

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik C
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

**Die GM-CSF-transgene Maus: Einfluss der GM-CSF-
Überexpression auf die extrazelluläre Matrix des
Herzens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des *doctor medicinae dentium*
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Beate Merkel
aus Siegen

Münster 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gabriele Weißen-Plenz

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst Robenek

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik C
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt
Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gabriele Weißen-Plenz
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Horst Robenek

Zusammenfassung

Die GM-CSF-transgene Maus: Einfluss der GM-CSF-Überexpression auf die extrazelluläre Matrix des Herzens

Beate Merkel

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die GM-CSF-Überexpression eine Infiltration von Makrophagen, welche MMP-12 produzieren und sezernieren, in das Herz induziert. Von dem daraus resultierenden Matrixabbau sind das Elastinsystem und die Elastin-degradierbare kollagene Matrix des Herzens betroffen, im Speziellen Typ VIII Kollagen. Durch die vorliegende Studie wird der enge Zusammenhang zwischen GM-CSF, MMP-12 und Typ VIII Kollagen gezeigt. Das Zusammenspiel dieser drei Moleküle ist für eine Reihe von Prozessen beim kardialen inflammatorischen *Remodeling* von großer Bedeutung: Infiltration und Migration von Makrophagen, Angiogenese und Arteriogenese, Verlust der strukturellen Gewebeintegrität. Die Daten deuten zusammengefasst darauf hin, dass der bei der GM-CSF-überexprimierenden Maus beobachtete Phänotyp, dem Bild des *Remodelings* bei chronischer Herzentzündung möglicherweise mit vaskulärer Insuffizienz entsprechen könnte. Weitere Untersuchungen werden sich mit der Verifizierung dieser Hypothese beschäftigen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.09.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Der Aufbau des Herzens	3
1.1.1. Feinbau der Herzmuskelzelle	4
1.2. Funktion des Herzens	5
1.3. Kardiales Remodeling	6
1.3.1. Remodeling bei ischämischer Kardiomyopathie	8
1.3.1.1. Frühes Remodeling nach Myokardinfarkt	10
1.3.1.2. Spätes Remodeling	10
1.3.2. Remodeling bei physiologischer und patho- physiologischer Hypertrophie (hypertrophischer Kardiomyopathie) und dilatativer Kardiomyopathie	11
1.3.2.1. Die physiologische Hypertrophie: Das Sportlerherz	11
1.3.2.2. Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)	12
1.3.2.3. Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und terminale Herzinsuffizienz	13
1.4. Das kardiale Bindegewebe und die kardiale extrazelluläre Matrix	14
1.5. Struktur des kardialen Interstitiums	15
1.6. Die Hauptstrukturelemente der kardialen extrazellulären Matrix	16
1.7. Kollagene	17
1.7.1. Typ I Kollagen und Kollagen Typ III	20
1.7.2. Typ VIII Kollagen	21
1.7.3. Kollagenassoziierte Erkrankungen des Herzens und des Gefäßsystems	21
1.8. Elastin	22
1.9. Quervernetzung von Strukturmolekülen	23
1.9.1. Lysyloxidase	23

1.9.2. Bone morphogenic protein 1 (BMP-1)	24
1.10. Moleküle des Abbaus von Kollagen und Elastin	24
1.10.1. Matrix-degradierende Enzyme	25
1.10.1.1. MMP-2	26
1.10.1.2. MMP-3	26
1.10.1.3. MMP-9	26
1.10.1.4. MMP-12	27
1.10.1.5. MMPs und Herzerkrankungen	27
1.10.2. Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases , TIMP)	28
1.10.2.1. TIMP-1	28
1.10.2.2. TIMP-2	29
1.11. Regulation der kardialen EZM durch Zytokine	29
1.11.1. GM-CSF	30
1.11.2. GM-CSF und Herzerkrankungen	31
1.12. Transgene Mausmodelle	31
1.12.1. Genetische Mausmodelle	32
1.13. Ziel der Arbeit	33
2. Material und Methoden	34
2.1. Entnahme und Präparation der Gewebeproben	34
2.2. mRNA-Isolierung mit dem MACS-System (Miltenyi mRNA-KIT)	34
2.3. Charakterisierung von Nukleinsäuren	35
2.4. Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	35
2.4.1. Reverse Transkription	35
2.4.2. Polymerase Kettenreaktion	36
2.5. TAE- und TBE-Agarose-Gelelektrophorese	39
2.6. Herstellung von Gewebeschnitten	40
2.7. Immunhistologie	40
2.8. Histologische Färbungen	42

2.9. Zymographie	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Kollagene	44
3.1.1. Prokollagen α 1(I)	44
3.1.2. Prokollagen α 1(III)	45
3.1.3. Prokollagen α 1(VIII)	46
3.1.4. Prokollagen α 2(VIII)	47
3.2. Tropoelastin	48
3.3. Lysyloxidase	49
3.4. Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	50
3.4.1. MMP-2	50
3.4.2. MMP-3	51
3.4.3. MMP-9	52
3.4.4. MMP-12	53
3.5. Gewebespezifische Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen	54
3.5.1. TIMP-1	54
3.5.2. TIMP-2	55
3.6. Histologische Färbungen zur Darstellung der kollagenen Matrix und des Elastinsystems	56
3.7. Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation und Verteilung von MMP-12 und Typ VIII Kollagen im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus	58
3.7.1. MMP-12	58
3.7.2. Typ VIII Kollagen	60
3.8. Zymographie zur Darstellung der MMP-Aktivität im Gewebe	62
4. Diskussion	64
4.1. MMP-12 Expression im Herzen der GM-CSF überexprimierenden Maus	66
4.2. MMP-12 und Herzerkrankungen	66

4.3. MMP-12 und Gefäßerkrankungen des Herzens	68
4.4. Die zellulären Hauptproduzenten von MMP-12: Inflammatorische Zellen	70
4.5. Das Zusammenspiel von GM-CSF und MMP-12	71
4.6. GM-CSF und MMP-12 und Vaskularisierung	72
4.7. MMP-12 und die kardiale extrazelluläre Matrix	74
4.7.1. Effekt von MMP-12 auf das kardiale Elastin	74
4.7.2. Effekt von MMP-12 auf die kollagene Matrix	76
5. Zusammenfassung und Ausblick	79
6. Literatur	80
7. Danksagung	98
8. Lebenslauf	99

1. Einleitung

Das Herz wird von den Menschen seit langer Zeit als besonderes Organ gesehen. Darauf verweisen schon Wandmalereien in Spanien und über 2000 Jahre alte Zeitzeugnisse der Chinesen, Griechen und Römer, die sich schon mit dem Herzen und dem Puls befassten. Um 300 v.Chr. erfand Herophilus von Chalkedon eine Taschenwasseruhr zur Pulsmessung und Seneca der Jüngere, ein römischer Literat, beschrieb vor 2000 Jahren einen *Angina pectoris* Anfall mit den Worten: „Der Anfall ist sehr kurz und einem Sturm ähnlich. Bei anderen Leiden hat man mit der Krankheit zu kämpfen, hier aber mit dem Sterben.“ Aber trotz des anfänglichen Wissens um das Herz, mussten noch 2000 Jahre vergehen, bevor wir einen Einblick in die molekularen Vorgänge im Herzen bekommen konnten.

In westlichen Industrieländern zeichnen kardiale und kardiovaskuläre Erkrankungen für die meisten der Todesfälle verantwortlich.

Im Rahmen der kardialen Erkrankungen nehmen die myokardiale Hypertrophie und die Herzinsuffizienz einen großen Stellenwert ein. Eine große Anzahl von Patienten vorrangig im fortgeschrittenen Alter entwickelt aus der primären myokardialen Hypertrophie eine dilatative Kardiomyopathie (DCM), deren Ätiologie noch unklar ist [163;185].

Die koronare Herzerkrankung (KHK) – die Atherosklerose der Herzkranzgefäße [14] – kann zur ischämischen Kardiomyopathie (ICM) und Herzinsuffizienz führen [124]. Durch die Verengung und die Versteifung der Gefäßwände der Koronararterien kommt es hier zu einer progressiven Einschränkung der Durchblutung des Herzmuskels. Schlimmstenfalls kommt es zur vollständigen Unterbrechung der Durchblutung, zum Herzinfarkt. Kann der Herzmuskel aufgrund der Beeinträchtigungen durch die Atherosklerose oder Herzinfarkt nicht mehr ausreichend durchblutet werden, können *Angina pectoris*, infarktbedingte Herzmuskelschwäche, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod resultieren [69;112].

Kardiale Erkrankungen unabhängig ihrer Ätiologie aber auch physiologische Herzbelastungen wie Ausdauer- oder Kraftsport, sind mit einer Reorganisation des Herzmuskels auf zellulärer und struktureller Ebene, auch myokardiales *Remodeling* genannt, und einer Vergrößerung der Herzmuskelmasse verbunden. Pathologisches *Remodeling* führt zwangsläufig zu einer eingeschränkten Herzfunktion und nachfolgend zur Herzinsuffizienz. Aber auch physiologisches *Remodeling* kann in eine Herzfunktionsstörung münden [111].

Auf zellulärer Ebene kommt es zur Myozyten-Hypertrophie [75], aber auch Myozytennekrose oder -apoptose [8], sowie zur Proliferation der interstitiellen Fibroblasten und zur Infiltration von Entzündungszellen [39]. Das *Remodeling* auf der strukturellen Ebene ist durch Veränderungen im kardialen Bindegewebe, auch Interstitium oder kardiale extrazelluläre Matrix genannt, gekennzeichnet [25;184;185;187]. Beschrieben sind Verschiebungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, im Matrixkatabolismus und überschießende Matrixakkumulation (Fibrose) [186].

Die Prozesse des zellulären und strukturellen *Remodeling* sind auf das Engste miteinander verflochten. Ein starker Zusammenhang besteht zwischen entzündlichen Prozessen und dem strukturellen *Remodeling*. Dies zeigen auch Arbeiten zum Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf die vaskuläre extrazelluläre Matrix aus der eigenen Arbeitsgruppe [135;136;188]. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht daher die Frage, ob auch im Herzen chronische entzündliche Stimuli, wie die Überexpression des inflammatorischen Wachstumsfaktors Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor – GM-CSF - zu einer Veränderung der Expression von Molekülen der kardialen extrazellulären Matrix führen.

1.1. Der Aufbau des Herzens

Das im Mediastinum liegende Herz hat die Form eines Kegels und befindet sich zu etwa einem Drittel rechts und zu etwa zwei Dritteln links der Medianebene. Seine Basis zeigt nach rechts oben und hinten, seine Spitze nach links unten und vorn. Das Herz einer Frau wiegt durchschnittlich etwa 220 Gramm, das Herz eines Mannes wiegt etwa 300 Gramm. Das Herz wird durch eine Scheidewand und durch einen Klappenapparat in vier etwa gleich große Teile geteilt. Es hat zwei Vorhöfe und zwei Kammern. Das Herz ist ein muskulöses Hohlorgan und besteht aus drei Schichten, dem Endokard, dem Myokard und dem Epikard [153].

Endokard: Das Endokard kommt sowohl in den Kammern, als auch in den Vorhöfen als innere Auskleidung des Herzens vor. Das Endokard besteht aus dem Endothel und zwei bindegewebigen Bestandteilen, der Bindegewebslamelle und dem subkardialen Bindegewebe. Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches dem Herzinnern und den Blutgefäßen eine glatte Oberfläche und somit einen geringen Reibungswiderstand für das strömende Blut bietet.

Die Bindegewebslamelle besteht aus einer feinen Schicht aus Bindegewebsfasern direkt unter dem Endothel, sowie einer weiteren Schicht aus elastischen Fasern mit eingebetteten glatten Muskelzellen. Das subkardiale Bindegewebe ist eine lockere Bindegewebschicht, in der Blutgefäße und die spezifischen Muskelzellen des Erregungsleitungssystems liegen.

Die Herzklappen sind Sonderformen des Endokards. Sie bestehen aus einer mit einem Endothelüberzug versehenen starken Bindegewebslamelle von Kollagenfaserbündeln. Bei gesunden Herzen sind die Herzklappen nicht vaskularisiert.

Myokard: Das Myokard ist die dickste Schicht im Herzen. Das Myokard besteht aus den ein Synzytium bildenden quergestreiften Herzmuskelzellen. Es lässt sich in drei wesentliche Hauptmuskelzüge einteilen, die äußere Längsmuskelschicht, die mittlere Ringmuskelschicht und die innere Längsmuskelschicht. Diese drei Muskelfasersysteme sind schraubenartig miteinander verbunden. Sie beginnen im Bereich der Herzklappen am sogenannten Herzskelett. Züge kollagener Bindegewebsfasern (*Trigonum fibrosum*) bilden das Herzskelett. In den Maschen dieses Netzes liegt lockeres Bindegewebe. Dieses interstitielle Bindegewebe dient sowohl als formgebendes Gerüst für die Herzmuskelzellen, als auch als Führungsschicht für die vielen Blutkapillaren.

Epikard: Das Epikard liegt außen auf dem Myokard des Herzens und verleiht dem Herzen eine äußere glatte Oberfläche. Sein Aufbau ist mit anderen serösen Häuten vergleichbar (z.B. Pleura, Peritoneum). Sein Schichtenaufbau wird auch als sogenanntes viscerales Blatt bezeichnet. Das Epikard besteht aus einer Epithelschicht, einer Bindegewebsschicht und dem subepikardialen Fettgewebe.

1.1.1. Feinbau der Herzmuskelzelle

Herzmuskelzellen haben sowohl Ähnlichkeit mit der quergestreiften Skelettmuskulatur, als auch mit der glatten Muskulatur. Im Herzmuskel sind die Herzmuskelzellen zu einem dreidimensionalen Netzwerk miteinander verbunden. Die einzelnen Zellen anastomosieren spitzwinkelig miteinander. Lockeres Bindegewebe und zahlreiche Blutgefäße füllen die Lücken dieses Netzwerkes aus. Meistens besitzen die Herzmuskelzellen nur einen Zellkern (75%), manchmal auch zwei (25%), selten drei (0,4%) und äußerst selten vier (0,1%) [123]. Im Gegensatz zur randständigen Lage der Kerne der quergestreiften Muskulatur liegen die Kerne der Herzmuskelzellen in der Mitte der Zelle. Quergestreifte randständige Myofibrillen umschließen die ovalen oder viereckigen Kerne. Durch das Auseinanderweichen der Myofibrillen um die

Zellkerne entsteht an deren Enden ein fibrillenfreier Raum im Sarkoplasma. In diesen Bezirken können viele paraplastische Stoffe, besonders Glykogen und mit zunehmendem Alter des Menschen das Abnutzungspigment Lipofuszin nachgewiesen werden. Die Zellgrenzen der Herzmuskelzellen werden Glanzstreifen (*Disci intercalares*) genannt. Die benachbarten Muskelzellen können in den *Disci intercalares* durch drei Arten von Zellkontakten verbunden werden: Mechanische Haftstrukturen, die *Maculae adhaerentes* (Desmosomen) und *Fasciae adhaerentes* mit darin verankerten Aktinfilamenten bilden die transversale Strecke, während die longitudinalen Strecken durch *Gap junctions* gebildet werden.

1.2. Funktion des Herzens

Das Herz ist der schwerstarbeitende Muskel im Körper eines Menschen [153]. Es kontrahiert im Laufe des Lebens etwa 3 Milliarden mal. Die Hauptlast trägt dabei der linke Ventrikel. Das Myokard des linken Ventrikels ist im Vergleich zum rechten Ventrikel etwa viermal dicker (12 mm vs. 3mm), da er gegen den hohen Druck-Widerstand des Körperkreislaufs arbeiten muss. Der rechte Ventrikel muss nur den geringeren Widerstand im Lungenkreislauf überwinden. Dieser Unterschied spiegelt sich im Verhältnis des Druckes in den Arterien des Körperkreislaufs (120/60 mmHg) und des Lungenkreislaufs (30/15 mmHg) wider.

Das aus dem Körper rückfließende sauerstoffarme Blut gelangt über die *Vena cava superior* und *Vena cava inferior* in den rechten Vorhof (Atrium) und von dort über die Trikuspidalklappe in die rechte Kammer (Ventrikel). Von dort wird es über die Pulmonalklappe in die Lungenarterien gepumpt. Die *Venae pulmonalis* (die einzigen Venen, die sauerstoffreiches Blut transportieren) führen das arterialisierte Blut in den linken Vorhof, von wo das Blut in die linke Herzkammer weitergeleitet wird. Der linke Ventrikel pumpt das Blut zurück in den Körperkreislauf (Abb. 1).

Das Ruhepotential des Herzmuskels beträgt je nach Lokalisation der Muskelfaser im Herzen zwischen -80 mV im Herzventrikel und -45 mV im Sinusknoten.

Verändern sich die Herzfunktionsparameter als Reaktion auf pathologische Reize (Verletzung, Druck/Volumen-Belastung etc.) oder andauernde physiologische Reize (Ausdauer- /Kraft-Training) antwortet das Herz mit einer Umstrukturierung des Herzens, dem sogenannten kardialen *Remodeling*.

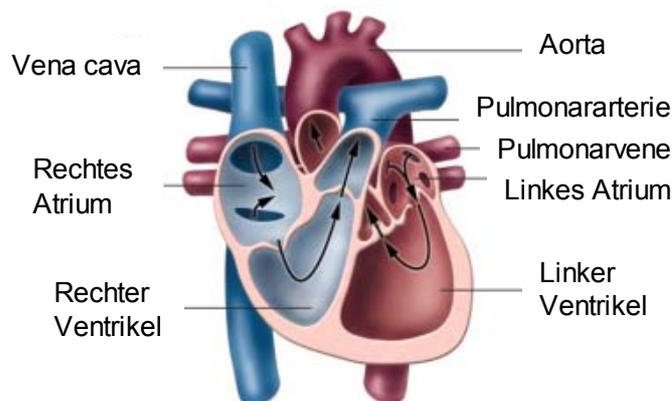


Abb. 1: Aufbau des Herzens (verändert nach: Pfeffer M. In: Colucci W, Editor. Atlas of Heart Failure, 1999.)

1.3. Kardiales Remodeling

Remodeling ist die englische Bezeichnung für Umgestaltung [45;52]. In der Biomedizin bezeichnet man mit *Remodeling* organische Umbauprozesse. *Remodeling* beim Herzen beinhaltet zum einen die kardialen Umbauprozesse (z.B. bei Herzinsuffizienz) aber auch vaskuläre Umbauprozesse (z.B. bei Hypertonie, Atherosklerose). Beide Prozesse des *Remodeling* kommen bei der ischämischen Kardiomyopathie zum Tragen, da hier die vaskulären Umbauprozesse kardiales *Remodeling* induzieren.

Das ventrikuläre *Remodeling* bezieht sich auf Veränderungen in Größe, Form und Funktion des Herzens nach einer „Verletzung“ des linken Ventrikels [169]. Die Verletzung kann einem akuten Myokardinfarkt entsprechen, kann aber auch aus anderen Gründen, wie erhöhtem Druck, erhöhter Wandspannung, Volumenüberlastung und/oder Myozytenschädigung geschehen. Chronische Herzinsuffizienz, chronische Hypertonie, angeborene Herzfehler mit intrakardialen *Shunt* und Herzklappenfehler führen ebenso zum *Remodeling* [37;169]. Ein Sonderfall ist das physiologische kardiale *Remodeling*, wie es beim sogenannten Sportlerherzen beobachtet wird [111]. Hier induzieren Ausdauer- oder Krafttraining über eine Steigerung der Druck- oder Volumenbelastung die Umstrukturierung des Herzens.

Medizinisch gesehen bedeutet ventrikuläres *Remodeling* einen progressiven Funktionsverlust, während das *reverse Remodeling*, also umgekehrtes *Remodeling* eine Verbesserung der ventrikulären Mechanik und Funktion nach einer vorausgehenden Verletzung beschreibt [132].

Remodeling zeigt sich in einer Reihe von histologischen, zellulären und strukturellen Veränderungen des Myokards, die – wenn pathologisch - zu einem progressiven Niedergang der Leistung des Herzens führen können.

Die Herzmuskelzelle und der kardiale interstitielle Fibroblast sind die am meisten in das *Remodeling* involvierten Zelltypen. Dabei ist die Herzmuskelzelle der für das myokardiale *Remodeling* und der kardiale interstitielle Fibroblast der hauptsächlich für das strukturelle *Remodeling* verantwortliche Zelltyp. Außerdem spielen die Zellen der koronaren Blutgefäße eine wichtige Rolle beim strukturellen *Remodeling*.

Letztendlich führt die Gesamtheit dieser Prozesse zu verminderter kontraktile Funktion und reduziertem Schlagvolumen [26;158].

Ursprünglich wurde der Begriff des kardialen *Remodeling* verwendet, um die Veränderungen zu beschreiben, die in den Tagen und Monaten nach einem Myokardinfarkt auftreten. Er wurde jedoch auf Kardiomyopathien

nichtischämischen Ursprungs, wie idiopathische dilatative Kardiomyopathie oder chronische Myokarditis erweitert [37;53], um allgemeine Mechanismen der fortschreitenden kardialen Dysfunktion zu beschreiben [132]. Unangepasstes pathologisches *Remodeling* ist immer mit einer ungünstigen Prognose der Herzinsuffizienz verbunden und die Prävention dieses pathologischen *Remodeling* ist ein etabliertes therapeutisches Ziel.

1.3.1. Remodeling bei ischämischer Kardiomyopathie

Üblicherweise kommt es nach einem Myokardinfarkt zum *Remodeling* (siehe auch Abb. 2). Es entsteht eine Myokardnekrose (Zelltod) und ein ungleichmäßiges Dünnerwerden des Herzens. Dieses dünne, geschwächte Areal kann dem Druck und der Volumenlast des Herzens nicht den gleichen Widerstand entgegensetzen, wie das gesunde Herzgewebe. Daraus resultiert eine Erweiterung der Herzkammer ausgehend von der Region des Infarktes.



Abb. 2: Post-Infarkt Herzkammer-*Remodeling* (verändert nach: Pfeffer M. In: Colucci W, Editor. Atlas of Heart Failure, 1999.)

Die initiale Phase des *Remodelings* resultiert nach einem myokardialen Infarkt aus der Reparatur des nekrotischen Gebiets und der Narbenbildung. Diese Prozesse werden, bis zu einem gewissen Ausmaß, als gut betrachtet, solange

eine Verbesserung oder Erhaltung der Funktion des linken Ventrikels und der kardialen Leistung stattfindet. Unterliegt das Herz eine gewisse Zeit dem andauernden *Remodeling*, verändert es seine Form und wird weniger elliptisch und mehr kugelförmig. Ventrikuläre Masse und Volumen nehmen zu, was sich letztendlich nachteilig auf die Herzfunktion auswirkt. Eventuell verschlechtern sich die diastolische Funktion oder die Fähigkeit des Herzens, sich zwischen den Kontraktionen zu entspannen [132;169].

Zu den pathophysiologischen Veränderungen während des ventrikulären *Remodelings* nach Herzinfarkt zählen [37]:

1. Streckung der Herzmuskelzellen
2. Verdünnung der Ventrikelwand
3. Infarktausbreitung vor der Ausdehnung
4. Entzündung und Resorption von nekrotischem Gewebe
5. Narbenbildung
6. kontinuierliche Ausbreitung der Infarktzone
7. Ausdehnung und Umgestaltung des linken Ventrikels
8. Muskelzellenhypertrophie
9. weiterführender Muskelzellenverlust
10. exzessive Anhäufung von Kollagen im kardialen Interstitium (Fibrose)

Remodeling nach einem Herzinfarkt kann in eine frühe Phase (1-3) und eine späte Phase eingeteilt werden (4-10).

1.3.1.1. Frühes Remodeling nach Myokardinfarkt

Die frühe Phase des *Remodelings* erstreckt sich über den Zeitraum vom Beginn des Infarkts bis 72 Stunden danach. Die innerhalb von Stunden nach der ischämischen Herzmuskelzellenschädigung auftretende Infarktausdehnung resultiert in einer Verdünnung der Ventrikelwand und einer Erweiterung der Ventrikel und verursacht die Erhöhung des diastolischen und systolischen Wanddruckes [169]. Die Ausdehnung des Infarkts ist ein Effekt des Abbaus der interzellulären Kollagenverstrebnungen durch Serinproteasen und der Aktivierung von freigesetzten Matrixmetalloproteinasen (MMP) aus neutrophilen Granulozyten [36;38]. Da sich die Prozesse des frühen *Remodelings* hauptsächlich im kardialen Bindegewebe abspielen, könnte man diese Phase auch als frühes strukturelles *Remodeling* bezeichnen.

1.3.1.2. Spätes Remodeling

Das späte *Remodeling* (ab 72 Stunden) [169] beinhaltet Hypertrophie der Herzmuskelzellen und Veränderungen in der Architektur der Ventrikel, um den erhöhten Wanddruck zu verteilen. Die Hypertrophie der Herzmuskelzellen ist mikroskopisch nachweisbar. Man findet eine bis zu 70%ige Zunahme des Zellvolumens und eine Wandhypertrophie bei der Sarkomerreplikation ohne eine Veränderung der Sarkomerenlänge [169]. Zur Stabilisierung der dehnenden Kräfte und um weitere Herzdeformationen zu vermeiden, bildet die extrazelluläre Matrix eine Kollagennarbe.

1.3.2. Remodeling bei physiologischer und pathophysiologischer Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie

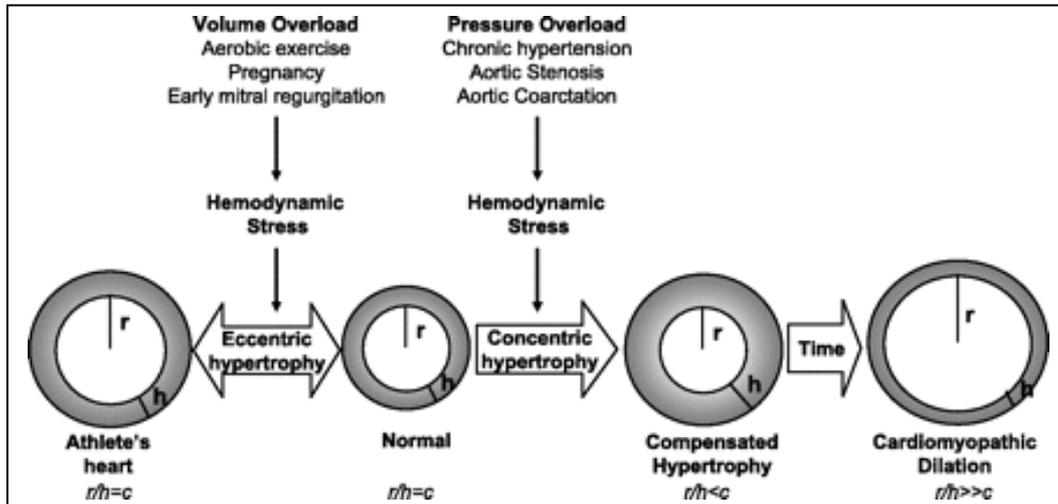


Abb. 3: Stimulus-spezifisches kardiales *Remodeling* (aus: Dorn et al. 2007 [46])

Nicht ischämisch induziertes sogenanntes Stimulus-spezifisches myokardiales *Remodeling* findet sich bei physiologischer (Sportlerherz) und pathologischer hypertropher Hypertrophie, dilatativer Kardiomyopathie und terminaler Herzinsuffizienz. Generell sind alle Formen mit einer Zunahme der Herzmuskelmasse verbunden [69;112].

1.3.2.1. Die physiologische Hypertrophie: Das Sportlerherz

Als Sportlerherz wird ein durch sportliche Betätigung (Ausdauersport oder Kraftsport) harmonisch vergrößertes Herz bezeichnet (Abb. 3). Dabei ist das Herz durch die erhöhte Volumenbelastung sowohl dilatiert, als auch hypertrophiert. Alle Herzhöhlen sind betroffen. Dies stellt einen physiologischen Kompensations-mechanismus dar. Ein Sportlerherz ist ein gesundes Herz mit erhöhter Leistungsfähigkeit bzw. Leistungsreserve [87;111]. Das Hauptkriterium für die Differentialdiagnose zwischen dem Sportlerherzen und der hypertrophen

Kardiomyopathie ist die Reversibilität der Hypertrophie. Das *Remodeling* beim Sportlerherz zeigt sich vorrangig in der Stimulierung des Katabolismus der extrazellulären Matrix [112]. Allerdings kann sich das physiologische Remodeling des Sportlerherzen in ein pathologische Remodeling umkehren.

1.3.2.2. Die hypertrophe Kardiomyopathie

Als Herzhypertrophie wird die Zunahme des Herzgewichtes und der Herzmuskelmasse als Folge chronischer Mehrbelastung des Herzens bezeichnet. Sie basiert auf der Vergrößerung (Hypertrophie) der Herzmuskelzellen.

Durch eine arterielle Hypertonie und eine Aortenklappenstenose entwickelt sich zunächst eine konzentrische Linksherzhypertrophie, welche mit fortschreitender Erkrankung in eine exzentrische Hypertrophie übergehen kann. Schließlich kommt es zu einer Dilatation des Herzen als Folge einer Volumen- oder Druckbelastung (Abb. 3).

Das Herzgewicht liegt bei 500 Gramm oder mehr. Histologisch lässt sich eine Texturstörung beobachten, die durch eine erhöhte Fibrosierung des Interstitium gekennzeichnet ist. Außerdem ist die normale parallele Anordnung der Kardiomyozyten aufgehoben, es kommt zu seitlichen Verbindungen und Verzweigungen. Die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (EZM) bei hypertropher Kardiomyopathie basiert aus einer Imbalance zwischen MMPs und deren Inhibitoren den Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMPs). Dieses Ungleichgewicht führt zu Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung, vermehrter Deposition von Kollagen (Fibrose) und damit zu einer Versteifung der EZM, welche zu fortschreitender kardialer Dysfunktion führt [17].

1.3.2.3. Dilatative Kardiomyopathie und terminale Herzinsuffizienz

Bei DCM zeigt sich zunächst eine Vergrößerung des linken Ventrikels [24]. Mit fortschreitender Erkrankung sind alle Herzhöhlen betroffen, bei geringfügig oder nicht verdickter Wandstärke. Die Kontraktionsfähigkeit und damit die Pumpfähigkeit des Herzens ist stark eingeschränkt. Folgeereignisse wie Herzrhythmusstörungen und plötzlicher Herztod können auftreten. Die DCM zählt zu den gemischten primären Kardiomyopathien. Das heißt, sie kann sowohl angeboren als auch erworben sein. Als häufigste Ursache zählen vorausgegangene Myokarditiden und chronischer Alkoholabusus [112].

Histologisch zeigen sich Kardiomyozytenhypertrophie und interstitielle Fibrose. Dabei kommt es nicht nur zu einer vermehrten Deposition der Kollagenfasern, sondern auch zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der Kollagenfibrillen. In der frühen Phase des *Remodeling* kommt es zu einer Erhöhung des Typ III Kollagenanteils in den Kollagenfibrillen. Die Typ III Kollagen-reicheren Fibrillen sind dünner und dehnbarer als die normaler Zusammensetzung. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Dehnung und Verdünnung der Ventrikelwand. In der späten Phase des *Remodeling* werden die dünnen Typ III Kollagen-reichen Fasern durch steife Kollagenfasern mit hohem Typ I Kollagen-Anteil ersetzt. Dies führt zusätzlich zur Erhöhung der Steifheit der bereits überdehnten Ventrikelwand [122] und zu progressiver systolischer und diastolischer Dysfunktion [25].

Bei der terminalen Herzinsuffizienz ist die Schädigung des Herzens so weit fortgeschritten, dass nur eine Herztransplantation den Betroffenen helfen kann. Da nicht genügend Spenderherzen zur Verfügung stehen, ist die Mortalitätsrate sehr hoch. So stehen in den USA jährlich nur etwa 2000 Spenderherzen für etwa 20000 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz zur Verfügung. Unabhängig vom Alter der neu diagnostizierten Patienten beträgt deren 5-Jahres-Überlebensrate nur etwa 50 % [195].

1.4. Das kardiale Bindegewebe

Der menschliche Körper besitzt, je nach Morphologie und Funktion zu unterscheidende, unterschiedliche Gewebearten, wie z.B. Epithel-, Binde-, Muskel- und Nervengewebe, die aus spezifischen Zellen und dem extrazellulären Raum bestehen.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen das kardiale Bindegewebe (Interstitium) und die Strukturelemente der kardialen EZM. Das nicht myozytäre Kompartiment oder kardiale Interstitium macht ca. 25% des Herzgewebes aus. Es besteht aus Bindegewebszellen und Fibroblasten (7%), vaskulären Elementen (59%), sogenanntem Leerraum (6%), Proteoglykan-reicher Grundsubstanz (24%) und Kollagen (4%). Ein komplexes Geflecht aus Makromolekülen füllt den kardialen extrazellulären Raum zum größten Teil aus. Die EZM dient als struktur- und formgebendes Element des Herzens und beeinflusst seine Entwicklung und Physiologie. Die EZM beeinflusst Zellfunktionen und Mechanik. Sie dient als passiver Speicher von z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Auf zellulärer Ebene wirkt die EZM auf die Proliferation, Migration, Adhäsion, sowie beeinflusst den Phänotyp und die Polarität der Zellen. Mechanisch hat die EZM eine statische Stützfunktion, indem sie den dreidimensionalen Aufbau aufrecht erhält und damit die Gewebeform und -integrität bestimmt. Außerdem hat die EZM eine Filterfunktion, da sie eine Diffusionsbarriere für Metaboliten bildet [187].

Im kardiovaskulären System erfüllt die EZM verschiedene biologische Aufgaben [25;187]:

- Erhaltung der Strukturintegrität des Herzens und der Blutgefäße
- Gerüst für die Zellverankerung und –funktion
- Bindeglied bei der Zellanheftung, Zellerscheinungsbild und Zell-Zell-Kommunikation
- Integration mechanischer Kräfte und Linien der Kraftübertragung
- Bindeglied bei der diastolischen Starrheit
- Unterstützung des Zellüberlebens und der Apoptose
- Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine
- Umgestaltung bei Entzündung, Verletzung und Wachstum/Rückbildung

1.5. Struktur des kardialen Interstitiums

Das kardiale Interstitium ist ein dreidimensionales Netzwerk, das in drei Kompartimente unterteilt wird (Abb. 4), das Epimysium, das Perimysium und das Endomysium. Das Interstitium besteht vorrangig aus einem Geflecht ineinander verwobener kollagener Faserbündel unterschiedlichen Kalibers [147;148;187].

Das Epimysium ist die äußere Hülle des Myokards und umfasst die Kollagenbündel und Elastinbündel der endokardialen und epikardialen Oberflächen. Vom Epimysium entspringen die Kollagenfasern des Perimysiums.

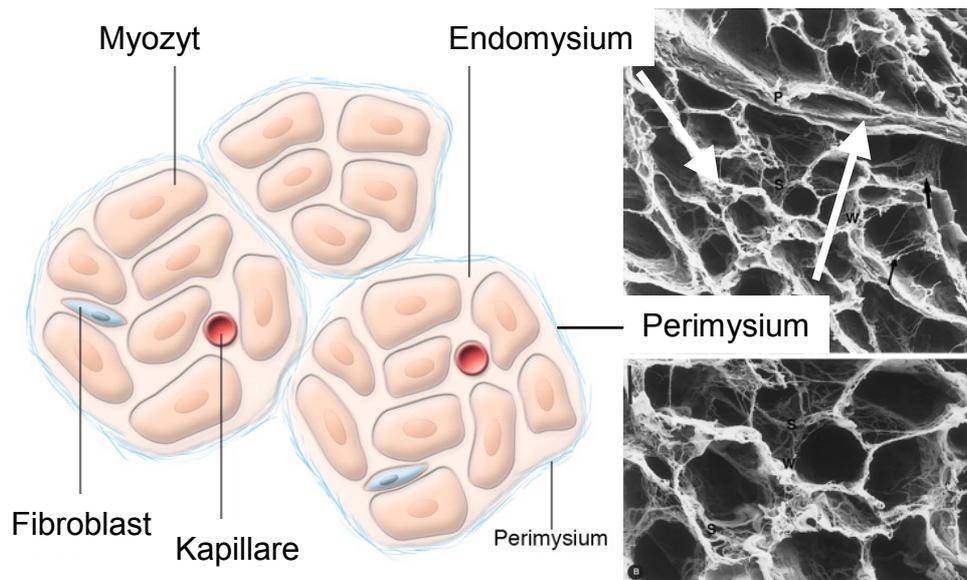


Abb. 4: Das kardiale Interstitium (verändert nach Sanchez-Quitana et al. 1999 [147] und Berk et al. 2007 [17]).

Das Perimysium besteht aus einem Geflecht aus dünneren kollagenen Fasern die parallel zu den Muskelfasern verlaufen. Es umschließt Gruppen von Myozyten, so dass Muskelfaserbündel gegeneinander abgegrenzt sind und verbindet die Muskelfaserbündel untereinander.

Das Endomysium umgibt als dünnes Kollagenfasergeflecht honigwabenartiger Struktur die einzelnen Myozyten. Streben dünner kollagener Stränge verbinden die individuellen Myozyten miteinander und die Zellen mit den Kapillaren [187].

1.6. Die Hauptstrukturelemente der kardialen EZM

Die Hauptstrukturelemente der kardialen und kardiovaskulären EZM sind Kollagen und Elastin. Beide werden im Herzgewebe hauptsächlich von den interstitiellen Fibroblasten produziert, im Gefäßsystem vorrangig von vaskulären glatten Muskelzellen.

Kollagen und Elastin sind polymere Makromoleküle, die zunächst als monomere Proformen synthetisiert werden. Am Beispiel des Kollagen soll dies hier exemplarisch dargestellt werden: Das kollagene Faserbündel, wie es z.B. im kardialen Interstitium zu finden ist, besteht aus einzelnen Kollagenfasern. Diese bestehen aus einem Bündel von Kollagenfibrillen. Die Fibrillen sind aus einem Bündel von Mikrofibrillen zusammengesetzt. Mikrofibrillen sind Polymere aus aneinandergereihten Tropokollagen-Molekülen. Tropokollagen ist ein Trimer. Es besteht aus drei helikal ineinander gewundenen Prokollagen-Molekülen. Die Moleküle der posttranslationalen Modifikation gewährleisten, dass aus den Monomeren eine stabile funktionelle hochpolymere Funktionseinheit entsteht.

1.7. Kollagene

Die Hauptproteine der EZM sind die Kollagene [142;176]. Kollagen bedeutet „leimgebend“ (gr. Kolla = Leim), weil es beim Kochen löslich ist und daraus Leim entsteht. Bei Säugetieren machen sie in etwa 25% des Gesamtproteins aus. Die Kollagene sind für eine breite Spanne von Funktionen verantwortlich, welche Zelladhäsion, Zelldifferenzierung, Zellwanderung, Angiogenese, Gewebemorphogenese, Gewebereparation, strukturelle Integrität von Organen und Onkogenese beinhalten [82;193].

Bis heute sind 43 α -Prokollagenketten bekannt. Jeweils drei Prokollagenketten bilden ein Tropokollagenmolekül. 28 verschiedene Kollagentypen (Typ I Kollagen – Typ XXVIII Kollagen) sind bisher bekannt [82;142;176]. Von den 28 beschriebenen Kollagenen sind ca. 11 bisher im Herzen nachgewiesen worden, wovon die Typen I, III und IV am besten charakterisiert sind [22;142].

Aufbau und Zusammensetzung: Ein typisches Kollagenmolekül besteht aus einer unbeweglichen langen Helikalstruktur, in der drei α -Prokollagenketten in einer Superhelix umeinander gewunden sind. Kollagene enthalten sehr viel Prolin und Hydroxyprolin (etwa 25%) und Glycin (etwa 30%). Diese beiden Aminosäuren sind wichtig für die Bildung der Tripelhelix. In der Tripelhelix

entspricht jede dritte Aminosäure einem Glycin, somit entsteht eine Sequenz von Gly-X-Y. X und Y können beliebige Aminosäuren sein, meist findet sich an X jedoch Prolin und an Y meist Hydroxyprolin. Durch die Ringstruktur von Prolin wird die α -Kette stabilisiert. Durch die kleine Aminosäure Glycin können die drei α -Ketten dicht aneinander gepackt werden. Aus drei α -Prokollagenketten entsteht so die Tripelhelix. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren stabilisieren die Tripelhelix. An der Zelloberfläche wird das fertige Tropokollagen zu Mikrofibrillen kondensiert. Die Mikrofibrillen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Bindungen zusammengehalten. Zugspannung auf das Gewebe bewirkt eine Kristallisation der Mikrofibrillen, so dass Fibrillen und Fasern entstehen. Aus Kollagenfibrillen entstehen kabelähnliche Bündel, die im Lichtmikroskop als Kollagenfasern erkennbar sind und einen Durchmesser von mehreren Mikrometern haben [16;85;93].

Die Tripelhelix des Kollagens ist resistent gegen proteolytische Spaltung durch Pepsin, Trypsin und Papain. *Clostridium histolyticum* produziert Kollagenasen, welche die Tripelhelix an zahlreichen Stellen spalten. Die Fähigkeit des Kollagens resistent gegen die Spaltung durch Pepsin und Trypsin zu sein und ihre Empfindlichkeit gegenüber der Spaltung durch bakterielle Kollagenasen wird zur Erforschung und Charakterisierung der Kollagene genutzt. Der Abbau von Kollagen kann *in vivo* durch Matrixmetalloproteinasen, Cysteinproteinasen und Serinproteasen erfolgen [49;167].

Nomenklatur und Klassifikation: Es gibt keine einvernehmliche Definition für ein Kollagen. Im Allgemeinen werden Kollagene als Proteine mit einer Tripelhelix angesehen, die Funktionen in der Sicherstellung der Gewebeintegrität haben. Die Grenze zwischen Kollagenen und kollagen-ähnlichen Proteinen ist verschwommen. Den Kollagenen wird eine römische Ziffer zugeordnet und sie werden nach ihrer Funktion und ihrer Domänenstruktur eingeteilt [176]. Man unterscheidet zwischen fibrillären und nicht-fibrillären Kollagenen.

Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI sind **fibrilläre Kollagene** oder Fibrillen-bildende Kollagene [20;21]. Die Kollagenfibrillen des Herzens (und auch anderer nicht knorpeliger Gewebe) bestehen aus einem Gemisch der Kollagentypen I, III und V, wobei den größten Anteil Typ I Kollagen ausmacht, gefolgt von Typ III Kollagen. Der Typ V Kollagen Anteil ist gering. In der Kollagenfibrille bestimmt Typ I die Zugfestigkeit und Typ III Kollagen die Elastizität. Daher wundert es nicht, dass die Gefäße einen höheren Anteil Typ III Kollagen in den Kollagenfibrillen enthalten als andere Gewebe [12;22;159].

Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT) sind relativ kurze Kollagene, die an der Oberfläche von Kollagenfibrillen gefunden werden [175].

Kollagene vom Typ IV, VIII und X sind **Netzwerk-bildende Kollagene**. Kollagen IV ist der Prototyp der Netzwerk-bildenden Kollagene. Typ IV Kollagen ist der Hauptbestandteil der Basalmembran und kommt somit in verschiedenen Geweben vor [86]. Typ VIII Kollagen wurde zunächst als eine Hauptkomponente der Descemet-Membran des Auges beschrieben, wo es als hexagonale Superstruktur erscheint [84]. Im vaskulären System ist Typ VIII Kollagen weit verbreitet und wird im Rahmen der Atherosklerose hochreguliert [133;134;199]. Nicht zuletzt ist Typ VIII Kollagen ein Bestandteil der kardialen kollagenen Matrix und wird von Endothel- als auch glatten Muskelzellen produziert [74;170].

Typ VI Kollagen ist ein **perlenschnurartiges Kollagen** und wird überall im Bindegewebe exprimiert [176].

Kollagen VII ist neben der *Lamina densa* der Epithelien der Hauptbestandteil der **verankernden Fibrillen** [142;176].

Die Gruppe der **transmembranären Kollagene** umfaßt die Kollagene XIII und XXV, welche Zellverbindungen besitzen und in einer großen Anzahl von Zellen, auch in malignen Zellen vorkommen [142].

Die Kollagene Typ XV und Typ XVIII zählen zu den **Endostatin-produzierenden Kollagenen** [142;176]. Endostatin ist ein von Typ XVIII-Kollagen natürlich vorkommendes 20 kDa C-terminales antiangiogenes Fragment [109;110]. Endostatin wird zur Zeit in der Krebsforschung untersucht. Endostatin inhibiert 65 verschiedene Tumortypen und modifiziert 12% des menschlichen Genoms um die pathologische Angiogenese ohne Nebeneffekte herunter zu regulieren [54].

Es gibt eine Reihe von Kollagenen die bisher keiner spezifischen Gruppe zugeordnet werden können. Wenig ist bis heute über die zuletzt entdeckten Kollagene Typ XXVI und XXVIII bekannt [149;181].

Da sie Hauptkomponenten der kardialen kollagenen Matrix sind, wurden die folgenden Kollagentypen in dieser Arbeit untersucht:

1.7.1. Typ I Kollagen und Kollagen Typ III

Typ I Kollagen besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette [16;72;126;193]. Im Herzen wird Typ I Kollagen von den interstitiellen Fibroblasten synthetisiert [187]. Der Anteil an Typ I Kollagen bestimmt die Steifheit und den Dehnungswiderstand der Kollagenfibrillen. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression von Prokollagen α 1(I) untersucht.

Typ III Kollagen besteht aus drei α 1- Prokollagenketten [10;21]. Der Anteil von Typ III Kollagen bestimmt die Elastizität und Dehnbarkeit der Kollagenfibrille [103]. Veränderungen im C1:CIII Verhältnis der Kollagenfibrillen können damit Herzfunktionsparameter maßgeblich beeinflussen [131].

Die Hauptproduzenten der beiden fibrillären Kollagene im Herzen sind die interstitiellen Fibroblasten [13;22].

1.7.2. Typ VIII Kollagen

Kollagen Typ VIII ist meist aus zwei α 1- und einer α 2- Kette zusammengesetzt, allerdings kann die Zusammensetzung variieren [170]. So kann das Typ VIII Tropokollagen sowohl ein Homo- als auch ein Heterotrimer sein.

Im Herzen wird Typ VIII Kollagen von interstitiellen Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch von den Myozyten produziert [74;88]. Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe weisen auf eine Bedeutung von Veränderungen der Expression des Typ VIII Kollagens bei der schweren Herzinsuffizienz hin.

In der Gefäßwand ist Typ VIII Kollagen in allen Schichten zu finden [89]. In der Tunica media wurde ein Expressionsgradient mit der stärksten Expression zur Tunica adventitia hin beschrieben [134]. Die Typ VIII Kollagen synthetisierenden Zellen der Gefäßwand sind Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Mastzellen, Makrophagen und adventitielle Fibroblasten [138].

1.7.3. Kollagenassoziierte Erkrankungen des Herzens und des Gefäßsystems

Bei Skorbut, einer Vitamin-C-Mangelkrankheit, können keine stabilen Tripelhelices als Folge von defekten Prokollagen- α -Ketten ausgebildet werden. Diese werden sofort in der Zelle abgebaut. Die Folgen des mangelnden Kollagens in der Matrix sind unter anderem brüchige Blutgefäße.

Kollagen spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose. So werden beispielsweise die Stabilität der Plaque und die Größe der atherosklerotischen Plaque von Kollagenen aus der Produktion glatter Muskelzellen maßgeblich beeinflusst. Fibrilläres Kollagen kann bei unkontrollierter Akkumulation zu arterieller Stenose führen, während

unkontrollierter Kollagenabbau zusammen mit inadäquater Synthese die Plaque schwächt und sie anfällig für eine Ruptur macht [141].

Mutationen in Kollagen Typ III sind mit bestimmten arteriellen Aneurysmen assoziiert [92;179].

Veränderungen im Kollagenmetabolismus sind der Hauptgrund für die Erhöhung der Gewebesteifheit (Fibrose) im kardialen und kardiovaskulären System und sind maßgeblich am kardialen *Remodeling* beim Hochdruck beteiligt [44;57].

1.8. Elastin

Ein Netzwerk elastischer und kollagener Fasern ermöglicht vielen Geweben, wie z.B. auch Blutgefäßen und dem Herzen sich zu dehnen und zusammenziehen zu können. Elastische Fasern verfügen über eine 5x höhere Dehnbarkeit als ein Gummiband gleicher Stärke. Zur Begrenzung der Elastizität sind die eher „unelastischen“ Kollagenfasern eingelagert. Diese verhindern Geweberisse durch Überdehnung. Hauptbestandteil elastischer Fasern ist Tropoelastin.

Aufbau und Zusammensetzung: Die Biosynthesevorstufe von Elastin ist das Tropoelastin, dessen Molekulargewicht ca. 72 kDa beträgt. Es besteht größtenteils aus zwei alternierenden Domänen [182]:

- die hydrophobe Domäne ist aus sich wiederholenden Einheiten der Aminosäuren Glycin, Valin, Prolin und Alanin aufgebaut.
- die hydrophile Domäne besteht aus Lysin, Prolin und Alanin.

Tropoelastin ist sehr hydrophob und enthält wie Kollagen viel Prolin und Glycin, wird aber nicht glykosyliert. Elastin enthält wenig Hydroxyprolin und kein Hydroxylysin.

Verschiedene Zellen sezernieren lösliches Tropoelastin. In der EZM wird das Tropoelastin, sofort nachdem es die Zelle verlassen hat, zu Elastin vernetzt. Dadurch ist es im Gewebe nur in geringer Konzentration nachweisbar. Zur Vernetzung wird das Enzym Lysyloxidase, ein kupferabhängiges Enzym, benötigt [182].

Elastin kommt besonders häufig in Arterien vor. Die Aorta, die größte Arterie besteht in ihrer Trockenmasse zu 50% aus Elastin. Durch Mutationen im Elastingen, kann es durch eine uneingeschränkte Proliferation der glatten Muskelzellen zur Verengung der Arterien kommen [9]. Im Herzen finden sich Elastinfasern in den Gefäßen, in den Herzklappen und im bindegewebigen Anteil des Endo- und Epikards.

1.9. Quervernetzung von Strukturmolekülen

Das Zusammenfügen der Grundbausteine der Kollagenfibrillen und des Elastins erfolgt durch Quervernetzung. Lysyloxidase (LOX) ist für die Quervernetzung des Kollagens und des Elastins verantwortlich, indem es lysinabgeleitete Querverbindungen von Kollagen und Elastin katalysiert. Die Quervernetzung stabilisiert und insolubilisiert die beiden Makromoleküle [83]. *Bone morphogenic protein 1* (BMP-1) aktiviert LOX [125].

1.9.1. Lysyloxidase

LOX ist eine Kupfer-abhängige Aminoxidase. Sie wird als 50 kD Prolysyloxidase synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung wird Prolysyloxidase zur aktiven 32 kD-Form prozessiert. LOX wandelt das proteingebundene Lysin bzw. Hydroxylysin, z.B. im Kollagen und Elastin, durch Ammoniakabspaltung und Oxidation in Lysylaldehyd oder Hydroxylysylaldehyd um und bildet dabei Wasserstoffperoxid. Die Lysyloxidase greift an den

Lysinresten des Kollagens und des Elastins an. Dabei entsteht aus der Verknüpfung von drei Lysylaldehydresten mit einem weiteren Lysinrest im Elastin das Desmosin als Aminosäure. Desmosin trägt durch die Brückenbildung zwischen Polypeptidketten zur hohen Elastizität des Elastins bei [83;173].

LOX wird bei dilatativer Kardiomyopathie hochreguliert, was mit gefundenen Kollagenablagerungen korreliert. Der Anstieg von LOX bei der Herzinsuffizienz korreliert mit der Fibrose im Myokard [163]. Ebenso findet sich ein erhöhtes Vorkommen von LOX beim experimentell verursachten Infarkt. Auch die Hemmung des LOX-Gens bewirkt strukturelle Veränderungen in der Arterienwand, die bis hin zum Aneurysma und Dissektion führen können [162].

1.9.2. Bone morphogenic protein 1

BMP-1 ist ein multifunktionales Enzym, das zum einen *transforming growth factor* ähnliche Moleküle aktiviert, zum anderen fibrilläres Prokollagen prozessiert [128]. Außerdem ist es an der Aktivierung von LOX beteiligt [125]. Ob BMP-1 eine Rolle beim kardialen *Remodeling* spielt, ist bisher nicht untersucht.

1.10. Moleküle des Abbaus von Kollagen und Elastin

Der Abbau von Kollagen und Elastin erfolgt durch extrazelluläre, proteolytische Enzyme. Man unterscheidet unter anderem die Ca^{2+} - oder Zn^{2+} -abhängigen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und die Serinproteasen, welche ein reaktives Serin in ihrem aktiven Zentrum besitzen. Spezifische Gewebeinhibitoren „*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*“ (TIMPs) hemmen die Matrixmetalloproteinasen und damit den Abbau der EZM [3;18;25].

1.10.1. Matrix-degradierende Enzyme

Matrix-degradierende Enzyme werden von den Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben. Die meisten dieser Proteasen können zwei Gruppen zugeordnet werden:

- MMPs (Ca^{2+} - bzw. Zn^{2+} -abhängig)
- Serinproteasen (reaktives Serin im aktiven Zentrum)

Matrixstrukturproteine werden gemeinsam von MMPs und den Serinproteasen abgebaut.

MMPs sind eine Familie von proteolytischen matrixdegradierenden Enzymen. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Umgestaltung der kardialen extrazellulären Matrix. Pathologische Matrixdegradation ist im Zusammenhang mit pathologischen Gefäß- und Herz-*Remodeling*-Prozessen, Atherosklerose und Plaqueruptur beschrieben [14;130;166].

Für den Menschen sind bisher 28 zinkabhängige, zu den MMPs gehörende Endopeptidasen beschrieben worden [58]. Aufgrund ihrer Substratspezifität können sie in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, *Membrane-Type*-(MT)MMPs und andere MMPs eingeteilt werden [43;166]. Im Herzen werden MMP-1, -2, -3, -9 und -12 exprimiert [99].

Aufbau und Wirkweise: Die MMPs werden in einer inaktiven Proenzymform synthetisiert und sezerniert. Die inaktiven Pro-MMPs binden an verschiedene Moleküle der kardialen EZM (MMP-2 an Elastin, MMP-3 an Kollagenfibrillen, MMP-9 an Basalmembranstrukturen), wo sie für eine schnelle Aktivierung und Mobilisierung bereitliegen. Durch proteolytische Spaltung werden die inaktiven Proenzyme zur aktiven Form prozessiert. Es gibt Plasmin-abhängige und – unabhängige Mechanismen der MMP-Aktivierung [98;99].

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende MMPs untersucht, da sie bekanntermaßen beim kardialen *Remodeling* eine maßgebliche Rolle spielen:

1.10.1.1. MMP-2

1979 wurde von Liotta und seinen Mitarbeitern ein Enzym in einem Tumor einer Maus entdeckt, welches Kollagen Typ IV der Basalmembran degradierte. Das 72 kDa große Enzym ist als 72 kDa Gelatinase A oder MMP-2 bekannt [101]. MMP-2 ist weit verbreitet und wird im Herzen u.a. von Fibroblasten, Myozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten synthetisiert [14;64].

1.10.1.2. MMP-3

1974 entdeckten Werb und Reynolds in Kulturen von Fibroblasten aus Kaninchenknochen Proteoglykanase [192]. Später wurde diese in Stromelysin 1 und MMP-3 umbenannt [35]. Im Herzen und Gefäßsystem, wird MMP-3 von Fibroblasten, Kardiomyozyten, Monozyten und glatten Muskelzellen exprimiert [64].

1.10.1.3. MMP-9

1974 fanden Sopata und Danciewicz in humanen Leukozyten die Gelatinase B oder MMP-9 [164]. Ein weiteres Synonym ist 92 kD-Gelatinase [108]. MMP-9 wird im kardiovaskulären System von glatten Muskelzellen und Makrophagen produziert. Exprimierende Herzzellen sind Fibroblasten und Myozyten [14;64].

1.10.1.4. MMP-12

1975 wurde MMP-12 von Werb und Gordon in stimulierten Maus-Makrophagen entdeckt [191]. Ihr bevorzugtes Substrat ist Elastin [14]. Die Metalloelastase MMP-12 wird auch im Herzen hauptsächlich von infiltrierenden Zellen synthetisiert [5;6;33].

1.10.1.5. MMPs und Herzerkrankungen

Mit fortschreitender Herzinsuffizienz erhöht sich die Aktivität verschiedener MMPs [32;64;102;168]. Bei einem Myokardinfarkt erhöhen sich die MMPs signifikant innerhalb von Stunden, gefolgt von der lokalen Aktivierung von Zytokinen und Infiltration von Entzündungszellen. Die MMP-Konzentration sinkt wieder mit dem Voranschreiten des Heilungsprozesses, wird aber von einer zweiten Welle der Aktivierung gefolgt, die mit Ventrikeldilatation und Herzinsuffizienz einhergeht. Einen wesentlichen Anteil an der Regulation der MMP-Produktion nach einem Myokardinfarkt haben entzündliche Zytokine. So führt eine erhöhte Ausschüttung des Tumornekrosefaktors zu einer lokal erhöhten Produktion von MMP-9 und MMP-2 und kann mit einer akuten myokardialen Ruptur enden. Geht dieser Prozess ohne eine Ruptur vonstatten, führt er zu einer ausgeprägten Herzdilatation, die mit verminderter Funktion und verschlechterter Überlebenschance assoziiert ist. Diesem Prozess kann mit der Verabreichung geeigneter Inhibitoren der MMPs entgegengewirkt werden. Jedoch kann eine zu hohe Dosis oder die zu lange Verabreichung der MMP-Inhibitoren zu einer verstärkten Narbenbildung führen. Dieses kann eine systolische Herzinsuffizienz in eine diastolische Herzinsuffizienz mit ausgedehnter Fibrosebildung und paradoxer Kollagenablagerung umkehren [102].

1.10.2. Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen

TIMPs sind spezifische Inhibitoren, welche die MMPs und somit den Abbau der EZM hemmen [119]. Bisher konnten vier TIMPs identifiziert werden (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Von diesen 4 sind TIMP-1 bis -3 ubiquitär, TIMP-4 wird vorrangig in Herzen exprimiert [99]. Produzierende kardiale Zellen sind interstitielle Fibroblasten und infiltrierende Zellen [61;99].

Im gesunden Organismus besteht ein ständiges Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der EZM und damit MMPs und TIMPs. Unter pathologischen Bedingungen wie der Herzinsuffizienz kann es durch hohe Konzentrationen an TIMPs zur Akkumulation der Matrix und damit Fibrosierung des Herzgewebes kommen [165;194]. TIMPs inhibieren die Angiogenese [79] und beeinflussen das Zellwachstum [62;63].

Aufbau und Wirkweise: TIMPs sind in etwa 40% ihrer Aminosäuresequenz identisch und weisen strukturelle Homologien auf [42]. TIMP-1 und TIMP-2 kommen in gelöster Form vor, während TIMP-3 an die EZM gebunden ist. Durch ihre hohe Affinität binden diese extrazellulären Proteine an spezifische MMPs. TIMP-1 und TIMP-3 binden vorrangig an MMP-9, TIMP-2 dagegen an MMP-2. Während TIMP-1, -2 und -3 auch alle anderen MMPs inhibieren, hemmt TIMP-4 nur spezifisch MMP-1, -2, -3, -7 und -9. TIMPs beeinflussen durch Komplexbildung mit Gelatinasen deren Aktivierung. So bildet TIMP-1 mit ProMMP-9 und TIMP-2 mit ProMMP-2 einen Komplex [172].

In dieser Arbeit wurden die folgenden TIMPs untersucht:

1.10.2.1. TIMP-1

TIMP-1 ist seit 1975 bekannt und hat eine hohe funktionelle Bandbreite. Es wird von vielen verschiedenen Zellen synthetisiert, im Herzen vorrangig von Fibroblasten [99]. TIMP-1 besteht aus 148 Aminosäuren und hat eine Größe von 28,5 kDa [29]. Darin enthalten sind 12 Cysteine, welche Disulfidbrücken

bilden. Dadurch entsteht eine Resistenz gegen große pH-Wert- und Temperaturschwankungen [30].

Eine erhöhte Expression von TIMPs ist häufig mit pathologischen fibrosierenden Prozessen assoziiert. So konnten in fibrotischen Geweben von Herzen und in der Gefäßwand hohe Spiegel von TIMP-1 nachgewiesen werden [68;180]. TIMP-1 ist bei terminaler Herzinsuffizienz erhöht [99].

1.10.2.2. TIMP-2

TIMP-2 wurde 1986 beschrieben [67]. Mit 21 kDa ist TIMP-2 im Vergleich zu TIMP1 etwas kleiner [171]. Es kann die Proliferation von mesenchymalen Zellen anregen [62]. Meist funktioniert TIMP-2 ähnlich wie TIMP-1. Durch Modulation der TIMP-2-Synthese kann jedoch ein zu TIMP-1 gegenteiliger Effekt auftreten [157].

1.11. Regulation der kardialen EZM durch Zytokine

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen greift in die Regulation der kardialen EZM ein. So besitzen kardiale interstitielle Fibroblasten Rezeptoren für *transforming growth factor β* , Angiotensin II, Endothelin und verschiedene proinflammatorische Zytokine [99]. Proinflammatorische Zytokine wie *tumor necrosis faktor α* (TNF α) und Interleukin-1 β können in unterschiedliche Richtungen wirken. So können sie die Kollagenproduktion stimulieren, aber auch inhibieren. Durch ihre stimulierende Wirkung auf MMPs beschleunigen sie den EZM-Abbau. Kolonie-stimulierende Faktoren, insbesondere der *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), sind wichtige Regulatoren des Kollagen- und Elastinmetabolismus der Gefäßwand [137;138;188;189]. Darüber, ob GM-CSF auch eine Rolle beim *Remodeling* der kardialen EZM spielt, liegen bisher ausschließlich Spekulationen vor.

1.11.1. GM-CSF

GM-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor. GM-CSF ist ein Glykoprotein-Zytokin, welches zur Familie der koloniestimulierenden Faktoren (CSF) im engeren Sinne gehört. GM-CSF spielt eine Schlüsselrolle bei Entzündungen und der Immunabwehr [114;115].

Struktur und Aufbau: Die aktive Form von GM-CSF liegt im extrazellulären Raum an Proteoglykane gebunden vor [23]. Es handelt sich um ein Homodimer, das in seiner ausgereiften Form glykosyliert ist.

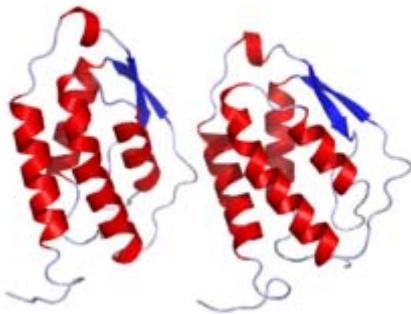


Abb. 4: Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) aus: Rozwarski et al 1996 [144].

GM-CSF wird von Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert. Im Herzen wird GM-CSF vorrangig im Gefäßsystem von inflammatorischen Zellen und Gefäßzellen exprimiert [136;138]. GM-CSF beeinflusst als Wachstumsfaktor die Bildung weißer Blutzellen und stimuliert Stammzellen zur Bildung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. GM-CSF modifiziert die Wundheilung, indem es die Monozytopoese und die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in das verletzte Gewebe unterstützt [107].

1.11.2. GM-CSF und Herzerkrankungen

Das Voranschreiten der Herzinsuffizienz beim *Remodeling* des Herzventrikels ist mit strukturellen Veränderungen in der EZM und im Zytoskelett der Kardiomyozyten, sowie mit Fibrose, Zellschädigung und Zelltod verbunden. Im Endstadium der Herzinsuffizienz wurde von Postiglione und Mitarbeitern im Vergleich zu normalen Herzgeweben ein Anstieg von GM-CSF in Kardiomyozyten gemessen [139]. Daher wird vermutet, dass GM-CSF eine Rolle bei Apoptose und/oder EZM-*Remodeling*-Vorgängen, sowie bei Veränderungen des Zytoskeletts im Myokard spielt [91]. Verschiedene CSF scheinen die kontraktile Funktion des Ventrikels nach einem Myokardinfarkt zu verbessern, vermutlich indem sie die Infarktheilung beschleunigen und das *Remodeling* in der Grenzzone unterdrücken. Verschiedene Studien zeigten, dass GM-CSF die Arteriogenese und Kollateralenbildung im Herzgewebe nach Herzinfarkt stimuliert [154]. Allerdings konnten spätere Studien diesen Effekt nicht bestätigen. Die START Studie zum Einfluss von GM-CSF bei peripheren Gefäßerkrankungen wurde vorzeitig abgebrochen [177;178].

1.12. Transgene Mausmodelle

Mit der Entwicklung spezifischer molekulargenetischer Klonierungstechniken wurde es möglich, spezifische Gene durch Isolation, Manipulation und Wiedereingliederung in einen Organismus zu integrieren und je nach Technik auszuschalten (*knockout*-Technik) oder überzuexprimieren (transgen) [4].

Die Maus als Säugetier eignet sich am besten als genetisches Modell, da sie sich schnell vermehrt und klein ist. Eine Züchtung ist somit ohne hohen Kostenaufwand möglich [4]. Heute ist es möglich, Mäuse mit gezielten Mutationen in nahezu jedem beliebigen Gen zu erzeugen [183].

Die Gentechnik ermöglicht es, Mutanten zu erzeugen, die Gene auf einem anormalen hohen Niveau exprimieren (transgene Überexpression) und stabil

weitergeben. Mit solchen Tieren kann nun z. B. die Überexpression von GM-CSF und sein Einfluss auf die kardiale EZM erforscht werden [116]. Verglichen wird die transgene Maus mit dem Wildtyp (nicht veränderte Kontrollmaus).

Die genetischen Mausmodelle sind ideal, um im Bereich der Grundlagenforschung die Funktion und Regulation einzelner Gene zu untersuchen. Sie ist vor allem bei entwicklungsbiologischen Fragen hilfreich. In der Medizin sind diese Tiermodelle heute besonders wichtig zur Untersuchung spezifischer Krankheitsbilder des Menschen. Der große Vorteil besteht darin, dass sich die induzierte Krankheit mehrfach, auch in verschiedenen Altersstufen, reproduzieren lässt.

Die gezielte Deletion oder Überexpression spezifischer Gene erzeugt den menschlichen Krankheiten stark ähnelnde Krankheitsbilder. In diese Kategorie gehören Modelle für Atherosklerose [121], Bluthochdruck [11], Herzinsuffizienz [200]. Genetische Mausmodelle ermöglichen sowohl Studien des Krankheitsverlaufs, als auch Therapiestudien und somit auch die Analyse von Nebenwirkungen [4].

1.12.1. Genetische Mausmodelle für GM-CSF

Die GM-CSF-Knockout-Maus: Die GM-CSF-defiziente Maus ist das Modell für die humane alveolare Proteinose [47;48]. Die Mäuse sind normal vital und fertil.

Beim Menschen wurde GM-CSF in normalen Koronararterien exprimiert; erhöhte GM-CSF-Level wurden im Rahmen der Atherogenese nachgewiesen [136;138]. Die glatten Muskelzellen der Tunica media exprimieren GM-CSF. In diesem konstitutivem Zelltyp reguliert GM-CSF die Expression von Typ VIII Kollagen [138].

Auf der Basis dieser Untersuchungen wurden Studien zur Bedeutung einer GM-CSF-Defizienz auf die vaskuläre EZM im Mausmodell durchgeführt. GM-CSF-

defiziente Mäuse zeigen offensichtliche Veränderungen in der EZM der Aorta. Die kollagene Matrix ist reduziert und desorganisiert. Die normalerweise parallel angeordneten Kollagenfibrillen homogenen Durchmessers sind bei der GM-CSF-Knockout-Maus desorganisiert und variabel [135]. Außerdem ist das elastische Lamellensystem drastisch reduziert, der verbleibende Rest wirkt diffus und aufgelockert [188;189].

Die GM-CSF-transgene Maus: Die GM-CSF-überexprimierende transgene Maus wurde 1987 von Lang und Mitarbeitern beschrieben [95]. Die Konzentration von GM-CSF im Serum und anderen Körperflüssigkeiten ist bei dieser Maus deutlich erhöht. Die Vitalität und Fertilität dieser Mäuse ist drastisch reduziert. Das Durchschnittsalter liegt bei 3-4 Monaten. Die Augen der Mäuse erscheinen opak und sie erblinden durch Einwanderung von Makrophagen. Der Phänotyp der GM-CSF-transgenen Maus zeichnet sich durch eine Erhöhung der Peritoneal- und Pleuralmakrophagen aus; im skelettalen Muskel treten große entzündliche Läsionen auf. Abdominale fibrotische Knoten und intra-abdominale Blutungen können auftreten [50;116]. Letzteres könnte auf einen zusätzlichen Phänotyp in der EZM hinweisen.

1.13. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird daher der Einfluss der GM-CSF-Überexpression auf die EZM der GM-CSF-transgenen Maus untersucht. Im Zentrum der Untersuchungen steht die EZM des Myokards und des kardiovaskulären Systems. Es werden die mRNA Expressions-Level der wichtigsten kardialen Kollagene, von Tropoelastin, MMPs, TIMPs, LOX und BMP-1 mittels RT-PCR ermittelt und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Entnahme und Präparation der Gewebeprobe

Im Rahmen der Arbeit wurden Gesamt-Herzen von GM-CSF-überexprimierenden Mäusen (4, 8 und 24 Wochen; n=3) verwendet. Die Herzen wurden direkt nach Entnahme sorgfältig von umliegendem Gewebe befreit, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2. mRNA-Isolierung mit dem MACS-System (Miltenyi mRNA-KIT)

Die Herzen wurden unter flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert und anschließend in Lysispuffer lysiert. Zur Unterstützung der Lyse wurden die Gewebesuspensionen auf Eis 2x für 10 s mit Ultraschall behandelt. Verbleibende unlösliche Gewebereste wurden durch Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge, 15.000 U/min, RT, 1 min) pelletiert und der Überstand auf die Zentrifugationseinheit pipettiert. Das aus der anschließenden Zentrifugation resultierende Eluat wurde mit 50 µl Oligo-dT-Microbits versetzt und gut gemischt. Dies dient zur Bindung der Poly-A-Schwänze der mRNA an die Oligo-dT-Nukleotide. Die Suspension wurde anschließend auf die Trennsäule im Magnetständer aufgetragen. Die Säule wurde 2x mit 200 µl Lysispuffer (Entfernung von Protein und DNA) und 4x mit je 100 µl Waschpuffer (Entfernung der tRNA) gewaschen. Anschließend wurde die mRNA mit DEPC-Wasser eluiert (65°C). Dabei wurde der 1. Tropfen des Eluats verworfen, da sich 90% der mRNA in den Tropfen 2-4 befinden. Die mRNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.3. Charakterisierung von Nukleinsäuren

Die isolierte mRNA wurde vor ihrer weiteren Verwendung quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte nach Maniatis *et al.* (1989) über die Bestimmung der optischen Dichte (OD). Dazu wurden die Absorptionen der in H₂O_{DEPC} gelösten und verdünnten Nukleinsäuren bei 260 nm photometrisch gemessen und die Nukleinsäurekonzentrationen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot x}{1\,000}$$

RNA: x = 40

2.4. Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion

Die Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR; *reverse transcription-polymerase chain reaction*) kombiniert die reverse Transkription (RT) von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit der anschließenden Amplifikation des resultierenden cDNA-Fragments durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Im Rahmen der Arbeit wurde diese Methode zum qualitativen und semiquantitativen Nachweis von RNA Molekülen und darüber hinaus zur quantitativen Analyse unter Verwendung eines Standards angewendet.

2.4.1. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden mRNA Proben von 10 ng mit 9 µl des RT-Mix zusammengegeben und mit H₂O_{DEPC}, auf 18 µl aufgefüllt. Diese Ansätze wurden für 10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl des RT-Mastermix wurden die Ansätze zur Transkriptionsreaktion für 1 h bei 37°C inkubiert. Mit der anschließenden Erhitzung der Ansätze auf 95°C

für 5 min wurde die Transkriptionsreaktion durch die Denaturierung der reversen Transkriptase gestoppt. Die Ansätze wurden sofort auf Eis abgekühlt und entweder direkt in der PCR verwendet, oder bei -20°C gelagert.

5x First Strand Buffer

TRIS-HCl, pH 8,3	111,1 mM
KCl	166,6 mM
MgCl ₂	6,6 mM

RT-Mastermix

<i>SuperScript</i> [™] II RT	100 U/μl
DTT	25 mM
RNase Inhibitor	4 U/μl

RT-Mix

dNTP-Mix (je dNTP)	1,1 mM
Oligo-[dT12-18]	55,5 ng/μl
<i>5x First Strand Buffer</i>	20% (v/v)
H ₂ O _{DEPC}	80% (v/v)

2.4.2. Polymerase Kettenreaktion

Mit der PCR wurden im Anschluss an die reverse Transkription spezifische cDNA-Fragmente der in Gesamt-RNA Proben zu analysierenden mRNA Moleküle amplifiziert. Die Untersuchungen verschiedener mRNA-Moleküle wurden unter Verwendung spezifischer Primerpaare und individuell erstellter PCR-Protokolle durchgeführt (siehe Tabelle 1 und 2).

Für die PCR-Reaktion wurden 1μl Aliquots der RT-Reaktionsansätze mit autoklaviertem H₂O_{bidest} und den Komponenten des für das jeweilige Primerpaar spezifischen PCR-Mastermix auf ein Gesamtvolumen von 50 μl gebracht. Anschließend wurde die PCR-Reaktion unter den für die Primerpaare

spezifischen Bedingungen im PCR-Gerät durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurden 10 µl Aliquots der PCR-Produkte in TBE-Agarose-Gelelektrophoresen (siehe 2.5.) analysiert.

PCR	<i>Upstream- und Downstream- Primer</i>
Alpha1(I) Prokollagen	L: AGG TGA ACA AGG TCC TGC TG R: GAA AGC CTC TCT CGC CTC TT
Alpha1(III) Prokollagen	L: CTA TGA CAT TGG GGG TCC TG R: TTG GTC ACT TGC ACT GGT TG
Alpha1(VIII) Prokollagen	L: TGC TCT ACA ACG GCA GAC AG R: TGT GTA CAT CAT GGG CTC GT
Tropoelastin	L: TGG GAT TCC AGA AAA AGC AC R: CTG GTG TTG GTC TTC CAG GT
MMP-2	L: GAT GGA TAC CCG TTT GAT GG R: CCA TCA GCG TTC CCA TAC TT
MMP-3	L: CAT CAC CAA TGT GCA GCT CT R: GGA AGA GAT GGC CAA AAT GA
MMP-9	L: TCG CGT GGA TAA GGA GTT CT R: ACC TGG TTC ACC TCA TGG TC
MMP-12	L: CTG GGC TTC TCT GCA TCT GT R: GTG GAA ATC AGC TTG GGG TA
TIMP-1	L: CCA GCG TTA TGA GAT CAA GAT G R: GGA TGG ATA AAC AGG GAA ACA C
TIMP-2	L: TAC CAG ATG GGC TGT GAG TG R: CTT GAT GCA GGC GAA GAA CT
Lysyloxidase (LOX)	L: TGC CAA CAC AGA GAG GAG AG R: CCA GGT AGC TGG GGT TTA CA
GAPDH	L: CCC ACT AAC ATC AAA TGG GG R: ATC CAC AGT CTT CTG GGT GG

Tabelle 1: Primersequenzen der spezifischen Matrixproteine, die bei der durchgeführten PCR zum Einsatz kamen.

PCR	Produktlänge (bp)	T (°C)	Zyklen
Alpha1(I) Prokollagen	150	58	36
Alpha1(III) Prokollagen	150	57	39
Alpha1(VIII) Prokollagen	150	57	39
Tropoelastin	150	56	39
MMP-2	150	58	36
MMP-3	150	60	39
MMP-9	150	58	36
MMP-12	150	60	36
TIMP-1	302	54	39
TIMP-2	260	53	39
Lysyloxidase (LOX)	233	58	36
GAPDH	324	58	24

Tabelle 2: PCR-Bedingungen

Nach Zugabe des Mastermix beinhaltete ein PCR-Ansatz zusätzlich zur cDNA 1 mM MgCl₂, 50 µM dNTP-Mix (je dNTP), 0,4 µM *Upstream*- und *Downstream*-Primer, 1x PCR-Puffer (20 mM TRIS-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl) und 0,5 U Taq-Polymerase.

Die Amplifikationsreaktion erfolgte im *UNO Thermocycler* der Firma Biometra (Göttingen) nach einer vorangehenden Denaturierung der Ansätze bei 94,5°C für 60 s zu den für die jeweiligen Primer ermittelten Bedingungen. Temperatur- und Zeitprofil der PCR: 30 s Denaturierung bei 94,5°C; 30 s Annealing; 20 s Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongation bei 72°C für 15 min wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt. Die zu erwartenden PCR-Produktlängen sind in der Tabelle zusammengefasst.

2.5. TAE- und TBE-Agarose-Gelelektrophorese

Die TBE-Agarose-Gelelektrophorese (1% w/v) wurde für die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten der RT-PCR-Analysen verwendet. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer bis zum vollständigen Lösen erhitzt. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde den Lösungen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugefügt. Die flüssigen Gele wurden in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gegossen und nach dem Gelieren mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die Nukleinsäuren enthaltenden Proben wurden vor dem Auftragen auf dem Gel mit H₂O_{DEPC} auf ein einheitliches Probenvolumen aufgefüllt und mit 1/5 Volumen 5x Probenauftragungspuffer versetzt. Parallel zu den Proben wurde 1 µg Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophoresen erfolgten mit ca. 13 V/cm (80 Volt) bei RT. Anschließend wurden die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren unter UV bei 320 nm visualisiert und mittels Gel-Dokumentation dokumentiert.

5x Probenauftragungspuffer

Lösung A

Glyzerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	2,5 mg/ml
H ₂ O _{DEPC}	

Lösung B

SDS	50 mg/ml
EDTA-Stammlösung	20% (v/v)
H ₂ O _{DEPC}	

Lösungen A und B 1:1 mischen

5x TBE-Puffer

TRIS	445 mM
Borsäure	445 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
pH 8,3	

In H₂O_{DEPC} lösen, pH-Wert einstellen und autoklavieren; für 1x TBE-Puffer 1:5 mit H₂O_{DEPC} verdünnen.

2.6. Herstellung von Gewebeschnitten

Die Herstellung von Gewebeschnitten kryokonservierter Proben (Schnittdicke ca. 3-5 µm) erfolgte am Kryostat bei einer Kammer- und Präparatetemperatur von -20 bis -25°C. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7. Immunhistologie

Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis von Typ VIII Kollagen und MMP-12: Für den Nachweis wurden die Objektträger vor den Markierungen kurz in PBS gewaschen, 5 min mit Methanol bei -20°C fixiert und erneut dreimal für 5 min in PBS gewaschen.

Die Markierungen erfolgten bei Raumtemperatur durch serielle Inkubationen der Objektträger mit 80-150 µl der jeweiligen Lösungen. Im ersten Schritt wurden die Schnitte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 0,5% Blockreagenz in PBS inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem in PBS mit 0,5% Blockreagenz verdünnten Primärantikörper inkubiert. Als Negativkontrollen wurden parallel zu den Markierungsexperimenten Inkubationsserien ohne Primärantikörper durchgeführt. Zum Entfernen ungebundener Primärantikörper wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Die Detektion gebundener Primärantikörper erfolgte durch

Inkubation der Schnitte für 1 h mit den in PBS mit 0,5% Blockreagenz verdünnten Sekundärantikörpern. Die Objektträger wurden anschließend dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen und zum Färben der Zellkerne für 10 min im Dunkeln mit Hoechst 33258 Kernfärbelösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS und in H₂O_{bidest} wurden die Schnitte mit Fluoromount eingedeckt. Zur Darstellung der Elastinlamellen wurde die Eigenfluoreszenz des Elastins in der Fluorescein-Anregung eingesetzt. Die Immunmarkierungsergebnisse wurden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Primärantikörper	verwendete Verdünnungen
Maus anti-Rind Typ VIII Kollagen	1:100
Kaninchen anti-Maus MMP-12	1:100

Sekundärantikörper	verwendete Verdünnungen
Esel anti-Kaninchen IgG, Cy TM 3-konjugiert	1:500
Esel anti-Maus IgG, Cy TM 3-konjugiert	1:500

Tabelle 3: Für Immunfluoreszenzmarkierungen verwendete Antikörper.

Hoechst 33258 Kernfärbelösung

Hoechst 33258 1 µg/ml

1x PBS 100% (v/v)

Hoechst 33258 in PBS lösen und bei -20°C lichtgeschützt lagern.

2.8. Histologische Färbungen

Elastika von Gieson Färbung zur Darstellung des Elastins

Zur Darstellung der Komponenten des kardialen Elastinsystems wurde die Elastika von Gieson Färbung eingesetzt. Nach Fixierung der Kryoschnitte in -20°C kaltem Methanol wurden die Schnitte in Eisenhämatoxylin nach Verhoeff für 1 h inkubiert. Zur Entwicklung der Kernfärbung erfolgte das gründliche Spülen unter fließendem Leitungswasser. Nach anschließender Differenzierung für 1-3 min in 2% Eisenchlorid-Lösung wurde die Reaktion durch Spülen in Leitungswasser bestoppt. Abschließend wurde mit Picrofuchsin-Lösung (0,05% Säurefuchsin in gesättigter wässriger Picrinsäure) für 1–3 min gegengefärbt. Die Schnitte wurden für das Eindecken entwässert und mit Rotihistokit eingedeckt.

Eisenhämatoxylin nach Verhoeff

Lösung A

Hämatoxylin	2% (w/v)
Ethanol absolut	

Lösung B

Eisenchlorid	10% (w/v)
H ₂ O	

Lösung C

Kaliumiodid	2% (w/v)
Iod	1% (w/v)
H ₂ O	

Lösungen A, B und C im Verhältnis 2,5 + 1 +1 mischen.

Picro-Siriusrot Färbung zur Darstellung der kollagenen Matrix

Nach Fixierung der Kryoschnitte in -20°C kaltem Methanol wurden die Schnitte für 7 min in Coelestinblau-Lösung (0,5 g Coelestinblau und 14 ml Glycerin in 100 ml einer 5%igen (w/v) Eisenalaun-Lösung) und danach für 7 min in Haemalaun-Lösung gefärbt. Die Differenzierung erfolgte in Salzsäure-saurem

Alkohol. Zur Bläuung erfolgte das gründliche Spülen unter fließendem Leitungswasser. Nach abschließender Inkubation in Picrosiriusrot-Lösung (0,1% Siriusrot in gesättigter wässriger Picrinsäure) für 5 min wurden die Schnitte entwässert und Rotihistokit eingedeckt.

2.9. Zymographie

Zum Nachweis und zur Lokalisierung der gelatinolytischen MMP-Aktivität im Gewebe wurde die in situ Zymographie eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit den DQTM Gelatinase Kit (Molecular Probes) nach Herstellerangaben.

Zu diesem Zweck wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer mit Reaktionspuffer gespült und erneut überschichtet und für 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit DQ-Gelatine-Lösung (0,1 ng/ml Reaktionspuffer) für 4 h bei 37°C. MMP-Aktivität führt zur Degradation der gequellten DQ-Gelatine. Durch den Abbau der DQ-Gelatine durch Gelatinasen und Kollagenasen entstehen stark fluoreszierende Peptide. Die Dokumentation des Fluoreszenzsignals erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines Computer-Dokumentationssystems.

3. Ergebnisse

3.1. Kollagene

3.1.1. Prokollagen $\alpha 1(I)$

Kollagen Typ I kommt im Körper am häufigsten vor und wird auch von Myofibroblasten gebildet. Die amplifizierten, spezifischen mRNA-Signale wurden untereinander verglichen und mit den Signalen der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) als interne Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Expression von Prokollagen $\alpha 1(I)$ wurde in verschiedenen Altersstufen insgesamt dreimal, nach 4, 8 und 24 Wochen, gemessen. Es zeigten sich zwischen den Prokollagen $\alpha 1(I)$ -Signalen von Wildtyp und GM-CSF Mäusen mit $0,94 \pm 0,07$ (WT 4 Wochen) zu $0,92 \pm 0,02$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,87 \pm 0,02$ (WT 8 Wochen) zu $0,83 \pm 0,02$ (GM-CSF 8 Wochen), $0,72 \pm 0,05$ (WT 24 Wochen) zu $0,68 \pm 0,12$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede (Abb.5).

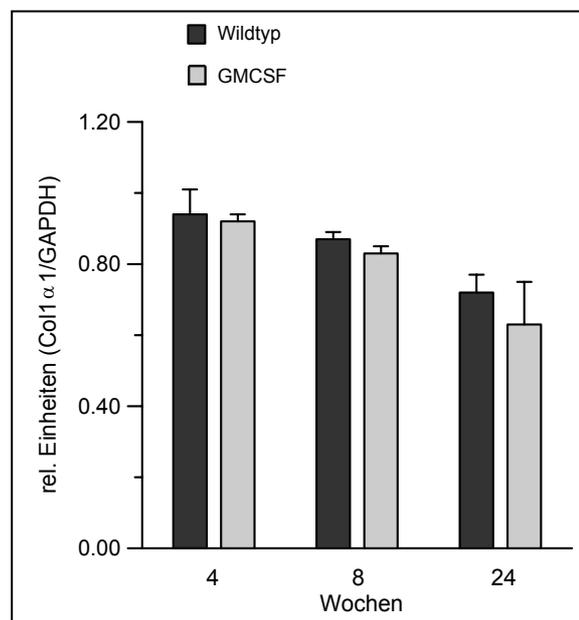


Abb. 5: Vergleich der Expression von Prokollagen $\alpha 1(I)$ (Col1 $\alpha 1$) in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen.

Prokollagen $\alpha 1(I)$ zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.1.2. Prokollagen $\alpha 1(III)$

Kollagen Typ III gehört ebenfalls zu den fibrillenbildenden Kollagenen. In den Kollagenfibrillen der Gefäßwand ist der Anteil an Typ III Kollagen sehr hoch. Die Prokollagen $\alpha 1(III)$ -Signale waren mit $0,43 \pm 0,02$ (WT 4 Wochen) zu $0,44 \pm 0,01$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,41 \pm 0,01$ (WT 8 Wochen) zu $0,42 \pm 0,03$ (GM-CSF 8 Wochen), $0,44 \pm 0,01$ (WT 24 Wochen) zu $0,46 \pm 0,03$ (GM-CSF 24 Wochen) nicht signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und GM-CSF Mäusen (Abb.6).

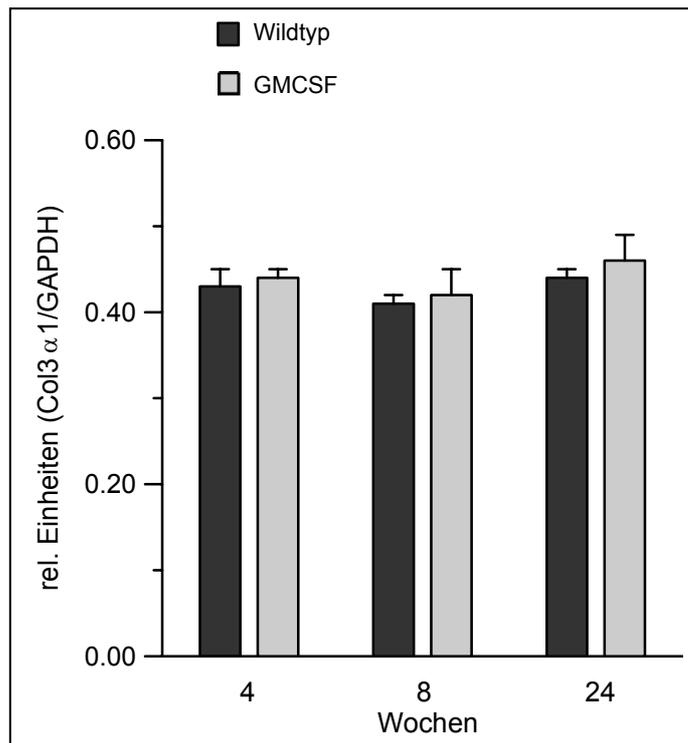


Abb. 6: Vergleich der Expression von Prokollagen $\alpha 1(III)$ (Col3 $\alpha 1$) in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. Prokollagen $\alpha 1(III)$ zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=6). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.1.3. Prokollagen $\alpha 1(\text{VIII})$

Kollagen VIII wird zu den netzförmigen Kollagenen gezählt und kommt in der Descemet-Membran des Auges und der subendothelialen Gefäßwand vor. Es wird von Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, mikrovaskulären Endothelzellen und von einigen Tumorzellen exprimiert. Die Prokollagen $\alpha 1(\text{VIII})$ -Signale zeigten mit $0,69 \pm 0,06$ (WT 4 Wochen) zu $0,71 \pm 0,04$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,69 \pm 0,02$ (WT 8 Wochen) zu $0,63 \pm 0,02$ (GM-CSF 8 Wochen), $0,64 \pm 0,03$ (WT 24 Wochen) zu $0,64 \pm 0,01$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und GM-CSF Mäusen (Abb.7).

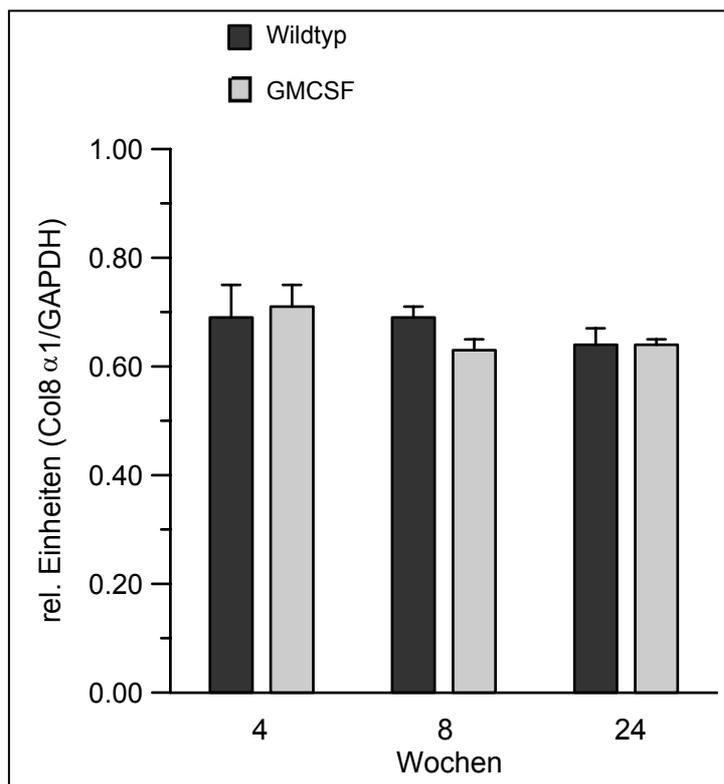


Abb. 7: Vergleich der Expression von Prokollagen $\alpha 1(\text{VIII})$ (Col8 $\alpha 1$) in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. Prokollagen $\alpha 1(\text{VIII})$ zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=6). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.1.4. Prokollagen $\alpha 2(\text{VIII})$

Die Prokollagen $\alpha 2(\text{VIII})$ -Signale waren mit $0,61 \pm 0,03$ (WT 4 Wochen) zu $0,59 \pm 0,03$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,47 \pm 0,05$ (WT 8 Wochen) zu $0,50 \pm 0,05$ (GM-CSF 8 Wochen), $0,47 \pm 0,06$ (WT 24 Wochen) zu $0,53 \pm 0,09$ (GM-CSF 24 Wochen) nicht signifikant unterschiedlich (Abb.8).

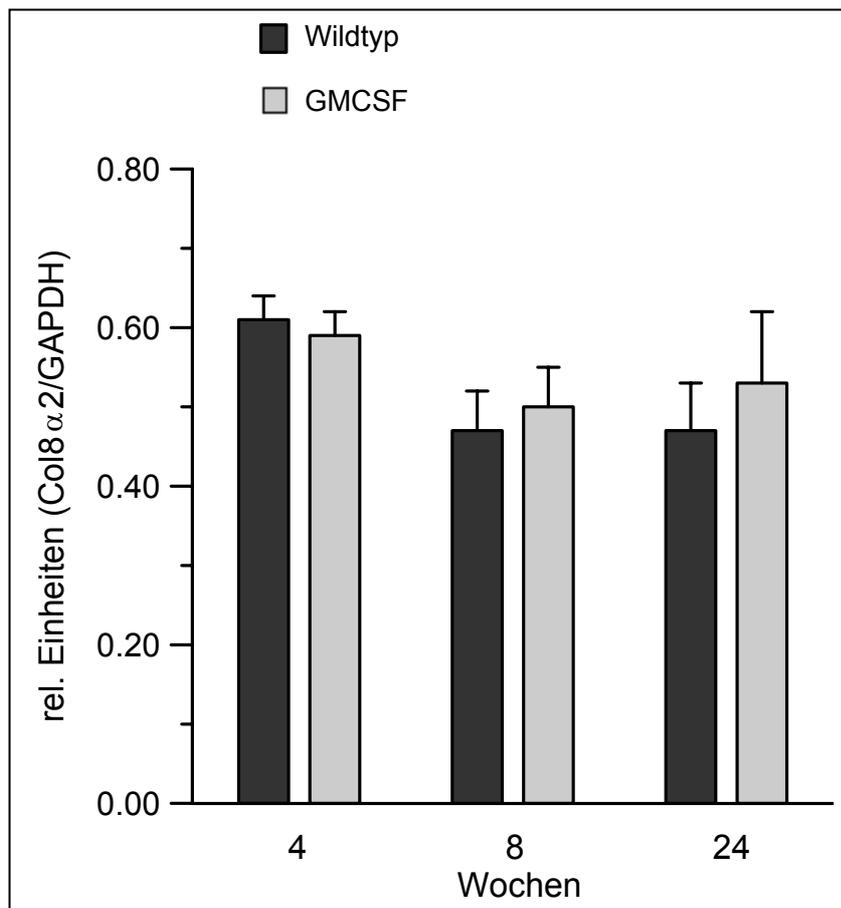


Abb. 8: Vergleich der Expression von Prokollagen $\alpha 2(\text{VIII})$ ($\text{Col}8\alpha 2$) in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. Prokollagen $\alpha 2(\text{VIII})$ zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen ($n=3$). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.2. Tropoelastin

Tropoelastin ist die Biosynthesevorstufe von Elastin und ist im Herzen in den Herzklappen und im Epi- und Endokard lokalisiert.

Die Tropoelastin-Signale zeigten mit $0,84 \pm 0,13$ (WT 4 Wochen) zu $0,90 \pm 0,02$ (GM-CSF 4 Wochen), mit $0,76 \pm 0,06$ (WT 8 Wochen) zu $0,72 \pm 0,07$ (GM-CSF 8 Wochen) und $0,60 \pm 0,05$ (WT 24 Wochen) zu $0,74 \pm 0,03$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede (Abb.9).

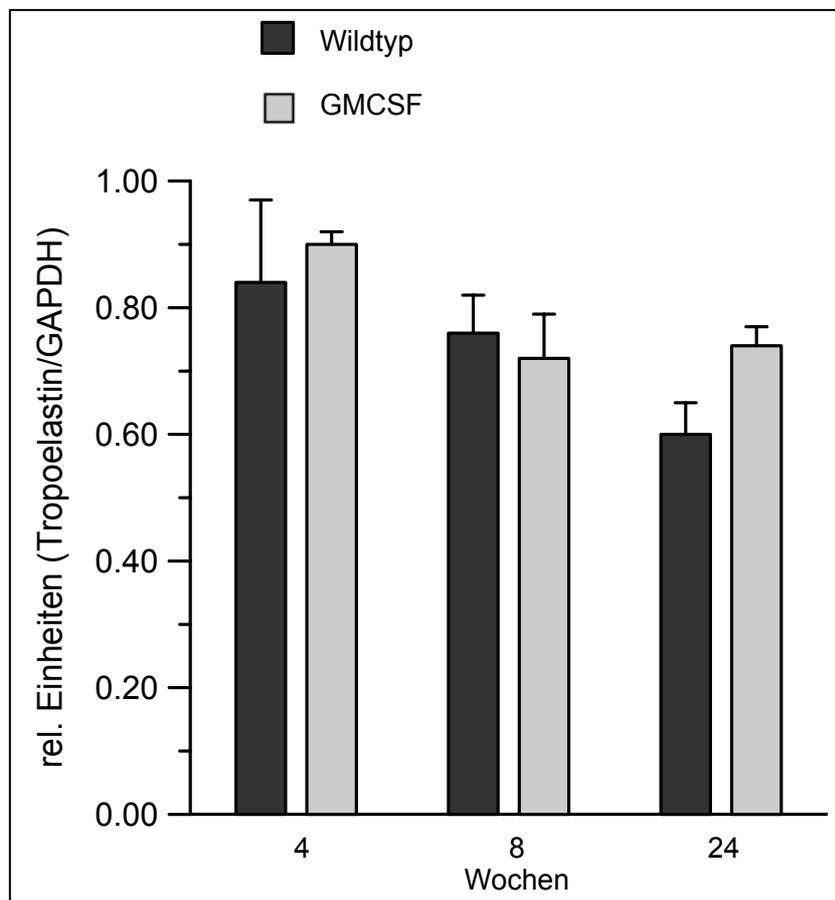


Abb. 9: Vergleich der Expression von Tropoelastin in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. Tropoelastin zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.3. Lysyloxidase

Die Lysyloxidase, eine kupferabhängige Aminooxidase, ist ein Enzym, welches die Quervernetzung von Kollagen und Elastin katalysiert.

Die Signale der Lysyloxidase zeigten mit $0,83 \pm 0,07$ (WT 4 Wochen) zu $0,66 \pm 0,04$ (GM-CSF 4 Wochen) und $0,61 \pm 0,05$ (WT 8 Wochen) zu $0,75 \pm 0,07$ (GM-CSF 8 Wochen) und $0,75 \pm 0,03$ (WT 24 Wochen) gegenüber $0,78 \pm 0,06$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und GM-CSF Mäusen (Abb.10).

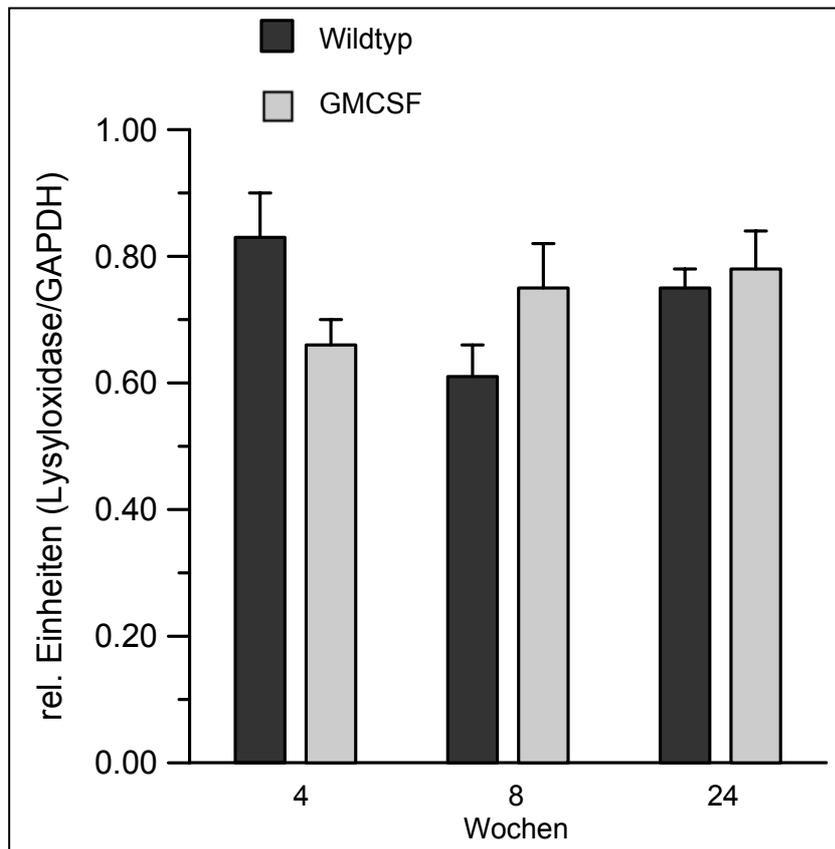


Abb. 10: Vergleich der Expression von Lysyloxidase in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. Das Enzym Lysyloxidase zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.4. Matrix Metalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen gehören zu einer Familie von bisher 28 proteolytischen Enzymen, welche durch Entzündungsreaktionen reguliert werden. MMPs spielen eine Schlüsselrolle bei der Umgestaltung und beim Abbau der extrazellulären Matrix und stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen wie Arteriosklerose und Herzinsuffizienz.

3.4.1. MMP-2

Das Enzym MMP-2 (72kDa Gelatinase A) ist weit verbreitet und hat eine Bedeutung bei der Aortenstenose und dem Tumorwachstum.

Die MMP-2-Signale zeigten mit $0,66 \pm 0,04$ (WT 4 Wochen) zu $0,71 \pm 0,03$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,68 \pm 0,01$ (WT 8 Wochen) zu $0,69 \pm 0,03$ (GM-CSF 8 Wochen), $0,71 \pm 0,03$ (WT 24 Wochen) zu $0,70 \pm 0,06$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede (Abb.11).

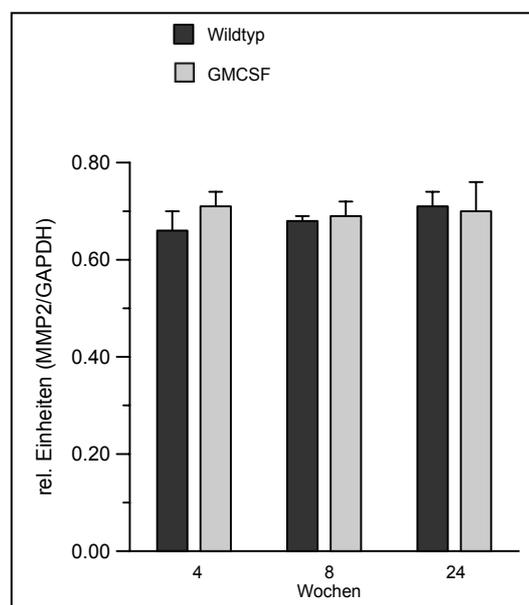


Abb. 11: Vergleich der Expression von MMP-2 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. MMP-2 zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.4.2. MMP-3

MMP-3 ist beteiligt an der Wundheilung, am Fortschreiten der Arteriosklerose und an der Tumorentstehung.

Die MMP-3 Signale zeigten mit $1,13 \pm 0,03$ (WT 4 Wochen) zu $1,22 \pm 0,05$ (GM-CSF 4 Wochen), $1,29 \pm 0,03$ (WT 8 Wochen) zu $1,13 \pm 0,03$ (GM-CSF 8 Wochen), $1,25 \pm 0,02$ (WT 24 Wochen) zu $1,45 \pm 0,11$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und GM-CSF Mäusen (Abb.12).

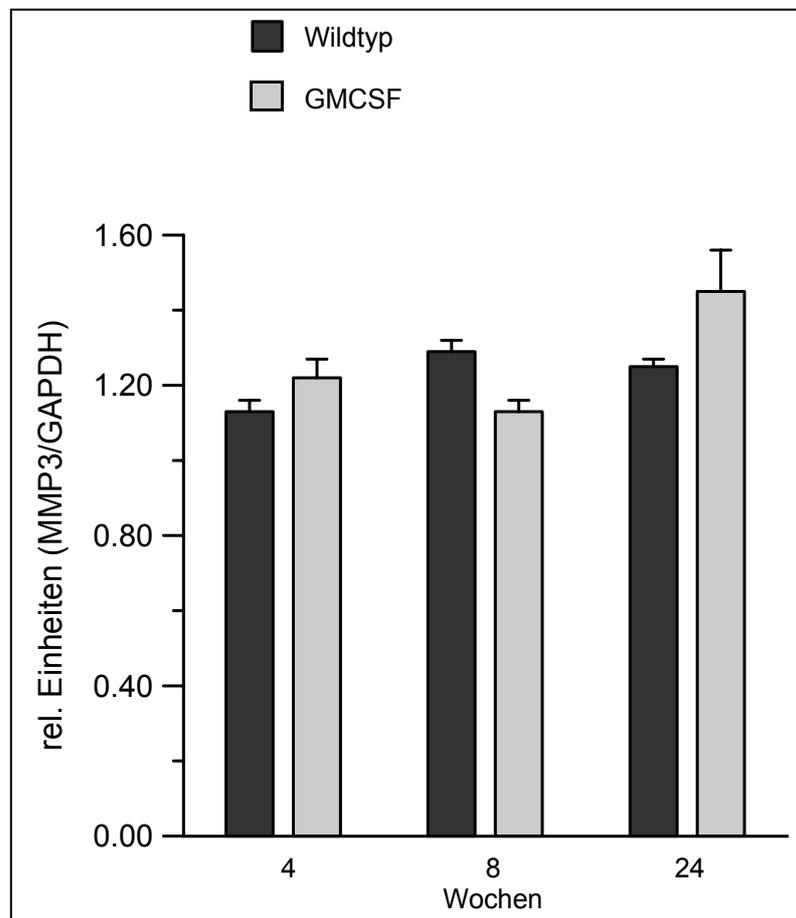


Abb. 12: Vergleich der Expression von MMP-3 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. MMP3 zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.4.3. MMP-9

MMP-9 (Gelatinase B) wird vorrangig in Monozyten und Makrophagen exprimiert.

Die Signale von MMP-9 zeigten mit $0,79 \pm 0,05$ (WT 4 Wochen) zu $0,73 \pm 0,02$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,73 \pm 0,01$ (WT 8 Wochen) zu $0,72 \pm 0,01$ (GM-CSF 8 Wochen) und $0,78 \pm 0,03$ (WT 24 Wochen) zu $0,86 \pm 0,08$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede (Abb.13).

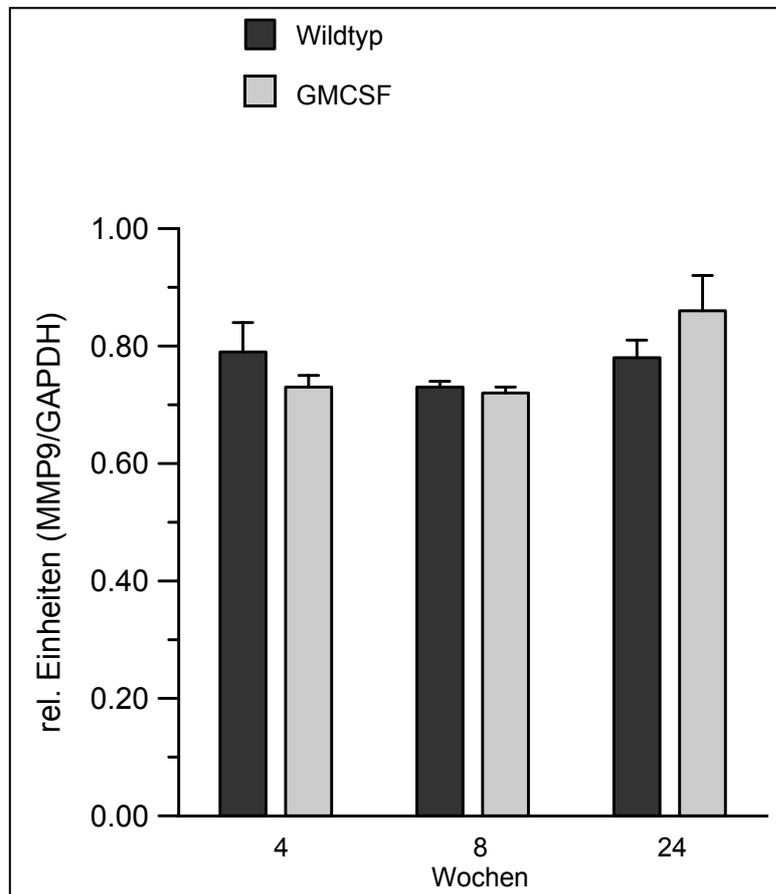


Abb. 13: Vergleich der Expression von MMP-9 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. MMP-9 zeigt keine signifikante Abnahme in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.4.4. MMP-12

MMP-12 ist eine Metalloelastase, die hauptsächlich von Makrophagen synthetisiert wird. Zu seinen bevorzugten Substraten gehört Elastin.

MMP-12 zeigte nach 4 und 24 Wochen eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate bei den GM-CSF überexprimierenden Mäusen mit $0,93 \pm 0,06$ (WT 4 Wochen) zu $1,25 \pm 0,01$ (GM-CSF 4 Wochen) und $0,96 \pm 0,02$ (WT 24 Wochen) zu $1,41 \pm 0,17$ (GM-CSF 24 Wochen). In der 8. Woche war der Unterschied mit $0,83 \pm 0,02$ (WT 8 Wochen) zu $1,03 \pm 0,09$ (GM-CSF 8 Wochen) gerade nicht mehr signifikant (Abb.14).

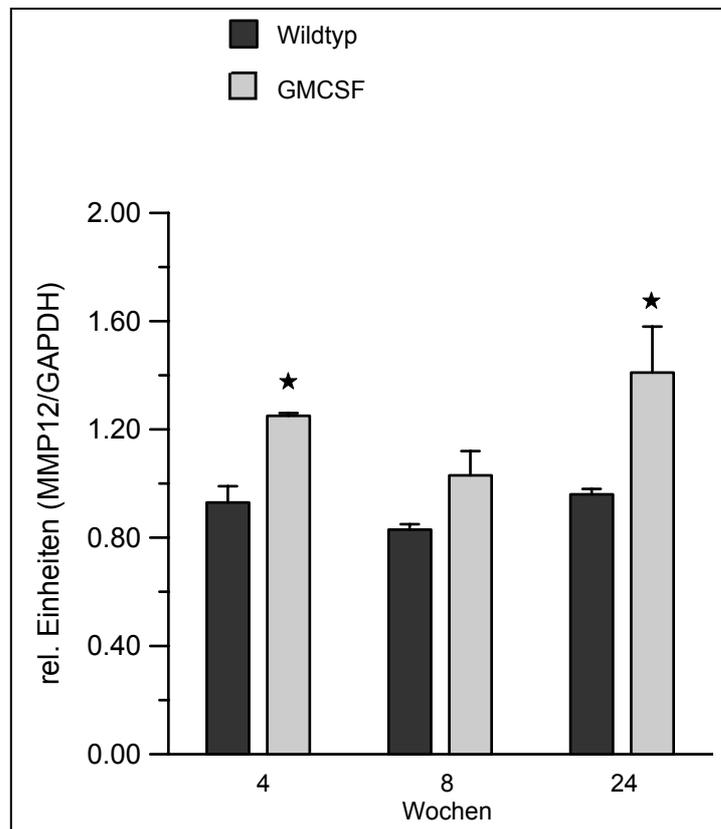


Abb. 14: Vergleich der Expression von MMP-12 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. MMP-12 zeigt nach 4 und nach 24 Wochen eine signifikante Zunahme in GM-CSF Mäusen (n=3). Der signifikante Effekt ist jeweils durch ein * gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

3.5. Gewebsspezifische Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen

TIMPs hemmen Matrixmetalloproteinasen und somit den Abbau der extrazellulären Matrix.

3.5.1. TIMP-1

TIMP-1 wird von Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten synthetisiert, besteht aus 148 Aminosäuren und hat eine Größe von 28,5 kDa. TIMP-1 kann alle MMPs inhibieren.

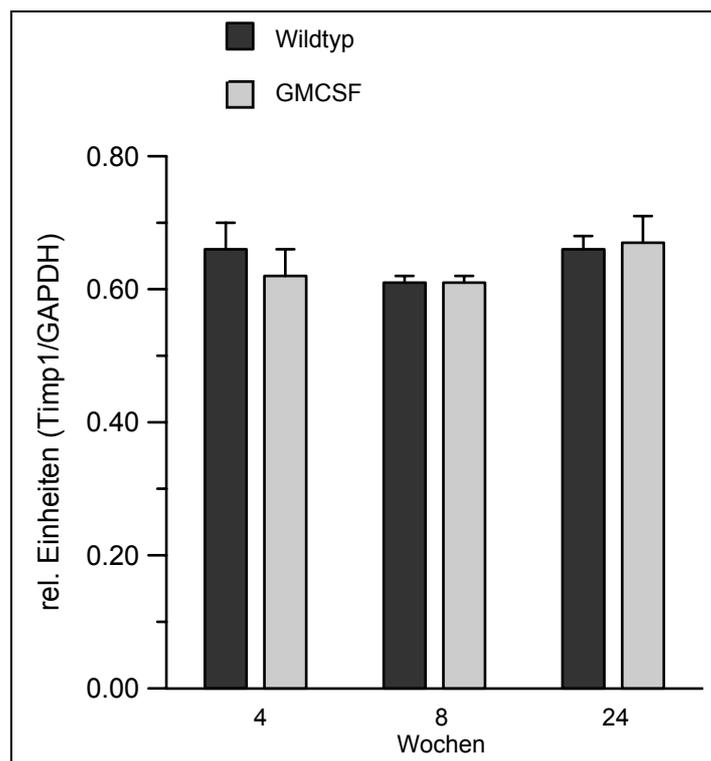


Abb. 15: Vergleich der Expression des Metalloproteinase-Inhibitors TIMP-1 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. TIMP-1 zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

Die Signale von TIMP-1 zeigten mit $0,66 \pm 0,04$ (WT 4 Wochen) zu $0,62 \pm 0,04$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,61 \pm 0,01$ (WT 8 Wochen) zu $0,61 \pm 0,01$ (GM-CSF 8 Wochen) und $0,66 \pm 0,02$ (WT 24 Wochen) zu $0,67 \pm 0,04$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und GM-CSF Mäusen (Abb.15).

3.5.2. TIMP-2

TIMP-2 ist im Vergleich zu TIMP-1 mit 21 kDa etwas kleiner, wobei die Aminosäuresequenz zu 40% identisch ist. TIMP2 kann ebenfalls alle MMPs inhibieren.

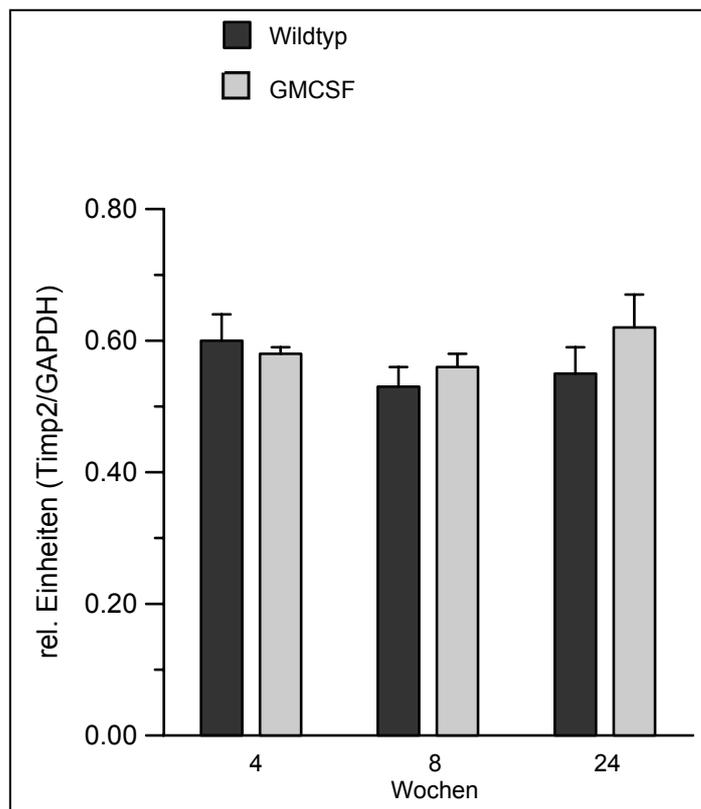


Abb. 16: Vergleich der Expression des Metalloproteinase-Inhibitors TIMP-2 in Wildtyp- und GM-CSF-überexprimierten Mäusen nach 4, 8 und 24 Wochen. Die spezifischen PCR-Signale sind gegen die interne Kontrolle (GAPDH) zur Vergleichbarkeit abgeglichen. TIMP-2 zeigt keine signifikante Veränderung in GM-CSF Mäusen (n=3). Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

Für TIMP-2 zeigte sich mit $0,60 \pm 0,04$ (WT 4 Wochen) zu $0,58 \pm 0,01$ (GM-CSF 4 Wochen), $0,53 \pm 0,03$ (WT 8 Wochen) zu $0,56 \pm 0,02$ (GM-CSF 8 Wochen) und $0,55 \pm 0,04$ (WT 24 Wochen) zu $0,62 \pm 0,05$ (GM-CSF 24 Wochen) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp und den GM-CSF-überexprimierenden Mäusen (Abb. 16).

3.6. Histologische Färbungen zur Darstellung der kollagenen Matrix und des Elastinsystems

Die Struktur und Verteilung des kardialen Elastinsystems wurde mittels Elastika von Gieson Färbung dargestellt und die der kollagenen Matrix durch Picrosiriusrot Färbung (Abb. 17).

Elastische Strukturen sind im Herzen vorrangig in der extrazellulären Matrix der kardialen Gefäße und in den Herzklappen lokalisiert, wie sich anhand der Elastinfärbung an Herzschnitten von der Wildtyp-Maus zeigen ließ.

Im Vergleich mit der Wildtyp-Maus war das kardiale Elastinsystem bei der GM-CSF-überexprimierenden Maus reduziert; die Fibrillen in den kardialen Gefäßen nicht mehr darstellbar.

Die kardiale kollagene Matrix der Wildtyp-Maus (Abb. 17: WT) weist die erwartete Struktur und Verteilung auf. Kollagen wurde in allen myzialen Strukturen (Epi-, Peri- und Endomysium), den Herzklappen und in und um die Gefäße nachgewiesen. Die Abbildung 17 (WT1&2) zeigt die kompakte kollagene Matrix im Bereich der Gefäße und im epikardialen Bereich.

Im Vergleich dazu war die kollagene Matrix im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Mäuse deutlich reduziert (Abb. 17: GM-TG1&2). Dieser Verlust an kollagener Matrix machte sich besonders markant im Bereich von Gefäßen und im Epikardium bemerkbar. Im endomysialen Bereich zeigten sich nur noch vereinzelte Anfärbungen.

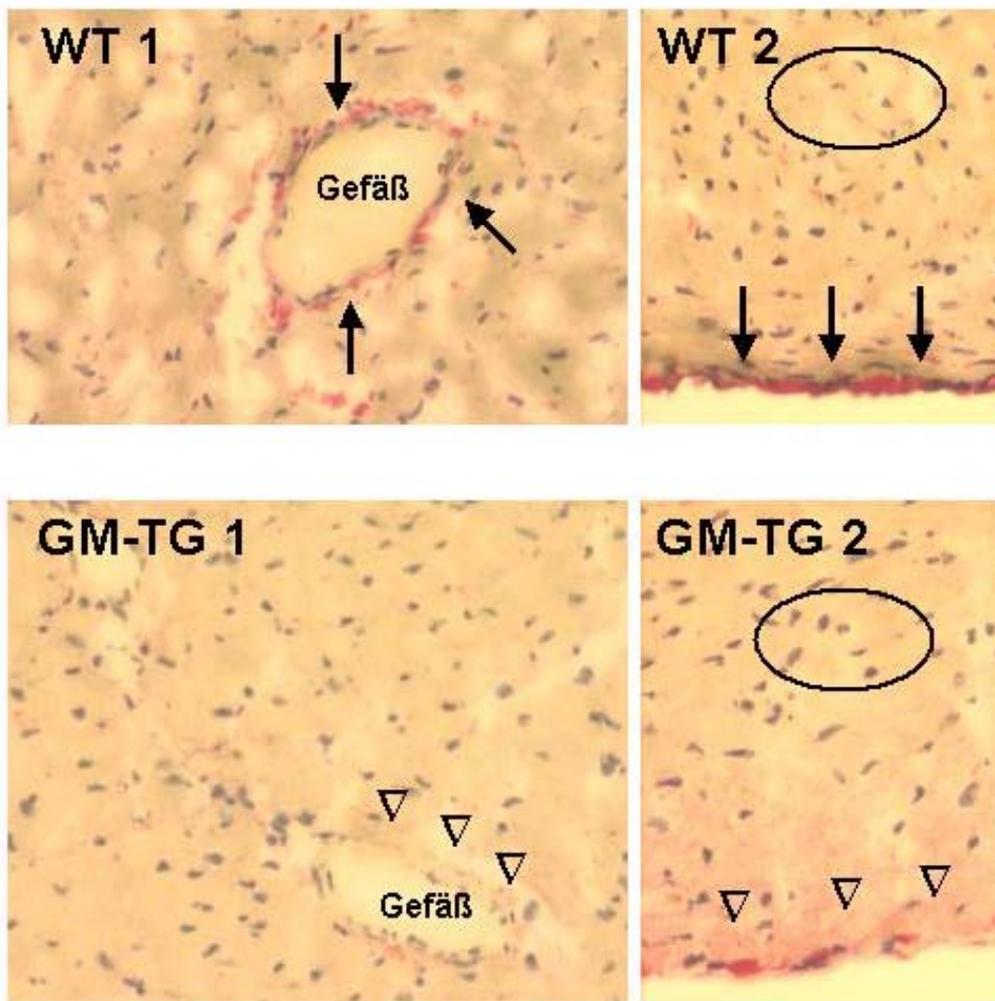


Abb. 17: Darstellung der kollagenen Matrix (rot) im Herzgewebe mittels Picro-Siriusrot-Färbung. WT1&2: Die kollagene Matrix im Myokard der Wildtyp-Maus. Depositionen von Kollagen finden sich in den endomysialen Bereichen, (1) in perivaskulären Arealen (Pfeile) und (2) im Epikardium (Pfeilspitzen). GM-TG 1&2: GM-CSF-transgene Maus. (1) Die kollagene Matrix ist massiv reduziert (Vergleich WT versus TG: offene Ellipsen). Besonders deutlich zeigt sich dies (1) im Bereich von Gefäßen (Pfeilspitzen) und (2) im Bereich des Epikards (Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: 200x

3.7. Immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation und Verteilung von MMP-12 und Typ VIII Kollagen im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus

3.7.1. MMP-12

Immunhistochemische Untersuchungen dienten zur Darstellung der Expression und Verteilung von MMP-12 im Herzen (Abb. 18).

Im Herzen von Wildtyp-Mäusen wurden nur vereinzelte MMP-12 produzierende Zellen nachgewiesen. Diese Zellen waren in Nachbarschaft von Gefäßen lokalisiert (Abb. 18: WT), wo auch ein sehr schwaches Signal in der perivaskulären Matrix nachweisbar war.

Im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus waren MMP-12-exprimierende Zellen gleichmäßig über das Myokard verteilt (Abb. 18: GM-TG1). Das Myokard wies eine sehr schwache gleichmäßige diffuse Anfärbung auf. Akkumulationen von MMP-12-positiven Zellen konnten im Bereich der Herzklappen und von Gefäßen nachgewiesen werden (Abb. 18: GM-TG2). In diesen Bereichen war auch das extrazelluläre Signal stärker.

Immunhistologien auf Parallelschnitten zum Nachweis von Makrophagen (Immunhistologien nicht gezeigt) identifizierten die stark MMP-12 exprimierenden Zellen als Makrophagen.

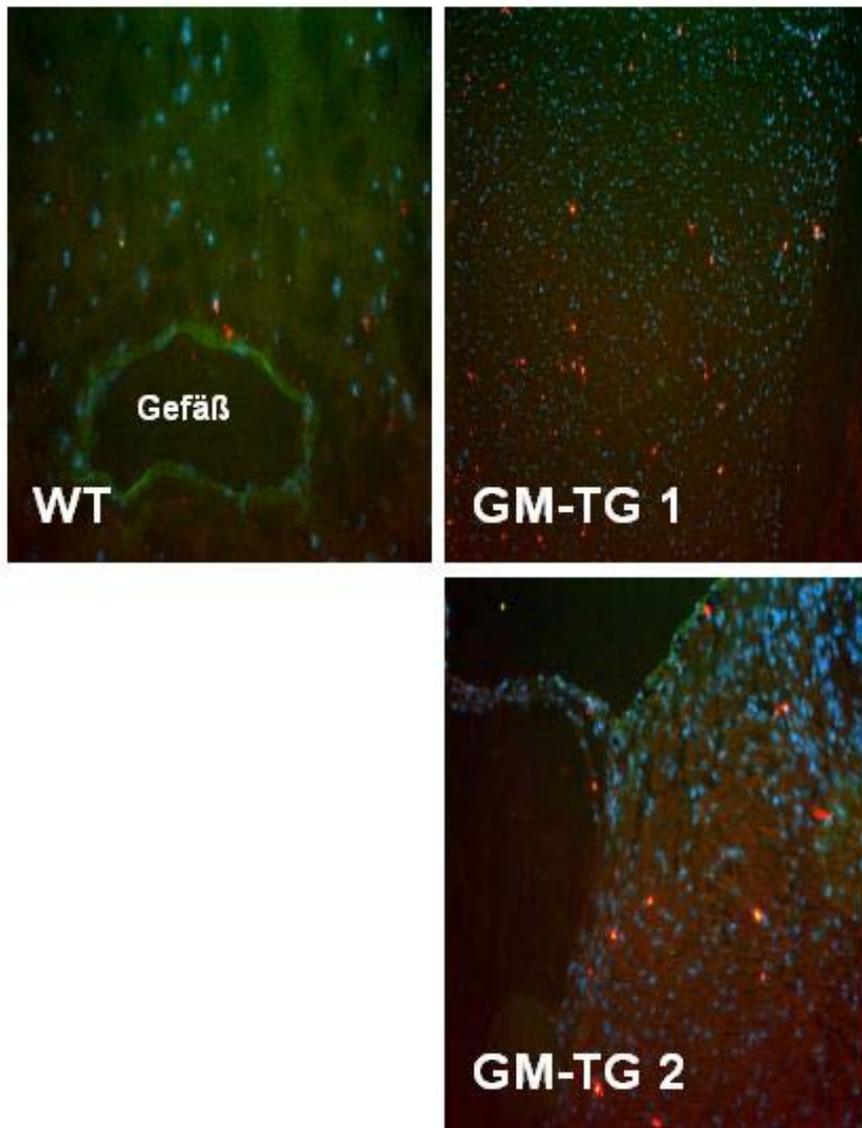


Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung der MMP-12-Expression (Rot) im Herzgewebe der Maus

WT: Nachweis vereinzelter MMP-12 exprimierender Zellen in Assoziation mit Gefäßen im Myokard der Wildtyp-Maus. Durch die Eigenfluoreszenz des Elastins in der Fluorescein-Anregung erscheinen die vaskulären Elastinlamellen grün. GM-TG 1&2: GM-CSF-transgene Maus. (1) Ein besonders starkes Signal findet sich in gleichmäßig über das ganze Herzgewebe verteilten Einzelzellen (Makrophagen). (2) Einzelzellen mit hoher MMP-12 Expression im Bereich der Herzklappen. Originalvergrößerung: WT&2: 200x; 1: 100x.

3.7.2. Typ VIII Kollagen

Immunhistochemische Analysen wurden zur Darstellung der Expression und Verteilung von Typ VIII Kollagen im Herzen eingesetzt (Abb. 19).

Im Herzen von Wildtyp-Mäusen ließ sich Typ VIII Kollagen in allen Bestandteilen des kardialen Interstitiums nachweisen. Typ VIII Kollagen war homogen über alle Bereiche des Myokards verteilt. Ein deutlich stärkeres Immunosignal zeigten die Kapillaren (Abb. 19: WT).

Die Immunoreaktion für Typ VIII Kollagen war im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus deutlich reduziert. Das endomysiale Signal war deutlich reduziert, während die perimysialen Anteile unverändert blieben. Das mit den Kapillaren assoziierte Typ VIII Kollagen fehlte vollständig (Abb. 19: GM-TG1). Einzelzellen mit hoher Typ VIII Kollagen Expression wurden im Bereich der Herzklappen und im Bereich von Gefäßen detektiert (Abb. 19: GM-TG2&3).

Immunhistologien auf Parallelschnitten zum Nachweis von Makrophagen identifizierten die stark Typ VIII Kollagen exprimierenden Zellen als Makrophagen.

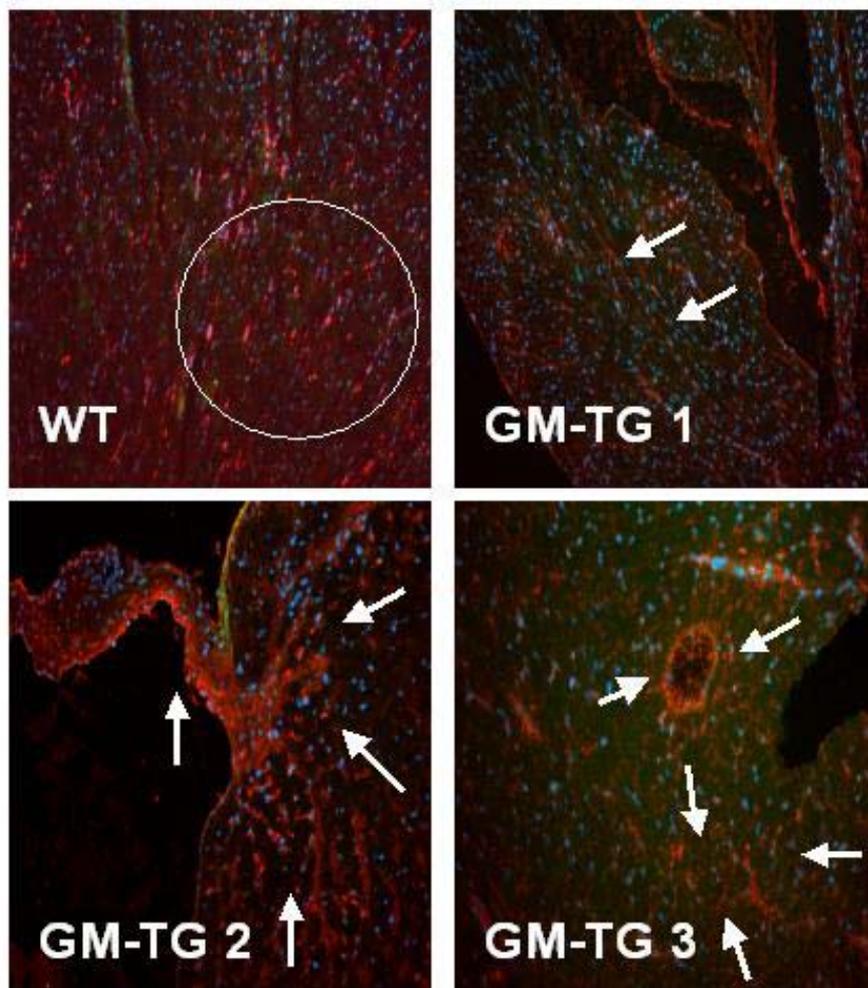


Abb. 19: Immunhistochemische Darstellung der Expression und Lokalisation von Typ VIII Kollagen (Rot) im Herzgewebe der Maus. WT: Im Myokard der Wildtyp-Maus ist Typ VIII Kollagen gleichmäßig im Endomysium verteilt. Ein starkes Immunosignal zeigen die Kapillaren (im offenen Kreis). GM-TG 1-3: GM-CSF-transgene Maus. (1) Das mit Kapillaren assoziierte Typ VIII Kollagen fehlt; das endomysiale Signal ist stark reduziert. Ein etwa stärkeres Signal für Typ VIII Kollagen wird in perimysialen Strukturen beobachtet (Pfeile). (2) Einzelzellen mit hoher Typ VIII Kollagen Expression im Bereich der Herzklappen (Pfeile) und (3) im Bereich von Gefäßen (Pfeile). Elastinfasern erscheinen durch die starke Eigenfluoreszenz im FITC-Kanal grün. Originalvergrößerung: WT&1: 100x; 2&3: 200x.

3.8. Zymographie zur Darstellung der MMP-Aktivität im Gewebe

Der Nachweis der Aktivität und der Verteilung der MMPs im Herzen erfolgte mittels in situ Zymographie (Abb. 20).

Die normale basale kardiale MMP-Aktivität zeigt die Zymographie der Wildtyp-Maus (Abb. 20: WT). Die gelatinolytische Aktivität war gleichmäßig über das gesamte Interstitium verteilt.

In Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus war die MMP-Aktivität deutlich erhöht. Ein besonders starkes Signal ließ sich im Bereich von Gefäßen und in über das ganze Myokard verteilten Makrophagen nachweisen (Abb. 20: GM-TG1). Akkumulationen von Einzelzellen, die hohe MMP-Aktivität aufwiesen, wurden im Bereich der Herzklappen und im perivaskulären Bereich lokalisiert (Abb. 20: GM-TG2&3).

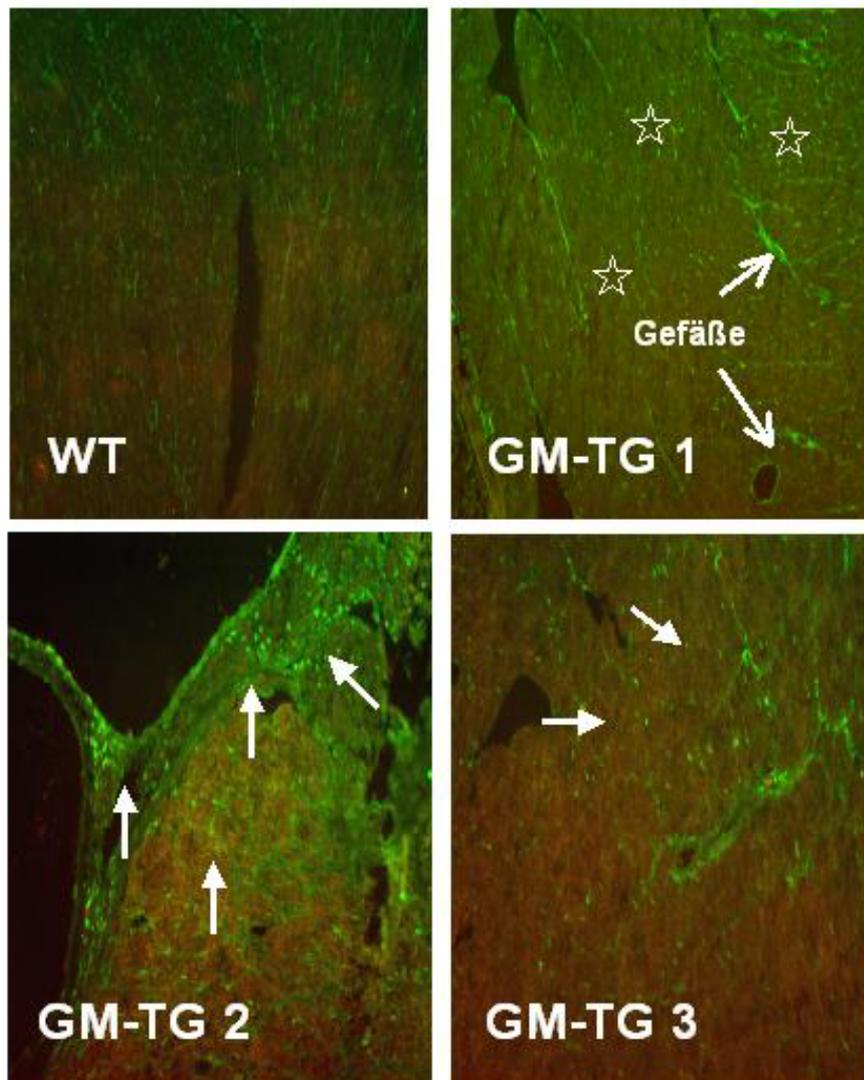


Abb. 20: In situ Zymographie zur Darstellung der MMP-Aktivität (Grün) im Herzgewebe. WT: Basale MMP-Aktivität im Myokard der Wildtyp-Maus. Es zeigt sich eine schwache gleichmäßig über das Interstitium des Myokards verteilte gelatinolytische Aktivität. GM-TG 1-3: GM-CSF-transgene Maus. (1) Die gelatinolytische Aktivität ist erhöht. Ein besonders starkes Signal findet sich im Bereich von Gefäßen (Pfeile) und in über das ganze Myokard verteilten Einzelzellen (Sterne). (2) Akkumulation von Einzelzellen mit hoher MMP-Aktivität im Bereich der Herzklappen (Pfeile) und (3) von Gefäßen (Pfeile). Originalvergrößerung: WT&1: 100x,; 2&3: 200x.

4. Diskussion

Die Aufrechterhaltung der physiologischen normalen Prozesse im Herzen, wie auch der Metabolismus der kardialen EZM, unterliegt einem komplexen, multifaktoriellen Regulationssystem, in dem auch Zytokine und Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen.

Das proinflammatorische Zytokin GM-CSF ist für seine zentrale Rolle im Regulationsnetzwerk der vaskulären EZM bekannt. Daten zur Auswirkung von Änderungen des GM-CSF-Levels auf das pathologisch unveränderte Herz wurden allerdings bisher nicht erhoben. Bisherige Studien zur Wirkung von GM-CSF auf das Herz fokussieren auf die positiven therapeutischen Effekte von GM-CSF bei Herzerkrankungen, insbesondere bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung und der Behandlung von Herzinsuffizienz [154;201].

Bekannt sind die zentrale Rolle von GM-CSF im Metabolismus der vaskulären EZM und seine Bedeutung für die Gefäßwandstruktur und –integrität [135;136;138;188]. Untersuchungen im Mausmodell zum Effekt einer GM-CSF-Defizienz auf die Gefäßwandstruktur bewiesen die immense Bedeutung des GM-CSF-Verlustes für die vaskuläre EZM [33;135;188]. So zeigte die Aorta der GM-CSF-defizienten Maus massive Veränderungen in den Hauptstrukturelementen Kollagen und Elastin. Erste Untersuchungen an GM-CSF-überexprimierenden Mäusen ergaben, dass auch bei chronisch hohen GM-CSF-Expressionslevels massive Veränderungen in der vaskulären EZM beobachtet werden können. Dies betrifft insbesondere das elastische System. Dass eine Überexpression von GM-CSF auch zu Veränderungen der kardialen EZM führt, also den Metabolismus der kardialen EZM oder das kardiale strukturelle *Remodeling* beeinflusst, zeigt die vorliegende Arbeit.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zur Expression von Molekülen der kardialen EZM in GM-CSF-überexprimierenden Mäusen ergaben, dass erhöhte GM-CSF-Level auch eine Wirkung auf die EZM des

Herzens ausüben. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass im Vergleich zur deutlich breiteren Wirkung auf die Moleküle der vaskulären EZM (Müller, laufende Dissertation), die primäre Wirkung der GM-CSF-Überexpression im Herzen auf einen sehr engen Bereich der EZM begrenzt bleibt. Kein Effekt ließ sich auf die mRNA-Expression der Hauptstrukturmoleküle Kollagen und Tropoelastin sowie von Molekülen der Kollagen/Elastin-Quervernetzung nachweisen. Von bekannten herzwirksamen Matrixmetalloproteinasen reagierten weder die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, noch MMP-3 (Stromelysin) auf die GM-CSF-Überexpression. Von allen untersuchten Matrixmolekülen war einzig die Expression der Metalloelastase MMP-12 im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Mäuse deutlich erhöht. Mittels in situ Zymographie wurde eine massive Steigerung der MMP-Aktivität festgestellt. Dies spiegelte sich in einer Degeneration der Elastase-abbaubaren kollagenen Matrix und dem Abbau von Elastinfibrillen wieder.

Im Folgenden wird daher der Effekt erhöhter MMP-12-Level im Herzen und im Gefäßsystem diskutiert, der Zusammenhang zwischen GM-CSF, MMP-12 und Typ VIII Kollagen herausgearbeitet, die möglichen Auswirkungen von hohen GM-CSF-Levels und gesteigerter MMP-12 Aktivität auf die kardiale EZM – im Speziellen auf Kollagen und Elastin - dargestellt und den therapeutischen Ansätzen von GM-CSF zugrunde liegende Mechanismen diskutiert.

4.1. MMP-12 Expression im Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Maus

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass über den gesamten Beobachtungszeitraum (4 Wochen bis 6 Monaten) die Herzen der GM-CSF-überexprimierenden Mäuse eine deutlich erhöhte Expression der neutrophilen Metalloelastase MMP-12 und hohe gelatinolytische Aktivität (Kollagenolyse und Elastolyse) zeigten. In den folgenden beiden Kapiteln soll deshalb dargestellt werden, im Rahmen welcher Herzerkrankungen, aber auch im Rahmen von welchen kardialen Gefäßerkrankungen bisher erhöhte MMP-12-Spiegel nachgewiesen worden sind. Bezeichnenderweise sind viele dieser Krankheitsbilder auch mit einer erhöhten GM-CSF-Expression in Gewebe oder erhöhten GM-CSF-Plasmakonzentrationen verbunden [117;139;139]

4.2. MMP-12 und Herzerkrankungen

Verschiedene tierexperimentelle Ansätze und Studien in Patientenkollektiven zeigten eine vermehrte Expression von MMP-12 – im Serum oder im Myokard – bei Myokarditis, Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt und Transplant-Dysfunktion. Für diese kardialen Krankheitsbilder ist bekannt, dass sie mit einer erhöhten Gewebeexpression oder auch Plasmakonzentration von GM-CSF einhergehen.

Myokarditis

Mäuse mit Coxsackievirus-induzierter Myokarditis zeigten eine erhöhte Expression von MMP-12 [34] im Myokard. In der frühen akut inflammatorischen Phase nach Virusinfektion geht die vermehrte Expression und Aktivierung von elastolytischem MMP-12 mit einem massiv gesteigerten *Remodeling* der kardialen EZM und Kollagenakkumulation einher [33;60]. In der chronischen Phase resultiert die hohe MMP-12-Aktivität in fortgesetztes maladaptives

Remodeling (die kollagene Matrix wird rissig), welches zu dilatativer Kardiomyopathie und letztlich zu Herzinsuffizienz führen kann.

Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz

Untersuchungen im Hundemodell für dilatative Kardiomyopathie zeigten eine erhöhte Expression von neutrophiler Elastase (= MMP-12) im Myokard [60]. Interessanterweise wird die Prädisposition der Rasse Dobermann Pinscher für dilatative Kardiomyopathie mit einer erhöhten kardialen MMP-Aktivität in Zusammenhang gebracht.

Chronisch herzinsuffiziente Mäuse zeigen eine erhöhte ventrikuläre MMP-12 mRNA Expression [127]. Dementsprechend weisen Patienten mit nicht-ischämischer und ischämischer Kardiomyopathie mit reduzierter linksventrikulärer Funktion (Auswurfraction: < 50%) im Plasma erhöhte Elastase-Konzentrationen auf [145]. Über die myokardiale Expression von MMP-12 im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz beim Menschen liegen bisher keine Daten vor.

Herzinfarkt und ischämische Kardiomyopathie

MMP-12 wird vermehrt in infarziertem humanem Herzgewebe exprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass im humanen Infarktgewebe Herzfibroblasten und nicht wie üblich Makrophagen die Hauptproduzenten der MMPs sind. In dieser Studie werden nicht nur die Auswirkungen der primären elastolytischen Funktion von MMP-12 dargestellt, sondern neutrophile Elastase wird als Aktivator latenter myokardialer MMPs bei ischämischer Kardiomyopathie diskutiert [174].

Im Ischämie/Reperfusion-Modell der Ratte wirken Serinprotease-Inhibitoren stark kardioprotektiv. Diese kardioprotektive Wirkung wird zum einen durch ihre primäre Wirkung – die Inhibition von Proteasen – aber auch sekundär durch die Inhibition der Akkumulation von inflammatorischen Zellen im Myokard vermittelt [104;118]. Demgegenüber wird im Kaninchen Herzinfarkt-Modell die kardioprotektive Wirkung (Reduzierung der Infarktgröße) des Elastaseinhibitors SS69071 allein auf die Inhibition der kardialen Elastase zurückgeführt [19].

Transplant-Dysfunktion

Tierexperimentelle Studien belegen, dass niedrige Expressionslevel von MMP-12 kardioprotektiv sind. So zeigten bei heterologer Herztransplantation die implantierten Herzen bei CCR5-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine geringere MMP-12 Expression (auch MMP-3 und MMP-13), weniger *Matrix-Remodeling* und damit eine deutlich bessere Myokardarchitektur und eine längere Überlebensdauer. Zusätzlich wiesen diese Mäuse in heterolog transplantierten Carotiden eine reduzierte Neointimabildung auf. Aus ihren Daten schließen die Autoren, dass in ihrem Transplant-Arteriosklerose-Modell das frühe degradative kardiale *Remodeling* ein kritischer Prozess für die Ausbildung einer chronischen Transplant-Dysfunktion ist [104].

4.3. MMP-12 und Gefäßerkrankungen des Herzens

Verschiedene tierexperimentelle Ansätze und Studien in Patientenkollektiven zeigten eine vermehrte Expression von MMP-12 – im Serum oder in der Gefäßwand - bei unterschiedlichen Gefäßerkrankungen. So werden erhöhte MMP-12-Level im Rahmen der koronaren Atherosklerose, in venösen Bypass-Grafts, bei Aneurysmen und bei Vaskulitiden beobachtet.

Koronare Herzerkrankung

MMP-12 wird als lohnendes Ziel für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Prävention der Plaqueruptur und damit des plötzlichen Herztodes betrachtet [77]. Während MMP-3 und -9 eher atheroprotektive Funktionen ausüben, wird durch MMP-12 die Plaqueprogression und Plaquestabilisation gefördert [78]. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung finden sich erhöhte Spiegel von MMP-12 im Plasma. Eine Therapie mit Statinen verringert bei diesen Patienten die MMP-12 Spiegel [81].

Plaques hypercholesterinämischer Kaninchen zeigen eine stark erhöhte Expression von MMP-12. Hauptproduzenten sind schaumzellige Makrophagen [113].

Bypass

Unter Cholesterindiät wird im Kaninchen Bypass-Modell ein expansives Remodeling der venösen Bypass-Grafts beobachtet. Dies wird auf die stimulierte frühe Makrophageninfiltration und eine erhöhte Expression von MMP-12 zurückgeführt [196].

Aneurysma

Ein klarer Zusammenhang besteht zwischen hohen MMP-12-Levels und Aneurysmen.

Beim abdominalen Aortenaneurysma führt die chronische Entzündung zur Akkumulation von MMP-12 exprimierenden Makrophagen und damit zur Elastolyse [7;40]. Die Inhibition der Aneurysmabildung durch Statine erklärt sich aus ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften und der Verhinderung des maladaptiven *Remodelings*. Statine inhibieren proinflammatorische Mediatoren. Die Folge ist eine Inhibition der Makrophagen-Rekrutierung in die Gefäßwand und damit keine Erhöhung der MMP-12-Expression [160]. Im Tiermodell schützt die Defizienz von MMP-12 ApoE-defiziente Mäuse vor medialer Matrixdegeneration und Aneurysmabildung [105]. MMP-Inhibition bei MMP-12-überexprimierenden LDL-R-defizienten Mäusen führte zur Verringerung der Elastolyse in der Aorta, während das Ausmaß der Atherosklerose unbeeinflusst blieb [140]. Interessanterweise sind Polymorphismen der Promoterregion MMP-12 nur mit aortalen Aneurysmen, aber nicht mit der Ausbildung koronarer Aneurysmen assoziiert [94].

Vaskulitis

Patienten mit koronarer Vaskulitis und damit verbundener Matrixdegeneration zeigen eine erhöhte Elastase-Konzentration im Plasma. Dies konnte für

Patienten mit Kawasaki-Syndrom [155;156] und *giant cell arteritis* [59;76] nachgewiesen werden.

4.4. Die zellulären Hauptproduzenten von MMP-12: Inflammatorische Zellen

MMP-12 wurde ursprünglich aus Mausmakrophagen isoliert [191], als neutrophile Elastase charakterisiert und wird in Geweben vorrangig von Makrophagen produziert. Auch die bereits beschriebenen mit einer erhöhten MMP-12 Aktivität einhergehenden kardialen oder vaskulären Erkrankungen sind mit chronischen oder akuten Entzündungsprozessen assoziiert. Dabei kommt es zur Infiltration und Akkumulation von Entzündungszellen. Serumuntersuchungen und Expressionstudien zeigen deutlich erhöhte Level von MMP-12.

Welche Auswirkungen die GM-CSF-Überexpression auf die Makrophagen-Infiltration und MMP-12-Expression im Herzen hat, darüber lagen bisher noch keine Daten vor. Wie die vorliegenden immunhistochemischen Studien zeigen, weist das Herz der GM-CSF-überexprimierenden Maus eine vermehrte Infiltration von Makrophagen auf, die im Interstitium häufig in Assoziation mit Gefäßen beobachtet wurden. Diese Makrophagen sind die Hauptproduzenten von MMP-12. Damit weisen die Untersuchungen nach, dass die im Herzen der GM-CSF-transgenen Maus nachgewiesene erhöhte Produktion von MMP-12 vorrangig auf der Akkumulation von inflammatorischen Zellen beruht.

Verschiedene immunhistologische Befunde liegen vor, die Makrophagen als Produzenten von MMP-12 im Gefäßsystem zeigen. Tierexperimentelle Studien an Kaninchen demonstrierten, dass in der atherosklerotischen Plaque MMP-12 von Makrophagen sezerniert wird [113]. MMP-12-transgene hypercholesterolämische Kaninchen zeigen eine vermehrte Bildung atherosklerotischer Plaques in Koronararterien. In diesen Plaques ist die

Makrophageninfiltration erhöht, es wurden Elastolyse und die Bildung Aneurysma-ähnlicher Strukturen nachgewiesen [100].

4.5. Das Zusammenspiel von GM-CSF und MMP-12

GM-CSF und MMP-12 entstammen zwar ganz unterschiedlichen Funktionsbereichen – Hämatopoese und EZM - sind aber auf das Engste miteinander verknüpft. GM-CSF ist ein proinflammatorisches Zytokin, es ist ein potentes Chemoattraktanz für inflammatorische Zellen [55;56] und spielt eine große Rolle bei der Regulation der vaskulären EZM [135;136;138;188]. MMP-12 ist ein elastolytisches Enzym, das im Rahmen von entzündlichen Prozessen hauptsächlich von inflammatorischen Zellen sezerniert wird [120].

Akute und chronische inflammatorische Prozesse sind generell durch die Immigration von Entzündungszellen in ein Gewebe gekennzeichnet, welche wiederum an Gefäße und Kapillaren gebunden ist. Eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen in der Nachbarschaft von Gefäßen oder auch in der Adventitia von Gefäßen und in Kapillaren ist daher auch für entzündliche Herz- und Gefäßerkrankungen beschrieben.

Unsere Untersuchungen weisen nach, dass bei der GM-CSF-transgenen Maus auch im Myokard die Anzahl der Makrophagen erhöht ist. MMP-12 exprimierende Makrophagen finden sich im kardialen interstitiellen Raum, vorrangig in der Nachbarschaft von Gefäßen und Kapillaren sowie in den Herzklappen. Dies deutet auf einen chronisch entzündlichen Prozess im Herzen des untersuchten Mausmodells hin. Unsere Studien am Herzen der GM-CSF-transgenen Maus zeigen weiterhin, dass MMP-12 von den eingewanderten Makrophagen produziert und sezerniert wird. Ob dabei MMP-12 und GM-CSF die Infiltration der Makrophagen gemeinsam vermitteln oder die MMP-12-Produktion erst nach Infiltration stimuliert wird, kann im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht geklärt werden.

Eine Reihe von Studien zeigt, dass GM-CSF die Expression von MMP-12 in Makrophagen reguliert. In kultivierten humanen Monozyten und Makrophagen stimuliert GM-CSF die Expression von MMP-12. So konnten Wu und Mitarbeiter zeigen, dass Monozyten MMP-12 erst nach Aktivierung mit GM-CSF exprimieren, während Makrophagen MMP-12 spontan exprimieren. Allerdings kann auch in diesen Zellen die Expression von MMP-12 durch GM-CSF-Behandlung noch weiter stimuliert werden. Aus ihren Experimenten schließen sie, dass die Expression von MMP-12 in Monozyten/Makrophagen vom Stadium der Zelldifferenzierung abhängig ist [197;198].

Checkerboard-Analysen mit kultivierten Monozyten und Makrophagen der Maus zeigten, dass GM-CSF ein potentes Chemoattraktanz für diese Zelltypen ist [55;56]. Bei Mäusen, die das proinflammatorische Zytokin GM-CSF überexprimieren, ist deshalb die Anzahl der Peritonealmakrophagen und auch die von Gewebemakrophagen stark erhöht [95]. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, gilt dies auch für das Herz.

Im vorgeschädigten Myokard führt die GM-CSF-vermittelte Akkumulation von Makrophagen zu Gefäßbildungsprozessen [28;151;154]. Ob dies auch für das nicht vorgeschädigte Herz der GM-CSF-überexprimierenden Maus zutrifft, konnte anhand der derzeitigen vorliegenden Daten am nicht vorgeschädigten Herzen nicht endgültig geklärt werden.

4.6. GM-CSF und MMP-12 und Vaskularisierung

GM-CSF und MMP-12 werden beide mit der Angiogenese, Arteriogenese und Neovaskularisierung nach Gefäßverschlusskrankheiten in Verbindung gebracht [5;6;151;152;154]. Während unsere Untersuchungen eine gesteigerte Makrophageninfiltration im Herzen der GM-CSF-transgenen Maus ergaben, konnte eine verstärkte Vaskularisierung nicht nachgewiesen werden.

GM-CSF gilt als potenter arteriogener Faktor, der über die Amplifikation der Monozytenfunktionen – Attraktanz, Migration und Aktivierung – wirkt [27;28] und als Mobilisator von Stammzellen dient [41]. Verschiedene klinische Studien zeigten zunächst die positive Wirkung von GM-CSF auf die Kollateralarterienbildung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, Schlaganfall und akutem Myokardinfarkt [41;70;154]. Allerdings wurde in einer Folgestudie an Patienten mit koronarer Herzerkrankung in der Behandlungsgruppe eine erhöhte Infarktneigung beobachtet [202], was die Sicherheit von GM-CSF als Medikament in Frage stellt. Auch Deng und Mitarbeiter bezeichnen die GM-CSF Therapie beim akuten myokardialen Infarkt als zweischneidiges Schwert. Zum einen kann sie effektiv die Stammzellen in das periphere Blut mobilisieren und vorteilhaft auf entzündliche Zytokine und Monozyten/Makrophagen einwirken. Dies stimuliert die Angiogenese, verbessert die Herzfunktion und verhindert *adverses Remodeling*. Auf der anderen Seite kann sich der entzündliche Prozess ins Negative umkehren, was zur Exazerbation der Entzündung und Gewebeverletzung und zur Erhöhung der myokardialen Steifheit führen kann [41]. Eine klinische Studie (START) zum Effekt von GM-CSF auf periphere Verschlusskrankheiten wurde wegen fehlendem Effekt abgebrochen [177;178].

Dies verdeutlicht einmal mehr, dass **vor** dem klinischen Einsatz von zugelassenen Medikamenten in neuen Anwendungsfeldern umfassende experimentelle Studien durchgeführt werden müssen und nicht umgekehrt.

In vivo und in vitro ist die Angiogenese und Neovaskularisierung von Geweben mit der Migration von Monozyten/Makrophagen mittels MMP-12-abhängiger Tunnelbildung assoziiert [6]. Der anti-angiogene Effekt von Neovastat basiert unter anderem auf seiner inhibitorischen Wirkung auf MMP-12 [51].

Die Regulation von arteriogenen Faktoren, wie MMP-12, durch GM-CSF wurde von Jost und Mitarbeitern (2003) herausgearbeitet [80]. In dieser Studie wurde das Potenzial von aus dem Knochenmark isolierten Makrophagen zur Stimulierung des Wachstums von Kollateralarterien anhand der Stimulierung der MMP-12 Expression nach GM-CSF-Behandlung nachgewiesen.

Im Tiermodell und bei Tumorpatienten reduziert die Blockade von GM-CSF die Makrophagenrekrutierung, die MMP-12 Expression und die Angiogenese [2;129]. Auch aus dem Bereich der Onkologie wird allerdings ein genau entgegengesetzter Effekt von MMP-12 auf die Angiogenese beschrieben. MMP-12 generiert Angiostatin – einen Angiogenese-Inhibitor - aus Plasminogen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Expression von MMP-12 in peritumoralen Bereichen die Angiogenese und Tumorwachstum begrenzt [31].

Dass unsere Untersuchungen keine erhöhte Vaskularisierung des Herzens nachweisen konnten, kann verschiedene Gründe haben. Die Daten könnten darauf hinweisen, dass eine Vorschädigung des Herzens Voraussetzung für die Vaskularisierung ist oder auch, dass es zu einer MMP-12-vermittelten Produktion von Angiogenese-Inhibitoren kommt.

4.7. MMP-12 und die kardiale extrazelluläre Matrix

MMP-12 besitzt neben seiner elastolytischen Aktivität auch kollagenolytische Eigenschaften. Während fibrilläre Kollagene und Typ IV Kollagen resistent gegenüber dem Abbau durch neutrophile Elastase sind, wird Typ VIII Kollagen vollständig durch Elastase degradiert [90].

4.7.1. Effekt von MMP-12 auf das kardiale Elastin

Im Herzen findet sich Elastin hauptsächlich in den Herzklappen und im elastischen System des kardialen Gefäßsystems [96]. Elastolyse führt zu einer Verformung der Aortenklappen. Die Klappen sind weniger dehnbar und die Steifheit nimmt zu [97]. In den Koronararterien mündet die erhöhte Elastase-Aktivität in Matrixdegeneration, Aneurysmabildung und Plaqueruptur [66].

Bisher fokussierten Studien an genetischen Mausmodellen für GM-CSF-Mäuse auf den vaskulären Effekt und zeigten deutliche Veränderungen im Elastinsystem von Gefäßen. In der Aorta der GM-CSF-defizienten Maus ist das Elastinsystem hypertrophiert und die Tropoelastin-Expression deutlich reduziert [135;188]. Die Aorta von GM-CSF-überexprimierenden Mäusen zeigt ein deutlich reduziertes Elastin-System (Müller, laufende Dissertation).

Die vorliegende Studie zur kardialen EZM der GM-CSF-überexprimierenden Maus zeigt, dass auch das Elastinsystem des Herzens betroffen ist. Während sich kein Effekt auf die Gesamtexpression von Tropoelastin-mRNA im Herzen nachweisen ließ, zeigte sich doch ein sekundärer Effekt auf der Proteinebene. Durch die erhöhte MMP-12-Expression kommt es zu einer Elastolyse im Herzen. Betroffen durch den erhöhten kardialen Elastinabbau sind die Herzklappen und die Gefäße. Das Ausmaß der Elastolyse im Herzen ist aber deutlich schwächer ausgeprägt, als in der Aorta der GM-CSF-überexprimierenden Maus. Dies ist sicherlich auch darauf zurückzuführen, dass die Elastinsysteme von elastischen (Aorta) und muskulären Arterien (Herzgefäße) deutliche Unterschiede aufweisen.

Bisherige Studien belegen, dass erhöhte Elastase-Aktivität im Herzen sich vorrangig auf die strukturelle Integrität der Herzklappen auswirkt. Stenotische Aortenklappen weisen eine erhöhte Expression und Aktivität von elastolytischen Enzymen, wie Cathepsin S, K und V auf [65]. In Mukopolysaccharidose Mäusen führt die erhöhte Transkription und Enzymaktivität von MMP-12 zu valvulärer Insuffizienz und führt zu kardiovaskulären Erkrankungen [106]. Außerdem bewirkt eine Elastasebehandlung von Meerschweinchen Papillarmuskel den Abbau von Elastinfibrillen und eine Reduzierung der Ruhespannung [150]. Interessanterweise zeigt die vorliegende Studie eine Akkumulation von MMP-12 exprimierenden infiltrierenden Zellen im Bereich der Herzklappen. Dies könnte auf eine verringerte strukturelle Integrität der Herzklappen bei der GM-CSF-transgenen Maus hinweisen.

4.7.2. Effekt von MMP-12 auf die kollagene Matrix

Wie Studien von Kittelberger und Mitarbeitern nachwiesen, wird Typ VIII Kollagen nach 4 Stunden vollständig von Elastase degradiert und zeigt eine partielle Degradation schon nach 15 Minuten [90]. Typ VIII Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der vaskulären und kardialen kollagenen Matrix [73;88;133;134;136;138]. Es wird von Endothelzellen und glatten Muskelzellen, aber auch von Kardiomyozyten und Herzfibroblasten produziert [74]. Zunächst wurde angenommen, dass Typ VIII Kollagen vorrangig im Verlauf der embryonalen Herzentwicklung exprimiert wird [74]. Wie die vorliegende Studie zeigt, wird Typ VIII Kollagen aber auch im adulten Herzen der Maus exprimiert. In Wildtyp-Mäusen ist es in allen Teilen des kollagenen Interstitiums zu finden, vorrangig aber als Bestandteil des Kollagengeflechts des Endomysiums und in und um kardiale Gefäße herum. Trotz unbeeinflusster Expression von Typ VIII Kollagen mRNA in den Herzen GM-CSF-überexprimierender Mäuse, fand sich deutlich weniger Protein und nur ein reduziertes, lockeres, dünnes Typ VIII Kollagengeflecht im Endomysium. Auch das perivaskuläre Typ VIII Kollagen war deutlich reduziert. Interessanterweise zeigten die inflammatorischen Zellen eine starke Expression von Typ VIII Kollagen. Wie oben schon aufgeführt, ist Typ VIII Kollagen nicht resistent gegenüber MMP-12-Degradation. Da die MMP-12 Expression und MMP-Aktivität im Herzen der GM-CSF-transgenen Mäuse deutlich erhöht ist, erklärt dies die Reduzierung des interstitiellen Typ VIII Kollagen. Die starke Expression von Typ VIII Kollagen in den Makrophagen könnte mit ihrem lytischen migrierenden Phänotyp in Zusammenhang stehen. Auch in der atherosklerotischen Plaque zeigen aktivierte migrierende Makrophagen des lytischen Phänotyps eine erhöhte Expression von Typ VIII Kollagen [190].

Elastin und Typ VIII Kollagen sind Strukturmoleküle, die auf das innigste miteinander verwoben sind und ein elastisches Netzwerk bilden. Außerdem vernetzt Typ VIII Kollagen Kollagenfibrillen miteinander und mit dem elastischen

Netzwerk. Dies Netzwerk gibt die Organstruktur des Herzens vor und verankert die Gefäße im Myokard. Kommt es wie im Myokard der GM-CSF-überexprimierenden Maus zum Abbau von Typ VIII Kollagen durch MMP-12, könnte dies zum Verlust der Gewebeintegrität des Myokards und der Herzklappen führen, und die Gefäße könnten aus ihrer Verankerung rutschen. Außerdem könnte der Abbau vorrangig des kardialen elastischen Netzwerks zum Überwiegen des steifen Elements im Herzen und damit zu kardialer Dysfunktion führen.

Wie GM-CSF und MMP-12 wird auch Typ VIII Kollagen mit der Kapillarenbildung und Angiogenese in Verbindung gebracht [146]. Es ist ein Produkt von Endothelzellen und wird von ihnen vermehrt im Rahmen der in vitro Kapillarenbildung produziert. Im Rahmen von inflammatorischen Vaskularisierungsprozessen bei Aneurysmen oder fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen – die immer mit einer stark erhöhten GM-CSF-Produktion und häufig auch mit vermehrter MMP-12 Aktivität assoziiert sind – zeigt sich auch eine starke Expression von Typ VIII Kollagen in den eingewanderten Kapillaren und kleinen Gefäßen [137;138].

Wie bei MMP-12, wird auch die Expression von Typ VIII Kollagen von GM-CSF reguliert [135;136;138]. Ob Typ VIII Kollagen deshalb auch wie MMP-12 zu den arteriogenen Faktoren zu zählen ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Allerdings gehen Rooney und Mitarbeiter davon aus, dass Typ VIII Kollagen kein echtes angiogenes Molekül ist, sondern eher die Angiogenese durch Modifikation der extrazellulären Matrix und Stimulation der Zellmigration beeinflusst [143].

In der Gefäßwand wird Typ VIII Kollagen durch glatte Muskelzellen, aber auch durch Makrophagen produziert [138;190]. Insbesondere in Makrophagen wird die Expression von Typ VIII Kollagen mit dem lytischen, MMP-exprimierenden migrierenden Phänotyp assoziiert [138;190].

Auch in vaskulären glatten Muskelzellen wird Typ VIII Kollagen im Zusammenhang mit Migrationsprozessen vermehrt exprimiert. So wird im *response to injury* Atherosklerose-Modell der Ratte oder auch beim Kaninchen Typ VIII Kollagen als Mediator der Migration in der frühen Atherogenese diskutiert [15;71;133;134;161]. Typ VIII Kollagen stimuliert die Migration von glatten Muskelzellen *in vitro*. Außerdem zeigen auf Typ VIII Kollagen adhärierende glatte Muskelzellen eine deutlich verstärkte MMP-Synthese, also, wie die Makrophagen, auch einen eher lytischen Phänotyp [71]. Es wird diskutiert, dass die glatten Muskelzellen eine migrationshemmende Typ I Kollagen reiche Matrix durch eine migrationsfördernde Typ VIII Kollagen reiche Matrix ersetzen können [1].

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass die GM-CSF-Überexpression eine Infiltration von Makrophagen in das Herz induziert. Diese Makrophagen produzieren und sezernieren MMP-12. Der daraus resultierende Matrixabbau betrifft das Elastinsystem und die Elastin-degradierbare kollagene Matrix des Herzens, im Speziellen Typ VIII Kollagen. Die vorliegende Studie zeigt den engen Zusammenhang zwischen GM-CSF, MMP-12 und Typ VIII Kollagen. Wie in der Diskussion herausgearbeitet wurde, ist das Zusammenspiel dieser drei Moleküle für eine Reihe von Prozessen beim kardialen inflammatorischen *Remodeling* von großer Bedeutung: Infiltration und Migration von Makrophagen, Angiogenese und Arteriogenese, Verlust der strukturellen Gewebeintegrität. Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass der bei der GM-CSF-überexprimierenden Maus beobachtete Phänotyp, dem Bild des *Remodelings* bei chronischer Herzentzündung möglicherweise mit vaskulärer Insuffizienz entsprechen könnte. Weitere Untersuchungen werden sich mit der Verifizierung dieser Hypothese beschäftigen.

6. Literatur

1. Adiguzel E, Hou G, Mulholland D, Hopfer U, Fukai N, Olsen B, Bendeck M: Migration and growth are attenuated in vascular smooth muscle cells with type VIII collagen-null alleles. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:56-61, 2006
2. Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, Hofmann M, Zins K, Schafer R, Stanley ER, Abraham D: Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 64:5378-5384, 2004
3. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, McClure CD, Spinale FG, Zile MR: Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 113:2089-2096, 2006
4. Andres AC: *Transgene Mäuse - was, wozu, wie weiter?* Unipress 88: 1996
5. Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI: Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am.J.Pathol.* 168:529-541, 2006
6. Anghelina M, Schmeisser A, Krishnan P, Moldovan L, Strasser RH, Moldovan NI: Migration of monocytes/macrophages in vitro and in vivo is accompanied by MMP12-dependent tunnel formation and by neovascularization. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 67:209-215, 2002
7. Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, Beliveau R: Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J.Vasc.Surg.* 35:539-546, 2002
8. Anversa P, Kajstura J, Olivetti G: Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol* 3:245-251, 1996
9. Arteaga-Solis E, Gayraud B, Ramirez F: Elastic and collagenous networks in vascular diseases. *Cell Struct.Funct.* 25:69-72, 2000

10. Bachinger HP, Bruckner P, Timpl R, Prockop DJ, Engel J: Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *Eur.J.Biochem.* 106:619-632, 1980
11. Bader M: Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models. *J.Mol.Cell Cardiol.* 34:1455-1462, 2002
12. Barnes MJ, Farndale RW: Collagens and atherosclerosis. *Exp.Gerontol.* 34:513-525, 1999
13. Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK: Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 291:H1015-H1026, 2006
14. Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ: Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin.Chem.Lab.Med.* 42 (2):121-131, 2004
15. Bendeck MP, Regenass S, Tom WD, Giachelli CM, Schwartz SM, Hart C, Reidy MA: Differential expression of alpha 1 type VIII collagen in injured platelet-derived growth factor-BB--stimulated rat carotid arteries. *Circ.Res.* 79:524-531, 1996
16. Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L, Zagari A: Recent progress on collagen triple helix structure, stability and assembly. *Protein Pept.Lett.* 9:107-116, 2002
17. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S: ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J.Clin.Invest* 117:568-575, 2007
18. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S: ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J.Clin.Invest.* 117:568-575, 2007
19. Bidouard JP, Duval N, Kapui Z, Herbert JM, O'Connor SE, Janiak P: SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury. *Eur.J.Pharmacol.* 461:49-52, 2003
20. Birk DE: Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 32:223-237, 2001
21. Birk DE, Silver FH: Collagen fibrillogenesis in vitro: comparison of types I, II, and III. *Arch.Biochem.Biophys.* 235:178-185, 1984
22. Bishop JE, Laurent GJ: Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur.Heart J.* 16 Suppl C:38-44, 1995

23. Borojevic R, Carvalho MA, Correa-Junior JD, Arcanjo K, Gomes L, Joazeiro PP, Balduino A, Wettreich A, Coelho-Sampaio T: Stroma-mediated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) control of myelopoiesis: spatial organisation of intercellular interactions. *Cell Tissue Res.* 313:55-62, 2003
24. Brilla CG, Maisch B: Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur.Heart J.* 15 Suppl D:45-52, 1994
25. Burlew BS, Weber KT: Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol.Clin.* 18:435-442, 2000
26. Burlew BS, Weber KT: Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 27:92-98, 2002
27. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W: Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation.* 10:371-379, 2003
28. Buschmann IR, Hoefler IE, Van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W: GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 159:343-356, 2001
29. Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG, Stricklin GP: Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2407-2411, 1986
30. Caterina NCM, Windsor LJ, Yermovsky AE, Bodden MK, Taylor KB, Birkedal-Hansen H, Engler JA: Replacement of conserved cysteines in human tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 272:32141-32149, 1997
31. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T: Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol.Cell Biochem.* 253:269-285, 2003
32. Chapman RE, Spinale FG: Extracellular protease activation and unraveling of the myocardial interstitium: critical steps toward clinical applications. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286:H1-H10, 2004
33. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JC, Suarez A, Zhang J, McManus BM: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc.Pathol.* 15:63-74, 2006

34. Cheung CT, Deisher TA, Luo H, Yanagawa B, Bonigut S, Samra A, Zhao H, Walker EK, McManus BM: Neutralizing anti-4-1BBL treatment improves cardiac function in viral myocarditis. *Lab Invest* 87:651-661, 2007
35. Chin JR, Murphy G, Werb Z: Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J.Biol.Chem.* 260:12367-12376, 1985
36. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT: Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27:1281-1292, 1995
37. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N: Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 35:569-582, 2000
38. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ: Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ.Res.* 89:201-210, 2001
39. Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N: Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am.J.Pathol.* 169:1567-1576, 2006
40. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW: Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J.Clin.Invest* 102:1900-1910, 1998
41. Deng Z, Yang C, Deng H, Yang A, Geng T, Chen X, Ma A, Liu Z: Effects of GM-CSF on the stem cells mobilization and plasma C-reactive protein levels in patients with acute myocardial infarction. *Int.J.Cardiol.* 113:92-96, 2006
42. Denhardt DT, Feng B, Edwards DK, Cocuzzi ET, Malyankar UM: Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): Structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 59:329-341, 1993
43. Deschamps AM, Spinale FG: Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc.Res.* 69:666-676, 2006
44. Diez J: Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J.Clin.Hypertens.(Greenwich.)* 9:546-550, 2007

45. Diez J, Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R: Mechanisms of disease: pathologic structural remodeling is more than adaptive hypertrophy in hypertensive heart disease. *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 2:209-216, 2005
46. Dorn GW: The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 49:962-970, 2007
47. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, Dickersin GR, Bachurski CJ, Mark EL, Whitsett JA : Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264:713-716, 1994
48. Dranoff G, Mulligan RC: Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor revealed by gene transfer and gene knockout studies. *Stem Cells* 12 Suppl 1:173-182, 1994
49. Eghbali M, Weber KT: Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol.Cell Biochem.* 96:1-14, 1990
50. Elliott MJ, Strasser A, Metcalf D: Selective up-regulation of macrophage function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice. *J.Immunol.* 147:2957-2963, 1991
51. Falardeau P, Champagne P, Poyet P, Hariton C, Dupont E: Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin.Oncol.* 28:620-625, 2001
52. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Skrtic M, Li RK: Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part III). *Cardiovasc.Pathol.* 14:109-119, 2005
53. Florea VG, Mareyev VY, Samko AN, et.al.: Left ventricular remodeling: common process in patients with different primary myocardial disorders. *Int.J.Card.Fail.* 68:287, 1999
54. Folkman J: Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp.Cell Res.* 312:594-607, 2006
55. Gabriel, D: Effect of growth factors on the migration of macrophages and smooth muscle cells. 1997. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
Ref Type: Thesis/Dissertation
56. Gabriel D, Plenz G, Harrach-Ruprecht B, Robenek H: GM-CSF and M-CSF as chemoattractive agents for macrophages and vascular smooth muscle cells. *Endokrine und zellbiologische Aspekte der Arteriosklerose* 203-207, 1996

57. Gallagher GL, Jackson CJ, Hunyor SN: Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure. *Front Biosci.* 12:1410-1419, 2007
58. Ganea E, Trifan M, Laslo AC, Putina G, Cristescu C: Matrix metalloproteinases: useful and deleterious. *Clin.Chem.Lab.Med.* 42:121-131, 2004
59. Genereau T, Peyri N, Berard M, Cherin P, Cabane J, Lehoang P, Guillevin L, Herson S, Boffa MC: Human neutrophil elastase in temporal (giant cell) arteritis: plasma and immunohistochemical studies. *J.Rheumatol.* 25:710-713, 1998
60. Gilbert SJ, Wotton PR, Tarlton JF, Duance VC, Bailey AJ: Increased expression of promatrix metalloproteinase-9 and neutrophil elastase in canine dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc.Res.* 34:377-383, 1997
61. Guo C, Piacentini L: Type I collagen-induced MMP-2 activation coincides with up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and TIMP-2 in cardiac fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 278:46699-46708, 2003
62. Hayakawa T: Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 107:2373-2379, 1994
63. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K: Growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. *FEBS Lett.* 298:29-32, 1992
64. Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, Cleutjens KB, Daemen MJ: The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J.Pathol.* 200:516-525, 2003
65. Helske S, Syvaranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oorni K, Mayranpaa MI, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT: Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1791-1798, 2006
66. Henriksen PA, Sallénave JM: Human neutrophil elastase: mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 40:1095-1100, 2008
67. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z: Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 261:2814-2818, 1986

68. Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, Gillijns H, Herijgers P, Flameng W, Carmeliet P, Van de WF, Pinto YM, Janssens S: Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation* 112:1136-1144, 2005
69. Hill JA, Olson EN: Cardiac plasticity. *N.Engl.J.Med.* 358:1370-1380, 2008
70. Hossmann KA, Buschmann IR: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an arteriogenic factor in the treatment of ischaemic stroke. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 5:1547-1556, 2005
71. Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP: Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am.J.Pathol.* 156:467-476, 2000
72. Hulmes DJ: Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J.Struct.Biol.* 137:2-10, 2002
73. Iruela-Arispe ML, Diglio CA, Sage EH: Modulation of extracellular matrix proteins by endothelial cells undergoing angiogenesis in vitro. *Arterioscler.Thromb.* 11:805-815, 1991
74. Iruela-Arispe ML, Sage EH: Expression of type VIII collagen during morphogenesis of the chicken and mouse heart. *Dev.Biol.* 144:107-118, 1991
75. Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L: The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail.Rev.* 5:239-250, 2000
76. Jensen HS: Elastolytic activity of human monocytes. With special reference to rheumatoid arthritis and giant cell arteritis. *Dan.Med.Bull.* 40:100-110, 1993
77. Johnson JL: Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert.Rev.Cardiovasc.Ther.* 5:265-282, 2007
78. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL: Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:15575-15580, 2005
79. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ: Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 160:194-202, 1994

80. Jost MM, Ninci E, Meder B, Kempf C, Van Royen N, Hua J, Berger B, Hoefler I, Modolell M, Buschmann I: Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis. *FASEB J.* 17:2281-2283, 2003
81. Jquirim-Souissi I, Jelassi A, Addad F, Hassine M, Najah M, Ben Hamda K, Maatouk F, Ben Farhat M, Bouslema A, Rouis M, Slimane MN: Plasma metalloproteinase-12 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels and presence, severity, and outcome of coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.* 100:23-27, 2007
82. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP: Collagens at a glance. *J.Cell Sci.* 120:1955-1958, 2007
83. Kagan HM: Intra- and extracellular enzymes of collagen biosynthesis as biological and chemical targets in the control of fibrosis. *Acta Trop.* 77:147-152, 2000
84. Kapoor R, Bornstein P, Sage EH: Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry* 25:3930-3937, 1986
85. Khoshnoodi J, Cartailier JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG: Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem* 281:38117-38121, 2006
86. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG: Mammalian collagen IV. *Microsc.Res.Tech.* 71:357-370, 2008
87. Kindermann W: Das Sporthertz. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 9:307-308, 2000
88. Kittelberger R, Davis PF, Flynn DW, Greenhill NS: Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connect.Tissue Res.* 24:303-318, 1990
89. Kittelberger R, Davis PF, Greenhill NS: Immunolocalization of type VIII collagen in vascular tissue. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 159:414-419, 1989
90. Kittelberger R, Neale TJ, Francky KT, Greenhill NS, Gibson GJ: Cleavage of type VIII collagen by human neutrophil elastase. *Biochim.Biophys.Acta* 1139:295-299, 1992
91. Kovacic JC, Muller DWM, Graham RM: Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42:19-33, 2007

92. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ: Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum.Mutat.* 9:300-315, 1997
93. Lamande SR, Bateman JF: Procollagen folding and assembly: the role of endoplasmic reticulum enzymes and molecular chaperones. *Semin.Cell Dev.Biol.* 10:455-464, 1999
94. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P: Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 40:43-48, 2002
95. Lang RA, Metcalf D, Cuthbertson RA, Lyons I, Stanley E, Kelso A, Kannourakis G, Williamson DJ, Klintworth GK, Gonda TJ, .: Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell* 51:675-686, 1987
96. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniw J, Yacoub MH: Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J.Heart Valve Dis.* 14:218-227, 2005
97. Lee TC, Midura RJ, Hascall VC, Vesely I: The effect of elastin damage on the mechanics of the aortic valve. *J.Biomech.* 34:203-210, 2001
98. Li YY, Feldman AM: Matrix metalloproteinases in the progression of heart failure: potential therapeutic implications. *Drugs* 61:1239-1252, 2001
99. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM: Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc.Res.* 46:214-224, 2000
100. Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, Morimoto M, Hatakeyama K, Asada Y, Watanabe T, Sasaguri Y, Watanabe S, Fan J: Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 113:1993-2001, 2006
101. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284:67-68, 1980
102. Liu P, Sun M, Sader S: Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can.J.Cardiol.* 22(Suppl B):25B-30B, 2006

103. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R: Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1852-1856, 1997
104. Luckow B, Joergensen J, Chilla S, Li JP, Henger A, Kiss E, Wieczorek G, Roth L, Hartmann N, Hoffmann R, Kretzler M, Nelson PJ, Perez dL, Maier H, Wurst W, Balling R, Pfeffer K, Grone HJ, Schlondorff D, Zerwes HG: Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* 34:2568-2578, 2004
105. Lutun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L: Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 109:1408-1414, 2004
106. Ma X, Tittiger M, Knutsen RH, Kovacs A, Schaller L, Mecham RP, Ponder KP: Upregulation of elastase proteins results in aortic dilatation in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol.Genet.Metab* 94:298-304, 2008
107. Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Sugano Y, Mahara K, Kohno T, Takahashi T, Ogawa S: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* 44:1510-1520, 2004
108. Mainardi CL, Seyer JM, Kang AH: Type-specific collagenolysis: a type V collagen degrading enzyme from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 97:1108-1115, 1980
109. Marneros AG, Olsen BR: The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* 20:337-345, 2001
110. Marneros AG, Olsen BR: Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J.* 19:716-728, 2005
111. Maron BJ, Pelliccia A: The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation* 114:1633-1644, 2006
112. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidmann CE, Young JB: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. *Circulation* 113:1807-1816, 2006
113. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, Masuho Y, Watanabe T: Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am.J.Pathol.* 153:109-119, 1998

114. Metcalf D: The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell* 43:5-6, 1985
115. Metcalf D: The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67:257-267, 1986
116. Metcalf D, Moore JG: Divergent disease patterns in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice associated with different transgene insertion sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:7767-7771, 1988
117. Miki T, Miura T, Nishino Y, Yano T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ichikawa Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Ura N, Shimamoto K: Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodeling in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31:873-882, 2004
118. Murohara T, Guo JP, Lefer AM: Cardioprotection by a novel recombinant serine protease inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274:1246-1253, 1995
119. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A: Regulation of matrixmetalloproteinase activity. *Ann.NY.Acad.Sci.* 732:31-41, 1994
120. Nenan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP: Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1:167-172, 2005
121. O'Neill TP: Apolipoprotein E-deficient mouse model of human atherosclerosis. *Toxicol.Pathol.* 25:20-21, 1997
122. Okada H, Kawaguchi H, Kudo T, Sawa H, Okamoto H, Watanabe S, Urasawa K, Murakami T, Kitabatake A: Alteration of extracellular matrix in dilated cardiomyopathic hamster heart. *Mol.Cell.Biochem.* 156:9-15, 1996
123. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, et al.: Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 28:1463-1477, 1996
124. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, et al.: Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 28:1463-1477, 1996
125. Olsen BR: Morphogenesis: collagen it takes and bone it makes. *Curr.Biol.* 6:645-647, 1996

126. Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M: Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron*. 33:587-596, 2002
127. Ovechkin AV, Tyagi N, Rodriguez WE, Hayden MR, Moshal KS, Tyagi SC: Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *J.Appl.Physiol* 99:2398-2405, 2005
128. Panchenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN, Kagan HM: Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J.Biol.Chem*. 271:7113-7119, 1996
129. Paulus P, Stanley ER, Schafer R, Abraham D, Aharinejad S: Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 66:4349-4356, 2006
130. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimmbeck PL, Noutsias M, Schultheiss HP: [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 27:677-682, 2002
131. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhauser R, Kuhl U, Schultheiss HP: Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc.Res*. 37:123-129, 1998
132. Pieske B: Reverse remodeling in heart failure-fact or fiction? *European Heart Journal Supplements* 6 (SupplementD):D66-D78, 2004
133. Plenz G, Dorszewski A, Breithardt G, Robenek H: Expression of type VIII collagen after cholesterol diet and injury in the rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 19:1201-1209, 1999
134. Plenz G, Dorszewski A, Volker W, Ko YS, Severs NJ, Breithardt G, Robenek H: Cholesterol-induced changes of type VIII collagen expression and distribution in carotid arteries of rabbit. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 19:2395-2404, 1999
135. Plenz G, Eschert H, Beissert S, Arps V, Sindermann JR, Robenek H, Volker W: Alterations in the vascular extracellular matrix of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) -deficient mice. *FASEB J*. 17:1451-1457, 2003
136. Plenz G, Koenig C, Reichenberg S, Robenek H: Colony stimulating factors modulate the transcription of type VIII collagen in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 144:25-32, 1999
137. Plenz G, Koenig C, Severs NJ, Robenek H: Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*. 17:2489-2499, 1997

138. Plenz G, Reichenberg S, Koenig C, Rauterberg J, Deng MC, Baba HA, Robenek H: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:1658-1668, 1999
139. Postiglione L, Montagnani S, Ladogana P, Castaldo C, Di Spigna G, Bruno EM, Turano M, De Santo L, Cudemo G, Cocozza S, Divitiis Od, Rossi G: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor receptor expression on human cardiomyocytes from end-stage heart failure patients. *European Journal of Heart Failure* 8:564-570, 2006
140. Prescott MF, Sawyer WK, Linden-Reed J, Jeune M, Chou M, Caplan SL, Jeng AY: Effect of matrix metalloproteinase inhibition on progression of atherosclerosis and aneurysm in LDL receptor-deficient mice overexpressing MMP-3, MMP-12, and MMP-13 and on restenosis in rats after balloon injury. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 878:179-190, 1999
141. Rekhter MD: Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc.Res.* 41:376-384, 1999
142. Ricard-Blum S, Ruggiero F: The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol.Biol.(Paris)* 53:430-442, 2005
143. Rooney P, Wang M, Kumar P, Kumar S: Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J.Cell Sci.* 105 (Pt 1):213-218, 1993
144. Rozwarski DA, Diederichs K, Hecht R, Boone T, Karplus RA: Refined crystal structure and mutagenesis of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proteins* 26:304-313, 1996
145. Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, Haddad M, Knittel K, Wende S, Wenzel J, Munzel T, Heitzer T, Meinertz T, Hubner C, Baldus S: Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic.Biol.Med.* 43:1189-1196, 2007
146. Sage H, Iruela-Arispe ML: Type VIII collagen in murine development. Association with capillary formation in vitro. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 580:17-31, 1990
147. Sanchez-Quintana D, Climent V, Ho SY, Anderson RH: Myoarchitecture and connective tissue in hearts with tricuspid atresia. *Heart* 81:182-191, 1999

148. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Hurle JM: Myocardial fiber architecture in the human heart. Anatomical demonstration of modifications in the normal pattern of ventricular fiber architecture in a malformed adult specimen. *Acta Anat.(Basel)* 138:352-358, 1990
149. Sato K, Yomogida K, Wada T, Yorihuzi T, Nishimune Y, Hosokawa N, Nagata K: Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J.Biol.Chem.* 277:37678-37684, 2002
150. Sato T, Imanishi S, Arita M, Shimada T: Effects of elastase on contractility and morphology of elastic tissue in isolated guinea pig papillary muscles. *Heart Vessels* 8:71-78, 1993
151. Schaper W: Therapeutic arteriogenesis has arrived. *Circulation* 104:1994-1995, 2001
152. Scholz D, Cai WJ, Schaper W: Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis.* 4:247-257, 2001
153. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K.: *Prometheus: Lernatlas der Anatomie*, 1 ed. Stuttgart, Thieme, 2005
154. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104:2012-2017, 2001
155. Senzaki H: The pathophysiology of coronary artery aneurysms in Kawasaki disease: role of matrix metalloproteinases. *Arch.Dis.Child* 91:847-851, 2006
156. Senzaki H, Masutani S, Kobayashi J, Kobayashi T, Nakano H, Nagasaka H, Sasaki N, Asano H, Kyo S, Yokote Y: Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in patients with Kawasaki disease. *Circulation* 104:860-863, 2001
157. Shapiro SD, Campbell EJ, Kobayashi DK, Welgus HG: Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *J Immunol* 146:2724-2729, 1991
158. Sharpe N: Left ventricular remodeling: pathophysiology and treatment. *Heart Fail.Monit.* 4:55-61, 2003
159. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS: Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll.Relat Res.* 5:355-368, 1985

160. Shiraya S, Miyake T, Aoki M, Yoshikazu F, Ohgi S, Nishimura M, Ogihara T, Morishita R: Inhibition of development of experimental aortic abdominal aneurysm in rat model by atorvastatin through inhibition of macrophage migration. *Atherosclerosis*, 2008
161. Sibinga NE, Foster LC, Hsieh CM, Perrella MA, Lee WS, Endege WO, Sage EH, Lee ME, Haber E: Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ.Res.* 80:532-541, 1997
162. Sibon I, Sommer P, Lamaziere JM, Bonnet J: Lysyl oxidase deficiency: a new cause of human arterial dissection. *Heart* 91:e33, 2005
163. Sivakumar P, Gupta S, Sarkar S, Sen S: Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy. *Mol.Cell Biochem.* 307:159-167, 2008
164. Sopata I, Dancewicz AM: Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochem Biophys Acta* 370:510-523, 1974
165. Spinale FG: Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ.Res.* 90:520-530, 2002
166. Spinale FG: Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 87:1285-1342, 2007
167. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL: Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc.Res.* 46:225-238, 2000
168. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, Zellner JL, Crumbley AJ: A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 102:1944-1949, 2000
169. St.John Sutton MG, Sharpe N: Left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 101:2981-2988, 2000
170. Stephan S, Sherratt MJ, Hodson N, Shuttleworth CA, Kielty CM: Expression and supramolecular assembly of recombinant alpha1(viii) and alpha2(viii) collagen homotrimers. *J.Biol.Chem.* 279:21469-21477, 2004
171. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch.H.C., Liotta LA: Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264:17374-17378, 1989

172. Stricklin GP, Welgus HG: Human skin fibroblast collagenase inhibitors: purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 258:12252-12258, 1983
173. Trackman PC: Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J.Cell Biochem.* 96:927-937, 2005
174. Tyagi SC, Kumar SG, Alla SR, Reddy HK, Voelker DJ, Janicki JS: Extracellular matrix regulation of metalloproteinase and antiproteinase in human heart fibroblast cells. *J.Cell Physiol* 167:137-147, 1996
175. van der RM, Dublet B, Champlaud MF: Fibril-associated collagens. *Biomaterials* 11:28-31, 1990
176. van der RM, Garrone R: Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5:2814-2823, 1991
177. Van Royen N, Piek JJ, Legemate DA, Schaper W, Oskam J, Atasever B, Voskuil M, Ubbink D, Schirmer SH, Buschmann I, Bode C, Buschmann EE: Design of the START-trial: STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of GM-CSF as a new treatment for peripheral vascular disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Vasc.Med.* 8:191-196, 2003
178. Van Royen N, Schirmer SH, Atasever B, Behrens CY, Ubbink D, Buschmann EE, Voskuil M, Bot P, Hoefler I, Schlingemann RO, Biemond BJ, Tijssen JG, Bode C, Schaper W, Oskam J, Legemate DA, Piek JJ, Buschmann I: START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation* 112:1040-1046, 2005
179. van Vlijmen-van Keulen CJ, Pals G, Rauwerda JA: Familial abdominal aortic aneurysm: a systematic review of a genetic background. *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.* 24:105-116, 2002
180. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S: Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc.Res.* 69:604-613, 2006
181. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R: Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J.Biol.Chem.* 281:3494-3504, 2006
182. Vrhovski B, Weiss AS: Biochemistry of tropoelastin. *Eur.J.Biochem.* 258:1-18, 1998

183. Waterstone RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Argawala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, et al.: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562, 2002
184. Weber KT: Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* 96:2488-2492, 1997
185. Weber KT, Janicki JS: Pathogenesis of heart failure. *Cardiol.Clin.* 7:11-24, 1989
186. Weber KT, Sun Y, Katwa LC: Local regulation of extracellular matrix structure. *Herz* 20:81-88, 1995
187. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP: Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J.Mol.Cell Cardiol.* 26:279-292, 1994
188. Weissen-Plenz G, Eschert H, Volker W, Sindermann JR, Beissert S, Robenek H, Scheld HH, Breithardt G: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor deficiency affects vascular elastin production and integrity of elastic lamellae. *J.Vasc.Res.* 45:103-110, 2008
189. Weissen-Plenz G, Hoffmeier A, Sindermann JR: Lysyl oxidase inhibition is responsible for the vascular elastic fiber phenotype. *Hypertension* 51:e13, 2008
190. Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J: Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J.* 13:1445-1457, 1999
191. Werb Z, Gordon S: Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J Exp Med* 142:361-377, 1975
192. Werb Z, Reynolds JJ: Stimulation by endocytosis of the secretion of collagenase and neutral proteinase from rabbit synovial fibroblasts. *J.Exp.Med.* 140:1482-1497, 1974
193. Wess TJ: Collagen fibril form and function. *Adv.Protein Chem.* 70:341-374, 2005
194. Wilson EM, Spinale FG: Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann.Med.* 33:623-634, 2001
195. Wittwer T, Wahlers T: Marginal donor grafts in heart transplantation: lessons learned from 25 years of experience. *Transpl.Int.* 21:113-125, 2008

196. Wong AP, Nili N, Jackson ZS, Qiang B, Leong-Poi H, Jaffe R, Raanani E, Connelly PW, Sparkes JD, Strauss BH: Expansive remodeling in venous bypass grafts: novel implications for vein graft disease. *Atherosclerosis* 196:580-589, 2008
197. Wu L, Fan J, Matsumoto S, Watanabe T: Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 269:808-815, 2000
198. Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Fan J, Sasaguri Y, Watanabe T: Induction of human matrix metalloproteinase-12 gene transcriptional activity by GM-CSF requires the AP-1 binding site in human U937 monocytic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 285:300-307, 2001
199. Yasuda O, Fukuo K, Maeda N, Ogihara T: Elevated expression of type VIII collagen gene in the atherosclerotic plaque of the ApoE-deficient mouse. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 947:312-315, 2001
200. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T: Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:407-411, 1996
201. Zbinden R, Vogel R, Meier B, Seiler C: Coronary collateral flow and peripheral blood monocyte concentration in patients treated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Heart* 90:945-946, 2004
202. Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C: Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 46:1636-1642, 2005

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Robenek danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit in seiner Abteilung an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster promovieren zu dürfen.

Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Gabriele Weissen-Plenz danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster promovieren zu dürfen.

Ich fühle mich von Frau Dr. Weissen-Plenz in vieler Hinsicht, sowohl fachlich, als auch menschlich, hervorragend unterstützt. Sie hat jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen gehabt. Ich freue mich sehr, ihr begegnet zu sein.

8. Lebenslauf

Name: Merkel
Geburtsname: Krah
Vorname: Beate
Geburtsdatum: 12. Januar 1965
Geburtsort: Siegen
Familienstand: verheiratet
Grundschule: 1971-1973 Grundschule Geisweid
1973-1975 Grundschule Siegen-Sohlbach
Gymnasium: 1975-1984 Fürst-Johann-Moritz-Gymnasium,
Siegen
Abitur: 1984
Studium: 1984-1985 Universität-Gesamthochschule Siegen
Lehramt der Sek. I für Deutsch und
Sport
Lehre: 1985-1989 Ausbildung zur Zahntechnikerin Dental-
Labor Huismann, Siegen
Abschluß: Gesellenprüfung
Arbeitsverhältnis: 1989-1989 Dental-Labor Strunk, Siegen
Zahntechnikerin
1989-1992 Deutsche Lufthansa AG, Frankfurt
Flugbegleiterin
Studium: 1992-1997 Justus-Liebig-Universität Gießen
Studium der Zahnheilkunde
Naturwissenschaftliche Prüfung bestanden 01.10.1993
Zahnärztliche Vorprüfung bestanden 06.03.1995
Zahnärztliche Prüfung bestanden 17.12.1997
Note: gut
Assistenzzeit: 1998-2000 Dr. Harry Krah, Siegen, Oralchirurg

Niedergelassen als Zahnärztin seit 01.Mai 2000 in Einzelpraxis in Versmold-
Peckeloh.

