Expression and localization of the two small Proteoglykans biglykan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 1990, 38:1549-63.
- 13 Vuillermoz B, Wegrowski Y, Contet-Audonneau JL, Danoux L, Pauly G, Maquart FX: Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich Proteoglykans production by skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2005, 277:63-72.
- 14 Jarvelainen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandell LJ: Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate Proteoglykans, PG-I/biglykan and PG-II/decorin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 1991, 266:23274-81.
- 15 Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ: The matrix component biglykan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005, 115:2223-33.
- 16 Cheng F, Heinegard D, Malmstrom A, Schmidtchen A, Yoshida K, Fransson LA: Patterns of uronosyl epimerization and 4-/6-O-sulphation in chondroitin/dermatan sulphate from decorin and biglykan of various bovine tissues. *Glycobiology* 1994, 4:685-96.
- 17 Theocharis AD, Karamanos NK: Decreased biglykan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 2002, 165:221-30.
- 18 Hausser H, Ober B, Quentin-Hoffmann E, Schmidt B, Kresse H: Endocytosis of different members of the small chondroitin/dermatan sulfate Proteoglykan family. *J Biol Chem* 1992, 267:11559-64.
- 19 Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H: Smad4/DPC4-dependent regulation of biglykan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem* 2002, 277:36118-28.

- 
- 20 Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV: Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1998, 101:406-12.
- 21 Chang MY, Potter-Perigo S, Tsoi C, Chait A, Wight TN: Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell Proteoglykans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties. *J Biol Chem* 2000, 275:4766-73.
- 22 Santiago-Garcia J, Kodama T, Pitas RE: The class A scavenger receptor binds to Proteoglykans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2003, 278:6942-6.
- 23 Takahashi T, Cho HI, Kublin CL, Cintron C: Keratan sulfate and dermatan sulfate Proteoglykans associate with type VI Kollagen in fetal rabbit cornea. *J Histochem Cytochem* 1993, 41:1447-57.
- 24 Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, Timpl R, Morgelin M: Biglykan organizes Kollagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem* 2002, 277:49120-6.
- 25 Pogany G, Hernandez DJ, Vogel KG: The in vitro interaction of Proteoglykans with type I Kollagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys* 1994, 313:102-11.
- 26 Alimohamad H, Habijanac T, Larjava H, Hakkinen L: Colocalization of the Kollagen-binding Proteoglykans decorin, biglykan, fibromodulin and lumican with different cells in human gingiva. *J Periodontal Res* 2005, 40:73-86.
- 27 Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H: Fibrillogenesis of Kollagen types I, II, and III with small leucine-rich Proteoglykans decorin and biglykan. *Biomacromolecules* 2006, 7:2388-93.
- 28 Westergren-Thorsson G, Hernnas J, Sarnstrand B, Oldberg A, Heinegard D, Malmstrom A: Altered expression of small Proteoglykans, Kollagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Clin Invest* 1993, 92:632-7.

- 29 Hunzelmann N, Anders S, Sollberg S, Schonherr E, Krieg T: Co-ordinate induction of Kollagen type I and biglykan expression in keloids. *Br J Dermatol* 1996, 135:394-9.
- 30 Suzuki K, Wang R, Kubota H, Shibuya H, Saegusa J, Sato T: Kinetics of biglykan, decorin and thrombospondin-1 in mercuric chloride-induced renal tubulointerstitial fibrosis. *Exp Mol Pathol* 2005, 79:68-73.
- 31 Walker-Caprioglio HM, Koob TJ, McGuffee LJ: Proteoglykan synthesis in normotensive and spontaneously hypertensive rat arteries in vitro. *Matrix* 1992, 12:308-20.
- 32 WHO- Report 2002: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>
- 33 Statist. Bundesamt : Anzahl verstorbener Personen im Jahr 2005 gemäß ICD-10 <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab19.php>
- 34 Muller JE: Diagnosis of myocardial infarction: historical notes from the Soviet Union and the United States. *Am J Cardiol* 1977, 40:269-71.
- 35 Sarmiento-Leite R, Krepsky AM, Gottschall CA: Acute myocardial infarction. One century of history. *Arq Bras Cardiol* 2001, 77:593-610.
- 36 Berliner Herzinfarktregister:  
<http://www.herzinfarktregister.de/verein/presse.htm#Pressemitteilung%20Herzstiftung>
- 37 Assmann G, Schulte H, Cullen P: New and classical risk factors--the Munster heart study (PROCAM). *Eur J Med Res* 1997, 2:237-42.
- 38 Middlekauff HR: Mechanisms and implications of autonomic nervous system dysfunction in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1997, 12:265-75.
- 39 Shan K, Kurrelmeyer K, Seta Y, Wang F, Dibbs Z, Deswal A, Lee-Jackson D, Mann DL: The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1997, 12:218-23.
- 40 Brilla CG, Maisch B, Zhou G, Weber KT: Hormonal regulation of cardiac fibroblast function. *Eur Heart J* 1995, 16 Suppl C:45-50.

- 
- 41 Weber KT: Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension* 2001, 38:588-91.
- 42 Sun Y, Weber KT: Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000, 46:250-6.
- 43 Cleutjens JP, Creemers EE: Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 2002, 8:S344-8.
- 44 Schonherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H: Interaction of biglykan with type I Kollagen. *J Biol Chem* 1995, 270:2776-83.
- 45 Yamamoto K, Kusachi S, Ninomiya Y, Murakami M, Doi M, Takeda K, Shinji T, Higashi T, Koide N, Tsuji T: Increase in the expression of biglykan mRNA expression Co-localized closely with that of type I Kollagen mRNA in the infarct zone after experimentally-induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30:1749-56.
- 46 Doi M, Kusachi S, Murakami T, Ninomiya Y, Murakami M, Nakahama M, Takeda K, Komatsubara I, Naito I, Tsuji T: Time-dependent changes of decorin in the infarct zone after experimentally induced myocardial infarction in rats: comparison with biglykan. *Pathol Res Pract* 2000, 196:23-33.
- 47 Figueroa JE, Vijayagopal P: Angiotensin II stimulates synthesis of vascular smooth muscle cell Proteoglykans with enhanced low density lipoprotein binding properties. *Atherosclerosis* 2002, 162:261-8.
- 48 Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Mifune M, Nakaya H, Kuroda M, Hayashi M, Saruta T: Regulation of vascular Proteoglykan synthesis by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12:2609-15.
- 49 Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Andersen GG, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H: Induction of myocardial biglykan in heart failure in rats--an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism. *Cardiovasc Res* 2003, 60:557-68.

- 50 Tiede K, Stoter K, Petrik C, Chen WB, Ungefroren H, Kruse ML, Stoll M, Unger T, Fischer JW: Angiotensin II AT(1)-receptor induces biglykan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGFbeta in vitro. *Cardiovasc Res* 2003, 60:538-46.
- 51 Heimer R, Bashey RI, Kyle J, Jimenez SA: TGF-beta modulates the synthesis of Proteoglykans by myocardial fibroblasts in culture. *J Mol Cell Cardiol* 1995, 27:2191-8.
- 52 Diez C, Nestler M, Friedrich U, Vieth M, Stolte M, Hu K, Hoppe J, Simm A: Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2001, 49:731-40.
- 53 Feldmann M: Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:364-71.
- 54 Ramasamy S, Lipke DW, McClain CJ, Hennig B: Tumor necrosis factor reduces Proteoglykan synthesis in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1995, 162:119-26.
- 55 Tufvesson E, Westergren-Thorsson G: Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglykan and decorin. *FEBS Lett* 2002, 530:124-8.
- 56 Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG: Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 2002, 55:329-40.
- 57 Tufvesson E, Westergren-Thorsson G: Alteration of Proteoglykan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem* 2000, 77:298-309.
- 58 Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF: Targeted disruption of the biglykan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 1998, 20:78-82.
- 59 Ameye L, Aria D, Jepsen K, Oldberg A, Xu T, Young MF: Abnormal Kollagen fibrils in tendons of biglykan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *Faseb J* 2002, 16:673-80.

- 60 Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD: Biglykan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconj J* 2002, 19:257-62.
- 61 Dominiak P. und Unger Th., AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten / Angiotensin II , Steinkopff-Darmstadt, 2. Auflage 1999
- 62 de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T: International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000, 52:415-72.
- 63 Steendijk P, Staal E, Jukema JW, Baan J: Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281:H755-63.
- 64 Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G: Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res* 1986, 58:26-37.
- 65 Wei S, Chow LT, Shum IO, Qin L, Sanderson JE: Left and right ventricular Kollagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction. *J Card Fail* 1999, 5:117-26.
- 66 Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie (Bd.2), Verlag Urban & Fischer 2004
- 67 Ameye L, Young MF: Mice deficient in small leucine-rich Proteoglykans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 2002, 12:107R-16R.
- 68 Kahari VM, Larjava H, Uitto J: Differential regulation of extracellular matrix Proteoglykan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglykan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 1991, 266:10608-15.
- 69 Kolb M, Margetts PJ, Sime PJ, Gauldie J: Proteoglykans decorin and biglykan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 280:L1327-34.

- 70 Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B: Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984, 70:812-23.
- 71 Baan J, Jong TT, Kerkhof PL, Moene RJ, van Dijk AD, van der Velde ET, Koops J: Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter. *Cardiovasc Res* 1981, 15:328-34.
- 72 Baan J, van der Velde ET, Steendijk P: Ventricular pressure-volume relations in vivo. *Eur Heart J* 1992, 13 Suppl E:2-6.
- 73 Feldman MD, Erikson JM, Mao Y, Korcarz CE, Lang RM, Freeman GL: Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, 279:H1698-707.
- 74 Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, Byrne BJ, Millar HD, Hare JM, Kass DA: In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol* 1998, 274:H1416-22.
- 75 Kass DA, Midei M, Graves W, Brinker JA, Maughan WL: Use of a conductance (volume) catheter and transient inferior vena caval occlusion for rapid determination of pressure-volume relationships in man. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1988, 15:192-202.
- 76 Wallace A, Lam HW, Mangano DT: Linearity, load dependence, hysteresis, and clinical associations of systolic and diastolic indices of left ventricular function in man. Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group. *J Card Surg* 1995, 10:460-7
- 77 Wang Q, Brunner HR, Burnier M: Determination of cardiac contractility in awake unsedated mice with a fluid-filled catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 286:H806-14.
- 78 Wodey E, Chonow L, Beneux X, Azzis O, Bansard JY, Ecoffey C: Haemodynamic effects of propofol vs thiopental in infants: an echocardiographic study. *Br J Anaesth* 1999, 82:516-20.

- 79 Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL: Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 287:H1618-24.
- 80 Kass DA, Bronzwaer JG, Paulus WJ: What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ Res* 2004, 94:1533-42.
- 81 Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH: Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med* 2004, 350:1953-9.
- 82 Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Nishikawa N, Mano T, Yoshida J, Miwa T, Sugawara M, Yamaguchi Y, Ookawara T, Suzuki K, Hori M: Myocardial stiffness is determined by ventricular fibrosis, but not by compensatory or excessive hypertrophy in hypertensive heart. *Cardiovasc Res* 2002, 55:76-82.
- 83 Cingolani OH, Yang XP, Cavaasin MA, Carretero OA: Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003, 41:249-54.
- 84 Zile MR, Brutsaert DL: New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* 2002, 105:1503-8.
- 85 Zile MR, Brutsaert DL: New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part I: diagnosis, prognosis, and measurements of diastolic function. *Circulation* 2002, 105:1387-93.
- 86 Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA: Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 2002, 87:547-55.

## Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zählen nach Erhebungen der Weltgesundheitsorganisation zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen. Trotz verbesserter Früherkennung von Risikofaktoren, Prophylaxe und Therapiemöglichkeiten nimmt der linksventrikuläre Myokardinfarkt hierbei eine führende Stellung ein.

Das nach einem Herzinfarkt im ischämischen Bereich entstehende Narbengewebe führt zusammen mit einer vermehrten generellen Fibrosierung des Herzens zu einer weiteren Leistungsinsuffizienz, welche nur durch vermehrte Herzarbeit kompensiert werden kann. Unbehandelt gerät das Herz-Kreislaufsystem hierbei schnell in einen *circulus vitiosus*, welcher den Tod zur Folge haben kann.

Das Gewebe der Infarktnarbe wird, unter Einflussnahme von Angiotensin II und Zytokinen (z.B. Tgf-beta1), von Komponenten der extrazellulären Matrix gebildet, welche auch für die vermehrte interstitielle Fibrosierung des restlichen kardialen Gewebes verantwortlich sind.

Eine dieser Komponenten ist das kleine leucinreiche Proteoglykan Biglykan, welches im Bereich der extrazellulären Matrix eine modulierende Funktion zu besitzen scheint. Biglykan mRNA wird nach einem Myokardinfarkt im Infarktgebiet, aber auch im restlichen kardialen Gewebe, wie z.B. im Septum, vermehrt exprimiert. Dieser Nachweis konnte auch für den Proteinanteil erbracht werden (46) (49). Bislang ist jedoch nicht bekannt, welche Rolle Biglykan im kardialen ‚Remodelling‘-Prozess nach einem Myokardinfarkt spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines *Knockout*-Mausmodells, zu klären, ob durch das Fehlen des Biglykans ein kardialer Phänotyp festzustellen ist und ob dieses Proteoglykan eine wichtige Rolle im kardialen ‚Remodelling‘-Prozess nach einem (experimentellem) Myokardinfarkt spielt.

Gesunde Biglykan-defiziente Mäuse besitzen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf histologischer, molekularbiologischer und funktioneller Ebene einen kardialen Phänotyp.

Das Herzgewicht fällt in Relation zum Körpergewicht bei einer gleichzeitig verringerten interstitiellen kardialen Fibrosierung in den genmutierten Mäusen geringer aus. Im hämodynamischen Bereich lässt sich ein Phänotyp in der diastolischen Funktion feststellen. Die intrinsische Steifigkeit des linken Ventrikels ist deutlich erniedrigt, bei einer Tendenz zu erhöhter Relaxationsfähigkeit. Der kardiale mRNA-Gehalt an Kollagen I und Tgf-beta1 fällt im Vergleich zu den Kontrollgruppen geringer aus, während der von Kollagen III und Decorin erhöht ist.

21 Tage nach einem Myokardinfarkt sind bei den Biglykan-defizienten Mäusen und bei den Tieren der Wildtyp-Kontrollgruppen gravierende Umbauprozesse feststellbar. Es kommt zu einer dilatativen Kardiomyopathie, welche bei den genmutierten Mäusen ausgeprägter ist. Hier lässt sich, im Vergleich zu Wildtypmäusen, eine erhöhte Dilatation des linken Ventrikels feststellen, welche im Bereich der systolischen Herzfunktion zu einem leicht erniedrigten

linksventrikulären Druck, einer schlechteren Kontraktilität und insgesamt deutlich geringeren Werten aller Parameter der Auswurfleistung des linken Ventrikels führt. Dilatationsbedingt sind die Endvolumina in Systole und Diastole erhöht. Aufgrund der schlechteren Auswurfleistung kommt es zu einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, bei gleichzeitig reduzierter Relaxationsfähigkeit des linken Herzens. Die Ursache der insgesamt deutlich schlechteren Herzfunktion, insbesondere nach einem Myokardinfarkt, liegt darin begründet, dass es aufgrund des Fehlens des modulierenden Biglykans zu einer veränderten Organisation der extrazellulären Matrix kommt, was molekularbiologisch und histologisch nachgewiesen werden konnte und eine Bestätigung beim Messen funktioneller Herzparameter (Hämodynamik) erfuhr. Die Bedeutung des Biglykans für den Reparaturprozess am Herzen wird insbesondere bei der Betrachtung der deutlich erhöhten Mortalitätsraten nach Myokardinfarkt offensichtlich.

Die Aufklärung der komplexen Zusammenhänge, insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, ist das Ziel weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

## Summary

### **„Effects of *biglycan* – deletion on the cardiac remodelling process after experimental myocardial infarction“**

According to research conducted by the World Health Organisation (WHO), cardiovascular diseases rank among the main causes of mortality in Western industrialised nations. Despite an improvement in the early recognition of risk factors, prophylaxis, and available therapies, the left-ventricular myocardial infarction assumes here a dominant role.

Scar tissue resulting from a heart attack in the ischaemic region, together with an increased fibrosis of the heart, leads to heart failure. When left untreated, the circulatory system quickly gets into a fatal vicious circle.

The scar tissue, influenced by angiotensin II and other cytokines (e.g. Tgf-beta 1), is formed by components of the extracellular matrix, which are responsible for the increased interstitial fibrosis of the remaining cardiac tissue. One of these components is the small leucine-rich proteoglycan biglycan, which appears to have a modulating function in the extracellular matrix region. After a heart attack, biglycan mRNA and protein are more present in the infarct area but also in the remaining cardiac tissue. The role of biglycan in the cardiac remodelling process following a heart attack remains unknown.

The aim of this study, by means of a knockout mouse model, was to clarify whether a cardiac phenotype can be determined through the absence of biglycan and whether this proteoglycan plays an important role in the cardiac remodelling process after an (experimental) myocardial infarction.

Biglycan-deficient mice possess a cardiac phenotype on histological, molecular-biological and functional levels. In these mice, heart weight drops to a lower level in relation to body weight with a simultaneous and reduced interstitial cardiac fibrosis. Moreover, the intrinsic stiffness of the left ventricle is reduced with a parallel increase of left ventricular relaxation. There is a decrease in cardiac mRNA levels of collagen I and TGF-beta1 and an increase of collagen III and decorin mRNA. Twenty-one days after myocardial infarction, biglycan-deficient mice develop a more severe dilatative cardiomyopathy in comparison to wildtype control mice. This decrease of cardiac function in mice lacking biglycan is caused by an alteration of the organization of the extracellular matrix which has been demonstrated by molecularbiological and histological approaches. The significance of biglycan in cardiac remodelling is underlined by the increased mortality of knockout mice after myocardial infarction. Nevertheless, the molecular actions of biglycan within the extracellular matrix of the heart remain largely unknown and have to be subjected to further scientific studies.

## Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildung inklusive Promotion jederzeit unterstützt haben.

Ferner geht mein Dank an meinen Betreuer Univ. Prof. Jens W. Fischer sowie an Univ. Prof. Thomas Unger und seine gesamte Arbeitsgruppe für die gute Betreuung und Schaffung der guten Rahmenbedingungen.

Bei der Arbeitsgruppe um PD. Dr. med. Carsten Tschöpe, insbesondere bei Dr. Dirk Westermann, möchte ich ganz besonders für die exzellente Kooperation bedanken.

Bei der Deutschen Forschungs Gemeinschaft bedanke ich mich für die Stiftung des Stipendiums und die Unterstützung des Graduiertenkollegs 754 „Myokardhypertrophie“, in das dieses Promotionsvorhaben eingegliedert war. Frau Univ. Prof. Vera Regitz-Zagrosek danke ich für Initiierung und Leitung o.g. Graduiertenkollegs.

Christian Neumann und Jan Scheffe danke ich für die gemeinsamen Jahre in der AG Unger, für die stetige Hilfsbereitschaft in allen fachlichen und privaten Belangen und für viele schöne gemeinsame Stunden auch außerhalb der Wissenschaft. Ahoi !

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 01.01.2008

Christian Petrik

## Publikationen

“Angiotensin II AT1-receptor induces biglykan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGF- $\beta$  in vitro”

Karen Tiede, Katrin Stöter, Christian Petrik, Wen-Bin Chen, Hendrik Ungefroren, Marie-Luise Kruse, Monika Stoll, Thomas Unger, Jens W. Fischer,  
Cardiovascular Research 60 (2003) 538– 546

”Effects of Biglykan deletion on the composition of the myocardial extracellular matrix ”

Christian Petrik, Thomas Unger, Jens W. Fischer, Posterbeitrag,  
Abschlußsymposium des Graduiertenkollegs “Myokardhypertrophie”, Berlin 09/2004

“Increased left ventricular dilatation and mortality in biglykane knockout mice after induction of myocardial infarction”

Westermann D, Petrik C, Young MF, Unger Th, Tschöpe C, Fischer JW, Posterbeitrag  
Heart Failure, European Society of Cardiology (ESC), Lissabon 06/2005

“Biglykan is required for adaptive remodelling after myocardial infarction”

Westermann D, Mersmann, J., Petrik C, Lüllmann- Rauch R., Young MF, Levkau B, Babba H., Unger Th, Zacharowski K., Tschöpe C, Fischer JW, Präsentation (Fischer JW)  
International meeting of the American Heart Association, Chicago 11/2006

“Biglykan is required for adaptive remodelling after myocardial infarction”

Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L,  
Lüllmann-Rauch R, Lettau O, Jacoby C, Schrader J, Brand-Herrman SM, Young MF,  
Schultheiss HP, Levkau B, Baba HA, Unger Th, Zacharowski K, Tschöpe C, Fischer JW,  
Circulation, 2008 Mar 11;117(10):1269-76.