Kardiale Expression der Proteoglykane Biglykan und Decorin: Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten neonataler Ratten und an infarzierten Herzen adulter Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Karen Tiede
aus Schönberg

Kiel 2002

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

(Dekan)

Abbildungsverzeichnis ..... *V*

Abkürzungsverzeichnis ..... *VIII*

1 Einleitung *1*

1.1 Myokardinfarkt **1**

1.2 Renin-Angiotensin-System (RAS) **2**

1.3 Extrazelluläre Matrix **3**

1.4 Myokardinfarkt und extrazelluläre Matrix **7**

1.5 Fragestellung **9**

2 Methoden *11*

2.1 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt an Ratten **11**

2.1.1 Histochemie und Immunhistochemie 12

2.1.1.1 Histochemie (Movats-Pentachrom-Färbung) 12

2.1.1.2 Immunhistochemie 13

2.1.2 Präparation der Gesamt-RNA aus Gewebe 15

2.2 Analyse der EZM-Expression an kultivierten kardialen Fibroblasten **16**

2.2.1 Zellkultur 16

2.2.1.1 Primärkultur kardialer Fibroblasten der neugeborenen Ratte 16

2.2.1.2 Subkultivierung 18

2.2.1.3 Zellcharakterisierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie 18

2.2.2 Durchführung der Experimente 19

2.2.2.1 Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen 20

2.2.2.2 Stimulation mit Angiotensin II 20

2.2.2.3 Stimulation mit Stickstoffmonoxid freisetzenden Substanzen 21

2.2.2.4 Metabolische Markierung der Proteoglykane durch Radiosulfat 21

2.2.3 Analytische Methoden 22

2.2.3.1 TGF-ß1-ELISA 22

2.2.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität ... 22

2.2.3.3 Ermittlung der Zellzahl ... 23

2.2.4 Untersuchung der sezernierten Proteoglykane ... 23

2.2.4.1 Quantifizierung der Proteoglykansekretion mittels Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation (CPC) ... 23

2.2.4.2 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie ... 24

2.2.4.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der Proteoglykane mit nachfolgend durchgeführtem Western-Blot-Verfahren ... 24

2.2.4.4 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der radioaktiv markierten Proteoglykane ... 26

2.2.4.5 Gel-Filtrations-Chromatographie ... 27

2.2.4.6 Glykosaminoglykan-Analyse ... 27

2.2.5 Präparation der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen ... 28

2.3 Untersuchung der Proteoglykan-mRNA-Expression ... 29

2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA ... 29

2.3.2 Transfer der Gesamt-RNA auf Nylonmembran ... 29

2.3.3 Spezifischer Nachweis von Proteoglykan-mRNA ... 30

2.3.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ... 31

2.3.4.1 RT-PCR zur Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt in Ratten ... 31

2.3.4.2 RT-PCR zur Charakterisierung der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen 1 und 2 von kultivierten kardialen Fibroblasten ... 33

2.4 Statistische Auswertung ... 34

3 Ergebnisse ... 35

3.1 Analyse der EZM-Expression an kultivierten kardialen Fibroblasten ... 35

3.1.1 Charakterisierung der Zellen ... 35

3.1.1.1 Immunfluoreszenz ... 35

3.1.1.2 Proteoglykane ... 36

3.1.2 Beeinflussung der Proteoglykan-Sekretion und -Expression ... 39

3.1.2.1 Wachstumsfaktoren und Zytokine ... 39

3.1.2.2 Stickstoffmonoxid ... 44

3.1.2.3 Angiotensin II 55

3.2 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt der Ratten 63

3.2.1 Histologie und Immunhistologie 63

3.2.1.1 Histologie 63

3.2.1.2 Immunhistologie 66

3.2.2 Zeitverläufe der mRNA-Expression nach Myokardinfarkt 66

3.2.3 Einfluss von ACE-Inhibitoren und AT1-Antagonisten auf die Proteoglykan-Expression nach MI an Ratten 71

4 Diskussion 76

4.1 Betrachtungen der verwendeten Methoden: zur Homogenität der Zellkultur und zum Sulfateinbau 76

4.1.1 Reinheit der Kultur 76

4.1.2 Radioaktive Markierung der Proteoglykane 77

4.2 Regulation der Proteoglykan-Sekretion und -Expression durch Wachstumsfaktoren und Zytokine 77

4.2.1 PDGF BB, TGF-ß1 80

4.2.2 TNF-alpha, IL-1ß 82

4.2.3 Thrombin 85

4.2.4 Stickstoffmonoxid 86

4.2.5 Angiotensin II 89

4.3 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt der Ratten 92

4.3.1 Charakterisierung von EZM-Molekülen nach Myokardinfarkt 92

4.3.2 Arzneistoff-Behandlung 94

4.4 Ausblick 97

5 Zusammenfassung 98

6 Summary 100

7 Literaturverzeichnis 102

8 Anhang 116

8.1 Bezugsnachweis der verwendeten Materialien 116

8.1.1 Zellkultur 116

8.1.2 Antikörper 117

8.1.3 Feinchemikalien 118

8.1.4 Verbrauchsmaterialien 120

8.2 Lösungen 121

8.2.1 Färbungen 122

8.2.1.1 Gewebe-Färbungen 122

8.2.1.2 Zell-Färbungen 123

8.2.2 Zellkultur 123

8.2.3 Proteoglykan-Analyse 125

8.2.3.1 Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation 125

8.2.3.2 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie 125

8.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 126

8.2.3.4 Gel-Filtrations-Chromatographie 127

8.2.4 RNA-Analyse 128

8.2.4.1 Extraktion der Gesamt-RNA 128

8.2.4.2 Gel-Elektrophorese der Gesamt-RNA 129

8.2.4.3 RT-PCR 130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Struktur des Chondroitinsulfat	4
Abbildung 2	Schematischer Aufbau von Decorin und Biglykan	6
Abbildung 3	Immunfluoreszenz zur Zellcharakterisierung	36
Abbildung 4	Nachweis der mRNA von Biglykan und Decorin mittels Northern-Blot	37
Abbildung 5	Nachweis der Proteoglykane Biglykan und Decorin mittels Western-Blot	38
Abbildung 6	Nachweis der Expression von Biglykan mittels SDS-PA-Gradienten-Gel	39
Abbildung 7	Wachstumsfaktoren und Zytokine steigern die Sekretion von metabolisch markierten Proteoglykanen	40
Abbildung 8	Induktion der Biglykan-Sekretion durch PDGF BB	40
Abbildung 9	Induktion der Proteoglykan-Sekretion durch Wachstumsfaktoren und Zytokine	41
Abbildung 10	PDGF BB steigert konzentrationsabhängig die Sekretion der Proteoglykane	42
Abbildung 11 A, B	TGF-ß1 und Thrombin steigern konzentrationsabhängig die Sekretion der Proteoglykane	43
Abbildung 12	Synergistische Stimulation der Sekretion von Proteoglykanen durch TNF-alpha und PDGF BB	44
Abbildung 13	Hemmung der Proteoglykan-Sekretion durch NO	45
Abbildung 14	Hemmung der Proteoglykan-Sekretion durch NO unter Berücksichtigung der Zellzahl	46
Abbildung 15	Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der Proteoglykan-Sekretion durch NO	47
Abbildung 16	Reduktion der Proteoglykan-Sekretion durch NO-Donoren mit kurzer t½ der NO-Freisetzung	48
Abbildung 17	DETA-NONOate und SNAP reduzieren die Biglykan-mRNA-Expression	50
Abbildung 18	DETA-NONOate hemmt die Sekretion des Biglykan-Proteoglykans	51
Abbildung 19	DETA-NONOate und SNAP erhöhen das Molekulargewicht des Biglykan-Proteoglykans	52
Abbildung 20	Gel-Filtrations-Chromatographie von sezernierten Proteoglykanen	53
Abbildung 21	DETA-NONOate erhöht das Molekulargewicht der GAG-Ketten des Biglykan-Proteoglykans	54
Abbildung 22	Kardiale Fibroblasten aus Herzen neonataler Ratten exprimieren sowohl den AT1-, als auch den AT2-Rezeptor	55

Abbildung 23 A, B Angiotensin II stimuliert die Sekretion von Proteoglykanen 56

Abbildung 24 AT1-Rezeptorantagonist Losartan hemmt die Angiotensin II-vermittelte Induktion der Proteoglykan-Sekretion..... 57

Abbildung 25 AT1-Rezeptorantagonist Losartan hemmt die Angiotensin II-vermittelte Induktion der Biglykan-mRNA-Expression..... 59

Abbildung 26 Neutralisierende Anti-TGF-ß1, -2, -3-Antikörper hemmen die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Proteoglykan-Sekretion 60

Abbildung 27 Neutralisierende Anti-PDGF- oder Anti-bFGF-Antikörper vermögen die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Proteoglykan-Sekretion nicht zu hemmen 61

Abbildung 28 TGF-ß1-Konzentration im Kulturmedium nach Angiotensin II-Stimulation via AT1-Rezeptor signifikant erhöht 62

Abbildung 29 Akkumulation von EZM-Molekülen nach MI..... 65

Abbildung 30 Vergleich der Lokalisation von Decorin und Biglykan zu Makrophagen und glatten Muskelzellen..... 65

Abbildung 31 Zeitgang der mRNA-Expression von Decorin, Biglykan und Collagen-Typ I nach MI 67

Abbildung 32 Decorin-mRNA-Expression erreicht 5 bis 7 Tage nach MI ein Maximum im Infarktgebiet des Rattenherzens 68

Abbildung 33 Zeitverlauf der Decorin-mRNA-Expression in rechtem Ventrikel, Septum und Randgebiet des infarzierten Rattenherzens..... 70

Abbildung 34 Decorin-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan 72

Abbildung 35 Biglykan-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan 73

Abbildung 36 Collagen-Typ I-alpha-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan 74

Abbildung 37 Decorin-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Ramipril 75

Abbildung 38 Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege der verwendeten Reize 79

Abbildung 39 Übersicht über die pharmakologischen Angriffspunkte im RAS 95

Abkürzungsverzeichnis

αSMA	alpha Glattmuskelaktin
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
Ang II	Angiotensin II
AT1/AT2-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1/2
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CPC	Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation
CS	Chondroitinsulfat
DAB	Diaminobenzidin
DEAE	Diethylaminoethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA-NONOate	(Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonio-ethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate
DMEM	*Dulbecco´s modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Deoxynukleosid-5´-triphosphat
DS	Dermatansulfat
GAG	Glykosaminoglykan(e)
GC	Guanylatzyklase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
ET-1	Endothelin 1
EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanosintriphosphat (z.B. G-Protein)

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin (z.B. IgG)
IL	Interleukin (z.B. IL-1ß)
K_D	scheinbare Verteilungskoeffizient
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MAPKK	MAPK-*kinase*
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	*messenger* RNA
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAPA-NONOate	(Z)-1-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor Typ 1
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	*platelet derived growth factor*
PG	Proteoglykan(e)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
post MI	nach Myokardinfarkt
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
sarkAkt	sarkomeres Aktin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine

S ..... Svedberg Einheiten
TGF-ß1 ..... *transforming growth factor beta-1*
TNF-alpha ..... *tumor necrosis factor alpha*
VSMC ..... glatte Gefäßmuskelzellen
WKY ..... Wistar-Kyoto-Ratte(n)

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

Bereits 1912 wurde der akute Myokardinfarkt (MI) in seinem klinischen Erscheinungsbild beschrieben. Doch erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurde man gewahr, dass dieses Ereignis die häufigste Todesursache (Erhebungen in den Vereinigten Staaten von Nord-Amerika) darstellte. Eine aufwändige und zeitlich immer früher angewandte Therapie führte zu einer dramatischen Abnahme der Mortalität nach MI. Die therapeutischen Optionen wurden durch intensive Forschungen zum Verständnis der elektrophysiologischen Vorgänge im Herzen und der Regulation des Blutdrucks wie auch die Entwicklung neuer pharmakologischer Wirkstoffe stetig erweitert. Die Identifikation von Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit wie z.B. der Bluthochdruck und entsprechend die antihypertensive Therapie gewann an Bedeutung und konnte die Inzidenz des MI weiter senken (1).

Im Jahr 1990 waren die kardiovaskulären Erkrankungen weltweit mit 29 % aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache. Einer Schätzung von Murray et al. (2) zufolge werden sie im Jahre 2020 mit mehr als 36 % die häufigste aller Todesursachen darstellen. Diese Zunahme stellt aber nicht die Effektivität der Maßnahmen zu Prophylaxe und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen in Frage, sondern sie spiegelt die Effizienz der Therapie anderer häufig zum Tode führender Erkrankungen und die enormen Verschiebungen des Altersaufbaus der Bevölkerung mit der daraus resultierenden drastischen Steigerung kardiovaskulärer Komplikationen wider.

Bislang standen im Fokus Maßnahmen zur Senkung des Risikos einer Thrombose, überhöhter Blutfettwerte und eines hohen Blutdrucks. Derzeit stehen keine prophylaktischen und therapeutischen Strategien zur Verfügung, welche die das ganze Herz betreffende Fibrosierung des Myokards vermindern könnten. Die Fibrosierung, die u.a. durch die Ablagerung von Collagen hervorgerufen wird, und die Hypertrophie des Myokards haben eine Minderperfusion zur Folge. Der lokale Sauerstoff- und Nährstoffmangel verringert die Leistungsfähigkeit des Herzens. Zur Kompensation der Leistungseinschränkung, die mit einer Mangeldurchblutung lebenswichtiger Organe einhergeht, wird auf der einen Seite das sympathische Nervensystem (3),

auf der anderen Seite das Renin-Angiotensin-System (RAS) (4) aktiviert. Diese Aktivierungen lösen eine periphere Vasokonstriktion und Flüssigkeitsretention aus, wodurch der in seiner Leistung ohnehin schon beeinträchtigte Herzmuskel gegen einen noch höheren peripheren Widerstand anarbeiten muss. Ein *circulus vitiosus* entwickelt sich, der letztendlich in einer chronischen Herzinsuffizienz enden kann.

1.2 Renin-Angiotensin-System (RAS)

Das RAS stellt ein klassisches endokrines Hormonsystem dar, dem sich Mitte der neunziger Jahre Erkenntnisse über ein Gewebe-RAS zur Seite stellten.

Am Anfang der Enzymkaskade des RAS steht das Gewebshormon Renin, das in der Niere synthetisiert und in die Blutbahn sezerniert wird. Die Enzymaktivität des Renin ist verantwortlich für die Abspaltung des Angiotensin I (Ang I) von dem in der Leber gebildeten Vorläufermolekül Angiotensinogen. Das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), welches sowohl im Gefäßendothel als auch lokal z.B. im Herzen nach MI exprimiert wird, spaltet carboxyterminal ein Dipeptid von Ang I ab, und es entsteht das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II). Neben dem Ang II entstehen weitere Angiotensinfragmente (Ang 2-8, Ang 3-8, Ang 1-7). Der Abbau der biologisch aktiven Substanzen durch Angiotensinasen führt zu inaktiven Metaboliten (Übersicht bei:(5)).

Die meisten bekannten physiologischen Effekte von Ang II (Blutdruckkontrolle, Aldosteronfreisetzung) werden durch den Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1 (AT1-Rezeptor) vermittelt. Im adulten Organismus sind die AT1-Rezeptoren, von denen bislang 2 Isoformen bekannt sind, weit verbreitet. Nicht nur zwischen den Isoformen des AT1-Rezeptors bestehen große Homologien, sondern auch zwischen den AT1-Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte. Neben dem AT1-Rezeptor ist der Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 2 (AT2-Rezeptor) bekannt, dessen Funktion jedoch bislang noch nicht umfassend geklärt ist. Neben seiner Rolle in der Embryogenese und Differenzierung wird vermutet, dass er einen Gegenspieler des AT1-Rezeptors darstellt (Übersicht bei: (5)).

1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) galt lange als inerte Grundsubstanz, von der die Zellen wie von einem Stativ in Position gehalten werden. Der bekannteste Bestand-

teil dieses Stativs ist Collagen, das in seiner fibrillären Struktur das dreidimensionale Netzwerk für darin eingebettete Zellen und Gefäße darstellt.

Neben Collagen gibt es weitere Bestandteile der EZM, die sich nach unterschiedlichen Kriterien einteilen lassen: nach funktionellen Eigenschaften oder nach strukturellen Merkmalen (Übersicht bei: (6)).

Die Beteiligung am Aufbau ist die gemeinsame funktionelle Eigenschaft von Makromolekülen wie Collagen, Fibronektin oder Elastin. Mit den fibrillären Komponenten der EZM oder mit Zelloberflächen assoziiert zu sein ist die Eigenschaft der Vertreter aus der Gruppe der Proteoglykane (PG).

Die Einteilung der EZM-Bausteinen nach strukturellen Merkmalen unterscheidet u.a. zwischen PG, Glycoproteinen und Collagen. Wichtige Vertreter der Collagene im Herzen, deren Expression nach MI gesteigert wird, sind Collagen-Typ I und –Typ III (7), (8), (9) und als Vertreter der Glycoproteine Fibronektin. Biglykan und Decorin sind PG, die eine Neointimahyperplasie im Tiermodell hemmen (10) sowie die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) in der Zellkultur (11) regulieren. Daher wird vermutet, dass Decorin und Biglykan auch eine Rolle bei der Entwicklung und Progression der Atherosklerose spielen.

Proteoglykane sind eine Klasse glykosylierter Proteine, die kovalent mit sulfatierten Glykosaminoglykanen (GAG) verbunden sind. Zu den wichtigsten Vertretern der GAG gehören Chondroitinsulfat (CS, schematisch dargestellt in Abbildung 1), Dermatansulfat (DS), Heparansulfat und Keratansulfat. Die GAG-Ketten der PG sind sulfatierte Polysaccharid-Ketten, die sich aus zwischen 40x und 100x wiederholenden Disacchariden zusammensetzen. Die Disaccharide wiederum bestehen aus einem Hexuronsäuremolekül und einem Aminozucker. Die am Aufbau von Decorin und Biglykan beteiligten GAG-Ketten, bestehend aus Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, besitzen als gemeinsamen Baustein den Aminozucker N-Acetyl-D-Galactosamin. Sie unterscheiden sich durch die Möglichkeit einer Epimerisierung an Position C5 der D-Glucuronsäure im Chondroitinsulfat, bei der D-Iduronsäure entsteht, womit dann Dermatansulfat vorliegt. Die Sulfatierung der Chondroitinsulfat-Ketten ist i.a. gleichmäßig, d.h. jedes Disaccharid trägt eine Sulfatgruppe. Die Sulfatierung kann an Position C2 und C3 der Glucuron-, bzw. Iduronsäure und an Position C4 und C6 des Aminozuckers stattfinden.

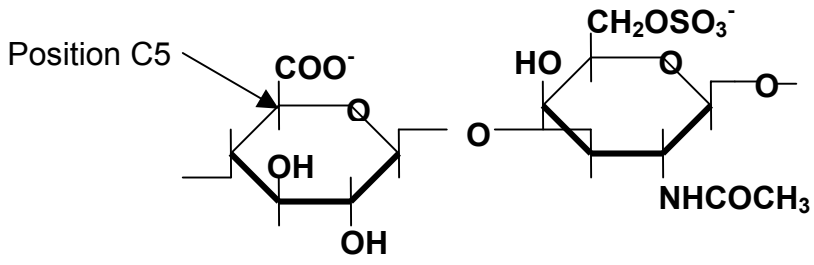


Abbildung 1 Struktur des Chondroitinsulfat

Der zwischen den einzelnen PG variierende Proteinanteil trägt zu Unterschieden in der Funktion bei. Neben den GAG-Ketten vermittelt der Proteinanteil der PG die Interaktion mit anderen Molekülen wie z.B. Collagen und moduliert dadurch die Bildung des dreidimensionalen Netzwerkes der Extrazellulärmatrix. Trägt ein Proteinkern zahlreiche GAG-Ketten, bzw. sind diese sehr lang oder stark sulfatiert, so ist sein Wasserbindungsvermögen aufgrund der hydrophilen Sulfatgruppen sehr hoch. Durch den Wasseranteil kann das Volumen des Gewebes gesteuert sowie die mechanischen Eigenschaften des betreffenden Gewebes beeinflusst werden.

Eine weiterführende Unterteilung der PG unterscheidet zwischen PG, die mit der Zelloberfläche assoziiert sind (z.B. Syndecan), ein sehr hohes Molekulargewicht haben (z.B. Versican) oder leucinreiche Regionen aufweisen (z.B. Biglykan, Decorin). Den kleinen, leucinreichen PG ist der Proteinanteil gemeinsam, der zu 70 % aus sich wiederholenden leucinreichen Regionen besteht. Diese PG werden nach ihrer Synthese durch die Zellen in den Extrazellulär-Raum sezerniert und dort als Bestandteil der EZM in das dreidimensionale EZM-Netzwerk eingefügt.

Die beiden kleinen, leucinreichen PG Decorin und Biglykan gehören zur Gruppe der Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-PG und haben einen Proteinanteil, der ein Molekulargewicht von 36 kDa, bzw. 38 kDa hat. Sie unterscheiden sich darin, dass Decorin nur eine GAG-Kette an seinem N-Terminus trägt, Biglykan jedoch zwei (12).

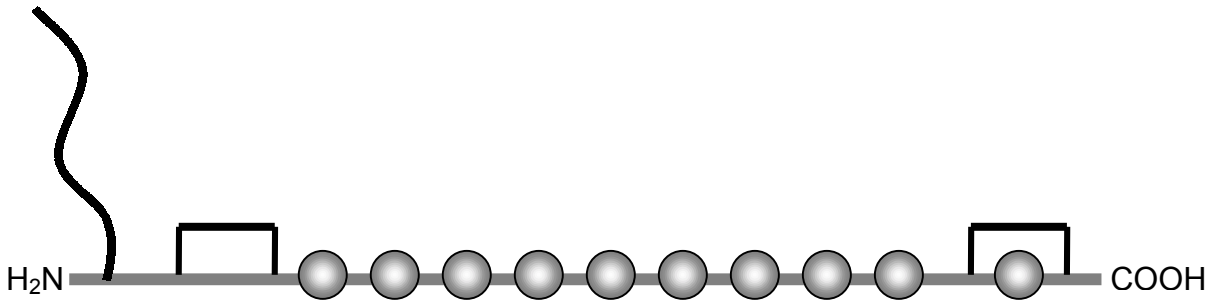


Abbildung 2 Schematischer Aufbau von Decorin und Biglykan

: leucinreiche Region

: Cystein-Brücke

: Proteinkern

: GAG-Kette, im Fall von Biglykan befinden sich am N-Terminus 2 GAG-Ketten

Über die Funktion des Biglykan ist bislang im Rahmen der Atherosklerose bekannt, dass es eine Affinität zu Lipoproteinen aufweist, die durch Modifikation der Kettenlänge der GAG bestimmt wird (13). Weiterhin sind beide CS/DS-PG an der Fibrillogenese von Collagen beteiligt. Sie sind für die gleichmäßige Anordnung der Fibrillen und damit für die mechanische Stabilität der Gewebe verantwortlich (14). Hinzu kommt eine Interaktion zwischen Decorin und *transforming growth factor-beta* (TGF-ß), die zu einer Beeinflussung der Aktivität des Wachstumsfaktors führt (15). Die Bedeutung von Decorin und Biglykan im Zusammenhang mit dem MI liegt bislang im Dunkeln.

Die Zellen, die EZM-Moleküle synthetisieren und sezernieren, tun dies in Abhängigkeit von der sie umgebenden Matrix. Die EZM kann zudem die Proliferation von Zellen beeinflussen, wie in Experimenten an VSMC gezeigt werden konnte (16). Für die Wahrnehmung der Beschaffenheit der umgebenden Matrix, bzw. für die notwendigen Interaktionen zwischen Zellen und EZM sind Integrin-Rezeptoren verantwortlich, die sich nach Bindung einer bestimmten EZM-Molekülsequenz (Arginin-Glycin-Aspartat, RGD) zusammenlagern und sogenannte fokale Adhäsionspunkte (*focal adhesions*) bilden. Durch die Bildung dieser fokalen Adhäsionspunkte wird der Integrin-Rezeptor funktionell aktiv, d.h. er setzt eine Signaltransduktionskaskade in den Zellen in Gang, die den Phänotyp der Zellen bestimmt und die Anordnung des Zytoskeletts reguliert (17). Interessanterweise sind die PG selbst

keine Liganden an den Integrin-Rezeptoren, jedoch interagieren PG mit den meisten Glykoproteinen, wie z.B. Fibronektin, und Collagen und modulieren dadurch indirekt integrin-vermittelte Signale.

Collagen als wichtiger Bestandteil der EZM hat als grundlegendes Strukturelement das Tropocollagen. Drei sich umeinander windende Tropocollagen-Stränge bilden das Collagen-Molekül. Die bei der Zusammenlagerung entstehenden Fibrillen weisen eine enorme Zugfestigkeit auf. Die Synthese des Collagen ist wie die der PG u.a. abhängig von der Konzentration bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch von der die Zellen umgebenden EZM.

1.4 Myokardinfarkt und extrazelluläre Matrix

Die nach MI entstehende Infarktnarbe stellt ein collagenreiches Gebiet dar, das langandauernden Umbauprozessen unterworfen ist. Glycoproteine, Collagen und PG werden unter dem Einfluss der Faktoren, die durch das ischämische Ereignis freigesetzt wurden, synthetisiert und in den Extrazellulärraum abgegeben. Die Zellen, die für die Deposition der EZM im Herzen verantwortlich sind, wurden als kardiale Fibroblasten identifiziert (18). Im gesunden Herzmuskel stehen sie unter einer ausgewogenen Regulation durch Faktoren, die Zellwachstum, Apoptose und den Phänotyp der Zellen beeinflussen. Den Stimulatoren wie Ang II und Endothelin sind Gegenspieler gegenüber gestellt, die hemmend wirken (Bradykinin, Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostaglandine) (19). Tritt eine Schädigung der Herzens z.B. durch einen MI ein, so gerät dieses System aus dem Gleichgewicht.

Pharmakologische Eingreifmöglichkeiten bieten Maßnahmen, die gegen das stimulierende Ang II gerichtet sind (ACE-Inhibitoren, AT1-Rezeptorantagonisten) und theoretisch NO-Donoren.

Klinische Studien zeigen die Bedeutung von ACE-Inhibitoren. Die AIRE-Studie (Acute Infarction Ramipril Efficacy) beschrieb, dass die Therapie nach einem akuten MI mit Ramipril bereits nach 6 Monaten die Mortalität um 6 % absenkte. 15 Monate nach Therapiebeginn war bei diesem Patientenkollektiv die Mortalität durch Ramipril um 11,4 % erniedrigt (AIRE-Extension-Study, (20)). Auch bei Hochrisiko-Patienten für kardiovaskuläre Ereignisse, die im Rahmen der HOPE-Studie (Heart Outcomes

Prevention Evaluation) mit Ramipril behandelt wurden (21), war nach 5 Jahren die Mortalität und die Inzidenz von MI und Schlaganfall reduziert.

Diese und frühere Beobachtungen führten zu näheren Untersuchungen des RAS nach MI im Tiermodell. In zahlreichen Studien an Ratten, denen experimentell ein MI induziert wurde, konnte festgestellt werden, dass die Applikation sowohl von ACE-Inhibitoren als auch von AT1-Antagonisten die Hypertrophie von kardialen Myozyten genauso wie die Collagen-Deposition zu senken vermag (22). Dies wurde unterstützt durch Befunde, dass nach MI die Expression des ACE in der Infarktnarbe erhöht war (23), und das sogenannte Gewebe-RAS aktiviert wurde.

Neben dem RAS sind eine Vielzahl weiterer Faktoren an den Umbauprozessen des Myokards beteiligt. Das Spektrum der Mediatoren umfasst dabei Proteine, die das Zellwachstum beeinflussen, wie z.B. *transforming growth factor-beta* (TGF-ß) (24) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) (25), sowie Proteine, die in Entzündungsprozesse involviert sind, wie *tumor necrosis factor–alpha* (TNF-alpha) (26) und die Gruppe der Interleukine (z.B. Interleukin-1-beta (IL-1ß)) (27), aber auch das kleine Molekül Stickstoffmonoxid, das eine Reihe unterschiedlichster Effekte auslösen kann.

Durch einen MI werden nicht nur die oben angesprochenen, vor allem auf vitale Zellen wirkenden Stoffe, sondern auch aus absterbenden Zellen proteolytisch aktive Enzyme wie z. B. lysosomale Proteasen freigesetzt. Fibroblasten und Makrophagen geben Matrix-Metalloproteasen (MMPs) ab, die am Umbau der EZM beteiligt sind. Durch Proteolyse werden auch Protease-aktivierte-Rezeptoren (PAR 1-4) aktiviert, die eine mitogene Wirkung auf Fibroblasten besitzen (28). Der spezifische Aktivator der PAR-Rezeptoren ist Thrombin, welches im Blut die Thrombozyten-Aktivität reguliert und die Blutgerinnung durch Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin initiiert. Die Anwesenheit, bzw. eine mögliche Funktion im Infarktgebiet konnte für Thrombin und PAR-Rezeptoren bislang nicht gezeigt werden.

1.5 Fragestellung

Die Faktoren, die die Bildung der Proteoglykane in kardialen Fibroblasten regulieren, und die Bedeutung der Proteoglykane für die Umbauprozesse des Herzens nach MI sind noch nicht bekannt.

Gut belegt ist dagegen der positive Einfluß der Hemmstoffe des RAS auf diese kardialen Umbauprozesse sowie auf die Akkumulation von Collagen und Fibronektin.

Für die vorliegende Dissertation ergaben sich folgenden Fragestellungen:

1) Welche Proteoglykane exprimieren kultivierte, aus neonatalen Ratten isolierte, kardiale Fibroblasten?

2.1) Durch welche Faktoren wird die Synthese dieser Proteoglykane in kultivieren kardialen Fibroblasten reguliert?

2.2) Haben PDGF BB, TGF-ß1, Interleukin-1ß, TNF-alpha, Ang II, Thrombin oder Stickstoffmonoxid einen Einfluß auf die PG-Sekretion in vitro?

2.3) Wird die Molekülgröße der Proteoglykane durch die getesteten Stimuli verändert?

3.1) Werden Proteoglykane durch einen Myokardinfarkt induziert und wenn ja, ist diese Induktion ausschließlich auf den Infarktbezirk begrenzt?

3.2) Lässt sich ein Zeitgang der Expression von Decorin- und Biglykan-mRNA in der Zeitspanne vom 1. bis 21. Tag nach MI in a) dem nicht-infarzierten rechten Ventrikel, b) dem nicht-infarzierten Septum, 3) dem Randgebiet und 4) der Infarktnarbe erkennen?

4) Ist die Expression der Proteoglykane nach MI pharmakologisch hemmbar?

Aus der Gruppe der PG wurden die beiden kleinen, leucinreichen Biglykan und Decorin ausgewählt. Ihre Regulation wurde zum einen an kardialen Fibroblasten charakterisiert, die aus den Herzen neugeborener Ratten gewonnen wurden. Zum anderen wurde die PG-Expression an Herzen adulter Ratten untersucht, bei denen experimentell ein MI induziert wurde.

Die Regulation von Decorin und Biglykan wurde mit Hilfe biochemischer und molekularbiologischer Verfahren untersucht

Der metabolische Einbau von Radiosulfat durch kardiale Fibroblasten in die GAG der PG diente zur Feststellung quantitativer Veränderungen der Gesamt-Proteoglykan-Sekretion. Mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens wurde die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht. Die Gel-Filtrations-Chromatographie sollte Aufschluss über Veränderungen von Molekulargewichten geben.

Histochemische und immunhistochemische Verfahren dienten zum Nachweis von Veränderungen der Proteoglykan-Expression in den infarzierten Herzen. Mittels Northern-Blot-Verfahren und Reverser-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wurden Regulationen der Transkription untersucht.

2 Methoden

2.1 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt an Ratten

Der Umbau des Myokards in Folge eines ischämischen Infarkts wurde an Ratten nach Ligatur der linken Koronararterie untersucht. Diese experimentellen Myokardinfarkte sind an 300-350 g schweren Wistar-Kyoto-Ratten (WKY-Ratten) in Anlehnung an Stauss et al. (29) induziert worden[1]. Zur Organentnahme zu den unten angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter tiefer Ethernarkose durch Genickbruch getötet und nachfolgend der Brustkorb eröffnet. Das entnommene Herz wurde in kaltem PBS gewaschen und den weiteren Untersuchungsmethoden zugeführt.

Zur histochemischen und immunhistochemischen Färbung der extrazellulären Matrixmoleküle (EZM-Moleküle) wurden die Herzen nach der Entnahme in 10 %iger Formalin-Lösung eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Zu diesem Zwecke sind Organe verwendet worden, deren Entnahme 7 Tage nach der experimentellen Induktion eines Infarktes erfolgte.

Zum Zwecke der Bestimmung der mRNA-Expression von Proteoglykanen wurden Herzen untersucht, die 12 Stunden und 1, 3, 5, 7, 14 und 21 Tage nach Myokardinfarkt entnommen wurden. Nach der Entnahme erfolgte ein transversales Schneiden der Herzen in 4 Scheiben. Die 2 mittleren Scheiben wurden in folgende Areale unterteilt: infarzierter linker Ventrikel, nicht infarzierter rechter Ventrikel, nicht infarziertes Septum und ein dem infarzierten Gebiet benachbartes Areal, welches im Folgenden als Randgebiet bezeichnet wird. Die Gewebestücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

Um den Einfluss des Angiotensin-Konversions-Enzym-Hemmers (ACE-Hemmer) Ramipril und des AT1-Rezeptorantagonisten Olmesartan auf die Umbauprozesse des Myokards zu untersuchen, wurden WKY-Ratten einer 7-tägigen Behandlung vor Setzen des Myokardinfarkts und einer 7-tägigen Nachbehandlung mit Ramipril (1 mg/kg Körpergewicht pro Tag) oder Olmesartan (1 mg/kg Körpergewicht pro Tag)

[1] Der Plan zu diesen tierexperimentellen Untersuchungen wurde der zuständigen Kommission „Tierschutz-Ethik“ vorgelegt, von dieser begutachtet und gutgeheißen.

unterzogen. Die Applikation der Arzneistoffe erfolgte mit Hilfe der Gavage. Nach Ablauf von 7 Tagen wurden die Organe wie beschrieben entnommen und die Gewebeproben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

2.1.1 Histochemie und Immunhistochemie

Die EZM-Deposition wurde zum einen histochemisch mit Hilfe der modifizierten Movats-Pentachrom-Färbung, zum anderen immunhistochemisch mit Hilfe von spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen Decorin, Biglykan und Collagen untersucht. Um eine räumliche Zuordnung der EZM-Moleküle zu eingewanderten Makrophagen durchführen zu können, wurden diese mit dem spezifischen monoklonalen Makrophagen-Antikörper gegen ED-1 detektiert.

Von den in Paraffin eingebetteten Organen wurden Schnitte in einer Stärke von 5 µm angefertigt, die vor den jeweiligen Färbevorgängen 3x 10 min mit Xylol entparaffinisiert wurden.

2.1.1.1 Histochemie (Movats-Pentachrom-Färbung)

Die histochemische Färbung von EZM-Molekülen erfolgte in Anlehnung an Schmidt et al. (30) mit Hilfe der modifizierten Movats-Pentachrom-Färbung.

Die Färbung erfolgte nach dem aufgeführten Schema:

Zeitabläufe	Färbelösungen	Ziel
3x 10 min	Xylol	Entparaffinisieren
kurz eintauchen	Ethanol 96 % (V/V) Ethanol 90 % (V/V) Ethanol 70 % (V/V) Ethanol 50 % (V/V)	schrittweise Hydratisierung
kurz eintauchen	Wasser	Hydratisierung
1x 10 min, 60°C	Bouins Lösung (8.2.1.1)	Fixierung
10 min	fließendes Wasser	Spülung
20 min	Alcian Blau-Lösung 1 % (8.2.1.1)	Proteoglykan-Färbung

...

Zeitabläufe	Färbelösungen	Ziel
...		
4 min	fließendes Wasser	Spülung
10 min, 60°C	Alkalischer Alkohol (8.2.1.1)	Fixierung des Alcian Blau
4 min	fliessendes Wasser	Spülung
30 min	Weigerts Lösung (8.2.1.1)	Färbung der Zellkerne und elastischen Fasern
2x kurz	kaltes destilliertes Wasser	Spülung
1 min	Crocein Scarlet / Fuchsinsäure-Lösung (8.2.1.1)	Färbung von glatten und quer-gestreiften Muskelzellen, Fibrin
1x kurz	destilliertes Wasser	Spülung
5 min	Phosphotungsicsäure-Lösung (8.2.1.1)	Differenzierung der Crocein-Scarlet-Färbung
5 min	1 %-ige Essigsäure	Differenzierung der Weigerts Färbung
1x 1 min	Ethanol 90 % (V/V)	Schrittweise Dehydratisierung
2x 1 min	Ethanol 96 % (V/V)	Schrittweise Dehydratisierung
60 min	alkoholische Safran-Lösung (8.2.1.1)	Färbung von Collagenfasern
2x 1min	Ethanol 96 % (V/V)	Spülung
2x 5min	Xylol	Dehydratisierung

Im Anschluss an die Färbung sind die Schnitte in Roti®-Histokit (Roth, Karlsruhe) eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt worden.

2.1.1.2 Immunhistochemie

Die ausgewählten EZM-Moleküle Collagen-Typ I-alpha, Biglykan und Decorin wurden mit spezifischen polyklonalen Antikörpern, die gegen Regionen des Protein-anteils gerichtet waren, nachgewiesen. Dazu sind Primärantikörper gegen murines Biglykan (*anti-murine biglycan-antibody*, LF-106, *polyclonal rabbit IgG*, 1:1000), murines Decorin (*anti-murine decorin-antibody*, LF-113, *polyclonal rabbit IgG*, 1:1000), humanes Collagen-Typ I-alpha (*anti-human collagen αI-antibody*, LF-67,

polyclonal rabbit IgG, 1:1000) eingesetzt worden. Makrophagen wurden mittels Antikörpern gegen murines ED-1 (*anti-mouse ED-1-antibody*, monoklonaler Antikörper, 1:200) angefärbt. Als Sekundärantikörper kamen peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (*goat-anti rabbit IgG*, Vector Laboratories, 1:500; *goat-anti mouse IgG*, Vector Laboratories, 1:500) zum Einsatz.

Die Färbungen sind nach dem folgenden Schema durchgeführt worden:

Zeitliche Abfolge	Färbelösungen	Ziel
3x 10 min	Xylol	Entparaffinisierung
2x 5 min	Ethanol 96 % (V/V)	
20 min	Wasserstoffperoxid 0,7 % in Methanol	Fixierung
jeweils 5 min	3x Ethanol 96 % (V/V) 2x Ethanol 90 % (V/V) 1x Ethanol 70 % (V/V) 1x Ethanol 50 % (V/V) 1x TBS (8.2)	schrittweise Hydratisierung
60 min, 37°C	Chondroitinase-ABC-Lösung (ICC) (8.2.1.1)	enzymatische Abspaltung der GAG-Ketten vom Kernprotein
10 min	TBS	Spülung
60 min, Raumtemperatur	10 % Ziegenserum, 2 % BSA in TBS	Unterbinden von unspezifischen Bindungen der Primärantikörper
über Nacht, 4°C feuchte Kammer	Primärantikörper (in TBS mit 0,1 % BSA)	Inkubation
2x 5 min (schwaches Schwenken)	TBS	Entfernung überschüssiger Primärantikörper
60 min, 37°C	peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (in TBS mit 2 % Ziegenserum, 0,25 % BSA)	Inkubation
variabel (siehe Anmerkung im folgenden Text)	DAB-Peroxidase-Set (Sigma)	Detektion der Sekundärantikörper
2 min	Mayers Hematoxylin-Lösung	Zellkernfärbung
je 2x 5 min	Ethanol 70 % (V/V) Ethanol 90 % (V/V) Ethanol 96 % (V/V) Xylol	schrittweise Dehydratisierung

Das Einbetten der Schnitte erfolgte mit Roti®-Histokit, ein Deckgläschen diente der Abdeckung.

Anmerkung: Die Detektion der Sekundärantikörper mit Hilfe des DAB-Peroxidase-Sets (Sigma) wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei die Intensität der Färbung beobachtet und die Dauer der Inkubation mit dem Chromogen entsprechend gewählt wurde.

2.1.2 Präparation der Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Gesamt-RNA aus den in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Myokard-Gewebeproben der Ratten wurde in Anlehnung an das *single-step*-Verfahren nach Chomczynski et al. (31) gewonnen. Dazu wurde Trizol®-Reagenz, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden ca. 100 mg gefrorenen Gewebes in ein Polypropylen-Röhrchen mit rundem Boden (Sarstedt, Nümbrecht) zu 1 ml Trizol®-Reagenz gegeben und mit dem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.) 1 min lang zerkleinert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml fassendes Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die durch die Gewebezerkleinerung entstandenen Zell- und Gewebetrümmer zu entfernen. Anschließend folgte eine Inkubation der Proben für 5 min bei Raumtemperatur, dann wurden 200 µl Chloroform je ml Trizol®-Reagenz hinzugefügt und die Proben 15 sek lang gut geschüttelt. Nach 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden sie bei 12.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase ist in ein neues Röhrchen überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 12.000 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, die Präzipitate mit 1 ml 75 %-igem Ethanol versetzt, erneut zentrifugiert (9.200 rpm, 5 min, 4°C) und luftgetrocknet. Die Lösung der getrockneten Präzipitate erfolgte in 30 µl DEPC-Wasser (8.2.4.1). Der RNA-Gehalt der Proben wurde dann photometrisch (U-2000 Spectrometer, Hitachi, Tokio) ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C tiefgefroren.

2.2 Analyse der EZM-Expression an kultivierten kardialen Fibroblasten

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Primärkultur kardialer Fibroblasten der neugeborenen Ratte

Kardiale Fibroblasten wurden durch enzymatische Verdauung aus den Ventrikeln der Herzen neugeborener, 2-3 Tage alter WKY-Ratten gewonnen (modifiziert nach (32)) und zur Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die für die Entzündungs- und Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt relevant sind, herangezogen.

Zur Isolierung der kardialen Fibroblasten wurden die neugeborenen Ratten dekapitiert, der Brustkorb in der Sternallinie eröffnet, das Herz entnommen und in eine Zellkulturschale mit kaltem ADS-Puffer (8.2.2) überführt. Nach Entfernen der Atria und anhaftenden Gewebes mit Hilfe eines Stereomikroskops (Olympus SF10, Olympus, Japan) sind die Ventrikel in eine Zellkulturschale mit frischem ADS-Puffer überführt und gedrittelt worden. Die weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Herasafe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Gemeinsam mit dem ADS-Puffer wurden die Ventrikel in ein 50 ml fassendes Polypropylenröhrchen (Falcon) überführt, der ADS-Puffer mit Hilfe einer Vakuumpumpe (KNF Miniport, Omnilab, Bremen) abgesaugt und durch Collagenase/Pankreatin-Lösung (8.2.2) ersetzt, wobei für bis zu 14 Ventrikel 6 ml der Enzymlösung zur Verwendung kamen. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C in einem Wasserbad, um an den Ventrikeln anhaftende Zelltrümmer und Blutzellen zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, frische Collagenase/Pankreatin-Lösung ergänzt und aufeinanderfolgend 7 Inkubationen (37°C, 20 min) durchgeführt. Um die durch die enzymatische Verdauung freigesetzten kardialen Myozyten von den kardialen Fibroblasten zu trennen, wurden die Überstände der jeweiligen Inkubationen mit 1,5 ml fetalem Kälberserum (FKS) versetzt und wie folgt aufgearbeitet:

Es erfolgte zunächst eine Zentrifugation (Labofuge GL, Heraeus, Osterode) bei 250 rpm für 5 min. Das entstandene Sediment bestand vorwiegend aus kardialen Myozyten und diente zur Kultivierung der Myozyten. In dieser Arbeit wurden die

Myozyten allerdings nur als Positivkontrolle bei der immunhistochemischen Charakterisierung der Fibroblastenkultur benutzt (2.2.1.3).

Der erhaltene Überstand der ersten Zentrifugation, in dem sich der Hauptanteil der kardialen Fibroblasten befand, wurde ein zweites Mal zentrifugiert (1000 rpm, 10 min), das Sediment in 1 ml FKS resuspendiert, 5 ml Preplating-Medium (8.2.2) zugesetzt und die Zellen auf Zellkulturschalen (56,7 cm^2, Nunc) ausgesät. Nach 4 Stunden wurde zur Entfernung nicht adhärenter und abgestorbener Zellen das Preplating-Medium entfernt und durch endgültiges, 20 % FKS-haltiges Kulturmedium (nachfolgend als „Kulturmedium“ bezeichnet, 8.2.2) ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Fibroblasten mit warmem PBS gewaschen und ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Kultivierung der kardialen Myozyten wurde das bei 250 rpm erhaltene Sediment in 1 ml FKS resuspendiert, 5 ml Preplating-Medium hinzugegeben und für 30 min unter Kulturbedingungen im Brutschrank in einer Zellkulturschale (56,7 cm^2, Nunc) inkubiert. Dieser Schritt diente der Abtrennung der kardialen Fibroblasten durch Sedimentation und Anhaftung, da Fibroblasten im Gegensatz zu kardialen Myozaten unter den gegebenen Bedingungen nach 30 min bereits adhärent sind. Anschließend wurde der die kardialen Myozyten enthaltende Überstand der ersten Zellkulturschale entweder auf eine frische Zellkulturschale (8 cm^2, Sarstedt) oder eine 12-Loch-Gewebekulturplatte (Nunc) gegeben, im Brutschrank inkubiert und nach 4 Stunden das Preplating-Medium durch endgültiges Myozyten-Kulturmedium (8.2.2) ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und frisches Myozyten-Kulturmedium zugesetzt.

Die Kultivierung der kardialen Fibroblasten und Myozyten erfolgte im Brutschrank (Hera Cell, Heraeus, Osterode) bei 37°C und 5 % CO_2, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

2.2.1.2 Subkultivierung

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die kardialen Fibroblasten subkultiviert, indem sie zunächst nach Entfernen des Mediums für 2 min bei Raumtemperatur mit 5 ml Passage-EDTA-Lösung (8.2.2) versetzt und anschließend für ca. 3 min mit 5 ml Trypsin-Lösung bei 37°C inkubiert wurden, wobei das Ablösen der Zellen vom Schalenboden mit Hilfe des Lichtmikroskops (Olympus CK2, Olympus, Japan)

verfolgt wurde. Nach dem Ablösen der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1 ml FKS die Inaktivierung des Trypsins. Die Zellen wurden in der verbliebenen Lösung suspendiert, in ein Polypropylenröhrchen (15 ml, Falcon) überführt und die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 10 min). Das Sediment wurde in Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und die kardialen Fibroblasten in definierter Dichte (10.000 Zellen/cm^2) ausplattiert.

2.2.1.3 Zellcharakterisierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Charakterisierung der kardialen Fibroblasten wurde in Anlehnung an das Verfahren nach Kruse et al. (33) mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Um eine Abgrenzung gegen kardiale Myozyten zu erreichen, wurden die Fibroblasten mit einem Antikörper gegen alpha-Glattmuskelaktin (αSMA) markiert, welches in den kardialen Myozyten vergleichsweise wenig exprimiert ist. Zur Detektion der Myozyten wurde ein Antikörper gegen sarkomeres Aktin (sarkAkt) verwendet.

Zur Charakterisierung wurden die kardialen Fibroblasten in der ersten Passage auf runde Deckgläschen (18 mm Durchmesser, Assistent, Schott) in einer Zelldichte von 3000/cm^2 ausgesät. Sie wurden parallel zu Fibroblasten kultiviert, die zu Versuchen genutzt wurden, und sind zeitgleich mit dem Beginn des Serumentzugs der Versuchszellen für 10 min mit eiskaltem Methanol bei –20°C fixiert worden. Zu diesem Zweck isolierte Myozyten wurden bereits während der Isolierung (2.2.1.1) auf den Deckgläschen kultiviert und der Fixierung unterworfen, sobald sie unter Kulturbedingungen zu kontrahieren anfingen.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen mit 1 ml TBS (8.2) gewaschen und mit IF-Blockierungslösung (8.2.1.2) für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit Primärantikörper gegen sarkAkt (*anti-sarkAkt-antibody*, *monoclonal mouse IgG*, Sigma, 1:100) über Nacht bei 4°C, bevor am darauffolgenden Tag zunächst 2x 5 min mit TBS-T (8.2.1) und anschließend 3x 10 min mit TBS gewaschen wurde. Die Inkubation mit Sekundärantikörper (*donkey-anti mouse 488*, Sigma, 1:1000), gelöst in TBS, wurde für 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Es schlossen sich die folgenden Waschschritte an: 2x 5 min mit TBS-T, 3x 10 min mit TBS. Zur Detektion des αSMA wurden die Deckgläschen anschließend für 1 Stunde in der IF-Blockierungslösung geschwenkt, bevor mit dem

direktmarkierten Primärantikörper gegen αSMA (*anti-αSMAcy3-antibody*, *monoclonal mouse IgG*, Sigma, 1:500) über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Zur Entfernung der Antikörper wurde erneut 2x 5 min mit TBS-T und 3x 10 min mit TBS gewaschen. Das Eindecken der Zellen erfolgte mit Slow-Fade® (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Nach Einwirken des Eindeckmittels wurde die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem Laser-Scan-Mikroskop (Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510) für die Detailaufnahmen und einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMR) für geringere Vergrößerungen bei 488 nm für sarkomeres Aktin und bei 543 nm für alpha-Glattmuskelaktin durchgeführt.

2.2.2 Durchführung der Experimente

Die kardialen Fibroblasten der neugeborenen Ratte sind jeweils in der ersten Passage für die Experimente verwendet worden (34).

Zur Quantifizierung der Proteoglykansekretion (PG-Sekretion) mit Hilfe der Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation (CPC, 2.2.4.1) wurden die Zellen auf 24-Loch-Gewebekulturplatten (Sarstedt, Nümbrecht) in einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm^2 ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert.

Zur biochemischen Charakterisierung der in das Kulturmedium abgegebenen Proteoglykane (PG) (2.2.4.3), sowie der Expression der *messenger*-RNA (mRNA) (2.2.5) erfolgte die Aussaat der Zellen auf Zellkulturschalen (56,7 cm^2, Nunc) in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm^2. Sie wurden dann bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert.

2.2.2.1 Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen

Vor der Stimulation sind die Zellen 48 Stunden unter Serumentzug (Wechsel auf Kulturmedium ohne FKS) gehalten worden. Nachfolgend wurden folgende Wachstumsfaktoren und Zytokine in den angegebenen Konzentrationen für eine Dauer von 24 Stunden zugesetzt, wobei zeitgleich frisches, serumfreies Kulturmedium verwendet wurde: FKS 10 %, *platelet derived growth factor BB* (PDGF BB) 1-10 ng/ml, *transforming growth factor-beta 1* (TGF-ß1) 0,1-10 ng/ml, *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-alpha) 10 ng/ml, Interleukin 1 beta (IL-1ß) 0,1 ng/ml, Thrombin 1-100 nM. In der Versuchsreihe zu Thrombin kam das Hepta-Peptid SFLLRNP zum

Einsatz, das die Aminosäuren 42-48 des Thombinrezeptors darstellt und als Agonist am Protease-aktivierten Rezeptor Typ 1 (PAR-1) wirkt.

In weiteren Experimenten ist die Reaktion auf eine 24-stündige Vorinkubation der Fibroblasten mit 10 ng/ml TNF-alpha und anschließender 24-stündiger Behandlung mit einer Kombination aus PDGF BB (10 ng/ml) oder TGF-ß1 (10 ng/ml) mit TNF-alpha (10 ng/ml) untersucht worden.

2.2.2.2 Stimulation mit Angiotensin II

Die Zellen erhielten für 48 Stunden serumfreies Kulturmedium, bevor die Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) in einer Konzentration von 10^{-7} M in frischem, serumfreiem Kulturmedium erfolgte. Folgende Rezeptorantagonisten wurden 30 min vor Zugabe des Ang II in frischem, serumfreiem Kulturmedium zu den Zellen gegeben: Losartan (AT1-Rezeptorantagonist, 10^{-5} M), PD123177 (AT2-Rezeptorantagonist, 10^{-6} M) (35), (36), (37).Die Inkubation mit Ang II in An- oder Abwesenheit der Antagonisten erfolgte für 24 Stunden.

Um zu prüfen, ob der Ang II-Effekt durch die autokrine Freisetzung von Wachstumsfaktoren vermittelt wurde, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die im folgenden aufgeführten, neutralisierenden Antikörper zum Einsatz kamen: *anti-basic fibroblast growth factor* (bFGF)-*antibody* (R&D, *polyclonal goat IgG*, 1 µg/ml), *anti-human platelet derived growth factor* (PDGF)-*antibody* (R&D, *polyclonal goat IgG*, 10 µg/ml) und *anti-transforming growth factor beta 1, 2, 3* (TGF-ß1, -ß2, -ß3)-*antibody* (R&D, *monoclonal mouse* IgG_1, clone #1D11, 0,5 µg/ml). Zudem wurden die entsprechenden Kontrollimmunglobuline (R&D, *normal goat IgG*, *mouse* IgG_1 *Isotype Control*) in den jeweiligen Konzentrationen verwendet.

2.2.2.3 Stimulation mit Stickstoffmonoxid freisetzenden Substanzen

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener NO-Donoren erfolgte ebenfalls an kardialen Fibroblasten, die vor Beginn des Experimentes 48 Stunden serumfreies Kulturmedium erhielten. Bei diesen Experimenten wurden die NO-Donoren DETA-NONOate ((Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate, 100 µM, t½: > 500 min), PAPA-NONOate ((Z)-1-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate, 100 µM, t½: 76 min) und SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine, 100 µM; Freisetzung von NO beginnt sofort) in Kombination

mit PDGF BB (10 ng/ml) in serumfreiem Kulturmedium im Rahmen eines Mediumwechsels zugegeben. Um toxische Wirkungen der NO-Donoren nachzuweisen, wurde ein Zytotoxizitäts-Test mit den relevanten Konzentrationen der NO-Donoren unter identischen Bedingungen durchgeführt (2.2.3.2).

2.2.2.4 Metabolische Markierung der Proteoglykane durch Radiosulfat

Durch Zusatz von [^{35}S]-haltigem anorganischem Sulfat zu dem Kulturmedium war es möglich, die Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten) der sezernierten PG radioaktiv zu markieren, da diese pro Zuckermolekül eine oder mehrere Sulfatgruppen enthalten. Zur metabolischen Markierung wurden die Zellen entsprechend der oben ausgeführten Stimulationsprotokolle behandelt. [^{35}S]SO_4^{2-} wurde, soweit nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 10 µCi/ml zusammen mit den jeweiligen Stimuli dem frischen, serumfreien Kulturmedium zugesetzt. 30 µCi [^{35}S]SO_4^{2-}/ml Kulturmedium wurden verwendet, um die sezernierten Proteoglykane im Anschluss an eine DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.2) mit Hilfe der Gel-Filtrations-Chromatographie (2.2.4.5) aufzutrennen oder mit Hilfe der Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE, 2.2.4.4) zu analysieren.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei –20°C eingefroren. Die Halbwertzeit von [^{35}S] beträgt 87,4 Tage.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 TGF-ß1-ELISA

Um zu prüfen, ob der Ang II-Effekt durch autokrine Freisetzung von TGF-ß1 vermittelt wurde, wurden Experimente dem Stimulationsprotokoll folgend (2.2.2.2) durchgeführt und die TGF-ß1-Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe des TGF-ß1-ELISAs (Quantikine®, human-TGF-ß1-Immunoassay, R&D Systems) nach den Anweisungen des Herstellers ermittelt.

Die Quantifizierung von aktiviertem TGF-ß1 mit Hilfe des TGF-ß1-ELISAs beruhte auf dem Einsatz der *sandwich enzyme immunoassay technique*. Am Boden einer Mikrotiterplatte befand sich der lösliche TGF-ß-Rezeptor Typ II als Präzipitat, an den

sich im Zellüberstand befindliches, aktiviertes TGF-ß1 band. Zur Detektion des gebundenen TGF-ß1 wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-TGF-ß1-Antikörper zugesetzt, der in einer nachfolgenden Enzymreaktion eine photometrisch zu erfassende Farbreaktion hervorrief. Dabei korrelierte die Absorption mit der TGF-ß1-Konzentration.

2.2.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Um mögliche toxische Wirkungen der verschiedenen NO-Donoren auf die kardialen Fibroblasten nachzuweisen, wurde ein Zytotoxizitäts-Test mit den auch in den Versuchen zur PG-Expression verwendeten Konzentrationen von DETA-NONOate (3 µM – 3 mM), PAPA-NONOate (30 – 300 µM) und SNAP (30 – 300 µM) dem Stimulationsprotokoll folgend (2.2.2.3) durchgeführt. Grundlage der Bestimmung der Zytotoxizität war die Aktivitätsmessung des zytoplasmatischen Enzyms Lactat-dehydrogenase (LDH), welches im Fall einer Zellmembranschädigung schnell in den Zellüberstand freigesetzt wird. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit NO-Donoren wurde mit Hilfe eines Reaktionskits (Cytotoxicity-Detection-Kit (LDH), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) die Höhe der LDH-Aktivität ermittelt, die mit dem Anteil lysierter Zellen korreliert.

Die Umsetzung von Lactat aus dem Zellüberstand in Pyruvat durch die LDH hatte die Reduktion von NAD^+ (Nicotinamidadenindinucleotid, oxidierte Form) zu $NADH/H^+$ (Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form) zur Folge. In einer zweiten, nachgeschalteten Enzymreaktion wurden 2 Protonen von $NADH/H^+$ auf das gelbe Tetrazoliumsalz 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) übertragen, wobei ein rot gefärbtes Formazansalz entstand, das bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Es wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

2.2.3.3 Ermittlung der Zellzahl

Da NO bekanntermaßen die Proliferation z.B. glatter Muskelzellen hemmt, konnten anhand der Ermittlung der Zellzahl nach Beendigung eines Experiments proliferationshemmende Wirkungen berücksichtigt werden.

Nach Entfernen des Kulturmediums, welches weiteren Analysen zugeführt wurde, wurden die verbleibenden Zellen mit PBS gespült. Nach Absaugen des PBS folgte

eine Inkubation für 3 min mit Trypsin-Lösung (8.2.2), anschließend wurden die vom Schalenboden abgelösten Zellen in der Trypsin-Lösung suspendiert und zu dem 4-fachen Volumen an Holleys-Fixierungs-Lösung (8.2.2) gegeben. Nachfolgend konnte mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt werden.

2.2.4 Untersuchung der sezernierten Proteoglykane

2.2.4.1 Quantifizierung der Proteoglykansekretion mittels Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation (CPC)

Der metabolische Einbau von [^{35}S]-haltigem anorganischem Sulfat in die GAG-Ketten der sezernierten PG (2.2.2.4) wurde mit Hilfe der Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation (CPC) in Anlehnung an das Verfahren nach Wasteson et al. (38) untersucht. Dazu wurden die Experimente als Vierfachbestimmungen in 24-Loch-Gewebekulturplatten durchgeführt. Von dem konditionierten Medium, das nach der Stimulation (2.2.2.1, 2.2.2.2 und 2.2.2.3) erhalten wurde, wurden je 2x 50 µl auf ein Filterpapier. das in 3x3 cm große Quadrate eingeteilt war (Whatman Chromatographiepapier, 3 mm), aufgetropft und getrocknet. Anschließend wurde 5x für 1 Stunde in 1 %iger Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (8.2.3.1) gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Filterpapierquadrate zerschnitten, in Szintillations-flüssigkeit (Ready Protein®, Beckmann Coulter, Fullerton, USA) eingeweicht und die Höhe der Radioaktivität mit dem Szintillationsmessgerät ermittelt.

2.2.4.2 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Konzentrierung der Zellüberstände wurde in Anlehnung an das Verfahren nach Kinsella et al. (39) eine DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt.

Um ein Probenvolumen von 5 ml aufzureinigen, wurden 0,5 ml DEAE-Trisacryl-M in Urea-Puffer (8.2.3) äquilibriert, in Plastiksäulen zur Chromatographie (Econo-Column, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben und mit 10 ml Urea-Puffer mit 0,25 M NaCl äquilibriert. Nach Auftragen und Einsickern der Probe in das Anionenaustauscherharz wurde 4x mit 6 ml Urea-Puffer (0,25 M NaCl) gewaschen, um nicht gebundene Moleküle vollständig zu entfernen. Anschließend erfolgte die Elution der an das Harz gebundenen, stark negativ geladenen Makromoleküle mit 3x 300 µl Urea-Puffer (3 M NaCl). Portionen von 300 µl des Eluats wurden nach Zusatz

von 5 µl Chondroitinsulfat-Lösung (10 mg/ml) mit dem 3,5-fachen des Volumens an 95 %igem Ethanol mit 1,3 % Kaliumacetat dreimal für ca. 1 Stunde bei –20°C gefällt. Das die PG enthaltende Präzipitat wurde luftgetrocknet und für die weitere Verwendung bei –20°C eingefroren.

2.2.4.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der Proteoglykane mit nachfolgend durchgeführtem Western-Blot-Verfahren

Dem Western-Blot-Verfahren liegt das Prinzip zugrunde, dass Proteine, die mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) behandelt wurden, denaturiert und proportional zu ihrer Molekülgröße negativ geladen sind. Diese negative Ladung erlaubt es, die mit SDS-behandelten Proteine in der Polymerstruktur eines Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch entsprechend ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde in Anlehnung an das Verfahren nach Laemmli et al. (40) durchgeführt.

Zur Identifizierung der von kardialen Fibroblasten in das Kulturmedium sezernierten PG wurden die nach der DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.2) erhaltenen Präzipitate in Anlehnung an das Verfahren nach Chang et al. (13) untersucht.

Die getrockneten Präzipitate wurden zur enzymatischen Abspaltung der GAG-Ketten von den Kernproteinen der PG mit 30 µl Chondroitinase-ABC-Lösung (8.2.3.3) pro Präzipitat für 4 Stunden bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. 2 Volumenteile der kernproteinhaltigen Chondroitinase-ABC-Lösung, sowie der reinen Chondroitinase-ABC-Lösung wurden mit 1 Volumenteil SDS-Probenpuffer (8.2.3.3) versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 100°C erhitzt. Gleichzeitig wurde ein Molekulargewichtsstandard (Kaleidoscope-Prestained-Standard, BioRad) vorbereitet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V über ca. 3 Stunden auf einem SDS-PAGE-Gel, dessen Sammelgel eine Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration von 3,5 % und dessen Trenngel eine Konzentration von 10 % aufwies (SDS-Laufpuffer: 8.2.3.3). Anschließend wurde das Gel in Transferpuffer (8.2.3.3) äquilibriert, die PVDF-Membran (Immobilon^{TM} P, Millipore) für ca. 5 min mit Methanol benetzt, bevor die Proteine mit dem Mini-Trans-Blot®-System (BioRad) auf die Membran transferiert wurden (400 mA, 120 min). Um den Anteil an unspezifischen Bindungsstellen für die Primärantikörper zu reduzieren, wurde die Membran für

1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung für Western-Blot (8.2.3.3) geschwenkt. Die Primärantikörper gegen murines Biglykan (*anti-murine biglycan-antibody*, LF-106, *polyclonal rabbit IgG*, 1:1000) und murines Decorin (*anti-murine decorin-antibody*, LF-113, *polyclonal rabbit IgG*, 1:1000) wurden jeweils in der Verdünnung 1:1000 in der Blockierungslösung hergestellt und für 12-16 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigen Primärantikörpern wurde 3x für 10 min mit TBS-T-Puffer (8.2) gewaschen, bevor die Inkubation mit peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (*goat anti-rabbit IgG*, Jackson Immuno Research Laboratories, 1:10.000) für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch 3-maliges Waschen für 10 min mit TBS-T entfernt. Die Detektion der Sekundärantikörper erfolgte mit dem ECL-Plus-System (Amersham Pharmacia Biotech), die Banden wurden auf einem Hyperfilm-ECL (Amersham Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht.

2.2.4.4 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der radioaktiv markierten Proteoglykane

Zur Identifizierung der von den kardialen Fibroblasten in das Kulturmedium sezernierten PG und zur Untersuchung von Molekulargewichtsveränderungen sezernierter PG wurden die nach der DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.2) erhaltenen Präzipitate in Anlehnung an das Verfahren nach Olin et al. (41) und Fischer et al. (11) analysiert. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Die getrockneten Präzipitate wurden in Urea-Puffer (8.2.3.2) gelöst und die Aktivität des metabolisch eingebauten [^{35}S]-Sulfats mit dem Szintillationsmessgerät ermittelt. Zur Identifizierung der PG kamen gleiche Radioaktivitätsmengen (Zerfälle/min) zum Auftrag. Zur Analyse quantitativer Unterschiede in der PG-Sekretion nach Stimulation der Zellen wurden Proben aufgetragen, die gleichen Volumina des konditionierten Kulturmediums entsprachen. Zur Probenvorbereitung wurden zu den jeweiligen Probenvolumina 0,5 Volumenteile SDS-Probenpuffer (8.2.3.3) gegeben und zur Denaturierung für 5 min bei 100°C erhitzt.

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an das Verfahren nach Laemmli et al. (40) durchgeführt. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 3,5 % Acrylamid/Bisacrylamid, das Trenngel wurde mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Gradienten von 4 % nach 12 % hergestellt, wodurch eine Unterscheidung von PG

ähnlichen Molekulargewichtes (35) möglich war. Das Gel mit einer Laufstrecke von 15 cm wurde über Nacht bei 14 mA in der Elektrophorese-Kammer (Protean® IIxi-Cell, BioRad Laboratories GmbH, München) mit SDS-Laufpuffer (8.2.3.3) entwickelt, anschließend für 30 min vorsichtig in der Entfärbelösung (8.2.3.3) geschüttelt, bevor es für 30 min in Amplify®-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) inkubiert wurde. Es folgte die Trocknung des Gels in einem Geltrockner (Gel-Dryer-Model-583, BioRad Laboratories GmbH, München). Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf dem getrockneten Gel fixiert und eine Autoradiographie durchgeführt.

2.2.4.5 Gel-Filtrations-Chromatographie

Zur Untersuchung des Einflusses des NO-Donors DETA-NONOate auf das Molekulargewicht von Biglykan wurde eine Gel-Filtrations-Chromatographie, modifiziert nach Chang et al. (13), durchgeführt.

Dazu wurden die nach DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.2) erhaltenen PG-Präzipitate in Urea-Puffer (8.2.3.2) gelöst. Gleichzeitig mit der Probe wurden ca. 50.000 dpm [^{35}S]-H_2SO_4 auf eine präparative Sepharose-CL-2B-Chromatographie-Säule aufgetragen (Pharmacia-XK16, Amersham Pharmacia Biotech), die zuvor in Urea-Puffer äquilibriert wurde. Fraktionen von 1 ml wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers (Pharmacia-LKB-RediFrac, Amersham Pharmacia Biotech) aufgefangen und die Radioaktivität eines Aliquots von 50 µl einer jeden Fraktion mit dem Szintillationsmessgerät ermittelt. Der scheinbare Verteilungskoeffizient (K_D) jeder Fraktion wurde anschließend mit der folgenden Formel rechnerisch bestimmt:

$$K_D=(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

V_e: Elutionsvolumen, V_0: Ausschlussvolumen, V_t: Gesamtvolumen

Das Ausschlussvolumen der verwendeten Säule wurde getrennt ermittelt, indem das Elutionsvolumen mit [^{3}H]Methyl-Thymidin-markierter DNA festgestellt wurde.

Die Fraktionen, die einem mittleren scheinbaren Verteilungskoeffizienten von $0{,}40 \leq K_D \leq 0{,}75$ entsprachen, enthielten hauptsächlich Biglykan. Diese biglykanhaltigen Fraktionen wurden zusammengefasst und erneut mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie konzentriert.

2.2.4.6 Glykosaminoglykan-Analyse

Zur Untersuchung der Kettengröße der GAG-Ketten des Biglykan wurden diese zunächst in Anlehnung an das Verfahren nach Chang et al. (13) mittels einer reduktiven β-Elimination mit 1 M Natriumborhydrid-Lösung in 50 mM NaOH über 24 Stunden bei 45°C vom Kernprotein getrennt. Im Anschluss wurden die Proben gegen Urea-Puffer dialysiert (Dialysemembran Spectra/Por®, MolekülGröße: 12-14.000, Spectrum Medical Industries, Rancho Dominguez, USA) und die Reaktionsprodukte nach Zusatz von 5 µl Chondroitinsulfat-Lösung (10 mg/ml) je 300 µl Probenvolumen mit 3,5 Volumenteilen 95 %igem Ethanol mit 1,3 % Kaliumacetat ausgefällt. Nach dem Lösen des Präzipitats in Tris-Puffer für Sepharose-CL-6B (8.2.3.4) wurden ca. 50.000 dpm [^{35}S]-H_2SO_4 zugesetzt und die Probe auf eine Sepharose-CL-6B-Chromatographie-Säule (Pharmacia-XK16, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen, die in Tris-Puffer für Sepharose-CL-6B äquilibriert worden war. Fraktionen von 1 ml wurden mit Hilfe des Fraktionssammlers aufgefangen und die Radioaktivität eines Aliquots von 500 µl jeder Fraktion mit dem Szintillationsmessgerät ermittelt. Anschließend wurde rechnerisch der scheinbare Verteilungskoeffizient (2.2.4.5) jeder Fraktion bestimmt.

2.2.5 Präparation der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus der Zellkultur wurde das *single-step*-Verfahren nach Chomczynski et al. (31) angewendet.

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, bevor 800 µl der Guanidinthiocyanat-Lösung (8.2.4.1) auf die Zellen gegeben wurden, um diese zu lysieren. Nach Überführen in ein 2 ml fassendes Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 80 µl einer 2 M Natriumacetat-Lösung, 800 µl wassergesättigten Phenols (Sigma, Deisenhof) und 160 µl eines 49:1-Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches hinzugefügt, wobei nach Zugabe jeder Lösung gemischt wurde. Es folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Die sich anschließende Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4°C) führte zu einer Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml fassendes Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Es schloss sich die Zugabe von 800 µl Isopropanol zu den Proben an, die dann bei –20°C 3-12 Stunden inkubiert wurden, um die Fällung der RNA zu erreichen. Die bei der anschließenden Zentrifugation erhaltenen Präzipitate wurden

erneut in Guanidinthiocyanat-Lösung (400 µl) gelöst, mit 400 µl Isopropanol versetzt und über Nacht bei –20°C inkubiert. Dieser Fällvorgang wiederholte sich ein drittes Mal, bevor die Pellets aufeinanderfolgend 2x in 75 %igem Ethanol und 1x in absolutem Ethanol gewaschen wurden. Nachdem die Präzipitate luftgetrocknet waren, wurden sie in 30 µl DEPC-Wasser gelöst, und der RNA-Gehalt photometrisch ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –80°C eingefroren.

2.3 Untersuchung der Proteoglykan-mRNA-Expression

2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA

Die elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in Anlehnung an das Verfahren nach Maniatis et al. (42) mittels eines formaldehydhaltigen 1 %igen Agarose-Gels (8.2.4.2).

Die aus den RNA-Präparationen (2.1.2 und 2.2.5) gewonnenen Proben wurden auf Eis aufgetaut und das einer Gesamt-RNA-Menge von 10-20 µg entsprechende Volumen entnommen. Nach dem Ergänzen des Volumens mit DEPC-Wasser auf 10 bzw. 20 µl wurde das 1,7-fache an RNA-Probenpuffer (8.2.4.2) zugesetzt, die Proben für 5 min bei 68°C im Thermoschüttler (Eppendorf 5436, Hamburg) denaturiert und auf Eis gestellt. Gleichzeitig wurden 1,5 µl eines RNA-Molekulargewichtsstandards (Konzentration: 1 µg/µl, 0,24-9,5 Kb RNA-Ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) entnommen und wie die Proben behandelt. Nach Zusatz des Farbstoffs Orange-G (8.2.4.2) wurden die Proben und der RNA-Molekulargewichtsstandard auf das Agarose-Gel aufgetragen, welches bereits in der Elektrophoresekammer (Horizon-11.14, Gibco BRL-Life Technologies, Eggenstein) im RNA-Laufpuffer (8.2.4.2) äquilibriert worden war, und bei 12 mA über Nacht aufgetrennt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde die ribosomale RNA in einer Ethidiumbromid-Lösung (8.2.4.2) für 30 min gefärbt, anschließend für 30 min in dem RNA-Laufpuffer entfärbt, bevor sie unter einem UV-Schirm (UV-Transluminator, Biometra, Göttingen) sichtbar gemacht wurde. Die Fluoreszenz der ribosomalen RNA (18S und 28S) wurde mit einer Digitalkamera fotografiert und diente bei der Auswertung als Maß für die aufgetragene RNA-Menge.

2.3.2 Transfer der Gesamt-RNA auf Nylonmembran

Der Transfer der Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech UK) erfolgte nach dem Northern-Blot-Verfahren (42). Vor dem eigentlichen Transfer wurde die in dem Gel aufgetrennte RNA fragmentiert. Dazu wurde das Gel für 30 min in einer 50 mM NaOH/10 mM NaCl-Lösung geschwenkt, anschließend für 30 min in 0,1 M Tris-HCl-Lösung, pH 7,4 neutralisiert und für 30 min in 20x SSPE-Puffer (8.2.4.2) äquilibriert. Der Transfer erfolgte vertikal über 12-15 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss an den Transfer wurden die Banden der ribosomalen RNA sowie die Auftragshöhe der RNA auf der Membran markiert. In ein Whatman Chromatographiepapier eingeschlagen wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank erhitzt, um die RNA auf der Membran zu fixieren.

2.3.3 Spezifischer Nachweis von Proteoglykan-mRNA

Zum Nachweis spezifischer Proteoglykan-mRNA-Moleküle und der 18S RNA wurde die Membran mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden der entsprechenden Ziel-mRNA hybridisiert. Als cDNA-Sonden wurden Biglykan und Decorin in einer Konzentration von 0,25 µg / µl eingesetzt. Die Ziel-mRNA von Biglykan hat eine Größe von 2446 bp, die von Decorin eine Größe von 1547 bp. Zum Markieren der 18S RNA ist ein Oligonukleotid der folgenden Sequenz verwendet worden: 5´-TTGCTTGCTCTGAGACCGTA-3´.

Die fixierte Membran wurde zunächst mit DEPC-Wasser, dann mit 5x SSPE-Puffer (8.2.4.2) angefeuchtet. Es folgte die Prähybridisierung der Membran in 20 ml Hybridisierungslösung (Rapid-hyb-buffer, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) für 30 min bei 65°C in einem Hybridisierungssofen (Biometra OV 1, Biometra, Göttingen). Die cDNA der Ziel-mRNA wurde mit [^{32}P]-alpha-dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) nach dem *Random-Prime-Labelling*-System (Rediprime^{TM}II, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) entsprechend den Vorschriften des Herstellers radioaktiv markiert. Nach Zugabe der markierten cDNA-Sonden zur Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung für 60 min bei 65°C. Es schlossen sich den jeweiligen cDNA-Sonden entsprechend unterschiedliche Waschprotokolle an, um den Anteil unspezifisch

gebundener cDNA-Sonden zu entfernen. Folgendes Waschprotokoll für Biglykan wurde im Hybridisierungsofen durchgeführt:

Zeit	Lösung	Temperatur
2x 5 min	ca. 50 ml 2x SSPE, 0,1 % SDS	50°C
1x 20 min	ca. 150 ml 2x SSPE, 0,1 % SDS	50°C
2x 20 min	ca. 150 ml 0,3x SSPE, 0,1 % SDS	65°C

Das Waschprotokoll für Decorin ist aufgrund der geringeren Länge der cDNA-Sonde bei weniger stringenten Bedingungen im Hybridisierungsofen durchgeführt worden:

Zeit	Lösung	Temperatur
1x 5 min	ca. 50 ml 2x SSPE, 0,1 % SDS	50°C
1x 10 min	ca. 50 ml 2x SSPE, 0,1 % SDS	37°C

Anschließend wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette mit Verstärkerschirm (BioMax-Folie, Kodak GmbH, Stuttgart) auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die erste Exposition erfolgte für 4 Stunden bei –80°C, weitere Expositionszeiten wurden entsprechend der Signalstärke der ersten Exposition ausgewählt. Eine Quantifizierung der Signale erfolgte nach dem Scannen der Autoradiographien durch densitometrische Berechnungen mit Hilfe der Scion-Image-Software
(http://www.scioncorp.com:8080/Downloads/fr._login.htm, 25.11.2002).

2.3.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.3.4.1 RT-PCR zur Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt in Ratten

Die Untersuchung der mRNA-Expression von Biglykan und Decorin nach Myokardinfarkt wurde in Anlehnung an Saiki et al. (43) mit Hilfe der semiquantitativen Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Dazu wurde das Qiagen®-OneStep-RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, welches in einem Reaktionsansatz zunächst die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) vornimmt und direkt die Amplifizierung der Ziel-cDNA

(PCR) anschließt. Als interner Standard, mit Hilfe dessen eine spätere Quantifizierung möglich wurde, wurde in denselben Reaktionsansätzen die cDNA von Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), einem *housekeeping*-Gen, amplifiziert.

Es wurden 1,5 µl der RNA-Lösung (100 ng/µl) für die RT-PCR verwendet. Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde eine RT-PCR-Reaktionsmischung hergestellt, die die folgenden Bestandteile beinhaltete (die Mengen gelten beispielhaft für einen Ansatz):

	Konzentration	Volumen
dNTP-Mischung	10 mM	0,4 µl
PCR-Puffer	5x	2 µl
Q-Solution	5x	2 µl
sense-, und *antisense*-Primer des Proteoglykans	10 µM	0,6 µl
sense-, und *antisense*-Primer von GAPDH	5 µM: Biglykan, Decorin 10 µM: Collagen-Typ I-alpha	0,5 µl
Enzymmischung (Reverser Transkriptase, Taq-Polymerase)		0,4 µl
RNAse-freies Wasser		1,5 µl

Zunächst wurde die RT-PCR durchgeführt (30 min, 50°C; 15 min, 95°C). Im Anschluss folgte die PCR unter den folgenden Temperaturschritte: 95°C, 30 sek; 58°C, 30 sek; 72°C, 40 sek. Je nach Ziel-cDNA wurde die Anzahl der Zyklen variiert: 33 Zyklen für Biglykan, 27 Zyklen für Decorin und 25 Zyklen für Collagen-Typ I-alpha. Parallel wurde jeweils die cDNA von GAPDH als interner Standard amplifiziert.

Die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung von 2 Volumenteilen des RT-PCR-Produktes und 1 Volumenteils Auftragspuffer RT-PCR (8.2.4.3) erfolgte auf einem 2 %igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel in TAE-Puffer (8.2.4.3). Die Banden wurden mittels UV-Licht detektiert und mit Hilfe des UV-Transluminators digital fotografiert und dokumentiert. Eine Quantifizierung der Signale erfolgte durch

densitometrische Berechnungen mit Hilfe der Quantity-One®-Software der Firma Bio Rad.

Es wurden die folgenden Primer verwendet:

Biglykan	*sense*-Primer	5´-GATGACTTCAAAGGCCTCCA-3´
Spezies: Ratte	anti-*sense*-Primer	5´-TCAGGCTCCCATTCTCAATC-3´
Decorin	*sense*-Primer	5´-ATCTCCGAGTGGTGCAGTG-3´
Spezies: Ratte	anti-*sense*-Primer	5´-TGTCGTGGAGTCGAAGCTC-3´
Collagen-Typ I-alpha	*sense*-Primer	5´-GCAAACAAGGTCCTTCTGGA-3´
Spezies: Ratte	anti-*sense*-Primer	5´-ACCAGAGAAGCCACGATGAC-3´
GAPDH (zusammen mit Biglykan, Collagen	*sense*-Primer	5´-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3´
Spezies: Mensch	anti-*sense*-Primer	5´-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3´
GAPDH (zusammen mit Decorin)	*sense*-Primer	5´-TCAAGGCTGAGAATGGGAAG-3´
Spezies: Mensch	anti-*sense*-Primer	5´-TACTCAGCACCAGACTCACC-3´

2.3.4.2 RT-PCR zur Charakterisierung der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen 1 und 2 von kultivierten kardialen Fibroblasten

Die Untersuchung zur Expression der Angiotensin II-Rezeptorsubtypen 1 und 2 wurde mit Hilfe der PCR durchgeführt worden. In zwei getrennten Schritten wurden zunächst 5 µg der nach Abschnitt 2.2.5 isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe des Superscript™Präamplifizierungssystems (Gibco) nach Anweisung des Herstellers in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. Unter Einsatz eines Oligo(dT)-Primers erfolgte mittels der reversen Transkriptase zunächst die Synthese der cDNA, bevor durch den Zusatz von RNAse der cDNA-Einzelstrang freigelegt wurde.

Die Amplifizierung der Ziel-cDNA wurde in einem zweiten Schritt unter Verwendung der jeweils für den AT1-, bzw. AT2-Rezeptor spezifischen Primer durchgeführt. Als interner Standard ist gleichzeitig eine PCR für die cDNA von ß-Aktin, einem *housekeeping*-Gen, angefertigt worden.

Sowohl die PCR für die 438 bp große Teilsequenz des AT1a-Rezeptors, als auch die PCR für die gesamte kodierende Region des AT2-Rezeptors erfolgte, indem die cDNA zunächst für 5 min bei 95°C erhitzt wurde. Im Anschluss daran wurde das im Folgenden aufgeführte Temperaturprofil zur Amplifizierung der cDNA 35x durchlaufen: 94°C, 30 sek; 57°C, 5 min; 72°C, 1 min. Die Fertigstellung der PCR fand durch eine 5-minütige Inkubation bei 72°C statt. Das PCR-Produkt wurde auf einem 2 %igen Agarosegel zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (100 bp-DNA-Ladder, Invitrogen) aufgetrennt und digital fotografiert.

AT1a-Rezeptorfragment	*sense*-Primer	5´-GAGTCCTGTTCC ACCCGATCACCGATCAC-3´
Spezies: Ratte (44)	anti-*sense*-Primer	5´-GGATGACGCCCAGCT GAATCAGCACATCC-3´
AT2-Rezeptor	*sense*-Primer	5´-CCAAGATTCATTTTA AGGAGTGCGTGTGG-3´
Spezies: Ratte (45)	anti-*sense*-Primer	5´-CCTCTAGATCCATTG CTAGGCTGATTACA-3´
ß-Aktin	*sense*-Primer	5´-ATGGATGATGATATCGCCGCG-3´
Spezies: Mensch	anti-*sense*-Primer	5´-CTAGAAGCATTTGCG GTGGACGATGGAGGGGCC-3´

Die Primer wurden bei Eurogentec, Seraing, Belgien bestellt.

2.4 Statistische Auswertung

In allen Abbildungen sind die Daten als arithmetische Mittelwerte dargestellt. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Alle graphischen Darstellungen und statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Graph-Pad-Software 3.0 (Graph-Pad, Institute for Scientific Information, San Diego, USA) angefertigt. Der jeweils verwendete Test zur Ermittlung der Signifikanz ist in den Legenden der Abbildungen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der EZM-Expression an kultivierten kardialen Fibroblasten

3.1.1 Charakterisierung der Zellen

3.1.1.1 Immunfluoreszenz

Die Validierung des Verfahrens der Isolierung und Kultivierung der kardialen Fibroblasten aus den Ventrikeln der Herzen 2-3 Tage alter WKY-Ratten (2.2.1) erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die gegen zelluläre Strukturen gerichtet waren, anhand derer kardiale Fibroblasten von kardialen Myozyten unterschieden werden konnten.

Die zur Identifizierung der Fibroblasten eingesetzten, direkt-markierten Antikörper gegen αSMA konnten bei einer Wellenlänge von 543 nm (rot) zur Fluoreszenz angeregt werden, wohingegen die zur Markierung der Myozyten verwendeten Primärantikörper gegen sarkomeres Aktin (sarkAkt) mit Hilfe von Sekundärantikörpern nachgewiesen wurden, der bei einer Wellenlänge von 488 nm (grün) fluoreszierte.

Abbildung 3a und b zeigen denselben Ausschnitt einer gefärbten Fibroblasten-Kultur des Fluoreszenz-Mikroskops, wobei Abbildung 3a das Ergebnis der Anregungswellenlänge (543 nm) für αSMA zeigt, Abbildung 3b das der Anregungswellenlänge (488 nm) für sarkAkt. In Abbildung 3a war bei gleicher Lichtintensität eine deutliche Fluoreszenz der Fibroblasten zu erkennen, wohingegen sich bei 488 nm nur schwach Zellen vor dem Hintergrund abzeichnen. Diese unspezifische Färbung kann auf eine höhere Streulichteinwirkung zurückzuführen sein.

Mit dem Laser-Scan-Mikroskop entstanden Aufnahmen (Abbildung 3c, d) der als Positivkontrolle dienenden Myozyten-Kultur, in der sich jedoch zahlreiche Fibroblasten befanden. Rot fluoreszierend zeigte sich αSMA in den Fibroblasten in Form von spindelförmigen, sich durch die gesamte Zelle erstreckenden Fasern. Bei Übereinanderlegen der Bilder beider Wellenlängen, die bei derselben Intensität des anregenden Lichtes aufgenommen wurden, fluoreszierte der gesamte Myozyt in

intensivem Grün (Abbildung 3c). Bei schwächerer Lichteinstrahlung (Bild nicht gezeigt) war sarkAkt im Vergleich zu αSMA diffuser angeordnet, jedoch auch in Form eines Netzwerks zu erkennen. Die Färbung zeigte, dass beide Antikörper kaum eine Kreuzreaktivität aufwiesen, die sich bei einer Überlagerung der Aufnahmen beider Wellenlängen in gelb zeigen würde (Abbildung 3c, d). Z.T. waren gelb erscheinende Zellen zu sehen, die eine Co-Lokalisation der beiden markierten Strukturelemente zeigte, wobei es sich um Myozyten handeln könnte, die sich in der Transformation zu αSMA-exprimierenden Zellen befanden (Aufnahme nicht gezeigt).

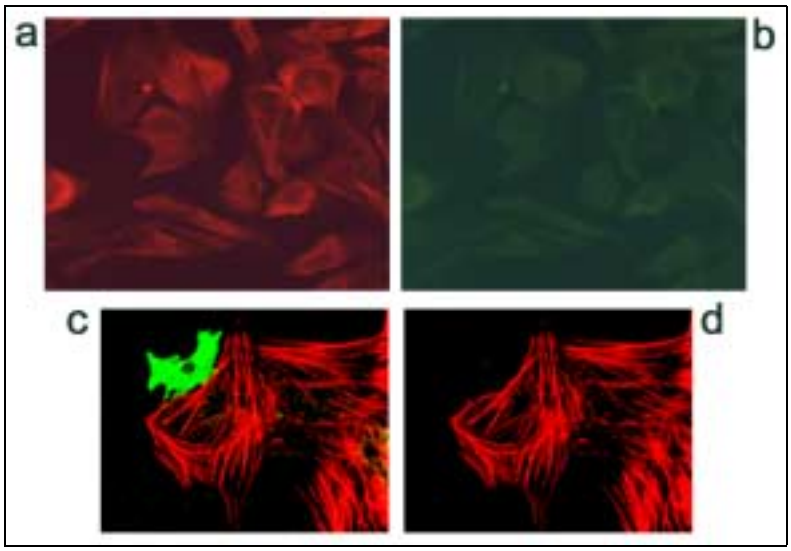


Abbildung 3 Immunfluoreszenz zur Zellcharakterisierung

Immunfluoreszenz kardialer Fibroblasten und kardialer Myozyten mit Antikörpern gegen αSMA (rot, 543 nm) und sarkAkt (Sekundärantikörper: grün, 488 nm). Abbildung (a) und (b) zeigen eine Doppelfärbung kardialer Fibroblasten markiert gegen αSMA und sarkAkt, aufgenommen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop, wobei (a) bei 543 nm, (b) bei 488 nm zur Fluoreszenz angeregt wurde. Abbildung (c) und (d) zeigen eine Doppelfärbung kardialer Myozytenkultur, wobei in (c) die Aufnahmen des Laser-Scan-Mikroskops der Anregungwellenlängen 543 und 488 nm übereinander gelegt wurden, (d) zeigt denselben Ausschnitt bei der Anregungwellenlängen 543 für αSMA.

3.1.1.2 Proteoglykane

Die beiden Proteoglykane (PG) Biglykan und Decorin, die im Fokus dieser Untersuchungen standen, wurden sowohl auf Ebene der mRNA-Expression, als auch auf Proteinebene untersucht.

Der Nachweis der mRNA von Biglykan und Decorin mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens (2.3.3) erfolgte dabei auf derselben Membran in dem zeitlichem Abstand, der für ein Abklingen der Radioaktivität des an die cDNA der Ziel-mRNA enzymatisch

gekoppelten [^{32}P]-Isotopes nötig war. Da gleiche Mengen an Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen waren, konnte gezeigt werden, dass die Expression der Biglykan-mRNA deutlich stärker ausgeprägt war, als die der Decorin-mRNA, die kaum nachweisbar war (Abbildung 4).

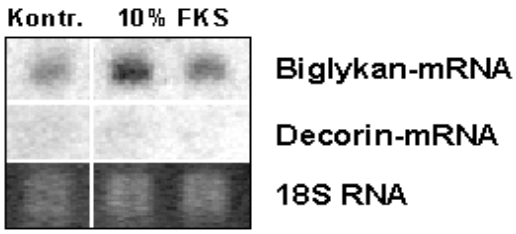


Abbildung 4 Nachweis der mRNA von Biglykan und Decorin mittels Northern-Blot

Kardiale Fibroblasten wurden mit 10 % FKS für 24 Stunden behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Die Membran wurde radioaktiv mit einer spezifischen cDNA-Sonde für humanes Biglykan oder Ratten-Decorin markiert. Die Ethidiumbromidfärbung der 18S RNA diente als Kontrolle für die Gel-Beladung. Vertikal sind links die Banden der Kontrollbedingung, rechts jeweils 2 Banden für die stimulierte Bedingung zu sehen.

Des Weiteren wurde die Protein-Expression von Biglykan und Decorin mittels Western-Blot-Verfahren (Abbildung 5) nachgewiesen. Dabei wurde für den Nachweis des Decorin deutlich mehr Medium aufgereinigt und Protein aufgetragen, so dass im Gegensatz zum Northern-Blot keine quantitative Aussage anhand des Western-Blots möglich ist.

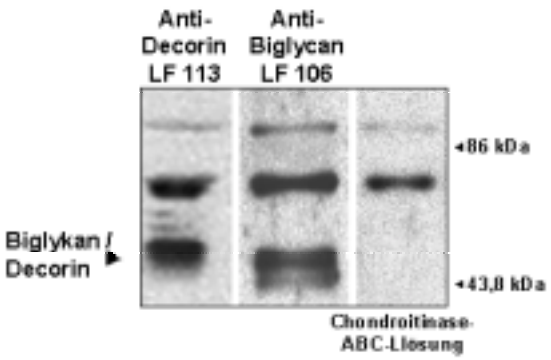


Abbildung 5 Nachweis der Proteoglykane Biglykan und Decorin mittels Western-Blot

Kardiale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit Kulturmedium behandelt. Unterschiedliche Volumina des Mediums wurde mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und mit Chondroitinase-ABC-Lösung bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 10 %gen SDS-PA-Gel, der Transfer auf eine Nylonmembran. Anschließend wurde mit Primärantikörpern gegen murines Biglykan (1:1000) oder murines Decorin (1:1000) markiert, die nachfolgend mit peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (*goat anti-rabbit IgG*, 1:10.000) detektiert wurden. Die rechte Spur zeigt die charakteristischen Banden Chondroitinase-ABC-Lösung.

Mit einer weiteren Methode, dem SDS-PA-Gradienten-Gel, das mit $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierten PG aus dem Kulturmedium angefertigt wurde, konnte festgestellt werde, dass Biglykan das vorherrschende PG war, das von den kardialen Fibroblasten exprimiert wurde.

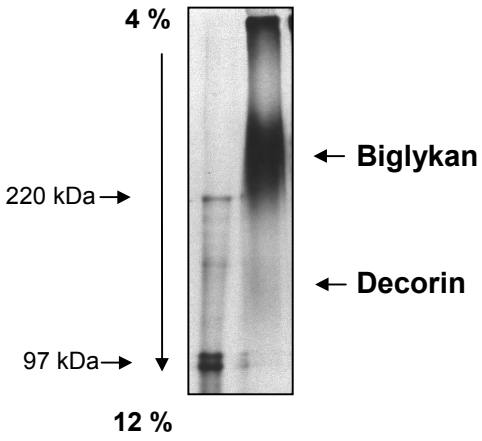


Abbildung 6 Nachweis der Expression von Biglykan mittels SDS-PA-Gradienten-Gel

Kardiale Fibroblasten wurden für 24 Stunden unter Zusatz von 30 µCi/ml [^{35}S]SO_4^{2-}mit Kulturmedium inkubiert, das Medium mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt und 20.000 dpm auf einem SDS-PA-Gradienten-Gel (4 %-12 %) aufgetrennt.

3.1.2 Beeinflussung der Proteoglykan-Sekretion und -Expression

3.1.2.1 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflussen neben der Proliferation (46) die Synthese und Sekretion von EZM-Molekülen z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) (47), (48). Zu den bekannten Induktoren von Synthese und Sekretion von PG gehört PDGF BB.

Radiosulfat wurde metabolisch in die GAG-Ketten der PG eingebaut, die von den kardialen Fibroblasten in das Kulturmedium sezerniert wurden. Die Stimulation mit PDGF BB (Kontrolle: 519 ± 32 dpm; 10 ng/ml: 907 ± 48 dpm), TGF-ß1 (Kontrolle: 449 ± 20 dpm; 10 ng/ml: 661 ± 49 dpm) oder Thrombin (Kontrolle: 141 ± 9 dpm; 100 nM: 265 ± 22 dpm) verursachte jeweils eine signifikanten Erhöhung der Sekretion der metabolisch markierten PG (2.2.4.1, Abbildung 7). Für PDGF BB konnte daneben eine im SDS-PA-Gradienten-Gel (2.2.4.4) deutlich sichtbare Erhöhung des Radiosulfateinbaus in die GAG-Ketten des Biglykan (Abbildung 8) gezeigt werden. Biglykan konnte dabei aufgrund eines Molekulargewichtstandards identifiziert werden konnte.

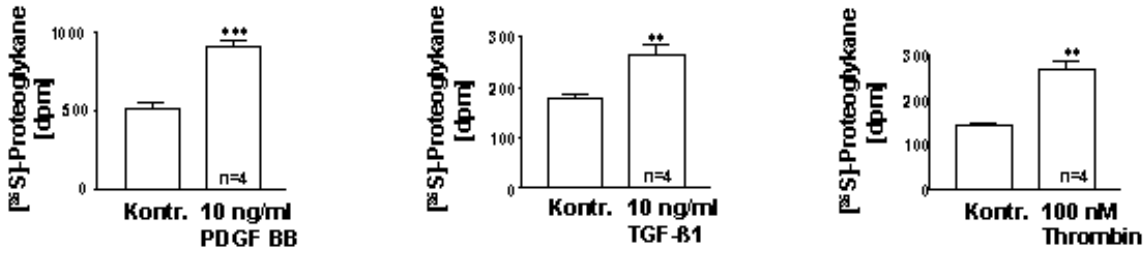


Abbildung 7 Wachstumsfaktoren und Zytokine steigern die Sekretion von metabolisch markierten Proteoglykanen

Kardiale Fibroblasten wurden mit 10 ng/ml PDGF BB, 10 ng/ml TGF-ß1 und 100 nM Thrombin für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert (n=4, Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0{,}001$; **: $p < 0{,}01$, ermittelt mittels ungepaartem t-Test).

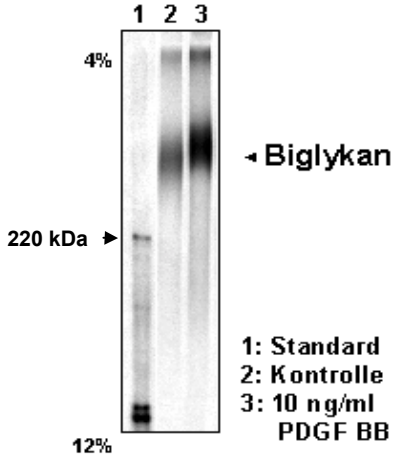


Abbildung 8 Induktion der Biglykan-Sekretion durch PDGF BB

Kardiale Fibroblasten wurden mit 10 ng/ml PDGF BB für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Die sezernierten PG wurden mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt, gleiche Anteile entsprechend dem ursprünglichen konditionierten Mediums auf einem SDS-PA-Gradienten-Gel (4 %-12 %) aufgetrennt und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt.

Nachfolgend wurden verschiedene Stimuli in Bezug auf die Induktion der PG-Sekretion verglichen, wobei der Effekt unter PDGF BB-Stimulation als Vergleichseffekt (100 %) diente. Dabei zeigte sich (Abbildung 9), dass 10 % FKS eine signifikante Steigerung der PG-Sekretion (2.2.2.4) (98,3 ± 8,0 %) hervorrief, die äquivalent zum PDGF BB-Effekt war. Thrombin (74,9 ± 8,5 %), wie auch TGF-ß1 (71,4 ± 9,5 %) verursachten eine quantitativ geringere, jedoch signifikante hohe Steigerung der PG-Sekretion hervor. Die Stimulation mit TNF-alpha (63,5 ± 2,9 %) zeigte eine schwache, aber noch immer signifikant höhere Sekretion als die Basal-

sekretion, wohingegen bei der Behandlung mit IL-1ß (54,6 ± 5,0 %) eine mit der Basalsekretion vergleichbare (53,9 ± 3,2 %) zu beobachten war.

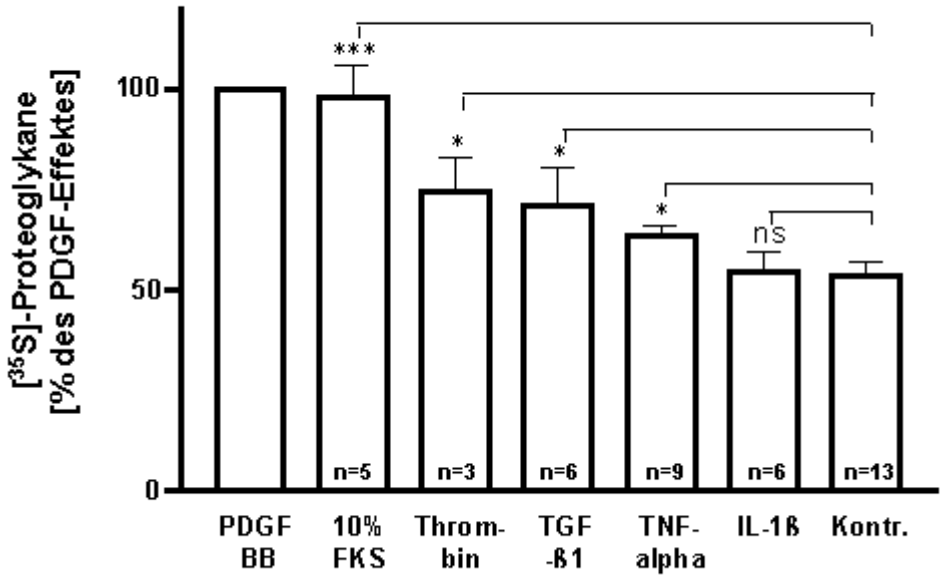


Abbildung 9 Induktion der Proteoglykan-Sekretion durch Wachstumsfaktoren und Zytokine

Kardiale Fibroblasten wurden mit den entsprechenden Stimuli in den folgenden Konzentrationen unter Zusatz von 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ für 24 Stunden behandelt: 10 ng/ml PDGF BB, 10% FKS, 100 nM Thrombin, 10 ng/ml TGF-ß1, 10 ng/ml TNF-alpha, 0,1 ng/ml IL-1ß. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Die Daten wurden ausgedrückt als Prozent der PDGF BB Stimulation (Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ermittelt mittels ANOVA und nachfolgendem ungepaarten t-Test).

Im Anschluss an den Vergleich verschiedener, an den Umbauprozessen nach Myokardinfarkt beteiligter Proteine, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der drei stärksten Induktoren der PG-Sekretion (2.2.4.1) untersucht. Die Steigerung der PDGF BB-Konzentration von 1 über 5 nach 10 ng/ml zeigte, dass die Sekretion der markierten PG mit steigender Konzentration zunahm (Abbildung 10, 1 ng/ml: 117,3 ± 12,0 %; 5 ng/ml: 172,0 ± 16,4 %; 10 ng/ml: 266,0 ± 72,1 %).

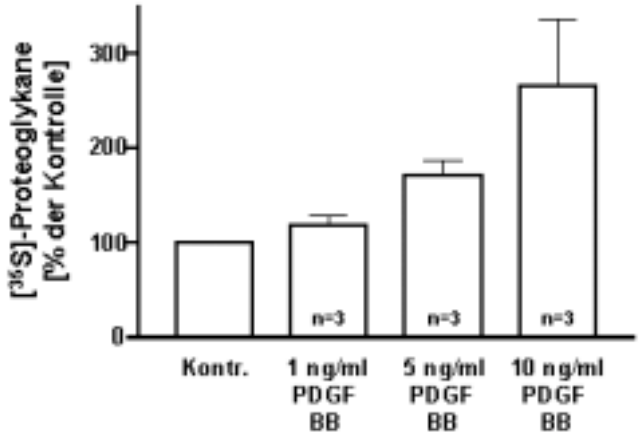


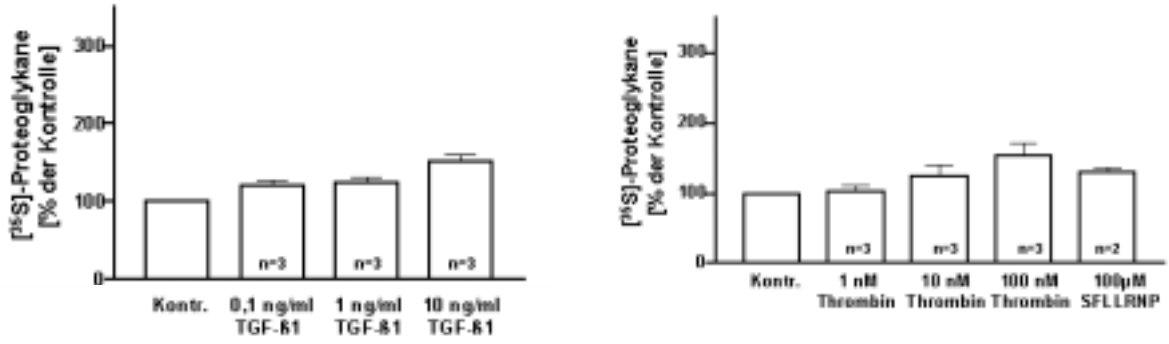
Abbildung 10 PDGF BB steigert konzentrationsabhängig die Sekretion der Proteoglykane

Kardiale Fibroblasten wurden mit 1, 5 und 10 ng/ml PDGF BB für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2}$-markierte PG wurden nach der CPC-Präzipitation quantifiziert. Gezeigt sind auf die unstimulierte Kontrolle normierten Daten (n=3, Mittelwert ± SEM).

Der Effekt von TGF-ß1 und Thrombin erwies sich ebenfalls als konzentrationsabhängig, der maximal mögliche sekretionssteigernde Effekt war jedoch geringer als der von PDFG BB. Abbildung 11 A zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt der TGF-ß1-Stimulation auf die PG-Sekretion (0,1 ng/ml: 120,7 ± 6,5 %; 1 ng/ml: 123,9 ± 8,0 %; 10 ng/ml: 151,5 ± 9,5 %), Abbildung 11 B den des Thrombin (1 nM: 102,4 ± 10,4 %; 10 nM: 125,0 ± 17,1 %; 100 nM: 154,6 ± 17,5 %). Mit SFLLRNP, einem Agonisten am PAR-1-Rezeptor, kam ein Hepta-Peptid zum Einsatz, das einen ähnlichen Effekt der Sekretionssteigerung aufwies (131,1 ± 6,0 %), wie 10 nM Thrombin.

Abbildung 11 A, B TGF-ß1 und Thrombin steigern konzentrationsabhängig die Sekretion der Proteoglykane

A B



Kardiale Fibroblasten wurden mit (A) 0,1, 1 und 10 ng/ml TGF-ß1 oder (B) 1, 10 und 100 nM Thrombin für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Gezeigt sind auf die unstimulierte Kontrolle normierten Daten (n=3, Mittelwert ± SEM).

Bei den Umbauprozessen des Myokards in Folge eines ischämischen Ereignisses spielen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen eine Rolle, unter ihnen PDGF BB, TGF-ß1 und TNF-alpha, die in den vorangegangenen Experimenten bereits untersucht wurden. Dabei konnte neben PDGF BB mit TGF-ß1 ein weiterer Wachstumsfaktor identifiziert werden, der die Sekretion von PG in kardialen Fibroblasten steigerte.

Im Folgenden war von Interesse, wie sich die Kombination zweier Stimuli auf die Sekretion auswirken kann. Dabei konnte nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit TNF-alpha und anschließender Behandlung mit der Kombination aus PDGF BB mit TNF-alpha eine synergistische Stimulation der Proteoglykan-Sekretion (2.2.4.1) von 167,4 % auf 208,5 % festgestellt werden (Abbildung 12; PDGF BB: 167,4 ± 4,6 %; PDGF BB + TNF-alpha: 208,5 ± 8,6 %; TNF-alpha: 114,3 ± 4,1 %). Im Gegensatz dazu verblieb bei der Kombination aus TGF-ß1 mit TNF-alpha nach gleichartiger Vorbehandlung der Zellen die Sekretion auf dem Niveau der Basalsekretion (TGF-ß1: 141,6 ± 11,0 %; TGF-ß1 + TNF-alpha: 142,7 ± 13,4 %; TNF-alpha: 114,3 ± 4,1 %).

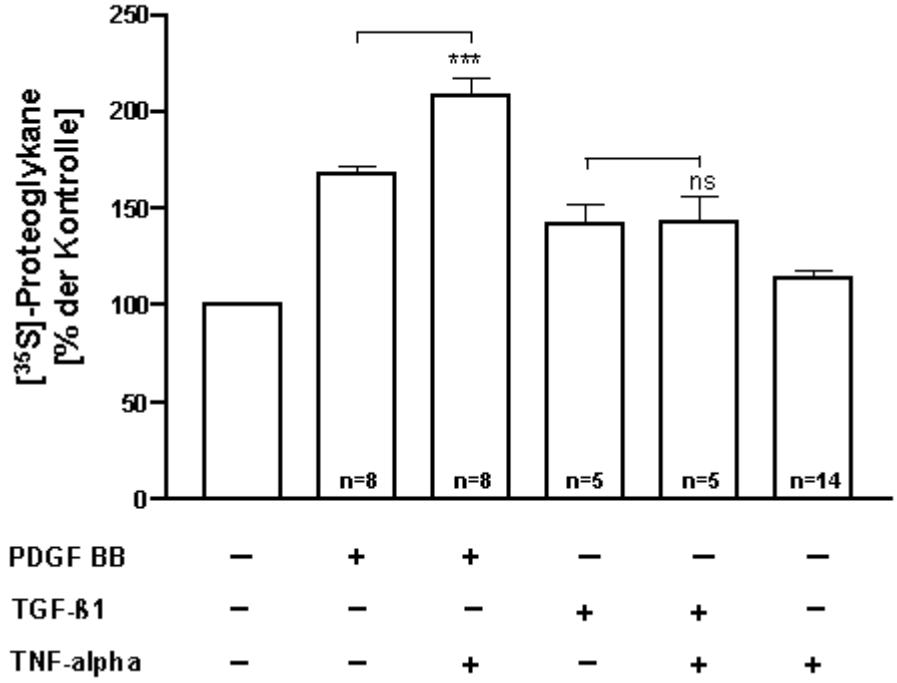


Abbildung 12 Synergistische Stimulation der Sekretion von Proteoglykanen durch TNF-alpha und PDGF BB

Kardiale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit TNF-alpha (10 ng/ml) vorinkubiert, anschließend mit einer Kombination aus PDGF BB (10 ng/ml) oder TGF-ß1 (10 ng/ml) mit TNF-alpha (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und mit 10 µCi/ml [^{35}S]SO_4^{2-} markiert. Ins Medium sezernierte, [^{35}S]SO_4^{2-}-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0{,}001$ ermittelt mittels ANOVA und nachfolgendem ungepaarten t-Test).

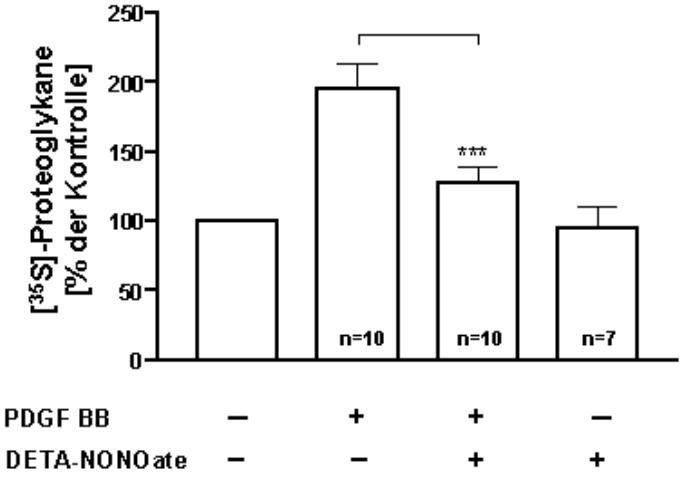
3.1.2.2 Stickstoffmonoxid

NO gilt als wichtiger Botenstoff bei den Umbauprozessen des Myokards nach Infarkt, so ist bekannt, dass NO die Größe des Infarktgebietes reduziert. Zusätzlich soll es verantwortlich sein für eine verminderte Collagen-Produktion durch die kardialen Fibroblasten (49).

3.1.2.2.1 Hemmung der Proteoglykan-Sekretion durch Stickstoffmonoxid

In dieser Arbeit wurde zunächst der quantitative Einfluss von NO auf die Sekretion der PG (2.2.2.4) untersucht. Die Kombination von PDGF BB als stimulierendem Agens mit dem NO-Donor DETA-NONOate löste eine signifikante Reduktion der

PDGF BB-stimulierten Sekretion der PG in das Kulturmedium von 195,5 % auf 128,1 % aus (Abbildung 13).



PDGF BB			195,5 ± 18,1 %
PDGF BB	+	DETA-NONOate	128,1 ± 11,8 %
		DETA-NONOate	94,9 ± 15,2 %

Abbildung 13 Hemmung der Proteoglykan-Sekretion durch NO

Kardiale Fibroblasten wurden mit DETA-NONOate (100 µM) und PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml [^{35}S]SO_4^{2-} markiert. DETA-NONOate hat eine t½ von > 500 min. Ins Medium sezernierte, [^{35}S]SO_4^{2-}-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0{,}001$ ermittelt mittels ANOVA und nachfolgendem ungepaarten t-Test).

Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass der proliferationshemmende Effekt von NO die Reduktion der PDGF BB-stimulierten PG-Sekretion durch NO nicht beeinflusste. Bei Berücksichtigung der Zellzahl nach Ablauf der Stimulationszeit zeigte sich ein äquivalent großer Hemmeffekt der PG-Sekretion (Abbildung 14).

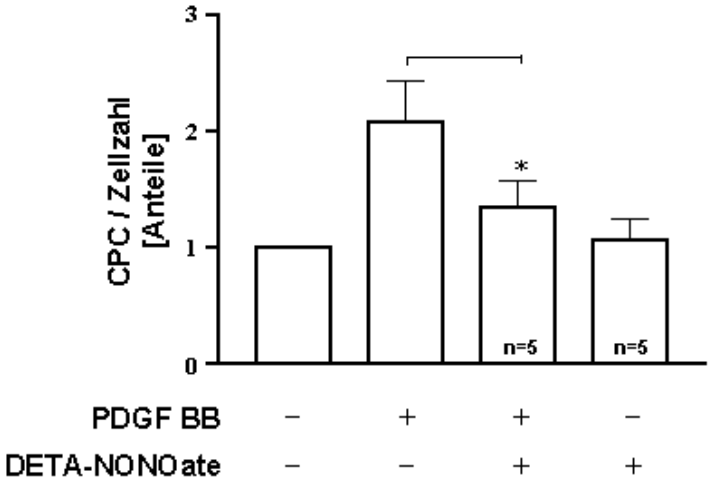
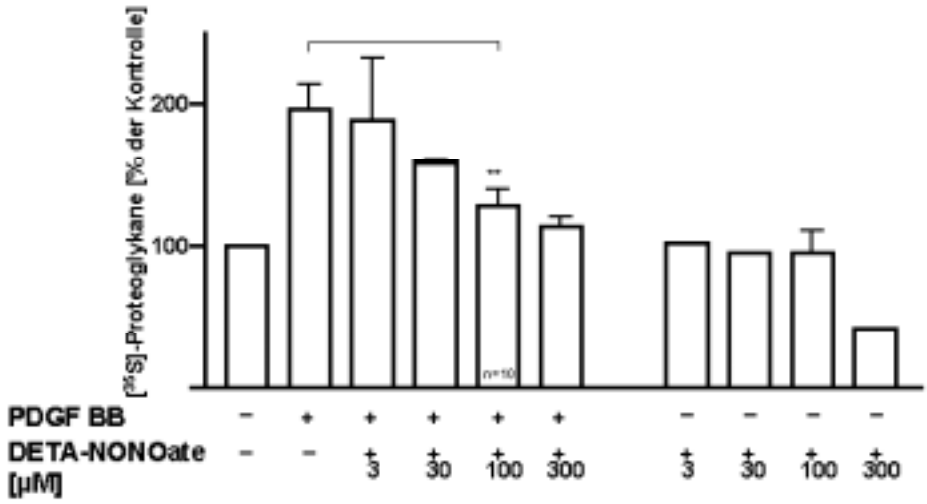


Abbildung 14 Hemmung der Proteoglykan-Sekretion durch NO unter Berücksichtigung der Zellzahl

Kardiale Fibroblasten wurden mit DETA-NONOate (100 µM) und PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Die Zellzahl wurde nach anschließend mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt und ein Quotient aus PG-Sekretion und Zellzahl gebildet (n=5, Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$; ermittelt mittels ANOVA und nachfolgendem ungepaarten t-Test).

Nachfolgend wurde die Konzentrationsabhängigkeit (Abbildung 15) der Hemmung der PG-Sekretion durch den NO-Donor DETA-NONOate gezeigt, wobei die Konzentration von 3 µM DETA-NONOate die Schwellenkonzentration für den hemmenden Effekt darstellte, da bei dieser Konzentration im arithmetischen Mittel kaum eine Reduktion erkennbar war. Bei Erhöhung der NO-Konzentration verdeutlichte sich der hemmende Effekt, bei einer Konzentration von 300 µM DETA-NONOate war die PDGF BB-stimulierte Sekretion nahezu vollständig unterdrückt.

Der Einsatz des NO-Donors ohne Zusatz des Wachstumsfaktors zeigte, dass erst in der Konzentration von 300 µM eine deutliche Reduktion der Basalsekretion der PG auftrat, in der später verwendeten Konzentration von 100 µM DETA-NONOate verblieb die Sekretion auf Höhe der Basalsekretion.



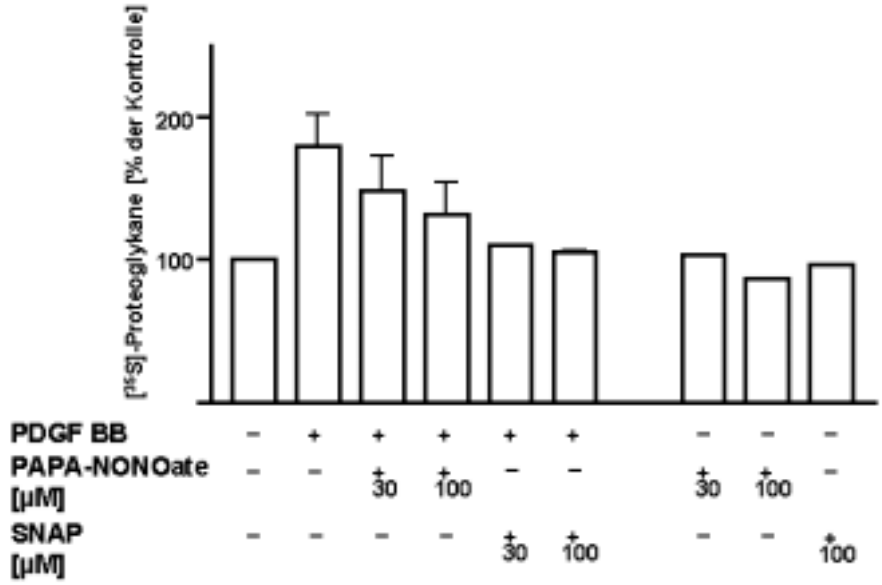
PDGF BB			195,5 ± 18,1 %
PDGF BB	+	3 µM DETA-NONOate	187,5 ± 44,9 %
PDGF BB	+	30 µM DETA-NONOate	158,4 ± 0,9 %
PDGF BB	+	100 µM DETA-NONOate	128,1 ± 11,8 %
PDGF BB	+	300 µM DETA-NONOate	113,6 ± 6,3 %

Abbildung 15 Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der Proteoglykan-Sekretion durch NO

Kardiale Fibroblasten wurden mit DETA-NONOate in den angegebenen Konzentrationen und PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (Mittelwert ± SEM; **: $p < 0,01$ ermittelt mittels ANOVA und nachfolgendem ungepaarten t-Test).

DETA-NONOate stellt NO über einen langen Zeitraum zu Verfügung ($t_{1/2}$: >500 min). Um die Frage zu klären, ob eine kontinuierliche NO-Freisetzung notwendig ist, um die PDGF BB-stimulierte Sekretion zu beeinflussen, wurden NO-Donoren kürzerer Halbwertzeit untersucht (Abbildung 16). Sowohl PAPA-NONOate mit einer Halbwertzeit von 76,6 min als auch SNAP, welches sehr schnell NO abgibt, senkten die Sekretion der PG in das Kulturmedium deutlich.

Beide NO-Donoren beeinträchtigten in den untersuchten Konzentrationen die Basalesekretion der PG nicht.



PDGF BB			179,7 ± 22,0 %
PDGF BB	+	30 µM PAPA-NONOate	148,4 ± 24,4 %
PDGF BB	+	100 µM PAPA-NONOate	131,8 ± 22,3 %
PDGF BB	+	100 µM SNAP	105,0 ± 1,3 %

Abbildung 16 Reduktion der Proteoglykan-Sekretion durch NO-Donoren mit kurzer t½ der NO-Freisetzung

Kardiale Fibroblasten wurden mit PAPA-NONOate und SNAP in den angegebenen Konzentrationen und PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. PAPA-NONOate hat eine t½ von 76 min , SNAP setzt NO sofort frei. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (n=2, Mittelwert ± SEM).

3.1.2.2.2 Bestimmung zytotoxischer Wirkungen der NO-Donoren

NO ist als Inhibitor der Proliferation von z.B. glatten Muskelzellen bekannt (50). Mit einem Zytotoxizitäts-Test (2.2.3.2) sollte ein entsprechender zytotoxischer Effekt unter den hier herrschenden Bedingungen während der Experimente ausgeschlossen werden. Die Resultate (Tabelle 1) zeigten, dass die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH), die mit der Toxizität der Substanzen korreliert, unter den für die weiteren Experimente verwendeten Konzentrationen zwar leicht anstieg, jedoch verglichen mit dem Effekt von TritonX-100 niedrig war. TritonX-100 diente als Positivkontrolle, unter deren Einfluss die Aktivität der LDH, die aus den geschädigten Zellen freigesetzt wurde, sehr hoch war (1700 %). Die LDH-Aktivität lag für PDGF BB

in Kombination mit 100 µM DETA-NONOate bei 179 % der unstimulierten Kontrolle, wurde die DETA-NONOate-Konzentration auf 300 µM angehoben, so lag die LDH-Aktivität bei 115 %.

Tabelle 1 Bestimmung zytotoxischer Wirkungen der NO-Donoren auf kardiale Fibroblasten

LDH-Aktivität		ohne PDGF BB	mit PDGF BB
		[%]	[%]
10 % TritonX-100		1700	
		100	103
DETA-NONOate	3 µM	109	113
	30 µM	127	143
	100 µM	358	179
	300 µM	191	115
PAPA-NONOate	30 µM	73	78
	100 µM	80	75
SNAP	100 µM	121	130

Kardiale Fibroblasten wurden mit DETA-NONOate, PAPA-NONOate oder SNAP in den angegebenen Konzentrationen ohne Zusatz von PDGF BB oder in der Kombination mit PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt. Als Positivkontrolle diente der Zusatz von 10 % TritonX-100 für 10 min vor Beendigung der Inkubationen. Die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) wurde mittels Zytotoxizitäts-Test bestimmt. Die Daten sind ausgedrückt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (n=2, Mittelwert ± SEM).

3.1.2.2.3 Regulation der mRNA-Expression von Biglykan

Die Untersuchung der Expression der Biglykan-mRNA (2.3.3) als dem in den kardialen Fibroblasten dominierenden PG sollte Aufschluss über den möglichen Einfluss der NO-Donoren auf die mRNA-Expression liefern. Zum Einsatz kam der langwirksame NO-Donor DETA-NONOate und der kurzwirksame SNAP.

Die Biglykan-mRNA-Expression (Abbildung 17) stieg unter Kontrollbedingungen im Zeitverlauf 6, 12 und 24 Stunden nur geringfügig an. Die Behandlung der Fibroblasten mit PDGF BB bewirkte in den Fibroblasten eine Steigerung der Biglykan-mRNA-Expression, die nach 12 Stunden ein Maximum erreichte. Nach 24 Stunden war die Erhöhung nur noch leicht im Vergleich zum Kontrollniveau. Wurden die NO-Donoren jeweils ohne den Wachstumsfaktor eingesetzt, so nahm

die mRNA-Expression des Biglykans unter Einfluss von DETA-NONOate im Zeitverlauf 6, 12 und 24 Stunden stetig ab. Unter der Behandlung mit SNAP, bei dem nur nach 24 Stunden eine Untersuchung erfolgte, zeigte sich eine Reduktion der Biglykan-mRNA-Expression im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbedingung. Die Experimente, bei denen PDGF BB in Kombination mit DETA-NONOate eingesetzt wurde, ergaben eine Inhibition der PDGF BB-stimulierten Biglykan-mRNA-Expression bereits nach 6 Stunden. Diese Abnahme setzte sich über 12 Stunden bis hin zum Zeitpunkt 24 Stunden fort. Nach 24 Stunden war die Biglykan-mRNA kaum noch detektierbar. Vergleichbar mit DETA-NONOate konnte nach 24-stündiger Behandlung der kardialen Fibroblasten mit SNAP die Expression der PDGF BB-stimulierten Biglykan-mRNA-Expression kaum noch detektiert werden.

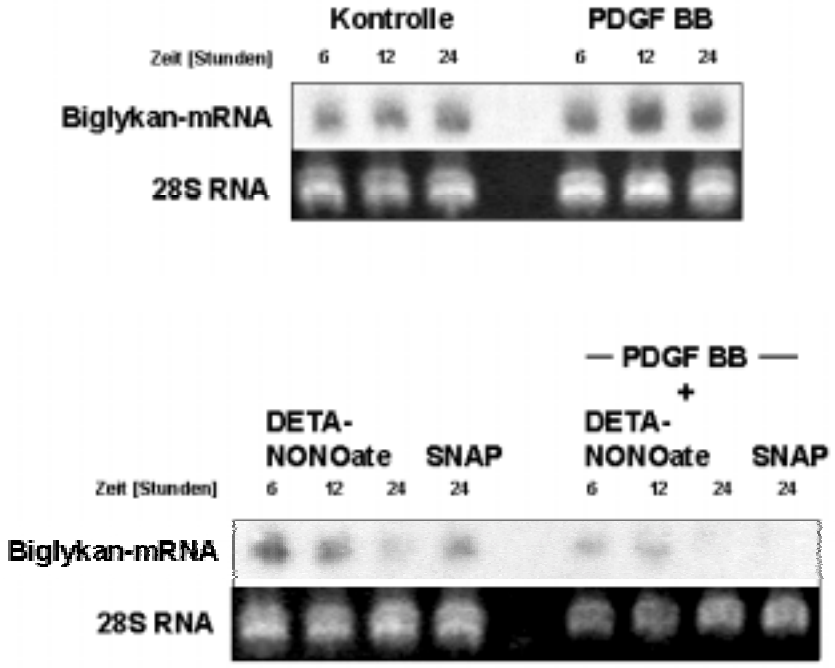


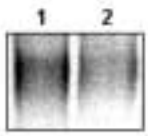
Abbildung 17 DETA-NONOate und SNAP reduzieren die Biglykan-mRNA-Expression

Kardiale Fibroblasten wurden mit DETA-NONOate (100 µM), SNAP (100 µM) und PDGF BB (10 ng/ml) für 24 Stunden behandelt. 20 µg Gesamt-RNA wurden mittels Northern-Blot-Verfahren mit einer spezifischen, an [^{32}P]-gekoppelten cDNA-Sonde für humanes Biglykan radioaktiv markiert. Die Ethidiumbromidfärbung der 28S RNA diente als Kontrolle für die Gel-Beladung.

3.1.2.2.4 Beeinflussung der Sekretion des Biglykan-Proteoglykans durch NO

Nachdem der hemmende Effekt verschiedener NO-Donoren auf die Sekretion von PG in das Kulturmedium (3.1.2.2.1) und die Inhibition der mRNA-Expression des

Biglykan (3.1.2.2.3) gezeigt werden konnte, wurde im Weiteren untersucht, ob sich auch eine Hemmung der Sekretion von endogen, mit $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markiertem Biglykan-PG nachweisen lies. Abbildung 18 stellt radioaktiv markiertes, mit Hilfe eines SDS-PA-Gradienten-Gels (2.2.4.4) aufgetrenntes Protein dar, wobei Spur 1 die PGs von kardialen Fibroblasten zeigt, die mit PDGF BB stimuliert wurden, und Spur 2 die PGs von kardialen Fibroblasten, die mit der Kombination von PDGF BB mit DETA-NONOate stimuliert wurden. Das Signal konnte anhand eines in dieser Abbildung nicht gezeigten Molekulargewichtsstandards als Biglykan identifiziert werden. Da Proben, die gleichen Volumina konditionierten Mediums entsprachen, auf das SDS-PA-Gradienten-Gel aufgetragen waren, konnte die Hemmung der Sekretion des Biglykan-Proteoglykans mit dieser Methode gezeigt werden.



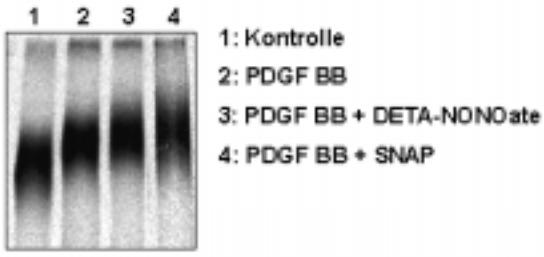
1: PDGF BB
2: PDGF BB + DETA-NONOate

Kardiale Fibroblasten wurden mit 10 ng/ml PDGF BB und 100 µM DETA-NONOate für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt, gleiche Anteile entsprechend dem ursprünglichen konditionierten Mediums auf einem SDS-PA-Gradienten-Gel aufgetrennt und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt.

Abbildung 18 DETA-NONOate hemmt die Sekretion des Biglykan-Proteoglykans

3.1.2.2.5 Veränderung des Molekulargewichts vom Biglykan-Proteoglykan

Im Rahmen der Auftrennung der mit Radiosulfat markierten PG mit Hilfe eines SDS-PA-Gradienten-Gels (2.2.4.4) wurde eine Vergrößerung des Molekulargewichts vom Biglykan-PG sowohl unter dem Einfluss von DETA-NONOate als auch unter dem Einfluss von SNAP erkennbar (Abbildung 19). Beide NO-Donoren wirkten in der Kombination mit dem Wachstumsfaktor PDGF BB.



SDS-PA-Gradienten-Gel (Sammelgel: 3,5 %, Trenngel: 4-12 %) gleicher Radioaktivitäts-mengen (20.000 dpm) von ins Medium sezernierten, [^{35}S]O_4^{2-}-markierten PG kardialer Fibroblasten, die mit 10 ng/ml PDGF BB, 100 µM DETA-NONOate und 100 µM SNAP für 24 Stunden behandelt wurden. Anschließend wurde eine Autoradiographie des Gels durchgeführt.

Abbildung 19 DETA-NONOate und SNAP erhöhen das Molekulargewicht des Biglykan-Proteoglykans

Um mit einer weiteren Methode den Einfluss von NO auf das Molekulargewicht des Biglykan-PG zu untersuchen, wurde nach Aufreinigung von konditioniertem Medium mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.4.2) eine Gel-Filtrations-Chromatographie (2.2.4.5) über eine Sepharose-CL-2B-Säule durchgeführt. Das Maximum des Mess-Signals, das sich aus der Kontrollbedingung ergab (scheinbarer Verteilungskoeffizient (K_D): 0,61), erfuhr eine Linksverschiebung (K_D: 0,56), die eine Molekulargewichtsveränderung bedeutete, wenn die Fibroblastenkultur mit PDGF BB behandelt wurde. Erfolgte eine Stimulation der Zellen mit einer Kombination aus PDFG BB mit DETA-NONOate, so zeigte sich das neuerlich erhöhte Molekulargewicht in einer weiteren Verschiebung des Mess-Signals nach links zu einem K_D-Wert von 0,54.

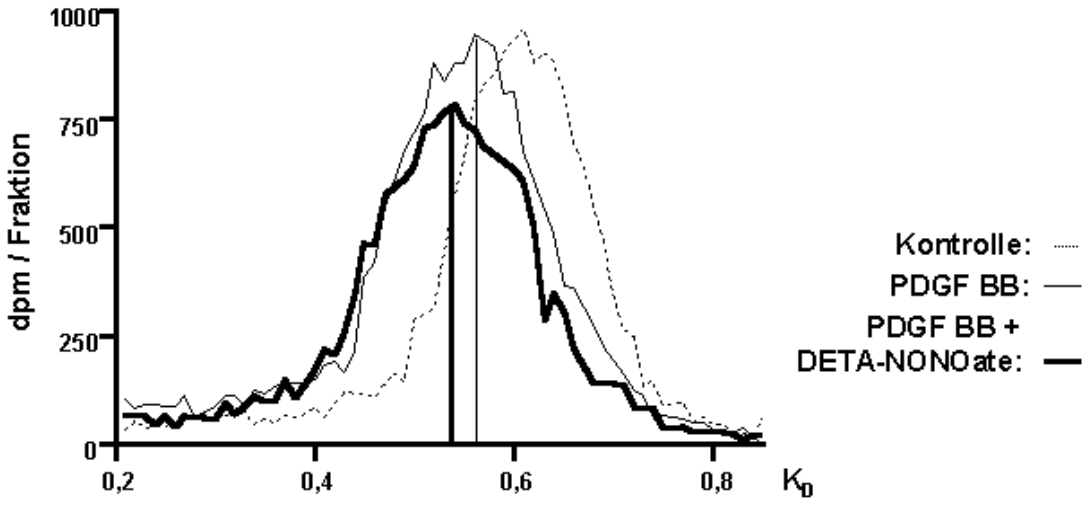


Abbildung 20 Gel-Filtrations-Chromatographie von sezernierten Proteoglykanen

Gel-Filtrations-Chromatographie über eine Sepharose-CL-2B-Säule von ins Medium sezernierten, mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierten PG kardialer Fibroblasten nach Behandlung mit 10 ng/ml PDGF BB und 100 µM DETA-NONOate für 24 Stunden. Auf der x-Achse sind die K_D-Werte der drei Proben markiert (Kontrolle: 0,61; PDGF BB: 0,56; PDGF BB + DETA-NONOate: 0,54).

Der Vergrößerung des Molekulargewichts vom Biglykan-PG könnten theoretisch sowohl eine Vergrößerung des Kernproteins als auch eine Verlängerung der GAG-Ketten zugrunde liegen. Im nachfolgenden Experiment wurden nach der Vereinigung der biglykanhaltigen Fraktionen eine chemische Reaktion zur Abtrennung der GAG-Ketten vom Kernprotein des Biglykan (2.2.4.6) mit anschließender Gel-Filtrations-Chromatographie über eine mit Sepharose-CL-6B gepackten Chromatographiesäule durchgeführt, die eine Analyse des Molekulargewichts der GAG-Ketten ermöglichte. In Abbildung 21 zeigte sich eine Erhöhung des Molekulargewichts der GAG-Ketten wiederum in einer Linksverschiebung des Maximums des Mess-Signals der mit PDGF BB behandelten Fibroblasten (K_D: 0,33) im Vergleich zu der Kontroll-bedingung (K_D: 0,38). Diese Linsksverschiebung verstärkte sich erneut durch die Kombination von PDGF BB mit DETA-NONOate (K_D: 0,28).

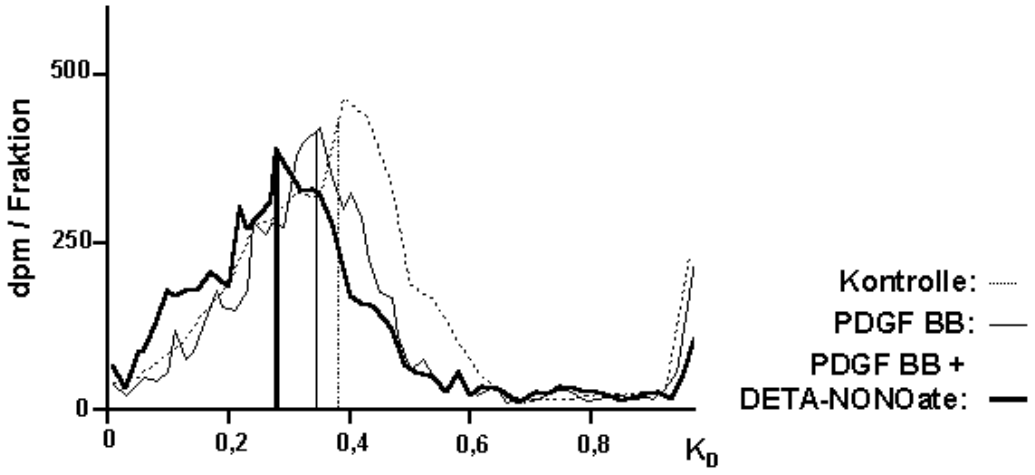


Abbildung 21 DETA-NONOate erhöht das Molekulargewicht der GAG-Ketten des Biglykan-Proteoglykans

Gel-Filtrations-Chromatographie über eine Sepharose-CL-6B-Säule der mittels ß-Elimination vom Kernprotein abgetrennten GAG-Ketten der biglykanhaltigen Fraktionen der Sepharose-CL-2B-Gel-Filtrations-Chromatographie. Auf der x-Achse sind die K_D-Werte der drei Proben markiert (Kontrolle: 0,38; PDGF BB: 0,33; PDGF BB + DETA-NONOate: 0,28).

3.1.2.3 Angiotensin II

3.1.2.3.1 Nachweis der Expression der AT1- und AT2-Rezeptorsubtypen in kardialen Fibroblasten

Soweit bislang bekannt, werden alle biologisch relevanten Effekte von Angiotensin II (Ang II) über AT1- und AT2-Rezeptoren vermittelt. Die Expression beider Rezeptorsubtypen wurde in den kardialen Fibroblasten mit Hilfe der RT-PCR (2.3.4.2) untersucht.

Abbildung 22 zeigt, dass sich in den kardialen Fibroblasten, die in dieser Arbeit benutzten wurden, die mRNA des AT1- und des AT2-Rezeptors nachweisen ließ.

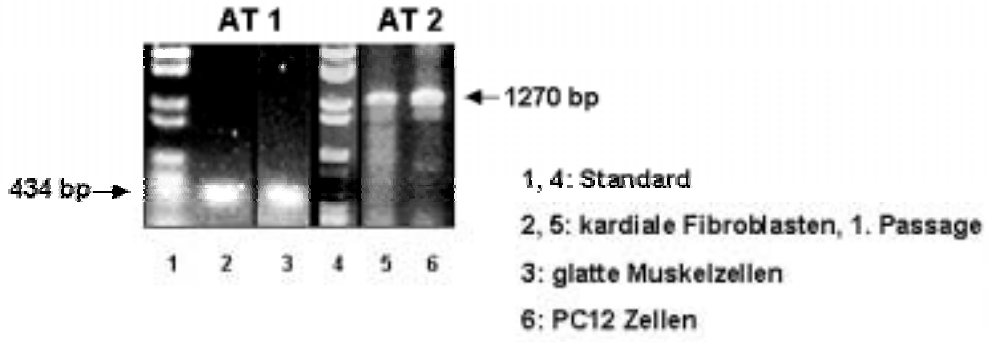


Abbildung 22 Kardiale Fibroblasten aus Herzen neonataler Ratten exprimieren sowohl den AT1-, als auch den AT2-Rezeptor

PCR wurde mit spezifischen Primern für ein 434 bp langes Fragment des AT1-Rezeptors der Ratte (Spur 2) und für die gesamte codierende cDNA des AT2-Rezeptors der Ratte (Spur 5) durchgeführt. Glatte Muskelzellen dienten als Kontrolle der AT1-Rezeptorexpression (Spur 3), PC12-Zellen als Kontrolle der AT2-Rezeptorexpression (Spur 6). Spur 1 und 4 zeigen die DNA-Leiter.

Die Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Katrin Stöter zur Verfügung gestellt.

3.1.2.3.2 Steigerung der Proteoglykan-Sekretion durch Angiotensin II

Da Ang II ein wichtiger Stimulus im Verlaufe des Umbauprozesses des Myokards nach Ischämie ist, folgte zunächst die Untersuchung des Einflusses von Ang II auf die Sekretion endogener, mit $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierter PG in das Zellkulturmedium (2.2.4.1).

In einem Einzelexperiment (Abbildung 23A) wurde ein signifikanter Anstieg der markierten PG von 546 ± 16 dpm auf 647 ± 28 dpm festgestellt, der sich als arithmetisches Mittel aus 8 Einzelexperimenten (Abbildung 23B) so darstellt, dass der stimulierende Effekt des Ang II im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei 117,1 ± 4,6 % lag.

Abb. 21A

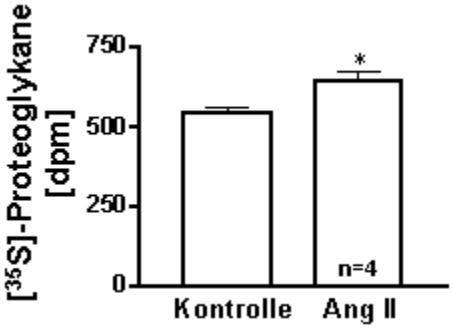


Abb. 21B

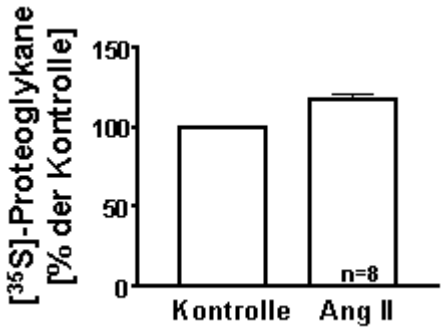


Abbildung 23 A, B Angiotensin II stimuliert die Sekretion von Proteoglykanen

Kardiale Fibroblasten wurden mit Ang II (10-7 M) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. (A) zeigt Daten [dpm] eines Einzelexperiments (n=4, Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ ermittelt mittels ungepaartem t-Test). In (B) sind die Daten von 8 verschiedenen Experimenten auf die unstimulierte Kontrolle normiert (n=8, Mittelwert ± SEM); diese Darstellung wurde im Folgenden verwendet.

Um die Frage zu klären, welcher der beiden Rezeptorsuybtypen des Ang II-Rezeptors die Sekretionsreize vermittelt, wurden sowohl der AT1-Rezeptorantagonisten Losartan, als auch der AT2-Rezeptorantagonisten PD123177 im Hinblick auf die Sekretion markierter PG in das Zellkulturmedium (2.2.4.1) untersucht.

Die Stimulation mit Ang II hatte im Mittel eine Sekretionssteigerung auf 110,0 ± 4,1 % im Vergleich zur Basalsekretion zur Folge (Abbildung 24). Kam gleichzeitig der AT1-Rezeptorantagonisten Losartan zum Einsatz, so reduzierte sich die Sekretion signifikant auf 94,1 ± 3,2 %. Bei der Kombination von Ang II mit dem AT2-Rezeptorantagonisten PD123177 erhöhte sich die Sekretion im Vergleich zur Ang II-Stimulation (121,0 ± 6,4 %). Wurden die kardialen Fibroblasten sowohl mit

Ang II, als auch mit beiden Antagonisten gemeinsam inkubiert, so blieb die Sekretion markierter PG in das Kulturmedium auf Höhe der Basalsekretion (101,9 ± 2,8 %).

Die Erhöhung der PG-Sekretion in das Kulturmedium wurde durch den AT1-Rezeptor vermittelt.

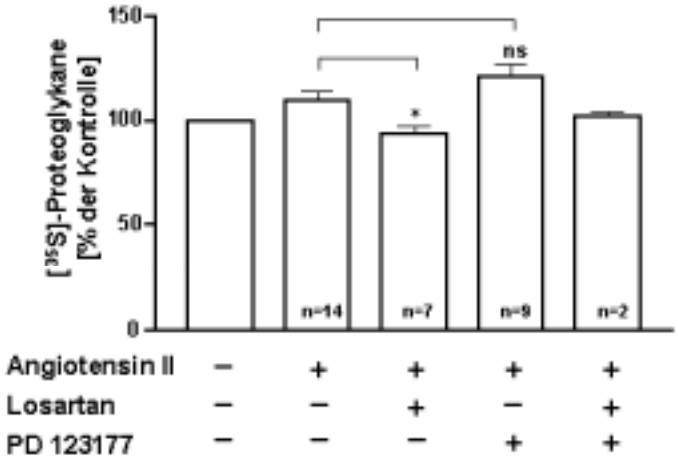


Abbildung 24 AT1-Rezeptorantagonist Losartan hemmt die Angiotensin II-vermittelte Induktion der Proteoglykan-Sekretion

Kardiale Fibroblasten wurden mit Losartan (10^{-5} M) und PD123177 (10^{-6} M) für 30 min vorinkubiert, Ang II (10^{-7} M) zugesetzt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Nach 24 Stunden wurden ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ ermittelt mittels ungepaartem t-Test).

3.1.2.3.3 Regulation der mRNA-Expression von Biglykan

Der sekretionssteigernde Einfluss des Ang II auf die PG wurde im Folgenden dahingehend untersucht, ob eine Regulation der mRNA von Biglykan, als dem dominierende PG, unter dem Einfluss von Ang II stand. Dabei wurden die kardialen Fibroblasten mit Ang II allein, bzw. mit Ang II in Kombination mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan oder dem AT2-Rezeptorantagonisten PD123177 behandelt. Die Gesamt-RNA wurde nach dem Northern-Blot-Verfahren (2.3.3) analysiert, mit spezifischer, an $[^{32}P]$-gekoppelter cDNA-Sonde markiert und anschließend eine Autoradiographie durchgeführt. Abbildung 25A zeigt die Autoradiographie eines Einzelversuches der mit der cDNA-Sonde für humanes Biglykan markierten Membran. Die Beladung des Gels wurde anhand der 18S RNA-Bande dokumentiert.

Das Signal der Biglykan-mRNA, das aus der Stimulation mit Ang II hervorging, war deutlich stärker, als das der Kontrollbedingung. Bei der Kombination von Ang II mit dem AT1-Rezeptorantagonisten ließ sich die Induktion der Biglykan-mRNA-Expression hemmen, wohingegen die Kombination mit dem AT2-Rezeptor-antagonisten die Stimulation der Biglykan-mRNA-Expression durch Ang II nicht beeinflußte.

Die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung (Abbildung 25B) zeigt, dass die mRNA-Expression unter dem Einfluss von Ang II im Vergleich zur Kontrollbedingung auf 121 ± 11 % anstieg. Der Einsatz von Losartan hatte eine signifikante Verminderung der Expression auf 90 ± 8 % zur Folge, die Kombination mit PD123177 hingegen ergab eine vergleichbar zur Ang II-Stimulation erhöhte Biglykan-mRNA-Expression (125 ± 17 %).

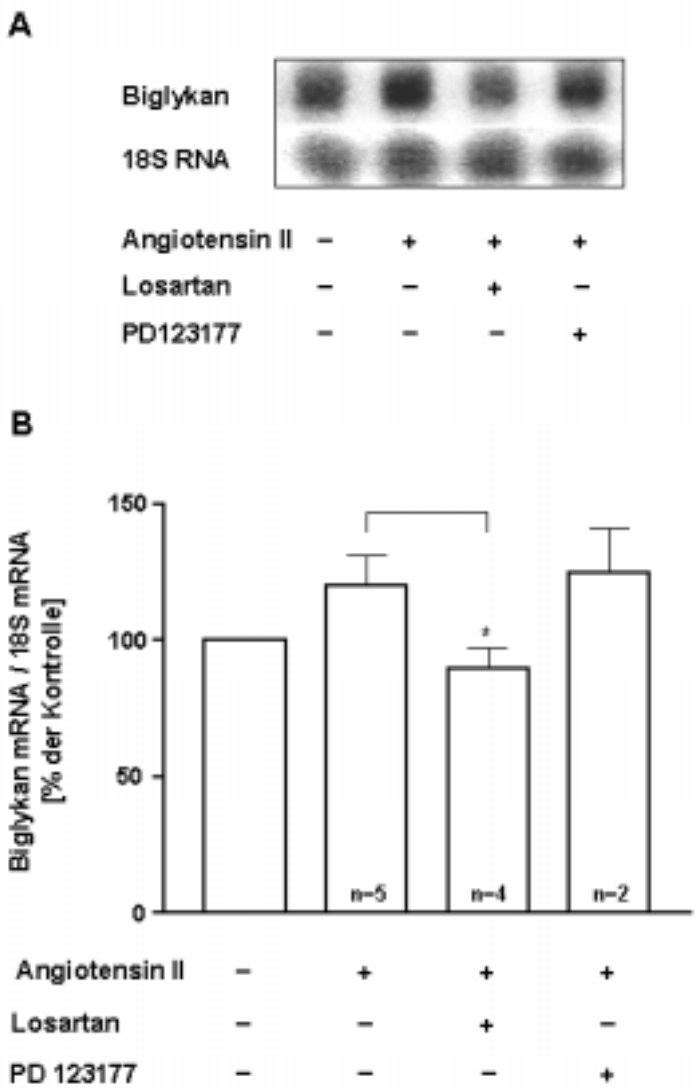


Abbildung 25 AT1-Rezeptorantagonist Losartan hemmt die Angiotensin II-vermittelte Induktion der Biglykan-mRNA-Expression

Kardiale Fibroblasten wurden mit Losartan (10^{-5} M) und PD123177 (10^{-6} M) für 30 min vorinkubiert und anschließend Ang II (10^{-7} M) für 24 Stunden zugesetzt. 10-15 µg Gesamt-RNA wurden mittles Northern-Blot-Verfahren mit den spezifischen, an [^{32}P]-gekoppelten cDNA-Sonden für humanes Biglykan und 18S RNA radioaktiv markiert. (**A**) zeigt die Autoradiographien eines Einzelexperiments der markierten Membranen, (**B**) zeigt die quantitative Abnahme graphisch dargestellt, wobei die Daten als Prozent der unstimulierten Kontrolle errechnet wurden (Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ ermittelt mittles gepaartem t-Test).

3.1.2.3.4 Autokrine/parakrine Vermittlung der Angiotensin II-stimulierten Proteoglykan-Sekretion durch den AT1-Rezeptor

In anderen Zellmodellen wurde bereits beschrieben, dass durch den AT1-Rezeptor vermittelte Effekte über einen autokrinen/parakrinen Mechanismus durch Wachstumsfaktoren zustande kommen können (37).

Um zu untersuchen, ob es AT1-vermittelt zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommt, die ihrerseits die PG-Sekretion steigern, ob also Ang II indirekt eine Steigerung der PG-Sekretion verursacht, wurden die Ang II-Effekte in Gegenwart von Antikörpern durchgeführt, die Wachstumsfaktoren neutralisieren. Der neutralisierenden Anti-TGF-ß1, -2, -3-Antikörpers (Abbildung 26) senkte die durch Ang II ausgelöste Erhöhung der PG-Sekretion in das Kulturmedium (2.2.4.1) signifikant von 111,8 ± 1,6 % auf 101,5 ± 3,6 %. Die gleichzeitig durchgeführte Kontrolle, die in der Applikation des entsprechenden IgG - einem Protein, das keine Bindungseigenschaft zu Wachstumsfaktoren aufweist - zusammen mit Ang II bestand, zeigte keinen Effekt. In der gleichen Reihe von Experimenten sind Anti-PDGF- und Anti-bFGF-Antikörper eingesetzt worden, wobei keiner der beiden neutralisierenden Antikörper den Effekt des Ang II unterbinden konnte (Abbildung 26).

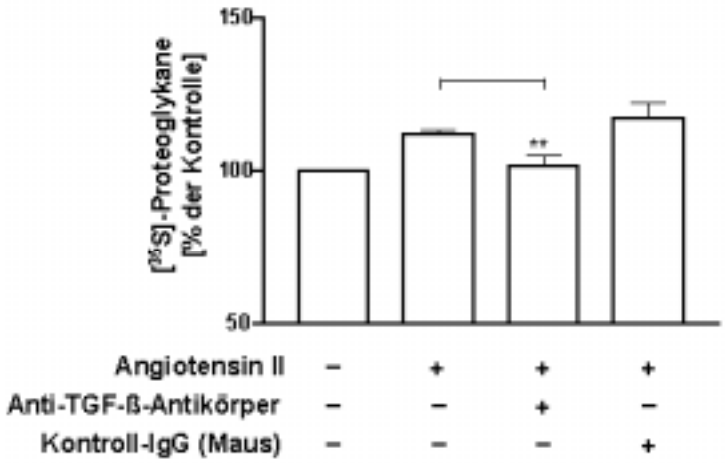


Abbildung 26 Neutralisierende Anti-TGF-ß1, -2, -3-Antikörper hemmen die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Proteoglykan-Sekretion

Kardiale Fibroblasten wurden mit Ang II (10^{-7} M) in Kombination mit Anti-TGF-ß1, -2, -3-Antikörpern (0,5 µg/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml $[^{35}S]SO_4^{2-}$ markiert. Als Kontrolle wurde 0,5 µg/ml des Immunglobulins verwendet. Ins Medium sezernierte, $[^{35}S]SO_4^{2-}$-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (n=3, Mittelwert ± SEM; **: $p < 0,01$ ermittelt mittels gepaartem t-Test).

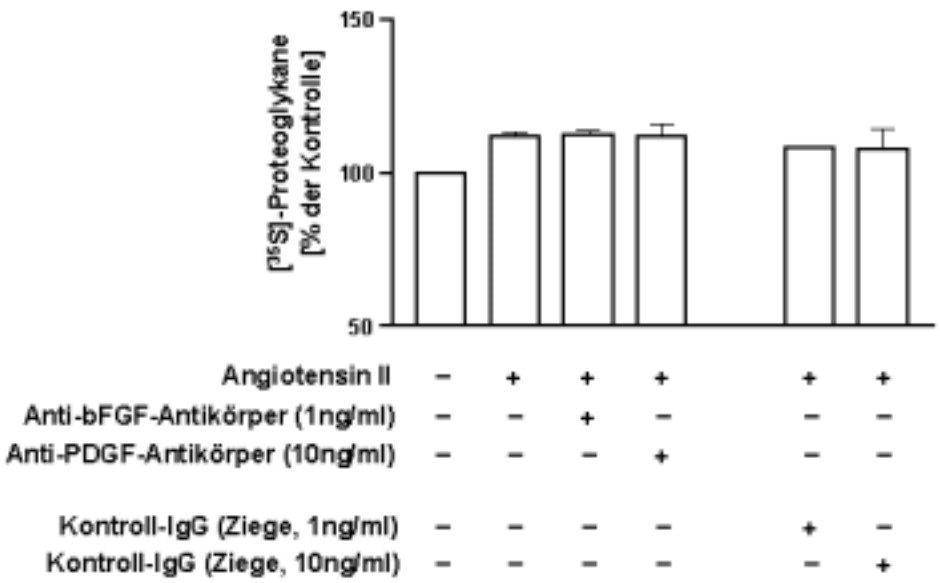


Abbildung 27 Neutralisierende Anti-PDGF- oder Anti-bFGF-Antikörper vermögen die Angiotensin II-vermittelte Erhöhung der Proteoglykan-Sekretion nicht zu hemmen

Kardiale Fibroblasten wurden mit Ang II (10^{-7} M) in Kombination mit Anti-bFGF-Antikörper (1 µg/ml) und Anti-PDGF-Antikörper (10 µg/ml) für 24 Stunden behandelt und metabolisch mit 10 µCi/ml [^{35}S]SO_4^{2-} markiert: Als Kontrolle wurde das Immunglobulin jeweils in der gleichen Konzentration eingesetzt. Ins Medium sezernierte, [^{35}S]SO_4^{2-}-markierte PG wurden mittels der CPC-Präzipitation quantifiziert. Daten sind dargestellt als Prozent der unstimulierten Kontrolle (n=3, Mittelwert ± SEM).

Der Befund, dass die Anti-TGF-ß1, -2, -3-Antikörper den Effekt des Ang II auf die PG-Sekretion in das Kulturmedium unterbinden konnten, stellte die Voraussetzung für das folgende Experiment dar, bei dem nach Stimulation der Fibroblasten mit Ang II oder der Kombination von Ang II mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan, bzw. dem AT2-Rezeptorantagonisten PD123177 die TGF-ß1-Konzentration im Kulturmedium mittels eines ELISAs bestimmt wurde. Das Ergebnis zeigte (Abbildung 28), dass nach Ang II-Stimulation die Konzentration an TGF-ß1 im Kulturmedium signifikant auf 40 ± 2 pg/ml im Vergleich zur Kontrolle (19 ± 3 pg/ml) anstieg. Bei der Kombination von Ang II mit Losartan lag die im Medium messbare TGF-ß1-Konzentration bei 21 ± 7 pg/ml, was eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Ang II-Stimulation darstellte. Der Einsatz von PD123177 hingegen hatte keinen Einfluss auf die TGF-ß1-Konzentration (42 ± 4 pg/ml). Wurden beide Rezeptorantagonisten dem Kulturmedium allein zugesetzt, so lagen die nachzuweisenden TGF-ß1-Konzentrationen mit 15 ± 3 pg/ml für Losartan und 17 ± 2 pg/ml für PD123177 auf Kontrollniveau.

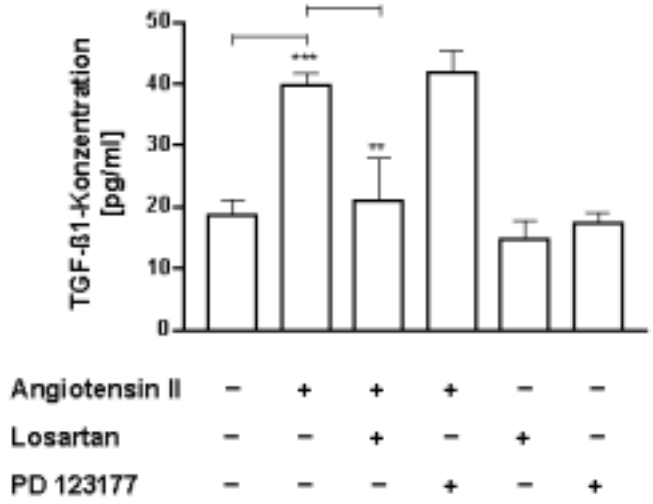


Abbildung 28 TGF-ß1-Konzentration im Kulturmedium nach Angiotensin II-Stimulation via AT1-Rezeptor signifikant erhöht

Messung der TGF-ß1-Konzentration im Kulturmedium kardialer Fibroblasten nach saurer Aktivierung mittels TGF-ß1-ELISA. Losartan (10^{-5} M) und PD123177 (10^{-6} M) wurden 30 min vor der Stimulation mit Angiotensin II (10^{-7} M) zugesetzt. (n=2-5, Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$. Signifikanz wurde mit ANOVA und Bonferroni-Post-Test ermittelt).

3.2 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt der Ratten

Das Myokardgewebe unterliegt nach einem ischämischen Ereignis wie dem Myokardinfarkt umfangreichen Umbauprozessen. Es kommt zur Ablagerung von EZM-Molekülen sowohl in dem ischämisch geschädigten Bereich, als auch im Verlaufe der Hypertrophie in den übrigen, nicht direkt von der Ischämie betroffenen Arealen, wie dem Septum und dem rechten Ventrikel.

Da sich eine deutliche Regulation des PG Biglykan in kardialen Fibroblasten *in vitro* zeigen ließ, sollte nachfolgend die Expression der kleinen leucin-reichen PG Biglykan und Decorin nach experimentellem MI der Ratte untersucht werde. Zu Vergleichszwecken wurde die Expression von Collagen-Typ I bestimmt, einem gut untersuchten Marker für fibrotische Veränderungen. Dabei wurden auf der einen Seite Gewebe-Färbungen angefertigt, die eine Lokalisierung der EZM-Moleküle im infarzierten Gebiet zeigen, auf der anderen Seite Zeitverläufe der mRNA-Expression im infarzierten Gebiet erstellt. Es schloss sich die Untersuchung der mRNA-Expression im Infarktgebiet nach Durchführung einer Behandlung der Tiere mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Rezeptorantagonisten Olmesartan 7 Tage nach Induzieren des MI (post MI) an.

3.2.1 Histologie und Immunhistologie

3.2.1.1 Histologie

Infarzierte Herzen der Ratte wurden 7 Tage post MI entnommen und transversale Schnitte durch den Ventrikel einerseits mittels Movats-Pentachrom-Färbung für verschiedene EZM-Komponenten und andererseits mit spezifischen Antikörpern gegen Ratten-Decorin, den Makrophagen-Marker ED-1 und alpha-Glattmuskelaktin (αSMA) gefärbt. Abbildung 29a-d zeigt einen Ausschnitt, der sowohl das Gebiet der Ischämie als auch angrenzende Bereiche darstellt, wobei am oberen Bildrand die Außenseite des Ventrikels, am unteren linken Bildrand das Herzlumen zu sehen sind. Die Bilder zeigen eine 50-fache Vergrößerung.

Das Resultat der Movats-Pentachrom-Färbung (a) zeigte einen Bereich gleichförmiger, hellroter bis gelblicher Färbung in der Mitte der Aufnahme, der die collagen-reiche Infarktnarbe darstellte. In den angrenzenden Gebieten deuteten die

schwach schwarz gefärbten Zellkerne auf eine hohe Anzahl von Zellen hin. Glycosaminoglykane (GAG) (blau) waren in diesem angrenzenden Bereich nur schwach detektierbar. Am rechten und am linken unteren Bildrand, an das Lumen angrenzend, färbten sich Areale in gleichförmigem, kräftigem Rot, die vitale Herzmuskelzellen darstellten.

Des Weiteren ist in (b) die immunhistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Decorin (braun) zu sehen. Es war im Bereich der zahlreichen, kleinen Zellen eine verstärkte bräunliche Färbung zu erkennen, wohingegen in dem Areal der hellroten bis gelblichen Färbung keine Anfärbung stattfand.

Mit Hilfe des spezifischen, gegen das Oberflächen-Antigen von Makrophagen (ED-1) gerichteten Antikörpers wurde erkennbar, dass in dem zum Infarkt benachbarten Gebiet zahlreiche Zellen ein positives Signal (c) gaben. Die Areale der Anfärbung deckten sich mit den Bereichen der Movats-Pentachrom-Färbung, in denen zahlreiche Zellkerne zu sehen waren.

In Abbildung 29d ist die immunhistochemische Färbung mit dem spezifischen Antikörper gegen αSMA zu sehen. Es konnte festgestellt werden, dass im Infarktgebiet, sowie in den angrenzenden Bereichen kaum ein Signal zu detektieren war. Im Gegensatz dazu zeigte ein Gefäß im linken oberen Bereich der Aufnahme die positive Reaktion der Antikörper.

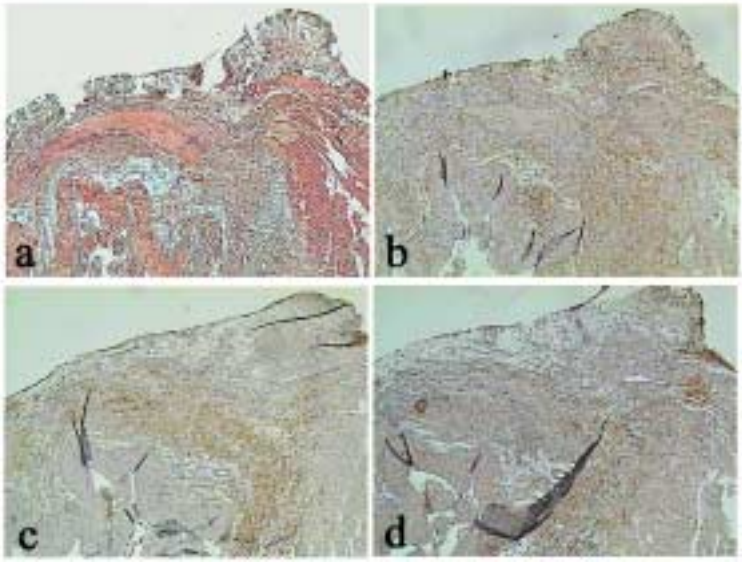


Abbildung 29 Akkumulation von EZM-Molekülen nach MI

Infarzierte Rattenherzen wurden 1 Woche post MI entnommen und transversale Schnitte histochemisch mittels Movats-Pentachrom-Färbung (a) und immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Decorin (LF113, b), den Makrophagen-Marker ED-1 (c), sowie αSMA (d) gefärbt. Vergrößerung: 50x

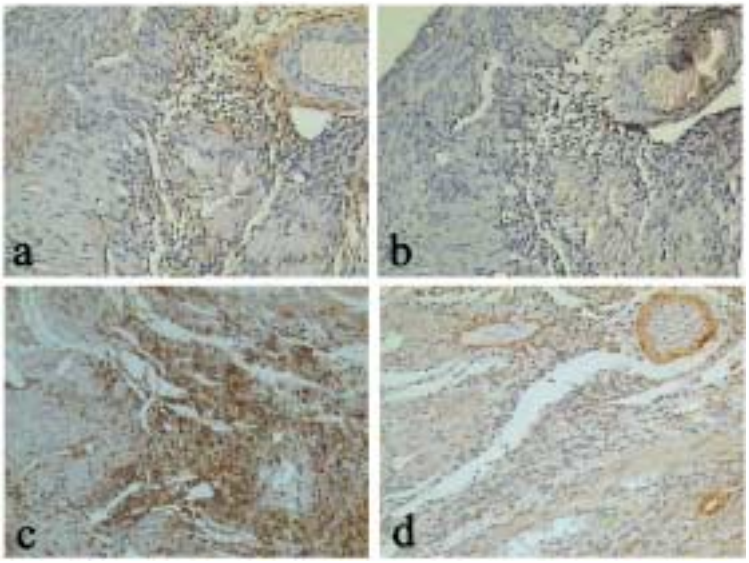


Abbildung 30 Vergleich der Lokalisation von Decorin und Biglykan zu Makrophagen und glatten Muskelzellen

Infarzierte Rattenherzen wurden 1 Woche post MI entnommen und transversale Schnitte immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen Decorin (LF113, a), Biglykan (LF106, b), ED-1 (c) und αSMA (d) gefärbt. Vergrößerung: 200x

3.2.1.2 Immunhistologie

Nachdem die Übersichtsaufnahmen der Movats-Pentachrom-Färbung die Anwesenheit zahlreicher kleiner Zellen und der immunhistochemischen Färbung ein positives Signal für Decorin zeigten, sind im Folgenden Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen gegen Decorin, Biglykan, ED-1 und αSMA in 200-facher Vergrößerung (Abbildung 30) angefertigt worden. Dabei war zudem eine mögliche Co-Lokalisation von Decorin und Biglykan mit den positiv für ED-1, bzw. positiv für αSMA reagierenden Zellen von Interesse.

Abbildung 30 a zeigt am oberen rechten Bildrand ringförmig ein Gefäss, in dessen direkter Umgebung (Adventitia) ein positives Signal für den Anti-Decorin-Antikörper. Neben dieser perivaskulären Anfärbung konnte Decorin auch in größerer Entfernung zum Gefäß nachgewiesen werden, z.B. am linken Bildrand.

Im Gegensatz zum Nachweis des Decorin, war Biglykan (b) in direkter Umgebung des Gefäßes (oberer rechter Bildrand) nicht detektierbar. Zu erkennen war jedoch eine diffuse Braunfärbung des Myokardgewebes.

Der Einsatz des spezifischen Antikörpers gegen ED-1 (c), mit Hilfe dessen Makrophagen gefärbt worden sind, zeigte Areale, in denen ein sehr starkes Signal zu erkennen war. Es traten aber auch Gebiete auf, in denen kaum ein Zelle gefärbt werden konnte.

Die Abbildung 30 d stellt die Aufnahme der immunhistochemischen Färbung gegen αSMA dar. Stark positiv reagierende Zellen waren erwartungsgemäß die glatten Muskelzellen der Media, wie in der rechten oberen Bildecke zu erkennen ist. Kardiale Fibroblasten, die ebenfalls αSMA exprimieren, wurden unter diesen Bedingungen nur schwach angefärbt.

3.2.2 Zeitverläufe der mRNA-Expression nach Myokardinfarkt

Im Folgenden wurde RNA aus dem Infarktgebiet der Ratten zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und bezüglich der mRNA-Expression von Decorin, Biglykan und Collagen-Typ I-alpha mittels Northern-Blot-Verfahren analysiert.

In Abbildung 31 sind der Zeitverlauf der Biglykan-mRNA (a), der Decorin-mRNA (b) und der Collagen-Typ I-alpha-mRNA (c) gezeigt. Die untersten Banden (d) stellen die Ethidiumbromid-Färbung der 18S RNA dar. Linksständig von der vertikalen

Einteilung sind die Signale resultierend aus Kontrollherzen gezeigt, rechtsständig die Signale dargestellt, die von den infarzierten Herzen zu den angegebenen Zeitpunkten erhalten wurden.

Die Expression der Biglykan-mRNA war unter Kontrollbedingungen nicht nachweisbar. Nach MI wurde sie aber sehr induziert, wobei das Maximum der Expression nach 3 Tagen auftrat. Nachfolgend fiel die mRNA-Expression wieder auf das Kontrollniveau ab.

Ein sehr ähnlicher Zeitverlauf stellte sich für die Expression der Collagen-Typ I-mRNA (c) dar, hier entwickelte sich ein Maximum der Expression an Tag 5, wohingegen sowohl an Tag 1, als auch an Tag 42 kein Signal mehr nachzuweisen war. Auch Collagen-Typ I-alpha war in nicht infarzierten Herzen kaum nachweisbar.

Der zeitliche Verlauf der Decorin-mRNA-Expression nach MI (c) zeigte mit zunehmender Zeit ein stärkeres Signal, jedoch war in dem Kontrollgewebe, wie auch an Tag 1 und 3 eine Grundexpression festzustellen. Die mRNA-Expression war an Tag 3 erhöht und stieg auf ein Maximum im Verlauf von 5 bis 7 Tagen post MI. Im Gegensatz zum Zeitverlauf der Expression der mRNA von Biglykan, bzw. Collagen-Typ I-alpha blieb die des Decorin auch noch nach 3 Wochene erhöht.

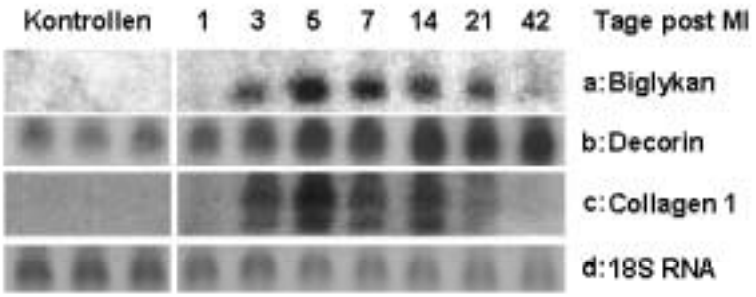


Abbildung 31 Zeitgang der mRNA-Expression von Decorin, Biglykan und Collagen-Typ I nach MI

Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet von Rattenherzen isoliert, die zu den angegebenen Zeitpunkten post MI entnommen wurden. Als Kontrollen dienten nicht-infarzierte linke Ventrikel. 20 µg Gesamt-RNA wurden mittels Northern-Blot-Verfahren mit spezifischen, an [^{32}P]-gekoppelten cDNA-Sonden für humanes Biglykan (a), Ratten-Decorin (b) und Ratten-Collagen-Typ I-alpha (c) markiert. 18S RNA (d) diente als Kontrolle für die Gel-Beladung.

Der Zeitverlauf der Decorin-mRNA-Expression ist für das infarzierte Gebiet graphisch in Abbildung 32 dargestellt. Die Zunahme der Signalstärke erreichte nach 5 Tagen

Signifikanz im Vergleich zur Kontrollbedingung (Kontrolle: 100 ± 7 %; 5 Tage post MI: 255 ± 51 %) und verblieb nach 7 Tagen (7 Tage post MI: 233 ± 46 %) auf einem signifikant erhöhten Niveau. In den darauffolgenden Tagen sankt die Expression zwar ab, blieb aber nach 21 Tagen post MI mit 195 ± 54 % im Vergleich zum Kontrollgewebe deutlich erhöht.

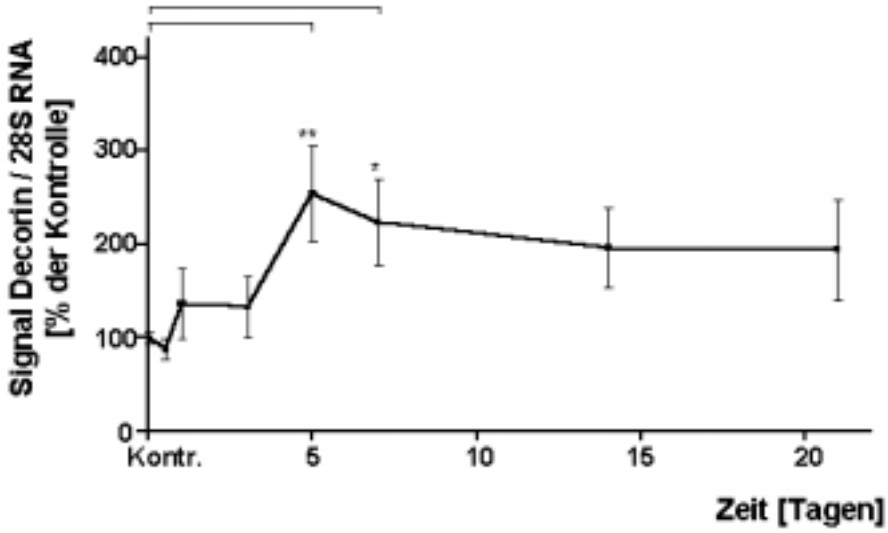


Abbildung 32 Decorin-mRNA-Expression erreicht 5 bis 7 Tage nach MI ein Maximum im Infarktgebiet des Rattenherzens

Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet von Rattenherzen isoliert, die zu den angegebenen Zeitpunkten post MI entnommen wurden. Als Kontrollen dienten nicht-infarzierte linke Ventrikel. 20 µg Gesamt-RNA wurden mittels Northern-Blot-Verfahren mit spezifischer, an [^{32}P]-gekoppelter cDNA-Sonde für Ratten-Decorin radioaktiv markiert. Das Signal für Ratten-Decorin wurde auf die Gel-Beladung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Färbung der 28S RNA normiert (n=3-5, Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ermittelt mit ungepaartem t-Test).

Neben dem infarzierten Gebiet zeigten die Zeitverläufe für die Expression der Decorin-mRNA in anderen Arealen der infarzierten Herzen gleichfalls eine Erhöhung, wobei diese am deutlichsten im nicht-infarzierten Septum, am geringsten in dem sogenannten Randgebiet ausgeprägt war. Die Expressionssteigerung erreichte 3 Tage post MI im nicht-infarzierten Septum Signifikanz.

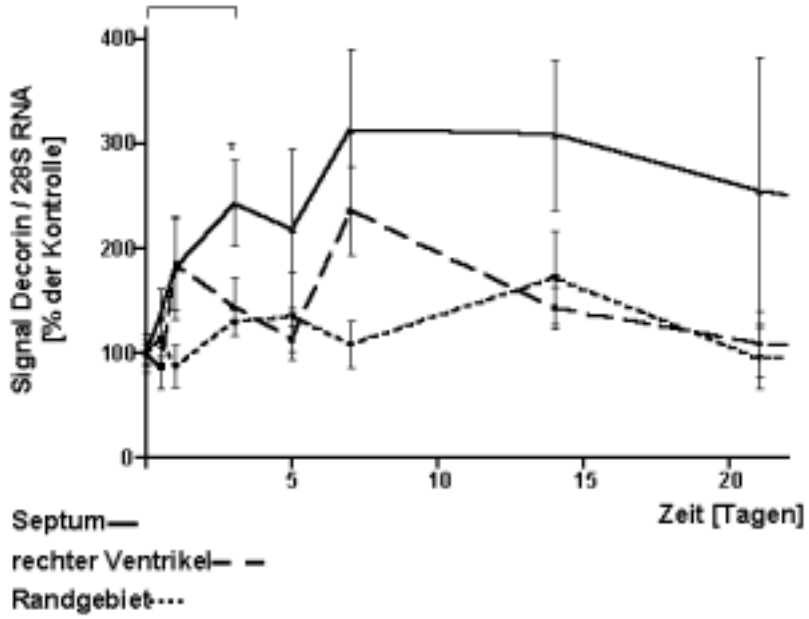


Abbildung 33 Zeitverlauf der Decorin-mRNA-Expression in rechtem Ventrikel, Septum und Randgebiet des infarzierten Rattenherzens

Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet von Rattenherzen isoliert, die zu den angegebenen Zeitpunkten post MI entnommen wurden. Als Kontrollen dienten nicht-infarzierte linke Ventrikel. 20 µg Gesamt-RNA wurden mittels Northern-Blot-Verfahren mit spezifischer, an [^{32}P]-gekoppelter cDNA-Sonde für Ratten-Decorin radioaktiv markiert. Das Signal für Ratten-Decorin wurde auf die Gel-Beladung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Färbung der 28S RNA normiert (n=3-5, Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ ermittelt mit ungepaartem t-Test).

In der folgenden Tabelle 2 sind die Einzelwerte der jeweiligen Herzareale zu den angegebenen Zeitpunkten aufgeführt:

Tabelle 2 Zusammenfassung der Regulationen der Decorin-mRNA post MI

Tage post MI	Kontr.	1	3	5	7	14	21
	%	%	%	%	%	%	%
Infarktgebiet	100 ± 7	137 ± 37	133 ± 33	255 ± 51	233 ± 46	196 ± 43	195 ± 54
Septum	100 ± 8	182 ± 49	243 ± 41	219 ± 76	314 ± 77	309 ± 71	255 ± 128
re. Ventrikel	100 ± 18	185 ± 44	145 ± 27	114 ± 12	236 ± 42	143 ± 20	109 ± 32
Randgebiet	100 ± 12	87 ± 20	130 ± 12	135 ± 42	108 ± 22	172 ± 45	95 ± 30

3.2.3 Einfluss von ACE-Inhibitoren und AT1-Antagonisten auf die Proteoglykan-Expression nach MI an Ratten

In den im ersten Teil dieser Arbeit (3.1) durchgeführten Experimenten an kardialen Fibroblasten wurde ein Anstieg der mRNA-Expression von Biglykan unter dem Einfluss von Ang II festgestellt. Die Daten aus der Untersuchung der Expression der mRNA von Biglykan, Decorin und Collagen-Typ I-alpha an Gewebeproben aus infarzierten Rattenherzen zeigten eine vermehrte Expression dieser EZM-Moleküle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induzieren des MI. Es ist bekannt, dass der Einsatz von ACE-Inhibitoren oder AT1-Rezeptorantagonisten einen positiven Einfluss auf die fibrotischen Umbauprozesse eines Herzen nach MI haben. Daraufhin sind Experimente durchgeführt worden, bei denen die Ratten 1 Woche vor der Ligatur der linken Koronararterie, sowie 1 Woche nach MI mit einem Vertreter der ACE-Hemmer (Ramipril) oder der AT1-Rezeptorantagonisten (Olmesartan) behandelt wurden.

Nach Isolation der Gesamt-RNA aus den infarzierten Gebieten der Herzen, bzw. aus den nicht-infarzierten linken Ventrikeln der scheinoperierten Tiere wurde eine RT-PCR mit nachfolgender Amplifizierung der Ziel-cDNA, Decorin, Biglykan oder Collagen-Typ I-alpha, (RT-PCR, PCR, 2.3.4) mit den entsprechenden spezifischen Primern durchgeführt. Im gleichen Ansatz ist eine PCR des *housekeeping*-Gen, der GAPDH, als internem Standard angefertigt worden, um eine Quantifizierung durchführen zu können.

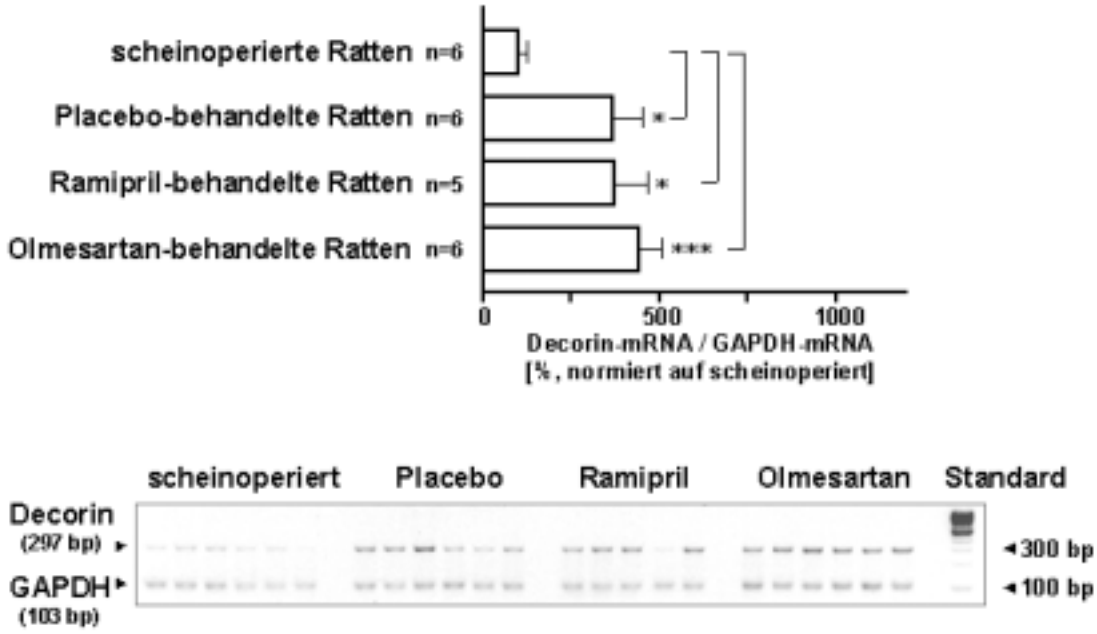


Abbildung 34 Decorin-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan

Ratten wurden während 1 Woche vor MI und während 1 Woche nach MI Ramipril (1 mg/kg Körpergewicht) oder Olmesartan (1 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet und aus linken Ventrikeln operierter, nicht-infarzierter (scheinoperierter) Tiere 1 Woche post MI isoliert. 100 ng/µl RNA wurden mit dem Qiagen® OneStep RT-PCR-Kit bearbeitet und Decorin-cDNA, sowie GAPDH-cDNA unter Verwendung spezifischer Primer ampilifiziert. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte in einem 2 %igen Agarosegel (unterer Teil der Abbildung). Der obere Teil der Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung (n=5-6, Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0{,}001$; *: $p < 0{,}05$).

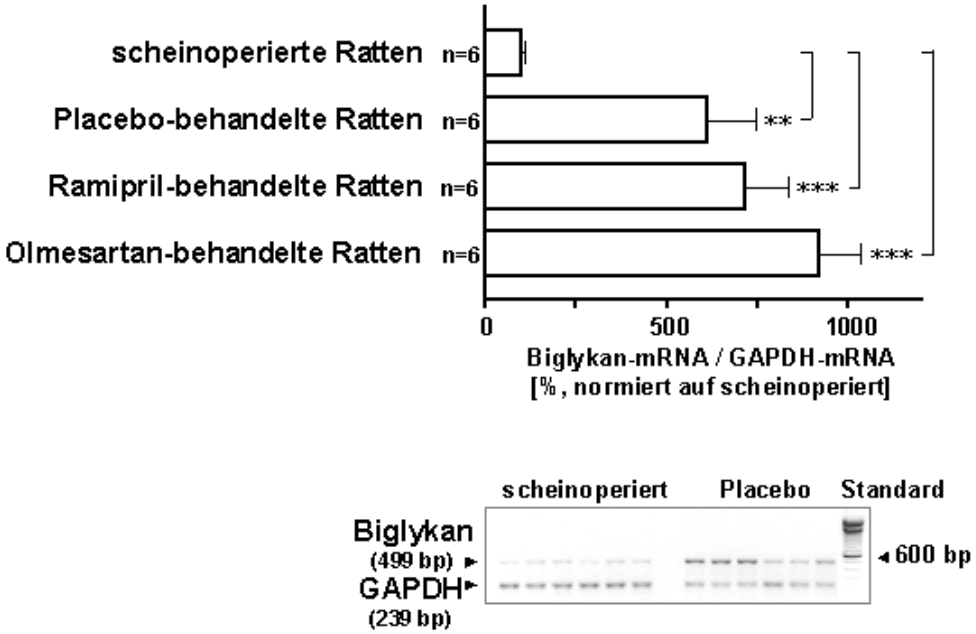


Abbildung 35 Biglykan-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan

Ratten wurden während 1 Woche vor MI und während 1 Woche nach MI mit Ramipril (1 mg/kg Körpergewicht) oder Olmesartan (1 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet und aus linken Ventrikeln operierter, nicht-infarzierter (scheinoperierter) Tiere 1 Woche post MI isoliert. 100 ng/µl RNA wurden mit dem Qiagen® OneStep RT-PCR-Kit bearbeitet und Biglykan-cDNA, sowie GAPDH-cDNA unter Verwendung spezifischer Primer ampilifiziert. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte in einem 2 %igen Agarosegel (unterer Teil der Abbildung). Der obere Teil der Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung (n=5-6, Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

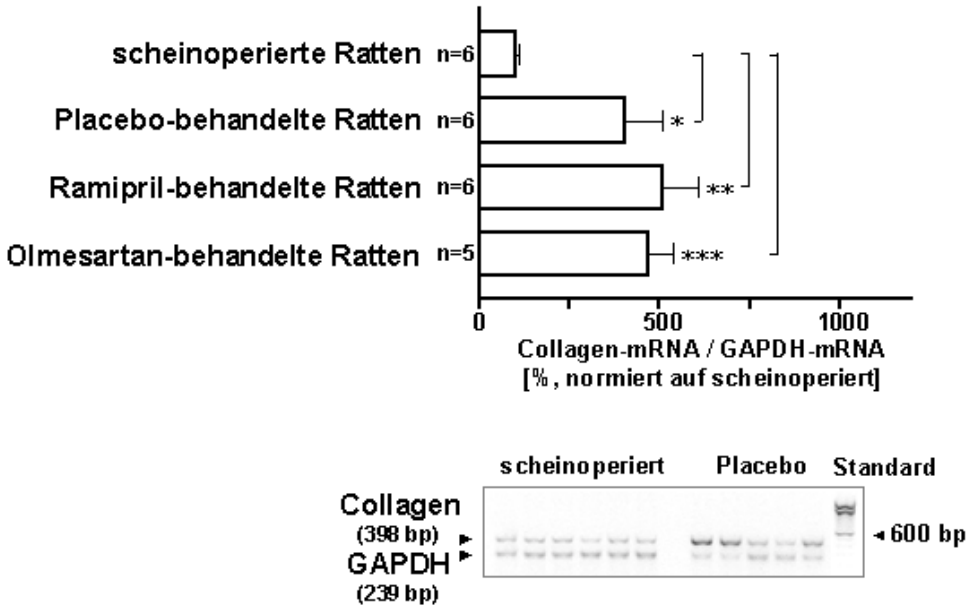


Abbildung 36 Collagen-Typ I-alpha-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril oder dem AT1-Antagonisten Olmesartan

Ratten wurden während 1 Woche vor MI und während 1 Woche nach MI mit Ramipril (1 mg/kg Körpergewicht) oder Olmesartan (1 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet und aus linken Ventrikeln operierter, nicht-infarzierter (scheinoperierter) Tiere 1 Woche post MI isoliert. 100 ng/µl RNA wurden mit dem Qiagen® OneStep RT-PCR-Kit bearbeitet und Collagen-Typ I-alpha-cDNA, sowie GAPDH-cDNA unter Verwendung spezifischer Primer ampilifiziert. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte in einem 2 %igen Agarosegel (unterer Teil der Abbildung). Der obere Teil der Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung (n=5-6, Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$).

Die Resultate der semiquantitativen PCR für Collagen-Typ I-alpha-mRNA zeigten eine deutliche Heraufregulation von 100 ± 11 % in der Gruppe der operierten, nicht-infarzierte (scheinoperierten) Tiere auf 404 ± 104 % in der Gruppe der placebo-behandelten Tiere. Ein ähnlich stark ausgeprägter Effekt konnte bei der semi-quantitativen PCR für Decorin-mRNA beobachtet werden (scheinoperierte Tiere: 100 ± 24 %; placebo-behandelte Tiere: 366 ± 88 %), wohingegen bei dem Nachweis der Expression der Biglykan-mRNA der stärkste Anstieg sichtbar wurde (schein-operierte Tiere: 100 ± 13 %; Placebo-behandelte Tiere: 614 ± 134 %). Die Erhöhungen der mRNA-Expression aller drei EZM-Moleküle waren signifikant im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse, die aus der semiquantitativen PCR der Gewebeproben aus dem Infarktgebiet der Herzen behandelter Tiere hervorgingen,

zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Expression der mRNA von Biglykan, Decorin oder Collagen-Typ I-alpha in den mit Arzneistoffen behandelten Tieren zu den placebo-behandelten Tieren gab. Weder der Einsatz des ACE-Hemmers Ramipril, noch des AT1-Rezeptorantagonisten Olmesartan veränderten die Expression eines der EZM-Moleküle.

Zur Überprüfung der Ergebnisse der semiquantitativen PCR wurde das Northern-Blot-Verfahren angewendet und die Gesamt-RNA von scheinoperierten Tieren, placebo-behandelten Tieren sowie ramipril-behandelten Tieren analysiert. Wie in Abbildung 37 dargestellt, konnte mit diesem Verfahren die erhöhte Expression der Decorin-mRNA 7 Tage post MI bestätigt werden. Eine Verminderung der Expression unter der Behandlung mit Ramipril war, vergleichbar mit der semiquantitativen PCR, auch mit diesem Verfahren nicht zu erkennen.

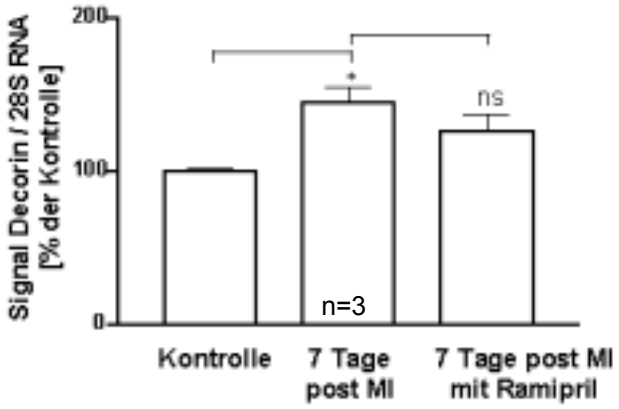


Abbildung 37 Decorin-mRNA-Expression 7 Tage post MI nach Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Ramipril

Ratten wurden während 1 Woche vor und nach MI mit Ramipril (3 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Gesamt-RNA wurde aus dem Infarktgebiet von Rattenherzen 1 Woche post MI und aus nicht-infarzierten linken Ventrikeln von Kontrolltieren isoliert. 20 µg Gesamt-RNA wurden mittels Northern-Blot-Verfahren mit spezifischer, an [^{32}P]-gekoppelter cDNA-Sonde für Ratten-Decorin radioaktiv markiert. Das Signal für Ratten-Decorin wurde auf die Gel-Beladung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Färbung der 28S RNA normiert. Daten sind dargestellt als Prozent der nicht-infarzierten Kontrollen (Mittelwert ± SEM; *: $p < 0,05$ errechnet mittels ungepaartem t-Test).

4 Diskussion

4.1 Betrachtungen der verwendeten Methoden: zur Homogenität der Zellkultur und zum Sulfateinbau

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung der Expression des Proteoglykans Biglykan in kultivierten kardialen Fibroblasten *in vitro* und der Untersuchung der Expression der Proteoglykane Decorin und Biglykan *in vivo* nach experimentell induziertem MI in der Ratte.

Das Myokard besteht im Wesentlichen aus 2 Zellpopulationen: Myozyten, die vor allem die Kontraktilität des Myokards vermitteln und den größten Beitrag zur Masse des Myokards leisten, und den sogenannten Nicht-Myozyten, die einen Anteil von zwei Dritteln an der Zahl aller Zellen des Myokards ausmachen. Die kardialen Fibroblasten wiederum stellen 90% dieser Fraktion und sind somit die häufigsten Zellen des Herzens (51). Sie sind verantwortlich für die Synthese und Ablagerung der EZM im Interstitium des Herzens. Die EZM bildet ein komplexes dreidimensionales Netzwerk aus Collagenfasern, in das kardiale Myofibrillen und Kapillargefäße eingelagert sind. Zusätzlich zur Synthese von Collagen-Typ I und –Typ III produzieren kardiale Fibroblasten weitere EZM-Proteine wie Fibronektin, Thrombospondin und Proteoglykane. Eine weitere sekretorische Funktion der Fibroblasten im Gewebeverband des Herzens stellt die autokrine und parakrine Freisetzung von Wachstumsfaktoren dar (46).

4.1.1 Reinheit der Kultur

Die Primärkultur der kardialen Fibroblasten wurde durch schrittweise enzymatische Freisetzung der das Myokard bildenden Zellen aus zerkleinerten Myokardstücken angelegt. Die Fibroblasten wurden aus dem Zellgemisch durch eine fraktionierte Zentrifugation mit anschließenden Sedimentationsschritten isoliert. Trotz dieser Verfahrensweise enthielt die Primärkultur noch einen geringen Anteil an Myozyten. Das Ausmaß der Kontamination wurde mittels Immunfärbung von für Myozyten spezifischem sarkomeren Aktin auf ca. 10 % geschätzt. Da die Fibroblasten die Hauptproduzenten der EZM-Moleküle darstellen (18), kann davon ausgegangen

werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteoglykane zum weit überwiegenden Teil von den Fibroblasten gebildet wurden.

4.1.2 Radioaktive Markierung der Proteoglykane

Die Markierung der sezernierten PG durch Zusatz von [^{35}S]-haltigem anorganischem Sulfat zu dem Kulturmedium ermöglichte den Nachweis von quantitativen Veränderungen der Proteoglykan-Synthese. Das anorganische Sulfat wird metabolisch in die N-Acetylglucosamin- und N-Acetylgalactosamin-Moleküle der GAG-Ketten der PG eingebaut. In den meisten Fällen ist ein Anstieg der Menge des neu inkorporierten Radiosulfats auf eine Steigerung der Synthese von PG zurückzuführen. Alternativ dazu kann aber auch eine Verlängerung der GAG-Ketten oder ein erhöhter Sulfatierungsgrad der GAG-Ketten bei gleicher Anzahl an Kernproteinen hinter einem Anstieg der in die PG eingebauten Menge an Radiosulfat verborgen sein. Veränderungen des Sulfatierungsgrades sind relativ selten, dagegen kommen Verlängerungen oder Verkürzungen der GAG-Ketten häufiger vor. Ein Beispiel ist die durch oxidiertes *low density lipoprotein* (oxLDL) induzierte Verlängerung der CS-Ketten von Biglykan in glatten Muskelzellen (13) oder die in dieser Arbeit beschriebene Verlängerung der GAG-Ketten von Biglykan durch NO. In erster Näherung hat sich allerdings die Bestimmung der Gesamt-PG-Sekretion als guter Indikator für Veränderungen der Expression erwiesen. Beispielsweise korrelierten in dieser Arbeit die Stimulation des Radiosulfat-Einbaus durch Ang II mit der Induktion der mRNA-Expression von Biglykan und die Hemmung des [^{35}S]SO_4^{2-}-Einbaus durch NO mit einer Repression der mRNA von Biglykan.

4.2 Regulation der Proteoglykan-Sekretion und -Expression durch Wachstumsfaktoren und Zytokine

Die Bildung einer Infarktnarbe *in vivo* ist notwendig, um den Ersatz nekrotischen Gewebes nach MI durch ein Gewebe zu gewährleisten, welches der mechanischen Beanspruchung während der Kontraktion des Myokards gewachsen ist. Lange galt der infarzierte Bereich als inertes Gebiet. Heute steht fest, dass auf alle Fälle von den Infarktrandbezirken biochemische Reize ausgehen, die regulieren, ob Zellen repariert und umgewandelt oder aber zerstört werden, und dies beginnt bereits während der Ischämiephase. Nach wenigen Tagen werden Makrophagen in das

Infarktgebiet gelockt, bestimmte Peptide aktiviert und freigesetzt, neue Blutgefäße sprossen ein, Fibroblasten werden angelockt und proliferieren. In dieser frühen entzündlichen Phase der Wundheilung wird unter dem Einfluss einer Vielzahl regulierender Mediatorsubstanzen Granulationsgewebe gebildet. Bestandteil dieses Granulationsgewebes sind über einen langen Zeitraum auch kardiale Fibroblasten, die damit Faktoren ausgesetzt sind, die u.a. das sekretorische Verhalten beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden biochemische Reize verwendet, die relevant für die Umbauprozesse nach MI sein könnten und die grob in 4 Gruppen unterteilt werden können:

(1) Wachstumsfaktoren (PDGF BB, TGF-ß1), die ihre Signale über Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermitteln, deren Signalkaskade durch eine Autophosphorylierung des Rezeptors mit anschließender Aktivierung einer Vielzahl von Effektorproteinen abläuft;

(2) Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Es wurde sowohl Ang II untersucht, ein Ligand an AT1- und AT2-Rezeptoren, als auch Thrombin, das proteolytisch Protease-aktivierte Rezeptoren vom Subtyp 1-4 aktiviert. Nach Bindung des Agonisten dissoziieren die G-Proteine von dem eigentlichen Rezeptorprotein ab und aktivieren für den Rezeptor, das G-Protein oder die jeweilige Zelle spezifische Effektorproteine. Die GPCR werden anschließend durch die Bindung von Arrestin abgeschaltet und evt. internalisiert;

(3) Zytokine (TNF-alpha, IL-1ß), die an Zytokinrezeptoren binden. Nach der Bindung an die Rezeptoren aktivieren diese über lösliche Protein-Tyrosin-Kinasen den weiteren Signalweg. Dieser kann von Zellpopulation zu Zellpopulation unterschiedlich sein;

(4) NO, das die meisten seiner Wirkungen über eine direkte Aktivierung der Guanylatzyclase (GC) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt.

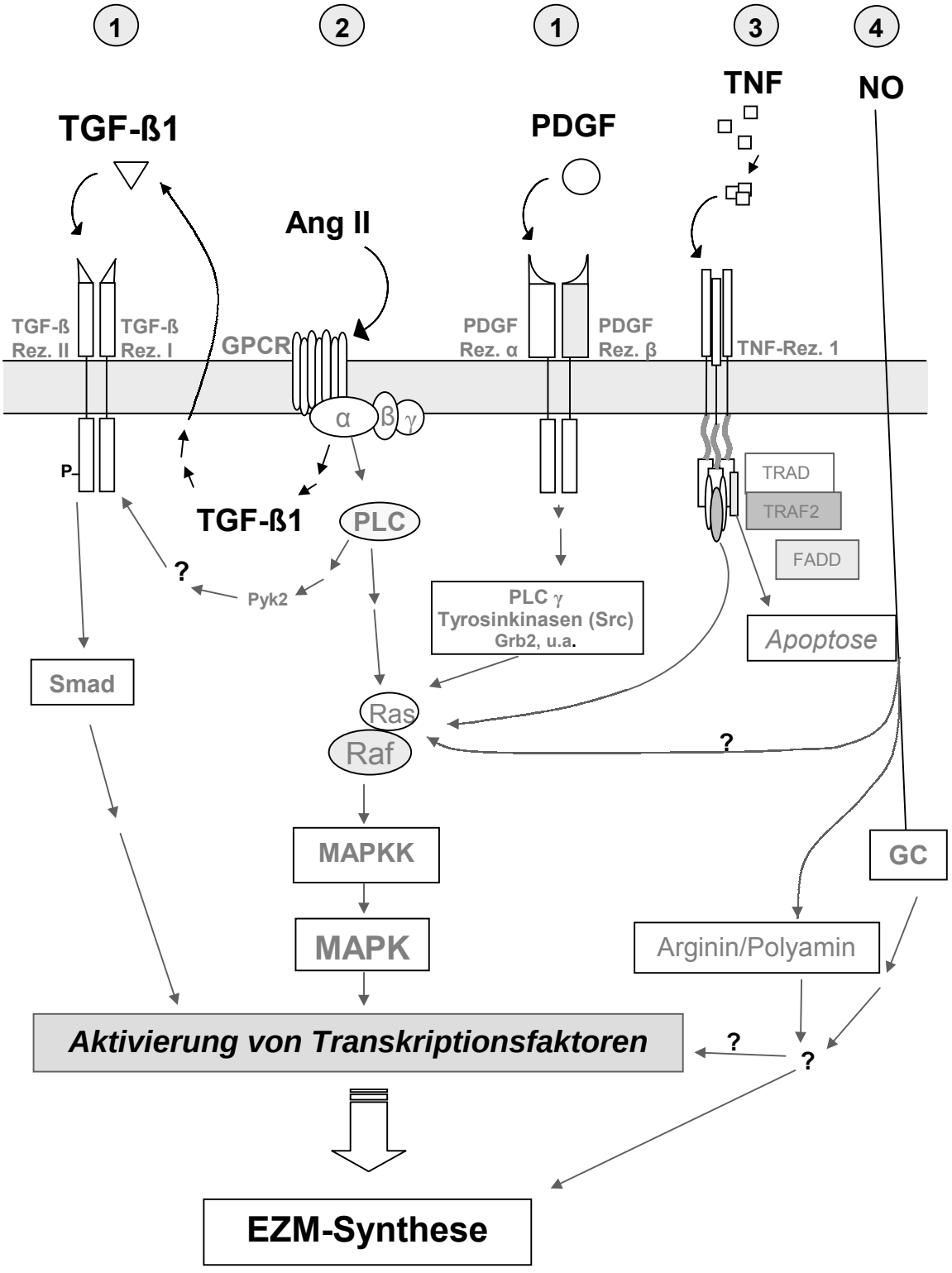


Abbildung 38 Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege der verwendeten Reize

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse und deren Diskussion sind die unterschiedlichen Signalwege nicht im Detail von Bedeutung, sie sind daher in grau gehalten. Wichtige Aspekte erscheinen in schwarz.

Legende zu Abbildung 38: Übersicht über die verschiedenen Signaltransduktionwege der verwendeten Reize

TGF-ß Rez. I/II: TGF-ß-Rezeptorsubtyp I/II; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PDGF Rez.α/β: PDGF-Rezeptorsubtyp α/β; TNF-Rez.1: TNF-Rezeptor Typ 1; PLC, bzw. PLCγ: Phospholipase C, TRADD: *TNF receptor-associated death domain*; TRAF2: *TNF receptor-associated factor 2*; FADD: *Fas-associated death domain*; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; MAPKK: *mitogen activated protein kinase kinase*

Die Wahl fiel auf diese vier Typen von Reizstoffe, weil so der Einfluss unterschiedlicher Rezeptorsysteme und Signaltransduktionswege auf die Regulation der Synthese von Proteoglykanen untersucht werden konnten. Im Folgenden wird die Signaltransduktion der Stimuli und ihre Relevanz für Umbauprozesse des Myokards kurz zusammengefasst.

4.2.1 **PDGF BB, TGF-ß1**

(siehe Abbildung 38)

Im zeitlichen Ablauf der Umbauprozesse sind die in das Infarktgebiet einwandernden Fibroblasten einem Gemisch von Wachstumsfaktoren und Zytokinen ausgesetzt. Das vermehrte Vorkommen von PDGF im Myokard nach Infarkt ist in der Literatur nicht beschrieben, jedoch ist bekannt, dass PDGF sowohl in Blutproben von MI-Patienten (52) als auch in transplantierten menschlichen Herzen verstärkt exprimiert wird. Bei der Autopsie von 20 transplantierten Herzen war PDGF in allen Herzen nachweisbar, wobei die Stärke der Expression in den Herzen ausgeprägter war, die zuvor einer globalen Ischämie ausgesetzt waren. Es konnte bei der Untersuchung festgestellt werden, dass PDGF vor allem im Interstitium und häufig mit Makrophagen assoziiert vorlag (53).

PDGF ist eine Familie von Wachstumsfaktoren, die aus zwei verschiedenen Proteinketten (A und B) bestehen. Die Proteinketten können in den drei möglichen Kombinationen (AA, AB, BB) über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sein. Sie binden sich je nach Zusammensetzung an unterschiedliche PDGF-Rezeptoren. Die PDGF-Rezeptoren stellen homo-, bzw. heterodimere Rezeptorproteine aus den Untereinheiten α und β dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Isoform des PDGF besteht aus zwei B-Ketten (PDGF BB) und bindet mit gleicher Affinität an alle drei möglichen Rezeptorsubtypen αα, αβ und ββ.

Die Regulation von TGF-ß1 im infarzierten Myokard ist besser untersucht. So ist die Expression der TGF-ß1-mRNA 10 Tage (54) wie auch 4 Wochen nach MI bei der Ratte deutlich erhöht, ebenso wie die Dichte des TGF-ß1-Rezeptors (55). Der Anstieg der TGF-ß1-mRNA geht zeitlich einem Anstieg der mRNA von Collagen-Typ I voraus, so dass vermutet wird, dass TGF-ß1 eine wichtige Rolle in den fibrotischen Umbauprozessen nach MI spielt.

Die TGFs sind eine Familie von Polypeptiden, die ihren Namen der Tatsache verdanken, dass sie den Phänotyp von Zellen transformieren können. Es wurden zwei strukturell verschiedene TGFs identifiziert, TGF-α und TGF-ß, wobei TGF-α in biologischer und struktureller Hinsicht einer anderen Klasse von Wachstumsfaktoren zuzuordnen ist. Bei TGF-ß handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der an Umbauprozessen von Geweben (z.B. MI) und an Wundheilungsprozessen beteiligt ist. Während er für einige Zelltypen einen Wachstumsinhibitor darstellt, kann TGF-ß in Zellen mesenchymaler Herkunft auch eine proliferationsfördernde Wirkung entfalten (24). Eine wichtige Funktion liegt in der Regulation der EZM-Akkumulation durch Induktion der Expression einer Vielzahl von EZM-Molekülen sowie der Hemmung des proteolytischen EZM-Abbaus. Es sind drei Isoformen des TGF-ß bekannt: TGF-ß1, -ß2 und -ß3. Die biologisch aktiven Peptide binden am TGF-ß-Rezeptor-Typ II. Der Komplex aus Rezeptor-Typ II und TGF-ß rekrutiert anschließend den TGF-ß-Rezeptor-Typ I. Die Aktivierung des TGF-ß-Rezeptor-Typ I durch den Rezeptor-Typ II ermöglicht weiterführend eine Phosphorylierung von *Smad*, das in den Zellkern wandert und die Transkription einer Vielzahl von Genen steuert. Alternativ werden noch weitere unterschiedliche Kinasen aktiviert (zur Übersicht: (56)).

In der Zellkultur sind die eingesetzten Wachstumsfaktoren wie TGF-ß1 und PDGF BB wichtige Faktoren. PDGF ist ein bekanntes Mitogen in kardialen Fibroblasten, TGF-ß1 konnte als Induktor der Collagen-Typ I-Expression ermittelt werden (46).

Kardiale Fibroblasten, gewonnen aus neonatalen Ratten, besitzen auf ihrer Zelloberfläche sowohl Rezeptoren für PDGF BB (46) als auch für TGF-ß1 (57). Für beide Wachstumsfaktoren ist in der Literatur belegt, dass sie neben der Steigerung der Proliferation (58) auch eine Erhöhung der Collagen-Synthese in kardialen Fibroblasten verursachen (59). Es ist bislang wenig bekannt über den Einfluss dieser Wachstumsfaktoren auf die Regulation der PG-Synthese in kardialen Fibroblasten. In anderen Zellen jedoch, wie z.B. glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), konnte gezeigt werden, dass sowohl PDGF als auch TGF-ß1 die Proliferation sowie die EZM-Synthese erhöhen können (47), (48). Zusätzlich ist TGF-ß1 ein potenter Stimulator der Biglykan-Expression in humanen Osteosarkoma-Zellen (MG63) (60). Es blieb bislang aber im Dunkeln, wie TGF-ß1 die Biglykan-Expression steigert, denn es konnte weder eine Zunahme der Aktivität des humanen Biglykan-Promotors noch eine Verlängerung Lebensdauer der mRNA von Biglykan im Zytoplasma festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass TGF-ß1 und PDGF BB beide zu einer ausgeprägten Induktion der PG-Sekretion in kardialen Fibroblasten führen. Die konzentrationsabhängige Steigerung der Sekretion von PG könnte ein Hinweis darauf sein, dass beiden Wachstumsfaktoren auch *in vivo* eine Bedeutung für die Regulation der PG-Expression z.B. im Rahmen von Umbauprozessen nach MI zukommt.

PDGF BB ist in seiner Effektivität und der Zuverlässigkeit, mit der ein Wachstumsreiz ausgelöst werden kann, mit FKS vergleichbar. Da Letzteres aber chemisch nicht definiert ist, wurde in den nachfolgenden Experimenten PDGF BB als Standardreiz eingesetzt und die Effekte anderer Faktoren auf den PDGF BB-Effekt bezogen.

4.2.2 TNF-alpha, IL-1ß

(siehe Abbildung 38)

Kardiale Fibroblasten konnten als Quelle von IL-1ß und TNF-alpha sowohl *in vitro* (61), als auch *in vivo* nach Ischämie im Myokard identifiziert werden (62).

TNF-alpha ist ein wichtiger Mediator im Hinblick auf Apoptose, Entzündungsgeschehen und Antwort des Immunsytems. Die Beteiligung des Zytokins an der Pathogenese einer Reihe von Krankheitsbildern wie z.B. rheumatoider Arthritis,

Krebs und MI ist gesichert. Das TNF-Peptid liegt als Homotrimer vor und kann seine Effekte durch Bindung an zwei verschiedenen Rezeptoren, dem TNF-Rezeptor-Typ I (TNF-RI) oder –Typ II, vermitteln. Dabei werden die meisten der bekannten biologischen Funktionen durch den TNF-RI initiiert, dessen Signalkaskade im Wesentlichen in der Aktivierung zweier Transkriptionsfaktoren mündet: *nuclear factor κB* (NF-κB) und *c-Jun NH_2-terminal kinase* (JNK). Die dorthin führenden Stufen der Signalkaskade sind sehr komplex. Es sei nur erwähnt, dass nach der Bindung des TNF-Trimers an den Rezeptor dieser auch trimerisiert und inhibierende Proteine von dem Rezeptor dissoziieren. Dadurch wird die Bindung von Adapterproteinen (*TNF receptor-associated death domain* (TRADD)) an den zytosolischen Anteil des Rezeptors möglich. Diese Domänen bieten Bindungsstellen für weitere Proteine, die für die Initiation von Signalen verantwortlich sind.

IL-1ß gehört wie TNF-alpha zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-1ß vermittelt seine Effekte über einen spezifischen IL-1-Rezeptor. Der IL-1-Rezeptor ist mit den TNF-Rezeptoren insofern verwandt, als er selbst keine Enzymaktivität hat, jedoch nach seiner Aktivierung am zytoplasmatischen Anteil Assoziationsstellen für zytoplasmatische Tyrosinkinasen bietet.

Für beide vorgestellten Zytokine wird vermutet, dass sie *in vivo* das Überleben von Zellen im Myokard während der Ischämiephase günstig beeinflussen (63). So lag es nahe, in dieser Untersuchung die Zytokine TNF-alpha und IL-1ß einzusetzen und ihren Effekt auf die Proteoglykan-Synthese zu messen. Auf diese Weise sollten Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, ob möglicherweise Zytokine an der veränderten Synthese-Leistung von PG und EZM *in vivo* nach Infarkt beteiligt sind. Das Resultat der Untersuchung zeigt, dass TNF-alpha nur einen schwach steigernden, IL-1ß keinen Effekt auf die Sekretion der PG hervorrief.

Drei Erklärungsmöglichkeiten sollen erwähnt werden:

1-Der Befund bedeutet nicht, dass TNF-alpha und IL-1ß die Synthese nicht oder nur schwach stimulierten, da *in vivo* die Gesamtmenge von PG nicht nur von der Synthese sondern auch von deren Abbau bestimmt wird (64). Mit den *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit kann lediglich eine Aussage zur Syntheseleistung getroffen werden. Es könnte also durchaus sein, dass Zytokine über eine Abbauhemmung die PG-Gesamtmenge erhöhen.

2-Es muss darauf hingewiesen werden, dass in dieser Untersuchung keine spezifizierende Analyse der Einzelkomponenten der EZM erfolgt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass an kardialen Fibroblasten ähnlich wie an humanen Brustkarzinomzellen (T47D) (60) und Endothelzellen (65) die Synthese von Biglykan vermindert ist, dafür aber die Synthese von z.B. Collagen kompensatorisch erhöht ist.

3-Die Aussagekraft der hier vorgestellten Ergebnisse ist durch die Tatsache beschränkt, dass *in vivo* zahlreiche Faktoren anwesend sind, die im Einzelnen nicht spezifiziert sind, die den Effekt von Zytokinen maßgeblich mitbestimmen könnten. Einen ersten Schritt auf dem Weg, die *in vivo*-Situation adäquat abzubilden, stellt die Kombination von PDGF BB mit TNF-alpha, bzw. TGF-ß1 mit TNF-alpha dar.

Interessanterweise steigerte TNF-alpha in der Kombination mit PDGF BB synergistisch die Sekretion von PG. Dieses Phänomen trat allerdings in der vorliegenden Stärke nur auf, wenn die kardialen Fibroblasten eine 24-stündige Vorinkubation mit TNF-alpha erfuhren. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass TNF-alpha, als erster Stimulus nach 48 Stunden Serumentzug zur Zellkultur gegeben, einen genomischen Effekt verursacht haben könnte, der die Wirkung von PDGF BB verstärkte. Dieser Effekt war spezifisch für PDGF BB, da das gleiche Experiment mit der Kombination von TGF-ß1 mit TNF-alpha keinen Synergismus zeigte.

PDGF BB und TGF-ß1 lösen über völlig unterschiedliche Signaltransduktionswege Effekte auf Zellen aus. TGF-ß1 verändert die Transkription über *Smad*, während PDGF BB typische Tyrosinkinase-Rezeptoren aktiviert und nachfolgend u.a. über Proteine wie *Ras*, *Raf* und MAPKK Veränderungen der Transkription induzieren. Welche spezifischen Signalwege für die Induktion der Biglykan-Expression durch

PDGF BB in anderen Zellen wie z.B. VSMC verantwortlich sind, ist noch nicht ausreichend untersucht worden. Daher kann bei dem derzeitigen Wissensstand auch noch nicht darüber spekuliert werden, auf welcher Stufe der PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion der Synergismus mit den durch TNF-alpha initiierten Signalwegen ausgelöst wird. In zukünftigen Untersuchungen soll diesen Fragen aber nachgegangen werden, da ähnliche Interferenzen zwischen verschiedenen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen für die Pathophysiologie des MI und der anschließenden Vernarbung und Hypertrophie des Herzens eine große Rolle spielen könnten.

4.2.3 **Thrombin**

(siehe Abbildung 38)

Thrombin, bekannt als Faktor IIa der Blutgerinnungskaskade, wurde bislang im zellulären Geschehen nach MI wenig Bedeutung beigemessen. Interessanterweise zeigte eine aktuelle Studie an humanen Plasmaproben, die MI-Patienten 5 Jahre nach MI entnommen wurden, dass nach diesem Zeitraum eine erhöhte Thrombinbildung vorlag, was einen Hinweis auf eine Aktivierung des Gerinnungssystems darstellt (66). Dem Befund, dass Thrombin in kultivierten kardialen Fibroblasten die PG-Sekretion induziert, könnte daher möglicherweise auch eine klinische Bedeutung zukommen. Die Untersuchung von Thrombineffekten in kardialen Zellen ist interessant, da akut während des MI und in der Zeit danach eine Vielzahl von Proteasen aktiviert werden. Unter diesen Proteasen finden sich lysosomale Enzyme, die aus nekrotischen oder apoptotischen Zellen freigesetzt werden, z.B. Serinproteasen wie Cathepsin G und Proteinase 3, die aus Leukozyten freigesetzt werden können, und Elastase, Matrix-Metalloproteasen (MMP), membranständige MMPs (MT-MMP) sowie Gerinnungsfaktoren, die neben Thrombin zu einer Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) führen könnten.

Thrombin selbst vermittelt seine zellulären Effekte durch Protease-aktivierte, G-Protein-gekoppelte (GPCR) Rezeptoren (PAR). PAR-1 ist bislang der einzige Rezeptor der PAR-Familie, der in kardialen Fibroblasten funktionell nachgewiesen werden konnte. In diesen Zellen führte seine Aktivierung durch Thrombin zu einer erhöhten DNA-Synthese. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die PAR-1-Aktivierung zu einer Transaktivierung des *epidermal growth factor receptor* (EGF-

Rezeptor) (67) führte. Der Einfluss von Thrombin auf die Collagen-Synthese ist in Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft mehrfach untersucht (68), (69), (70), der Einfluss auf PG bislang nicht. Thrombin erhöht die mRNA-Expression von Pro-collagen-Typ I-alpha. Damit hat es einen ähnlichen Effekt wie PDGF.

In der vorliegenden Arbeit steigert Thrombin die Sekretion von PG in das Kulturmedium. Diese vermehrte PG-Sekretion kann nicht bedingt sein durch die (für Thrombin nachgewiesene) Steigerung der Collagen-Synthese, da Collagen bei der Aufreinigung der PG-Fraktion entfernt wird. Bei dem jetzigen Stand der Untersuchung kann nichts zur Natur des zusätzlich gebildeten PG ausgesagt werden. Möglicherweise eröffnet sich hier ein Weg, durch PAR-1-Antagonisten eine pathologisch gesteigerte Expression von EZM zu korrigieren.

Der Einsatz des selektiven PAR-1-Agonisten (SFLLRNP) verursachte einen vergleichbaren Effekt, so dass vermutet werden kann, dass der Thrombineffekt auf die PG-Sekretion durch den PAR-1-Rezeptor vermittelt wird. Da Collagen-Typ I-alpha und PG in fibrotischen Geweben vermehrt vorliegen, wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Inaktivierung von Thrombin die Fibrosierung des Myokards gegebenenfalls vermindern kann.

4.2.4 Stickstoffmonoxid

(siehe Abbildung 38)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein frei diffundierendes, kurzlebiges Gas, welches durch die Familie der NO-Synthasen (NOS) generiert wird. Zu dieser gehören die konstitutiv exprimierte neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) sowie die unter anderem durch Zytokine induzierbare NOS (iNOS). NO wird durch die enzymatische Aktivität der NOS aus L-Arginin freigesetzt und kann durch Zellmembranen diffundieren. Die meisten physiologischen Vorgänge werden durch eine Aktivierung der Guanylatcyclase (GC) hervorgerufen, die ihrerseits durch die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) als *second messenger* verschiedene Zielproteine aktivieren kann. Neben dieser Möglichkeit der Signaltransduktion durch NO werden weitere diskutiert:

(1) NO soll indirekt oder direkt *Ras*, ein G-Protein des MAP-Kinase-Signalweges, aktivieren (71).

(2) NO soll die Proteinkinase-C-Aktivität hemmen (72) oder steigern (73).

(3) NO soll die Janus-Kinasen (JAK), eine weitere Klasse von Proteinkinasen, beeinflussen (74).

(4) NO soll die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Aorta von Ratten durch die Hemmung des Arginin-Polyamin-Weges hemmen (75), der ein von cGMP unabhängiger Signalweg ist.

Den vielfältigen Signalwegen, die von NO beeinflusst werden, entspricht eine Vielfalt von Funktionen. NO verhindert die Freisetzung von Prostanoiden im infarzierten Myokard (76), die Plättchenaggregation und die Leukozytenadhäsion (77), erhält die Undurchlässigkeit von Gefäßen (78) und hemmt die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (50). Wichtig für diese Arbeit waren Hinweise auf eine Reduktion der Größe des Ischämiegebiet nach MI durch NO (79). Untersuchungen an eNOS-*knockout*-Mäusen bestätigten diese klinische Beobachtung. Bei eNOS-*knockout* Tieren war ein größerer Bereich des Herzmuskels vom Infarkt betroffen (80) und die kompensatorische Heraufregulation der iNOS war ausgeprägter (81) als bei den Wildtypen. Nach experimentell induziertem MI sollen aktivierte Makrophagen die Hauptquelle von NO darstellen (82).

Die Beeinflußung der Synthese von EZM-Moleküle durch NO wurde bereits untersucht. Zum Beispiel verminderte sich die Collagenproduktion von Fibroblasten aus der Haut über einen cGMP-abhängigen Weg durch NO (49) oder es erhöhte sich die Biglykan-Expression bei Einsatz des NOS-Inhibitors L-NAME in der Cyclosporin-geschädigten Niere von Ratten (83).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von NO auf die PDGF-stimulierte Sekretion von PG und auf die PDGF-stimulierte mRNA-Expression von Biglykan in kardialen Fibroblasten. Es konnte gezeigt werden, dass NO freigesetzt von NO-Donoren (unabhängig von der substanzspezifischen Freisetzungs-geschwindigkeit) die Sekretion von PG konzentrationsabhängig senkt. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Verwendung von nicht-maximal wirksamen Konzentrationen der NO-Donoren zell-toxische oder proliferationshemmende Wirkungen die PG-Sekretion beeinflussten. Die mRNA-Expression von Biglykan, welches das vorherrschende PG der neonatalen, kardialen Fibroblasten darstellt, wurde im Verlauf von 24 Stunden nach Zugabe des NO-Donors deutlich gehemmt.

Diese Befunde stehen im Einklang mit einer Untersuchung, derzufolge NO, ebenfalls unabhängig von der Freisetzungshalbwertzeit des NO-Donors, in Chondrozyten aus dem Gelenkknorpel von Kaninchen konzentrationsabhängig die durch *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) stimulierte PG-Sekretion in das Kulturmedium senkte (84).

In kardialen Fibroblasten vermindert NO nicht nur die mRNA-Expression von Biglykan, sondern erhöht das Molekulargewicht dieses PGs durch eine Verlängerung der GAG-Ketten. Die Verlängerung der GAG-Ketten könnte von erheblicher pathophysiologischer Bedeutung sein. Zumindest konnte an VSMC aus Aorten von Affen gezeigt werden (13), dass ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen, nämlich oxidiertes *low density lipoprotein* (oxLDL), das Muster der GAG-Ketten der an der EZM beteiligten PG verändert. Möglicherweise liegt also den pathologischen Gefäßwandveränderungen nicht oder nicht nur eine Verschiebung der verschiedenen an der EZM beteiligten PG zugrunde sondern möglicherweise auch eine Veränderung der GAG-Ketten, die die Eigenschaften des betroffenen PG modulieren. Eine solche Eigenschaft könnte die Affinität der PG für natives LDL sein. Eine andere wäre das Bindungsvermögen für Wachstumsfaktoren. Für Biglykan und Decorin ist bekannt, dass sie Wachstumsfaktoren (TGF-ß1) binden und damit inaktivieren können (85). Möglicherweise ändert sich das Bindungsvermögen von Decorin und Biglykan durch die Änderung der GAG-Ketten. Hierfür liegen im Augenblick keine experimentellen Belege vor.

Die vorliegende Untersuchung wirft die Frage auf, ob auch kardiale Fibroblasten unter dem Einfluss von NO PG mit einem höheren Molekulargewicht und dadurch veränderten funktionellen Eigenschaften synthetisieren. Da nach MI sowohl die Expression der iNOS als auch von Biglykan erhöht ist, könnte die Regulation der Expression und des Molekulargewichtes des Biglykan auch *in vivo* relevant sein.

4.2.5 Angiotensin II

(siehe Abbildung 38)

Nach MI kommt es neben einem ausgeprägten fibrotischen Umbau der Infarktnarbe zu einer Hypertrophie und interstitiellen Fibrose des nicht-infarzierten Myokards (86). Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass das Renin-Angiotensin-System (RAS) in diese Prozesse involviert ist. Der Einsatz von ACE-Hemmern führte zu einer

deutlichen Reduktion der Bildung fibrotischen Gewebes, wobei zudem gezeigt werden konnte, dass sowohl ACE-Hemmer als auch AT1-Rezeptorantagonisten die Infiltration von Makrophagen und Fibroblasten reduzieren konnten (87).

Ang II vermittelt seine Effekte durch den AT1- und den AT2-Rezeptor, wobei es sich bei beiden um GPCR handelt. Sowohl die Funktion als auch die Signaltransduktion des AT1-Rezeptors ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Im adulten Organismus ist der AT1-Rezeptor weit verbreitet exprimiert, wohingegen sich die Expression des AT2-Rezeptors im adulten Organismus auf einem sehr niedrigen Niveau im Wesentlichen auf die Nebenniere und das Gehirn beschränkt. Nach einem ischämischen Ereignis im menschlichen Herzen aber steigt die Rezeptordichte des AT2-Rezeptors deutlich an (88), was für eine Rolle des AT2-Rezeptors bei der Reaktion des Myokards auf eine ischämische Schädigung und die nachfolgenden Prozesse hinweist. Der AT2-Rezeptor wird vor allem mit Regenerations- und Wundheilungsprozessen in Verbindung gebracht (89).

Die Zellkultur der kardialen Fibroblasten, isoliert aus den Ventrikeln neonataler Ratten, stellt ein anerkanntes Modell zur Untersuchung des Einflusses des RAS auf die Expression von EZM-Molekülen (90), (91) *in vitro* dar. Wie zuvor schon anhand von Studien an Patienten ausgeführt, ist nach ischämischen Ereignissen des Myokards *in vivo* die Expression des sonst hauptsächlich in der embryonalen Entwicklungsphase exprimierten AT2-Rezeptors (92) erhöht (93). Die Bedingungen zur Kultivierung und Gewinnung der Zellen wurde mit Bedacht so gewählt, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sowohl den AT1- als auch den AT2-Rezeptor exprimierten. Daher konnte das oben genannte Zellmodell für Untersuchungen von Ang II-vermittelten Effekten verwendet werden, bei denen das Zusammenspiel von AT1- und AT2-Rezeptoren von Interesse war. Um die Existenz beider Ang II-Rezeptorsubtypen in der Zellkultur zu gewährleisten, wurden Herzen neonataler Ratten verwendet, die ein Alter zwischen 2 und 3 Tagen hatten, da beide Rezeptorsubtypen in diesem Alter am stärksten exprimiert werden (94), (95). Somit handelt es sich bei dem beschriebenen Effekt von Ang II um Wirkungen, die sich aus der gleichzeitigen Stimulation beider Rezeptorsubtypen ergeben könnten. Interessanterweise wurde in vielen experimentellen Ansätzen gezeigt, dass der AT2-Rezeptor ein Gegenspieler des AT1-Rezeptors sein kann. Zuerst wurde dieser funktionelle

Antagonismus beider Rezeptorsubtypen in Bezug auf die Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen beschrieben (45).

Die Regulation der EZM durch das RAS ist sowohl in VSMC als auch in kardialen Fibroblasten aus adulten und neonatalen Ratten untersucht worden. In *in vitro* und *in vivo* Studien wurde beschrieben, dass Ang II, vermittelt durch den AT1-Rezeptor, die Collagen-Expression durch VSMC und die Collagen-Akkumulation in der Gefäßwand der Ratte erhöht (96), (97). Ang II vermag ebenso die Produktion von PG in kultivierten VSMC der Ratte zu stimulieren (98).

Die Untersuchungen zur Regulation der EZM in kardialen Fibroblasten durch Ang II beschränkten sich bislang vor allem auf die Synthese und mRNA-Expression von Collagen-Typ I und -Typ III sowie Fibronektin. Zur Regulation von PG in diesem Zelltyp durch Ang II ist bislang nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch metabolischen Einbau von Radiosulfat in die GAG-Ketten der PG gezeigt werden, dass Ang II die Sekretion der PG durch den AT1-Rezeptor vermittelt induzierte. Da Biglykan nachweislich das dominierende PG ist, das von kardialen Fibroblasten aus neonatalen Rattenherzen synthetisiert wird, wurde anschließend der Einfluss von Ang II auf die mRNA-Expression von Biglykan untersucht. Auch die Induktion der mRNA-Expression wird durch den AT1-Rezeptor vermittelt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen an VSMC (99) und werfen die Frage auf, welcher der bekannten Signaltransduktionswege des AT1-Rezeptors diesen Effekt in kardialen Fibroblasten hervorrufen könnte.

In der Literatur sind zahlreiche Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren an AT1-Rezeptor-vermittelten Effekten zu finden.

Bekannt ist für humane VSMC, dass eine AT1-Rezeptor-Stimulation zur Freisetzung von TGF-ß1 führt (siehe Abbildung 38), welche parakrin/autokrin die Collagen-Expression und -Synthese erhöht (37). Daneben wird darüber berichtet, dass Ang II in VSMC Wachstumsfaktoren (PDGF, bFGF) freisetzen kann und diese dann parakrine Effekte verursachen (100).

Neben einer durch Ang II-Stimulation erfolgten Freisetzung von TGF-ß1, PDGF oder bFGF wird eine Transaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch den AT1-Rezeptor diskutiert. Eguchi et al. (101) zeigten, dass in VSMC nach Ang II-

Stimulation die Phosphorylierung des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptors induziert wurde, ohne dass EGF im extrazellulären Medium vermehrt vorhanden war.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die erhöhte PG-Sekretion und Biglykan-mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten durch eine autokrine Freisetzung von Wachstumsfaktoren als Reaktion auf die AT1-Rezeptor-Aktivierung ausgelöst wird. Der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen PDGF, bFGF und TGF-ß1 zeigt nur bei Neutralisierung von TGF-ß1 eine Hemmung der Ang II-induzierten PG-Sekretion. Dies ist ein Hinweis darauf, dass TGF-ß1 in die Ang II-induzierte Biglykan-Expression involviert ist. Im Folgenden wurde mit Hilfe eines ELISAs für TGF-ß1 eine erhöhte TGF-ß1-Konzentration im Kulturmedium nach Ang II-Stimulation festgestellt, die durch Verwendung des AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan zu hemmen war. Da der AT2-Rezeptor-Antagonist PD123177 keinen Effekt auf die gesteigerte TGF-ß1-Konzentration hatte, liegt der Schluss nahe, dass Ang II die PG-Sekretion und die Biglykan-mRNA-Expression durch eine AT1-Rezeptor-vermittelte autokrine Freisetzung von TGF-ß1 erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten,

- dass Ang II vermittelt über TGF-ß1 eine Änderung der EZM bewirkt,
- dass dieser Effekt von Ang II auf TGF-ß1 beschränkt ist, d.h. es kommt nicht zu einer vermehrten Freisetzung von PDGF oder bFGF
- dass dieser Effekt ausschließlich über den AT1-Rezeptor ausgelöst wird.

4.3 Analyse der EZM-Expression nach Myokardinfarkt der Ratten

Im gesunden, nicht-infarzierten Herzen ist ein Gerüst aus interstitieller extrazellulärer Matrix (EZM) vorhanden, das sowohl der Verankerung der kardialen Myozyten im Gewebeverband dient, als auch ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, in das Kapillargefäße eingelagert sind.

Nach MI kommt es neben einem ausgeprägten fibrotischen Umbau der Infarktnarbe zu einer reaktiven Hypertrophie des nicht-infarzierten linken Ventrikels mit verminderter koronarer Durchblutung, mit verminderter kapillarer Durchlässigkeit und einer interstitiellen Fibrose (86), (102). Diese fibrotischen Umbauprozesse können u.a. zu einer eingeschränkten Dehnbarkeit des Myokards führen und so die

diastolische Herzfunktion und Kontraktilität beeinträchtigen (103). Die Synthese und der Umbau der EZM wird maßgeblich von interstitiellen Myofibroblasten ausgeführt (104), die zudem Quelle verschiedener Wachstumsfaktoren sind.

4.3.1 Charakterisierung von EZM-Molekülen nach Myokardinfarkt

Zu den in der Literatur gut beschriebenen Bestandteilen der EZM, die nach MI einer veränderten Expression unterliegen, gehören v.a. Collagen-Typ I und -Typ III (105). Belegt ist ebenso die Tatsache, dass Ang II und TGF-ß1 maßgeblich an der Induktion der Collagene beteiligt sind (106). So konnte in einer Studie an infarzierten Rattenherzen, die 8 Wochen nach dem Setzen des Infarktes entnommen wurden, festgestellt werden, dass die erhöhte mRNA-Expression und die erhöhte Protein-Expression von TGF-ß1 mit der vermehrten Collagen-Typ I-Expression korrelierten (107). Eine weitere Untersuchung an infarzierten Rattenherzen zeigte, dass 7 Tage nach MI im infarzierten Gebiet sowohl eine vermehrte Expression der mRNA von Decorin (108), als auch der mRNA von Biglykan vorlag (7). PG wie Decorin und Biglykan können bekanntermaßen die Fibrillogenese von Collagen (109) und Fibronektin modulieren, sowie die TGF-ß1-Aktivität beeinflussen, womit sie von Interesse für die Umbauprozesse nach MI sind.

Die Befunde der Literatur zu einer erhöhten Collagen-Expression im infarzierten Gewebe können in der vorliegenden Arbeit durch den histochemischen Nachweis von Collagen in der Infarktnarbe sowie der erhöhten Collagen-Typ I-mRNA-Expression bestätigt werden. Da Yamamoto et al. (7) eine Co-Lokalisation von Biglykan mit Collagen-Typ I im Myokard nach MI vermuten und in anderen Systemen eine Co-Lokalisation von Decorin mit Collagen zeigten, wurden immun-histochemische Färbungen durchgeführt. Dabei kann in der Übersichtsaufnahme gezeigt werden, dass in direkter Nachbarschaft der Infarktnarbe deutliche Signale für das PG Decorin zu sehen sind. Dieses Resultat steht im Einklang mit eigenen Befunden und mit Befunden aus der Literatur, die zeigen, dass die mRNA von Decorin 7 Tage post MI deutlich induziert ist (108).

Als Quelle für die Proteoglykane kommen prinzipiell Fibroblasten, die in ihrem aktivierten Zustand in der Infarktnarbe des menschlichen Myokards alpha Glattmuskelaktin (αSMA)-positiv sind (110), (104), Myozyten und Makro-phagen in Frage. Myozyten können anhand ihrer Morphologie leicht von Makro-

phagen und Fibroblasten unterschieden werden. In Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur können zahlreiche Makrophagen, die mittels ED-1-Antikörpern identifiziert wurden, im Bereich des Granulationsgewebes angefärbt werden. Ein Vergleich der Färbungen für Decorin/Biglykan und αSMA zeigt eine Expression der Proteoglykane sowohl in αSMA-positiven Bereichen als auch in der Nähe und in dem stark von Makrophagen infiltrierten Gewebe. Biglykan wird außerdem auch diffus verteilt in dem nicht-infarzierten Myokard des Septums und des Ventrikels angefärbt. Obwohl die häufig beobachtete räumliche Nähe von Decorin und Makrophagen dafür spricht, dass entweder die Makrophagen selbst Decorin sezernieren oder aber umliegende Fibroblasten zur Decorin-Abgabe stimulieren, kann anhand der vorliegenden Färbungen noch keine Aussage darüber getroffen werden, welcher Zelltyp Decorin und Biglykan sezerniert. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit *in vitro* gezeigt, dass zumindest kultivierte kardiale Fibroblasten kein Decorin bilden.

Mit Hilfe von Doppelfärbungen, in denen gleichzeitig die Färbung eines PG und der Makrophagen bzw. Fibroblasten erfolgt, sollte in zukünftigen Arbeiten eine Aussage zur Herkunft der PG nach MI möglich sein.

Des Weiteren war von Interesse, nach welchem Zeitverlauf die mRNA von Decorin, Biglykan und Collagen-Typ I nach MI induziert wurden. Die ermittelten Zeitverläufe mit einem Maximum der mRNA von Biglykan und Collagen-Typ I 5 Tage nach MI und einem Maximum der mRNA von Decorin 5-7 Tage nach MI stimmten mit Angaben aus der Literatur überein. Doi et al. (108) zeigten einen deutlichen Anstieg der Decorin-mRNA-Expression zwischen Tag 7 und 14 nach Setzen des MI. In der vorliegenden Arbeit konnte im Einklang mit diesen Daten ein Verbleib der erhöhten mRNA-Expression von Decorin über den Tag 14 nach MI hinaus bis zum Zeitpunkt 21 Tage post MI nachgewiesen werden. Es konnte aber nur eine schwach erhöhte mRNA-Expression von Collagen-Typ I 3 Wochen nach MI gezeigt werden, wohingegen Hao et al. (107) neben der Decorin-mRNA auch die Collagen-Typ I-mRNA 8 Wochen post MI stark erhöht exprimiert fanden.

In den nicht-infarzierten Arealen des Myokards war sowohl die Collagen-Typ I- und -Typ III-, als auch die Decorin-mRNA-Expression erhöht (111). Der Befund von Zimmermann et al. fand sich in der vorliegenden Untersuchung in einer erhöhten Expression der mRNA von Decorin im nicht-infarzierten rechten Ventrikel und im

nicht-infarzierten Septum bestätigt. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit eine moderate Erhöhung der Decorin-Expression im Randgebiet des Infarktes festgestellt.

4.3.2 Arzneistoff-Behandlung

Das RAS ist nachweislich in die Umbauprozesse des Myokards nach MI involviert.

Die Rezeptordichte der AT1-Rezeptoren ist nach MI in dem Zeitraum von 8 Wochen post MI deutlich erhöht (112). Der AT1-Rezeptor wird vor allem von kardialen Fibroblasten exprimiert, die zudem in der späten Granulationsphase für die Synthese von TGF-ß1 verantwortlich sind (113). Sowohl die TGF-ß1-mRNA-Expression, die bereits kurz nach dem Infarkt induziert ist, als auch die Expression des Wachstumsfaktors war im Infarktgebiet von Ratten 4 Wochen post MI deutlich erhöht (112). Es sei daran erinnert, dass Ang II zu einer vermehrten Freisetzung von TGF-ß1 in kultivierten kardialen Fibroblasten führte und so indirekt ein mitogenes Signal auslösen könnte. Da die Erhöhung der TGF-ß1-Protein-Expression *in vivo* bestätigt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ang II die Entstehung von fibrotischem Gewebe indirekt durch TGF-ß1 fördert (113), (114), (115).

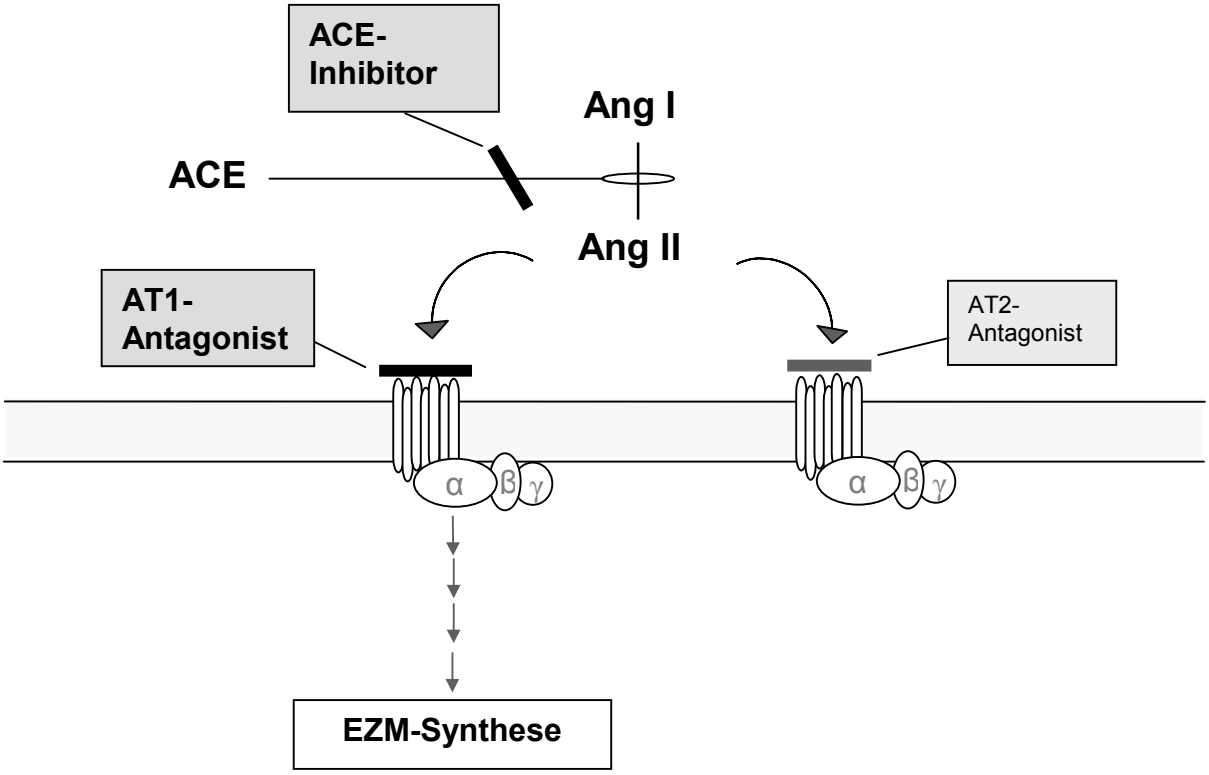


Abbildung 39 Übersicht über die pharmakologischen Angriffspunkte im RAS

Um kardiale Fibrose post MI einzudämmen, sind die in der Abbildung 39 dargestellten pharmakologischen Angriffspunkte denkbar. Die Effekte von ACE-Inhibitoren auf der einen Seite und AT1-Rezeptorantagonisten auf der anderen Seite zeigen sich in einer verkleinerten Infarktgröße und einer verringerten Konzentration von Hydroxyprolin, einem Bestandteil von Collagen, was die Bedeutung des RAS für das Infarktgeschehen erkennen lässt (102), (116), (117), (118), (119).

Da der Einfluss von Ang II auf die Expression von PG nach MI im infarzierten Gebiet bislang wenig untersucht ist und in der vorliegenden Arbeit eine Stimulation der Biglykan-Expression durch Ang II gezeigt wurde, wurde im Tiermodell an Ratten untersucht, ob der ACE-Inhibitor Ramipril oder der AT1-Rezeptorantagonist Olmesartan die Expression der mRNA von Decorin, Biglykan oder Collagen-Typ I-alpha hemmen kann. Für jedes der EZM-Moleküle wurde die erhöhte mRNA-Expression nach MI im infarzierten Gebiet bestätigt, jedoch konnte weder mit Hilfe der semiquantitativen PCR noch mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens eine

Veränderung der Expression durch die Behandlung der Tiere mit einem der Arzneistoffe nachgewiesen werden.

Ein naheliegender Erklärungsansatz für das Fehlen von Effekten einer Ang II-Hemmung wäre die Wahl des Zeitpunktes der Bestimmung der mRNA-Expression. Da die verwendeten Herzen 7 Tage post MI entnommen wurden, es sich bei den fibrotischen Umbauprozessen jedoch um einen langanhaltenden Vorgang handelt, ist nicht auszuschließen, dass sich ein Einfluss der Arzneistoffbehandlung erst zu einem späteren Zeitpunkt bemerkbar gemacht haben würde. Bezüglich des Zeitgangs einer PG-Expression im Myokard nach Infarkt ist wenig bekannt. Dagegen wurde für fibrilläres Collagen gezeigt, dass seine Akkumulation progressiv über einen Zeitraum von 8 Wochen post MI verläuft (120) und sich der Einsatz von ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorantagonisten hemmend auf diese Akkumulation auswirkt. Es wäre sinnvoll, Effekte einer Langzeitbehandlung mit diesen Arzneistoffe auf die PG-Expression zu untersuchen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den nicht nachweisbaren Einfluß der Arzneistoffbehandlung auf die Regulation der mRNA von Decorin, Biglykan und Collagen-Typ I-alpha wäre, dass die nach MI nachgewiesene erhöhte Expression von TGF-ß1 von Ang II unabhängig erfolgt und damit Hemmstoffe des RAS wirkungslos bleiben müssen.

Diese Stimulation der TGF-ß1-Bildung könnte beispielsweise von Endothelin-1 (ET-1), einem weiteren Peptid, das neben Ang II zur kardialen Fibrose beiträgt, vermittelt werden. In einer Myokardinfarkt-Studie an Ratten zeigten Tzanidis et al. (121), dass die Behandlung der Tiere entweder mit einem ET-1-Rezeptorantagonisten oder mit einem AT1-Rezeptorantagonisten keinen Effekt auf die Collagen-Ablagerung im Myokard hatte, beide zusammen jedoch die Collagen-Expression reduzierten. Bei der Untersuchung der TGF-ß1-Expression stellten Tzanidis et al. bei der Kombinationsbehandlung aus ET-1- und AT1-Rezeptorantagonisten eine Reduktion sowohl des TGF-ß1-Peptids als auch der TGF-ß1-Gen-Expression fest. Dieser Befund stellt einen Hinweis auf die Beteiligung von ET-1 an den Vorgängen nach MI dar.

4.4 Ausblick

Der durch zahlreiche Studien belegte positive Effekt der ACE-Hemmer bzw. der AT1-Rezeptorantagonisten auf die Umbauprozesse des Myokards nach MI spiegelt sich nicht in einer Veränderung der Synthese der Proteoglykane Decorin und Biglykan wieder. Allerdings ist die Funktion von Decorin und Biglykan in dieser speziellen pathologischen Situation noch völlig unbekannt. Sowohl herzprotektive als auch schädigende Wirkungen sind beim derzeitigen Wissensstand denkbar.

In zukünftigen Untersuchungen soll daher die Funktion der Proteoglykane nach MI mit Hilfe von *knockout*-Tiermodellen untersucht werden. Sowohl für Decorin als auch für Biglykan wurden bereits Deletionsmutanten in Mäusen (*knockouts*) hergestellt (14), (122). Da Tiere beider Modelle veränderte Collagen-Fibrillen aufweisen, wäre es zunächst interessant zu erfahren, ob die veränderten Collagen-Fibrillen eine ausreichende Stabilität der Infarktnarbe nach MI gewährleisten könnten.

Die Studien über NO an den kardialen Fibroblasten zeigen, dass NO die GAG-Ketten des Biglykanmoleküls verlängern kann. Durch die GAG-Ketten sind funktionelle Eigenschaften des PG determiniert wie z.B. das Wasserbindevermögen und die Affinitäten zu anderen Molekülen. Eine Untersuchung im Zellkulturmodell, bei dem die Zellen mit dem unter NO-Bedingungen veränderten Biglykan behandelt würden, könnte Aufschluß darüber geben, welche funktionellen Konsequenzen diese spezifische „hochmolekulare“ Form des Biglykan auf den Phänotyp kardialer Fibroblasten hat.

Als Weiteres wäre interessant, den Expressionsverlauf der PG nach MI in iNOS-*knockout*-Mäusen zu untersuchen, um festzustellen, welchen Einfluss NO auf die Expression der PG *in vivo* hat.

5 Zusammenfassung

Nach Myokardinfarkt (MI) beginnen umfangreiche Umbauprozesse. Neu gebildetes fibrotisches Gewebe sowohl im infarzierten, als auch in den nicht-infarzierten Gebieten beeinträchtigt die Funktion des Muskels. Die myokardiale Fibrosierung wird maßgeblich von Fibroblasten verursacht und ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung der EZM, die von Fibroblasten sezerniert wird, akkumuliert und ein dreidimensionales Netzwerk bildet, das zu der Funktionsbeeinträchtigung des Muskels führt.

Medizinisch wären Ansätze von Bedeutung, die diese funktionsbeeinträchtigenden Fibrosierungsreaktionen hemmen, setzen aber Kenntnisse der Prozesse und Faktoren voraus, die diese pathologischen Vorgänge hemmen.

Anliegen der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener Reize für Wachstum und Proliferation auf die Synthese von EZM-Bausteinen von kardialen Fibroblasten und inwieweit sich Parallelen zur Situation im Herzen von Ratten nach Infarkt ergeben.

Kardiale Fibroblasten wurden aus den Herzen neonataler Ratten gewonnen und immunhistochemisch charakterisiert (Immunfluoreszenz-Mikroskopie). Die PG-Synthese wurde mit Hilfe des Einbaus radioaktiven Sulfats gemessen. Mit dem Verfahren des Northern-Blot wurden Veränderungen auf mRNA-Ebene, mit dem Verfahren der Gel-Filtrations-Chromatographie die Kettenlänge der den PG-angehefteten GAG ermittelt.

An den Herzen adulter Ratten nach Infarkt wurde im Infarktbereich selbst, im nicht-infarzierten Septum und rechten Ventrikel die Expression der mRNA für Biglykan (BG) und Decorin (Dec) mit Hilfe der RT-PCR gemessen.

Kardiale Fibroblasten synthetisieren hauptsächlich das kleine, leucin-reiche PG BG. PDGF BB, TGF-ß1 sowie Thrombin erhöhten die PG-Sekretion deutlich. Ang II stimulierte, vermittelt durch den Ang II-Rezeptorsubtyp 1 (AT1-Rezeptor), sowohl die Sekretion von PG in das Zellkulturmedium als auch die Expression der BG-mRNA. Weiterhin stimulierte Ang II die TGF-ß1-Freisetzung aus den Fibroblasten. Als Mechanismus für die AT-1-vermittelte BG-Induktion konnte die autokrine Freisetzung von TGF-ß1 wahrscheinlich gemacht werden, da die Stimulation der BG-Expression

durch Ang II in Gegenwart neutralisierender Anti-TGF-ß-Antikörpern ausblieb. NO unterdrückte in den kardialen Fibroblasten sowohl die PDGF BB-stimulierte Sekretion der PG als auch spezifisch die mRNA-Expression von BG. Zudem erhöhte NO das Molekulargewicht der GAG-Ketten von BG in Kombination mit PDGF BB.

Die Untersuchungen zur PG-Synthese fördernden Wirkung des Ang II und ihrer Hemmbarkeit durch Inhibitoren des RAS an kardialen Fibroblasten wurden ergänzt durch Untersuchungen zur Expression der PG Dec und BG im Herzmuskelgewebe adulter Ratten nach Infarkt. Unter dieser Bedingung war die Expression der PG BG und Dec gesteigert, das Maximum der Expression wurde am 5.–7., bzw. 3.-5. Tag nach MI erreicht. Obgleich Ang II nachweisbar die BG-Synthese erhöhte, erwies sich die Behandlung der Tiere mit Hemmstoffen des RAS als wirkungslos.

Die Wirkungslosigkeit von Hemmstoffen des RAS stellt nicht unbedingt eine Widerspruch zu den *in vitro* Befunden dar, mag sich vielmehr aus der Anwesenheit anderer die PG-Synthese maßgeblich beeinflussender Faktoren unter den *in vivo* Bedingungen erklären.

6 Summary

After myocardial infarction (MI), extensive myocardial remodelling of both infarcted and noninfarcted myocardium occurs leading to cardiac fibrosis and hypertrophy. Myocardial fibrosis is mainly caused by cardiac fibroblasts which produce large amounts of extracellular matrix (ECM) components. The ECM becomes secreted into the interstitial space where it accumulates and forms a threedimensional network.

Medical approaches would be important to inhibit fibrosis but it would be essential to learn more about these pathological processes.

In this study different factors influencing cellular growth and proliferation were examined with regard to the synthesis of ECM components in cardiac fibroblasts as well as in infarcted hearts from adult rats.

Rat neonatal cardiac fibroblasts were characterized using immunohistochemical staining. Proteoglycan (PG) synthesis was measured by incorporation of radiosulfat. Changes in mRNA expression were determined using Northern Blot analysis. Size exclusion chromatography could reveal changes in the length of GAG-chains.

The mRNA expression for biglycan (BG) and decorin (Dec) in the adult rat hearts was measured in the infarct scar as well as in non-infarcted areas like right ventricle and septum.

Rat neonatal fibroblasts mainly expressed the small leucin-rich PG BG. PDGF BB, TGF-ß1 and thrombin markedly induced PG secretion. Ang II enhanced the PG secretion as well as the mRNA levels of BG through the Ang II-receptorsubtype 1 (AT1-receptor). Furthermore, extracellular TGF-ß1-concentration following Ang II treatment was increased. Therefore the underlying mechanism of BG induction by Ang II is probably the autocrine release of TGF-ß1 in response to stimulation of the AT1-receptor. NO was found to be an inhibitor of PDGF BB stimulated PG-secretion and BG-mRNA expression. Furthermore the molecular weight of GAG-chains of BG was increased after treatment with NO.

In addition to the increased PG-secretion induced by Ang II experiments were performed to examine whether the inhibition of the RAS might influence the expression of Dec and BG in infarcted adult rat hearts. Dec-mRNA levels reached a maximum 5-7 days post MI whereas BG peaked 3-5 days post MI. Although Ang II

increased BG synthesis *in vitro* no effect could be observed using RAS-inhibitors *in vivo*.

Ineffectiveness of RAS inhibitors displays no contradiction to the findings *in vitro* because there might be a lot of different factors influencing PG-synthesis under *in vivo* condition.

7 Literaturverzeichnis

1. Braunwald, E. (1997) Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities;N Engl J Med 337(19), 1360-9.

2. Murray, C. J. L., and Lopez, A. D. (1996) The global burden of disease;Global burden of disease and injury series. Boston: Harvard University School of Public 1

3. Middlekauff, H. R. (1997) Mechanisms and implications of autonomic nervous system dysfunction in heart failure;Curr Opin Cardiol 12(3), 265-75.

4. Shan, K., Kurrelmeyer, K., Seta, Y., Wang, F., Dibbs, Z., Deswal, A., Lee-Jackson, D., and Mann, D. L. (1997) The role of cytokines in disease progression in heart failure;Curr Opin Cardiol 12(3), 218-23.

5. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors;Pharmacol Rev 52(3), 415-72.

6. Wight, T. N. (1995) The extracellular matrix and atherosclerosis;Curr Opin Lipidol 6(5), 326-34.

7. Yamamoto, K., Kusachi, S., Ninomiya, Y., Murakami, M., Doi, M., Takeda, K., Shinji, T., Higashi, T., Koide, N., and Tsuji, T. (1998) Increase in the expression of biglycan mRNA expression Co-localized closely with that of type I collagen mRNA in the infarct zone after experimentally-induced myocardial infarction in rats;J Mol Cell Cardiol 30(9), 1749-56.

8. Boluyt, M. O., O'Neill, L., Meredith, A. L., Bing, O. H., Brooks, W. W., Conrad, C. H., Crow, M. T., and Lakatta, E. G. (1994) Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components;Circ Res 75(1), 23-32.

9. Weber, K. T., Janicki, J. S., Shroff, S. G., Pick, R., Chen, R. M., and Bashey, R. I. (1988) Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium;Circ Res 62(4), 757-65.

10. Fischer, J. W., Kinsella, M. G., Clowes, M. M., Lara, S., Clowes, A. W., and Wight, T. N. (2000) Local expression of bovine decorin by cell-mediated gene transfer reduces neointimal formation after balloon injury in rats;Circ Res 86(6), 676-83.

11. Fischer, J. W., Kinsella, M. G., Levkau, B., Clowes, A. W., and Wight, T. N. (2001) Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors;Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(5), 777-84.

12. Iozzo, R. V. (1999) The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins;J Biol Chem 274(27), 18843-6.

13. Chang, M. Y., Potter-Perigo, S., Tsoi, C., Chait, A., and Wight, T. N. (2000) Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell proteoglycans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties;J Biol Chem 275(7), 4766-73.

14. Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E., and Iozzo, R. V. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility;J Cell Biol 136(3), 729-43.

15. Yamaguchi, Y., Mann, D. M., and Ruoslahti, E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin;Nature 346(6281), 281-4.

16. Hein, M., Fischer, J., Kim, D. K., Hein, L., and Pratt, R. E. (1996) Vascular smooth muscle cell phenotype influences glycosaminoglycan composition and growth effects of extracellular matrix;J Vasc Res 33(6), 433-41.

17. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., and Juliano, R. L. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins;Pharmacol Rev 50(2), 197-263.

18. Brilla, C. G., Maisch, B., Zhou, G., and Weber, K. T. (1995) Hormonal regulation of cardiac fibroblast function;Eur Heart J 16 Suppl C, 45-50.

19. Weber, K. T. (2001) Cardioreparation in hypertensive heart disease;Hypertension 38(3 Pt 2), 588-91.

20. Hall, A. S., Murray, G. D., and Ball, S. G. (1997) Follow-up study of patients randomly allocated ramipril or placebo for heart failure after acute myocardial infarction: AIRE Extension (AIREX) Study. Acute Infarction Ramipril Efficacy;Lancet 349(9064), 1493-7.

21. Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R., and Dagenais, G. (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators;N Engl J Med 342(3), 145-53.

22. Wollert, K. C., Studer, R., Doerfer, K., Schieffer, E., Holubarsch, C., Just, H., and Drexler, H. (1997) Differential effects of kinins on cardiomyocyte hypertrophy and interstitial collagen matrix in the surviving myocardium after myocardial infarction in the rat;Circulation 95(7), 1910-7.

23. Zhu, Y. C., Zhu, Y. Z., Gohlke, P., Stauss, H. M., and Unger, T. (1997) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy;Am J Cardiol 80(3A), 110A-117A.

24. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., and de Crombrugghe, B. (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta;J Cell Biol 105(3), 1039-45.

25. Diez, C., Nestler, M., Friedrich, U., Vieth, M., Stolte, M., Hu, K., Hoppe, J., and Simm, A. (2001) Down-regulation of Akt/PKB in senescent cardiac fibroblasts impairs PDGF-induced cell proliferation;Cardiovasc Res 49(4), 731-40.

26. Feldmann, M. (2002) Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis;Nat Rev Immunol 2(5), 364-71.

27. Deten, A., Volz, H. C., Briest, W., and Zimmer, H. G. (2002) Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats;Cardiovasc Res 55(2), 329-40.

28. Trejo, J., Connolly, A. J., and Coughlin, S. R. (1996) The cloned thrombin receptor is necessary and sufficient for activation of mitogen-activated protein kinase and mitogenesis in mouse lung fibroblasts. Loss of responses in fibroblasts from receptor knockout mice;J Biol Chem 271(35), 21536-41.

29. Stauss, H. M., Zhu, Y. C., Redlich, T., Adamiak, D., Mott, A., Kregel, K. C., and Unger, T. (1994) Angiotensin-converting enzyme inhibition in infarct-induced heart failure in rats: bradykinin versus angiotensin II;J Cardiovasc Risk 1(3), 255-62.

30. Schmidt, R., and Wirtala, J. (1996) Modification of Movat Pentachrome Stain with Improved Reliability of Elastin Staining;The J Histotechnol 19(4), 325-27

31. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction;Anal Biochem 162(1), 156-9.

32. Sen, A., Miller, J. C., Reynolds, R., Willerson, J. T., Buja, L. M., and Chien, K. R. (1988) Inhibition of the release of arachidonic acid prevents the development of sarcolemmal membrane defects in cultured rat myocardial cells during adenosine triphosphate depletion;J Clin Invest 82(4), 1333-8.

33. Kruse, M. L., Hildebrand, P. B., Timke, C., Folsch, U. R., Schafer, H., and Schmidt, W. E. (2001) Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells;Pancreas 23(1), 49-54.

34. Abdelaziz, N., Colombo, F., Mercier, I., and Calderone, A. (2001) Nitric oxide attenuates the expression of transforming growth factor-beta(3) mRNA in rat cardiac fibroblasts via destabilization;Hypertension 38(2), 261-6.

35. Fischer, J. W., Stoll, M., Hahn, A. W., and Unger, T. (2001) Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells;Cardiovasc Res 51(4), 784-91.

36. Shimizu-Hirota, R., Sasamura, H., Mifune, M., Nakaya, H., Kuroda, M., Hayashi, M., and Saruta, T. (2001) Regulation of vascular proteoglycan synthesis by angiotensin II type 1 and type 2 receptors;J Am Soc Nephrol 12(12), 2609-15.

37. Ford, C. M., Li, S., and Pickering, J. G. (1999) Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation;Arterioscler Thromb Vasc Biol 19(8), 1843-51.

38. Wasteson, A., Uthne, K., and Westermark, B. (1973) A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells;Biochem J 136(4), 1069-74.

39. Kinsella, M. G., Fischer, J. W., Mason, D. P., and Wight, T. N. (2000) Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells. Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro;J Biol Chem 275(18), 13924-32.

40. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4;Nature 227(259), 680-5.

41. Olin, K. L., Potter-Perigo, S., Barrett, P. H., Wight, T. N., and Chait, A. (1999) Lipoprotein lipase enhances the binding of native and oxidized low density lipoproteins to versican and biglycan synthesized by cultured arterial smooth muscle cells;J Biol Chem 274(49), 34629-36.

42. Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F. (1989) in Molecular cloning, a laboratory manual (Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F., eds) Vol. 1, 2 Ed., pp. 7.1-7.87, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

43. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase;Science 239(4839), 487-91.

44. Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M., and Inada, M. (1993) Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy;Circ Res 73(3), 439-47.

45. Stoll, M., Steckelings, U. M., Paul, M., Bottari, S. P., Metzger, R., and Unger, T. (1995) The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells;J Clin Invest 95(2), 651-7.

46. Booz, G. W., and Baker, K. M. (1995) Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts;Cardiovasc Res 30(4), 537-43.

47. Miyazawa, K., Kikuchi, S., Fukuyama, J., Hamano, S., and Ujiie, A. (1995) Inhibition of PDGF- and TGF-beta 1-induced collagen synthesis, migration

and proliferation by tranilast in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats;Atherosclerosis 118(2), 213-21.

48. Chen, Y. M., Wu, K. D., Tsai, T. J., and Hsieh, B. S. (1999) Pentoxifylline inhibits PDGF-induced proliferation of and TGF-beta-stimulated collagen synthesis by vascular smooth muscle cells;J Mol Cell Cardiol 31(4), 773-83.

49. Chu, A. J., and Prasad, J. K. (1999) Up-regulation by human recombinant transforming growth factor beta-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling;J Am Coll Surg 188(3), 271-80.

50. D'Souza, F. M., Sparks, R. L., Chen, H., Kadowitz, P. J., and Jeter, J. R., Jr. (2002) Mechanism of eNOS gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation;Am J Physiol Cell Physiol 18, 18

51. Eghbali, M., Czaja, M. J., Zeydel, M., Weiner, F. R., Zern, M. A., Seifter, S., and Blumenfeld, O. O. (1988) Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats;J Mol Cell Cardiol 20(3), 267-76.

52. Wallace, J. M., Freeburn, J. C., Gilmore, W. S., Sinnamon, D. G., Craig, B. M., McNally, R. J., and Strain, J. J. (1998) The assessment of platelet derived growth factor concentration in post myocardial infarction and stable angina patients;Ann Clin Biochem 35(Pt 2), 236-41.

53. Shaddy, R. E., Hammond, E. H., and Yowell, R. L. (1996) Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor in cardiac biopsy and autopsy specimens of heart transplant patients;Am J Cardiol 77(14), 1210-5.

54. Casscells, W., Bazoberry, F., Speir, E., Thompson, N., Flanders, K., Kondaiah, P., Ferrans, V. J., Epstein, S. E., and Sporn, M. (1990) Transforming growth factor-beta 1 in normal heart and in myocardial infarction;Ann N Y Acad Sci 593, 148-60.

55. Lijnen, P. J., Petrov, V. V., and Fagard, R. H. (2000) Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1);Mol Genet Metab 71(1-2), 418-35.

56. Akhurst, R. J. (2002) TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor?;J Clin Invest 109(12), 1533-6.

57. Akiyama-Uchida, Y., Ashizawa, N., Ohtsuru, A., Seto, S., Tsukazaki, T., Kikuchi, H., Yamashita, S., and Yano, K. (2002) Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts;Hypertension 40(2), 148-54.

58. Simm, A., Nestler, M., and Hoppe, V. (1997) PDGF-AA, a potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats;J Mol Cell Cardiol 29(1), 357-68.

59. Butt, R. P., Laurent, G. J., and Bishop, J. E. (1995) Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors;Eur J Cell Biol 68(3), 330-5.

60. Ungefroren, H., and Krull, N. B. (1996) Transcriptional regulation of the human biglycan gene;J Biol Chem 271(26), 15787-95.

61. Yue, P., Massie, B. M., Simpson, P. C., and Long, C. S. (1998) Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure;Am J Physiol 275(1 Pt 2), H250-8.

62. Patten, M., Wang, W., Aminololama-Shakeri, S., Burson, M., and Long, C. S. (2000) IL-1 beta increases abundance and activity of the negative transcriptional regulator yin yang-1 (YY1) in neonatal rat cardiac myocytes;J Mol Cell Cardiol 32(7), 1341-52.

63. Brown, J. M., White, C. W., Terada, L. S., Grosso, M. A., Shanley, P. F., Mulvin, D. W., Banerjee, A., Whitman, G. J., Harken, A. H., and Repine, J. E. (1990) Interleukin 1 pretreatment decreases ischemia/reperfusion injury;Proc Natl Acad Sci U S A 87(13), 5026-30.

64. Li, Y. Y., McTiernan, C. F., and Feldman, A. M. (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling;Cardiovasc Res 46(2), 214-24.

65. Ramasamy, S., Lipke, D. W., McClain, C. J., and Hennig, B. (1995) Tumor necrosis factor reduces proteoglycan synthesis in cultured endothelial cells;J Cell Physiol 162(1), 119-26.

66. Reganon, E., Vila, V., Martinez-Sales, V., Vaya, A., and Aznar, J. (2002) Inflammation, fibrinogen and thrombin generation in patients with previous myocardial infarction;Haematologica 87(7), 740-5; discussion 745.

67. Sabri, A., Short, J., Guo, J., and Steinberg, S. F. (2002) Protease-activated receptor-1-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblast is via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes;Circ Res 91(6), 532-9.

68. Gaca, M. D., Zhou, X., and Benyon, R. C. (2002) Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors;J Hepatol 36(3), 362-9.

69. Chambers, R. C., Dabbagh, K., McAnulty, R. J., Gray, A. J., Blanc-Brude, O. P., and Laurent, G. J. (1998) Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1;Biochem J 333(Pt 1), 121-7.

70. Howell, D. C., Goldsack, N. R., Marshall, R. P., McAnulty, R. J., Starke, R., Purdy, G., Laurent, G. J., and Chambers, R. C. (2001) Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis;Am J Pathol 159(4), 1383-95.

71. Deora, A. A., Hajjar, D. P., and Lander, H. M. (2000) Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras;Biochemistry 39(32), 9901-8.

72. Klann, E., Roberson, E. D., Knapp, L. T., and Sweatt, J. D. (1998) A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation;J Biol Chem 273(8), 4516-22.

73. Studer, R. K., DeRubertis, F. R., and Craven, P. A. (1996) Nitric oxide suppresses increases in mesangial cell protein kinase C, transforming growth factor beta, and fibronectin synthesis induced by thromboxane;J Am Soc Nephrol 7(7), 999-1005.

74. Duhe, R. J., Evans, G. A., Erwin, R. A., Kirken, R. A., Cox, G. W., and Farrar, W. L. (1998) Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity;Proc Natl Acad Sci U S A 95(1), 126-31.

75. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wei, L. H., Bauer, P. M., Wu, G., and del Soldato, P. (2001) Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation;Proc Natl Acad Sci U S A 98(7), 4202-8.

76. Yamamoto, T., Kakar, N. R., Vina, E. R., Johnson, P. E., and Bing, R. J. (2000) The effect of aspirin and two nitric oxide donors on the infarcted heart in situ;Life Sci 67(7), 839-46.

77. Salvemini, D., Currie, M. G., and Mollace, V. (1996) Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators;J Clin Invest 97(11), 2562-8.

78. Moncada, S. (1997) Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology;Ann N Y Acad Sci 811, 60-7; discussion 67-9.

79. Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Komamura, K., Minamino, T., Inoue, M., Tada, M., Hori, M., and Kamada, T. (1996) Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction;Circulation 93(2), 356-64.

80. Sumeray, M. S., Rees, D. D., and Yellon, D. M. (2000) Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium;J Mol Cell Cardiol 32(1), 35-42.

81. Kanno, S., Lee, P. C., Zhang, Y., Ho, C., Griffith, B. P., Shears, L. L., 2nd, and Billiar, T. R. (2000) Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase;Circulation 101(23), 2742-8.

82. Akiyama, K., Kimura, A., Suzuki, H., Takeyama, Y., Gluckman, T. L., Terhakopian, A., Katagiri, T., Suh, K. Y., Roseto, J., and Bing, R. J. (1998) Production of oxidative products of nitric oxide in infarcted human heart;J Am Coll Cardiol 32(2), 373-9.

83. Shihab, F. S., Yi, H., Bennett, W. M., and Andoh, T. F. (2000) Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity;Kidney Int 58(3), 1174-85.

84. Studer, R. K., Levicoff, E., Georgescu, H., Miller, L., Jaffurs, D., and Evans, C. H. (2000) Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation;Am J Physiol Cell Physiol 279(4), C961-9.

85. Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., Border, W. A., and Ruoslahti, E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta;Biochem J 302(Pt 2), 527-34.

86. Volders, P. G., Willems, I. E., Cleutjens, J. P., Arends, J. W., Havenith, M. G., and Daemen, M. J. (1993) Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction;J Mol Cell Cardiol 25(11), 1317-23.

87. Solomon, S. D., and Pfeffer, M. A. (2002) Renin-angiotensin system and cardiac rupture after myocardial infarction;Circulation 106(17), 2167-9.

88. Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M., and Iwasaka, T. (1998) Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression;Circ Res 83(10), 1035-46.

89. Unger, T. (1999) The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme;J Hypertens 17(12 Pt 2), 1775-86.

90. Schorb, W., Booz, G. W., Dostal, D. E., Conrad, K. M., Chang, K. C., and Baker, K. M. (1993) Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts;Circ Res 72(6), 1245-54.

91. Ju, H., and Dixon, I. M. (1996) Effect of angiotensin II on myocardial collagen gene expression;Mol Cell Biochem 163-164, 231-7.

92. Kim, S., and Iwao, H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases;Pharmacol Rev 52(1), 11-34.

93. Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M., and Inada, M. (1995) Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction;J Clin Invest 95(1), 46-54.

94. van Kesteren, C. A., van Heugten, H. A., Lamers, J. M., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A., and Danser, A. H. (1997) Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts;J Mol Cell Cardiol 29(8), 2147-57.

95. Hunt, R. A., Ciuffo, G. M., Saavedra, J. M., and Tucker, D. C. (1995) Quantification and localisation of angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the developing rat heart;Cardiovasc Res 29(6), 834-40.

96. Kato, H., Suzuki, H., Tajima, S., Ogata, Y., Tominaga, T., Sato, A., and Saruta, T. (1991) Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells;J Hypertens 9(1), 17-22.

97. Fakhouri, F., Placier, S., Ardaillou, R., Dussaule, J. C., and Chatziantoniou, C. (2001) Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF-beta;J Am Soc Nephrol 12(12), 2701-10.

98. Bailey, W. L., LaFleur, D. W., Forrester, J. S., Fagin, J. A., and Sharifi, B. G. (1994) Stimulation of rat vascular smooth muscle cell glycosaminoglycan production by angiotensin II;Atherosclerosis 111(1), 55-64.

99. Papakonstantinou, E., Roth, M., Kokkas, B., Papadopoulos, C., and Karakiulakis, G. (2001) Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells;J Cardiovasc Pharmacol 38(5), 715-28.

100. Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R. E., Gibbons, G. H., and Dzau, V. J. (1993) Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II;J Clin Invest 91(5), 2268-74.

101. Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E. D., Kawakatsu, H., Owada, K. M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells;J Biol Chem 273(15), 8890-6.

102. Schieffer, B., Wirger, A., Meybrunn, M., Seitz, S., Holtz, J., Riede, U. N., and Drexler, H. (1994) Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat;Circulation 89(5), 2273-82.

103. Jalil, J. E., Janicki, J. S., Pick, R., Abrahams, C., and Weber, K. T. (1989) Fibrosis-induced reduction of endomyocardium in the rat after isoproterenol treatment;Circ Res 65(2), 258-64.

104. Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1993) Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions;Annu Rev Cell Biol 9, 511-40.

105. Dostal, D. E., Booz, G. W., and Baker, K. M. (1996) Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function;Mol Cell Biochem 157(1-2), 15-21.

106. Weber, K. T. (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation;Circulation 96(11), 4065-82.

107. Hao, J., Ju, H., Zhao, S., Junaid, A., Scammell-La Fleur, T., and Dixon, I. M. (1999) Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing;J Mol Cell Cardiol 31(3), 667-78.

108. Doi, M., Kusachi, S., Murakami, T., Ninomiya, Y., Murakami, M., Nakahama, M., Takeda, K., Komatsubara, I., Naito, I., and Tsuji, T. (2000) Time-dependent changes of decorin in the infarct zone after experimentally induced myocardial infarction in rats: comparison with biglycan;Pathol Res Pract 196(1), 23-33.

109. Schonherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., and Kresse, H. (1995) Interaction of biglycan with type I collagen;J Biol Chem 270(6), 2776-83.

110. Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G., and Daemen, M. J. (1994) The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars;Am J Pathol 145(4), 868-75.

111. Zimmerman, S. D., Thomas, D. P., Velleman, S. G., Li, X., Hansen, T. R., and McCormick, R. J. (2001) Time course of collagen and decorin changes in rat

cardiac and skeletal muscle post-MI;Am J Physiol Heart Circ Physiol 281(4), H1816-22.

112. Sun, Y., and Weber, K. T. (1996) Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart;Cardiovasc Res 31(4), 518-25.

113. Sun, Y., Zhang, J. Q., Zhang, J., and Ramires, F. J. (1998) Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart;J Mol Cell Cardiol 30(8), 1559-69.

114. Campbell, S. E., and Katwa, L. C. (1997) Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts;J Mol Cell Cardiol 29(7), 1947-58.

115. Pimentel, J. L., Jr., Sundell, C. L., Wang, S., Kopp, J. B., Montero, A., and Martinez-Maldonado, M. (1995) Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy;Kidney Int 48(4), 1233-46.

116. Smits, J. F., van Krimpen, C., Schoemaker, R. G., Cleutjens, J. P., and Daemen, M. J. (1992) Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content;J Cardiovasc Pharmacol 20(5), 772-8.

117. Michel, J. B., Lattion, A. L., Salzmann, J. L., Cerol, M. L., Philippe, M., Camilleri, J. P., and Corvol, P. (1988) Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction;Circ Res 62(4), 641-50.

118. De Carvalho Frimm, C., Sun, Y., and Weber, K. T. (1997) Angiotensin II receptor blockade and myocardial fibrosis of the infarcted rat heart;J Lab Clin Med 129(4), 439-46.

119. Jugdutt, B. I., Khan, M. I., Jugdutt, S. J., and Blinston, G. E. (1995) Effect of enalapril on ventricular remodeling and function during healing after anterior myocardial infarction in the dog;Circulation 91(3), 802-12.

120. Sun, Y., Cleutjens, J. P., Diaz-Arias, A. A., and Weber, K. T. (1994) Cardiac angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat;Cardiovasc Res 28(9), 1423-32.

121. Tzanidis, A., Lim, S., Hannan, R. D., See, F., Ugoni, A. M., and Krum, H. (2001) Combined angiotensin and endothelin receptor blockade attenuates adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction in the rat: possible role of transforming growth factor beta(1);J Mol Cell Cardiol 33(5), 969-81.

122. Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G., Bianco, P., and Young, M. F. (2002) Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues;J Bone Miner Res 17(7), 1180-9.

8 Anhang

8.1 Bezugsnachweis der verwendeten Materialien

8.1.1 Zellkultur

Material	Hersteller / Lieferant
DMEM, Katalognummer: 41966-029	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS), Ch.Nr. 148659-02	Boehringer, Mannheim
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Medium 199, Katalognummer: M7528	Sigma, Deisenhof
Penicillin (10 000 IE)/ Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS, Katalognummer: 14190-094	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin	SERO-Med, Wien, Österreich
Wistar-Kyoto Ratten	Charles-River, Sulzfeld
Neugeborene Wistar-Kyoto Ratten	Institutseigene Zucht

8.1.2 Antikörper

Material	Hersteller / Lieferant
Anti-murine biglycan-Antikörper (LF-106)	Larry W. Fisher, National Institutes of Health/NIDCR, Bethesda, USA
Anti-human collagen αI-Antikörper (LF-67)	Larry W. Fisher, National Institutes of Health/NIDCR, Bethesda, USA
Anti-murine decorin-Antikörper (LF-113)	Larry W. Fisher, National Institutes of Health/NIDCR, Bethesda, USA
Anti-maus ED-1 monoklonale Antikörper	Bioproducts for Science, Indianapolis, USA
Anti-FGF basic polyklonale Antikörper	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-human PDGF polyklonale Antikörper	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-TGF-ß1, - ß2, - ß3 monoklonale Antikörper	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Goat-anti rabbit IgG, Peroxidase-gekoppelt	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
Goat-anti rabbit IgG, Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Goat-anti mouse IgG, Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Normal goat IgG	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Normal mouse IgG_1	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-maus α-SMAcy3 monoklonale Antikörper Anregungswellenlänge: 546 nM	Sigma, Deisenhof
Anti-maus sarkomeres Aktin monoklonale Antikörper	Sigma, Deisenhof
Donkey-anti mouse IgG, Anregungswellenlänge: 488 nM	Sigma, Deisenhof

8.1.3 Feinchemikalien

Material	Hersteller / Lieferant
Acrylamid/Bisarcylamid-Lösung (40%)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Amplify®	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Angiotensin II	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
Chondroitinase ABC	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Collagenase Type CL S II (Aktivität >250u/ml)	Biochrom AG, Berlin
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
[alpha-^{32}P]dCTP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
DEAE Trisacryl M	Sepracor, Villeneuve la Garenne, Frankreich
DETA-NONOate (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate	Alexis, Grünberg
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Material	Hersteller / Lieferant
Olmesartan	Sankyo Pharma AG, Fällanden, Schweiz
PAPA-NONOate (Z)-1-[N-(3-Ammoniopropyl)- N-(n-propyl)amino]diazen- 1-ium-1,2-diolate	Alexis, Grünberg
[alpha-^{32}P]dCTP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Quantikine® TGF-β-ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Qiagen® OneStep RT-PCR	Qiagen GmbH, Hilden
Ramipril	Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden
Rapid Hyb Buffer	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Rediprime DNA Labeling System	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
[^{32}S]Schwefelsäure	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
SFLLRNP	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP)	Alexis, Grünberg
Safran	Ostsee-Apotheke, Schönberg
Slow Fade® Light Antifade Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Temed	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
[^{3}H]Methyl-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien waren vom Reinheitsgrad „p.A.“ und wurden von den Firmen E. Merck, Darmstadt, und Sigma, Deisenhof, bezogen.

8.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller / Lieferant
BioMax Folie	Kodak GmbH, Stuttgart
Röntgenfilm, Biomax MR	Kodak GmbH, Stuttgart
Röntgenfilm, Biomax MS	Kodak GmbH, Stuttgart
Econo-Column	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filtropur S 0,45 µm	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Hybond-N+	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Immobilon^{TM} P	Millipore Corporation, Bedford, USA
24-Loch-Platten	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Poly-Prep Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Whatman Chromatographiepapier (3mm)	Biometra GmbH, Göttingen
Roti®-Histokit	Roth, Karlsruhe
Zellkulturschalen (56,2 cm^2)	Nunc, Karlsruhe

8.2 Lösungen

	Natriumchlorid	90 g
	Tris-Base	12,1 g

TBS (10x):

Die Salze wurden in dest. Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung nach Ergänzen des Volumens auf 1 l autoklaviert.

TBS-T:	TBS (10x)	50 ml
	Tween 20	0,5 ml
	dest. Wasser	449,5 ml

Nach dem Vereinigen der Flüssigkeiten war die Lösung gebrauchsfertig.

8.2.1 Färbungen

8.2.1.1 Gewebe-Färbungen

Alkalischer Alkohol:	95 % Ethanol konz. Ammoniak	180 ml 20 ml
Bouins Lösung:	Pikrinsäure 37 % Formaldehyd konz. Essigsäure	150 ml 50 ml 10 ml
Eisen-III-chlorid-Lösung:	Eisen-III-chlorid Hexahydrat dest. Wasser konz. Salzsäure	12,4 g 500 ml 5 ml
Jod-Lösung:	Jod Kaliumjodid dest. Wasser	5 g 10 g 250 ml
Weigerts Lösung:	2 % Hematoxylin in 95 %igem Ethanol Eisenchlorid-Lösung Jod-Lösung	30 ml 20 ml 10 ml
Crocein Scarlet:	Crocein Scarlet M00 3B dest. Wasser konz. Essigsäure	2 g 200 ml 1 ml
Fuchsinsäure-Lösung:	Fuchsinsäure dest. Wasser konz. Essigsäure	0,2 g 200 ml 1 ml
Crocein Scarlet / Fuchsinsäure-Lösung:	Crocein Scarlet Fuchsinsäure-Lösung	160 ml 40 ml
Alkoholische Safran-Lösung:	Safran 100 %iger Ethanol	6 g 100 ml
Chondroitinase-ABC-Lösung (ICC)	Chondroitinase ABC (10 u/ml) Tris-Puffer für ICC dest. Wasser BSA	20 µl 196 µl 784 µl 1 mg
Tris-Puffer für ICC:	Tris-Base Natriumacetat Natriumchlorid	3 g 2,4 g 1,46 g

Die Salze wurden in dest. Wasser gelöst, der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Vor der Verwendung ist der Puffer 1 : 5 mit dest. Wasser verdünnt worden.

8.2.1.2 Zell-Färbungen

IF-Blockierungslösung:	0,1 % Bovines Serumalbumin (BSA) 0,2 % Glycin

Die Blockierungslösung-IF wurde mit TBS (1x) hergestellt.

8.2.2 Zellkultur

ADS-Puffer:	116,4 mM NaCl	6,8 g
	20 mM HEPES (1 M Stammlösung)	20 ml
	1 mM NaH_2PO_4 x H_2O	0,138 g
	5,5 mM Glucose	1 g
	5,4 mM KCl	0,403 g
	0,8 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O	0,197 g

Der Puffer wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml ergänzt und sterilfiltriert.

Collagenase/Pankreatin-Lösung:	100 U/ml Collagenase Type CL S II (Aktivität >250u/ml) 0,6 mg/ml Pankreatin	

Die Enzymlösung ist in dem entsprechenden Volumen ADS-Puffer angesetzt und für 10 Minuten vorsichtig gerührt worden. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 µm, Sarstedt) und auf 15 µM Calciumchlorid eingestellt.

DMEM komplett:	HEPES (1 M Stammlösung)	12,5 ml
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 ml

Das Medium wurde mit DMEM auf 500 ml ergänzt.

Medium M 199 komplett:	L-Glutamin	340 µl
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	1 ml

Das Medium wurde mit Medium M 199 auf 100 ml ergänzt.

Myozyten-Kulturmedium:	Medium M 199 komplett	85 ml
	Pferdeserum	50 ml
	FKS	25 ml

Das Medium wurde mit DMEM komplett-Medium auf 500 ml ergänzt.

Preplating-Medium:	FKS	25 ml
	Myozyten-Kulturmedium	25 ml

Kulturmedium:	FKS	100 ml
	DMEM komplett	400 ml

Das FKS wurde mit DMEM komplett-Medium auf 500 ml ergänzt.

Passage-EDTA:	136 mM NaCl	3,97 g
	2 mM KCl	149,1 mg

	6 mM Na_2HPO_4	851,9 mg
	1,4 mM KH_2PO_4	190,5 mg
	0,5 mM Na_2EDTA	168,1 mg

Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml ergänzt und sterilfiltriert.

TBS für Zellkultur:	137 mM NaCl	8 g
	2,7 mM KCl	0,2 g
	25 mM Trisbase	2 g

Die Salze wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, pH 7,4 eingestellt, auf 1000 ml ergänzt und sterilfiltriert.

Holleys-Fixierungs-Lösung	Formaldehyd (37 %)	100 ml
	Natriumchlorid	5 g
	Natriumsulfat	15 g
	dest. Wasser	900 ml

Die Substanzen wurden in dem dest. Wasser gelöst, anschließend Formaldehyd zugesetzt.

8.2.3 Proteoglykan-Analyse

8.2.3.1 Cetylpyridiniumchlorid-Präzipitation

1 %ige Cetylpyridiniumchlorid-Lösung:	0,05 M NaCl	52,6 g
	1 % Cetylpyridiniumchlorid	180 g

Die Chemikalien wurden in ca. 2 l Wasser gelöst und die Lösung erhitzt. Nach dem Lösen der Substanzen wurde das Volumen auf 18 l ergänzt.

8.2.3.2 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Urea-Puffer:	8 M Harnstoff	480,48 g
	2 mM EDTA	0,585 g
	50 mM Tris-Base	6,055 g
	0,5 % Triton X 100	5 g

Der Puffer wurde in 1 l destilliertem Wasser angesetzt und pH 7,5 eingestellt.

Urea-Puffer/0,25 M NaCl:	0,25 M NaCl	14,61 g

Der Puffer ist in 1 l Urea-Puffer hergestellt worden.

Urea-Puffer/3 M NaCl:	3 M NaCl	17,53 g

Der Puffer wurde in 100 ml Urea-Puffer hergestellt.

8.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

SDS-Probenpuffer (3x):	SDS	3 g
	Glycerol	30 ml
	Bromphenolblau	30 mg
	0,5 M Tris-Lösung, pH 6,7	30 ml
	dest. Wasser	35 ml

Der SDS-Probenpuffer ist in kleine Volumina aliquotiert und bei -20°C eingefroren worden. Vor Gebrauch wurden 50 µl/ml ß-Mercaptoethanol hinzugefügt.

SDS-Laufpuffer (10x):	Tris-Base	30 g
	Glycin	144 g

Das Volumen wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l ergänzt.

SDS-Laufpuffer (1x):	SDS-Laufpuffer (10x)	100 ml
	10 %ige wässrige SDS-Lösung	10 ml
	dest. Wasser	890 ml

Entfärbelösung:	Eisessig	75 ml
	Methanol	50 ml

Zur Herstellung dieser Lösung wurde etwas dest. Wasser in einem Gefäß vorgelegt, dann Eisessig und Methanol hinzugefügt und das Volumen auf 1 l ergänzt.

Chondoitinase-Puffer (6x):	Tris-Puffer (3 M)	1,82 ml
	BSA	30 mg
	Natriumacetat	124,3 mg

Die Bestandteile sind in dest. Wasser gelöst und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt worden, bevor das Volumen auf 50 ml ergänzt wurde.

Proteinase-Inhibitor-Lösung:	6-Aminohexansäure	131,18 mg
	Benzamidin	16 mg
	Phenylmethylsulfonylfluorid einer 100nM Stammlösung	10 µl

Die Bestandteile wurden in 1 ml destillierten Wassers gelöst.

Chondroitinase-ABC-Lösung:	Chondoitinase-ABC (10 U/ml)	30 µl
	Chondoitinase-Puffer	20 µl
	Proteinase-Inhibitor-Lösung	10 µl
	dest. Wasser	60 µl

Transfer-Puffer (Western Blot):	SDS-Laufpuffer (10x)	50 ml
	Methanol	100 ml
	dest. Wasser	350 ml

8.2.3.4 Gel-Filtrations-Chromatographie

Tris-Puffer für Sepharose-CL-6B:	0,2 M Tris-HCl	24,23 g
	0,2 M NaCl	11,69 g

Der Puffer wurde mit destilliertem Wasser hergestellt, der pH auf 7,0 eingestellt, bevor das Volumen auf 1 l ergänzt wurde.

8.2.4 RNA-Analyse

8.2.4.1 Extraktion der Gesamt-RNA

DEPC-Wasser:

1 l destilliertes Wasser wurde mit 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und über Nacht unter dem Abzug stehengelassen. Am folgenden Tag wurde die Lösung autoklaviert.

Natriumcitrat-Lösung:	0,75 M Natriumcitrat	5,51 g
	DEPC-Wasser	25 ml

Das Volumen wurde auf 25 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Guanidinthiocyanat-Lösung:	4 M Guanidinthiocyanat	100 g
	0,75 M Natriumcitrat-Lösung	7,04 ml
	1ige Sarcosyl-Lösung	10,6 ml
	DEPC-Wasser	117,2 ml

Die Bestandteile wurden zum Lösen vorsichtig bei 65°C im Wasserbad erwärmt. Vor Gebrauch wurden 50 µl/ml ß-Mercaptoethanol hinzugefügt.

8.2.4.2 Gel-Elektrophorese der Gesamt-RNA

10x MOPS:	200 mM MOPS	41,86 g
	80 mM Natriumacetat	6,8 g
	10 mM Natrium-EDTA	37,22 g

Der Puffer wurde mit DEPC-Wasser hergestellt und der pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 7,0 eingestellt. Nach Ergänzen des Volumens auf 1 l wurde der Puffer autoklaviert und anschließend dunkel und bei 4°C gelagert.

1 %iges Agarose-Gel:	1 % Agarose	1,0 g
	1x MOPS	83,3 ml

Die Agarose musste, um in Lösung gebracht zu werden, in dem Puffer zum Sieden erhitzt werden. Die Lösung wurde bis auf ca. 65°C abgekühlt, das verdunstete Volumen ergänzt und 16,7 ml 37 %-iges Formaldehyd zugesetzt. Nach Umschwenken wurde die Lösung in einen Gelträger gegossen, die Gelkämme eingesetzt und das Gel zum Aushärten unter dem Abzug belassen.

RNA-Probenpuffer,	Formamid	20 µl
exemplarisch für 20 µl RNA-	37 %iges Formaldehyd	8 µl
Lösung:	10x MOPS	6 µl

Orange G-Marker (10x):	20 % Ficoll 400	2,0 g
	10 mM ETDA	
	(0,05 M Stammlösung, pH 7,0)	2 ml
	0,1 % Orange G	0,01 g

Die Bestandteile wurden in DEPC-Wasser gelöst und die Lösung anschließend in Portionen bei –20°C gelagert.

Ethidiumbromid-Lösung:	0,5 µg/ml Ethidiumbromid	
	(10 mg/ml-Stammlösung)	10 µl
	DEPC-Wasser	200 ml

10x SSPE-Puffer:	Natriumchlorid	175,3 g
	Natriumdihydrogenphosphat x 2 H_2O	27,6 g
	ETDA (freie Säure)	7,4 g

Die Bestandteile wurden in DEPC-Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, das Volumen auf 1 l ergänzt und anschließend autoklaviert.

Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,4	Tris-HCl	15,76

Das Salz wurde in DEPC-Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 1 l ergänzt und autoklaviert.

8.2.4.3 RT-PCR

TAE-Puffer (50x):	Tris Base	242,8 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0	100 ml

Die Lösung wurde mit dest. Wasser hergestellt und autoklaviert.

2 %iges Agarosegel:	TAE (1x)	50 ml
	Agarose	1 g

Die Agarose wurde, um in Lösung gebracht zu werden, in dem Puffer zum Sieden erhitzt worden. Anschließend wurde 1 µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) zugesetzt, die Lösung umgeschwenkt und in einen Gelträger gegossen. Nach dem Aushärten erfolgte die Beladung des Gels.

Auftragspuffer RT-PCR:	Glycerol	50 % (V/V)
	SDS	0,2 % (M/V)
	Bromphenolblau	0,05 % (M/V)

Der Auftragspuffer RT-PCR wurde in TAE-Puffer (1x) hergestellt.

PCR-Puffer:	PCR-Puffer (10x)	5 µl
	Magnesiumchlorid (50 mM)	1,5 µl
	sense Primer (1 µg/µl)	1 µl
	Anti-*sense* Primer (1 µg/µl)	1 µl
	dNTP-Mix	6 µl
	Taq-Polymerase	0,5 µl

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Herrn Prof. Dr. A. Ziegler für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich für die anspornende Unterstützung in den letzten Monaten bedanken.

Herrn Prof. Dr. J. Fischer für die interessante Fragestellung, die wertvollen Anregungen und die zu jedem Zeitpunkt gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. T. Unger für die Unterstützung.

Herrn Dr. S. Sandmann, Herrn A. Reinecke und Herrn Dr. Q. Xia für die operativen Maßnahmen an den Tieren.

Frau E. Schröder für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und die stete Hilfsbereitschaft jeglicher Art.

Frau K. Stöter für die Bereitstellung der Bilder der RT-PCR für die AT1- und AT2-Rezeptoren in den kultivierten kardialen Fibroblasten sowie für ihre gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. M.-L. Kruse für die spontane Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Immunfluoreszenzaufnahmen.

allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie.

Ein besonderer Dank gilt allen, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit geholfen und mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Name:	Karen Tiede	
Geburstdatum:	22.09.1970	
Geburtsort:	Schönberg / Holst.	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulausbildung:	1977 - 1981	Grundschule in Schönberg
	1981 - 1990	Gymnasium in Heikendorf
	05.1990	Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung:	12.1990 – 07.1991	Freiwilliges Soziales Jahr
	08.1991 – 01.1994	Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin
	02.1994	Pharmazeutisch-Technische Assistentin
Hochschulausbildung:	1994-1998	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
	06.1998 – 10.1998 05.1999 – 06.1999	Praktisches Jahr Ostsee-Apotheke, Schönberg / Holst.
	11.1998 – 04.1999	Praktisches Jahr Klinikumsapotheke Universitätsklinikum Ulm
	07.1999	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Seit dem 01.01.2000 bin ich wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Sektion Pharmakologie für Naturwissenschaftler am Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Kiel, Beginn der Dissertation.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie wurde bisher an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits in Form von Kongressbeiträgen veröffentlicht (siehe unten).

Kiel, den

Kongressbeiträge

Tiede K, Xia Q, Stöter K, Schröder E, Reinecke A, Ziegler A, Unger T, Fischer JW

The Small Leucine-rich Proteoglycan Decorin is upregulated after Myocardial Infarction in Rats.

Naunyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology 363: R106 (412)

Stöter K, Stoll M, Tiede K, Ziegler A, Unger T, Fischer JW

Regulation of Thrombospondin-1 and Proteoglycans by Angiotensin II in Neonatal Cardiac Fibroblasts.

Naunyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology 363: R104 (404)

Tiede K, Ziegler A, Unger T, Fischer JW

Characterization of Proteoglycan Secretion in Neonatal Cardiac Fibroblasts.

Hypertension 2001; 38 (4) (PB. 04)

Tiede K, Stöter K, Stoll M, Unger T, Fischer JW

Angiotensin II Induces Biglycan, a Small Leucine-rich Proteoglycan, in

Cultured Cardiac Fibroblasts Derived from Neonatal Rats.

Naunyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology 365: R90 (348).

Tiede K, Xia Q, Reinecke A, Unger T, Fischer JW

Upregulation of the Small Leucine-rich Proetoglycan, Decorin, During Post-Infarct Remodeling

Journal of Hypertension 2002 June; 20 (Suppl.4): S306 (P1299)

Publikation

Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H

Smad4/DPD4-dependent Regulation of Biglycan Gene Expression by

Transforming Growth Factor-ß in Pancreatic Tumor Cells

J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36118-28