

**Die Rolle von Osteopontin-1 auf die inflammatorische Reaktion in
einem murinen Modell der repetitiven Ischämie und Reperfusion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Bettina Mesenholl

aus Linz am Rhein

2014

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. Oliver Dewald
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 25. August 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Armin Welz

Gewidmet meinen Eltern zum Dank,
in lieber Erinnerung an meinen Vater.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Die koronare Herzkrankheit	9
1.1.1 Klinik der koronaren Herzkrankheit	9
1.2 Konzepte der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit	10
1.3 Repetitive Ischämie und Reperfusion	12
1.4 Entzündungsreaktion nach Reperfusion	14
1.4.1 Modelle der Ischämie und Reperfusion	15
1.4.2 Sauerstoffradikalabhängige Faktoren nach Ischämie und Reperfusion	17
1.5 Chemotaktische Mediatoren im myokardialen Gewebeumbau	19
1.5.1 Zytokine	19
1.5.2 Chemokine	20
1.6 Mediatoren im Gewebeumbau	22
1.6.1 Tenascin	22
1.6.2 Transforming Growth Factor- β	23
1.6.3 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren	24
1.7 Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren	25
1.8 Cannabinoidrezeptoren	28
1.9 Osteopontin im Gewebeumbau	29
1.10 Hypothese	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Mausmodell der myokardialen Ischämie und Reperfusion	32
2.1.1 Protokoll der initialen Operation	32
2.1.2 Protokoll der repetitiven Ischämie und Reperfusion	33
2.1.3 Gruppendifinitionen	34
2.2 Echokardiographie zur Untersuchung der ventrikulären Pumpfunktion	36
2.3 Probenaufbereitung	37
2.3.1 Gewinnung der Gewebeproben	37
2.3.2 Isolation der mRNA	37
2.4 Molekularbiologische Analyse mittels Real-time PCR	38

2.4.1	Prinzip der konventionellen PCR	38
2.4.2	Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	40
2.4.3	cDNA-Synthese	45
2.4.4	TaqMan [®] RT-PCR	45
2.5	Auswertung	48
2.6	Statistik	48
3.	Ergebnisse	50
3.1	Ergebnisse der Tier-Operationen	50
3.1.1	Wildtypmäuse	50
3.1.2	Osteopontin-Knockout-Mäuse	50
3.2	Globale und regionale linksventrikuläre Funktion	51
3.3	Osteopontin in Wildtypmäusen	53
3.4	Intrazelluläre Faktoren	54
3.4.1	Marker des oxidativen Stress	54
3.4.2	Zinkspeicherproteine	56
3.5	Inflammatorische Mediatoren	58
3.5.1	Chemokine	58
3.5.2	Zytokine	61
3.6	Mediatoren des Gewebeumbaus	63
3.7	Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor- α	73
3.8	Cannabinoidrezeptoren	74
4.	Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	82
6.	Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	83
7.	Literaturverzeichnis	85
8.	Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
α -SMAC	α -smooth muscle actin
AWT	anterior wall thickening (Vorderwandverdickung)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
CCL	Chemokine (C-C-motive) ligand
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphat
dsDNA	double stranded desoxyribonucleic acid
EKG	Elektrokardiogramm
FS	Fractional shortening (Fraktionsverkürzung)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Colony Stimulating Factor
GPX	Glutathionperoxidase
HMOX	Hämoxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
I/R	Ischämie und Reperfusion
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	left anterior descending coronary artery
LVdiast	linksventrikulärer Durchmesser während der Diastole
LVsyst	linksventrikulärer Durchmesser während der Systole
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
M-Mode	Motion-Mode
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger-Ribonucleic Acid
MT	Metallothionein

MT-MMP	Membrane-type-Matrixmetalloproteinase
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OP	Operation
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR	Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
ROS	Reactive oxygen species (Sauerstoffradikale)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TH1	T-Helferzellen 1
TH2	T-Helferzellen 2
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
TNC	Tenascin C
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VWdiast	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Diastole
VWsys	Vorderwanddicke des linken Ventrikels während der Systole
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Die koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) entsteht durch Atherosklerose an den Gefäßwänden der Koronararterien und ist durch eine Verengung des Gefäßdurchmessers und eine damit einhergehende Reduktion des Blutflusses gekennzeichnet. Die KHK ist eine multiätiologische Erkrankung. Einige ihrer Risikofaktoren sind dabei von jedem Individuum selbst in gewissem Rahmen beeinflussbar. Hierzu gehören Nikotinabusus, Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus. Hinzu kommen eine Reihe sogenannter unbeeinflussbarer Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht und familiäre Disposition bzw. genetische Aspekte.

Herz-Kreislaufkrankungen stellen heutzutage die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Die koronare Herzkrankheit steht dabei an der Spitze der Todesstatistik. Allein in Deutschland waren im Jahr 2011 rund 110.000 Todesfälle durch ischämische Herzkrankheiten zu beklagen, für den akuten Myokardinfarkt lag die Anzahl bei 52.113 Todesfällen (Todesursachenstatistik 2011, Statistisches Bundesamt Deutschland). In groß angelegten Studien, wie z.B. der Framingham-Studie konnte gezeigt werden, dass jeder 5. Mann und jede 17. Frau im Alter von 60 Jahren an einer KHK leidet (Castelli, 1982). Dabei ist zu beachten, dass das Auftreten einer KHK in den jüngeren Lebensjahren eines Menschen zwischen den Geschlechtern noch stark divergiert. Jenseits des 65. Lebensjahres jedoch gleichen sich die Zahlen annähernd an (Fuster et al., 1992).

1.1.1 Klinik der koronaren Herzkrankheit

Das Leitsymptom der Koronarinsuffizienz ist die Angina pectoris, die sich in der Regel ab einer kritischen Koronarstenose (ca. 75% des Gefäßdurchmessers) manifestiert. Es handelt sich hierbei um vorwiegend retrosternal auftretende Beschwerden im Sinne von Schmerzen, Brennen, Enge- oder Druckgefühl, die gehäuft nach körperlicher oder psychischer Belastung auftreten. Eine unspezifische Ausstrahlung der Schmerzen zum

Oberkiefer, Hals, Schultergelenk, linken (selten auch rechten) Arm und Oberbauch ist möglich.

Gemäß ihrer unterschiedlichen Verlaufsformen kann zwischen stabiler und instabiler Angina pectoris differenziert werden. Die stabile Angina pectoris zeichnet sich dadurch aus, dass sie regelmäßig durch bestimmte Mechanismen (z.B. körperliche Anstrengung) auslösbar ist und gut auf Nitrate reagiert. Zur instabilen Angina pectoris hingegen wird zum einen jede Erstangina (primär instabile Angina pectoris) gezählt, zum anderen fällt jedoch auch eine Ruhe-Angina, ein zunehmender Bedarf an antianginösen Medikamenten sowie eine Crescendo-Angina, welche sich durch zunehmende Schwere, Dauer und Häufigkeit der Schmerzanfälle auszeichnet, unter diesen Begriff (sekundär instabile Angina pectoris) (Herold et al., 2005).

Die kritische Stenose eines größeren Koronargefäßes kann zu ischämischer Kardiomyopathie mit Linksherzinsuffizienz, schweren Herzrhythmusstörungen, akutem Koronarsyndrom oder sogar plötzlichem Herztod führen.

Um die schweren Folgeerscheinungen der KHK zu vermeiden und einer Chronifizierung bzw. Progression der Erkrankung entgegen zu wirken, gilt es, im Sinne einer Kausaltherapie die Risikofaktoren der Atherosklerose auszuschalten. Daneben existieren eine Reihe symptomatischer Behandlungsmöglichkeiten, die von medikamentöser Therapie (Nitrate, Betarezeptorenblocker, Thrombozytenaggregationshemmer, Lipidsenker) über minimal-invasive Revaskularisation bis hin zur aortokoronaren Bypasschirurgie reichen (Herold et al., 2005).

Bei klinisch manifester KHK gilt heute, aufgrund von klinischen und experimentellen Studien die frühe Revaskularisation zur Vermeidung eines Myokardinfarktes als Therapie der Wahl. Alle genannten Therapiekonzepte stützen sich auf das Verständnis der Mechanismen von Ischämie und Reperfusion (I/R), welche jedoch leider noch immer nicht ausreichend erforscht sind (Herold et al., 2005).

1.2 Konzepte der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit

Die Atherosklerose hat als Hauptursache von KHK, Herzinfarkt und zerebralem Insult aufgrund ihrer hohen klinischen Bedeutung seit vielen Jahren einen hohen Stellenwert in der Forschung erlangt. Der Begriff der Atherosklerose wurde 1833 erstmals durch Jean

Lobstein geprägt, der die Gefäßwandveränderungen als eine Kombination aus Kondensation und Induration beschrieb (Hanke et al., 2001). Karl Rokitansky (1804-1878) postulierte in seiner Inkrustationshypothese, dass es sich bei der Atherosklerose um eine Verdickung der Intima handle, hervorgerufen durch Fibrinablagerungen, deren Organisation durch Fibroblasten und nachfolgende Akkumulation von Lipiden (Mayerl et al., 2006). Einer der größten Kritiker Rokitanskys war Rudolf Virchow (1821-1902). Er erklärte sich die Gefäßwandveränderungen durch Ablagerungen von Lipiden aus dem Blut in Intima und Media von Arterien (Mayerl et al., 2006). Beide Ansätze sind, zumindest teilweise, in der von Russell Ross 1973 postulierten „response-to-injury-Hypothese“ vertreten, die mehrfach modifiziert bis heute gültig ist (Fuster et al., 1992; Karsch, 1992; Ross, 1993). Das primäre Ereignis bildet hierbei die Reaktion auf eine Endothelverletzung (Ross und Glomset, 1977; Ross, 1990). Der Verletzungsursprung spielt dabei keine Rolle (mechanisch, metabolisch, toxisch, immunologisch, viral). Als Folge der Verletzung kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen, Myozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Makrophagen und Wachstumsfaktoren (Liao, 1998; Ross, 1993).

Die dadurch entstehende progressive Stenose führt zu Durchblutungsstörungen im Myokard, die sich als rezidivierende Episoden von Ischämien manifestieren. Als Folge der Ischämien kommt es zu einem Gewebeumbau im Myokard in Form einer Fibrose. Dies wiederum führt zu einer Verschlechterung der ventrikulären Pumpfunktion, da das Zusammenspiel von Kardiomyozyten und extrazellulärer Matrix gestört ist. Diese extrazelluläre Matrix besteht normalerweise aus netzartig verknüpftem, fibrillärem Kollagen vom Typ I und III. Sie dient dazu, die Ventrikelgeometrie aufrecht zu erhalten und ist mit verantwortlich für die Pumpfunktion (Eghbali et al., 1989; Weber, 1989; Weber et al., 1993).

Das Kollagengerüst, als anpassungsfähiges und dynamisches Gewebe (Weber, 1989), wird in der Regel von Fibroblasten produziert. Bei dem angesprochenen Gewebeumbau kommt es jedoch zu einer Fibroblastenproliferation und -differenzierung in Myofibroblasten (Weber, 1989; Willems et al., 1994). Myofibroblasten sorgen während der dermalen Wundheilung für eine Narbenkontraktion (Serini und Gabbiani, 1999). Nach einem Myokardinfarkt übernehmen sie die Hauptproduktion an Kollagen (Cleutjens et al., 1995).

Die Myokardfibrose lässt sich in eine reaktive Fibrose und eine Ersatzfibrose unterteilen (Anderson et al., 1978; Weber et al., 1993, 1995). Die Ersatzfibrose findet sich nach stattgefundenen Parenchymverlusten, z.B. in Folge eines Myokardinfarktes. Das nekrotische Myokardgewebe wird hierbei durch Kollagen ersetzt, wodurch eine bindegewebige Narbe entsteht (Weber et al., 1993, 1999). Unter reaktiver Fibrose versteht man eine Bindegewebsvermehrung ohne vorangegangenen Parenchymverlust. Es kommt zu einer Akkumulation von Kollagen, sowohl als interstitielle Fibrose als auch in der Gefäßadventitia (perivaskuläre Fibrose; Anderson et al., 1978; Weber et al. 1993, 1995). Das Bild der reaktiven Fibrose findet sich bei zahlreichen pathologischen Zuständen, wie arterieller Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz. Weiterhin stellt sie eines der histologischen Merkmale des hibernierenden Myokards dar (Anderson et al., 1979; Ausma et al., 1995; Huysman et al., 1989; Maes et al., 1995; Olsen, 1972; Pearlman et al., 1982; Roberts et al., 1974), welches als Folgeerscheinung repetitiver I/R beobachtet wurde.

1.3 Repetitive Ischämie und Reperfusion

Durch eine Ischämie kommt es in Folge des verminderten Blutflusses zu einer Unterversorgung des betroffenen Areals mit Sauerstoff und wichtigen Substraten wie z.B. Glukose. Gleichzeitig werden anfallende Stoffwechselmetabolite (z.B. Laktat) unzureichend schnell abtransportiert und akkumulieren (Verdouw et al., 1998). Dauert dieser Zustand zu lange an, kommt es zu weiteren zellulären Veränderungen, die letztendlich zu einer Gewebsnekrose führen.

Eine rechtzeitige Reperfusion kann dies verhindern, allerdings muss auch sie als „zweischneidiges Schwert“ angesehen werden (Braunwald und Kloner, 1985), da es im Rahmen einer Reperfusion zunächst zu einer weiteren Gewebsschädigung durch toxisch wirkende freie reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) kommt (Birnbaum et al., 1995; Entman et al., 2000; Frangogiannis et al., 1996, 1998). In Abhängigkeit von der Dauer der Ischämiephase kommt es zu unterschiedlichen Folgeerscheinungen.

Eine davon ist das ischämische „preconditioning“ (Präkonditionierung). Hierbei handelt es sich um ein von Murry et al. 1986 erstmals an Hunden beobachtetes Phänomen

(Murry et al., 1986). Kurze Ischämiephasen von 1 bis 5 Minuten mit nachfolgender Reperfusion führen zu intrazellulären Veränderungen, die sich innerhalb von Minuten wieder normalisieren. Es kommt zu einer Freisetzung verschiedener Stoffwechselmetabolite, die über mehrere Schritte zu einer Phosphorylierung eines ATP-abhängigen Kaliumkanals an der Myozytenmembran führt und damit den Energieverbrauch der Zelle herabsetzt. Die Präkonditionierung kann weder histomorphologisch noch über Veränderungen der ventrikulären Pumpfunktion nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sie in experimentellen Studien einen kardioprotektiven Effekt, der sich durch einen verminderten Parenchymverlust nach lang andauernder Ischämie (Kloner et al., 1998), sowie einer Reduktion des nekrotischen Areals nach einem Myokardinfarkt zeigte (Heusch, 1998).

Das „myocardial stunning“ stellt eine transiente Funktionsabnormalität der Ventrikelmuskulatur dar, die bei Okklusion der Koronararterien von mehr als 5 Minuten Dauer auftritt (Kloner et al., 1998) und für mehrere Tage anhält (Allen et al., 1996; Gerber et al., 1999; Kloner et al., 2001 a, b, c; Patel et al., 1988; Vlahovic and Popovic, 2000). Als pathogenetische Grundlage wird die reaktive Freisetzung von ROS angesehen, wobei es nicht bzw. kaum zu einer Entzündungsreaktion kommt (Bolli 1988; Bolli und Marban, 1999; Kloner et al., 1998). Auch Kalziumüberladung und Adenosinwirkung werden als Ursachen diskutiert. Auch in diesem Fall zeigen sich histopathologisch keine wesentlichen Veränderungen.

Anders als beim „preconditioning“ und „myocardial stunning“, die beide im Tierversuch entdeckt wurden, handelt es sich beim hibernierenden Myokard um einen klinisch beobachteten Zustand. Der Begriff „hibernating myocardium“ wurde erstmals von Diamond et al. verwendet (Diamond et al., 1978), nachdem Chatterjee 1972, im Rahmen einer klinischen Studie eine Verbesserung linksventrikulärer Dyskinesien nach Bypassoperation bei Patienten mit KHK nachweisen konnte (Chatterjee, 1972). Definitionsgemäß handelt es sich um eine durch chronische Minderperfusion hervorgerufene ventrikuläre Dysfunktion, die lange bestehen bleibt (Rahimtoola, 1985, 1989). Beim „hibernating myocardium“ passt sich die kontraktile Funktion in Form einer metabolischen und funktionellen Herabregulation der bestehenden Minderperfusion an um das Myokard zu schützen (Rahimtoola, 1982, 1985, 1989). Ross sprach in diesem Zusammenhang von einem „perfusion-contraction-matching“ (Ross, 1991). Klinisch

konnte hibernierendes Myokard bei stabiler und instabiler Angina pectoris, chronischer Herzinsuffizienz, linksventrikulärer Dysfunktion und im Randbereich von Myokardinfarkten beobachtet werden (Heusch, 1998). Es stellte sich heraus, dass auch Phasen von repetitiver Ischämie und Reperfusion bei erniedrigter Koronarreserve, ausgelöst z.B. durch Stresssituationen bei KHK-Patienten, zu den auslösenden Mechanismen zählen (Fallavollita et al., 2001 a, b; Kloner et al., 1998; Shivalkar et al., 1999; Vanoverschelde et al., 1993; Wijns et al., 1998).

Durch die Reversibilität der ventrikulären Dysfunktion durch Revaskularisation (Rahimtoola, 1982, 1985, 1989) erschließt sich der Sinn und Nutzen einer frühzeitigen Intervention.

An histopathologischen Veränderungen konnten interstitielle Kollagenablagerungen, intrazelluläre Glykogeneinlagerungen, Verlust der Sarkomere und eine Verkleinerung der Mitochondrien im hibernierenden Myokard nachgewiesen werden (Heusch, 1998). Die aufgezeigten Myokardveränderungen beschreiben auch eine Entzündungsreaktion.

1.4 Entzündungsreaktion nach Reperfusion

Eine massive inflammatorische Reaktion konnte nach Reperfusion von bereits infarziertem Myokardgewebe beobachtet werden. Hier kam es neben einer starken inflammatorischen Antwort auch zu einem beschleunigten Parenchymbau im Sinne einer Myokardfibrose und zur Ausbildung einer Infarkt Narbe (Frangogiannis et al., 2000; Jugdutt, 1997; Reimer et al., 1993; Richard et al., 1995; Solomon und Gersh, 1998).

Durch Reperfusion der nekrotischen Areale kommt es einerseits zu einer Aktivierung der Komplementkaskade, andererseits zu einer vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS), deren Aufkommen durch die vorhandenen Enzyme (Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid Dismutase) sowie intrazelluläre Antioxidantien nicht mehr ausgeglichen werden kann (Frangogiannis, 2008). Dies wiederum induziert die vermehrte Synthese von Interleukin-8 (IL-8) und CCL2, zweier starker chemotaktischer Faktoren für monozytäre Zellen, welche unter anderem die Einwanderung neutrophiler Granulozyten ins reperfundierte Myokard triggern. Die Zellen ihrerseits setzen proteolytische Enzyme frei und schädigen damit nicht nur nekrotisches Gewebe, sondern auch vitale Myozyten in der Umgebung des Infarktareals (Birnbbaum et al., 1995; Entman et

al., 2000; Frangogiannis et al., 1996, 1998; Schaper et al., 1983). Die toxischen Produkte werden fast nur nach Adhäsion der Neutrophilen an ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)-exprimierende Kardiomyozyten freigesetzt. Hiermit begründen sie die sogenannte reperfusion injury (Birnbaum et al., 1995; Entman et al., 2000; Frangogiannis et al., 1996, 1998; Schaper et al., 1983).

Später wandern, stimuliert durch chemotaktische Reizstoffe wie Komplementfaktoren (C5a), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und CCL2 Makrophagen ins Gewebe ein. Sie sind direkt am Gewebeumbau beteiligt, da sie nekrotisches Parenchym mit Hilfe von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Wachstumsfaktoren, wie z.B. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), abbauen. Sie bewirken dies über eine Stimulierung der Neoangiogenese und der Fibroblastenproliferation. Das Ergebnis ist die Ausbildung einer Infarkt Narbe (Frangogiannis et al., 2000), bedingt durch eine Zunahme der Fibrose in der extrazellulären Matrix. Dies resultiert in einer Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion des Myokards durch Kardiomyozytenverlust sowie durch die Rigidität des Typ-I-Kollagens im daraufhin entstehenden fibrotischen Areal.

Obwohl durch die Reperfusion ein zusätzlicher Gewebeschaden entsteht, verbessert sich die Langzeitprognose eines Myokardinfarkts nach frühzeitiger Reperfusion erheblich, weshalb dies nach wie vor die Therapie der Wahl nach einem Myokardinfarkt darstellt (Schaper und Schaper, 1997).

1.4.1 Modelle der Ischämie und Reperfusion

Um die Pathophysiologie der I/R besser verstehen und erforschen zu können war es nötig, adäquate Tiermodelle zu entwickeln. Als Großtiermodelle, bei denen einige Eigenschaften des menschlichen hibernierenden Myokards als „Short-term-Hibernation“ auftreten, haben sich hierbei bislang Hunde und Schweine bewährt (Heusch, 1998; Heusch und Schulz, 2000). Es wurden Ameroidkonstriktoren oder eine partielle Koronarstenose des Ramus circumflexus der linken Koronararterie verwendet. Von Vorteil erwies sich bei diesen Modellen die leichtere Durchführbarkeit einer funktionellen Diagnostik (Echokardiographie, PET) zur Beurteilung der kontraktiven Ventrikelfunktion. Leider sind die Ergebnisse, bedingt durch anatomische und physiologische Unterschiede, nicht

komplett auf den Menschen übertragbar. Als Beispiele wären hier die Entstehung von Mikroinfarkten und Nekroseinseln am Schweineherzen und die Bildung nativer Kollateralgefäße beim Hund zu nennen (Camici et al., 1997; Chen et al., 1997 a, b; Fallavollita et al., 2001 b; Kudej et al., 1998; Shen et al., 1996).

Eine bessere Bestimmung funktionaler und zellbiologischer Parameter erfolgt über Kleintiermodelle wie z.B. Ratte oder Maus (Michael et al., 1995; Selye, 1960). Da diese Tiere zudem genetisch weitgehend erforscht sind, besteht die Möglichkeit, transgene Tiere für spezielle Fragestellungen zu kreieren (Heusch, 1998; Lutgens et al., 1999; Weber 1999). Die Lebensspanne von Ratten und Mäusen ist außerdem kürzer und Langzeituntersuchungen sind so in einem überschaubaren Zeitraum durchführbar. Zudem ist die Haltung von Kleintieren auch aus ökonomischen Gesichtspunkten günstiger.

Ein weiteres klassifizierendes Merkmal ist die Art der Operation hinsichtlich der zeitlichen Diskrepanz des operativen, die Ischämie vorbereitenden Eingriffs und der Ischämie bzw. der darauf folgenden Reperfusion. Es werden das „open-chest“-Modell vom „closed-chest“-Modell unterschieden (Verdouw et al., 1998). Ersteres dient eher der gezielten Untersuchung von regionaler Funktion und Metabolismus im Rahmen von Kurzzeitstudien. Der vorbereitende operative Eingriff und die Induktion der Ischämie erfolgen in derselben Sitzung. Ein Nachteil dieser Variante ist, dass durch das akute chirurgische Trauma selbst eine signifikante und höchst variable inflammatorische Reaktion ausgelöst wird, welche von der durch I/R ausgelösten Entzündungsreaktion nur schwer zu unterscheiden ist (Michael et al., 1985). „Closed-chest“-Modelle zeichnen sich durch einen der Ischämie zeitlich einige Tage vorausgehenden initialen operativen Eingriff zwecks Implantation einer Ligatur zur Gefäßokklusion aus. Dadurch bieten sie eine Abgrenzbarkeit der ischämiebedingten Schäden von denen des initialen OP-Traumas (Nossuli et al., 2000). Zusätzlich eröffnen sie die Möglichkeit, Langzeitstudien vorzunehmen (z.B. repetitive I/R) und somit eine Myokardischämie mit chronischer Kardiomyopathie beim Menschen zu simulieren (Michael et al., 1995). Durch weitere Modifikationen des Modells können Ischämie und Reperfusion beliebig oft wiederholt werden (Dewald et al., 2003).

1.4.2 Sauerstoffradikalabhängige Faktoren nach Ischämie und Reperfusion

Ischämie und Reperfusion führen im Gewebe zur Entstehung von oxidativem Stress. Hierbei kommt es aufgrund von Störungen in der mitochondrialen Atmungskette, bei denen die korrekte Reduktion von Sauerstoff zu Wasser aufgrund eines Elektronenverlusts nicht erfolgen kann, zur Bildung sogenannter „reactive oxygen species“ (ROS), (Bandy et al., 1990). Zu den ROS gehören auch freie Radikale wie das Superoxid-Anion oder das Hydroxylradikal. In niedriger Konzentration spielen die ROS eine Rolle bei der Regulation der Apoptose (Curtin et al., 2002), der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder p38-MAP-Kinase (Owuor und Kong, 2002) sowie der Modulation der Expression von Strukturgenen antioxidativer Enzyme (Holgrem, 2003). Mit steigender Konzentration kehren sich diese durchaus nützlichen Eigenschaften der ROS ins Negative und zytotoxische Effekte gewinnen die Oberhand. So kommt es durch hohe ROS-Konzentrationen zur Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsproteine (Lentsch et al., 2000). Auch Mutationen der DNA, eine Inaktivierung von Enzymen und Lipidperoxidation mit der Folge einer Schädigung der Zellmembran sind mögliche Konsequenzen (Babbs et al., 1991; Janssen et al., 1993).

Um dies zu verhindern bestehen im menschlichen Organismus verschiedene antioxidative Schutzmechanismen wie Enzyme, Transportproteine (Transferrin, Ferritin, Coeruloplasmin), kleine Moleküle (Glutathion, Harnsäure, Bilirubin, Vitamin A, C, E u.v.m.) und Spurenelemente (Anaya-Prado et al., 2002; Jaeschke, 1995; Kiang und Tsokos, 1998; Korthuis et al., 1998). Besonders hervorzuheben sind an dieser Stelle die antioxidativen Enzyme Glutathionperoxidase (GPX-1) und Hämoxigenase (HMOX-1), da sie im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Die Hauptfunktion der Glutathionperoxidase besteht in der Elimination von Lipidperoxiden. Zur einwandfreien Funktion benötigt das Enzym Selen und Glutathion (Neve et al., 1989).

Hämoxigenasen sorgen für den Abbau von freiem Häm, welches neben den ROS eine Quelle freier Radikale ist, zu Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid (Liu und Ortiz de Montellano, 2000). Biliverdin kann dann in einem weiteren Schritt durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin abgebaut werden, woraus eine zusätzliche Hemmung der Lipidperoxidation resultiert (Abraham et al., 1995; Clark et al., 2000). Es sind 3 Isoformen der

Hämoxygenase (HMOX) bekannt. Diese Arbeit befasst sich mit der HMOX-1, einem Enzym aus der Familie der Hitzeschockproteine, das vor allem in Leber und Milz membrangebunden vorkommt (Maines, 1988; Maines, 1997). Es reagiert extrem empfindlich auf oxidativen Stress, welcher beispielsweise durch I/R, Hyperoxie und inflammatorische Zytokine ausgelöst wird und ist dadurch induzierbar (Amersi et al., 1999; Choi und Alam, 1996; Kudo und Kawako, 1999; Rizzardini et al. 1993; Takahashi et al., 1999; Terry et al., 1998).

Weitere Faktoren zur Regulation des oxidativen Stress finden sich in der Zelle in Form von Metallothioneinen (MT). Es handelt sich hierbei um cysteinreiche Proteine (bis zu 33 % Cystein) mit einem Molekulargewicht von 6-7 kD, die Metalle wie Silber, Cadmium, Kupfer, Quecksilber und Zink in Mercaptidkomplexen binden können. Die physiologische Bedeutung der MT ist jedoch weitgehend ungeklärt. Über die Chelatierung der Metalle durch die Thiolgruppen der Cysteinreste der MT wird die Metallhomöostase der Zelle aufrecht erhalten und evtl. schädigende Bindungen freier Metalle an andere Proteine verhindert. Eine weitere Funktion ist die eines Zinkspeichers zur Bereitstellung von Zink für verschiedene Enzyme (z.B. Zink-Proteinasen), als Aktivator von Transkriptionsfaktoren (Zinkfinger) oder für den intra- und interzellulären Signalweg in cerebralen Neuronen (Manet, 2000; Vasak und Hasler, 2000). Im Säugetiergewebe kommen 4 verschiedene Isoformen vor, wobei hier auf die Metallothioneine 1 und 2 (MT1, MT2), welche in allen Geweben exprimiert werden (Vasak und Hasler, 2000) näher eingegangen werden soll. Für MT1 und MT2 stellen Zink und Cadmium starke Induktoren dar. Weiterhin besteht eine enorm hohe Bindungsaffinität für die beiden Metalle (Zangger et al., 1999). Die MTs fungieren je nach Verhältnis von Glutathion (GSH) zu dessen oxidiertem Form (GSSG) als Metallendonatoren oder –speicher (Jacob et al., 1998; Maret und Vallee, 1998). Bei Auftreten von oxidativem Stress können über Cysteinreste somit ROS gebunden und im Austausch dazu gebundene Metalle freigesetzt werden (Kumari et al., 1998).

1.5 Chemotaktische Mediatoren im myokardialen Gewebeumbau

In den Modellen mit I/R kommt es im Zuge der inflammatorischen Reaktion neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Komplementaktivierung, die eine durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) initiierte Zytokinkaskade auslöst.

1.5.1 Zytokine

TNF- α

Nach kardialer Ischämie wird TNF- α insbesondere aus Mastzellen freigesetzt (Frangogiannis et al., 2002 c), aber auch andere Zellen des mononukleären Systems sowie Monozyten und Gewebsmakrophagen sind zur Produktion von TNF- α fähig (Davies und Hagen, 1997; Hehlhans und Pfeffer, 2005).

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und bewirkt die Mobilisation von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark, deren extravasale Transmigration und Aktivierung, sowie die Differenzierung und Aktivierung der mononukleären Zellen selbst. Daneben birgt es noch zahlreiche andere Funktionen, wie die Aktivierung der Lipolyse und Ausübung kataboler Einflüsse auf die Muskulatur mit der Folge einer Kachexie (daher veralteter Name „Kachexin“). Auch die Bildung von akute-Phase-Proteinen in der Leber, die Begünstigung der intravaskulären Thrombosebildung, immunmodulatorische Effekte und der Verlust von Tonus und Kontraktilität am Myokard gehören zu den Effekten von TNF- α (Davies und Hagen, 1997; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Induziert wird die TNF- α -Synthese durch gramnegative und grampositive Bakterien und deren Produkte (v.a. Lipopolysaccharid, LPS), Viren, Parasiten, Mykoplasmen, Immunkomplexe und Zytokine wie Granulozyten/Makrophagen-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), IL-1, IL-2, TNF- α selbst, Interferon- γ , Komplement C5a und Sauerstoffmetabolite.

Interleukin-1

Ein ähnliches Funktionsspektrum wie TNF- α weist Interleukin-1 (IL-1) auf. Neben seiner löslichen Form, dem IL-1 β besteht eine membrangebundene Form, das IL-1 α . IL-1 wird

von Monozyten produziert und v.a. durch LPS und Pyrogene stimuliert. Seine Wirkung besteht insbesondere in der Verstärkung der Synthese von GM-CSF und hepatischen akute-Phase-Proteinen sowie der Chemotaxis von aktivierten Leukozyten (Davies und Hagen, 1997; Dinarello, 2005).

Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) ist ein Zytokin, das zunächst als „cytokine synthesis inhibitory factor“ beschrieben wurde. Es ist ein inhibitorisches Zytokin, dessen protektive Rolle nach I/R durch eine Unterdrückung der akuten inflammatorischen Reaktion zustande kommt. Dies erfolgt über eine Hemmung der Induktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8). Produziert wird IL-10 von aktivierten TH2-Zellen, einer Subgruppe der T-Helferzellen, und endotoxin-stimulierten Monozyten (Grütz, 2005). IL-10 beeinflusst Monozyten/Makrophagen in Funktion, Morphologie und Phänotyp und spielt eine Rolle in der Formation der extrazellulären Matrix durch Modulation der Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (Tissue inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs); Lacraz et al., 1995). Weiterhin scheint es eine Rolle in der Angiogenese zu spielen (Cervenak et al., 2000; Silvestre et al., 2000). Ohne Reperfusion kommt es nicht zu einer signifikanten Induktion der IL-10-mRNA (Frangogiannis et al., 2000).

1.5.2 Chemokine

Die Chemokine sind zunächst als eine Untergruppe der Zytokine beschrieben worden und werden derzeit im Zusammenhang mit Inflammation bei myokardialer Ischämie intensiv erforscht. Es handelt sich um eine Superfamilie von polypeptiden Leukozytenchemoattraktoren. Sie induzieren eine schnelle und selektive Leukozytentransmigration (Bagiollini, 1998; Rollins, 1997). Es konnten vier Subklassen, abhängig von ihren beiden ersten N-terminalen Cysteinmotiven klassifiziert werden, die CXC-, CC-, C- oder CX3C-Chemokine.

CCL2 (alte Nomenclatur: Monocyte Chemoattractant Protein-1; MCP-1) ist eines der wichtigsten Chemokine der CC-Familie zur Rekrutierung von mononukleären Zellen und

deren Extravasation (Krishnaswamy et al., 1999; Weber KS et al., 1999). Zusammen mit IL-8 triggert es eine feste Adhäsion von Monozyten an Gefäßendothel (Gerszten et al., 1999). Auch im reperfundierten, infarzierten Myokard stellt CCL2 ein starkes chemotaktisches Signal für mononukleäre Zellmigration dar (Frangogiannis et al., 1998). Durch den Einfluss von IL-1, IL-6 und IL-8 wird CCL2 aus Endothelzellen freigesetzt (Krishnaswamy et al., 1999; Sica et al., 1990). Über den Transkriptionsfaktor NF κ B kann die CCL2-Expression moduliert werden (Brand et al., 1997; Gawaz et al., 1998). In Studien mit Phasen der kurzen repetitiven I/R konnte eine signifikante Induktion von CCL2 beobachtet werden, die dem fibrotischen Umbau des ischämischen Areals vorausging. CCL2 spielt eine Rolle im Remodeling (Frangogiannis, 2007). Untersuchungen an CCL2-defizienten Mäusen konnten dies belegen (Dewald et al., 2005). Hier kam es zu einer reduzierten Einwanderung von Makrophagen in heilendes Infarktgewebe und zu einer Hemmung des Umbaus der verletzten Kardiomyozyten und zu Granulationsgewebe. Begleitend war eine erniedrigte mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β , Transforming Growth Factor- β 2 und - β 3 (TGF- β 2, - β 3) und IL-10 zu beobachten, was zu einer verminderten Akkumulation von Myofibroblasten führte. Diese verlängerte inflammatorische Phase ging mit verlangsamtem inflammatorischem Remodeling einher (Dewald et al., 2005). Zudem konnte ein atherogenetisches Potential bei der CCL2-Expression aus Makrophagen nachgewiesen werden (Aiello et al., 1999).

Bei CCL3 (alte Nomenklatur: Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; MIP-1 α) handelt es sich, genauso wie bei CCL4 (alte Nomenklatur: Macrophage Inflammatory Protein-1 β ; MIP-1 β), um ein Chemokin aus der CC-Familie mit proinflammatorischen Eigenschaften (Wang et al., 1998). Es besteht zwar eine Überlappung bezüglich der Funktionen von CCL3 und CCL4, ganz identisch sind sie jedoch nicht. Beide induzieren die Migration von Monozyten und T-Lymphozyten. Während CCL3 aber eher auf B-Lymphozyten und CD-8-positive T-Zellen einwirkt, entfaltet CCL4 seine Aktivität bei aktivierten CD-4 positiven Zellen. Dazu ist CCL3 ein Chemoattraktor für neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und eosinophile Granulozyten. Zudem stimuliert es basophile Granulozyten zur Ausschüttung von Histamin. CCL3 spielt eine Rolle in der Auslösung einer Myokarditis, die durch Coxsackie-B3-Viren verursacht wird und in der inflammatorischen Antwort nach Infektion mit Influenzaviren (Cook et al., 1995; Cook, 1996). Eine erhöhte Expression von CCL3 konnte bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und im Mausmodell

nachgewiesen werden. Auch eine kardiale Ischämie, wie bei instabiler Angina pectoris, führt zu einer Induktion der CCL3-mRNA-Expression (de Jager et al., 2008). Durch die relativ spezifische Hochregulation im Rahmen der Ischämie könnte CCL3 als prädiktiver Marker kardiovaskulärer Ereignisse Bedeutung erlangen.

Kurze Episoden der I/R führen, wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, zu einer Anreicherung von ROS in reperfundiertem Myokard. In Abhängigkeit von TNF- α kommt es daraufhin zu einer Hochregulation von CCL3, CCL4 und CXCL2. Nossuli et al. zeigten in einem Mausmodell, dass es nach einmaliger kurzer I/R in Abwesenheit eines Infarkts zu einer ROS-abhängigen Hochregulation von CCL3, CCL4 und CXCL2 im Endothel von Venulen kommt (Nossuli et al., 2001). Das postkapilläre Netzwerk ist der Ort der Extravasation von Blutzellen, auf die die Chemokine durch Chemotaxis einen wichtigen Einfluss nehmen (Hawkins et al., 1996; Frangogiannis et al., 2002 c). Dazu beginnt die Angiogenese im Endothel von Venulen (Folkman, 1982). Die Induktion von CCL4 (ebenso CCL3 und CXCL2) könnte somit Auswirkungen auf Chemotaxis und Extravasation inflammatorischer Zellen haben und eine Rolle bei der Angiogenese im ischämisch-reperfundierten Myokard spielen.

CXCL2 (alte Nomenklatur: Macrophage Inflammatory Protein-2; MIP-2) ist ein proinflammatorisches CXC-Chemokin, das die kardiale Ischämie durch Stimulierung polynukleärer Leukozyten und Monozyten beeinflusst (Chandrasekar et al., 2001; Massey et al., 1995; Tarzami et al., 2001).

1.6 Mediatoren im Gewebeumbau

1.6.1 Tenascin

Im ischämischen Gewebe differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten und exprimieren neben α -smooth muscle actin (α -SMAC) das matrizelluläre Protein Tenascin (TNC). TNC ist ein multifunktionales Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das vor allem während der Embryonalentwicklung und beim Erwachsenen im Geweb remodeling vorkommt (Frangogiannis et al., 2002 a, b).

1.6.2 Transforming Growth Factor- β

Bei der Differenzierung der Myofibroblasten wird dem Transforming Growth Factor- β (TGF- β) eine aktive Rolle zugeschrieben (Frangogiannis et al., 2002 a, b, c). Im hibernierenden Myokard erfolgt eine Hochregulation von TGF- β (Elsässer et al., 2000). Die TGF- β -Familie umfasst mehr als 30 Faktoren. Beim Menschen kommen TGF- β 1 bis -3 vor. TGF- β 2 und -3 sind vor allem im Nervensystem zu finden, kommen hier stets zusammen vor und weisen identische Effekte auf. Darüber hinaus aber kommt TGF- β 2 in vielen embryonalen Geweben vor und ist wichtig für die Fibroseentstehung und damit für das Remodeling (Deten et al., 2001; Jakowlew et al., 1994). TGF- β 3 spielt eine Rolle in der embryonalen Herzentwicklung (Potts et al., 1991). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen der TGF- β 3-Expression und der Kollagenexpression sowie der Expression von MMP-2 und TIMP-2 an einem Infarktmodell der Ratte nachgewiesen werden (Deten et al., 2001). Der biologische Effekt der verschiedenen TGF- β -Isoformen wird durch deren Verhältnis untereinander bestimmt (Deten et al., 2001; Massagué, 1990; Wells, 2000).

In infarziertem Myokard sorgt TGF- β 1 nach Aktivierung von Komplement 5 (C5) für eine frühe Leukozyten- und Monozytenrekrutierung (Bridsall et al., 1997; Frangogiannis et al., 2002 a, b, c). TGF- β -Freisetzung aus ischämisch verletzten Zellen führt zur Einwanderung mononukleärer Zellen (Kumar et al., 1997). Diese produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), welche zu Fibroblastenproliferation und Angiogenese führen und damit die Grundlage zur Entstehung einer Infarktnarbe bilden. Dabei wird die Reifung der Makrophagen durch Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) während der Reperfusion initiiert, die Mastzellendifferenzierung und - einwanderung durch den „stem cell factor“ vermittelt. TGF- β 1 reguliert das Wachstum von Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten und ist an der Modulation der extrazellulären Matrix durch Stimulierung von MMPs und TIMPs beteiligt (Desmouliere et al., 1993; O’Kane und Ferguson, 1997; Sappino et al., 1990 a, b; Thompson et al., 1988). Begleitet werden diese Prozesse von einer vermehrten OPN-Expression (Dobaczewski, 2010). TGF- β 1 stellt einen der potentesten und am weitesten verbreiteten profibrotischen Mediatoren im menschlichen Organismus dar (Wells, 2000).

1.6.3 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind die Hauptmediatoren des Remodeling auf der Ebene der extrazellulären Matrix und spielen eine zentrale Rolle bei der Organentwicklung und im Gewebsremodeling im Rahmen von Entzündung und Verletzung (Liu et al., 2006). Je nach Substratspezifität und chemischer Struktur werden sie in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und MT-(membrane type) MMPs unterteilt (Murphy und Nagase, 2008). Mit Ausnahme der MT-MMPs, welche membrangebunden sind, werden die MMPs als inaktive Proenzyme in den Extrazellulärraum sezerniert. Ihre Produktion erfolgt durch verschiedene Zellen, wie Fibroblasten, Myozyten, glatte Muskelzellen oder Makrophagen (Hartung, 2000; Spinale et al., 2000; Takino et al., 1995). Die Regulation dieser proteolytischen Enzyme erfolgt hauptsächlich über proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interleukine (Spinale et al., 2000). Durch zusätzliche Aktivierungssignale wie ROS, ischämische Trigger (Thrombin, Chymase) oder Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) aus Mastzellen wird das Propeptid abgelöst und somit das Enzym durch Freilegen der aktiven Stelle aktiviert (Stewart et al., 2003). Dieser Prozess kann auch durch MT-MMPs oder andere proteolytische Faktoren wie Plasminogenaktivatoren oder Plasmin katalysiert werden, wobei letztere durch Inflammation oder bei Aktivierung der Gerinnungskaskade entstehen (Heymans et al., 1999; Sun et al., 2004). In diesem Zusammenhang können MMPs eine Rolle bei der atherosklerotischen Plaqueruptur spielen und durch ein Einwirken ihrer Enzymaktivität auf die lokale fibrotische Kappe eine zunächst chronische Erkrankung in einen akuten Myokardinfarkt verwandeln (Liu et al., 2006). Weiterhin sind sie am Fortschreiten des ventrikulären Remodeling nach Myokardinfarkt mit den Folgen von ventrikulärer Hypertrophie und Dilatation dadurch beteiligt, dass sie einen Zusammenbruch des Kollagen- und Elastinnetzwerkes bewirken (Liu et al., 2006).

Die TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) sind endogene Inhibitoren der MMPs und damit wichtige Regulatoren im Umbau der extrazellulären Matrix und beim Gewebsremodeling. Sie spielen eine Rolle als Promotoren der Zellproliferation, haben eine antiangiogenetische Wirkung sowie pro- und antiapoptotische Eigenschaften (Brew und Nagase, 2010). Insgesamt existieren vier verschiedene TIMPs (TIMP-1 bis -4). Sie alle fungieren als Inhibitoren der MMPs, haben allerdings unterschiedliche Affinitäten zu

bestimmten Inhibitor-Protease-Paaren, wobei TIMP-3 das breiteste Inhibitionsspektrum bezüglich der MMPs aufweist (Nagase und Murphy, 2008). Die Interaktionen sind relativ spezifisch, wobei durch Bildung eines Komplexes die Aktivierung der MMPs bzw. deren proteolytische Aktivität gehemmt wird. So besitzt TIMP-1 eine erhöhte Affinität zum Propeptid von MMP-9, aktiviertem MMP-9 und MMP-3 (Alvarez et al. 1990; Nagase und Murphy, 2008).

TIMP-2 bildet in erster Linie über seine N-terminale Domäne einen Komplex mit dem Propeptid von MMP-2 und mit aktiviertem MMP-2. Über die Interaktion mit Pro-MMP-2 ist es darüber hinaus Teil des Aktivierungsmechanismus von pro-MMP-2 zu aktiviertem MMP-2 (Atkinson et al., 1995; Bernardo und Fridman, 2003; Itoh et al., 2001).

Anders als TIMP-1- und 2 liegen TIMP-3 und -4 im Interstitium nicht als freie Moleküle vor, sondern sind an Bestandteile der extrazellulären Matrix gebunden (Greene et al., 1996; Pavloff et al., 1992). TIMP-3 inhibiert die Aktivierung von pro-MMP-2 (English et al., 2006) und scheint eine Rolle bei degenerativen Erkrankungen der Retina zu spielen (Langton et al., 1998). TIMP-4 konnte bislang nur im Herzmuskelgewebe nachgewiesen werden (Gomez et al., 1997) und hemmt effektiv die pro-MMP-2-Aktivierung durch Inhibierung von MT1-MMP (Bigg et al., 2001).

1.7 Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren

Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren und gehören zur Superfamilie nukleärer Hormonrezeptoren, wie z.B. dem Steroidhormonrezeptor (Isseman und Green, 1990). Die Regulation der Genexpression erfolgt zunächst durch Ausbildung eines heterodimeren Komplexes mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), welcher ein verbreiteter Bindungspartner für zahlreiche nukleäre Hormonrezeptoren, wie z.B. den Schilddrüsenhormonrezeptor oder den Vitamin-D-Rezeptor, darstellt (Mangelsdorf und Evans, 1995). Mit Hilfe dieses Komplexes werden in einem zweiten Schritt PPAR-respose-Elemente (PPAREs) erkannt, welche in der Promotorregion der Zielgene lokalisiert sind (Schoonjans et al., 1996; Tugwood et al., 1992). Bisher konnten 3 Subtypen von PPAR identifiziert werden, PPAR- α , PPAR- β und PPAR- γ (Dreyer et al., 1992). Sie entfalten verschiedene physiologische Funktionen, abhängig von ihrer Gewebsexpression, Ligandenbindungs-

spezifität und spezifischer physiologischer Funktion bei Aktivierung (Pruimboom-Brees et al., 2006). Synthetische Liganden sind unter anderem lipidsenkende Fibratderivate, wie z.B. Fenofibrat, sowie antidiabetische Thiazolidindione, wie z.B. Troglitazon und Rosiglitazon. Natürlich vorkommende Peroxisom-Proliferatoren bilden neben Fettsäurederivaten auch Eicosanoide wie Prostaglandine und das Leukotrien B₄ (Forman et al., 1995; Krey et al., 1997).

PPAR- α wird vor allem in Geweben exprimiert, die eine hohe Rate an β -Oxidation aufweisen z.B. braunes Fettgewebe, Leber, Herz, Niere und Skelettmuskulatur (Auboeuf et al., 1997). PPAR- α hat auf transkriptionaler Ebene eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Fettsäureoxidation, indem es die Expression von Genen, welche für die Aufnahme von Fettsäuren und deren Stoffwechsel verantwortlich sind, steuert (Mandard et al., 2004). Es gilt als therapeutisches Ziel bei Dyslipidämien. Hierbei werden seit mehreren Jahrzehnten Fibrate als PPAR-Agonisten aufgrund ihres triglyceridsenkenden und HDL-steigernden Effektes genutzt (van Raalte et al., 2004). In neueren Studien wurden zudem antiinflammatorische und antithrombotische Eigenschaften der PPAR-Agonisten auf die Gefäßwände beobachtet, was zu einer Minderung der Atherosklerose beitragen könnte (Li et al., 2004; Rubins et al., 1999). So führt die Aktivierung von PPAR- α in Monozyten/Makrophagen zur Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität, während die Aktivierung von PPAR- γ die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine inhibiert (Jiang et al., 1998). In Endothelzellen wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und auch die Leukozytenadhäsion durch Fenofibrat, als synthetischen PPAR- α -Liganden blockiert (Marx et al., 1999 a). Zudem inhibieren PPAR- α -Aktivatoren die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, aus glatten Gefäßmuskelzellen. PPAR- γ hemmt die Expression chemotaktisch wirksamer Mediatoren in den Endothelzellen und damit die Migration proinflammatorischer Zellen (Marx et al., 1999 b). Insgesamt spiegelt sich in der Vielzahl der durch PPAR beeinflussten Mechanismen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen wider.

Im Gegensatz zu den klar definierten Effekten der PPAR-Agonisten auf den Lipidmetabolismus und die Cholesterollhomöostase sind die Wirkungen der PPAR- α -Aktivität auf den kardialen Stoffwechsel und die kardiale Funktion sowie deren pathophysiologische Konsequenzen noch nicht genügend erforscht (Pruimboom-Brees et al., 2006). Ein Mäuseherz etwa gewinnt in Ruhe ca. 70 % seiner Energie aus der β -

Oxidation der Fettsäuren, der Rest wird durch Glykolyse und Glucoseoxidation bereitgestellt (Taegtmeyer, 1994). Der relative Beitrag der β -Oxidation an der kardialen Energieproduktion steigt beim Fasten, im Rahmen eines Diabetes oder unter experimentellen Bedingungen. Dies führt zu einer vermehrten Expression von PPAR- α und damit zur Aktivierung von Genen, die an der Aufnahme und Degradierung von Fettsäuren beteiligt sind. Hierdurch wird eine suffiziente Energieversorgung des Myokards gewährleistet. Ein herabgesetzter PPAR- α -Level wurde in Nagetiermodellen mit ventrikulärer Druckbelastung und im insuffizienten menschlichen Herzen beobachtet. Dies ging mit einem erhöhten Verbrauch an Glucose und Laktat einher (Barger et al., 2000; Depre et al., 1998; Sack et al., 1996; Sack et al., 1997). Studien an transgenen Mäusen mit kardialer Überexpression von PPAR- α haben gezeigt, dass PPAR- α die β -Oxidation und den Glucoseverbrauch reguliert (Finck et al., 2002). Die PPAR- α -Überexpression führte darüber hinaus zu einer Kardiomyopathie, ähnlich der beim Diabetes (Finck et al., 2003). Pruijboom-Brees et al. postulierten 2006, dass eine chronische Aktivierung von PPAR- α zu einer Nekrose von Kardiomyozyten führt. In der Studie wurden verschiedene potente und selektive PPAR-Agonisten verwendet, was die Abhängigkeit von einem bestimmten Agens widerlegt und den Klasseneffekt unterstreicht. Die Erhöhung der peroxisomalen β -Oxidation durch eine persistierende PPAR- α -Aktivierung korreliert zunächst mit dem Auftreten mikroskopischer Verletzungen und einer dadurch bedingten Erhöhung der Serumbiomarker für kardiale Schädigung (Prujboom-Brees et al., 2006). Die Myokardnekrose ist letztendlich die Konsequenz aus anhaltend erhöhter peroxisomaler β -Oxidation und einer begleitenden Schädigung durch oxidativen Stress (Prujboom-Brees et al., 2006). So kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Hydrogenperoxid und ROS in PPAR- α -überexprimierten Mäusen (Finck et al., 2003). Eine zusätzliche Evidenz für das Vorhandensein von oxidativem Stress ist die Hochregulation des Glutathion-Systems und von Enzymen, die ROS eliminieren (Dewald et al., 2004; Pruijboom-Brees et al., 2006).

1.8 Cannabinoidrezeptoren

Als Endocannabinoide werden körpereigene Substanzen bezeichnet, die in ihrer Wirkung derjenigen von Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) ähneln, welches um 1960 als primär psychoaktiver Wirkstoff der Hanfpflanze *Cannabis sativa* entdeckt wurde (Gaoni et al., 1964). Die beiden am meisten erforschten Endocannabinoide sind Arachinodylethanolamid (oder Anandamide, hergeleitet von „a-nanda“, dem Sanskritwort für Glückseligkeit, Freude und Genuss) und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1998). Ihre biologischen Effekte werden über spezielle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt (Howlett et al., 1990). Bisher konnten zwei Cannabinoidrezeptoren (CB) durch molekulares Cloning identifiziert werden. Der CB1 ist am weitesten im Hirngewebe verbreitet (Matsuda et al., 1990), kommt aber auch in verschiedenen peripheren Geweben, wie dem Blutgefäßsystem (Gebremedhin et al., 1999; Liu et al., 2000), dem Herzen (Batkai et al., 2004 b) und der Leber vor (Engeli et al., 2005; Teixeira-Clerc et al., 2006). Vom CB2 wurde zunächst angenommen, dass er vornehmlich in immunologischen und hämatopoetischen Zellen exprimiert werde (Munro et al., 1993; Valk und Delwel, 1998). Neuere Studien fanden ihn allerdings auch im Gehirn (Van Sickle et al., 2005), im Myokard (Mukhopadhyay et al., 2007), in Endothelzellen (Blazquez et al., 2003) und in Kardiomyoblasten (Mukhopadhyay et al., 2007; Shmist et al., 2006). Durch die Einführung von Rimonabant (SR141716A), einem CB1-Agonisten zur Therapie bei Adipositas, wurde die Aufmerksamkeit erstmalig auf das Potential gelenkt, über das Endocannabinoidsystem kardiovaskuläre Risiken zu senken (Van Gaal et al., 2005). Allgemein betrachtet bewirken Cannabinoide in vivo akut eine Tachykardie sowie eine Vasodilatation mit unterschiedlicher Wirkung auf den Blutdruck (Huestis et al., 1992; Kanakis et al., 1976). Längerfristig kommt es CB1-vermittelt zu Bradykardien und arterieller Hypotonie (Benowitz und Jones, 1975; Rosenkrantz und Braude, 1974).

Die Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei der myokardialen I/R wurde erstmals von Wagner et al. am Rattenmodell belegt (Wagner et al., 2001). In nachfolgenden Studien zeigten Lagneux und Lamontagne die Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei der myokardialen Präkonditionierung durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid (LPS); Lagneux und Lamontagne, 2001). LPS erhöht die Produktion von

Endocannabinoiden in inflammatorischen Zellen (Liu et al., 2003; Varga et al., 1998). In isolierten Rattenherzen führte eine Vorbehandlung mit LPS zur Reduktion der Infarktgröße und erhöhte die funktionelle Erholung des Myokards nach Reperfusion (Lagneux und Lamontagne, 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten nach hitzestress-getriggelter myokardialer Präkonditionierung beobachtet werden (Joyeux et al., 2002). In beiden Fällen konnte zudem gezeigt werden, dass die Effekte durch den CB2-Antagonisten SR144528, nicht aber durch den CB1-Antagonisten SR141716 unterdrückt werden konnten, was eine Beteiligung myokardialer CB2-Rezeptoren nahelegt (Joyeux et al., 2002; Lagneux und Lamontagne, 2001). Im Gegensatz dazu verschwand der kardioprotektive Effekt nach myokardialer Präkonditionierung durch kurze Ischämiephasen (5 Min.) sowohl nach Blockade von CB1 als auch von CB2 (Bouchard et al., 2003). In einer neueren Studie beschrieben Wagner et al. eine CB1-vermittelte Beteiligung des Endocannabinoidsystems an der NO-induzierten myokardialen Präkonditionierung (Wagner et al., 2006). Ihre kardioprotektive Wirkung vermitteln Cannabinoide durch Aktivierung von PKC (Proteinkinase C), den ERK (extrazelluläre signalregulierte Kinase) 1/2-Signalweg und p38 MAP-Kinase (Lepicier et al., 2003). An verschiedenen Organen, wie der Leber (Batkai et al., 2007; Rajesh et al., 2007), im Gehirn (Zhang et al., 2007) und auch am Herzen (Hiley und Ford, 2004; Joyeux et al., 2002; Lamontagne et al., 2006; Underdown et al., 2005) konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide zu einer Reduktion der ischämie- und reperfusionsbedingten Nekrose beitragen können. Eine Verringerung nekrotischer Kardiomyozyten konnte auch im Zellkulturmodell nach Einwirkung von Cannabinoiden beobachtet werden (Defer et al., 2009). Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass die Rolle der Cannabinoidrezeptoren und Endocannabinoide in der Kardioprotektion durch myokardiale Präkonditionierung bei I/R ein noch sehr kontrovers diskutiertes Thema ist.

1.9 Osteopontin im Gewebeumbau

Die o.g. Gewebeumbau-Prozesse werden von einer vermehrten Osteopontin- (OPN)-Expression begleitet (Baliga et al., 2011; Patouraux et al., 2012; Yu et al., 2009). OPN ist ein multifunktionales Phosphoglykoprotein, das erstmals 1986 von Oldberg et al. im Knochen identifiziert wurde (Oldberg et al., 1986). In Abhängigkeit von verschiedenen

Modifikationen (post-transkriptionales Spleißen der RNA, post-translationale Phosphorylierung und Glykolysierung) ist es zwischen 44 und 75 kDa groß (O'Regan und Berman, 2000; Singh et al., 1990). Sein Genort ist *ssp-1* (secreted phosphoprotein-1). Es ist Bestandteil der nicht-kollagenen Knochenmatrix und wird sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten gebildet. Allerdings beschränkt sich das Vorkommen von OPN nicht nur auf den Knochen. Vielmehr konnte seine Expression in zahlreichen anderen Geweben wie Haut, Niere, Leber, Lunge, Herz, den Blutgefäßen und im Fettgewebe nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, dass OPN, als Bestandteil der extrazellulären Matrix eine Schlüsselfunktion bei vielen inflammatorischen Prozessen im Körper einnimmt. Während es als Polymer vorwiegend mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Kollagenen interagiert (Kaartinen et al., 1999), steuert es als Monomer mit zytokinartiger Wirkung die Migration und Adhäsion inflammatorischer Zellen. Außerdem induziert es die Expression entzündlicher Moleküle und hemmt die Apoptose (Denhard et al., 2001 a; Liaw et al., 1995; Senger et al., 1996). Seine Wirkung entfaltet OPN durch Bindung an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren wie CD44 oder Integrine (u.a. β 1-Integrin, α β 3, α β 5; Sodek et al., 2000). Neben inflammatorischen Eigenschaften hat OPN als Faktor für die zelluläre Immunantwort auch immunmodulatorische Wirkungen. Eine andere Bezeichnung für OPN ist in diesem Zusammenhang Eta-1 (early T-Lymphocyte activation 1; Paterca et al., 1989; Paterca et al., 1993). Es verstärkt die Wirkung der TH1-Zytokin-Expression (IL-12, Interferon- γ , IL-2) und inhibiert die Expression der TH2-Zytokine (IL-10, IL-4). Die Organwirkung von OPN beinhaltet die Modulation von inflammatorischem Geschehen. An der Niere wird OPN von Zellen des distalen proximalen Tubulus bei tubulärer Verletzung exprimiert, wie sie im Rahmen der Glomerulonephritis vorkommt (Patarca et al., 1989; Ross et al., 1993). OPN spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis, Akkumulation und Adhäsion von Monozyten/Makrophagen. Im Rahmen der Adipositas sorgt OPN über inflammatorische Zytokine wie TNF- α , Interleukine und CCL2 für die Förderung der Makrophagen-Akkumulation und für eine chronische Fettgewebsentzündung. Diese chronischen entzündlichen Prozesse scheinen in kausalem Zusammenhang mit der Entstehung der Insulinresistenz bei adipösen Menschen und dem Typ-2-Diabetes zu stehen (Hotamisligil, 2006; Weisberg et al., 2003). OPN ist zudem an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt, indem es die Migration von glatten Muskelzellen

und Makrophagen in atherosklerotische Läsionen und deren Akkumulation fördert. Eine Überexpression von OPN führt hier zu einer Größenzunahme der Läsion, während OPN-Defizienz die Plaquegröße reduziert. Zusätzlich ist OPN an Mechanismen beteiligt, die zu Plaqueruptur führen (Scatena et al., 2007).

Am Herzen konnte die Rolle von OPN in der Regulation von Kollagensynthese und –Ablagerung sowie Remodeling nach Infarkt anhand eines Infarktmodells an Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Trueblood et al., 2001). Das Fehlen von OPN induziert dabei die linksventrikuläre Dilatation und ist mit einer verminderten Kollagensynthese und –ablagerung assoziiert (Singh et al., 2010).

Suazewa et al. konnten in einer Studie mit Patienten, die einer erfolgreichen Revascularisation nach akutem Vorderwandinfarkt unterzogen worden waren, eine positive zeitliche Korrelation zwischen Plasma-OPN-Spiegel und linksventrikulärer Ejektionsfraktion nachweisen. Auch bei Risikopatienten mit relevanten atherosklerotischen Läsionen in der LAD bestand ein Zusammenhang zwischen Plasma-OPN-Spiegel und linksventrikulärem Volumen und Funktion (Suazewa et al., 2005). Die protektive Rolle des OPN nach ischämischer Verletzung könnte in der Induktion einer späten Präkonditionierung (siehe Kapitel 1.3) liegen (Wang et al., 2009). Zudem schützt OPN kardiale Fibroblasten nach Reperfusion über den Caspase-3-Weg vor dem Zelltod, welcher bei OPN-defizienten Zellen verstärkt zu beobachten ist (Zohar et al., 2004).

1.10 Hypothese

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob OPN eine kardioprotektive Rolle im myokardialen Gewebeumbau nach kurzen repetitiven I/R Episoden am Mausherzen ausübt.

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodell der kurzen, repetitiven myokardialen Ischämie und Reperfusion

2.1.1 Protokoll der initialen Operation

Als Grundlage für den initialen Eingriff fungierte das Modell der myokardialen I/R von Dewald et al. (Dewald et al., 2003). Die Anästhesie der Tiere wurde durch intraperitoneale Injektion eines Natrium-Pentobarbital-Gemisches (60 µl/g Körpergewicht) induziert. Es bestand aus 1,8 ml Pentobarbital (Nembutal 50 mg/ml; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA), 4 ml 100 %igem Ethanol (Aaper Co., Shelbyville, KY, USA) und 16 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung (Baxter, Deerfield, IL, USA). Nachdem die Mäuse am Thorax rasiert waren wurden sie in Rückenlage mit Klebeband an ihren Extremitäten auf dem Operationstisch fixiert. Die Regulation der Körpertemperatur erfolgte durch eine Heizplatte auf dem Operationstisch.

Um den Zugang zur Trachea zu erleichtern wurde der Nacken leicht überstreckt, indem eine 3-0 Seidenfadenschlinge (Surgical Silk, Ethicon, Somerville, NJ, USA) in angemessener Spannung um die oberen Nagezähne gelegt wurde. Die anschließende Hautdesinfektion wurde mit Betaisodona (Mundipharma GmbH, Limburg, D) durchgeführt. Unter Sichthilfe eines Mikroskops (Stemi 2000-CS, Zeiss, Jena, D) wurde der Hautschnitt medial von submental bis zum Xiphoid geführt und die Hautlappen zur Seite präpariert. Peritracheales Fettgewebe und Muskulatur wurden ebenfalls seitwärts verschoben und so die Trachea freigelegt. Die Intubation erfolgte nach Anheben des Zungengrunds durch leichtes Herausziehen der Zunge mit einem aus Polyethylen (PE) gefertigten PE-90 Tubus (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Die korrekte Lage des Tubus (etwa 5-8 mm distal des Larynx) wurde unter Sichtkontrolle überprüft. Das freie Tubusende wurde über einen PE-160 Verbindungsschlauch an einen Kleintierventilator (Mini Vent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) angeschlossen und am Operationstisch fixiert. Die Beatmung erfolgte mit 100 %igem Sauerstoff bei einem Atemminutenvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von ca. 110/Minute.

Die Thorakotomie erfolgte links parasternal unter Durchtrennung der 3.-5. Rippe mit anschließender Blutstillung durch elektrisches Kauterisieren (Codman, Randolph, MA,

USA). Der Thorax wurde anschließend durch eine rechtsseitige und zwei linksseitige transthorakale 6-0-Prolene[®]-Nahtschlingen (Ethicon) offen gehalten. Nach stumpfer Perikardiotomie wurde der RIVA (Ramus interventrikularis anterior) lokalisiert. Eine 8-0-Prolene[®]-Ligatur (Ethicon) wurde 1-3 mm distal des linken Atriums um den RIVA vorgelegt. Um diesen Vorgang zu erleichtern wurde die Nadel u-förmig gebogen. Die Fadenenden wurden durch einen 0,5 mm lang geschnittenen und in 100 %igem Ethanol desinfizierten PE-10-Tubus (Becton Dickinson) gefädelt. Mit einer Kalt-Nadel (Größe 3; Fine Science Tools, Lausanne, CH) wurden die Fadenenden an den entsprechenden Seiten transthorakal geführt und in subkutanen Hauttaschen im Bereich der Axilla verstaut.

Der Thoraxverschluss erfolgte daraufhin durch drei bis vier 6-0-Prolene[®]- Einzelknopfnähte. Besondere Vorsicht galt während der gesamten Operation der Arteria thoracica interna sowie der rechten Lunge mit dem Ziel, eine unstillbare Blutung sowie einen Pneumothorax zu vermeiden. Durch kurzes Abklemmen des Tubus vor dem Festziehen der letzten Naht des Thoraxverschlusses wurde die Lunge vollständig aufgebläht und die Beatmung beendet. Die Spontanatmung setzte für gewöhnlich innerhalb einer Minute ein. Bis zum Ende des Eingriffs atmeten die Tiere 100 %igen Sauerstoff. Zuletzt wurde die Hautwunde mit Hilfe einer fortlaufenden 6-0-Prolene[®]-Naht wieder verschlossen. Zum Ende des Eingriffs wurde der Tubus entfernt und 0,5 ml einer Lösung intraperitoneal appliziert, die dem Volumenersatz, der Schmerzstillung sowie der Infektionsprophylaxe diente. Sie bestand aus 100 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, 800 µl Metamizol und 8 ml Zinacef[®] (Himka Pharma GmbH, Graefelfing, D). Das Aufwachen erfolgte unter Sauerstoffgabe, unterstützt von einer Infrarot-Heizlampe. Anschließend erholten sich die Mäuse für 7-10 Tage von dem initialen Eingriff. Diesem Operationsprotokoll wurden sowohl Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) als auch Osteopontin-Knockout-Mäuse (OPN^{-/-}-Mäuse) unterzogen.

2.1.2 Protokoll der repetitiven Ischämie und Reperfusion

Das Protokoll bestand aus täglichen, 15-minütigen Ischämieepisoden, die über einen Zeitraum von 3, 5 und 7 Tagen wiederholt wurden, sowie aus der anschließenden jeweils 24-stündigen Reperfusion. Am Tage der letzten Ischämie wurde 5 Stunden nach

der 15-minütigen RIVA-Okklusion das Herz entnommen (siehe Kap. 2.3.1). Zur Anästhesie der Mäuse während der täglichen 15-minütigen Ischämie wurde den Tieren bei Spontanatmung über eine Nasenmaske ein Gemisch aus 1,5 %igem Isofluran (Isoflo, Abbott Laboratories) und Sauerstoff (1l/Minute) zugeführt. Die Versuchstiere wurden in Rückenlage an ihren Extremitäten mittels Klebeband und EKG-Kontaktcreme (Signa Elektrode Cream; Parker Laboratories, NJ, USA) auf EKG-Ableitungsflächen am Operationstisch befestigt. Das EKG wurde mit Hilfe der zweiten Ableitung nach Einthoven aufgezeichnet.

Nach Entfernung der Hautnaht wurde die Haut eröffnet und die zuvor in den axillären Hauttaschen verstauten Fadenenden der RIVA-Schlinge an einem mobilen Metallzylinder mittels Klebeband befestigt. Unter Beobachtung des EKG wurden die Metallzylinder langsam auseinander gezogen, die Fäden dadurch gespannt und die Ligatur zugezogen, was wiederum eine Okklusion des RIVA zur Folge hatte. Als Ischämiezeichen wurde eine ST-Streckenhebung im EKG festgestellt. Die Ischämie wurde daraufhin 15 Minuten lang aufrechterhalten. Danach wurden die Fadenenden von den Metallzylindern gelöst und wieder unter die Haut verlegt, welche daraufhin verschlossen wurde. Eine erfolgreiche Reperfusion wurde durch die Normalisierung der ST-Strecke bestätigt. Die Reperfusion erstreckte sich über 24 Stunden, bis zur nächsten Ischämie-Episode. Zuletzt erhielten die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml des oben genannten Analgesie/Antibiotika-Gemisches.

EKG- Aufzeichnungen wurden vor, zu Beginn und am Ende einer jeden Ischämie, sowie nach Hautverschluss - Reperfusion - durchgeführt. Das Protokoll galt für WT- und OPN^{-/-}-Mäuse. Tiere, bei welchen die ST-Hebung persistierte und dadurch auf einen Myokardinfarkt schließen ließ, wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

2.1.3 Gruppendifinition

WT-Mäuse

In der vorliegenden Arbeit wurden C57/BL6-WT-Mäuse (Charles River) im Alter von 8-12 Wochen und einem Körpergewicht von 17 bis 25 g von der Firma Harlan Sprague Dawley (Houston, TX, USA) verwendet.

Die Untersuchungen wurden an Kontroll- und I/R-Mäusen nach 3, 5 und 7 Tagen durchgeführt. Alle Gruppen bestanden aus 10 bis 12 Tieren.

Die Tierhaltung erfolgte artgerecht unter Beachtung der Tierversuchsgenehmigung mit der Nummer 50.203.2-BN 3, 14/03 erteilt durch die Bezirksregierung Köln im zentralen Tierhaus der Universitätsklinik Bonn.

1.) Kontrollgruppen: Bei den Mäusen der Kontrollgruppen wurde eine initiale Operation, aber kein I/R-Protokoll durchgeführt. Die Herzentnahme erfolgte nach einer 7-tägigen Erholungsphase im Anschluss an die Initial-OP (0 Tage-Kontrollgruppe). Die Untersuchung der mRNA und die histologische Begutachtung der Kontrollgruppentiere sollte Aufschluss geben über die Induktion einer Inflammationsreaktion durch das Trauma der Initialoperation mit dem Ziel, eine etwaige unerwünschte Induktion später von der mRNA-Induktion durch die I/R-Ereignisse unterscheiden zu können.

2.) I/R-Gruppen: Ab dem 7. postoperativen Tag nach der initialen Operation wurden die Mäuse der I/R-Gruppen täglich für die oben bereits genannten unterschiedlichen Zeitspannen dem I/R-Protokoll unterzogen. Demzufolge waren die weiteren Versuchstiere in die 3-, 5- und 7-Tage-I/R-Gruppen einzuteilen mit dem Ziel, den Verlauf der durch I/R verursachten mRNA-Induktion über eine Zeitspanne von einer Woche nachzuverfolgen.

OPN^{-/-}-Mäuse

Die Versuche wurden an OPN^{-/-}-Mäusen durchgeführt, die das gleiche Alter und Gewicht wie die WT-Mäuse hatten.

Die homozygoten OPN^{-/-}-Mäuse für unsere Zucht wurden uns freundlicherweise von S. Rittling-Rutgers zur Verfügung gestellt. Die Verpaarung erfolgte nach den Richtlinien der Tierversuchsgenehmigung mit der Nummer 50.203.2-BN 3, 14/03 erteilt durch die Bezirksregierung Köln. Die Homozygotie der neugeborenen Mäuse für die Deaktivierung des OPN-Merkmals wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an Mäuseschwanz-DNA getestet. Die Untersuchungen wurden an Kontroll- und I/R-Mäusen nach den o.g. Zeitintervallen analog zu den WT-Tieren durchgeführt. Alle Gruppen bestanden aus 7 bis 10 Tieren. Die Tierhaltung erfolgte wie bei den WT-Tieren.

- 1.) Kontrollgruppe: Es wurde die Initial-Operation ohne Anwendung eines I/R-Protokolls durchgeführt und die entsprechenden mRNA-Messungen sowie die histologischen und echokardiographischen Untersuchungen durchgeführt.
- 2.) I/R-Gruppen: Ähnlich wie bei den WT-Mäusen wurde auch hier das I/R-Protokoll von 3 bis 7 Tagen angewendet (jeweils mit 3-, 5- und 7-Tagen-I/R).

2.2 Echokardiographie zur Untersuchung der ventrikulären Pumpfunktion

Echokardiographische Messungen wurden jeweils ca. 5 Stunden nach der letzten Ischämieepisode mittels eines 15 MHz-Linearschallkopfes (HDI-5000, ATL Phillips, Oceanside, CA, USA) durchgeführt.

Anhand von motion-mode (M-Mode)-Aufnahmen in kurzer Achse wurden systolischer und diastolischer Durchmesser des linken Ventrikels sowie die Vorderwanddicke gemessen. Um die Ventrikelfunktion der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse zu beschreiben, wurden aus diesen Daten die Fraktionsverkürzung ("fractional shortening", FS) und die Vorderwandverdickung ("anterior wall thickening", AWT) nach folgenden Formeln berechnet:

$$FS (\%) = \frac{LV_{diast} - LV_{syst}}{LV_{diast}} \times 100$$

$$AWT (\%) = \frac{VW_{syst} - VW_{diast}}{VW_{syst}} \times 100$$

Die FS gibt Auskunft über die globale linksventrikuläre Pumpfunktion und wird aus den systolischen (LV_{syst}) und den diastolischen (LV_{diast}) linksventrikulären Durchmessern bestimmt.

Die AWT beschreibt die regionale Pumpfunktion der Vorderwand. Sie errechnet sich aus den Werten der systolischen (VW_{syst}) und diastolischen Vorderwanddicke (VW_{diast}).

2.3 Probenaufbereitung

2.3.1 Gewinnung der Gewebeproben

Am letzten Versuchstag wurde der Maus nach fünfstündiger Reperfusion eine letale Dosis (120 µg/g Körpergewicht) Natrium-Pentobarbital-Gemisch (Abbott Laboratories) intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden sie an ihren Extremitäten in Rückenlage am Operationstisch fixiert und der Nacken leicht überstreckt, um einen leichteren operativen Zugang zu gewährleisten. In Höhe des Manubrium sterni wurde ein v-förmiger Hautschnitt beidseits bis kurz unterhalb des Rippenbogens geführt. Die Thorakotomie erfolgte in einem u-förmigen Schnitt, ausgehend von der rechten sechsten Rippe medioklavikulär über das proximale Manubrium sterni bis zur linken sechsten Rippe medioklavikulär. Die Herzentnahme erfolgte durch Durchtrennung von Aorta, A. pulmonalis und der Vv. cavae sowie der Lungenvenen. Das Herz wurde dann von Pericardresten befreit. Für die weitere Verarbeitung zur mRNA-Isolation wurden die Vorhöfe auf Klappenebene entfernt. Für histologische Untersuchungen wurden die Vorhöfe belassen. Die Herzen wurden in eine RNA-konservierende Lösung (RNA later™; Qiagen GmbH, Hilden, D) gegeben und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.2 Isolation der mRNA

Für jedes Mäuseherz wurden je 2 ml Trizol® Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) in einen 15 ml Flakon (Sarstaedt, Nümbrecht, D) vorgelegt. Anschließend wurden die Herzen nacheinander angetaut, anschließend von den RNA later™ (Qiagen GmbH) in die vorbereiteten 15 ml Röhrchen (Sarstaedt) überführt und mit einem Gewebshomogenisator (ART Micra D1, ART moderne Labortechnik, Mühlheim, D) auf höchster Stufe zerkleinert. Nach der Verarbeitung eines jeden Herzens wurde das Messer mit 10 %igem Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D), RNase freiem Wasser (DNase/RNase freies Wasser, Sigma-Aldrich) und einem scharfen Instrument von Geweberesten gereinigt, um eine Übertragung von RNA-Resten auf die nachfolgenden Proben zu vermeiden. Jeder Probe wurden 200 µl 99 %iges R-Chloroform

(Sigma-Aldrich) zur Phasentrennung zugegeben. Diese erfolgte, nach einer Inkubationszeit der Proben von 15 Minuten auf Eis, durch eine wiederum 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C (Universal 30 RF, Hettich Zentrifugen, Mühlheim an der Ruhr, D). Der mRNA-haltige, wässrige Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und zum Ausfällen mit 1 ml 99 %igem Isopropanol versetzt. Zum Vermischen wurde alles behutsam ca. 20 Mal über Kopf geschüttelt und anschließend über Nacht bei - 20 °C bzw. für 1-2 Stunden bei - 80 °C inkubiert. Beide Versionen führten hierbei zu gleichwertigen Ergebnissen.

Die untere Phase wurde zur Weiterverarbeitung in der DNA- und Proteinisolation bis auf weiteres bei - 80 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt wurden die Proben nochmals für 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig ausgegossen.

Anschließend wurden zum Waschen der mRNA 2 ml eiskaltes 75 %iges Ethanol zugegeben.

Nach erneuter Abzentrifugation des Überstandes wurde die mRNA für 20 bis 45 Minuten unter dem Abzug (Steril Gemini, Bio-Flow Technik, Meckenheim, D) luftgetrocknet. Dann wurde sie in 80 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und für 10 Minuten gelöst. Schließlich wurde die Extinktion der Proben in einer 1:100 Verdünnung bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 320 nm optimetrisch gemessen (Ultraspec 3000 UV/Visible Spectrometer, Pharmacia Biotech AG, Dübendorf, D). Die Qualität der Extinktion wurde durch das Verhältnis 260 nm/280 nm überprüft (Sollwert über 1,6). Mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes ließ sich die mRNA-Konzentration der Proben aus der Extinktion bei 260 nm ermitteln.

Das zur Weiterverarbeitung in der Transkription zur cDNA benötigte Volumen von 25 µl mRNA wurde in 0,2 ml Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, D) vorgelegt und die gesamte mRNA bei - 80 °C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Analyse mittels Real-time quantitativer PCR

2.4.1 Prinzip der konventionellen PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; polymerase chain reaction) ist heute eine der wichtigsten Methoden der modernen Biomedizin.

Mit Hilfe dieser Technik lassen sich gezielt spezifische DNA-Fragmente vermehren, die zwischen zwei Bezirken bekannter Nukleotidsequenz liegen. Zudem bietet sie die Möglichkeit der Vervielfältigung (Amplifikation) besonders kleiner Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Materialien (Mullis und Falloona, 1987). Die Reaktion läuft dabei in folgenden Schritten ab:

Zunächst findet eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) statt. Im Anschluss daran können sich am 5'- und 3'- Ende des zu amplifizierenden Bereichs spezifische Oligonukleotide, die sogenannten Primer anlagern (Annealing). Man unterscheidet dabei zwischen einem Forward- und einem Reverse-Primer, die sich an den jeweils komplementären DNA-Strang anlagern.

Die Verlängerung (Elongation) der Primer erfolgt durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase mittels freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs). Sie schreitet so lange fort, bis die DNA-Polymerase entweder das Ende der Matrize erreicht hat und quasi davon „abfällt“ oder die Reaktion anderweitig unterbrochen wird, z.B. durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C und damit einhergehender erneuter Denaturierung des DNA-Doppelstranges.

Durch anschließendes Kühlen des Reaktionsansatzes auf 40-60 °C in Anwesenheit freier Oligonukleotide, können sich diese an die komplementäre Matrize des DNA-Stranges anlagern. Nun kann erneut ein Doppelstrang synthetisiert werden. Somit entstehen PCR-Produkte von spezifischer Länge und Sequenz.

Die Abfolge dieser drei Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird als Zyklus bezeichnet und sollte zwischen 25 und 40 Mal wiederholt werden (Mülhardt, 2002).

Bei vorher geringen DNA-Mengen können die nun vervielfältigten Sequenzen per Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Rein theoretisch verdoppelt sich in der PCR die Anzahl der DNA-Moleküle bei jedem Zyklus. Der Multiplikationsfaktor läge demnach bei zwei. Tatsächlich jedoch liegt er, bezogen auf die Gesamtreaktion bei 1,6 bis 1,7 (Kainz, 2000). Der Grund dafür ist, dass die Vermehrungsrate am Ende der PCR geringer ist als am Anfang und in der Mitte, wo sie einen exponentiellen Anstieg zeigt. Gegen Ende geht die Vermehrungsrate zunächst in ein lineares Wachstum, dann in eine Plateau-Phase über (Kainz, 2000).

Dies hat verschiedene Ursachen. Zum einen wird die Aktivität der Polymerase durch Bindung an neu synthetisierte Produkte (ab einer Konzentration von ca. 0,3-1 pmol; Mülhardt, 2002) und anfallende Pyrophosphate reduziert. Zum anderen kommt es zur Zerstörung der Polymerase und der dNTPs durch wiederholt hohe Temperaturen während der Denaturierung. Zudem gehen im Laufe der Reaktion dNTPs und Primer durch Einbau in neu synthetisierte Produkte verloren, was natürlich ebenfalls zum Rückgang der Vermehrungsrate in der PCR führt (Kainz, 2000).

2.4.2 Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Theoretischer Hintergrund

Die quantitative real-time PCR (RT-qPCR) ist eine relativ neue Labormethode, die in den 1990er Jahren entwickelt wurde. Sie ermöglicht die Kombination der Amplifikation des DNA-Produkts mit dessen Auswertung in einem einzigen Reaktionsgefäß. Der Schritt der Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese fällt dabei weg und führt so zu einer immensen Zeit- und Kostenersparnis.

Die Grundidee beruht auf dem Wunsch, die Amplifikation des PCR-Produktes „live“ zu beobachten. In den ersten Versuchen wurde hierzu die PCR alle fünf Zyklen gestoppt, ein Aliquot entnommen und dieses ausgewertet (Ginzinger, 2001). Dies barg natürlich ein sehr hohes Kontaminationsrisiko und war zudem, insbesondere bei hohem Probenaufkommen, sehr zeit- und arbeitsaufwändig.

Die spätere Erkenntnis, dass man über die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase eine indirekte Aussage über die Zunahme der Amplifikationsrate während der PCR treffen kann, führte dazu, dass radioaktive Sonden entwickelt wurden, die mit den Amplifikaten hybridisierten und von der Taq-Polymerase enzymatisch gespalten wurden (Holland et al., 1991).

Später entdeckten Higuchi et al., dass eine Messung der PCR-Produkte während der PCR auch durch interkalierende Farbstoffe, im Sinne eines nicht spezifischen Detektionssystems möglich ist (Higuchi et al., 1992, 1993). Bei beiden Entwicklungen erfolgte die Messung der Fluoreszenz vor und nach der PCR in einem separaten Gefäß. Durch Kombination eines Thermocyclers mit einer Lichtquelle (Halogenlampe, Laser,

Licht emittierende Diode (LED)) sowie eines optischen Detektionsmoduls, konnte nur wenige Jahre später die Fluoreszenz auch während der laufenden PCR gemessen werden und eine Auswertung in Echtzeit (real time) durchgeführt werden (Ishiguro et al., 1995; Wittwer et al., 1997).

Nicht spezifische Detektionssysteme stellen neben spezifischen Detektionssystemen eine Möglichkeit zur Visualisierung des Amplikons dar. Beide Varianten beruhen auf der Tatsache, dass der Fluoreszenzanstieg proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsprodukts stattfindet. Dadurch ist zudem eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA möglich. Die während des Amplifikationsprozesses emittierte Fluoreszenz wird während eines jeden Zyklus gemessen und ermöglicht so eine graphische Darstellung, die es dem Anwender erlaubt, die Reaktion in Echtzeit zu beobachten.

Nicht-spezifische Detektionssysteme

Bei den nicht spezifischen Detektionssystemen emittieren unter anderem interkalierende Farbstoffe nach Anregung durch energiereiches UV-Licht sichtbares Licht im energieärmeren Wellenlängenbereich (Fluoreszenz). Liegt der Farbstoff frei vor ist die Emission nur gering. Erst nach Interkalierung des Farbstoffs in die kleine Windung des DNA-Doppelstranges wird sie verstärkt (Higuchi et al., 1992, 1993). Die Einlagerung in den DNA-Doppelstrang wird durch den planaren Aufbau des Farbstoffmoleküls ermöglicht.

Der erste auf diese Weise eingesetzte Farbstoff war das hochgiftige und stark cancerogene Ethidiumbromid. Inzwischen ist er durch andere Farbstoffe, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis aufweisen und nicht gesundheitsschädlich sind verdrängt worden. Der am meisten verwendete unter ihnen ist SYBR Green™ (Molecular Probes Inc.).

Die Vorteile dieser Farbstoffe sind unter anderem ihre universelle Verwendbarkeit und ihre hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle binden kann. Zudem handelt es sich um recht preisgünstige Farbstoffe.

Leider ist es mit diesen Farbstoffen nicht möglich, zwischen korrektem Produkt und Artefakten, wie z.B. Primerdimern, zu unterscheiden. Beide binden an SYBR Green™ und können somit zu einem Fluoreszenzanstieg auch in negativen Proben führen

(Vandesompele et al., 2002), was eine Schmelzpunktanalyse am Ende der PCR notwendig macht (Ririe et al., 1997).

Spezifische Detektionssysteme

Spezifische Detektionssysteme arbeiten mit Hilfe fluorogener Sonden, deren Prinzip darauf beruht, zur eigentlichen PCR-Reaktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrom) markierte Oligonukleotide dazu zu geben. Diese werden so gewählt, dass sie in einem Bereich zwischen den beiden Primern hybridisieren.

Die Sonden (engl.: Probes) sind zwischen 20 und 30 Basen lang. Ihre Sequenz muss, wie bei den Primern, speziell zu dem zu untersuchenden Amplikon passen. Die Emission erfolgt erst bei Hybridisierung an die entsprechende Zielsequenz, wodurch das Problem der geringen Spezifität entfällt.

Prinzipiell beruhen alle bisher entwickelten Varianten dieser Sonden auf demselben Mechanismus, dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfer, der von Cadullo et al., 1988 entwickelt wurde.

Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich dabei durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen und strahlt diese Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab (Selvin, 1994; Abb. 1).

Das jeweilige Anregungs- und Emissionsspektrum ist dabei für jeden Farbstoff charakteristisch.

Bringt man nun ein Fluorochrom (F1) in ausreichende Nähe zu einem zweiten Fluorochrom (F2), dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum (E1) des ersten Fluorochroms entspricht, springt die Energie zwischen den beiden über wenn der Abstand nicht mehr als 17-20 Basen (10-100 Å) übersteigt (Cardullo et al., 1988). Anstatt als Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden, landet die Energie bei Fluorochrom 2. Während der PCR kann man nun die Lichtstärke von E1 oder E2 verfolgen und daran ablesen, ob die beiden Fluorochrome räumlich weit auseinander (Messen von E1) oder dicht beieinander liegen (Selvin, 1994).

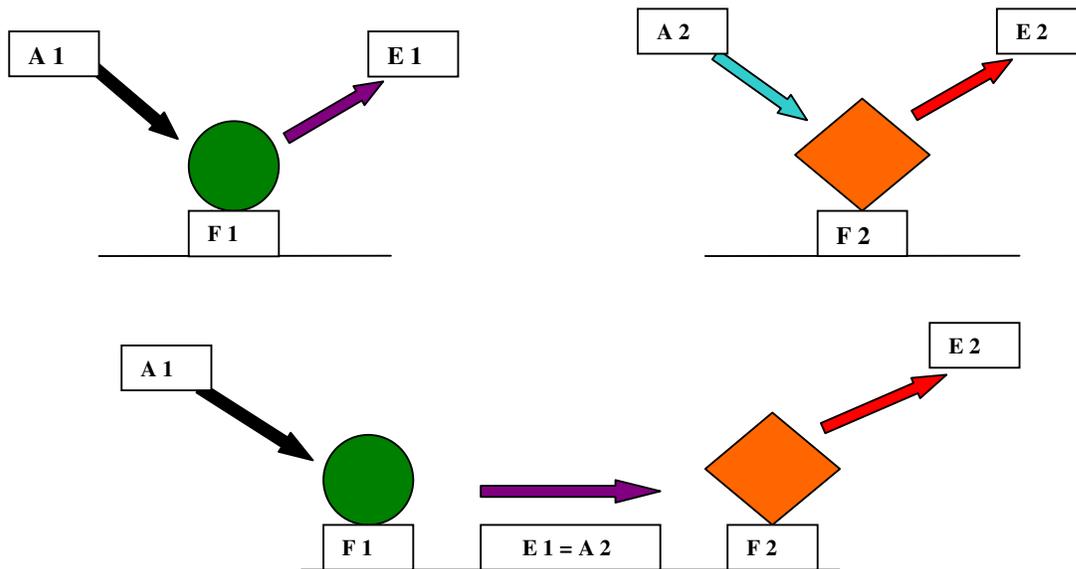


Abb. 1: Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Fluorochrom F1 wird mit Anregungswellenlänge A1 stimuliert und emittiert Licht der Wellenlänge E1. In gleicher Weise wird Fluorochrom F2 mit Anregungswellenlänge A2 stimuliert und strahlt Emissionswellenlänge E2 aus. Befinden sich die beiden Fluorochrome in räumlicher Nähe und ist zusätzlich $E1 = A2$, so wird die von F1 emittierte Energie auf F2 übertragen und als E2 ausgestrahlt (Selvin, 2004).

Für die Nutzung des FRET-Effekts wird konventionell der Farbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) als Rezeptor/Donor verwendet. Als Quencher/Akzeptor steht der Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) zur Verfügung. Er wird auch als „fluoreszierender Quencher“ bezeichnet, da er die aufgenommene Energie in Licht anderer Wellenlänge umformt. Er kann auch als Rezeptorfarbstoff genutzt werden. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Quenchern entwickelt, die man als dark black hole oder non-fluorescent quencher bezeichnet (Nasarabadi et al., 1999). Sie emittieren die aufgenommene Energie nicht als Licht unterschiedlicher Wellenlänge, sondern als Wärme. Außerdem ist das Absorbtionsspektrum der Non-fluorescent Quencher derart konzipiert, dass es mit dem Emissionsspektrum des Reporters maximal überlappt, wodurch das Verhältnis von Signal- und Hintergrundfluoreszenz optimiert wird.

Double Dye Sonden/TaqMan[®]-Sonden

Das Double-Dye-Sonden-Prinzip ist das älteste und derzeit meist genutzte Prinzip. Es wurde von Roche und ABI entwickelt und arbeitete zunächst mit radioaktiv markierten Sonden (Holland et al., 1991). Aufgrund der hohen Arbeits- und Zeitintensität bei der Auswertung wurde zu fluorochrom-markierten Sonden gewechselt.

Double-Dye-Sonden tragen zwei Fluorochrome auf einer Sonde. Dabei befindet sich der Rezeptorfarbstoff am 5'-, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende.

Damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann, ist am 3'-Ende eine Phosphatgruppe zusätzlich angefügt (Lie, 1998). Solange die Sonde intakt ist, ist die Lichtemission E1 gering. Fast die gesamte Energie (E1), die bei Anregung des Reporters (F1) durch Wellenlänge A1 entsteht, wird aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher (F2) auf diesen übertragen und als Licht der Wellenlänge E2 emittiert (Walker, 2002). Das emittierte Licht des Rezeptorfarbstoffs wird gelöscht (gequencht). Der FRET-Effekt bleibt auch erhalten nachdem die Sonde an den komplementären DNA-Strang gebunden hat (Lie, 1998).

Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert sie mit Hilfe ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Nicht alle Polymerasen haben eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Zuerst wurde dieses Prinzip bei der Taq-Polymerase beobachtet. Das Verhalten der Taq-Polymerase bei der Strangverlängerung ähnelt dabei dem Verhalten einer Comicfigur aus dem um 1980 entstandenen Computerspiel PacMan. In Anlehnung daran wurde das Prinzip TaqMan[®]-Prinzip genannt (Leutenegger, 2001). Nach der Hydrolyse befindet sich der Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe zum Rezeptor. Nun kann der Fluoreszenzanstieg von E1 gemessen werden, da E1 nicht mehr vom Quencher abgefangen und umgewandelt wird.

Eine Weiterentwicklung der TaqMan[®]-Sonden sind die so genannten molecular beacons. Diese Sonden sind aufgrund ihrer eigenkomplementären Enden in der Lage, Haarnadelstrukturen auszubilden. Quencher und Reporter kommen dadurch in unmittelbare Nachbarschaft zueinander und das Fluoreszenzsignal wird vollständig unterdrückt.

Normale TaqMan[®]-Sonden können dagegen unter bestimmten Bedingungen ungünstige Tertiärstrukturen ausbilden und somit auch ohne Bindung an die DNA-Matrize eine Signalemission erzeugen, weil Rezeptor und Quencher weit voneinander entfernt liegen.

2.4.3 cDNA- Synthese

Die Gewinnung der cDNA erfolgte mittels High capacity cDNA Archive KIT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Die KIT-Komponenten wurden in einem 2 x RT-Master Mix gepoolt um einen gleichmäßigen Zusatz zu den jeweiligen Proben zu gewährleisten. Im Einzelnen bestand oben genannter Master Mix aus 10 x reverse Transkriptase Puffer (5 µl/Rkt.), 25 x dNTPs (2 µl/Rkt.), 10 x Random Primers (5 µl/Rkt.), Multi Scribe Reverse Transkriptase (50 U/µl; 2,5 µl/Rkt.) und RNase freiem Wasser (10,5 µl/Rkt.). Daraus ergab sich für jede Reaktion ein 2 x RT-Mastermix-Volumen von 25 µl. Zur cDNA Sammelreaktion wurden je 25 µl RNA sample und 25 µl 2 x RT-Mastermix zusammen in ein 0,2 ml PCR Tube (Eppendorf AG, Hamburg, D) gegeben.

Die Proben, mit einem nun endgültigen Reaktionsvolumen von 50 µl, wurden kurz zentrifugiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe eines Thermal Cyclers (Biometria UNO-Thermoblock, Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D) durchgeführt.

2.4.4 TaqMan[®] RT-qPCR

Beim TaqMan[®] handelt es sich um einen 96 Loch Thermocycler mit ebenso vielen Lichtwellenleitern, über die die TaqMan[®]-Probe per Laserlicht angeregt wird. Gleichzeitig sind sie in der Lage, das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht zu messen. Gemäß dem FRET-Effekt (siehe 2.4.2) wird die vom Rezeptorfarbstoff abgegebene Lichtenergie bei intakter TaqMan[®]-Probe auf den Quencherfarbstoff übertragen, welcher dann seinerseits Licht von charakteristischer Wellenlänge aussendet. Diese Emission wird alle 5 Sekunden vom TaqMan[®] erfasst.

Zur Optimierung der PCR wurde zunächst ein geeignetes Arbeitsumfeld geschaffen. Der PCR Arbeitsplatz befand sich räumlich getrennt von anderen Arbeitsplätzen.

Während der gesamten Arbeitsphase wurden gestopfte Einweg-Pipettenspitzen aus Plastik (Sarstaedt, Nümbrecht, D) verwendet und es wurde darauf geachtet, dass Baumwollkittel und Latex-Handschuhe getragen wurden, die in regelmäßigen Abständen gewechselt wurden. Es wurde darauf hingewirkt, eine unnötige Kontamination der Proben zu vermeiden.

Design von TaqMan[®]-Probe und Primern:

TaqMan[®]-Probe

- das G/C-Verhältnis sollte im Bereich von 20-80 % liegen
- Serien gleicher Nukleotide, insbesondere von Guanin, sollten vermieden werden
- am 5'-Ende sollte sich kein Guanin befinden
- die Schmelztemperatur sollte bei 65-68 °C liegen
- dem Strang mit mehr Cytosin als Guanin war Vorzug zu geben
- die Länge der TaqProbe[®] sollte zwischen 9-40 Basen liegen

Primer

- das G/C-Verhältnis sollte im Bereich von 20-80 % liegen
- Serien gleicher Nukleotide, insbesondere von mehr als 4 Guanin, sollten vermieden werden
- die Schmelztemperatur sollte bei 58-60 °C liegen
- die letzten 5 Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als 2 Basen Guanin und/oder Cytosin aufweisen
- Forward- und Reverse-Primer sollten so nahe wie möglich an der TaqProbe[®] liegen, ohne diese jedoch zu überlappen

Am Vortag einer geplanten RT-qPCR wurden je 6,65 µl der im vorangegangenen Schritt für jede Probe synthetisierten cDNA in je ein 0,2 ml PCR Tube (Eppendorf AG, Hamburg, D) vorgelegt und bei 4 °C bis zum Reaktionstag im Kühlschrank aufbewahrt.

Am eigentlichen Reaktionstag der RT-qPCR wurde zunächst je ein 0,2 ml PCR Tube für jedes zu untersuchende Gene Assay mit 6,65 µl RNase freiem Wasser gefüllt, um später als Leerprobe (NTC = No Template Control) mit den eigentlichen Proben mitlaufen zu können. Dadurch sollten eventuell auftretende grobe Verunreinigungen der Proben ausgeschlossen werden.

Als nächstes wurde ein Mastermix, bestehend aus je 5 µl TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) zur Durchführung der PCR-Reaktion, 0,5 µl des jeweiligen TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems) und 2,5 µl RNase freiem Wasser angesetzt und vermischt (Vortex 2 Genie, Sientific Industries inc., Bohemia, NY, USA).

Die Spezifität des jeweiligen TaqMan[®] Gene Expression Assay wurde dabei vom Hersteller überprüft und garantiert. Es enthielt, entsprechend der TaqMan[®]-Methode, neben dem spezifischen Forward- bzw. Reverse-Primer zur Amplifikation der DNA ein weiteres Oligonukleotid (TaqMan[®]-Probe, Sonde).

Von diesem Mastermix wurden je 27 µl zu den sich bereits in den PCR Tubes befindenden 6,65 µl cDNA bzw. RNase freiem Wasser dazupipettiert, wobei darauf geachtet wurde, für jede Probe eine frische Pipettenspitze zu verwenden.

Danach wurden die Proben sanft bei 1000 n/min. für 2 Minuten zentrifugiert. Das Probenvolumen von je 30 µl wurde nun mit Hilfe einer Achtkanalpipette (Finnpipette[®], Laborsystems) in die Vertiefungen einer 384-well Reaktionsplatte (384-well clear optical reaction plate, Applied Biosystems) gegeben. Da es sich um eine Dreifachbestimmung handelte, wurden die 30 µl auf jeweils drei Vertiefungen aufgeteilt, also je 10 µl pro Vertiefung. Danach wurde die Reaktionsplatte bei 4000 n/min. für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mit einer durchsichtigen Klebefolie (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems) zum Schutz vor Kontamination verschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, die Folie nicht direkt mit den Händen zu berühren, um die optische Durchlässigkeit nicht zu beeinträchtigen.

Zur relativen Quantifizierung wurde GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase) als so genanntes housekeeping gene amplifiziert. Dabei handelt es sich um eine aktive Referenz bzw. eine endogene Kontrolle, bei der die Menge der Ziel-RNA im Verhältnis zur insgesamt in der Probe vorhandenen RNA betrachtet werden kann. Als endogene Kontrolle eignen sich Gene, die ubiquitär und in konstanter Menge in den zu unter-

suchenden Zellen vorkommen. Außer GAPDH eignen sich auch 18s rRNA oder β -Aktin zu diesem Zweck. Außerdem wurde bei der RT-qPCR eines jeden gemessenen Gens ein sogenannter Calibrator mitgeführt, um eine äquivalente Qualität der Reaktion in unterschiedlichen Läufen zu garantieren.

Die PCR-Amplifikation wurde auf dem TaqMan ABI Prism[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) mit folgender Programmierung durchgeführt:

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
UNG-Aktivierung	120	50	1
Aktivierung der AmpliTaq [®] Gold DNA-Polymerase	600	95	1
Denaturierung	15	95	40
Annealing/Elongation	60	60	40

Tab. 1: Programmierung des TaqMan ABI Prism[®] 7900HT

Die Daten wurden mit der Sequence Detection System 2.1 (SDS 2.1) Software (Applied Biosystems, USA) aufgenommen und ausgewertet.

2.5 Auswertung

Die RT-qPCR wurde mittels Taqman[®] Gene expression Assays durchgeführt und die mRNA-Expression wurde auf die Expression in den Kontroll-Tieren sowie auf das house keeping gene GAPDH mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bezogen. Die Auswertung der Daten wurde mittels dem Programm SDS (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

2.6 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels

multipler Varianzanalyse, gefolgt von Student-Newman-Keuls post-hoc Analyse überprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Tier-Operationen

3.1.1 Wildtypmäuse

Bei der vorliegenden Arbeit wurden 56 C57/BL6-WT-Mäuse verwendet. WT-Mäuse, die während oder kurz nach der Initialoperation verstarben (n= 12, Überlebensrate 79 %) oder den I/R-Eingriff nicht überlebten (n= 1, Überlebensrate 98 %) wurden nicht für die weiterführenden Auswertungen verwendet. Die restlichen 43 Mäuse wurden wie folgt in Gruppen eingeteilt.

1.) Kontrollgruppe (n= 11): Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden initial operiert aber keinem I/R-Protokoll unterzogen.

2.) I/R-Gruppen (n= 32): Mäuse der I/R-Gruppe wurden initial operiert und anschließend nach einem I/R-Protokoll behandelt. In die 3- und 5-Tage-I/R-Gruppen wurden jeweils n= 10, in die 7-Tage-I/R-Gruppe n= 12 Tiere sortiert.

3.1.2 Osteopontin-Knockout-Mäuse

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden 47 homozygote $OPN^{-/-}$ -Mäuse verwendet. Mäuse, deren Muster an Chemokinen und Zytokinen eher einem Infarkt entsprachen (n= 1, Überlebensrate 98 %) wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen, ebenso wenig Mäuse, die während der Initialoperation oder kurz danach verstarben (n= 13, Überlebensrate 72 %). Die übrigen 33 Mäuse wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

1.) Kontrollgruppe (n= 7): Nach der initialen Operation wurden die Mäuse dieser Gruppe keiner I/R unterzogen.

2.) I/R-Gruppen (n= 26): Die Mäuse dieser Gruppen wurden verschiedenen I/R-Protokollen unterworfen. Dabei wurden n= 9 in die 3-Tage-, n= 7 in die 5-Tage- und n= 10 in die 7-Tage-I/R-Gruppe eingeteilt.

3.2 Globale und regionale linksventrikuläre Funktion

Die Datenerhebung erfolgte mittels Motion-Mode Echokardiographie nach 7d I/R, im Vergleich zwischen $OPN^{-/-}$ - und WT-Mäusen.

Fraktionsverkürzung

Die M-Mode Echokardiographie zeigte einen signifikanten Rückgang der FS, als Parameter für die globale ventrikuläre Pumpfunktion, für die Gruppe der WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse nach 7d I/R im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ($34,16 \% \pm 1,24 \%$ vs. $41,17 \% \pm 1,6 \%$ bzw. $27,56 \% \pm 1,36 \%$ vs. $38,81 \% \pm 3,18 \%$) (Abb. 2).

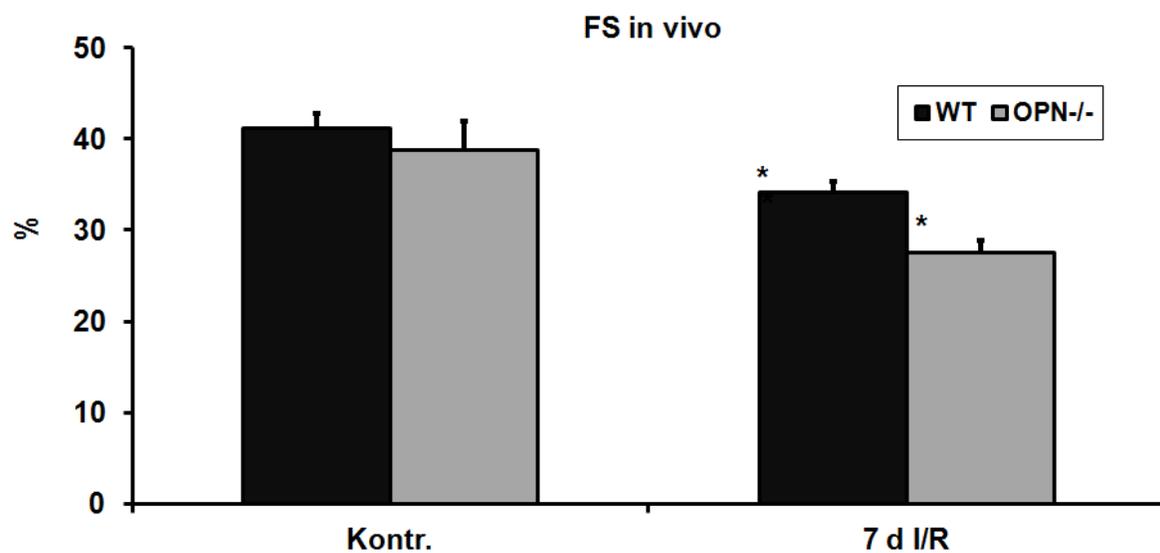


Abb. 2: Echokardiographische Analyse der Pumpfunktion. Die Fraktionsverkürzung (FS) zeigt die globale ventrikuläre Pumpfunktion nach 7d I/R im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen; WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; d, Tage; *, $p < 0,05$

Vorderwandverdickung

In der M-Mode Echokardiographie konnte ein signifikanter Rückgang der AWT, als Parameter für die regionale Pumpfunktion, in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse nach 7d I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden ($24,76 \% \pm 2,95 \%$ vs. $34,51 \% \pm 1,79 \%$) (Abb. 3). Es zeigte sich, dass die AWT in der Gruppe der WT-Mäuse durch die Ischämie weniger stark beeinträchtigt wurde. Hier fand sich kein signifikanter Rückgang im Vergleich zur Kontrollgruppe.

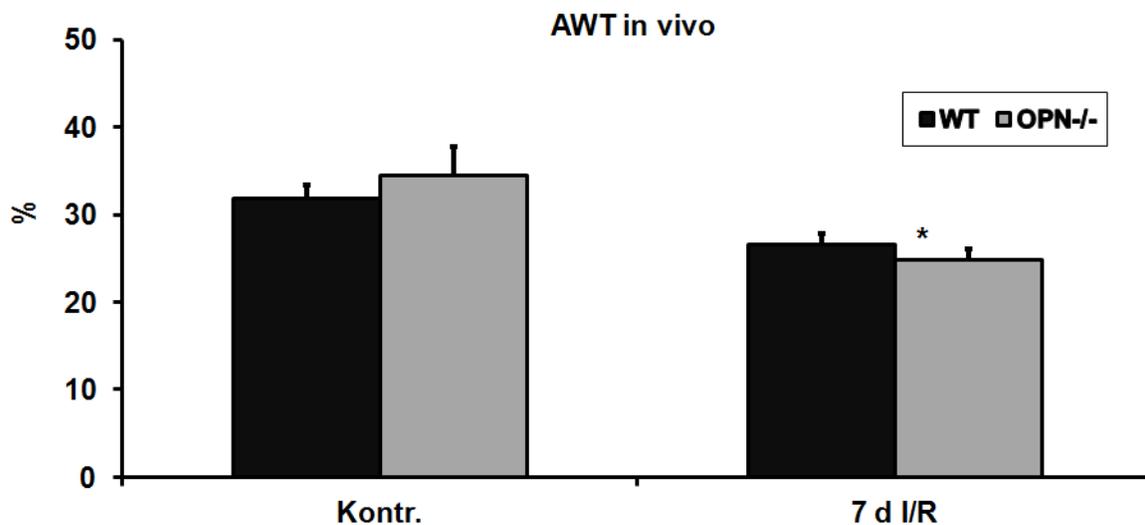


Abb. 3: Echokardiographische Analyse der Pumpfunktion. Die Vorderwandverdickung (AWT) beschreibt die regionale linksventrikuläre Pumpfunktion nach 7d I/R im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen; WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; d, Tage; *, $p < 0,05$

3.3 Osteopontin in Wildtypmäusen

Die RT-qPCR-Messung ergab eine signifikante und maximale Erhöhung der mRNA-Expression nach 3 d I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe ($38,61 \pm 8,28$). Nach 1, 5 und 7 d I/R war keine signifikante Expressionserhöhung zu sehen (Abb. 4).

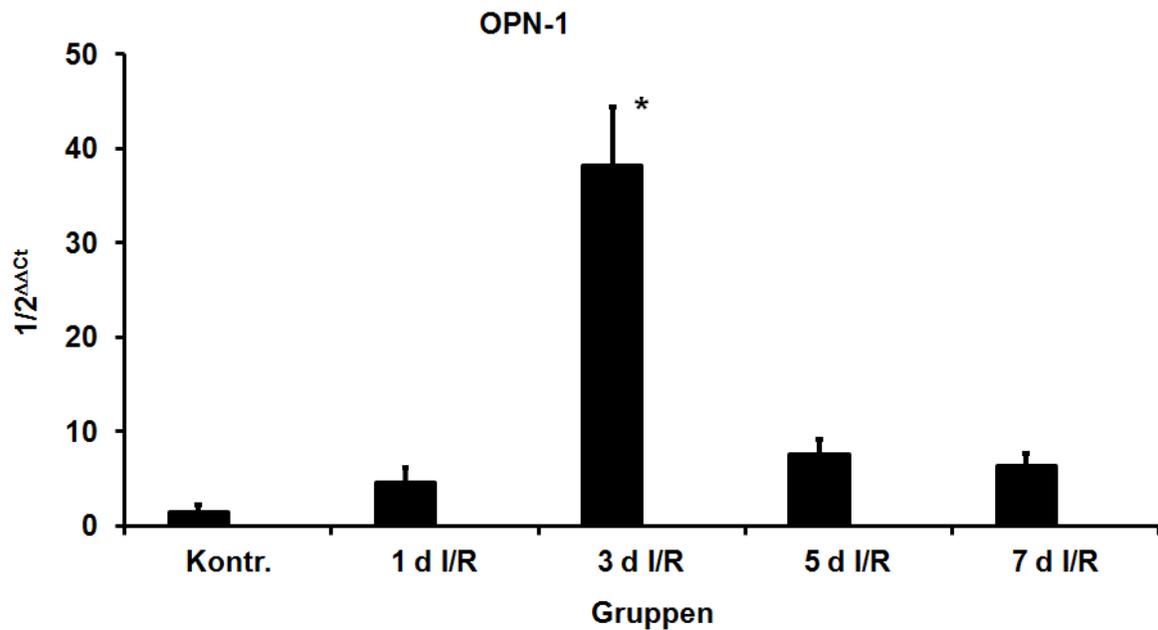


Abb. 4: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von OPN-1 in WT-Mäusen nach 1, 3, 5 und 7 Tagen bezogen auf eine Kontrollgruppe. OPN-1, Osteopontin-1; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

3.4 Intrazelluläre Faktoren

3.4.1 Marker des oxidativen Stress

Glutathionperoxidase

In der Messung von GPX-1 zeigten die Taqman-Ergebnisse für die Kontrollgruppe keine Unterschiede der mRNA-Expression von zwischen $OPN^{-/-}$ und WT-Mäusen (Abb. 5). Nach 7d I/R war eine signifikant unterschiedliche GPX-1-mRNA-Expression zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen zu sehen ($1,99 \pm 0,19$ vs. $1,23 \pm 0,13$). Für alle I/R-Gruppen der WT-Mäuse zeigte sich durchgehend eine Erhöhung der GPX-1-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Maximum erreichten beide Gruppen nach 3 d I/R.

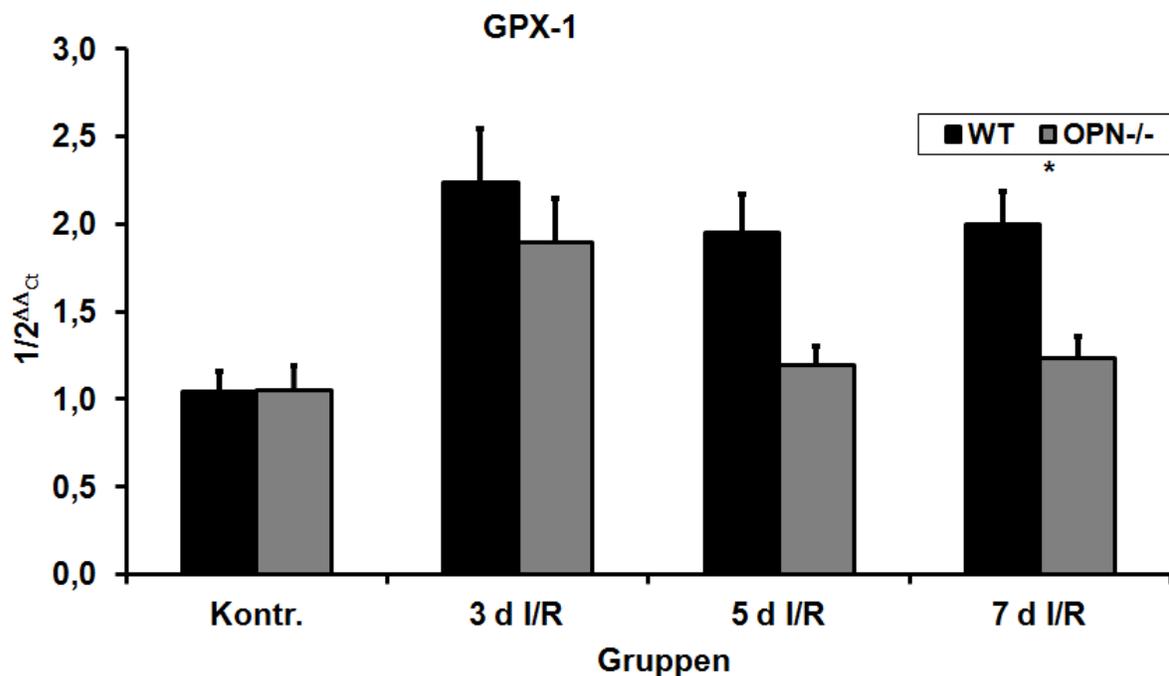


Abb. 5: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von GPX-1 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Hämoxxygenase-1

Die HMOX-1-Expression erreichte in beiden Gruppen ihr Maximum nach 3 Tagen I/R, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen zu sehen war ($12,72 \pm 1,61$ vs. $4,77 \pm 0,57$). Nach 5 und 7 Tagen I/R konnte ein deutlicher Rückgang der HMOX-1-mRNA-Expression in beiden Genotypen beobachtet werden (Abb. 6). Die mRNA-Induktion war zu diesen Zeitpunkten tendenziell geringer in $OPN^{-/-}$ -Mäusen.

Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen konnte sowohl in der Gruppe der WT-Mäuse als auch der $OPN^{-/-}$ -Mäuse nach 5 bzw. 7 Tagen I/R keine signifikante Expressionserhöhung mehr beobachtet werden. Zwischen den Kontrollgruppen selbst zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der mRNA-Expression.

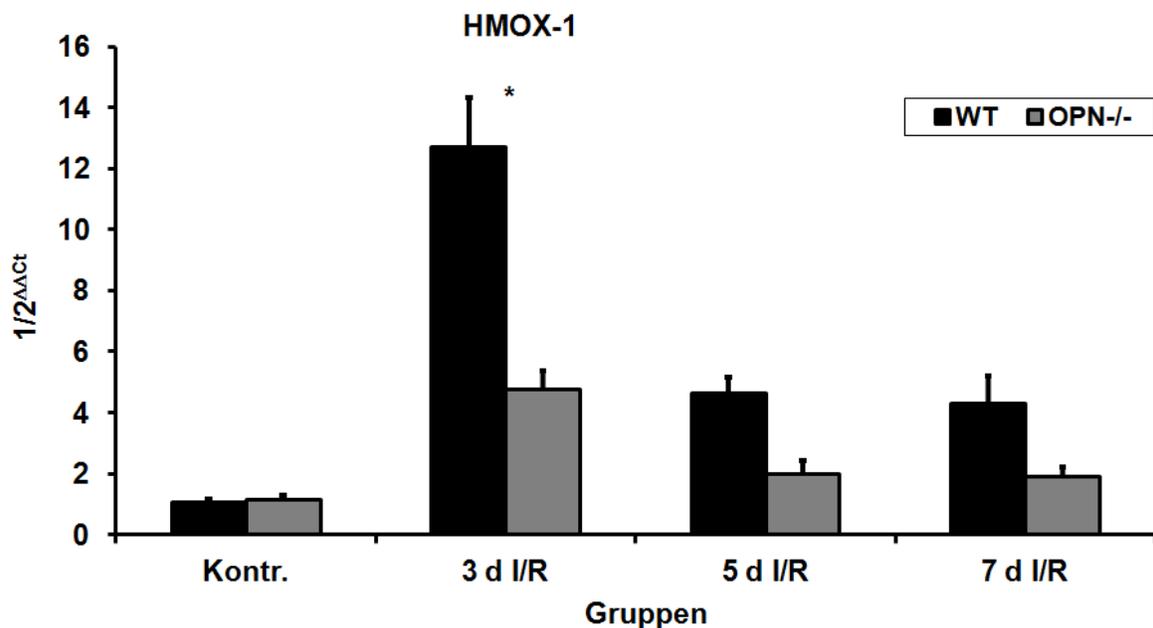


Abb. 6: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von HMOX-1 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ - Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, $p < 0,05$

3.4.2 Zinkspeicherproteine

Metallothionein-1

In den RT-qPCR-Messungen der MT1-mRNA zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen (Abb. 7). In allen drei I/R-Gruppen war die MT1-mRNA-Expression signifikant höher in WT-Mäusen ($5,17 \pm 1,08$ vs. $2,05 \pm 0,19$ nach 3 Tagen I/R, $5,74 \pm 1,22$ vs. $1,20 \pm 0,08$ nach 5 Tagen I/R, $5,52 \pm 0,39$ vs. $1,50 \pm 0,26$ nach 7 Tagen I/R). In $OPN^{-/-}$ -Mäusen war keine mRNA-Induktion über das Niveau der $OPN^{-/-}$ -Kontrollgruppe zu beobachten.

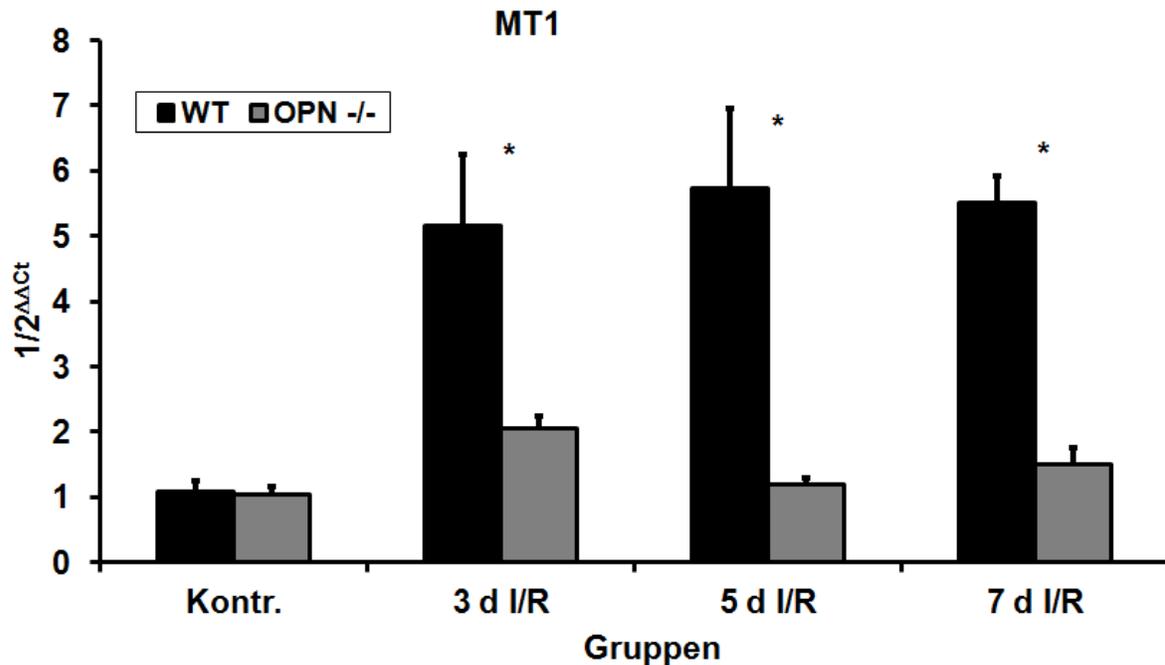


Abb. 7: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von MT1 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ - Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Metallothionein-2

Die Ergebnisse der MT2-mRNA-Expression folgten denen für die MT1-Expression. Es gab keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen (Abb. 8). Nach 3 und 7 Tagen I/R ergaben sich signifikante Erhöhungen der MT2-mRNA-Expression für die jeweiligen Gruppen der WT-Mäuse gegenüber den entsprechenden $OPN^{-/-}$ -Mäusen ($21,41 \pm 7,79$ vs. $3,41 \pm 0,44$ nach 3d I/R; $35,88 \pm 5,64$ vs. $1,94 \pm 0,44$ nach 7d I/R). Insgesamt war in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse keine Hochregulation der MT2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten.

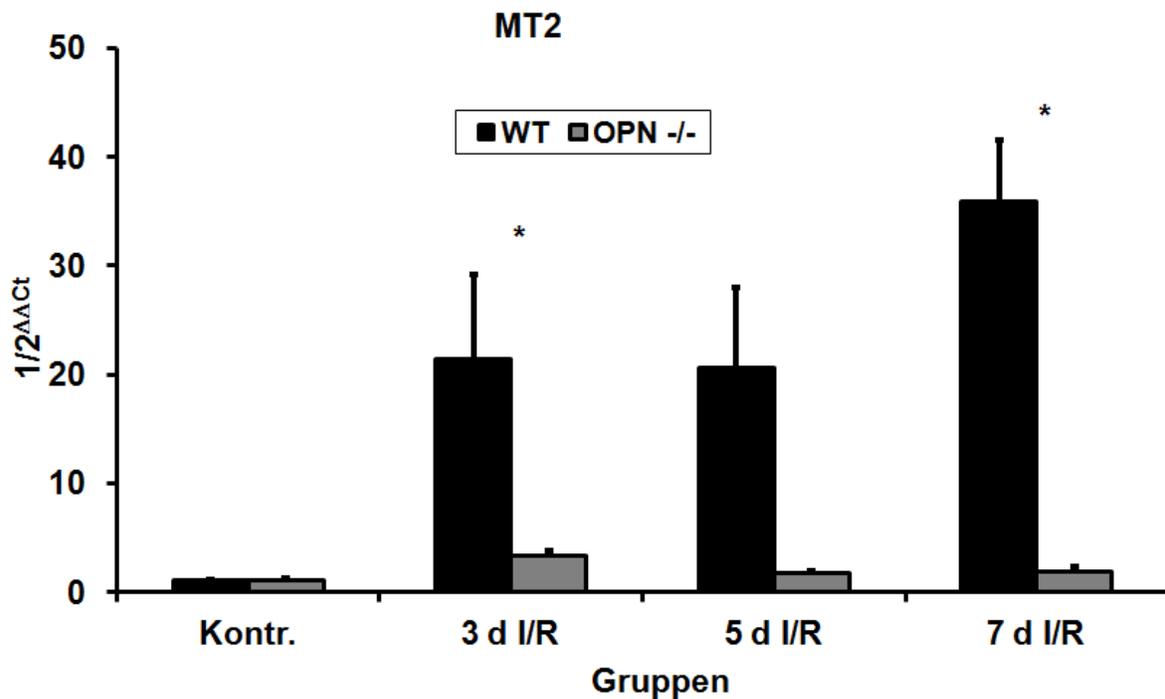


Abb. 8: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von MT2 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, $p < 0,05$

3.5 Inflammatorische Mediatoren

3.5.1 Chemokine

CCL2

In den jeweiligen Kontrollgruppen für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse war die CCL2-mRNA nicht unterschiedlich exprimiert (Abb. 9). Sowohl für die Gruppe der WT- als auch für die Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse war nach 3 Tagen I/R die höchste CCL2-mRNA-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen zu beobachten. Hierbei zeigten sich zudem signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($20,76 \pm 3,62$ vs. $12,95 \pm 2,48$). Nach 5 und 7 Tagen I/R kam es zu einer deutlichen Regression der mRNA-Expression in beiden Gruppen. Nach 7 Tagen I/R entsprach die CCL2-Expression in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse wieder nahezu der entsprechenden Kontrollgruppe. In der Gruppe der WT-Mäuse persistierte jedoch eine leicht erhöhte CCL2-Expression.

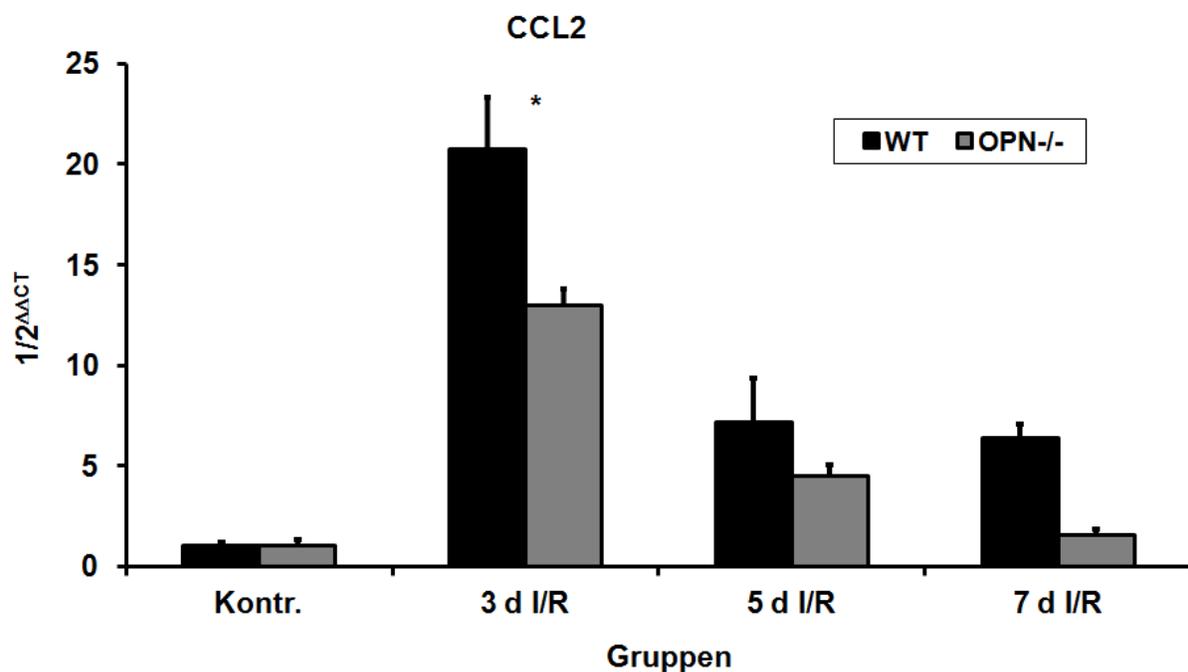


Abb. 9: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von CCL2 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ - Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

CCL3

Auch hier lieferten die RT-qPCR-Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse (Abb. 10). Ähnlich der CCL2-mRNA-Expression erreichte die CCL3-mRNA-Expression nach 3 Tagen I/R sowohl in der Gruppe der WT- als auch in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse ihren Maximalwert, um dann nach 5 und 7 Tagen I/R wieder eine rückläufige Expression zu zeigen. Nach 3 Tagen I/R waren die Ergebnisse für die CCL3-mRNA-Expression signifikant unterschiedlich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen ($10,59 \pm 2,56$ vs. $3,92 \pm 0,85$). In der Folge kam es zu einem sukzessiven Expressionsrückgang.

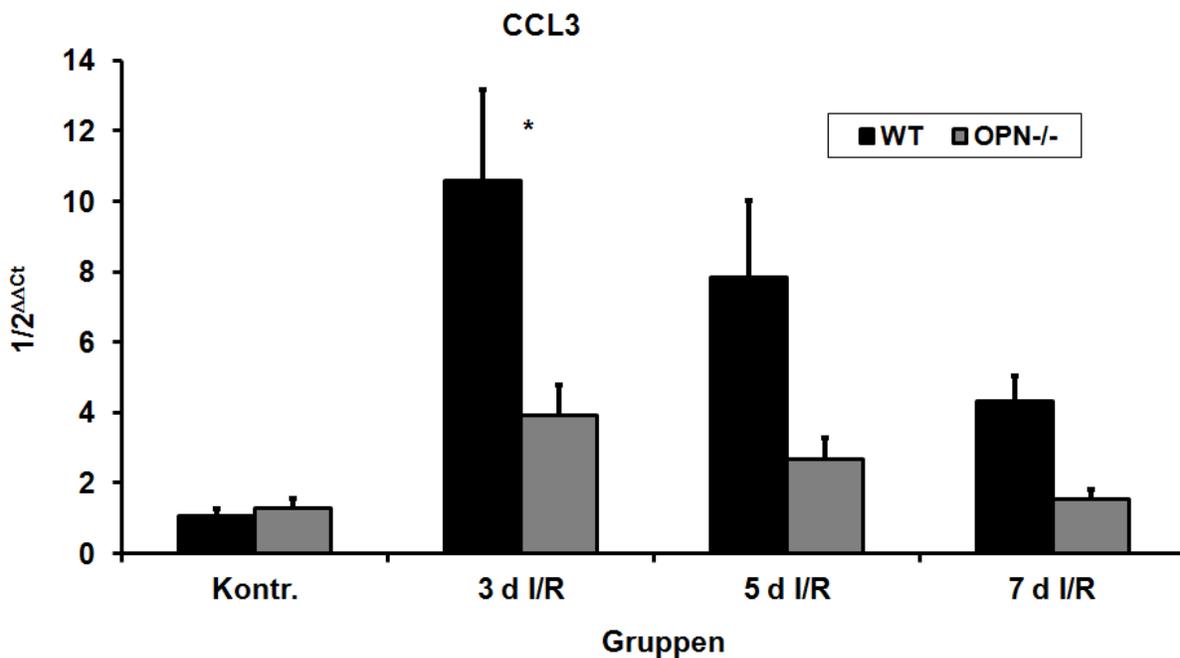


Abb. 10: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von CCL3 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

CCL4

Für die CCL4-mRNA-Expression zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie für die RT-qPCR-Messungen der CCL2- und CCL3-mRNA-Expression. Es waren auch hier keine wesentlichen Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den Kontrollgruppen für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse zu beobachten (Abb. 11). Im Verlauf wies die CCL4-mRNA-Expression nach 3 Tagen I/R ein Maximum für beide Gruppen auf mit einer signifikant unterschiedlichen mRNA-Expression für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse ($17,38 \pm 3,06$ vs. $8,70 \pm 2,69$). Ein zunehmender Expressionsrückgang nach 5 und 7 Tagen I/R war auch hier, ähnlich der CCL2- und CCL3-mRNA-Expression, zu beobachten.

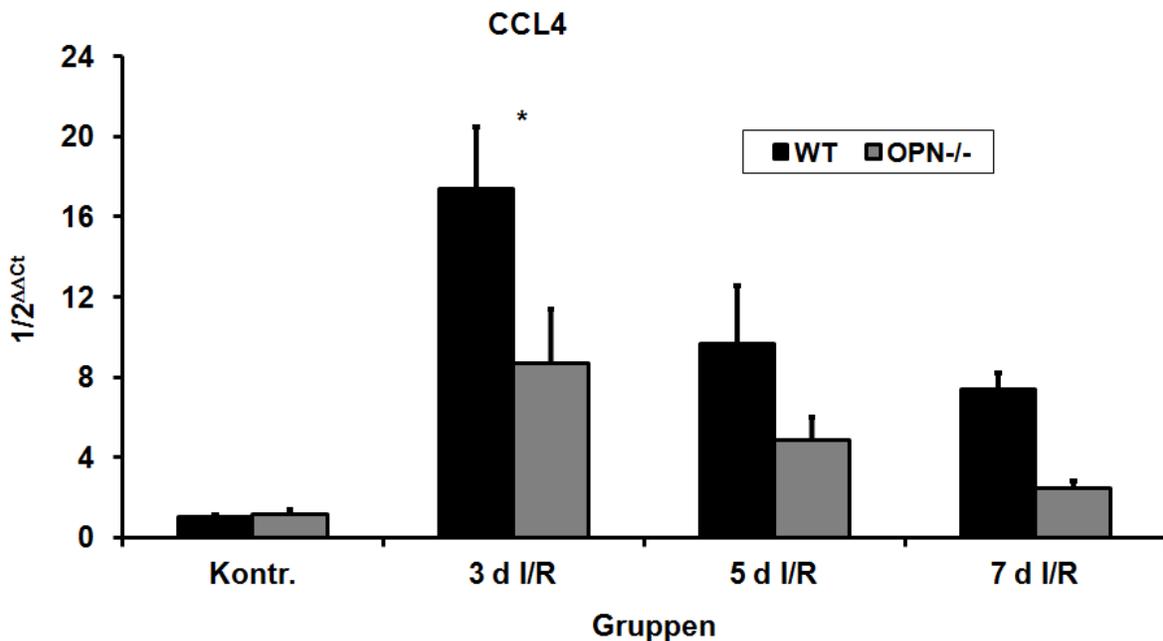


Abb. 11: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von CCL4 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ - Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, $p < 0,05$

3.5.2 Zytokine

Tumornekrosefaktor- α

Bezüglich der TNF- α -mRNA-Expression ergaben die RT-qPCR- Messungen keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen für WT- und OPN^{-/-}-Mäuse (Abb. 12). Es zeigten sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den jeweiligen Gruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse nach 3, 5 und 7 Tagen I/R bei einer leicht erhöhten mRNA-Expression in den Gruppen der WT-Mäuse gegenüber den Gruppen der OPN^{-/-}-Mäuse. Nach einem maximalen Expressionsanstieg nach 3 Tagen I/R kam es in beiden Gruppen zu einer sukzessiven Regression der TNF- α -mRNA-Expression nach 5 und 7 Tagen I/R. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen blieb die mRNA-Expression in beiden Gruppen erhöht.

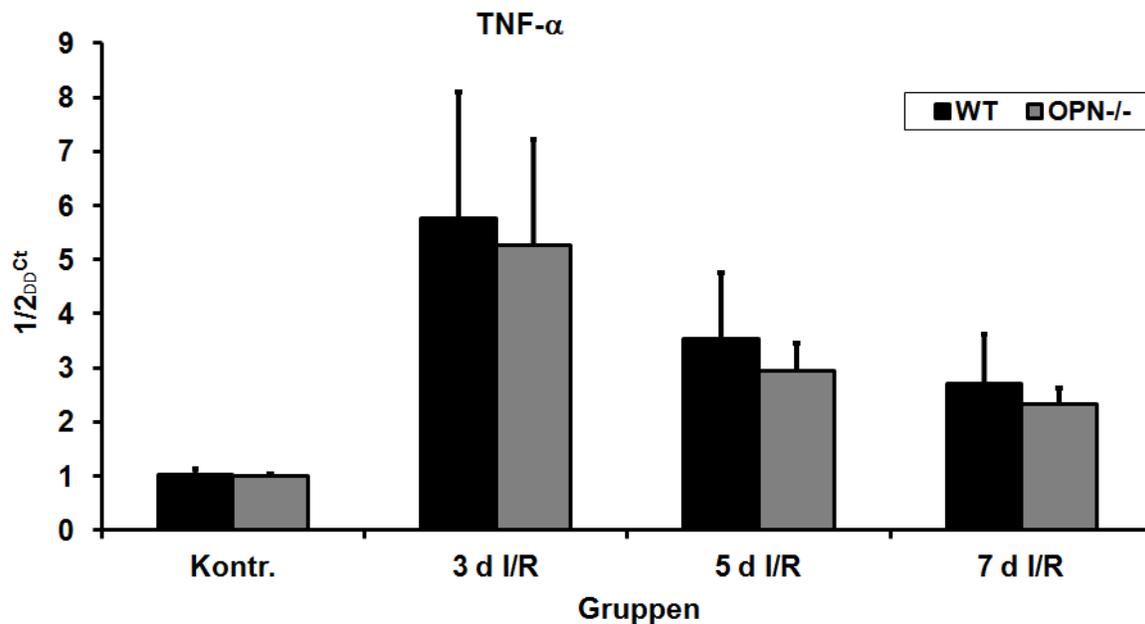


Abb. 12: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TNF- α im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}- Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage

Interleukin-10

Die RT-qPCR-Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede der IL-10-mRNA-Expression zwischen den Gruppen für die WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse nach 3, 5 und 7 Tagen I/R (Abb. 13). Nach 3 Tagen I/R zeigte sich eine deutliche Erhöhung der IL-10-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($8,65 \pm 2,77$ vs. $7,47 \pm 3,59$). Nach 5 und 7 Tagen I/R zeigte sich eine rückläufige mRNA-Expression in beiden Gruppen. Es bestand kein Unterschied zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen.

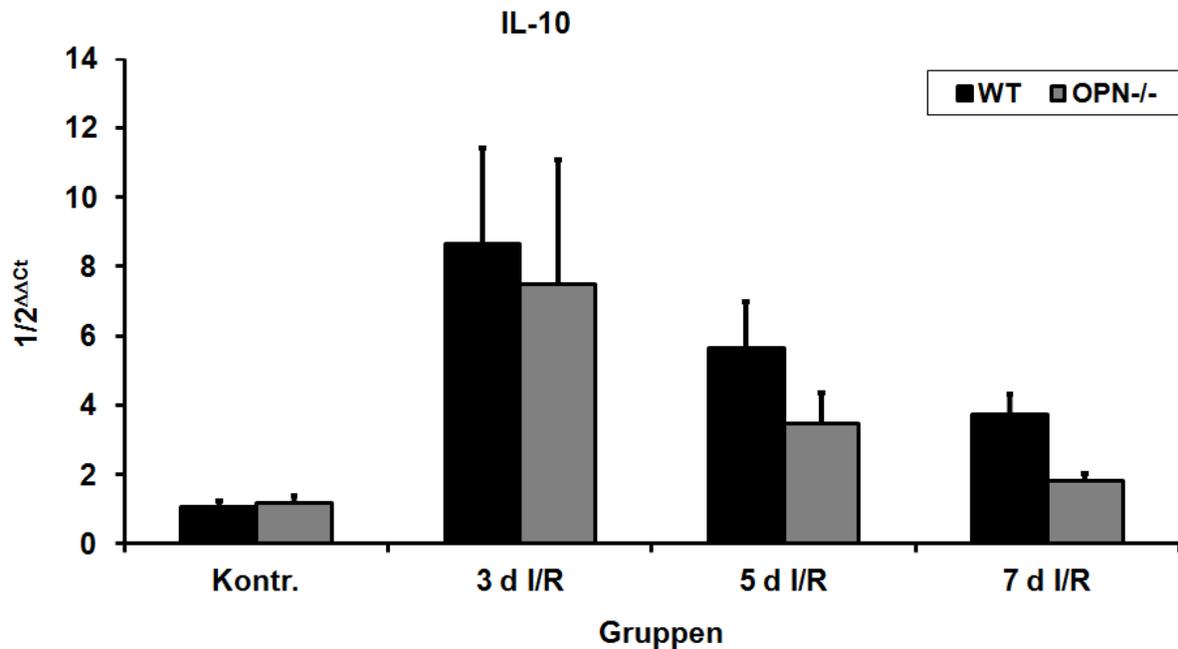


Abb. 13: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von IL-10 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage

3.6 Mediatoren des Gewebebaus

Tenascin C

In den Kontrollgruppen für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse gab es keine Unterschiede in der TNC-mRNA-Expression (Abb. 14). Nach 3, 5 sowie nach 7 Tagen I/R war die TNC-mRNA-Expression in WT-Mäusen signifikant höher exprimiert als in $OPN^{-/-}$ -Mäusen. Das Maximum der mRNA-Expression in der Gruppe der WT-Mäuse wurde nach 3 Tagen I/R erreicht ($88,25 \pm 18,39$ vs. $4,79 \pm 0,88$). Die TNC-mRNA-Expression blieb in der Gruppe der WT-Mäuse durchgehend erhöht im Vergleich zur eigenen Kontrollgruppe. Dagegen zeigte sich in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg der TNC-mRNA-Expression.

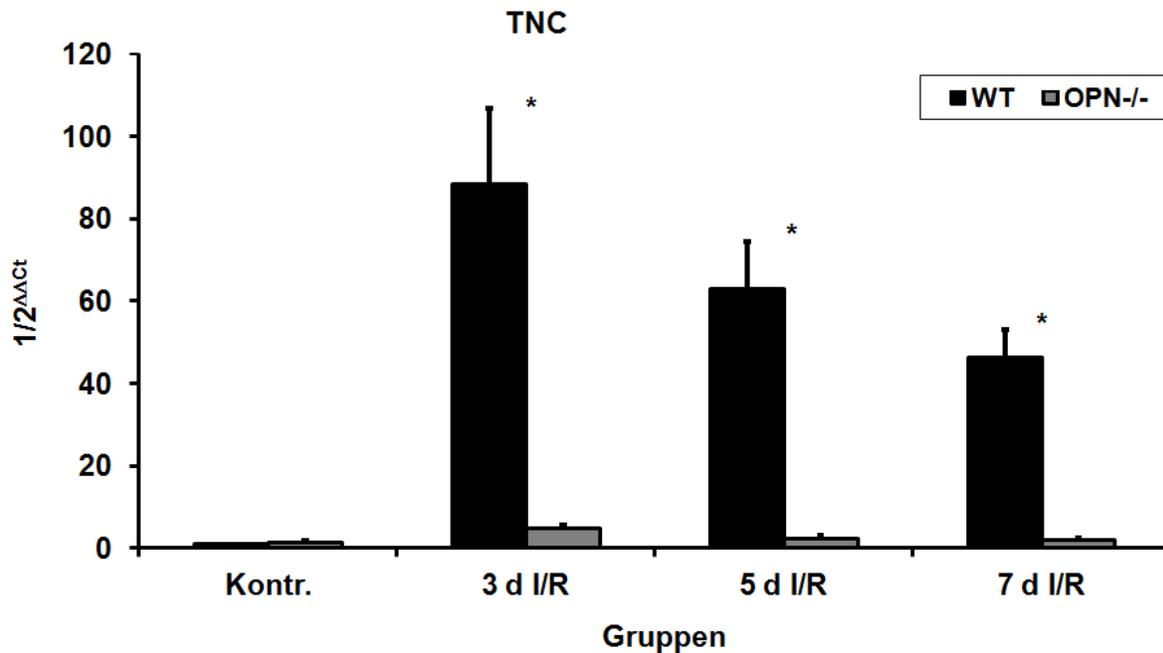


Abb. 14: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TNC im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ - Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, $p < 0,05$

Transforming Growth Factor- β 1

Die TGF- β 1-mRNA-Expression war zwischen den Kontrollgruppen für WT- und OPN^{-/-}-Mäuse nicht unterschiedlich (Abb. 15). Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen nach 3, 5 und 7 Tagen I/R. Die maximale Expression wurde nach 3 Tagen I/R in den Gruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse erreicht, nach 5 und 7 Tagen ging die mRNA-Expression in beiden Gruppen sukzessive auf das Kontrollgruppen-Niveau zurück.

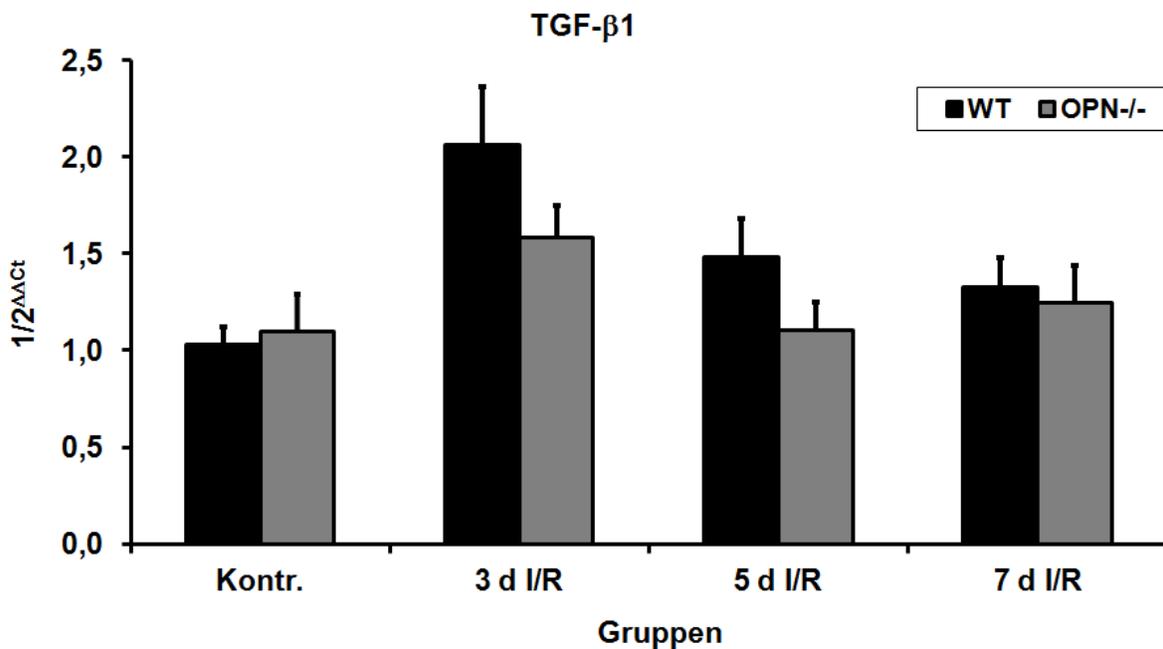


Abb. 15: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TGF- β 1 im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}-Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage

Transforming Growth Factor- β 2

Es zeigten sich keine unterschiedlichen TGF- β 2-mRNA-Expressionen zwischen den Kontrollgruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse (Abb. 16). Ein Maximum der mRNA-Expression erreichten beide Gruppen nach 3 Tagen I/R. Die TGF- β 2-mRNA-Expression zwischen den Gruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse war nach 5 Tagen I/R signifikant unterschiedlich ($3,02 \pm 0,46$ vs. $1,70 \pm 0,34$). Nach 7 Tagen I/R war die mRNA-Expression in beiden Gruppen wieder rückläufig.

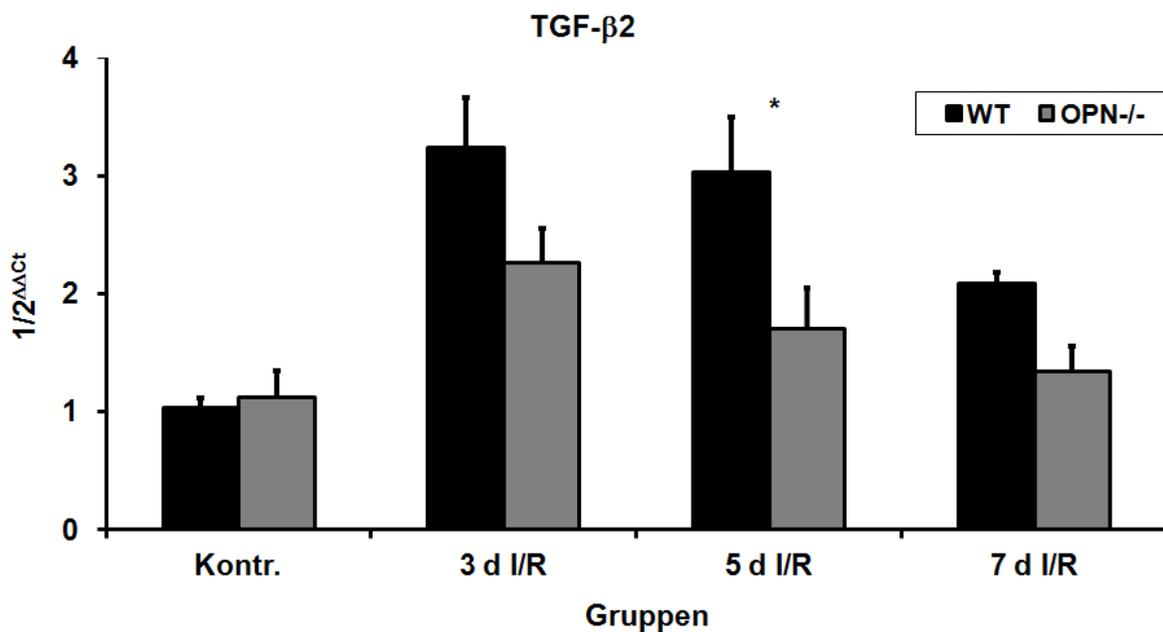


Abb. 16: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TGF- β 2 im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}-Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Transforming Growth Factor- β 3

Auch hier war keine unterschiedliche Expression zwischen den Kontrollgruppen zu sehen (Abb. 17). Es traten keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den Gruppenpaaren auf. Während sich in den Gruppen der WT-Mäuse durchgehend eine leicht erhöhte TGF- β 3-mRNA-Expression zeigte, fiel in den Gruppen der OPN^{-/-}-Mäuse zu keinem Zeitpunkt eine Expressionserhöhung gegenüber der Kontrollgruppe auf.

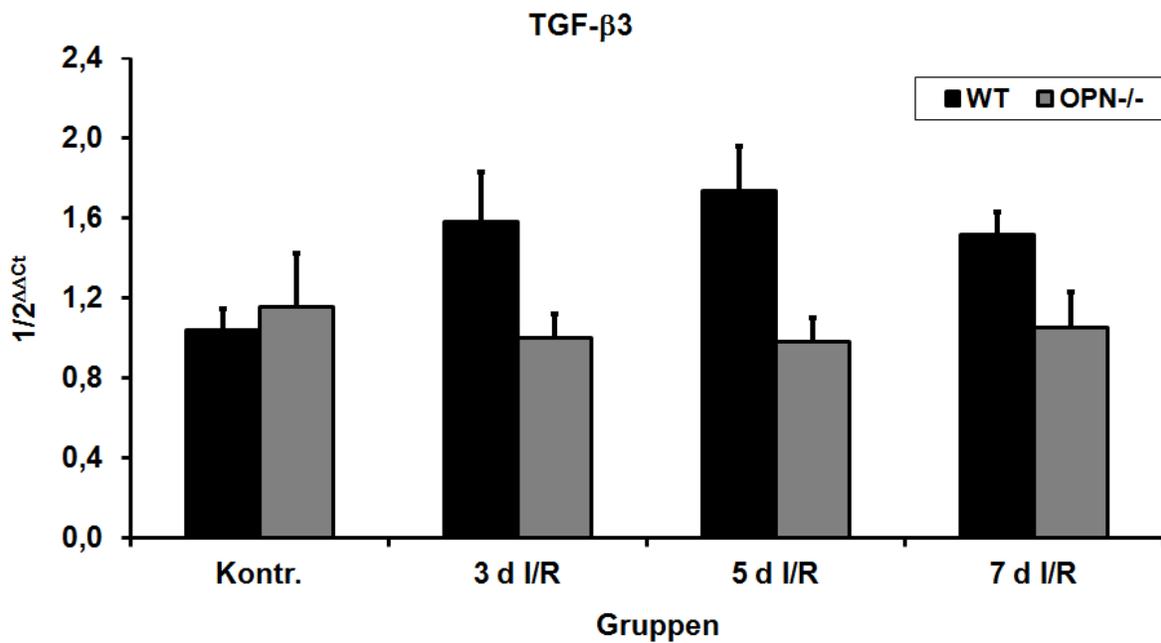


Abb. 17: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TGF- β 3 im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}-Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage

Matrixmetalloproteinase-2

Die Messungen ergaben signifikante Unterschiede der MMP-2-mRNA-Expression zwischen den Gruppen der WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse nach 5 und 7 Tagen I/R mit einer maximalen Expression der MMP-2-mRNA nach 5 Tagen I/R bei den WT-Mäusen ($2,29 \pm 0,36$ vs. $0,94 \pm 0,11$ nach 5 Tagen I/R und $3,45 \pm 0,48$ vs. $0,80 \pm 0,12$ nach 7 Tagen I/R; Abb. 18). In den I/R-Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse wurde MMP-2, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nicht induziert. Die Kontrollgruppen selbst wiesen ebenfalls keine unterschiedliche Expression auf.

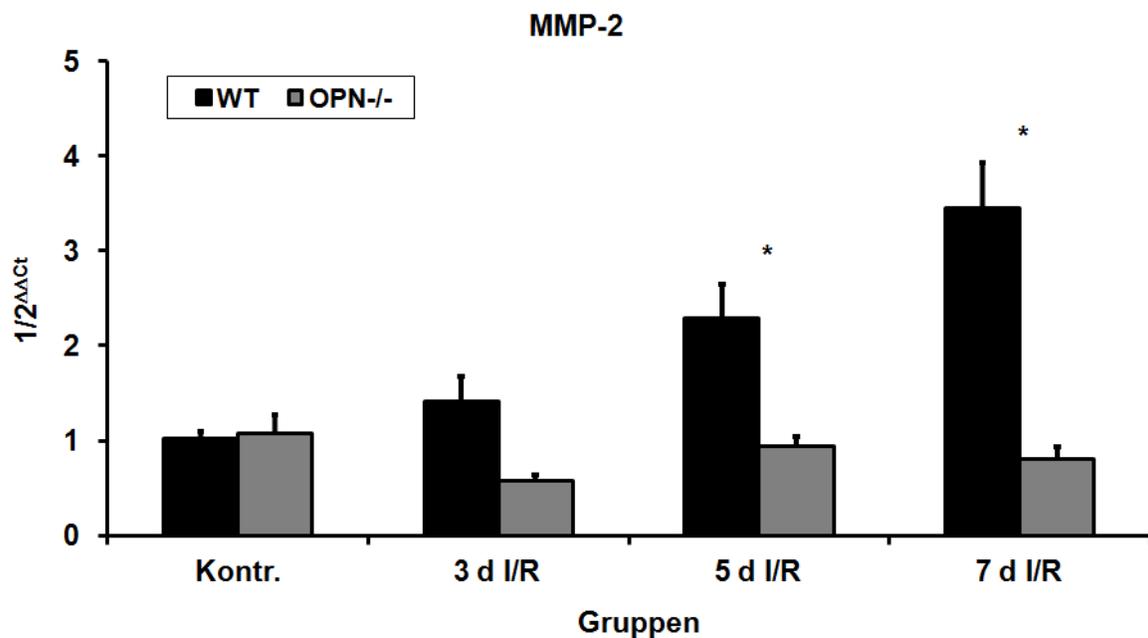


Abb. 18: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von MMP-2 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, $p < 0,05$

Matrixmetalloproteinase-9

Die MMP-9-mRNA-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen, jedoch eine signifikant erhöhte Expression nach 3 Tagen I/R in der Gruppe der WT-Mäuse gegenüber den $OPN^{-/-}$ -Mäusen ($2,85 \pm 0,12$ vs. $0,82 \pm 0,07$; Abb. 19). Nach 3 Tagen I/R war die MMP-9-mRNA in der Gruppe der WT-Mäuse zudem maximal exprimiert, zeigte nach 5 Tagen I/R bereits eine rückläufige Tendenz, welche sich nach 7 Tagen I/R den Ergebnissen der Kontrollgruppe annäherte. In den Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse lag insgesamt keine Induktion der MMP-9-mRNA-Expression nach I/R vor.

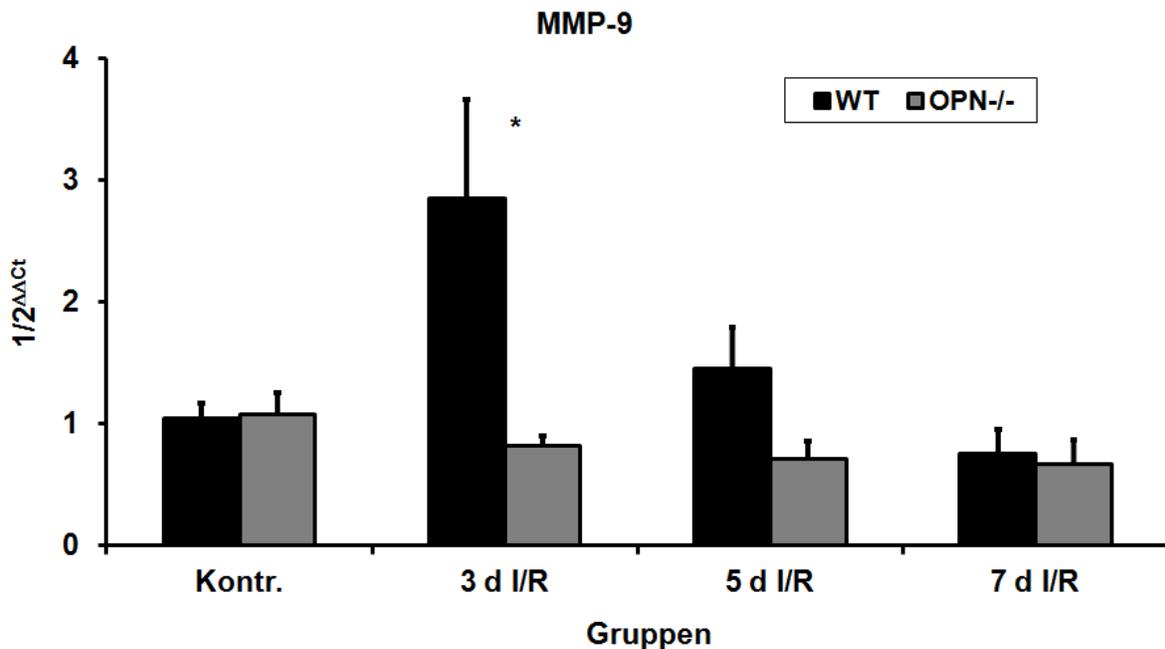


Abb. 19: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von MMP-9 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Matrixmetalloproteinase-13

Die RT-qPCR-Messungen ergaben eine maximale und signifikant erhöhte MMP-13-mRNA-Expression nach 3 Tagen I/R in der Gruppe der OPN^{-/-}-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen ($3,12 \pm 0,70$ vs. $0,64 \pm 0,09$; Abb. 20). Nach 5 und 7 Tagen I/R zeigte sich eine rückläufige Tendenz, die sich den Ergebnissen der Kontrollgruppe annäherte. In den Gruppen der WT-Mäuse trat zu keiner Zeit eine MMP-13-mRNA-Induktion auf. Die Kontrollgruppen zeigten keine unterschiedliche MMP-13-mRNA-Expression.

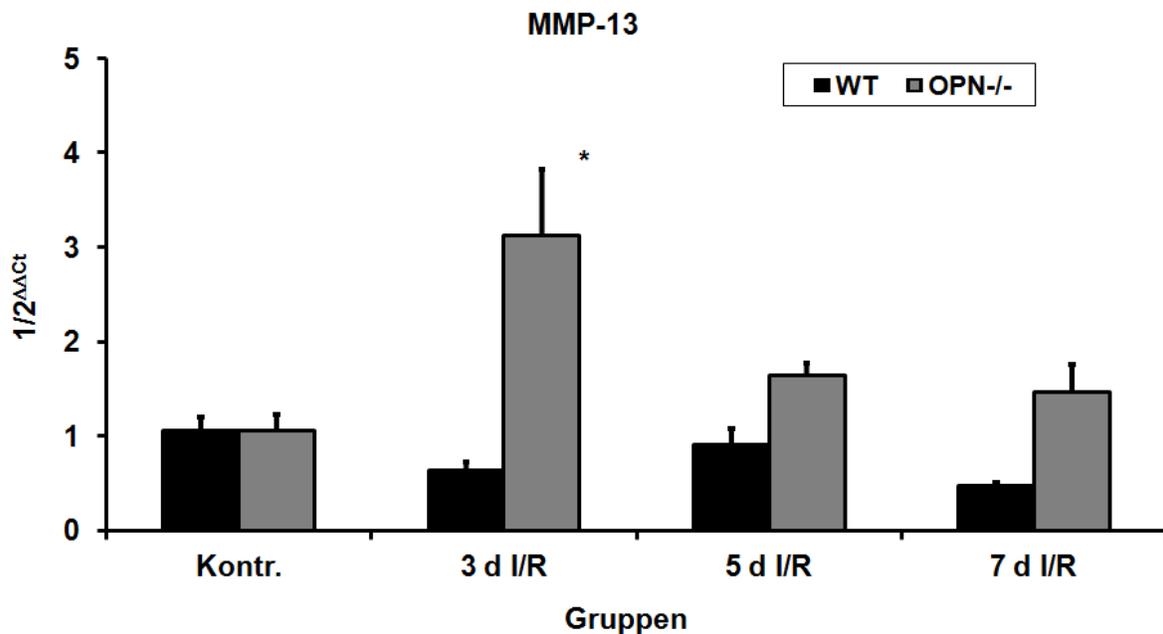


Abb. 20: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von MMP-13 im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}-Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d,Tage; *, p < 0,05

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

Die TIMP-1-mRNA-Expression war in den beiden Kontrollgruppen nicht unterschiedlich. In keiner der $OPN^{-/-}$ -I/R-Gruppen war eine TIMP-1-Induktion gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen (Abb. 21). Demgegenüber zeigte sich die Expression in den Gruppen der WT-Mäuse sowohl nach 3, 5 als auch nach 7 Tagen I/R signifikant erhöht, verglichen mit den jeweiligen $OPN^{-/-}$ -Gruppen ($38,29 \pm 4,61$ vs. $2,83 \pm 0,56$ nach 3 Tagen I/R, $30,55 \pm 5,87$ vs. $1,21 \pm 0,24$ nach 5 Tagen I/R und $25,08 \pm 2,92$ vs. $0,95 \pm 0,22$ nach 7 Tagen I/R). Ihr Maximum wurde nach 3 Tagen I/R in der Gruppe der WT-Mäuse erreicht.

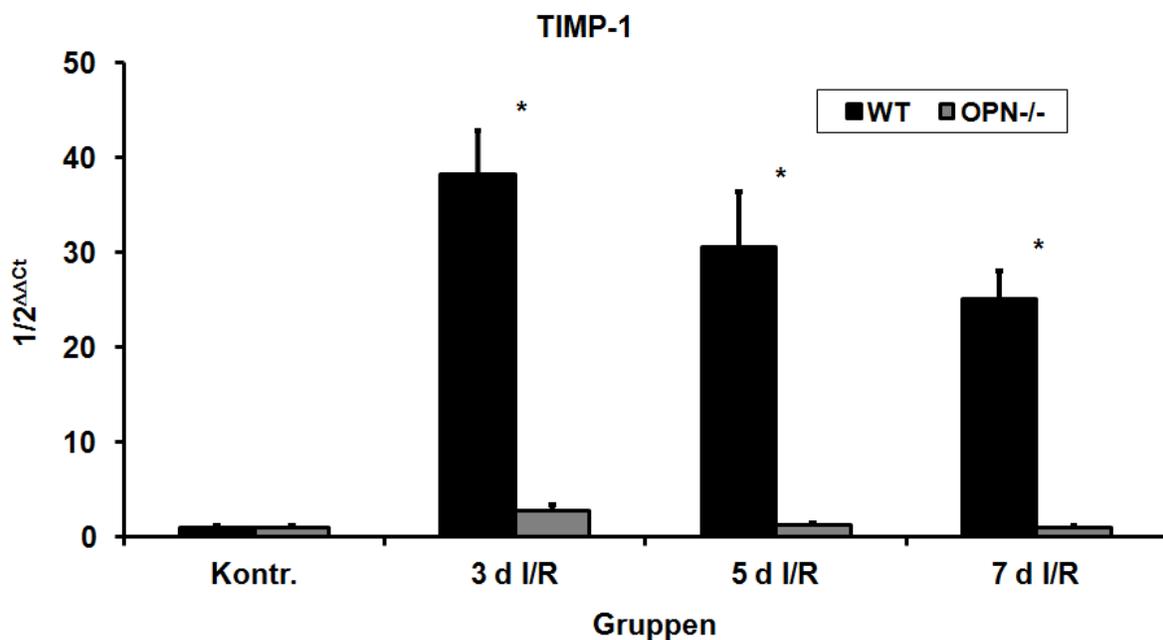


Abb. 21: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TIMP-1 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2

Es gab keine Unterschiede der TIMP-2-mRNA-Expression zwischen den Kontrollgruppen (Abb. 22). Nach 3 und 7 Tagen I/R war die TIMP-2-mRNA in den Gruppen der WT-Mäuse signifikant höher exprimiert als in den Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse ($1,16 \pm 0,22$ vs. $0,57 \pm 0,06$ nach 3 Tagen I/R und $1,62 \pm 0,22$ vs. $0,55 \pm 0,07$ nach 7 Tagen I/R). Die I/R-Gruppen der WT-Tiere zeigten einen sukzessiven Anstieg bis 7 Tagen I/R, während in den Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse keine erhöhte TIMP-2-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte.

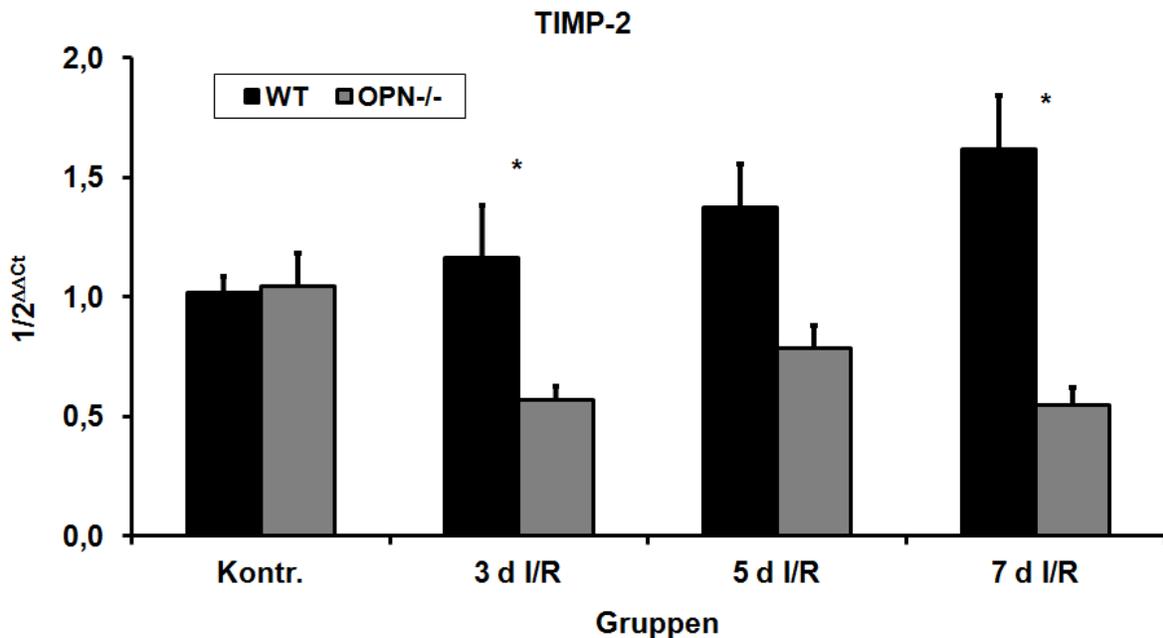


Abb. 22: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TIMP-2 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4

Auch hier zeigten die Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (Abb. 23). In den Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse lag zu keinem gemessenen Zeitpunkt ein Unterschied zur Kontrollgruppe vor. Nach 7 Tagen I/R war allerdings eine signifikant höhere TIMP-4-mRNA-Expression in der Gruppe der WT-Mäuse gegenüber den $OPN^{-/-}$ -Mäusen zu sehen ($2,19 \pm 0,20$ vs. $1,12 \pm 0,09$). Gleichzeitig erreichte diese hier ihr Maximum.

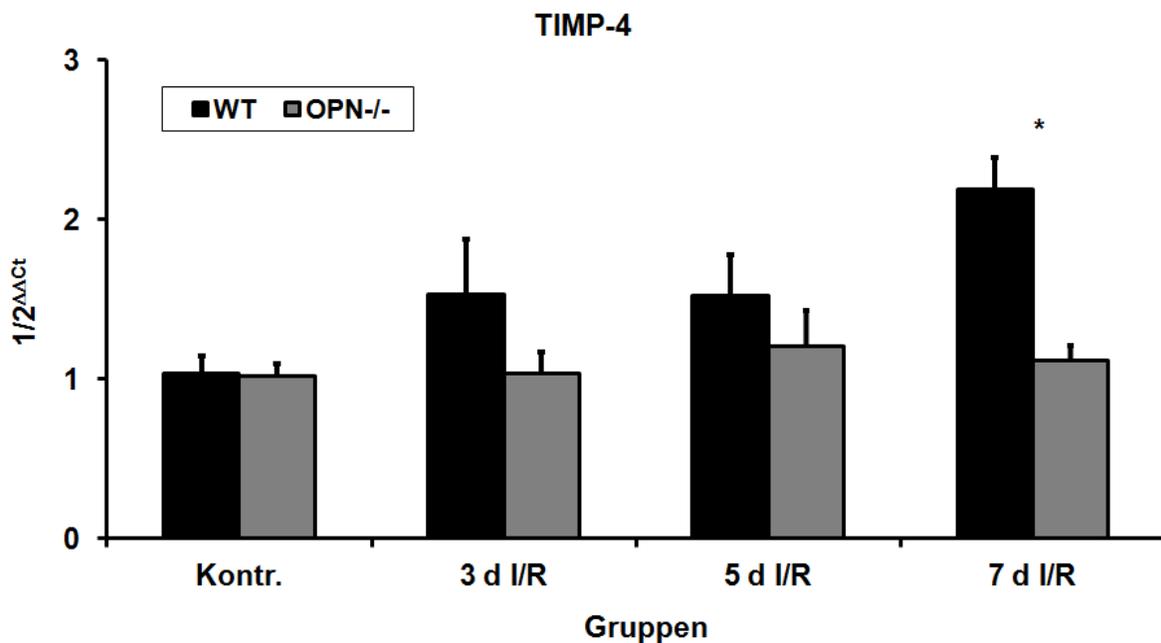


Abb. 23: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von TIMP-4 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

3.7 Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor- α

Während die PPAR- α -mRNA-Expression in den Gruppen der OPN^{-/-}-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt erhöht war, zeigte sich in allen 3 I/R-Gruppen der WT-Mäuse eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den OPN^{-/-}-Mäusen und auch im Vergleich zur eigenen Kontrollgruppe ($1,31 \pm 0,15$ vs. $0,80 \pm 0,05$ nach 3 Tagen I/R, $1,27 \pm 0,12$ vs. $0,79 \pm 0,11$ nach 5 Tagen I/R und $1,65 \pm 0,1$ vs. $0,83 \pm 0,08$ nach 7 Tagen I/R) (Abb. 24). Ein Maximum wurde nach 7 Tagen I/R erreicht. Zwischen den jeweiligen Kontrollgruppen lag kein Unterschied zu vor.

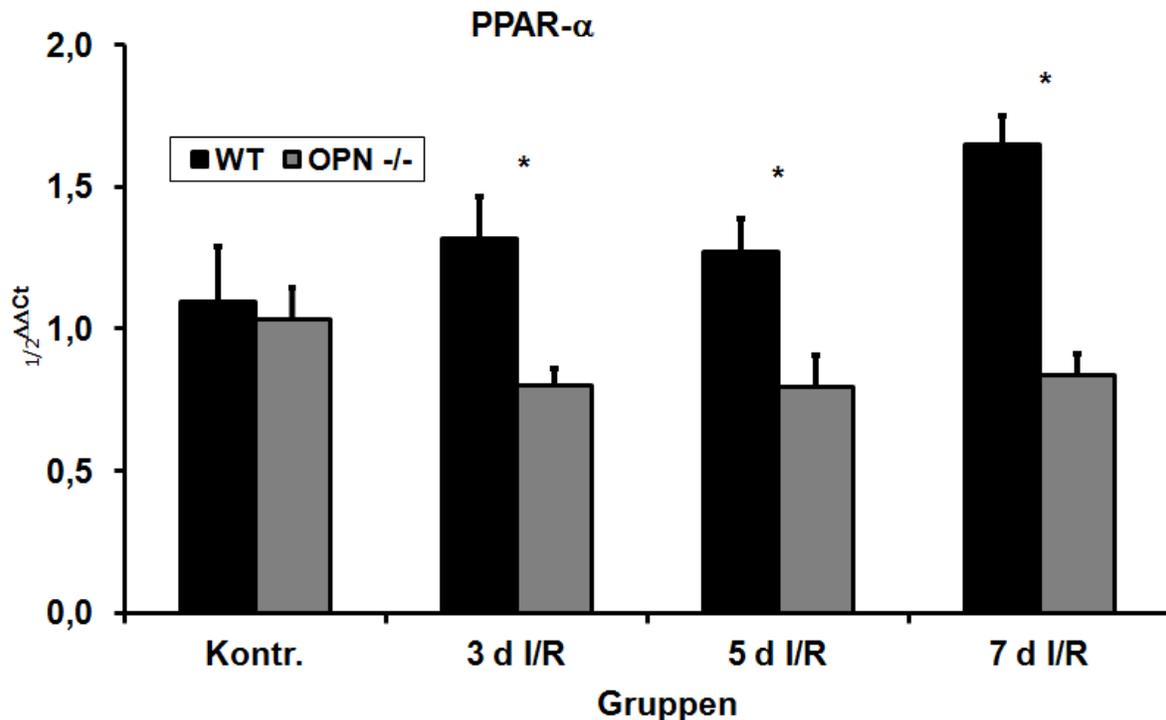


Abb. 24: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von PPAR- α im Vergleich zwischen WT- und OPN^{-/-}-Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; OPN^{-/-}, OPN^{-/-}-Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

3.8 Cannabinoidrezeptoren

Cannabinoidrezeptor 1

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (Abb. 25). Beide Gruppen wiesen keine Erhöhung der CB1-mRNA-Expression als Antwort auf I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Nach 5 Tagen I/R war allerdings eine signifikant geringere Expression in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen zu beobachten ($0,29 \pm 0,05$ vs. $0,77 \pm 0,22$).

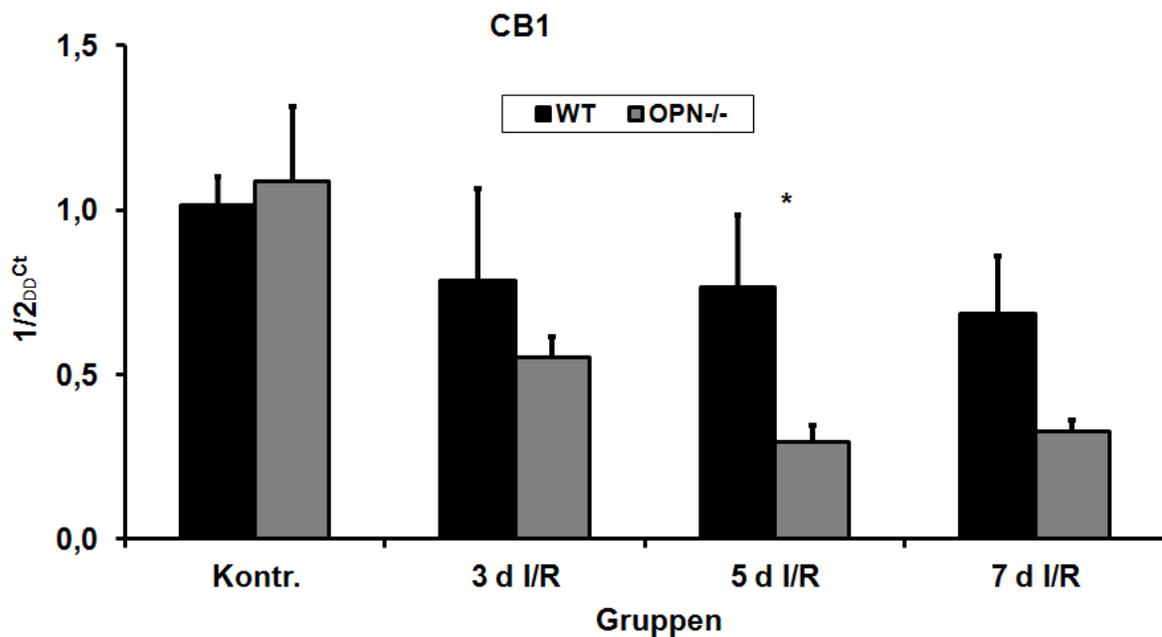


Abb. 25: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von CB1 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

Cannabinoidrezeptor 2

Die Ergebnisse der CB2-mRNA-Expression ergaben keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen für WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäuse (Abb. 26). Das Maximum wurde in der Gruppe der WT-Mäuse nach 5 Tagen I/R bei einer signifikant niedrigeren CB2-mRNA-Expression in der Gruppe der $OPN^{-/-}$ -Mäuse erreicht ($4,48 \pm 1,14$ vs. $0,88 \pm 0,08$). Eine Induktion der CB2-mRNA in den I/R-Gruppen der $OPN^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe blieb aus.

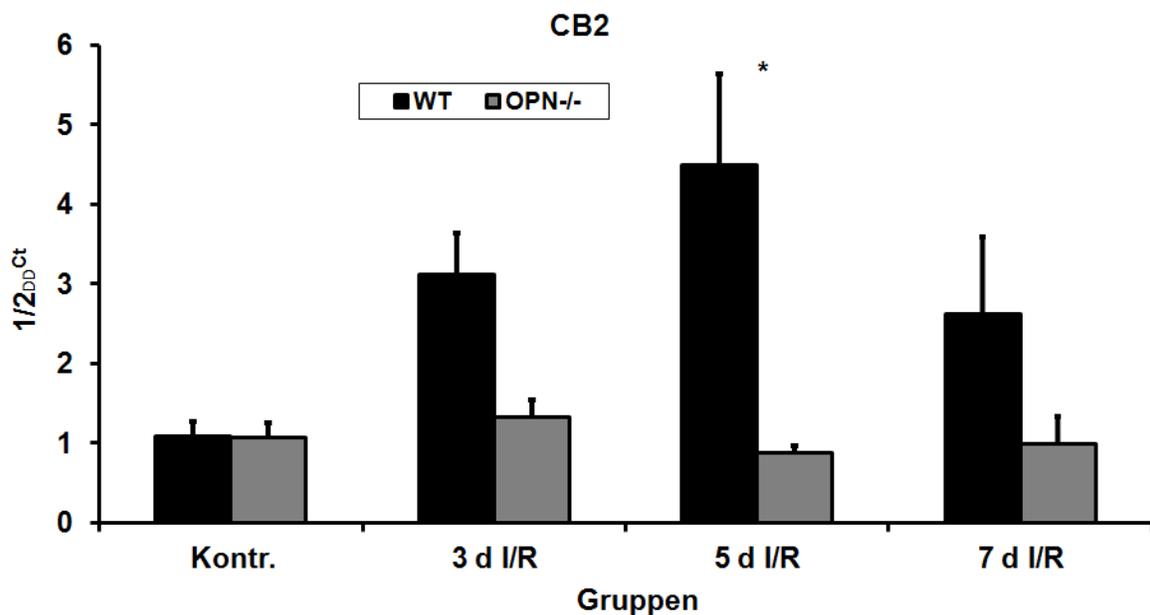


Abb. 26: Taqman RT-qPCR: Darstellung der Induktion der mRNA-Expression von CB2 im Vergleich zwischen WT- und $OPN^{-/-}$ -Mäusen nach 3, 5 und 7 d I/R bezogen auf Kontrollgruppen. WT, Wildtyp-Mäuse; $OPN^{-/-}$, $OPN^{-/-}$ -Mäuse; I/R, Ischämie/Reperfusion; d, Tage; *, $p < 0,05$

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle von OPN im myokardialen Gewebeumbau anhand eines Mausmodells der repetitiven, kurzen I/R. Hierzu wurde die Induktion von Zytokinen, Chemokinen, Mediatoren des Gewebeumbaus, PPAR- α und Cannabinoidrezeptoren in OPN-defizienten Mäusen mit derjenigen in Wildtypmäusen verglichen und damit der Anteil von OPN an der inflammatorischen Antwort und der Entstehung der ventrikulären Dysfunktion bestimmt. Die Untersuchungen waren ein wichtiger Teil des Projektes, indem außerdem auch histologische Veränderungen qualitativ und quantitativ untersucht worden sind. Die Histologie ist in einer anderen Dissertation abgehandelt und auf diese wird stellenweise verwiesen.

Die Überlebensraten nach initialer Operation betrugen 79 % für die WT-Mäuse und 72 % für die OPN^{-/-}-Mäuse. Die initiale Operation war der schwierigste Teil der chirurgischen Eingriffe. Die Hauptkomplikationen waren die Entstehung eines Pneumothorax sowie die akzidentelle Verletzung der Arteria thoracica interna, die mit einer massiven Blutung einherging. In beiden Fällen verstarben die Tiere meist bereits perioperativ oder un-mittelbar postoperativ. Der zur Durchführung der Ischämie und Reperfusion erforderliche Eingriff war weitaus weniger invasiv und somit weniger riskant, wodurch sich die nahezu 100 %ige Überlebensrate erklären lässt.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass OPN als Bestandteil der extrazellulären Matrix eine Schlüsselfunktion bei zahlreichen inflammatorischen Prozessen im Körper einnimmt (Denhard et al., 2001; Liaw et al., 1995; Senger et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der OPN-mRNA in WT-Mäusen in einem Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie ohne Myokardinfarkt – im Sinne einer KHK – untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten bereits nach einem Tag eine tendenzielle, nach 3 Tagen I/R eine signifikante Hochregulation der OPN-mRNA. Die kardioprotektive Rolle von OPN nach Infarkt konnte bereits gezeigt werden (Singh et al., 2010; Trueblood et al., 2001; Wang et al., 2009). Die OPN-Defizienz führte zu verstärkter linksventrikulärer Dilatation und einer verminderten Kollagensynthese.

Die ventrikuläre Dysfunktion ist eine der wesentlichen Folgeerscheinungen der ischämischen Kardiomyopathie. Im Rahmen der KHK führt die progressive Stenose zu Durchblutungsstörungen im Myokard, die sich als rezidivierende Episoden von

Ischämien manifestieren. Hierbei entsteht eine vorübergehende ventrikuläre Dysfunktion im Sinne eines hibernierenden Myokards, die nach Revaskularisation wieder reversibel ist (Rahimtoola et al., 1989). In dem bei dieser Arbeit verwendeten „closed-chest“-Mausmodell der kurzen repetitiven I/R wurde eine globale und lokalisierte linksventrikuläre Dysfunktion durch kurze, repetitive Phasen der I/R verursacht. Diese ist nach Reperfusion in WT-Mäusen reversibel (Dewald et al., 2003). Die OPN^{-/-}-Mäuse zeigten eine vergleichbare Einschränkung der globalen und regionalen Pumpfunktion wie die WT-Mäuse. Aufgrund der histologisch gesicherten signifikanten Mikroinfarkte in OPN^{-/-}-Mäusen ist von einer Reversibilität der Pumpfunktionsstörung nicht auszugehen. Diese Ergebnisse deuten sehr auf eine kardioprotektive Rolle des OPN in der myokardialen Ischämie und Reperfusion bei Mäusen.

Ischämie und Reperfusion führen im myokardialen Gewebe zur Entwicklung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und damit zu oxidativem Stress. Um den menschlichen Organismus vor den schädigenden Effekten der ROS zu bewahren bestehen verschiedene antioxidative Schutzmechanismen. In dieser Arbeit wurden die GPX-1, ein Enzym dessen Hauptfunktion die Elimination von Lipidperoxiden ist, und die HMOX-1, die den Abbau von freiem Häm zu Biliverdin, Eisen und CO katalysiert, näher untersucht. Die Expression der HMOX-1 und der GPX-1 war im zeitlichen Verlauf vergleichbar mit der OPN-Expression in WT-Mäusen. Die signifikant niedrigere Expression beider ROS-Mediatoren in OPN^{-/-}-Mäusen lässt auf eine OPN-assoziierte Induktion der antioxidativen Enzyme schließen. Somit scheint OPN eine Rolle im Rahmen der Schutzmechanismen des Organismus gegen oxidativen Stress zu spielen, wie er z.B. während der „reperfusion injury“ nach I/R auftritt.

Weitere Faktoren zur Regulation des oxidativen Stress finden sich in der Zelle in Form von Metallothioneinen. Die fehlende Induktion von MT1- und MT2-mRNA in den OPN^{-/-}-Mäusen deutet sehr darauf hin, dass in Anwesenheit von OPN aufkommender oxidativer Stress in der Zelle besser kompensiert wird und die dadurch bedingte Entstehung einer inflammatorischen Reaktion reguliert wird.

In tierexperimentellen Studien konnte eine massive inflammatorische Reaktion in den ersten Tagen der Reperfusion nach Ischämie beobachtet werden (Frangogiannis et al., 1996). Den Chemokinen kommt dabei durch ihre chemotaktischen Effekte auf Monozyten, Makrophagen und Leukozyten eine entscheidende Rolle zu. In der vor-

liegenden Arbeit zeigte sich, dass repetitive, kurze myokardiale I/R die mRNA-Expression der Chemokine transitorisch mit einem Höhepunkt nach 3 Tagen induziert. Diese Befunde korrelierten mit denen der OPN-mRNA-Expression in WT-Mäusen. In OPN^{-/-}-Mäusen wurde dagegen eine signifikant niedrigere Expression von Chemokinen gemessen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass OPN eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Chemokine und damit für die Rekrutierung mononukleärer Zellen im Zuge der inflammatorischen Reaktion spielt. Damit könnte OPN indirekt auch die Auflösung der inflammatorischen Reaktion sowie den Ablauf des Remodeling beeinflussen. In den Modellen der I/R kommt es im Zuge der inflammatorischen Reaktion auch zur Komplementaktivierung, die eine durch TNF- α initiierte Zytokinkaskade auslöst (Davies und Hagen, 1997; Frangogiannis et al., 2002 c; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Im vorliegenden Mausmodell konnten wir zeigen, dass die mRNA einiger mit der inflammatorischen Antwort assoziierter Zytokine nach kurzer, repetitiver I/R mit einem Maximum nach 3 Tagen I/R in den Gruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse induziert war. Der weitere zeitliche Verlauf der mRNA-Induktion ähnelte dem der Chemokine. Ein Zusammenhang mit der zellulären Infiltration in der Histologie konnte auch hergestellt werden. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin dessen protektive Rolle nach I/R durch eine Unterdrückung der akuten inflammatorischen Reaktion zustande kommt (Frangogiannis et al., 1998 a, 2000, 2002 c). Im vorliegenden Mausmodell war die IL-10-mRNA-Expression zwischen den WT- und OPN^{-/-}-Mäusen vergleichbar und zeigte eine zeitliche Auflösung der Entzündungsreaktion auf. Insgesamt kann konstatiert werden, dass OPN nur einen geringen Einfluss auf die Induktion der Zytokine und einen deutlichen Effekt auf die Expression von Chemokinen hat. OPN scheint hier einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation der inflammatorischen Antwort nach I/R zu haben.

Verschiedene Studien zeigten eine Rolle des OPN im Remodeling (Dobaczewski, 2010; Singh et al., 2010; Trueblood et al., 2001). Die Frühphase des Remodeling ist durch die Expression von TNC gekennzeichnet. Die OPN^{-/-}-Mäuse zeigten keine Induktion von TNC im Verlauf, was auf dessen Regulation durch OPN hindeutet. Die histologischen Ergebnisse untermauern diesen Befund, da die OPN^{-/-}-Mäuse eine verminderte Akkumulation von Myofibroblasten in das ischämische Gewebe und eine verlängerte Infiltration des Gewebes mit monozytären Zellen aufwiesen. Damit wird ein verzögertes,

bzw. gestörtes Remodeling in Abwesenheit von OPN nahegelegt - ein sog. „adverse remodeling“ (Dewald et al., 2005).

Die Mediatoren der TGF- β -Familie besitzen eine zentrale Rolle im Remodeling. TGF- β 1 stellt einen der potentesten und am weitesten verbreiteten profibrotischen Mediatoren im menschlichen Organismus dar (Wells, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein transitorisches Maximum der TGF- β 1-mRNA-Induktion nach 3 Tagen I/R in den Gruppen der WT- und OPN^{-/-}-Mäuse. TGF- β 2 ist ebenso wichtig für die Fibroseentstehung (Deten et al., 2001; Jakowlew et al., 1994). Nach 5 Tagen I/R war die TGF- β 2-mRNA in der Gruppe der OPN^{-/-}-Mäuse deutlich niedriger exprimiert. Interessanterweise blieb die TGF- β 3-mRNA-Induktion in OPN^{-/-}-Mäusen aus, im Vergleich zu der Induktion bei WT-Tieren. Auch diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle des OPN in der Regulation des myokardialen Remodeling im Modell der repetitiven I/R bei Mäusen hin.

Nach der Entstehung der Fibrose sind die MMPs die Hauptmediatoren des Umbaus der extrazellulären Matrix (Liu et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit zeigt das Ausbleiben der mRNA-Induktion von MMP-2 und MMP-9, sowie die deutliche Induktion von MMP-13 in den OPN^{-/-}-Mäusen eine differenzierte Regulation des Remodeling in Abhängigkeit von OPN. Als Einschränkung der Interpretation ist anzumerken, dass die mRNA-Expression der MMPs nicht direkt die Wirkung der aktivierten Enzyme im Gewebe widerspiegelt, sondern lediglich auf einen veränderten Bedarf an Synthese der MMPs hinweist.

Die TIMPs sind endogene Inhibitoren der MMPs und damit ebenfalls wichtige Regulatoren im Umbau der extrazellulären Matrix und beim Gewebsremodeling (Brew und Nagase, 2010). In unseren Messungen zeigt sich ein Maximum der TIMP-1-Expression nach 3 Tagen I/R, sowie eine kontinuierliche Induktion von TIMP-2 und -4 in der Gruppe der WT-Mäuse. In den Gruppen der OPN^{-/-}-Mäuse wurde dagegen keine Induktion der TIMPs beobachtet. TIMP-4 konnte bislang nur im Herzmuskelgewebe nachgewiesen werden (Gomez et al., 1997) und hemmt effektiv die pro-MMP-2-Aktivierung durch Inhibierung von MT1-MMP (Bigg et al., 2001). Aufgrund dieser spezifischen Wechselwirkungen korrelieren die Ergebnisse von TIMP-2 und TIMP-4 mit denen für MMP-2. Daraus lässt sich schließen, dass OPN nicht nur einen Einfluss auf die ubiquitär vor-

kommenden Mediatoren, sondern auch auf die herzspezifischen Marker des Auf- und Abbaus der extrazellulären Matrix in einem ischämischen Mausherzen hat.

In Bezug auf die bereits diskutierten Ergebnisse erscheinen zwei weitere Regulationssysteme interessant: PPAR und Rezeptoren des Endocannabinoidsystems.

Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) entfalten verschiedene physiologische Funktionen, abhängig von ihrer Gewebsexpression, Ligandenbindungsspezifität und spezifischer physiologischer Funktion bei Aktivierung (Pruimboom-Brees et al., 2006). In unserem Mausmodell der repetitiven I/R wurde eine spezifische Regulation des PPAR- α mit Kardioprotektion im Sinne einer Abwendung von Lipotoxizität assoziiert. In der vorliegenden Arbeit deutet eine fehlende Induktion von PPAR- α in OPN^{-/-}-Mäusen auf eine Beteiligung des OPN an der Regulation von PPAR- α . Somit wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, dass OPN eine Rolle im Rahmen der Regulation inflammatorischer Prozesse spielt, welche durch die antiinflammatorischen und anti-thrombotischen Eigenschaften von PPAR- α vermittelt werden (Rubins et al., 1999; Li et al., 2004). Dieser Befund und die zugrunde liegenden Mechanismen sollen in weiteren Projekten näher untersucht werden.

Bei Cannabinoidrezeptoren (CB) handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche die biologischen Effekte des Endocannabinoidsystems vermitteln (Howlett et al., 1990). Der CB1 ist am weitesten im Hirngewebe verbreitet (Matsuda et al., 1990), kommt aber auch in verschiedenen peripheren Geweben, wie dem Blutgefäßsystem (Gebremedhin et al., 1999; Liu et al., 2000), dem Herzen (Batkai et al., 2004 b) und der Leber vor (Engeli et al., 2005; Teixeira-Clerc et al., 2006). Unsere Messungen zeigten keine mRNA-Induktion in WT- und OPN^{-/-}-Mäusen während des I/R-Protokolls. Der CB2 wird vornehmlich in immunologischen und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Munro et al., 1993; Valk und Delwel, 1998) und wurde auch im Myokard nachgewiesen (Mukhopadhyay et al., 2007). Die Induktion von CB2 kann die Leukozytenmigration im Rahmen einer akuten inflammatorischen Reaktion hemmen und spielt damit eine große Rolle bei der Regulation einer solchen Entzündungsreaktion, wie sie auch nach I/R vorkommt (Liu et al., 2013). Unsere Ergebnisse zeigen eine maximale mRNA-Expression nach 5 Tagen I/R in der Gruppe der WT-Mäuse bei fehlender mRNA-Induktion im I/R-Protokoll der OPN^{-/-}-Mäuse. Damit scheint OPN auch eine Verbindung mit der Aktivität

des Endocannabinoidsystems und womöglich seinen kardioprotektiven Eigenschaften zu haben.

Zusammenfassend konnte der kardioprotektive Effekt von OPN nun auch im Rahmen der kurzen repetitiven I/R belegt werden. Es konnte neben einer zeitlichen Korrelation der OPN-Expression in WT-Mäusen zu verschiedenen Mediatoren des oxidativen Stress, der Entzündungsreaktion und im Gewebeumbau auch eine funktionelle Bedeutung in diesen Prozessen hergestellt werden. Die Bedeutung von OPN in der Kardioprotektion scheint auch über weitere Systeme wie PPAR oder Endocannabinoide vermittelt zu sein.

5. Zusammenfassung

Die koronare Herzerkrankung als Manifestation der Atherosklerose an den Gefäßwänden der Koronararterien ist gekennzeichnet durch kurze, repetitive Episoden von Ischämie und Reperfusion (I/R). Damit geht eine reversible ventrikuläre Dysfunktion aufgrund einer sich entwickelnden ischämischen Kardiomyopathie einher. Diese wird aufgrund ihrer Reversibilität auch als hibernierendes Myokard bezeichnet. Repetitive I/R führt im vorliegenden Mausmodell zu einer transienten Induktion von Chemokinen sowie einer reversiblen Fibrose. In dieser Arbeit wurde die Rolle des matrizellulären Proteins und Markers der Makrophagenreifung Osteopontin-1 (OPN) näher untersucht. Hierzu wurde einmal täglich eine 15-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion durch Verschluss der LAD an 3, 5 oder 7 aufeinanderfolgenden Tagen an C57/Bl6 Wildtypmäusen (WT) sowie OPN^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Anschließend wurden die Herzen echokardiographisch untersucht und einer mRNA-Analyse (Taqman[®]) unterzogen. In WT-Mäusen war ein 15-facher Anstieg der OPN-mRNA-Expression nach 3 Tagen I/R zu sehen. Begleitet wurde diese durch eine globale und regionale Dysfunktion nach 7 Tagen I/R, die zwischen den WT- und OPN^{-/-}-Mäusen vergleichbar war. Die OPN^{-/-}-Mäuse zeigten eine spezifische Wirkung auf die Expression von Chemokinen und eine weniger spezifische Wirkung auf die Induktion von Zytokinen auf. Diese wurde begleitet von einer signifikant niedrigeren Expression von Mediatoren des oxidativen Stress HMOX-1, GPX-1, MT1 und MT2. Die OPN-Defizienz führte nicht zu einer Induktion des frühen Markers des Remodeling TNC, bewirkte aber gleichzeitig eine differenzierte Regulation weiterer wichtiger Faktoren wie TGF- β , MMPs, oder TIMPs. Zusammen mit den histologischen Ergebnissen zeigte sich ein Bild des verzögerten Remodelings. Die fehlende mRNA-Induktion von PPAR- α und des Endocannabinoidrezeptors CB2 in OPN^{-/-}-Mäusen deutet darüber hinaus auf eine regulatorische Wirkung von OPN in anderen Bereichen der Kardioprotektion hin.

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Daten eine wichtige Rolle für OPN in der Regulation des oxidativen Stress, der damit verbundenen Entzündungsreaktion und des nachfolgenden myokardialen Remodeling im Modell der repetitiven I/R bei Mäusen.

6. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Darstellung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)	43
Abb.2	Darstellung von Fraktionsverkürzung (FS) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	51
Abb.3	Darstellung der Vorderwandverdickung (AWT) während des I/R-Protokolls im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	52
Abb. 4	Osteopontin in WT-Mäusen	53
Abb. 5	GPX-1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	54
Abb. 6	HMOX-1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	55
Abb. 7	MT1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	56
Abb. 8	MT2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	57
Abb. 9	CCL2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} - Mäusen	58
Abb. 10	CCL3 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	59
Abb. 11	CCL4 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	60
Abb. 12	TNF- α im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	61
Abb. 13	Il-10 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	62
Abb. 14	TNC im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	63
Abb. 15	TGF- β 1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	64
Abb. 16	TGF- β 2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	65
Abb. 17	TGF- β 3 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	66
Abb. 18	MMP-2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	67
Abb. 19	MMP-9 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	68
Abb. 20	MMP-13 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	69
Abb. 21	TIMP-1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	70
Abb. 22	TIMP-2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	71
Abb. 23	TIMP-4 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	72
Abb. 24	PPAR- α im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	73
Abb. 25	CNR1 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	74
Abb. 26	CNR2 im Vergleich zwischen WT- und OPN ^{-/-} -Mäusen	75

Tab. 1 Programmierung des TaqMan ABI Prism® 7900HT

48

7. Literaturverzeichnis

Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, Shibahara S, Kappas A. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit Coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6798-6802

Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1518-1525

Allen JW, Cox TA, Kloner RA. Myocardial stunning: a post-ischemic syndrome with delayed recovery. *Exs* 1996; 76: 443-452

Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA. Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 589-595

Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman CR, Kolls JK, Alam J, Ritter T, Volk HD, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1631-1639

Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-258

Anderson HT, Kessinger JM, McFarland WJ, Laks H, Geha AS. Response of the hypertrophied heart to acute anemia and coronary stenosis. *Surgery* 1978; 84: 8-15

Anderson KR, Sutton MG, Lie JT. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol* 1979; 128: 79-85

Atkinson SJ, Crabbe T, Cowell S, Ward RV, Butler MJ, Sato H, Seiki M, Reynolds JJ, Murphy G. Intermolecular autolytic cleavage can contribute to the activation of progelatinase A by cell membranes. *J Biol Chem* 1995; 270: 30479-30485

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Valier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in humans. *Diabetes* 1997; 46: 1319-1327

Ausma J, Cleutjens J, Thone F, Flameng W, Ramaekers F, Borgers M. Chronic hibernating myocardium: interstitial changes. *Mol Cell Biochem* 1995 a; 147: 35-42

Babbs CF, Salaris SC, Turek JJ. Cytochemical studies of hydrogen peroxide generation in postischemic hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260: H123-129

Bagiollini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568

Baliga SS, Merrill GF, Shinohara ML, Denhardt DT. Osteopontin expression during early cerebral ischemia-reperfusion in rats: enhanced expression in the right cortex is suppressed by acetaminophen. *PLoS One* 2011; 6: e14568

Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging. *Free Rad Biol Med* 1990; 8: 523-539

Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferators-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1723-1730

Batkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertáler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004; 110: 1996-2002

Batkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey White J, Jafri A, Haskó G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/ reperfusion injury. *FASEB J*. 2007; 21: 1788-1800

Benowitz NL, Jones RT. Cardiovascular effects of prolonged delta-9-tetrahydrocannabinol ingestion. *Clin Pharmacol Ther* 1975; 18: 287-297

Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 regulates MMP-2 activity in the extracellular environment after pro-MMP-activation by MT1-MMP. *Biochem J* 2003; 374: 739-745

Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang ZP, Soloway PD, Overall CM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type I-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2001; 61: 3610-3618

Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis* 1995; 2: 177-186

Blazquez C, Casanova ML, Planas A, Gomez Del Pulgar T, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Aragon J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J* 2003; 17: 529-531

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ('stunned myocardium'). *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 239-249

Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 609-634

Bouchard JF, Lepicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 2003; 72: 1859-1870

Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeurele PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1901-1909

Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76: 1713-1719

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 55-71

Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997; 95: 684-692

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridisation by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8790-8794

Camici PG, Wijns W, Borgers M, De Silva R, Ferrari R, Knuuti J, Lammertsma AA, Liedtke AJ, Paternostro G, Vatner SF. Pathophysiological mechanisms of chronic reversible left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium). *Circulation* 1997; 96: 3205-3214

Castelli WP. Clinical risk factors in coronary disease. The Framingham study. *Wien Med Wochenschr* 1982; 132 Spec No 2: I-IX

Cervenak L, Morbidelli L, Donati D, Donnini S, Kambayashi T, Wilson JL, Axelson H, Castaños-Velez E, Ljunggren HG, Malefyt RD, Granger HJ, Ziche M, Bejarano MT. Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. *Blood* 2000; 96: 2568-2573

Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001; 103: 2296-2302

Chatterjee K, Swan HJ, Parmley WW, Sustaita H, Marcus H, Matloff J. Depression of left ventricular function due to acute myocardial ischemia and its reversal after aortocoronary saphenous-vein bypass. *N Engl J Med* 1972; 286: 1117-1122

Chen C, Ma L, Linfert DR, Lai T, Fallon JT, Gillam LD, Waters DD, Tsongalis GJ. Myocardial cell death and apoptosis in hibernating myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1997 a; 30: 1407-1412

Chen C, Ma L, Dyckman W, Santos F, Lai T, Gillam LD, Waters DD. Left ventricular remodeling in myocardial hibernation. *Circulation* 1997 b; 96: II-46-50

Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 9-19

Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 2000; 348 Pt 3: 615-619

Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995; 147: 325-338

Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995; 269: 1583-1585

Cook DN. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 61-66

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265: 49-72

Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84: 920-935

Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, Manin S, Deveaux V, Bourin MC, Zimmer A, Lotersztajn S, Pecker F, Pavoine C. The cannabinoidreceptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009; 23: 2120-2130

Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 723-749

Depre C, Shipley GL, Chen W, Han Q, Doenst T, Moore ML, Stepkowski S, Davies PJ, Taegtmeyer H. Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nat Med* 1998; 4: 1269-1275

Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 122: 103-111

Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1191-1207

Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700-2705

Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-677

Dewald O, Sharma S, Adroque J, Salazar R, Duerr GD, Crapo JD, Entman ML, Taegtmeyer H. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species and prevents lipotoxicity. *Circulation* 2005; 112: 407-415

Diamond GA, Forrester JS, deLuz PL, Wyatt HL, Swan HJ. Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978; 95: 204-209

Dinarelli CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 1355-1359

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 504-511

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992; 68: 879-887

Eghbali M, Eghbali M, Robinson TF, Seifert S, Blumenfeld OO. Collagen accumulation in Heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 723-729

Elsässer A, Decker E, Kostin S, Hein S, Skwara W, Müller KD, Greiber S, Schaper W, Klövekorn WP, Schaper J. A self-perpetuating vicious cycle of tissue damage in human hibernating myocardium. *Mol Cell Biochem* 2000; 213: 17-28

Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; 54: 2838-2843

English JL, Kassiri Z, Koskivirta I, Atkinson SJ, Di Grappa M, Soloway PD, Nagase H, Vuorio E, Murphy G, Khokha R. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* 2006; 281: 10337-10346

Entman ML, Youker KA, Frangogiannis N, Lakshminarayanan V, Nossuli T, Evans A, Kurrelmeyer K, Mann DL, Smith CW. Is inflammation good for the ischemic heart-perspectives beyond the ordinary. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: IX/82-87

Fallavollita JA, Lim H, Canty JM Jr. Myocyte apoptosis and reduced SR gene expression precede the transition from chronically stunned to hibernating myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001 a; 33: 1937-1944

Fallavollita JA, Logue M, Canty JM Jr. Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: absence of progressive fibrosis in the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol* 2001 b; 37: 1989-1995

Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002; 109: 121-130

Finck BN, Han X, Courtois M, Amond F, Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW, Kelly DP. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1226-1231

Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 401: 212-227

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelmann BM and Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARgamma. *Cell* 1995; 83: 803-812

Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *Exs* 1996; 76: 263-284

Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2567-2576

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000; 165: 2798-2808

Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002 a; 39: 1468-1474

Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Shan K, Aggeli C, Reardon MJ, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002 b; 160: 1425-1433

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002 c; 53: 31-47

Frangogiannis NG. The prognostic value of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2125-2127

Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008; 58: 88-111

Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation* 1992; 86: III1-11

Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rössner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005; 365: 1389-1397

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active Constituent of haschish. *J Am Chem Soc* 1964; 86: 1646-1648

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98: 1164-1171

Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 1999; 276: H2085-H2093

Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Bartunek J, Melin JA. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused noninfarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1939-1946

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999; 398: 718-723

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-512

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996; 271: 30375-30380

Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 3-15

Hanke H, Lenz C, Finking G. The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review. *Acta Chir Belg* 2001; 101: 162-169

Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000; 107: 140-147

Hawkins HK, Entman ML, Zhu JY, Youker KA, Berens K, Dore M, Smith CW. Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol* 1996; 148: 1957-1969

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1-20

Herold G, Aliani S, Beckers H, Braun RP, Duess U, Drexler H, Faber L, Gawaz M, Germing U, Hagenström H, Harten P, Heintges T, Hönig W, Janssen A, Kaemmerer A, Kindler J, Krebs P, Mellwig KP, Mellinghoff W, Mödder G, Moll S, Oette M, Sauer W, Schmidt HK, Weber AA. *Innere Medizin Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln: Eigenverlag, 2005

Heusch G. Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 1998; 78: 1055-1085

Heusch G, Schulz R. The biology of myocardial hibernation. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 108-114

Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nübe O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999; 5: 1135-1142

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 1992; 10: 413-417

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993; 11: 1026-1030

Hiley CR, Ford WR. Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2004; 79: 187-205

Holgreem A. Redox regulation of genes and cell function. In: Cutler RG, Rodriguez H, eds. *Critical reviews of oxidative stress and aging. Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention.* Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2003: 102-111

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7276-7280

Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S73-78

Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR, Herkenham M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci* 1990; 13: 420-423

Huestis MA, Sampson AH, Holicky BJ, Henningfield JE, Cone EJ. Characterization of the absorption phase of marijuana smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 52: 31-41

Huysman JA, Vliegen HW, Van der Laarse A, Eulderink F. Changes in nonmyocyte tissue composition associated with pressure overload of hypertrophic human hearts. *Pathol Res Pract* 1989; 184: 577-581

Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal Biochem* 1995; 229: 207-213

Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645-650

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; 20: 4782-4793

Jacob C, Maret W, Vallee BL. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3489-3494

Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 104-111

De Jager SC, Kraaijeveld AO, Grauss RW, de Jager W, Liem SS, van der Hoeven BL, Prakken BJ, Putter H, van Berkel TJ, Atsma DE, Schaliij MJ, Jukema JW, Biessen EA. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45: 446-452

Jakowlew SB, Ciment G, Tuan RS, Sporn MB, Roberts AB. Expression of transforming growth factor-beta 2 and beta 3 mRNAs and proteins in the developing chicken embryo. *Differentiation* 1994; 55: 105-118

Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993; 69: 261-274

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86

Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovas Res* 2002; 55: 619-625

Jugdutt BI. Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction. *Am J Physiol* 1997; 272: H1205-1211

Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* 1999; 274: 1729-1735

Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 23-27

Kanakis C, Pouget JM, Rosen KM. The effects of Δ 9-THC (cannabis) on cardiac performance with or without beta blockade. *Circulation* 1976; 53: 703-709

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 63-78

Karsch KR. Atherosclerosis--where are we heading? *Herz* 1992; 17: 309-319

Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 183-201

Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97: 1848-1867

Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, Shook T, Pollick C, Burstein S. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron Artery Dis* 2001 a; 12: 349-356

Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001 b; 104: 2981-2989

Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001 c; 104: 3158-3167

Korthuis RJ, Gute DC, Cepinkas G, Kvietys PR. Cellular mechanism of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 1998; 5: 35-48

Krey G, Braissant O, L`Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands for peroxisome proliferator activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 779-791

Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 91-104

Kudej RK, Ghaleh B, Sato N, Shen YT, Bishop SP, Vatner SF. Ineffective perfusion contraction matching in conscious, chronically instrumented pigs with an extended period of coronary stenosis. *Circ Res* 1998; 82: 1199-1205

Kudo S, Kawano K. Role of interleukin-1 beta in the modulations of cytochrome P450 and heme metabolism in rat liver. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 601-607

Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith CW, Entman ML. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; 95: 693-700

Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic Res* 1998; 29: 93-101

Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibit metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2304-2310

Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 793-796

Lamontagne D, Lépicier P, Lagneux C, Bouchard JF. The endogenous cardiac cannabinoid system: a new protective mechanism against myocardial ischemia. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2006; 99: 242-246

Langton KP, Barker MD, McKie N. Localisation of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J Biol Chem* 1998; 273: 16778-16781

Lentsch AB, Ward PA. The NFkappaB/IkappaB system in acute inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48: 59-63

Lepicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 805-815

Leutenegger CM, Higgins J, Matthews TB, Tarantal AF, Luciw PA, Pedersen NC, North TW. Real-time TaqMan PCR as a specific and more sensitive alternative to the branched-chain DNA assay for quantitation of simian immunodeficiency virus RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 243-251

Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β/δ , and γ . *J Clin Invest* 2004; 114: 1564-1576

Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998; 44: 1799-1808

Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, Giachelli CM. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95: 713-724

Lie YS, Petropoulos CJ. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 43-48

Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 835-840

Liu Y, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 5297-5307

Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 2003; 278: 45034-45039

Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006; 22 Suppl B: 25B-30B

Liu YJ, Fan HB, Jin Y, Ren CG, Jia XE, Wang L, Chen Y, Dong M, Zhu KY, Dong ZW, Ye BX, Zhong Z, Deng M, Liu TX, Ren R. Cannabinoid receptor 2 suppresses leukocyte inflammatory migration by modulating the JNK/c-Jun/Alox5 pathway. *J Biol Chem* 2013; 288: 13551-13562

Lutgens E, Daemen M, Kockx M, Doevendans P, Hofker M, Havekes L, Wellens H, de Muinck ED. Atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice: from proliferative to atheromatous stage. *Circulation* 1999; 99: 276-283

Maes A, Flameng W, Borgers M, Nuyts J, Ausma J, Bormans G, Van de Werf F, De Roo M, Mortelmans L. Regional myocardial blood flow, glucose utilization and contractile function before and after revascularization and ultrastructural findings in patients with chronic coronary artery disease. *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 1299-1305

Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2: 2557-2568

Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferators-activated receptor- α target genes. *Sell Mol Sci* 2004; 61: 393-416

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-850

Maret W, Vallee BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3478-3482

Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 2000; 130: 1455S-1458S

Marx N, Sukhova G, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999 a; 99: 3125-3131

Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferatoractivated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999 b; 83: 1097-1103

Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641

Massey KD, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Standiford TJ. Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors. *Am J Physiol* 1995; 269: H980-987

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564

Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* 2006; 449: 96-103

Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998; 359: 1-18

Michael LH, Hunt JR, Weilbaecher D, Perryman MB, Roberts R, Lewis RM, Entman ML. Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol*. 1985; 248: H350-359

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: H2147-2154

Mülhard C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002

Mukhopadhyay P, Batkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Hasko G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of cannabinoid receptor-1 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 528-536

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-65

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 290-308

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136

Nagase H, Murphy G. Tailoring TIMPs for selective metalloproteinase inhibition. In: Edwards D, Hoyer-Hansen G, Blasi F, Sloane BF, eds. *The Cancer Degradome*. New York: Springer Science, 2008: 787-810

Nasarabadi S, Milanovich F, Richards J, Belgrader P. Simultaneous detection of TaqMan probes containing Fam and Tamra reporter fluorophores. *Biotechniques* 1999; 27: 1116-1118

Neve J, Vertongen F, Peretz A, Carpentier YA. [Usual values of selenium and glutathione peroxidase in a Belgian population]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1989; 47: 138-143

Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1049-1055

Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, Peschon J, Mann DL, Michael LH, Entman ML. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2549-2558

Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 8819-8823

Olsen EG. Hypertension, hypertrophy and dilatation. *Postgrad Med J* 1972; 48: 768-769

Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 765-770

Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T celldependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* 1989; 170: 145-161

Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit. Rev. Immunol* 1993; 13: 225-246

Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E. Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 1988; 108: 626-628

Patouraux S, Bonnafous S, Voican CS, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA, Agostini H, Njike M, Barri-Ova N, Naveau S, Le Marchand-Brustel Y, Veillon P, Calès P, Perlemuter G, Tran A, Gual P. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2012; 7: e35612

Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992; 267: 17321-17326

Pearlman ES, Weber KT, Janicki JS, Pietra GG, Fishman AP. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest* 1982; 46: 158-164

Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1516-1520

Pruimboom-Brees I, Haghpassand M, Royer L, Brees D, Aldinger C, Reagan W, Singh J, Kerlin R, Kane C, Bagley S, Hayward C, Loy J, O'Brien P, Francone OL. A critical role for peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha nuclear receptors in the development of cardiomyocyte degeneration and necrosis. *Am J Pathol* 2006; 169: 750-760

Van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, Wasan KM. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res* 2004; 21: 1531-1538

Rahimtoola SH. Postoperative exercise response in the evaluation of the physiologic status after coronary bypass surgery. *Circulation* 1982; 65: 106-114

Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am Heart J* 1989; 117: 211-221

Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation* 1985; 72: V123-135

Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Haskó G, Liaudet L, Gao B, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects hepatic ischemia/reperfusion injury attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1382-1389

O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 373-390

Reimer KA, Vander Heide RS, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol* 1993; 72: 13G-21G

Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation* 1995; 92: 1891-1901

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-160

Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J* 1993; 290: 343-347

Roberts WC, Buja LM, Bulkley BH, Ferrans VJ. Congestive heart failure and angina pectoris: opposite ends of the spectrum of symptomatic ischemic heart disease. *Am J Cardiol* 1974; 34: 870-872

Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-928

Rosenkrantz H, Braude M. Acute, subacute and 23-day chronic marihuana inhalation toxicities in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 28: 428-441

Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-684

Ross R. Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1990; 19: 79-86

Ross J Jr. Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation* 1991; 83: 1076-1083

Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc* 1993; 25: 2041-2043

Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem.* 1993; 268: 9901-9907

Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaeffer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozyl for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-418

Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996; 94: 2837-2842

Sack MN, Dish DL, Rockman HA, Kelly DP. A role for Sp and nuclear receptor transcription factors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6438-6443

Sappino AP, Masouyé I, Saurat JH, Gabbiani G. Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol* 1990 a; 137: 585-591

Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990 b; 63: 144-161

Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2302-2309

Schaper W, Schaper J. Reperfusion Injury: An Opinionated View. *J Thromb Thrombolysis* 1997; 4: 113-116

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1302: 93-109

Selvin PR, Hearst JE. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements On fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10024-10028

Selye H, Prioireschi P, Jean P. Production of cardiac necroses and nephrocalcinosis by stress in adrenalectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 104: 68-70

Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, Osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996; 149: 293-305

Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 1999; 250: 273-283

Shen YT, Vatner SF. Differences in myocardial stunning following coronary artery occlusion in conscious dogs, pigs, and baboons. *Am J Physiol* 1996; 270: H1312-1322

Shivalkar B, Flameng W, Szilard M, Pislaru S, Borgers M, Vanhaecke J. Repeated stunning precedes myocardial hibernation in progressive multiple coronary artery obstruction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 2126-2136

Shmist YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A. Delta-9 tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 2006; 283: 75-83

Sica A, Matsushima K, Van Damme J, Wang JM, Polentarutti N, Dejana E, Colotta F, Mantovani A. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology* 1990; 69: 548-553

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; 310: 329-332

Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy BI. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 2000; 87: 448-452

Singh K, DeVouge MW, Mukherjee BB. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 18696-18701

Singh M, Foster CR, Dalal S, Singh K. Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 538-543

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 279-303

Solomon A, Gersh B. The open-artery hypothesis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 63-76

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* 2000; 102: 1944-1949

Stewart JA Jr, Wei CC, Brower GL, Rynders PE, Hankes GH, Dillon AR, Lucchesi PA, Janicki JS, Dell'Italia LJ. Cardiac mast cell- and chymase-mediated matrix metalloproteinase activity and left ventricular remodeling in mitral regurgitation in the dog. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 311-319

Statistisches Bundesamt, 2011: Todesursachen in Deutschland. <https://www.destatis.de> (Zugriffsdatum 05.01.2014)

Suezawa C, Kusachi S, Murakami T, Toeda K, Hirohata S, Nakamura K, Yamamoto K, Koten K, Miyoshi T, Shiratori Y. Time-dependent changes in plasma osteopontin levels in patients with anterior-wall acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left-ventricular volume and function. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 33-40

Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2004; 110: 3221-3228

Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Prob Cardiol* 1994; 19: 61-86

Takahashi S, Takahashi Y, Ito K, Nagano T, Shibahara S, Miura T. Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1447: 231-235

Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M. Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene Ther* 1995; 155: 293-298

Tarzami ST, Cheng R, Miao W, Kitsis RN, Berman JW. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 209-221

Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V, Ledent C, Mallat A, Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006; 12: 671-676

Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: H883-891

Thompson KL, Assoian R, Rosner MR. Transforming growth factor-beta increases transcription of the genes encoding the epidermal growth factor receptor and fibronectin in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; 263: 19519-19524

Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS, Singh K. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res* 2001; 88: 1080-1087

Tugwood JD, Isseman I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992; 11: 433-439

Underdown NJ, Hiley CR, Ford WR. Anandamide reduces infarct size in rat isolated hearts subjected to ischaemia-reperfusion by a novel cannabinoid mechanism. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 809-816

Valk PJ, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor, Cb2, in retrovirally-induced leukemic transformation and normal hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998; 32: 29-43

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034

Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, Bol A, Melin JA. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1513-1523

Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998; 12: 1035-1044

Vasák M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 177-183

Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-135

Vlahović A, Popović A. [Reversible left ventricular dysfunction in coronary disease (part one): myocardial stunning]. *Med Pregl* 2000; 53: 39-44

Wagner JA, Hu K, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, Kunos G, Ertl G. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 2048-2054

Wagner JA, Abesser M, Harvey-White J, Ertl G. 2-Arachidonylglycerol acting on CB1 cannabinoid receptors mediates delayed cardioprotection induced by nitric oxide in rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharm* 2006; 47: 650-655

Wang JM, Su S, Gong W, Oppenheim JJ. Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28: 83-90

Wang Y, Chen B, Shen D, Xue S. Osteopontin protects against cardiac ischemia-reperfusion injury through late preconditioning. *Heart Vessels* 2009; 24: 116-123

Walker NJ. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 2002; 296: 557-559

Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 1637-1652

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 341-348

Weber KT, Sun Y, Guarda E, Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Zhou G. Myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: an overview of potential regulatory mechanisms. *Eur Heart J* 1995; 16 Suppl C: 24-28

Weber KT. Infarcted hearts of mice and men. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 506-508

Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC, Weber C. Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999; 29: 700-712

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808

Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G845-850

Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Hibernating myocardium. *N Engl J Med* 1998; 339: 173-181

Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha-smooth muscle actinpositive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 1994; 145: 868-875

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 134-138

Yu Q, Vazquez R, Khojeini EV, Patel C, Venkataramani R, Larson DF. IL-18 induction of osteopontin mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H76-85

Zangger K, Oz G, Otvos JD, Armitage IM. Three-dimensional solution structure of mouse [Cd7]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Sci* 1999; 8: 2630-2638

Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF. Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1387-1396

Zohar R, Zhu B, Liu P, Sodek J, McCulloch CA. Increased cell death in osteopontin-deficient Cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1730-1739

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Armin Welz, meinem ursprünglichen Doktorvater möchte ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Bearbeitung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Oliver Dewald, der mir zunächst als Betreuer und später als Doktorvater durch seine konstruktive und kritische Anleitung sowie seine fachlich kompetente Beratung stets hilfreich zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Daniel Dürr für seine Unterstützung als Betreuer in den finalen Zügen der Arbeit und seine Geduld bei deren Korrektur.

Derselbe Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ischämische Kardiomyopathie des herzchirurgischen Forschungslabors des Universitätsklinikums Bonn. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Helge Dörr und Frau Christine Peigney, sowie dem Institut für Pathologie, welche mir mit wertvollen praktischen Hinweisen zu den molekularbiologischen Versuchen, den Tier-OP`s sowie mit der Schaffung der bestmöglichen Arbeitsbedingungen eine große Hilfe waren.

Ganz herzlich danken möchte ich auch meiner Mutter, die mir meinen Werdegang ermöglicht hat und mich nach wie vor unterstützt, meinem Ehemann, der mir in jeder Lage die größte Hilfe und meine tragende Kraft ist und meinem verstorbenen Vater, ohne den ich heute nicht die wäre, die ich bin.