

**Strukturelle Umbauprozesse im Myokard als  
Ursache eines circulus vitiosus im Stadium des  
“endstage heart failure“ bei dilatativer  
Kardiomyopathie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von            Hanke Mollnau  
aus                            Bremerhaven

Giessen

2003

Aus dem Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerckhoff-Institut  
Abteilung für Experimentelle Kardiologie  
in Bad Nauheim

Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. Jutta Schaper  
Gutachter: Prof. Dr. R. Voß

Tag der Disputation: 15.10.2003

meinen Eltern gewidmet

## Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>3</b>
2.1. Allgemeiner Teil	3
2.1.1. Gewinnung der Gewebeproben und Patientenauswahl	3
2.1.2. Analysemethoden	5
2.1.3. Behandlung und Verarbeitung der Gefrierschnitte	5
2.2. Spezieller Teil	6
2.2.1. Sirius-Rot-Färbung	6
2.2.1.1. Durchlichtmikroskopie	7
2.2.1.2. Ergebnisdokumentation	7
2.2.2. Immunfluoreszenz	7
2.2.2.1. Färbeprotokoll	8
2.2.2.2. Antikörper	9
2.2.2.3. Auswertung	9
2.2.3. Das konfokale Laser Prinzip	11
2.2.3.1. Bildverarbeitung und Ergebnisdokumentation	14
2.2.4. Westernblot: Überprüfung des Antikörpers Kollagen VI	14
2.2.5. Vorgehen bei der Auswertung	15
2.2.5.1. Durchlichtmikroskopie	15
2.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie	15
2.2.6. Methodischer Anhang	16
2.2.6.1. Herstellung von Mowiol zur Einbettung	16
2.2.6.2. Herstellung einer PBS – Puffer-Lösung	16
2.2.6.3. Herstellung von Gelatine-beschichteten Objektträgern	17
2.2.6.4. Herstellung einer Bouin-Lösung für Sirius-Rot-Färbungen	17

	<b>Seite</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
3.1. Allgemeine Begutachtung des extrazellulären Raumes	18
3.2. Durchlichtmikroskopie	19
3.2.1. Sirius-Rot-Färbung	19
3.2.2. Fluoreszenzmikroskopie	19
3.2.2.1. Chondrotinsulfat	19
3.2.2.2. Kollagen I und III	21
3.2.2.3. Kollagen IV	23
3.2.2.4. Kollagen VI	23
3.2.2.5. Fibronectin	26
3.2.2.6. Laminin	27
3.2.2.7. Tenascin	27
3.2.2.8. Vimentin	30
3.2.2.9. CD68	30
3.3. Westernblot	32
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	33
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>34</b>
4.1. Einleitung	34
4.2. Extrazelluläre Matrix	35
4.2.1. Glykosaminoglykane	36
4.2.1.1. Chondroitinsulfat	36
4.2.2. Faserproteine	38
4.2.2.1. Strukturproteine - Kollagene	38
4.2.2.1.1. Kollagen I und III	41
4.2.2.1.2. Kollagen IV	44
4.2.2.1.3. Kollagen VI	46
4.2.2.2. Adhäsionsproteine	49
4.2.2.2.1. Fibronectin	49
4.2.2.2.2. Laminin	51
4.2.2.2.3. Tenascin	54

	<b>Seite</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	
4.2.2.2.4. Vimentin	56
4.2.2.2.5. CD68	58
4.3. "Heart failure" und die Veränderungen der regulativ. Mechanismen	59
4.4. Ischämie, Apoptose, Energiemetabolismus und Therapieansätze	66
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b>	<b>110</b>
<b>9. DANKSAGUNG</b>	<b>111</b>

# 1. Einleitung

Kardiomyopathien werden von der WHO/IFSC als Erkrankungen des Herzmuskels mit objektivierbaren kardialen Funktionsstörungen definiert. Die Einteilung erfolgt hauptsächlich in fünf Formen: 1. dilatativ (DCM), 2. hypertrophisch-obstruktiv (HOCM), 3. restriktiv (RCM) 4. arrhythmogen-rechtsventrikulär (ARVC) 5. nicht-klassifizierbar (NKCM) <sup>1,2</sup>.

Die dilatative Form wird charakterisiert durch Kardiomegalie mit verminderter systolischer Pumpfunktion eines oder beider Ventrikel. Ätiologisch wird die idiopathische von der sekundären Form unterschieden. Für die sekundäre dilatative Kardiomyopathie sind über fünfundsiebzig Ursachen bekannt. Diese schließen neuromuskuläre, inflammatorische, toxische und endokrine Ursachen ein <sup>3,4</sup>. Die primäre Form, die idiopathische dilatative Kardiomyopathie, ist eine Erkrankung bisher nicht eindeutig geklärter Genese. Es erkranken bevorzugt Männer im Verhältnis 2:1 gegenüber Frauen. Die Inzidenz beträgt ca. 6 pro 100000, die Prävalenz ca. 36 pro 100000 Einwohner. Die Erkrankung nimmt trotz adäquater medikamentöser Therapie einen progressiven Verlauf. So bleibt vielen Patienten am Ende nur noch die Herztransplantation als Therapie der Wahl. Die häufigste Todesursache dieser Patienten ist der plötzliche Herztod im Rahmen von anhaltenden malignen ventrikulären Tachykardien <sup>3-5</sup>. Viele ätiologische Ursachen und Zusammenhänge sind bereits diskutiert und beschrieben worden. Darunter fallen infektiöse, genetische und autoimmunologische Aspekte <sup>6,7</sup>. Die klinischen Symptome der dilatativen Kardiomyopathie orientieren sich an dem Grad der Herzinsuffizienz.

Die korrelierenden morphologischen Veränderungen gehen einher mit Hypertrophie der Kardiomyozyten und einem massiven Gehalt an Bindegewebe im extrazellulären Raum. Es wird angenommen, dass der Primäreffekt in den Myozyten selbst, ohne hämodynamische Druckbelastung als Ursache stattfindet <sup>8</sup>. Die Myozyten zeigen deutliche Veränderungen der Ultrastruktur vor dem Auftreten fibrotischer Umbauprozesse im extrazellulären Raum. Die Größe der Mitochondrien in den Kardiomyozyten nimmt ab, ohne dass kompensatorisch ihre Zahl zunimmt. Dieser Aspekt trägt zur Verschlechterung des Energiemetabolismus der Myozyten bei. Die Kerne weisen bizarre Formen auf, vergrößern sich und zeigen untypische Chromatinansammlungen. Intrazelluläre Lipidablagerungen sind ebenfalls vermehrt zu finden <sup>9-12</sup>. Intrazellulär kommt es zum Verlust an kontraktilen Material <sup>11,13,14</sup>. Zytoskelettäre Proteine wie Tubulin und Desmin werden vermehrt und unorganisiert intrazellulär exprimiert <sup>15,16</sup>.

Übergreifend entstehen Veränderungen in den “gap junctions“, u.a. hervorgerufen durch neurohumorale Mechanismen. Die Dysfunktion der “gap-junctions“ wird wiederum kausal für das erhöhte Auftreten an Arrhythmien bei dem Krankheitsbild angesehen <sup>17,18</sup>.

Auf zellulärer Ebene wird längerfristig die Integrität der Myozyten im Verbund nicht mehr gewährleistet. Im Interstitium finden sich massive Ansammlungen an Matrixproteinen, vor allem an Kollagenen, die zunehmend Raum beanspruchen und Muskelzellen ersetzen bzw. verdrängen. Es bildet sich im Rahmen der Umbauprozesse das Narbengewebe, die Fibrose. Die Fibrose ist ein bedeutendes morphologisches Charakteristikum der dilatativen Kardiomyopathie, weil es schließlich für das Auftreten der klinischen Symptome mitverantwortlich ist. Auf die Myokardfibrose wurde erstmalig von Jean-Baptiste Sénac (1693-1770) in seiner Arbeit “*Traité de la structure du cœur, de son action et de ses maladies*“ hingewiesen <sup>19</sup>. Seitdem gibt es viele Arbeiten von internationalen Wissenschaftlern, die diese Pathologie bei vielen myokardialen Erkrankungen beschreiben konnten <sup>20</sup>.

Eine grundlegende Folgerung, die man gewann, war, dass die Fibrose das Endprodukt von Umbauprozessen (“remodeling“) ist, deren Ablauf ähnlich der von herkömmlichen Verletzungsreaktionen ist, wie man sie zum Beispiel von thermischen oder physikalischen Schäden her kennt. Verletzungen des Gewebes, unabhängig von der Ätiologie, produzieren eine uniforme reparative Antwort. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die extrazelluläre Matrix einem permanenten Umbauprozess in Form von Abbau und Neusynthese, allerdings für gewöhnlich auf einem ausgeglichenen niedrigen Niveau. Myozytenform, Myozytenanordnung und Stabilität des Gewebes werden durch dieses Gleichgewicht, dem die extrazellulären Matrixproteine unterliegen, gewährleistet und bestimmt. Die Bedeutung dieser Proteine und ihrer regulativen Mechanismen im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie soll nun in dieser Arbeit erörtert werden. Interessant sind vor allem die terminalen Veränderungen und Zusammenhänge, die letztendlich zur Herztransplantation führen – das “endstage heart failure“.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeiner Teil

#### 2.1.1 Gewinnung der Gewebeproben und Patientenauswahl

Als Untersuchungsmaterial diente Myokardgewebe von 10 Patienten, bei denen aufgrund einer nicht-ischämischen dilatativen Kardiomyopathie (DCM) eine Herztransplantation durchgeführt wurde. Die Ejektionsfraktion lag bei allen Patienten echokardiographisch  $\leq 25\%$ . Die klinischen Daten sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Das DCM-Gewebe wurde bereits im Operationssaal aufbereitet, um akut ischämische Veränderungen auf ein Minimum zu reduzieren. Sofort nach Erhalt des Herzens durch den Kardiochirurgen wurde dieses in bis zu 10 g schwere Stücke, unter Berücksichtigung anatomischer Strukturen (re./li. Atrium, Septum, Papillarmuskel, re./li. Ventrikel) fraktioniert und für weitere Zwecke in Flüssigstickstoff eingefroren. Die weitere Aufbewahrung des Gewebes erfolgte in einer Tiefkühltruhe bei einer Temperatur von minus 80° Celsius.

Adäquates humanes Kontrollgewebe zu bekommen, erweist sich aus ethischen Gesichtspunkten als sehr schwierig. Wir waren daher auf humanes Myokardgewebe angewiesen, das normalem Gewebe am ehesten entsprach, und dessen Ätiologie sich klar von der dilatativen Kardiomyopathie abgrenzen ließ. Als Kontrolle bzw. Vergleichsgewebe diente linkes Ventrikelmyokard von 2 Patienten, die an therapierefraktären ventrikulären Arrhythmien litten, und sich einer Transplantation unterziehen mußten. Ferner standen uns Biopsien von Patienten mit atrialen-septalem-Defekt zur Verfügung.

Die Fixierung und Lagerung des Kontrollgewebes war dem der DCM-Untersuchungsgruppe identisch. Zum besseren Verständnis wird das Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie als DCM-Gewebe und das andere als Kontrollgewebe bezeichnet.

**Tabelle 1:** Klinische Parameter der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die sich aufgrund der Progredienz der Erkrankung einer Herztransplantation unterziehen mußten. Auffällig war der ausgeprägte hohe linksventrikuläre enddiastolische Druck als Ausdruck der Ventrikelsteifheit. In Folge dessen und durch die Dilatation der Ventrikel kommt es zur verminderten Ejektionsfraktion. Einige Patienten hatten eine klinisch relevante Mitralinsuffizienz bzw. Trikuspidalinsuffizienz, sowie einen erhöhten mittleren Pulmonalarteriendruck (MPAP). 5 von 10 Patienten hatten in ihrer Rhythmusanamnese maligne Herzrhythmusstörungen in Form von Kammerflimmern oder polymorphe ventrikuläre Tachykardien (klassifiziert nach Lown/Wolf). Ein Patient (#4) wies als Zufallsbefund eine akzessorische Leitungsbahn auf und bei einem Patient war ein Mitralklappenersatz und ein Trikuspidalklappenersatz in der Anamnese zu eruieren.

Patient- Nummer	Alter in Jahren	Sex	EF in %	LVEDP in mm Hg	MPAP in mm Hg	Rhythmus- anamnese	Klappen- status
1	30	w	24	30	40	VF	MI: III°
2	33	m	10	33	39	Lown III-IV	MI: III-IV°
3	53	w	20	25	10	n.a.	MI: II°
4	53	m	20	22	26	WPW	MI: I-II°
5	59	m	20	30	35	n.a.	MI: III-IV°
6	51	w	25	60	35	VF	TI: II-III°
7	40	m	15	27	50	n.a.	MI: III°
8	51	m	15	22	12	VF	MKE, TKE
9	34	m	10	28	33	Lown III-IV	MI: II°
10	54	m	20-25	35	50	n.a.	MI: II°

*Die Normwerte und Bedeutungen sind wie folgt:*

*LVEDP: 8-13 mm Hg, EF: bis 67%  $\pm$  0,008, MPAP: 9-19 mm Hg,*

*Klasse III-IV nach Lown und Wolf (1971): polytope VES, Bigeminus, gekoppelte VES, Salven<sup>21</sup>.*

### 2.1.2. Analysemethoden

Zur Untersuchung wurde Gewebe vom linken Ventrikel für die histologischen Untersuchungen ausgewählt, da aufgrund der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie dort am ehesten Veränderungen zu erwarten sind. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde darauf geachtet, möglichst dieselben Gewebestücke für die verschiedenen Proteinfärbungen zu verwenden. Um eine Aussage über den Zustand der fibrotischen Veränderungen, bzw. über die Lokalisation von Kollagenakkumulationen machen zu können, wurden Sirius-Rot-Färbungen durchgeführt. Danach folgten immunhistochemische Färbungen zur Darstellung extrazellulärer Matrixproteine. Die Ergebnisse beider Färbemethoden wurden anschließend photodokumentiert oder digital gespeichert.

### 2.1.3. Behandlung des Gewebes und Verarbeitung der Gefrierschnitte

Die Gewebestücke wurden für die nachfolgenden Prozeduren am Mikrotom mittels Tissue Tek (Fa. Miles Inc., USA) auf Aluminiumobjekthalter fixiert und eingebettet.

Zum Schneiden der Gewebeproben kam das Gefriermikrotom CM 3000 von der Firma Leica, Deutschland, zum Einsatz. Das Messer besaß, wie für Gefrierschnitte üblich, einen C-Schliff; die Kammertemperatur, sowie die Temperatur am Objekthalter betrug -20 bis -25° C. Die Schnittdicke variierte zwischen 5 und 30 µm. Schnitte bis 6 µm wurden für die Durchlichtmikroskopie verwendet, die dickeren für die Auswertung am Lasermikroskop. Myozyten haben einen Durchmesser von ca. 20 µm, so dass eine Schnittdicke bis zu 30 µm gewählt wurde, um mit Hilfe des Lasermikroskopes eine volle Rekonstruktion der Myozyten mit den umgebenden extrazellulären Proteinen durchzuführen.

Für die Immunfluoreszenzanalysen war es notwendig, die Schnitte auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufzubringen, um die erforderliche Stabilität bei den folgenden Behandlungsschritten zu gewährleisten. Bei Sirius-Rot-Färbungen konnte darauf verzichtet werden. Anschließend ließ man die Gewebeschnitte für kurze Zeit an der Luft trocknen. Die einzelnen Verfahren werden im folgenden speziellen Teil besprochen.

## 2.2. Spezieller Teil

### 2.2.1. Sirius-Rot-Färbung

Die Sirius-Rot-Färbung dient zur Darstellung von kollagenen und retikulären Fibrillen bzw. Fasern im extrazellulären Raum von Gewebe. Strukturen, die Kollagen enthalten, werden rot angefärbt. Damit erhält man Informationen über den Gesamtgehalt kollagener Strukturen und der Lokalisation fibrotischer Areale. Zelluläre Bestandteile lassen sich mit Hilfe der Hämalaun-Kernfärbung blau darstellen. Die Vorbereitungen der Gewebeschnitte für den Färbeprozess wurden bereits im allgemeinen Teil erläutert. Der Tabelle 2 sind die einzelnen Schritte des Färbeprozesses zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Sirius-Rot-Färbeprotokoll

1)	Objektträger mit den Präparaten für mindestens 24 Stunden in Bouin-Lösung legen (Rezept: siehe Anhang)
2)	Schnitte für 1 Stunde in 0,1% Sirius-Rot/Pikrinsäure Lösung stellen (beide Chemikalien Fa. Chroma, Deutschland)
3)	Um Überfärbungen zu vermeiden, kurze Überführung in 0,01N HCL (Fa. Merck, Deutschland)
4)	Kurzes Reinigen in Aqua dest.
5)	Kernfärbung in Hämalaun (Fa. Chroma, Deutschland) für 5-10 Minuten, je nach Frische der Lösung
6)	fließend Wässern für 5 Minuten
7)	Dehydrieren in Alkoholreihe von 95% aufwärts, abschließend in Xylol (Fa. Merck, Deutschland)
8)	Einbettung in Entellan (Merck, Deutschland)

### **2.2.1.1. Durchlichtmikroskopie**

Die gefärbten Schnitte wurden an einem Mikroskop der Firma Leica, Deutschland, Model: DM RB mit den Objektiven: Pl Fluotar 10x/0,3; Pl Apo 20x/0,6; Pl Apo 40x/0,75 befundet. Eine nötige Kontraststeigerung ließ sich unter Verwendung des im Filtermagazin integrierten Graufilters N16 erreichen.

### **2.2.1.2. Ergebnisdokumentation**

Am herkömmlichen Mikroskop wurden die Befunde mit Hilfe einer am Gerät angebrachten Kamera auf Diafilme der Marke Kodak Ektachrome mit einer Lichtempfindlichkeit von 100 ASA dokumentiert. Die Belichtungszeiten der einzelnen Aufnahmen lagen zwischen 0,1 bis 0,5 Sekunden. Die Ergebnisdokumentation am konfokalen Lasermikroskop erfolgte digital auf Wechselspeichermedien.

### **2.2.2. Immunfluoreszenz**

Zur Beurteilung der Verteilung einzelner extrazellulärer Matrixproteine wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe der Immunzytochemie analysiert. Es ließen sich Einfachfärbungen bzw. Doppelfärbungen gegen die unter 2.2.2.2., Tabelle 5 aufgeführten Proteine durchführen. Die Einfachfärbung diente zur Beurteilung und Strukturdarstellung von Matrixproteinen mit möglichen pathologischen Abweichungen und beinhaltete eine Kernfärbung. Die Kernfärbung verhalf zur Bestimmung der Lokalisation von Myozyten.

Die Doppelfärbungen gaben Aufschluß über die räumliche Zuordnung zweier Proteine. Eine Kerngegenfärbung wurde ebenfalls zur Orientierung durchgeführt. Dies konnte jedoch bei Verwendung des konfokalen Laser Mikroskopes nicht separat dokumentiert werden, da das verfügbare Mikroskop mit dem eingebauten Laser auf 2 unterschiedliche Wellenlängen limitiert war. Bei der Dokumentation der Doppelfärbungen stellten sich somit die Kernfärbung und eine der Fluoreszenzen ähnliche Wellenlänge mit gleicher Farbe dar.

Es mußte bei der Durchführung von Doppelfärbungen die Herkunft der Tierspezies des Erst-Antikörpers (1. Antikörper) berücksichtigt werden, da sonst bei Applikation des Zweitantikörpers (2. Antikörper) gleichen Herkunftstieres mit

Kreuzreaktionen zu rechnen wäre. Der Ablauf der FärbeprozEDUREN ist unter 2.2.2.1 aus den Tabellen 3 und 4 ersichtlich. Aufgrund der sehr intensiven Fluoreszenz bei Verwendung des Kollagen VI-Antikörpers wurde eine Überprüfung der Antikörperspezifität mit Hilfe eines Westernblot durchgeführt. Dieser Schritt wird folgend unter 2.2.4. aufgeführt.

### 2.2.2.1. Färbeprotokoll

Als Kontrolle für die Spezifität des verwendeten 1. Antikörpers und der damit gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wurde während des Färbeablaufs der 1. Antikörper auf einem gesonderten Objektträger weggelassen. Stattdessen wurde dieser Objektträger für eine Stunde in PBS-Puffer inkubiert. Dies entsprach der Negativkontrolle, bei der keine spezifische Fluoreszenz sichtbar sein durfte. Ansonsten galt die Färbung als unbrauchbar. Die vorherige Befundung der Negativkontrollen hatte bei der Auswertung folgende Konsequenzen: eventuell aufgetretene unspezifische Reaktionen und/oder Hintergrundfluoreszenzen ließen sich ausgrenzen. Ferner konnte somit ein Mangel an Fluoreszenz als Mangel an Protein im Gewebe interpretiert werden, und nicht als Fehler im Versuchsablauf, oder als Versagen des 1. Antikörpers.

**Tabelle 3:** Färbeprotokoll: Einzelfärbung mit Kernfärbung

1.	Schneiden von Gewebe in 5 bzw. bis zu 30 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom
2.	Lufttrocknen der Schnitte für ca. 10 Minuten
3.	Fixierung des Gewebes in reinem Azeton (Fa. Merck, Deutschland) bei -20° C
4.	Waschen für 10 Minuten in PBS-Puffer
5.	Auftragen des 1. Antikörpers mit PBS-Verdünnung,
6.	Inkubation für 1 Stunde in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer
7.	3 maliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer
8.	Auftragen des 2. Antikörpers mit PBS-Verdünnung
9.	Inkubation für 1 Stunde in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer
10.	3 maliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer
11.	Kerngegenfärbung, Verdünnung und Inkubationszeit abhängig vom Farbstoff – siehe Tabelle 7.
12.	Waschen für 10 Minuten in PBS-Puffer
13.	Eindeckeln der Objektträger mit Mowiol (Fa. Hoechst, Deutschland)
14.	Auswertung/Lagerung über Nacht bei 4° C

**Tabelle 4:** Färbeprotokoll: Doppelfärbung mit Kernfärbung

1.	Schneiden von Gewebe in 5 bzw. bis zu 30 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom
2.	Lufttrocknen der Schnitte für ca. 10 Minuten
3.	Fixierung des Gewebes in reinem Azeton bei -20°C
4.	Waschen für 10 Minuten in PBS-Puffer
5.	Auftragen des 1. Antikörpers mit PBS-Verdünnung
6.	Inkubation für 1 Stunde in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer
7.	3 maliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer
8.	Auftragen des 2. Antikörpers mit PBS-Verdünnung
9.	Inkubation. für 1 Stunde in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer
10.	3 maliges Waschen für je 5 Minuten in PBS-Puffer
11.	Jetzt werden die Schritte ab Punkt 5 bis 10 erneut durchgeführt - mit dem Antikörper gegen das zweite darzustellende Protein - danach weiter mit Punkt 12
12.	Waschen für 10 Minuten in PBS-Puffer
13.	Eindeckeln der Objektträger mit Mowiol
14.	Auswertung/Lagerung über Nacht bei 4° C

### 2.2.2.2. Antikörper

Alle Antikörper und Farbstoffe wurden kommerziell erworben; die Verdünnungen, Herkunft und Bezugsquellen können aus den Tabellen 5 bis 7 entnommen werden. Zur Kerngegenfärbung dienten entweder Propidium Jodid oder Amino-Aktinomycin, deren Inkubationszeiten in Tabelle 7 aufgeführt werden.

### 2.2.2.3. Auswertung

Die Fluoreszenzfärbungen wurden mit dem konfokalen Laser Mikroskop TCS D4 (Fa. Leica, Deutschland) unter Verwendung der Immersionsobjektive Pl Fluotar 25x/0,75 Oil; Pl Fluotar 40x/1,0-0,5 Oil; Pl Apo 63x/1,4 Oil betrachtet. Die jeweiligen Absorptions- und Emissionsmaxima der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe sind aus der Tabelle 8 zu entnehmen. Die allgemeine Begutachtung und Photodokumentation des Präparates erfolgte zunächst mit der herkömmlichen Auflichtfluoreszenzmikroskopie. Im Anschluß wurde bei speziellen Fragestellungen die konfokale Laser Mikroskopie verwendet.

**Tabelle 5:** Herkunft und Verdünnung 1. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Firma
CD 68	1 : 50	Maus	DAKO, Dänemark
Chondroitinsulfat	1 : 50	Maus	Sigma, Deutschland
Fibronektin	1 : 50	Kaninchen	ICN, USA
Kollagen I	1 : 100	Kaninchen	Bio-Science, Schweiz
Kollagen III	1 : 50	Kaninchen	Bio-Science, Schweiz
Kollagen IV	1 : 50	Maus	Dianova, Deutschland
Kollagen VI	1 : 150	Kaninchen	Dianova, Deutschland
Laminin	1 : 100	Ratte	Dianova, Deutschland
Tenascin	1 : 50	Maus	Chemicon, Int.Inc.USA
Vimentin	1 : 3	Maus	Dianova, Deutschland
□-Aktinin	1 : 50	Maus	Sigma, Deutschland

**Tabelle 6:** Herkunft und Verdünnung 2. Antikörper

Biotingekoppelter Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Firma
Anti-rabbit	1 : 100	Esel	Dianova, Deutschland
Anti-rat	1 : 100	Schaf	Dianova, Deutschland
Anti-mouse	1 : 100	Schaf	Dianova, Deutschland

**Tabelle 7:** Herkunft und Verdünnung Fluorochrome und Kernfärbung

Antikörper:	Verdünnung	Firma:	Inkubationszeit in Min.
Texas Red	1 : 100	Amersham, USA	30
FITC	1 : 100	Amersham, USA	30
CY2 / CY3	1 : 100	Biotrend, USA	30
Propidium Jodid	1 : 1000	Molecular Probes, NL	4
Amino-Aktinomycin	1 : 100	Molecular Probes, NL	10

**Tabelle 8:** Eigenschaften der Fluorochrome

Fluorochrom	Farbe	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)
Amino- Aktinomycin	rot	523	647
Propidium Jodid	rot	536	620
CY2	grün	489	505
CY3	orange	552	565
FITC	grün	490	525
Texas Red	rot	590	615

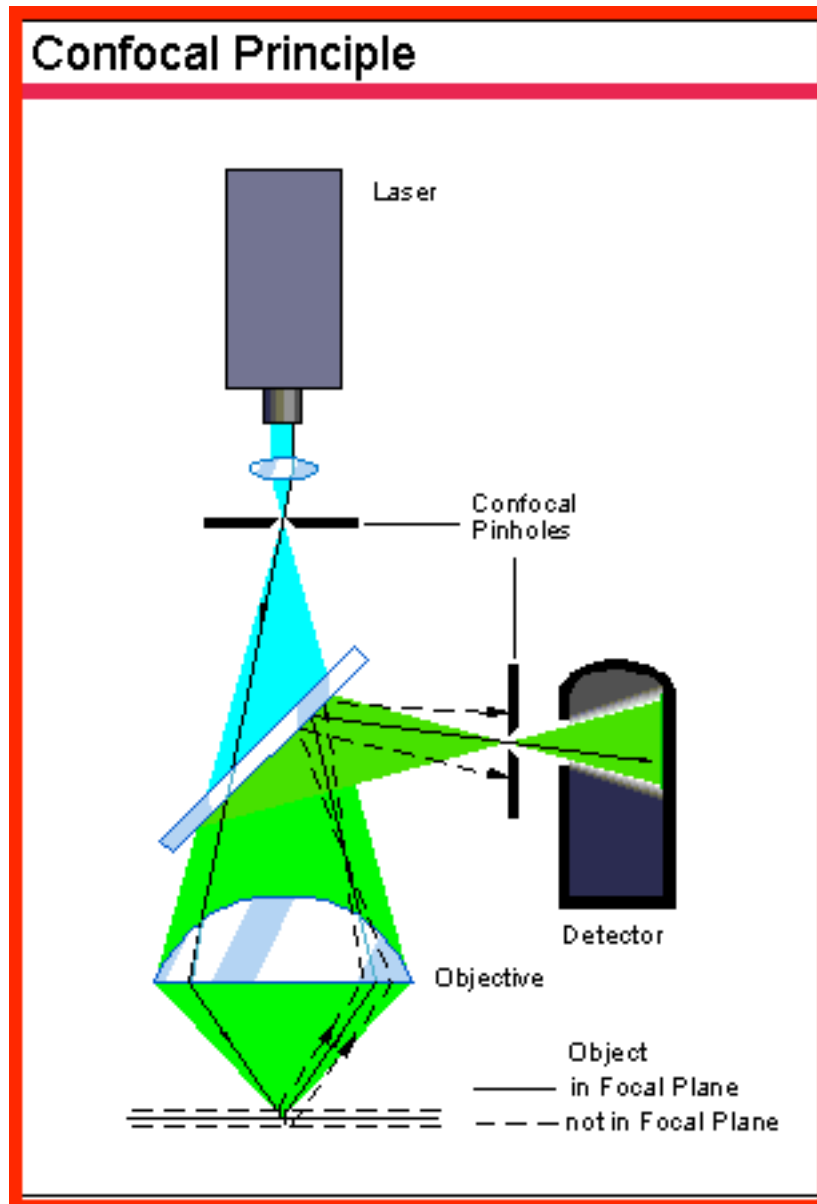
### 2.2.3. Das konfokale Laser Prinzip

Bei dem Konfokalen Laser Mikroskop handelt es sich um ein Mikroskop unter Zusammenschluß von Lasertechnologie, Optik und einer Computereinheit. Letztere hat die Aufgabe, das Mikroskop in seinen Funktionen anzusteuern und die gewonnenen Bilder mit Hilfe von Graphikprogrammen zu verarbeiten. Der generelle Aufbau des Mikroskopes ist dem der herkömmlichen Auflichtmikroskope ähnlich. Mit Hilfe einer Laserlichtquelle (anstelle der herkömmlichen Quecksilberdampf-Lichtquelle) wird die Fluoreszenz der eingesetzten Fluorochrome in den Objekten angeregt. Man ist allerdings auf definierte Lichtwellenlängen beschränkt. Die jeweiligen Wellenlängen, die benutzt werden können, sind abhängig von der verwendeten Lasertechnologie und dem dahinter geschalteten Filtersatz. Im verwendeten Mikroskop TCS D4 der Firma Leica befindet sich ein Argon/Krypton Laser (Omnichrome; Ca., USA) mit den Wellenlängen 647, 568 und 488.

Der Laserstrahl geht durch einen Filtersatz über Blenden, Linsen, dichromatische Spiegel und Objektivlinse auf das Objekt. Der Filtersatz hinter der Laserlichtquelle definiert die Wellenlänge mit der das Präparat zum jeweiligen Zeitpunkt angeregt wird. Die Linse im Objektiv bündelt dann den Laserstrahl im Objekt wie ein Kondensator - in der sogenannten Fokusebene, siehe Abbildung 1. Das Präparat emittiert nun durch Anregung des Lasers Lichtphotonen, deren Weg zurück zu einem Detektor führt, der diese Signale von analog zu digital konvertiert. Vor dem Detektor ist zusätzlich eine Blende angelegt, um Streulicht, das nicht von der Fokusebene kommt, auszugrenzen. Somit erreichen nur die Informationen der Fokusebene den Detektor, wodurch sich höhere Auflösungen, weniger Rauschen und mehr Kontrast als bei herkömmlichen Auflichtmikroskopen erreichen lassen. Die

Auflösung bei dem verwendeten TCS D4 liegt in der x/y-Ebene bei  $0,2\ \mu\text{m}$  und in der z-Ebene bei  $0,4\ \mu\text{m}$ . Unter Zuhilfenahme eines von der Computereinheit feinelektronisch gesteuerten Objektisches (Motorfokus) ist man in der Lage, die Fokusebene in der z-Ebene zu verschieben, so dass sich das Objekt in Sektionen mit einem Schnittabstand von nahezu  $0,1\ \mu\text{m}$  beurteilen läßt. Das „Schichten“ des Präparates ähnelt dem eines Computertomographen oder Magnetresonanztomographen, wie man sie in der Radiologie verwendet. Die optimale Anzahl der Sektionsschnitte in der z-Ebene ist dabei abhängig von den Eigenschaften des Objektes (Dicke, Lichtundurchlässigkeit, Brechungsindex) und der Linse im Objektiv (Numerische Apertur, Abstand zum Objekt).

Mit den so gewonnen digitalen Datensätzen lassen sich unter anderem 3D-Rekonstruktionen, Schattenprojektionen oder 360°-Animationen berechnen, die weiteren Aufschluß über die morphologischen Verhältnisse geben, wie z.B. der Lokalisation spezifischer intrazellulärer Proteine. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können gleichzeitig im gleichen Präparat untersucht werden. Die Informationen erhält man mit Hilfe für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff spezifischen, von der Lasereinheit definierten Wellenlänge. Dabei ist der Detektor während des Scan-Vorgangs in der Lage, eine simultane Zuordnung der verschiedenen Wellenlängen durchzuführen, ohne dass das Präparat erneut belichtet werden muß. Dadurch reduzieren sich Bleicheffekte bei den Fluoreszenzfarbstoffen. Von dem Detektor aus folgt die Weiterleitung über ein Glasfaserkabel zu der Computereinheit, in der, den vom Präparat emittierten Lichtpunkten, einzelne Pixel bzw. Voxel zugeordnet werden. Um ein Gesamtbild zu erzeugen, muß der Laser über den ausgesuchten Objektauschnitt wandern, Linie für Linie. Dabei wird das entstehende Bild „online“ in dem Monitor der Computereinheit aufgebaut. Die so gewonnenen Datenmengen können jetzt digital gespeichert, mit Bildverarbeitungsprogrammen aufgearbeitet oder mit Hilfe von Datenbankprogrammen z.B. auf Wechselspeichermedien archiviert werden.

**Abbildung 1:**

Das konfokale Prinzip: Über eine Laserlichtquelle wird das Objekt auf dem Objektisch angeregt. Der Laserstrahl nimmt seinen Weg über Blenden, Linsen, Spiegel und zuletzt Objektivlinse auf das Objekt. Die Objektivlinse bündelt den Laser wie einen Kondensator in der Fokusebene, welche durch Ausrichtung des Objektisches in der z-Ebene definiert und verändert werden kann.

Das zu untersuchende Objekt emittiert nun Lichtwellen, die ihren Weg zurück durch Streulinsen zum Detektor nehmen. Dadurch werden nur die Lichtphotonen zum Detektor gelassen, die in der Fokusebene liegen. Eine Randunschärfe wie bei den herkömmlichen Auflichtmikroskopen läßt sich somit nun verhindern. Zusätzlich ergeben sich höhere Auflösungen, weniger Rauschen und mehr Kontrast.

Durch die computergesteuerte Ausrichtung in der z-Ebene lassen sich sehr feine Abstände definieren, die damit ein „Schichten“ des Präparates zulassen. Im Detektor werden dann den Lichtphotonen Pixel bzw. Voxel zugeordnet, die dann letztendlich das Bild auf dem Monitor zusammensetzen. (Bildquelle: Fa. Leica, Deutschland).

### **2.2.3.1. Bildverarbeitung und Ergebnisdokumentation**

Die mit dem TCS D4 gewonnen Datensätze wurden entweder vor Ort mit den im System integrierten Bildverarbeitungsprogrammen der Fa. Leica verarbeitet und die entstandenen Bilder auf dem Image Corder (Fa. Focus Graphics, USA) belichtet oder über Ethernet-Netzwerkverbindung auf eine INDY Workstation (Fa. Silicon Graphics, USA) transferriert. Dort erfolgte eine intensive Bildbearbeitung (z.B. Kontrasterhöhung, Rauschunterdrückung, 3D-Rekonstruktion, Schattenprojektion, Extended Focus etc.) mit dem Imaris Programm (Fa. Bitplane, Schweiz). Mit Hilfe der Datenbank Selima (Fa. Bitplane, Schweiz) konnten die endgültigen Bildsätze und ihre zugehörigen Rohdatensätze auf der Festplatte oder einem Magneto Optical Disk Laufwerks (Fa. Pinnacle Micro, USA) verwaltet werden. Dabei sind Informationen über verwendetes Objektiv, Vergrößerung, Pixelgröße, Belichtungszeit etc. zusammen mit den Datensätzen in Form von Info-Dateien abgespeichert worden, so dass jederzeit darauf zurückgegriffen werden konnte. Abschließend wurden die ausgewählten Bilder über eine Quadra 700 (Fa. Apple Macintosh, USA) auf dem LFR Mark II (Fa. Lasergraphics, USA) belichtet bzw. auf einem Thermosublimationsdrucker (Model: Phaser 450, Fa. Tektronics, USA) ausgedruckt. Zur Photodokumentation dienten Kodak Ektachrome Diafilme mit einer Lichtempfindlichkeit von 100 ASA.

### **2.2.4. Westernblot: Überprüfung des Antikörpers Kollagen VI**

Im Verlauf der immunhistochemischen Untersuchungen stellte sich aufgrund von Lokalisation und intensivem Fluoreszenzverhalten für Kollagen VI die Frage, ob sich der Antikörper infolge einer Kreuzreaktion auch gegen andere Kollagengruppen, wie z.B. Kollagen I oder III richtet. Unter Durchführung eines Westernblots in Anlehnung an die Methode von Laemmli und Favre<sup>22</sup> ließ sich die Spezifität des Antikörpers für Kollagen VI testen. Der Versuchsablauf wurde routinemäßig durchgeführt, Trenngel und Sammelgel wurden nach den üblichen Standardverfahren angesetzt. Jeweils 20 µg der Gesamtproteine (Human-Kollagen VI, I, III; Fa. Gibco, USA) wurden nach Aufbereitung in Färbelösung und Extraktionspuffer auf einem 8% SDS Polyacrylamid Gel für ca. 1 Stunde bei 200 V (60 mA) aufgetrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran für ca. 12 Stunden mit 30 V (40 mA) geblottet. Die Nitrozellulosemembran wurde vorher mit in Puffer gelöstem sterilem Magermilchpulver geblockt und danach mit dem Anti-Human

Type VI Collagen Antiserum (Kaninchen, polyclonal; Fa. Gibco, USA) versehen und inkubiert. Die Antikörperkonzentration betrug für den 1. Antikörper 1:100.

Eine Peroxidase Reaktion (Anti-rabbit IgG) zum Darstellen der Banden aus einem Standardkit (Fa. Sigma, Deutschland) schloß die Analysen ab. Anhand der Produktinformation der Firma Gibco sind für Kollagen VI zwei Banden mit 78 kd und 85 kd zu erwarten.

### **2.2.5. Vorgehen bei der Auswertung**

Aufgrund der durchgeführten unterschiedlichen Nachweismethoden mußte beim Vorgehen der Auswertung zwischen Durchlichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie unterschieden werden.

#### **2.2.5.1. Durchlichtmikroskopie**

Bei der Sirius-Rot-Färbung interessierte vor allem die Lokalisation der Kollagenakkumulationen. Es galt, den Zustand des extrazellulären Raumes in folgenden Punkten zu beurteilen:

- Ist der interstitielle Raum vergrößert, liegt Fibrose vor?
- Wo haben sich die fibrotischen Areale manifestiert?
- In welcher Beziehung stehen die Kollagenfasern zu zellulären Bestandteilen des Gewebes, z.B. Myozyten?
- Wie ist die Beschaffenheit und Anordnung der Kollagenfasern?
- Gibt es Ähnlichkeiten zwischen den zu untersuchenden Gewebeproben?

#### **2.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie**

Im Gegensatz zur Sirius-Rot-Färbung, bei der ausschließlich Kollagenstrukturen angefärbt wurden, waren bei der Fluoreszenzmikroskopie, neben der allgemeinen Begutachtung des extrazellulären Raumes, wie unter 3.1 beschrieben, mehrere Proteine nach Lokalisation und Art der Strukturveränderung zu beurteilen. Es galt, Verlust oder Vermehrung der Proteindistribution im Vergleich zu anderen Arealen im gleichen Gewebe und zu anderen Gewebeproben zu bestimmen. Ebenso war es von großem Interesse, ob eine Zuordnung der extrazellulären Matrixproteine zu anderen Strukturen, wie z.B. Gefäße oder Myozyten beobachtet werden konnte.

## 2.2.6. Methodischer Anhang

### 2.2.6.1. Herstellung von Mowiol zur Einbettung

1 g Mowiol (Fa. Hoechst, Deutschland) wird in 4 ml PBS-Puffer (pH 8,0) gelöst. Da das Mowiol schwer in Lösung zu bringen ist, ist es erforderlich es für ca. 16 Stunden zu rühren. Nach Zugabe von 2 ml wasserfreiem Glycerin (Fa. Merck, Deutschland) wird die Lösung erneut für 16 Stunden gerührt. Damit eventuell vorhandene Schwebstoffe entfernt werden, sollte das Einbettmittel zuletzt für 15 Minuten bei 4° C mit 12000 rpm zentrifugiert werden. Empfohlen wird folgende Menge zum Ansetzen: 50 g Mowiol in 200 ml PBS-Puffer unter Zugabe von 25 ml Glycerin.

### 2.2.6.2. Herstellung einer PBS-Puffer Lösung

Zunächst wird eine Stammlösung hergestellt, die vor dem Gebrauch in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt wird. Der pH-Wert der Gebrauchslösung sollte vor Benutzung 7,4 betragen. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Stammlösung von 2 Litern:

1)	158,8 g NaCl
2)	4,0 g KCl
3)	4,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
4)	35,5 g NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O

Die Bezugsquelle aller unter Punkt 1 bis 4 aufgeführten Chemikalien war die Firma Merck, Deutschland.

### **2.2.6.3. Herstellung von Gelatine-beschichteten Objektträgern**

Die benötigten Objektträger werden in Extran (Fa. Merck, Deutschland) zur Entfettung für 20 Minuten gewaschen und anschließend in fließenden Leitungswasser, danach mit destilliertem Wasser gespült. Die Gelatinelösung, in der die Objektträger im nächsten Schritt 5 Minuten lang eingetaucht werden, setzt sich folgendermaßen zusammen: 1000 ml Aqua dest. erhitzt auf 45°C mit einem Zusatz von 5 g Gum arabic (Fa. Fluka Chemie, Schweiz) und 0,5 g  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (Fa. Merck, Deutschland). Anschließend läßt man die Objektträger abtropfen und bei 38° C über Nacht im Wärmeschrank trocknen.

### **2.2.6.4. Herstellung einer Bouin-Lösung für Sirius-Rot-Färbungen**

15 ml gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung (Pikrinsäure: Fa. Chroma, Deutschland) mit 5 ml Formol (Fa. Merck, Deutschland), ca. 35%, mischen und anschließend 1 ml Eisessig zusetzen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Allgemeine Begutachtung des extrazellulären Raumes

Im DCM-Gewebe ließ sich im Vergleich zum Kontrollmyokard eine Verbreiterung des extrazellulären Raumes feststellen. Allerdings waren als nicht pathologisch anzusehende Areale des Interstitiums ebenfalls im DCM-Gewebe zu finden, so dass die pathologischen Veränderungen fokale Bereiche darstellten und parallel mit dem Auftreten an nicht pathologisch eingestuften Arealen einhergingen. Die Veränderungen im DCM-Gewebe stellten keinen einheitlich geringen, oder starken Grad dar, sondern waren eher fließend ineinander übergehend in einem untersuchten Gewebestück zu finden. Starke fibrotische Veränderungen wurden vor allem in näherer Umgebung zu Gefäßen beobachtet. Der perivaskuläre Raum war stark verbreitert, und einzelne angrenzende Muskelzellverbände schienen vom Hauptverbund durch Bindegewebe abgegrenzt zu werden. Vereinzelt waren im Kontrollmyokard ebenfalls mäßig vergrößerte fibrotische Areale im perivaskulären Raum lokalisiert. In fokalen Bereichen waren die morphologischen Veränderungen im DCM-Gewebe so stark ausgeprägt, dass sich der sonst homogen kompakte Myozytenverbund auflöste und sich irreguläre Anordnungen der Myozyten gebildet hatten. Die eng aneinander liegenden Myozyten wurden durch fibrotische Umbauprozesse auseinander gedrängt und vereinzelt Myozyten erschienen völlig vom Verbund isoliert, indem sie vollständig von fibrotischem Material eingeschlossen waren. Zudem konnte man hypertrophe und atrophe Myozyten dokumentieren. Mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Aktinin wurden intrazelluläre Veränderungen der Myozyten im Rahmen einer Degeneration deutlich. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analysen der jeweiligen Proteine besprochen. Die dargestellten morphologischen Bilder stellen eine Auswahl dar und sind repräsentativ für die untersuchten Gewebeproben. Den entsprechenden Proteinen zuzuordnende Farben und die Vergrößerungen der Bilder sind den jeweiligen Legenden zu entnehmen.

## **3.2. Durchlichtmikroskopie**

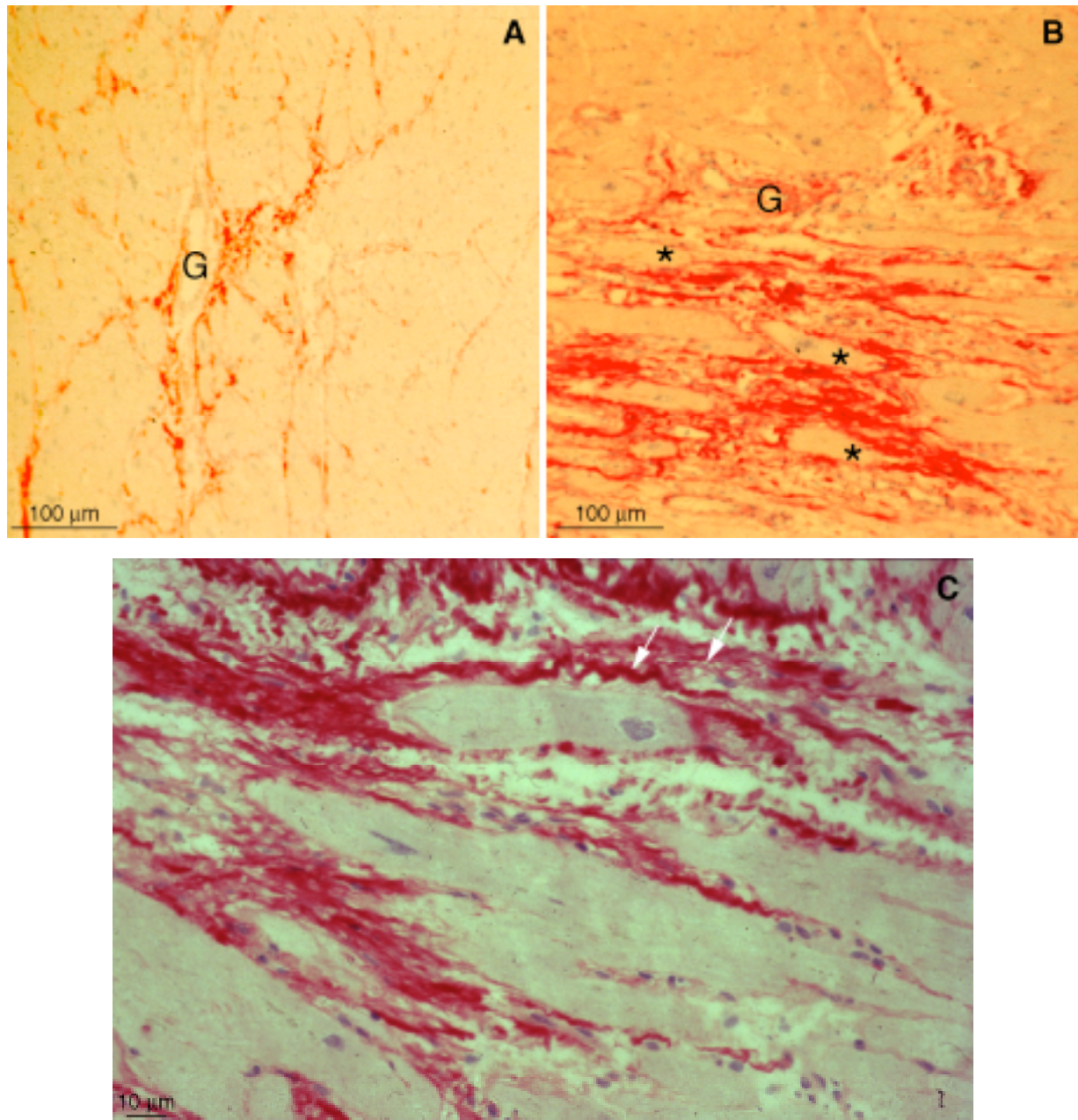
### **3.2.1. Sirius-Rot-Färbung**

Mit der Sirius-Rot-Färbung werden alle unterschiedlichen Kollagenarten im Myokard markiert. Im Kontrollgewebe zeigten sich feine Kollagenstrukturen im Endo- und Perimysium. Perivaskulär in der Adventitia von Arterien und Venen fanden sich vereinzelt dickere Fibrillen. Dicke wie dünne Fasern lagen in gewellter oder geschlungener Form vor (Abb. 2C). Jeden Myozyten umgab ein feiner Saum der Markierung. Die Kollagenfasern bildeten ein Geflecht, welches die Herzmuskelzellen miteinander verband und/oder Verbindungen zu vaskulären Strukturen herstellte. Vergleichend sah man im Kontrollgewebe geringere Anteile an Kollagenakkumulationen (Abb. 2A). Eine deutliche Verbreiterung des interstitiellen Raumes im DCM-Gewebe infolge einer signifikanten Zunahme an Kollagen war in folgenden Bereichen zu beobachten: im Endomysium, Perimysium und in der Adventitia von Gefäßen, entlang des Gefäßbaumes (Abb. 2B). Zusätzlich sah man, dass die Kollagenfibrillen im Durchmesser zunehmen. Einzelne Myozyten, die isoliert in den massiven Ansammlungen an Kollagen vom Zellverbund getrennt wurden, wurden häufig beobachtet (Abb. 2C).

### **3.2.2. Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.2.2.1. Chondroitinsulfat**

Chondroitinsulfat verleiht als Proteoglykan der extrazellulären Matrix eine hohe osmotische Aktivität, die dem Gewebe die nötige Flexibilität verleiht. Chondroitinsulfat im Kontrollgewebe war deutlich eng zur Basalmembran der Myozyten lokalisiert. Es füllte das Interstitium vollständig aus (Abb. 3 A). Bei höherer Vergrößerung zeigte die Fluoreszenz eine faserartige Distribution mit kleinen Granula. Die feinen Chondroitinstrukturen verzweigten sich dabei netzartig miteinander. Im DCM-Gewebe zeigte sich eine erhöhte Markierung im Interstitium (Abb. 3 B). Im Gegensatz zum Kontrollgewebe waren im DCM-Gewebe deutlich mehr granuläre Strukturen vorhanden. Mit einem feinen Saum um die Myozyten, füllte es flächig den gesamten extrazellulären Raum aus. Das vermehrte Vorkommen in den DCM-Geweben resultierte zum einen aus der Verbreiterung des Interstitiums, zum anderen aus vermehrter Akkumulation. Die Lokalisation von Chondroitinsulfat war perivaskulär und fokal im Perimysium verstärkt. Alle Wandschichten der Gefäße waren mit Chondroitinsulfat markiert.

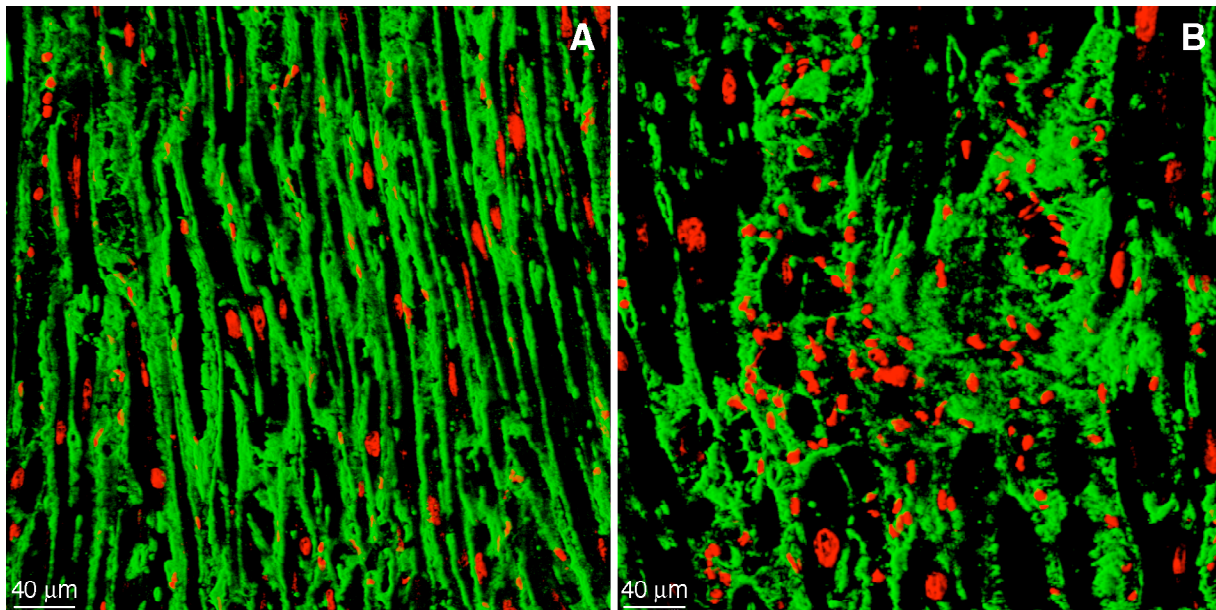


**Abbildung 2:** Sirius-Rot-Färbungen im Kontrollgewebe A und DCM-Gewebe B. C zeigt DCM-Gewebe bei höherer Vergrößerung. Die roten Strukturen stellen die Kollagene dar, blau markiert die Zellkerne der Myozyten, sowie der interstitiellen Zellen.

**Kontrollgewebe (A):** Das Kontrollgewebe zeigt eine homogene Kollagenverteilung. Die Kollagenfibrillen bilden einen feinen Saum um die Myozyten. Perivaskulär (G = Gefäß) finden sich vermehrt Kollagenfasern, die als physiologischer Fibrosegrad eingestuft wurden.

**DCM-Gewebe (B):** Massive perivaskuläre Fibrose im DCM-Gewebe. Die Kollagenfibrillen nehmen im Durchmesser zu. Es kommt zur Isolation von Myozyten aus dem Myozytenverbund (G = Gefäß, \* = isolierter Myozyt).

**DCM-Gewebe (C):** Bei höherer Vergrößerung zeigt sich die Form der Kollagenfasern – sie liegen in gewellter oder straffer Form vor und haben unterschiedliche Durchmesser (Pfeile). Die blauen Kerne im Interstitium sind dort ansässigen Zellen wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen zuzuordnen.



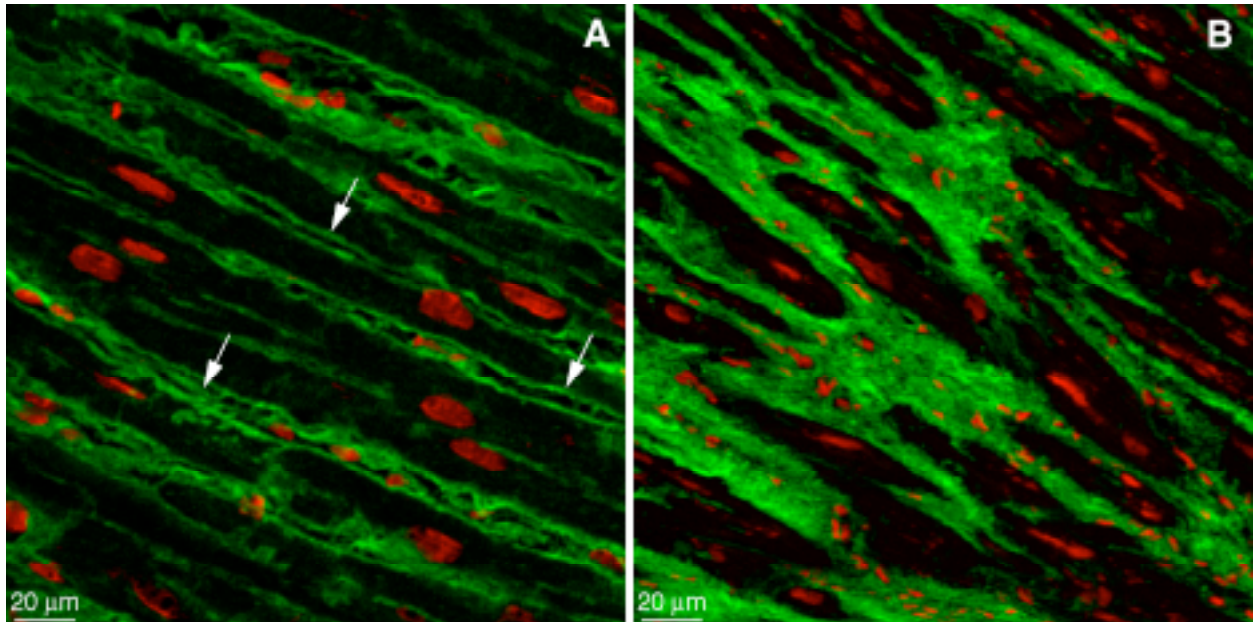
**Abbildung 3:** Immunfluoreszenz für Chondroitinsulfat in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe (Grün = Chondroitinsulfat; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe (A):** Chondroitinsulfat verteilt sich ubiquitär im extrazellulären Raum im Myokard und begrenzt jeweils die individuellen Myozyten.

**DCM-Gewebe (B):** Chondroitinsulfat füllt das erweiterte Interstitium vollständig aus. In Arealen mit Fibrose kommt es zur vermehrten Chondroitinsulfatmarkierung. Die zahlreichen Zellkerne könnten u.a. Fibroblasten zugeordnet werden, die im Narbengewebe vermehrt lokalisiert sind.

### 3.2.2.2. Kollagen I und III

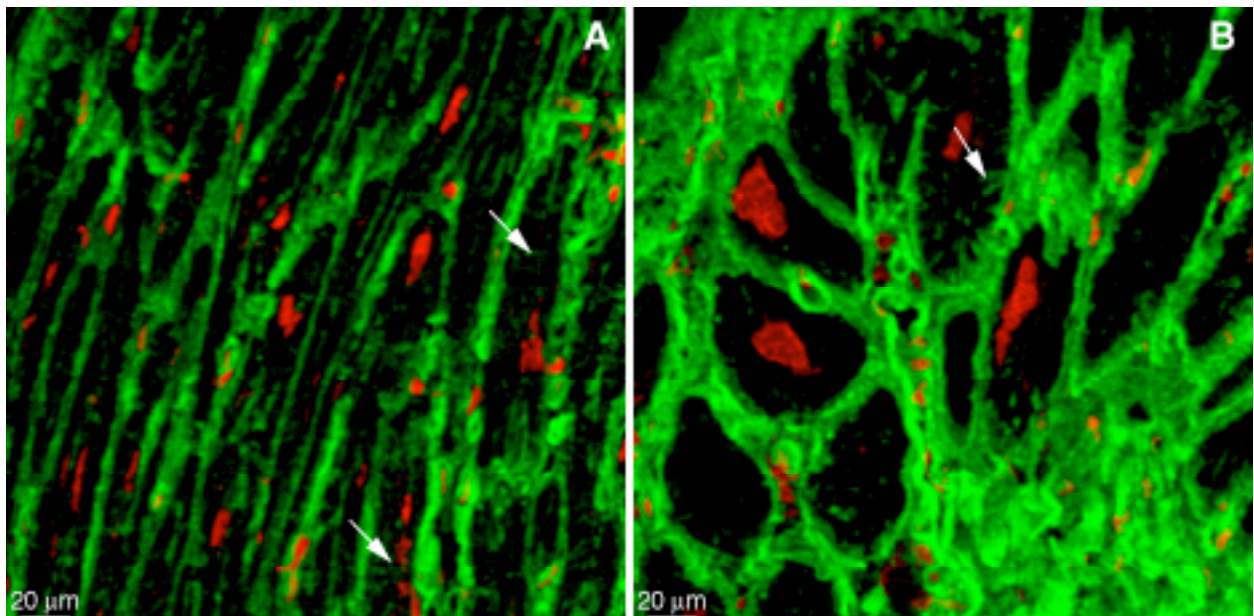
Beim Auswerten dieser beiden Antikörper bot sich im Kontroll- und DCM-Gewebe ein morphologisches Bild, wie es von den Sirius-Rot-Färbungen bekannt war. Die Anordnung beider Kollagene im Endomysium und Perimysium wies kaum Unterschiede auf. Positive Markierungen für Kollagen I und III fanden sich im gesamten Interstitium und füllten es flächendeckend aus. Beide Kollagenarten zeigten Verbindungsfasern zwischen Myozyten untereinander als auch zwischen Myozyten und Gefäßen. Sie lagen eng einzelnen Myozyten an, so dass jeder Myozyt eine membrannahe Markierung aufwies (Abb. 4A und 5A). Markierungen der T-Tubuli waren nur bei Kollagen-III-Färbungen im DCM-Gewebe nachweisbar (Abb. 5AB). Bei Beurteilung der Kollagenstrukturen mit höherer Vergrößerung wurden Unterschiede zwischen beiden Kollagenarten sichtbar. Die Kollagen I- und III-Markierungen zeigten Fasern unterschiedlichster Form. Wellige, straffe, feine, sowie dicke Kollagenstränge, die sich zu einem Maschengerüst formierten, konnten beobachtet werden. Dabei wies das Kollagen I-Gerüst größere Zwischenräume auf und hatte breitere, welligere Strukturen. Die Kollagen III-Markierung bildete ein viel feineres Netzwerk im Interstitium ab. Die Lokalisation der vermehrten Kollagenakkumulationen im DCM-Gewebe entsprach den Stellen, an denen gesteigerte narbige Umbauprozesse stattfanden. Ausgehend vom perivaskulären Raum, erstreckten sie sich entlang des Perimysiums, bis zum Endomysium, wo an Orten schwerster Fibrose einzelne Myozyten isoliert wurden (Abb. 4 B und 5. B) Die vaskuläre Markierung beider Kollagene im Kontroll- sowie im DCM-Gewebe, waren in der Adventitia, der Tunica media und der Intima zu finden.



**Abbildung 4:** Immunfluoreszenz für Kollagen I in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe. (Grün = Kollagen I; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe (A):** Kollagen I bildet einen feinen Saum um die Myozyten (Pfeile). Die Kollagenfasern liegen in welliger Form vor. Der extrazelluläre Raum ist nicht verbreitert und die Myozytenanordnung ist homogen.

**DCM-Gewebe (B):** Der extrazelluläre Raum liegt verbreitert vor und wird vollständig mit Kollagen I ausgefüllt. Die Myozytenanordnung ist inhomogen, dabei werden einzelne Myozyten vom Verbund getrennt.



**Abbildung 5:** Immunfluoreszenz für Kollagen III in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe. (Grün = Kollagen III; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe (A):** Ähnlich wie in Abb. 4 ist Kollagen III als feine Struktur sichtbar. Aufgrund von dünneren Fibrillen bildet es ein viel feineres Netzwerk und füllt daher den extrazellulären Raum flächendeckend aus. Es kommt zu pseudointrazellulären Markierungen in dem T-System der Myozyten (Pfeile).

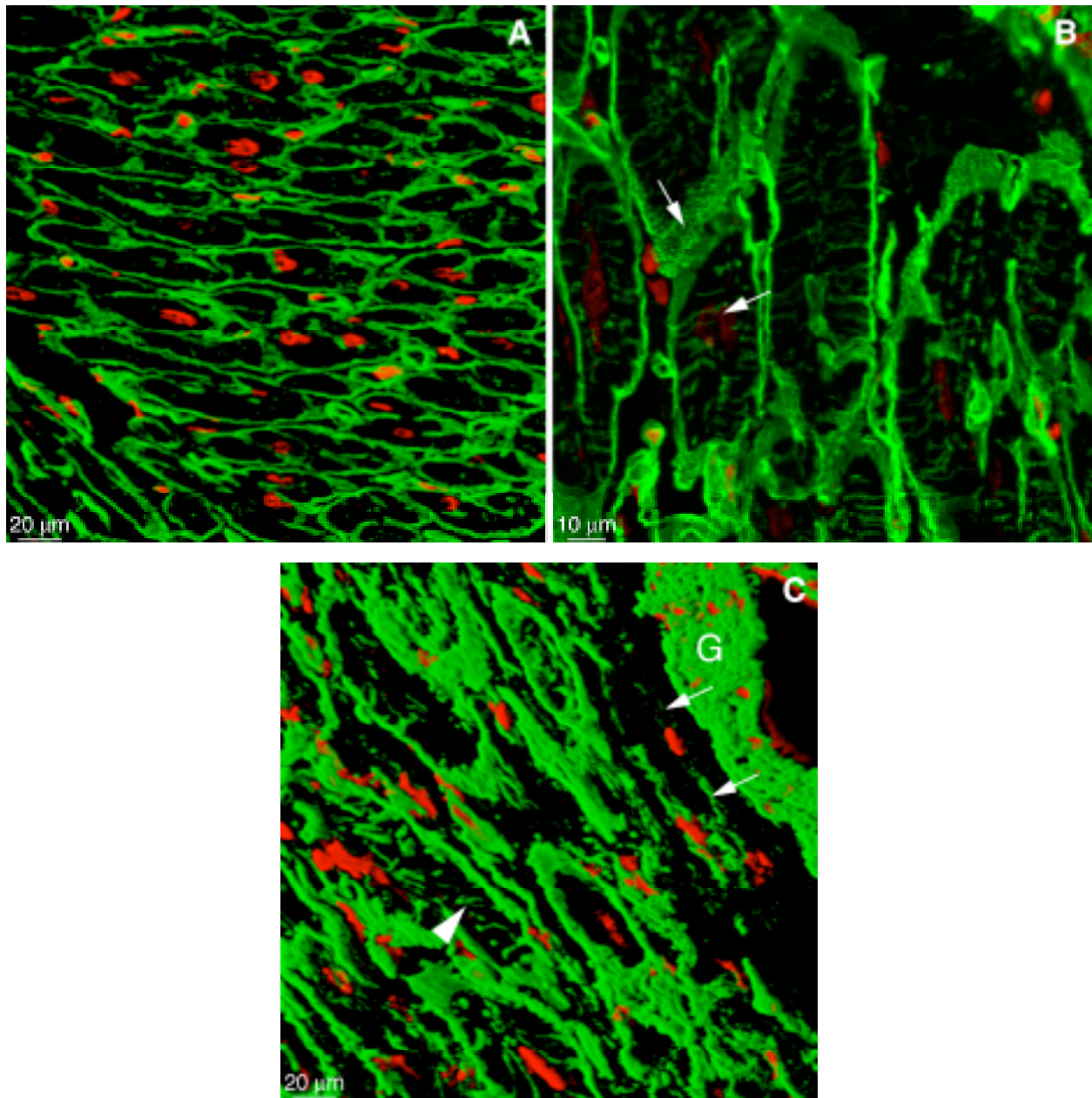
**DCM-Gewebe (B):** Gewebe mit schwerer Fibrose. Die Kollagen III-Markierung im Interstitium ist dramatisch erhöht. Die Myozyten sind im Vergleich zu A hypertrophiert, so dass das T-System jetzt deutlich sichtbarer wird (Pfeil).

### 3.2.2.3. Kollagen IV

Kollagen IV zeigte im Kontroll- und DCM-Gewebe eine Verteilung, wie sie bei der Laminin-Markierung beobachtet werden konnte. Kollagen IV, ebenfalls wie das Protein Laminin ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran, umhüllte jeden einzelnen Myozyten mit einem feinen durchgehend netzartigen Saum. Dieser wies intrazelluläre Ausläufer auf, bei denen es sich um Einstülpungen des Sarkolemm handelte, die als T-Tubuli identifiziert wurden (Abb. 6 A und B). Die Öffnungen des T-Systems konnten unter Verwendung der konfokalen Laser Mikroskopie und dickerer Schnitte als feine Punkte sichtbar gemacht werden (Abb. 6 B). Bei der Markierung der Gefäße war, wie bei der Lamininmarkierung, nur die Tunica media und Intima der Gefäßwand angefärbt. Im DCM-Gewebe zeigte die Kollagen IV-Markierung zum einen normale Strukturen wie im Kontrollgewebe, andererseits war die homogene Struktur der Basallamina in vielen Myozyten lückenhaft, unregelmäßig und verbreitert. Man konnte eine Verbreiterung des T-Systems beobachten. In Bereichen schwerer Fibrose konnten zusätzlich massive Kollagen IV-Strukturen im Interstitium dokumentiert werden, die sich nicht nur auf die Basalmembran beschränkten, sondern die mehr flächenhaften Charakter hatten, ähnlich wie bei den fibrillären Kollagenen.

### 3.2.2.4. Kollagen VI

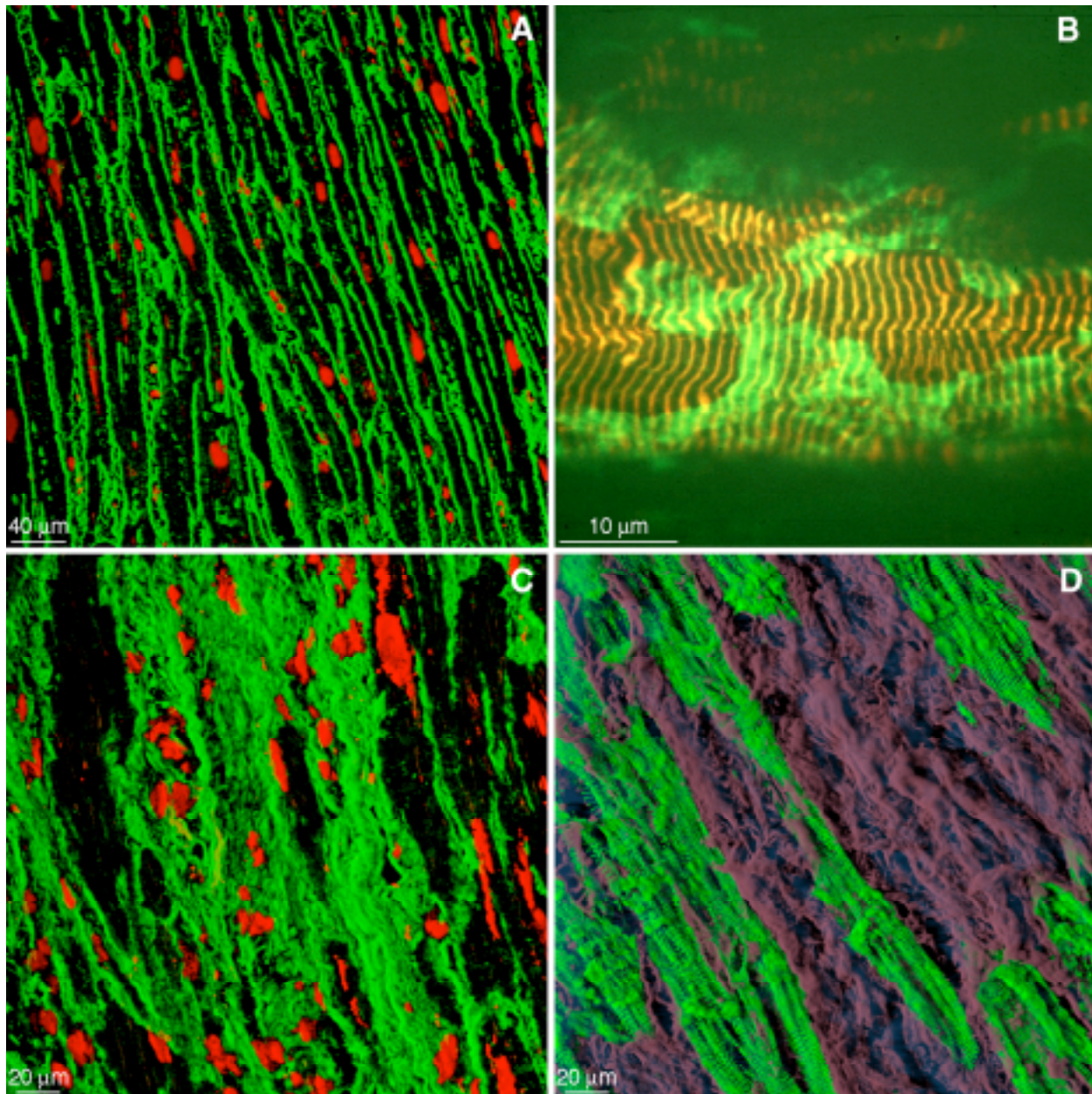
Eine Kollagen VI spezifische Fluoreszenz fand sich im Kontrollmyokard im Endomysium, Perimysium, in der Adventitia von Gefäßen und um die glatten Muskelzellen der Lamina media. Bei hoher Vergrößerung sah man, dass Kollagen VI den Myozyten umschließt und einen engen Saum bildet (Abb. 7A und B). Pseudointrazelluläre Markierungen der Kardiomyozyten, die Hinweise auf das T-System gaben, wie beim Kollagen IV wurden im Kontrollgewebe ebenfalls beobachtet (Abb. 7A). Die Ausläufer des T-Systems ließen sich bei vermehrter Proteinpräsenz im DCM-Gewebe schlechter darstellen. Die interstitielle Lokalisation und morphologische Struktur gingen parallel mit denen von Kollagen I und III einher, entweder in Form eines Netzwerkes mit feinen Strängen oder als dicke, wellige Faserbündel im perivaskulären Raum. Dabei verknüpfen die Kollagen VI-Fasern die Myozyten miteinander, bzw. die Muskelzellen mit Gefäßen. Im DCM-Gewebe konnte, wie bei den anderen Kollagentypen eine Vergrößerung des interstitiellen Raumes mit einer signifikanten Vermehrung der Kollagen VI-Fluoreszenz dokumentiert werden (Abb. 7C und D). Sie war besonders im Endomysium und Perimysium sowie im perivaskulären Raum arterieller und venöser Gefäße vermehrt.



**Abbildung 6:** Immunfluoreszenz für Kollagen IV in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe (Grün = Kollagen IV; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe** (A+B): Als Bestandteil der Basalmembran zeigt diese Markierung das individuelle Ausmaß der Myozyten. Die Myozyten liegen in unmittelbarer Nähe zueinander. Ansatzweise ist eine pseudointrazelluläre Markierung zu sehen, die das T-System darstellt. Bei höherer Vergrößerung (B) wird das T-System jetzt deutlich sichtbar. Schaut man auf die intakte Basalmembran, so erscheinen die Einstülpungen der T-Tubuli als kleine Punkte (Pfeile).

**DCM-Gewebe** (C): Perivaskuläre Kollagen-IV-Verteilung (G=Gefäß). Aufgrund der Myozytenhypertrophie und der vermehrten Distribution kommt es bereits bei niedrigerer Vergrößerung zu sichtbaren Markierungen des T-Systems (Pfeilspitze). Die Myozyten sind nicht mehr so eindeutig begrenzt wie in A. Die Basalmembran erscheint verbreitert und wird in degenerierten Myozyten so lückenhaft, dass das genaue Ausmaß der Myozyten nicht mehr eindeutig bestimmt werden kann (Pfeile).



**Abbildung 7:** Immunfluoreszenz für Kollagen VI in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe.

**Kontrollgewebe (A;** Grün = Kollagen VI; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Kollagen VI ist hier im Endomysium und Perimysium lokalisiert und bildet, ähnlich wie die anderen Kollagenarten einen dünnen Saum um die Myozyten. Es sind pseudointrazelluläre Markierungen des T-Systems zu finden.

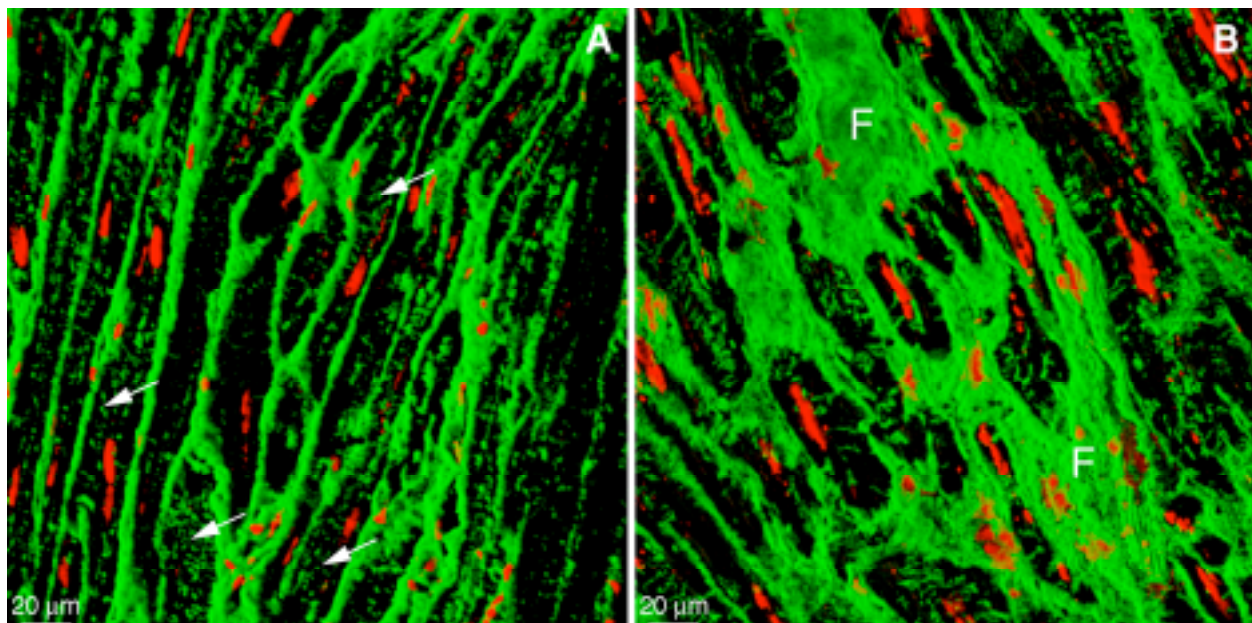
**Kontrollgewebe (B;** Grün = Kollagen VI; Rot =  $\alpha$ -Aktinin): Bei hoher Vergrößerung zeigt sich, wie eng Kollagen VI den Myozyten umschließt. Für den intakten Myozyten ist die regelmäßige Querstreifung mit  $\alpha$ -Aktinin charakteristisch.

**DCM-Gewebe (C;** Grün = Kollagen VI; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Gewebe mit schwerer interstitieller Fibrose. Kollagen VI füllt den extrazellulären Raum vollständig aus.

**DCM-Gewebe (D;** Violett = Kollagen VI; Grün =  $\alpha$ -Aktinin): Doppelfärbung mit Kollagen VI und  $\alpha$ -Aktinin. Massive Kollagen VI-Akkumulationen im extrazellulären Raum mit Zeichen der Myozytendegeneration in Form von Verlust der Querstreifung und Reduktion von  $\alpha$ -Aktinin. Kollagen VI läßt sich entweder als dicke, wellige oder als feine Fibrillen nachweisen.

### 3.2.2.5. Fibronektin

Die Fluoreszenz für Fibronektin zeigte im DCM- sowie im Kontrollgewebe eine homogene Struktur. Fibronektin verteilte sich flächenförmig als feine wellige Fasern im extrazellulären Raum. Diese feinen Strukturen bildeten ein dichtes Netzwerk. Man sah bei der Auswertung, dass die Fibronektinfasern Myozyten miteinander und Myozyten mit Gefäßstrukturen verknüpfen (Abb. 8A). In Gewebeproben mit größerer Schnittdicke war zu sehen, dass Fibronektinstrukturen in räumlicher Nähe zu der Zellmembran standen und den Myozyten vollständig ummantelten. Der einzelne Myozyt wurde an seiner Membran von einer dünnen Markierung begrenzt (Abb. 8A). Wie bei Laminin oder Kollagen IV, konnten pseudointrazelluläre Markierungen dem T-System zugeordnet werden (Abb. 8A). Alle Wandschichten der Blutgefäße wiesen eine positive Markierung auf. Im DCM-Gewebe fand sich besonders im perivaskulären Raum eine massive Anhäufung an Fibronektin (Abb. 8B). Die Zunahme der Fibronektinmarkierungen korrelierte mit der vermehrten Akkumulation der Kollagene, die im verbreiterten extrazellulären Raum lokalisiert waren und gemeinsam die Fibrose bildeten.



**Abbildung 8:** Immunfluoreszenz für Fibronektin im Kontroll- und DCM-Gewebe (Grün = Fibronektin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe (A):** Fibronektin füllt den extrazellulären Raum vollständig aus und stellt eine Verbindung zwischen den einzelnen Myozyten her. Die pseudointrazellulären Markierungen repräsentieren das T-System (Pfeile).

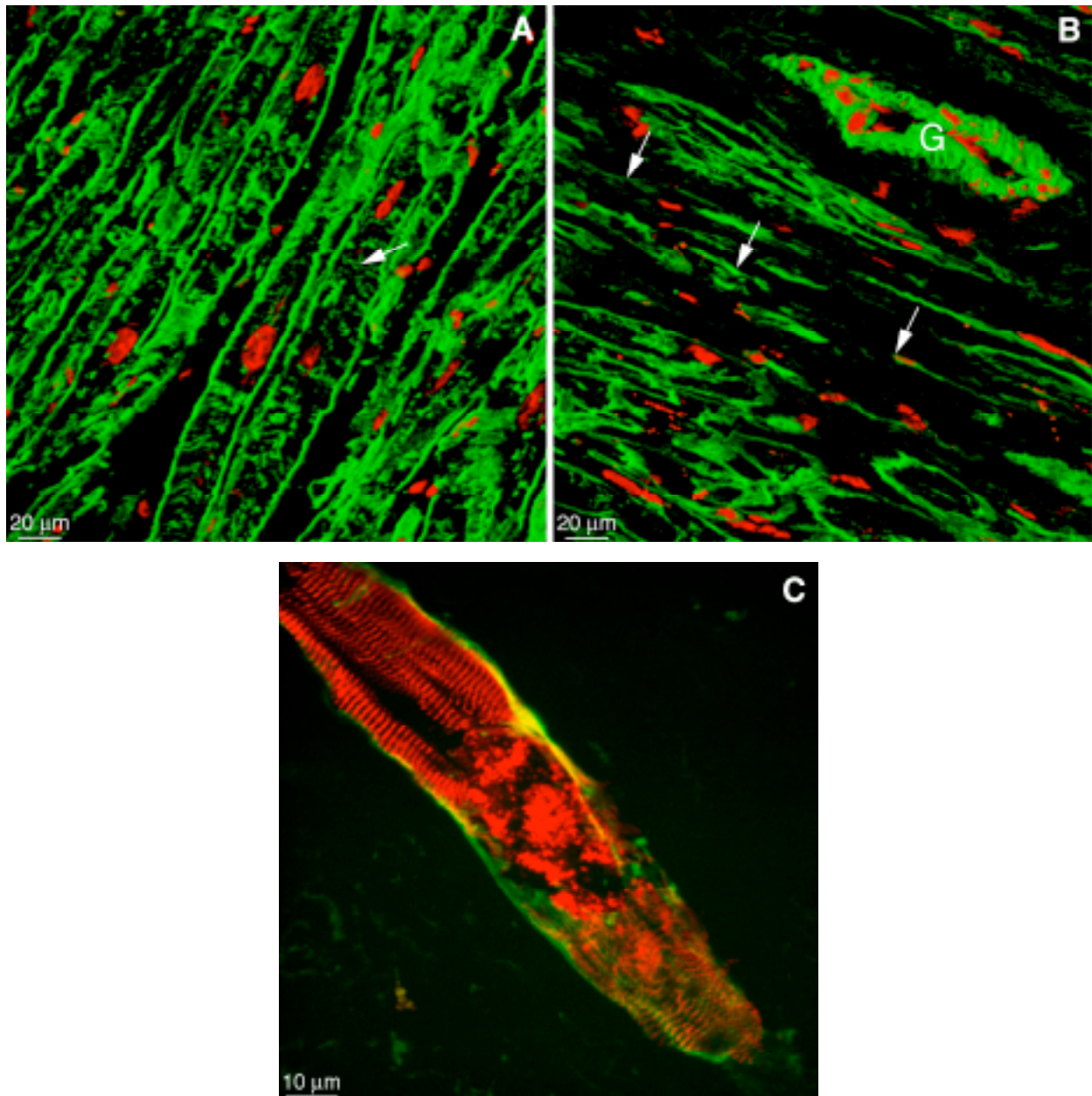
**DCM-Gewebe (B):** Fibrotisches Gewebeareal mit verbreitertem extrazellulären Raum, das mit einer erhöhten Fibronektinakkumulation (F) einhergeht.

### 3.2.2.6. Laminin

Das Protein Laminin ist in der Basallamina vieler Zellarten lokalisiert. Im Herzmuskel wird es von Myozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen, sowie in Perizyten exprimiert. Im Kontrollgewebe waren die Myozyten meist von einer durchgehend homogenen, positiven Markierung umschlossen (Abb. 9A). Mit einer Doppelfärbung gegen Laminin und  $\alpha$ -Aktinin konnte gezeigt werden, wie sich Laminin strumpfförmig um den Myozyten legt (Abb. 9C). Die T-Tubuli der jeweiligen Myozyten ließen sich je nach Schnittrichtung, entweder als punktförmige intrazelluläre Markierung, oder als längliche intrazelluläre Einstülpungen, ausgehend von der Basalmembran, darstellen (Abb. 9A). Bei den Analysen der DCM-Gewebe stellte sich die Lamininfluoreszenz als homogene bis vollständig fehlende Lamininstruktur dar (Abb. 9B). Diese Veränderungen zeigten sich vor allem in Bereichen, die massive Anteile an Bindegewebe enthielten, wie z.B. der perivaskuläre Raum (Abb. 9B). In diesen Arealen zeigte die sonst homogene Lamininmarkierung eine ungleichmäßige Struktur, bzw. sie bekam einen fragmentierten Charakter und es wurde eine signifikante Wandverdickung deutlich. Bei diesen Befunden waren die T-Tubuli nicht mehr so deutlich erkennbar, zeigten eine diffuse Markierung, oder die Basalmembranmarkierung fehlte gänzlich. Laminin wurde in den Gefäßen in der Tunica media und Intima gefunden. Dort war es Bestandteil der Basalmembran der glatten Muskel- und Endothelzellen.

### 3.2.2.7. Tenascin

Das Kontrollgewebe ließ im Vergleich mit dem pathologischen Gewebe nur vereinzelt Tenascinakkumulationen erkennen (Abb. 10A). Die spezifische Fluoreszenz fand sich in unmittelbarer Nähe zum Myozyten oder markierter Gefäße. Bei der Beurteilung des DCM-Gewebes konnten zwei wichtige Eigenschaften festgehalten werden: zum einen eine gehäufte Lokalisation an Gefäßen, zum anderen ein enger Kontakt mit Myozyten (Abb. 10B und C). Ansammlungen von Tenascin waren in allen Geweben fokal auftretend. Im perivaskulären Raum umfaßten positiv markierte Strukturen die Adventitia, Lamina media und weiter lumenwärts den Bereich der Endothelzellen. Es konnte keine Regelmäßigkeit festgestellt werden inwieweit arterielle oder venöse Gefäße, beziehungsweise Kapillaren vorrangig eine positive Markierung für Tenascin zeigten. Interessant war jedoch, dass einige Gefäße, die in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander standen, positiv markiert waren (Abb. 10B). Desweiteren zeigten einzelne Myozyten eine prominente, direkt zellangrenzende Tenascinmarkierung, die im Transversalschnitt oft den gesamten Myozyten umschloß (Abb. 10B und C). Dabei waren benachbarte Myozyten ebenfalls markiert. Bei Untersuchungen mit Doppelmarkierungen mit Fibronectin zeigte sich, dass beide Proteine in einer räumlichen Nähe zueinander anzuordnen sind (Abb. 10C). Bei dieser Färbung wies die Tenascinmarkierung faserartige fibronectinähnliche Strukturen auf.

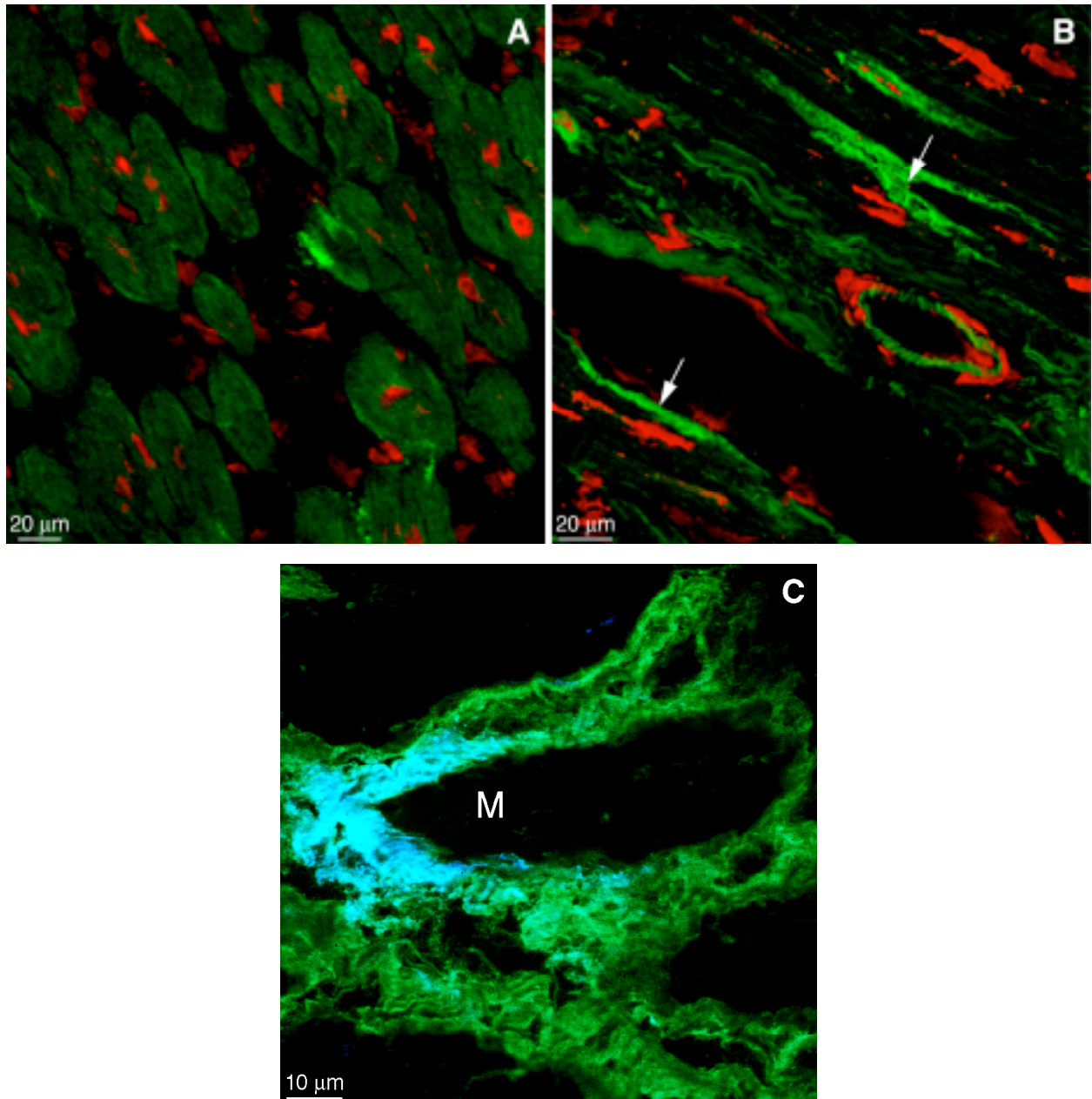


**Abbildung 9:** Immunfluoreszenz für Laminin in Kontrollgewebe und DCM-Gewebe.

**Kontrollgewebe (A;** Grün = Laminin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Laminin markiert nur die Basalmembran der einzelnen Myozyten. Das T-System (Pfeil) ist daher gut sichtbar zu erkennen.

**DCM-Gewebe (B;** Grün = Laminin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Lamininmarkierung im perivaskulären Raum bei schwerer Fibrose (G = Gefäß). Die einzelnen Myozyten sind nur unscharf begrenzt. Die Basalmembran ist fragmentiert (Pfeile) und die T-Tubuli sind nur noch vereinzelt sichtbar.

**DCM-Gewebe (C;** Grün = Laminin; Rot =  $\alpha$ -Aktinin): Doppelfärbung mit Laminin und  $\alpha$ -Aktinin. Einzelner degenerierter Myozyt bei höherer Auflösung. Die sonst homogene Querfärbung von  $\alpha$ -Aktinin liegt fragmentiert im intrazellulären Raum und charakterisiert die Myozytendegeneration. Die Markierung zeigt die ausschließliche Lokalisation von Laminin im Sarkolemm.



**Abbildung 10:** Immunfluoreszenz für Tenascin in Kontroll- und DCM-Gewebe.

**Kontrollgewebe (A;** Grün = Tenascin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Vereinzelt sind Tenascinmarkierungen im Gewebe zu finden.

**DCM-Gewebe (B;** Grün = Tenascin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Vermehrte Tenascinmarkierungen im perivaskulären Raum, in der Narbenbildung stattfindet. Es sind Abschnitte der Gefäßwand (Pfeile), sowie das angrenzende Interstitium an den Myozyten angefärbt.

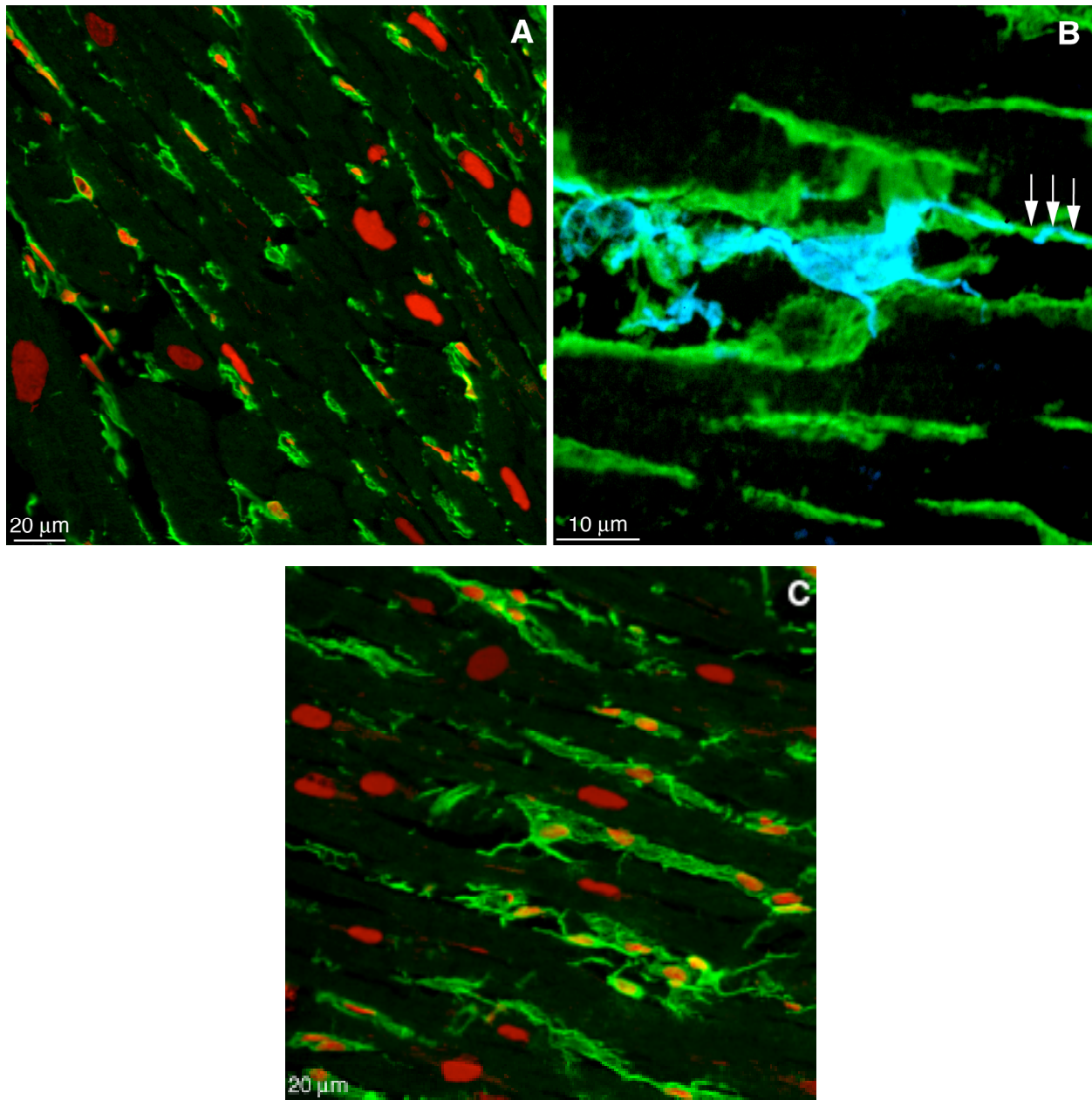
**DCM-Gewebe (C;** Grün = Fibronektin; Blau = Tenascin): Diese Doppelmarkierung zeigt die Interaktion von Fibronektin und Tenascin im frischen Narbengewebe. Dabei steht die Tenascinmarkierung in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran des Myozyten (M).

### 3.2.2.8. Vimentin

Vimentin ist ein zytoskelettäres Protein, das in Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert wird. Es ist daher ein Maß für den Zellgehalt, bzw. für den Gehalt an Fibroblasten im Bindegewebe. Für Vimentin positiv markierte Strukturen waren im gesamten extrazellulären Raum zu finden. Vergleichend mit dem DCM-Gewebe war die Zahl an positiv markierten Strukturen im Kontrollgewebe stark vermindert (Abb. 11A). Die Vimentinmarkierung zeigte, die für Fibroblasten typischen länglichen Ausläufer, die mit benachbarten Fibroblasten oder mit Myozyten in Kontakt treten. Mancherorts schienen die Fibroblasten die Myozyten mit ihren Ausläufern förmlich zu „umgarnen“. In Gebieten, in denen eine Verbreiterung des extrazellulären Raumes mit Zunahme fibrotischer Strukturen zu erkennen war, lag immer eine erhöhte Anzahl markierter Fibroblasten vor. In diesen Arealen sah man dann ein Geflecht vieler Fibroblastenausläufer (Abb. 11C). Eine Doppelmarkierung mit Kollagen VI zeigte die enge räumliche Anordnung beider Proteine im extrazellulären Raum. Dabei wickelten sich die Endigungen einzelner Fibroblasten zirkulär um Kollagen VI-Fibrillen (Abb. 11B). Bei den Gefäßen wiesen alle Wandschichten eine positive Markierung auf.

### 3.2.2.9. CD68

CD68 markiert Makrophagen und Zellen der myeloischen Reihe. Die Fluoreszenz dieser Markierung stellt somit den Gehalt an Makrophagen im Bindegewebe dar. Im Kontrollgewebe und im DCM-Gewebe waren die Makrophagen im Interstitium deutlich erkennbar. Im untersuchten Kontrollgewebe waren die Ansammlungen der Makrophagen im perivaskulären Raum und im Perimysium stark vermindert (Abb. 12A). Die Makrophagen traten im DCM-Gewebe fokal verstärkt auf, hingegen im Kontrollgewebe vereinzelt mit gleichmässiger Verteilung (Abb. 12A). Die Lokalisationen der markierten Zellen waren nicht notwendigerweise mit einer Verbreiterung des Interstitiums assoziiert. Die Markierung für CD68 zeigte eine granuläre Form und es wurden die Ausläufer bzw. Ausstülpungen der Zellen sichtbar (Abb. 12B). Desweiteren sah man im DCM-Gewebe, dass die Größe der markierten Zellen zunahm und einzelne Granula neben den CD68 markierten Zellen im extrazellulären Raum zu finden waren.

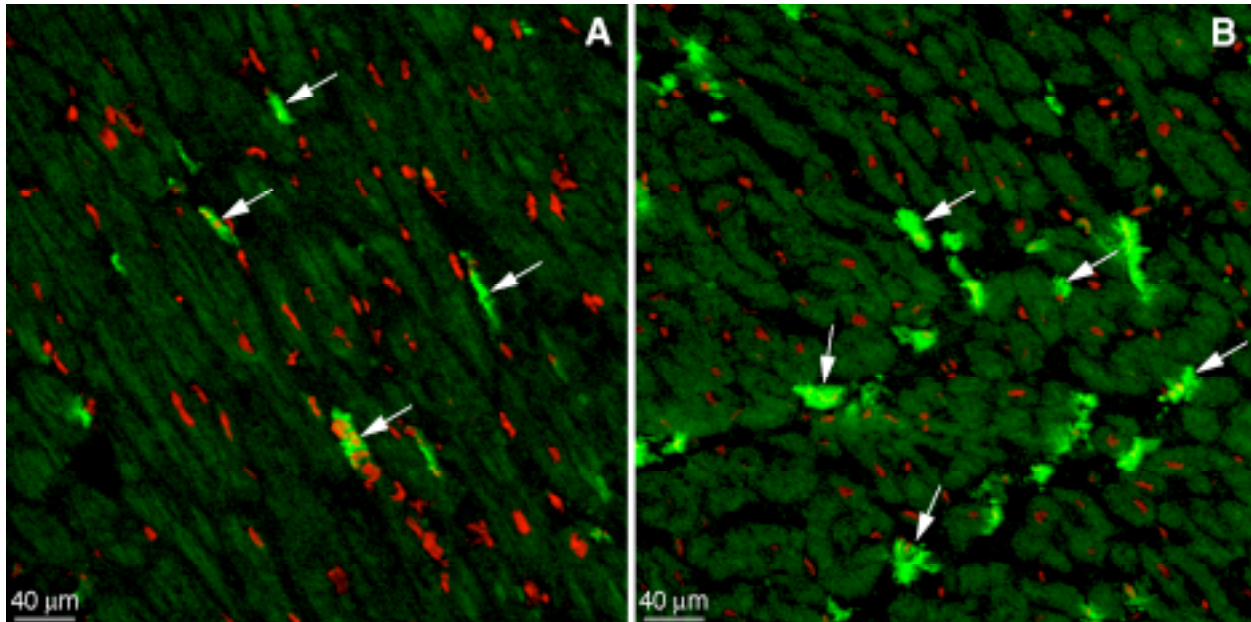


**Abbildung 11:** Immunfluoreszenz für Vimentin im Kontroll- und DCM-Gewebe.

**Kontrollgewebe (A;** Grün = Vimentin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): Typische Vimentinfärbung im Kontrollgewebe. Sie steht für das Maß bzw. Gehalt an Fibroblasten im Interstitium.

**Kontrollgewebe (B;** Grün = Kollagen VI; Blau = Vimentin): Doppelmarkierung mit Kollagen VI und Vimentin bei höherer Vergrößerung, die die räumlich Nähe der Fibroblasten zu den Kollagenfasern zeigt. Die Endigungen des Fibroblasten umwickeln zirkulär die einzelnen Kollagenfasern (Pfeile).

**DCM-Gewebe (C;** Grün = Tenascin; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin): In Arealen mit Fibrose kommt es zur gesteigerten Anordnung von Fibroblasten im Interstitium.



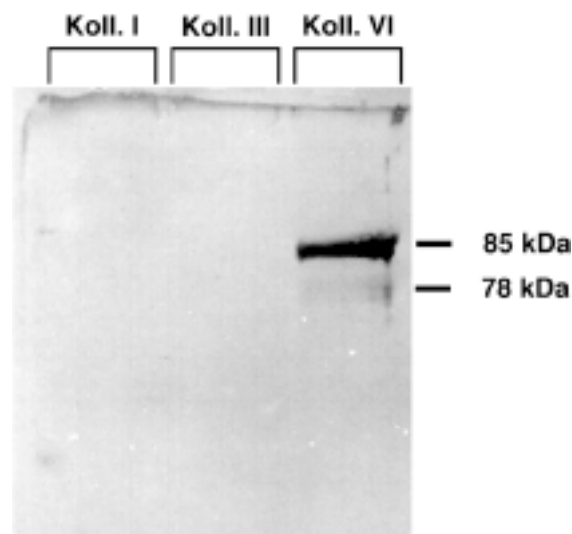
**Abbildung 12:** Immunfluoreszenz für CD68 in Kontroll- und DCM-Gewebe (Grün = CD68; Rot = Kernfärbung/Lipofuscin).

**Kontrollgewebe (A):** CD68 ist vereinzelt im Perimysium des Myokards zu finden und repräsentiert die Lokalisation der Makrophagen (Pfeile).

**DCM-Gewebe (B):** Ansammlung von CD68 positiv markierten Makrophagen, die aufgrund von lokalen Entzündungsreaktionen fokale gehäuft im DCM-Gewebe zu finden sind (Pfeile).

### 3.3. Westernblot:

Das Ergebnis des Westernblots zur Überprüfung der Spezifität des Kollagen VI-Antikörpers zeigte eine deutliche Markierung in der Kollagen VI-Bande, bei 85 kDa und eine schwächere bei 78 kDa. Markierungen in der Spur von Kollagen I und III fehlten völlig, daher wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Diese Resultate dokumentieren die Spezifität dieses Antikörper für Kollagen VI.



**Abbildung 13:** Westernblot mit Kollagen I-, III- und VI-Antikörper.

Die spezifischen Banden für Kollagen VI sind nur in der Kollagen VI-Spur sichtbar. Somit kann eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit den anderen Kollagentypen ausgeschlossen werden.

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse:

Die Veränderungen der extrazellulären Matrix im Myokardgewebe bei terminaler Herzinsuffizienz im Vergleich zum Kontrollgewebe lassen sich kurz folgendermaßen beschreiben:

Aufgrund degenerativer intrazellulärer Prozesse ( $\alpha$ -Aktinin-Färbung) gehen signifikante extrazelluläre Veränderungen einher, die sich in Form einer Verbreiterung des extrazellulären Raumes und stark narbigen Umbauprozessen darstellten. Wie aus den Sirius-Rot- und den Kollagenfärbungen ersichtlich wird, ist das Interstitium mit deutlichen Kollagenakkumulationen angereichert, die vom perivaskulären Raum ausgehend einzelne Myozyten vom Zellverbund trennen und diese dabei oftmals völlig isolieren. Man findet eine massive Vermehrung aller untersuchten Strukturproteine (Kollagen I, III, VI) und Fibronektin, sowie von Chondroitinsulfat und Tenascin. Die zellulären Bestandteile des Interstitiums, wie Makrophagen (CD68) und Fibroblasten (Vimentin) waren ebenfalls vermehrt exprimiert. Die Proteine der Basalmembran (Laminin und Kollagen IV) zeigten neben stärksten degenerativen Veränderungen eine vermehrte Distribution in Arealen schwerer Fibrose. Die gefundenen Veränderungen stellen keinen einheitlichen Grad im Gewebe dar, sondern waren als Übergänge fließend in allen Bereichen der DCM-Proben zu finden. Die Zusammenhänge, die zu diesen schweren Veränderungen führen, sowie mögliche Therapieansätze sollen nun im folgenden Kapitel erörtert werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einleitung

In dieser Arbeit wurde das strukturelle Korrelat der Herzinsuffizienz, mit besonderer Berücksichtigung der extrazellulären Matrix, am Beispiel des Krankheitsbildes der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Bei allen Patienten ließen sich im Rahmen der klinischen Diagnostik eine Dilatation der Ventrikel und erhöhte enddiastolische Volumina mit Verminderung der Auswurffraktion (EF  $\leq$  25%) nachweisen. Die Patienten boten das klinische Bild der terminalen Linksherzinsuffizienz (NYHA Klassifikation: IV). Als ultima ratio der Therapie blieb schließlich nur noch die Transplantation.

Alle untersuchten Gewebeproben wurden während der Transplantation, somit im finalen Stadium der Herzinsuffizienz entnommen, und nicht im Verlauf der Erkrankung. Deswegen ist das vorrangige Ziel dieser Untersuchung nicht, mögliche ätiologische Ursachen der dilatativen Kardiomyopathie zu klären oder deren Verlaufsbeobachtung darzustellen, es soll das Syndrom "endstage heart failure" morphologisch beschrieben, bzw. Veränderungen identifiziert werden, die zum Verlust der kardialen Funktion beitragen. In dieser Studie werden extrazelluläre Proteine in ihrer Distribution und strukturellen Zuordnung lichtmikroskopisch qualitativ beschrieben. Eine Quantifizierung des Fibrosegehaltes wurde nicht durchgeführt, da uns Daten bereits aus der Dissertation von Wolfgang Diener vorlagen und wir uns darauf beziehen<sup>23</sup>. Er hatte quantitativ beschrieben, daß es im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie zu einer signifikanten Zunahme der Fibrose kommt und das konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

Antworten auf folgende Fragen waren von Interesse:

Welche extrazellulären Proteine sind an der Fibrosebildung im Myokard bei terminaler Herzinsuffizienz beteiligt?

Wie ist die Verteilung der einzelnen Proteine bei der terminalen Herzinsuffizienz?

Lassen sich aufgrund veränderter Proteindistributionen Rückschlüsse auf die Pathomechanismen der Herzinsuffizienz ziehen?

Welche Rolle spielt die extrazelluläre Matrix in Bezug auf die Progression dieser Erkrankung?

## 4.2. Extrazelluläre Matrix

Der Volumenanteil der Myozyten im normalen Myokard variiert zwischen 65 - 75%<sup>24-26</sup>. Der Rest wird als extrazellulärer Raum oder Interstitium zusammengefaßt. In ihm liegt die Matrix, die alle Strukturkomponenten beinhaltet, die zwischen den Myozyten lokalisiert sind. Die Matrix beinhaltet spezifische Proteine und nicht-myozytäre Zellen, einschließlich Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen. In diesen Zellen werden extrazelluläre Proteine synthetisiert, die einen wichtigen Beitrag zur kardialen Funktion und Dysfunktion leisten. Das Ausmaß der Proteinsynthese der extrazellulären Matrix ist als Reaktion auf die kardiale Beanspruchung bzw. Bedarf zu sehen. Bei der hypertensiven oder der ischämischen Herzerkrankung kommt es zur Ausschüttung vieler bioaktiver Substanzen, wie z.B. Angiotensin II und Renin, die neben ihren hämodynamischen, besonders regulative Wirkungen auf die Produktion an extrazellulären Matrixproteinen haben. Andererseits sind bereits grundlegende physiologische Prozesse kausal für eine gesteigerte Proteindistribution verantwortlich.

Im Rahmen der neonatalen Herzentwicklung sind bei dem Gewebsumbau die extrazellulären Proteine maßgeblich beteiligt. Die Entwicklung der Herzhöhlen von einer einzelnen Kammer zu einer 4-Kammer-Einheit mit separatem, unidirektional fließendem Blutfluß ist ein hochkomplizierter Vorgang. Die Drehung des Herzens, Ausbildung der Septen und der Klappen mit dem zugehörigen Gewebeumbau findet zu einer Zeit statt, in der das Herz bereits die Pumpfunktion ausübt. Mit dem Größerwerden des Organismus kommt den extrazellulären Proteinen eine wachsende Funktion zu. Sie sind verantwortlich für Stabilität und Differenzierung des Organs. Die interstitiellen Zellen synthetisieren ihre Matrixproteine gemäß ihrem Reifestadium und der Funktion und sind damit in der Lage, im Herzen fundamentale zelluläre Eigenschaften zu modulieren, wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen<sup>27</sup>.

Damit es nicht zur Minder- bzw. Überproduktion an Proteinen kommt, was mit einer verschlechterten kardialen Leistung einhergehen würde, ist ein sehr ausgewogenes Verhältnis an regulativen Mechanismen nötig. Postpartum ist die Entwicklung der extrazellulären Matrix im Herzen nicht abgeschlossen. Im Gegenteil, sie ist einem progressiven Ablauf unterworfen, der sich den Veränderungen des wachsenden Organismus anpaßt<sup>28,29</sup>. Mit dem physiologisch ansteigenden intraventrikulären Druck vollziehen sich neben der Organisation von Zellorganellen in den Myozyten, Abbauprozesse von Myozyten infolge apoptotischer Abläufe und extrazellulärer Veränderungen<sup>30</sup>.

In der frühen postpartalen Entwicklungsphase korreliert die veränderte Distribution an extrazellulären Matrixproteinen, vor allem das Kollagen, mit dem steigenden Blutdruck im Organismus <sup>31</sup>. Die Verankerung der Myozyten und der Gefäße im Myokard in Koordination mit der physiologischen Myozytenhypertrophie ist ebenfalls ein postpartum ablaufender Prozeß <sup>29</sup>. Diese Vorgänge haben zur Folge, dass das Herzgewebe rigider wird und sich Dehnungsprozessen adäquat widersetzt, wobei eine übermäßige Dilatation der Ventrikel verhindert wird.

Grundsätzlich teilt sich die extrazelluläre Matrix in zwei Hauptproteinklassen auf: die Glykosaminoglykane (Polysaccharide), die an Core-Proteine gekoppelt in Form von Proteoglykanen vorliegen und die Faserproteine, die sich weiter in Strukturproteine (z.B. Kollagene) und Adhäsionsproteine (wie Laminin oder Fibronektin) differenzieren lassen.

#### **4.2.1. Glykosaminoglykane**

##### **4.2.1.1. Chondroitinsulfat**

Glykosaminoglykane (Mucopolysaccharide) sind repetitive Disaccharideinheiten, die in 4 Gruppen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgt nach den vorhandenen Zuckerresten, Art ihrer Verbindung und Zahl und Position der Sulfatgruppen. Chondroitinsulfate, z.B. repräsentieren als Mitglieder dieser Familie einen wichtigen Bestandteil in der extrazellulären Matrix im Myokard. Sie erfüllen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellfunktionen im extrazellulären Raum. Kovalent gebunden an ein Kernprotein bilden die Chondroitinsulfatproteine oder andere Glycosaminoglykane, wie z.B. Heparan- und Keratansulfat, die charakteristische Tausendfüßlerstruktur der Proteoglykane. Das Molekulargewicht eines Kernproteins einschließlich der angefügten Glykosaminoglykan-Einheiten kann bis zu 100 kDa betragen. Der Aufbau ist in Bezug auf Proteingehalt und Anzahl der gebundenen Glycosaminoglykane ausgesprochen heterogen und abhängig von der Herkunftszelle. Über nicht kovalente Bindungen sind die Proteoglykane in der Lage große Aggregate zu bilden, mit der Tendenz langgestreckte zufallsgeknäulte Konformationen einzunehmen. Damit beanspruchen sie ein für ihre Masse verhältnismäßig großes Volumen, welches der Größe einer Bakterienzelle entsprechen kann <sup>32</sup>.

Im Myokard variiert die Lokalisation der Proteoglykane von der Basalmembran bis zum ubiquitären Vorkommen im extrazellulären Raum. Ihre Molekülstrukturen zeigen Homologien zur Untereinheit des MCSF <sup>33,34</sup>. Die Proteoglykanaggregate haben hydrophile Eigenschaften und besitzen eine starke anionische Ladung, die

u.a. die Permeabilität von Zellmembranen reguliert. Durch das Fehlen der Proteoglykane kommt es zu dramatischen Folgen für die Zellen bzw. für das Organ: so z.B. in Basalmembranen der Nierenglomerulie, wo es u.a. kausal für das Auftreten der Proteinurie angesehen wird <sup>35</sup>.

In den hier vorliegenden Ergebnissen fanden wir die Chondroitinmarkierungen in naher Lokalisation zur Basalmembran der Myozyten. Dort übernimmt Chondroitin u.a. die Aufgabe eines Molekülsiebes und kann somit den transmembranen Transport von Molekülen entsprechend ihrer Größe und Ladung steuern. Die Proteoglykanmoleküle steuern auch die Regulation von Integrin-mediiertes Zelladhäsion und Zellmotilität und die Modulation der Integrinaffinität und intrazellulären Signalvorgängen <sup>33,36</sup>.

Kommt es zu Veränderungen der Proteoglykanexpression in der Basalmembran der Myozyten, so hat dies schwere Auswirkungen auf die Signaltransduktion und Anionen-/Kationenaustausch der Zelle. Aufgrund der hohen Dichte an negativen Ladungseinheiten ziehen die Proteoglykane wie z.B. Chondroitinsulfat osmotisch wirksame Ladungseinheiten wie Natriummoleküle an und somit auch freies Wasser (H<sub>2</sub>O). Dadurch entsteht ein Turgor, der auftretenden Druckkräften Widerstand entgegensetzt und damit eine Pufferfunktion ausübt. Das verleiht dem Gewebe Flexibilität und folglich Stabilität, die das Myokard bei der Kontraktion und Relaxation benötigt. Jedoch ist dies als additiver Effekt zu der Funktion des Bindegewebes zu sehen, welches primär für die Stabilität des Myokard verantwortlich ist.

Die Induktion der Proteoglykansynthese in Fibroblasten kann u.a. über Stimulation mit TGF- $\beta_1$  erfolgen, das vermehrt im Myokard bei dilatativer Kardiomyopathie vorzufinden ist <sup>37</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Chondroitinmarkierung sich über alle Wandschichten der Gefäße erstreckt. Erwartungsgemäß werden damit die Zellmembranen der Endothel- und der glatten Muskelzellen erfaßt, die Fibroblasten der Adventitia und das frei vorkommende Chondroitinsulfat. Die Erhöhung der Proteoglykansynthese in der Gefäßwand ist im Rahmen von Wundheilungsvorgängen im Koronarsystem zu finden. Es kommt zur Aktivierung neointimaler und adventitialer Zellen (Myofibroblasten) und damit zu einer Steigerung der Proteoglykansynthese <sup>38</sup>.

Im DCM-Gewebe kam es zur gesteigerten Chondroitinsulfatmarkierung (Abb. 3 B). Es wäre zu diskutieren, ob dieser Effekt der Pufferfunktion kompensatorisch genutzt wird, um der zunehmenden Rigidität im Myokard im Krankheitsverlauf entgegenzuwirken. Die vermehrte Fluoreszenz von Chondroitinsulfat resultierte einerseits aus der Verbreiterung des extrazellulären Raumes, andererseits aus

einer intensiveren Markierung. Im Kontrollgewebe sahen wir die Chondroitinsulfatmarkierung als feine netzartige Anordnung (Abb. 3 A).

Die Proteoglykane können Kollagenstrukturen einwickeln und bilden so ein komplexes Ordnungsmuster mit regelmäßigen Abständen. Die Tatsache, dass im DCM-Gewebe die Chondroitinsulfatmarkierung mehr granulären Charakter hatte, ist mit einer erhöhten Akkumulation im extrazellulären Raum durch die gesteigerte Proteinsynthese zu erklären. Die vermehrte Expression im DCM-Gewebe begründet sich durch lokale Wundheilungsprozesse im Rahmen der Pathogenese, wie man es bei Reparaturprozessen mit Narbenbildung anderer Genese gesehen hat <sup>38,39</sup>.

Chondroitinsulfat kann durch die hydrophilen Ladungseigenschaften die Akkumulation und Diffusion von löslichen Nährstoffen, Metaboliten, Hormonen, Signalmolekülen, wie z.B. Wachstumsfaktoren (FGF-2, TGF- $\beta_1$ ) unterstützen <sup>40</sup>. Desweiteren verfügen die Glykosaminoglykane über Bindungsstellen für Kollagen I, III, IV und VI und vermögen zusätzlich lösliche Substanzen, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren zu binden <sup>41-43</sup>. Sie sind an der Verfügbarkeit dieser Transmitterproteine beteiligt und stellen dem Gewebe, insbesondere den ansässigen Zellen ein Reservoir zur Verfügung, auf das sofort zurückgegriffen werden kann, ohne erst mit der Produktion dieser Mediatoren zu beginnen.

## 4.2.2. Faserproteine

### 4.2.2.1. Strukturproteine - Kollagene

Das Wort "collagène" ist ein, im Zuge des französischen Neologismus (19. Jahrhundert) entstandenes, ehemals griechisches Wort, welches einen Leim produzierenden Bestandteil im Bindegewebe beschreibt <sup>44</sup>. Kollagene machen ungefähr 25% der Gesamtproteinmasse in Säugetieren aus. Sie sind die Strukturproteine der extrazellulären Matrix, deren Grundmolekülstruktur aus 3 spiralförmig angeordneten Polypeptidketten besteht, die sich zu einer Helixstruktur gruppieren. Dabei konnten bis zu 25 verschiedene Gruppierungsformen der Helix für einen einzigen Kollagentyp nachgewiesen werden <sup>44,45</sup>.

Die Nomenklatur basiert auf folgenden Regeln: die individuellen Peptidketten werden  $\alpha$ -Ketten genannt und mit arabischen Nummern bezeichnet, deren Kollagentyp sie repräsentieren mit römischen Zahlen. Die Numerierung der Kollagentypen und Ketten ist willkürlich erfolgt und spiegelt die historische Aufeinanderfolge ihrer biochemischen Charakterisierung wider. Die Kollagene enthalten verstärkt die Aminosäuren Prolin, Hydroxyprolin und Glycin. Bis heute

können bis zu 18 verschiedene Typenformen von Kollagenen unterschieden werden, von denen alle, bis auf Kollagen I Disulfidbrücken zwischen Cysteinen ausbilden<sup>44,46</sup>.

Man unterteilt die Kollagene aufgrund ihrer Struktur und molekularen Anordnung in 2 Hauptgruppen: in die fibrillären und nicht-fibrillären Kollagene<sup>44,45</sup>. Zu der fibrillären Gruppe gehören Kollagen I, II, III, V und XI, deren einzelne Moleküle in ihrer Formation durch ein longitudinales Überlappungsmuster eine Art Staffelung bilden<sup>45</sup>. Damit entsteht eine fibrilläre Form, die durch kovalente Bindungen (interwie intramolekular) stabilisiert wird, wodurch diese Gruppe sich gut Zug-, und Scherkräften widersetzen kann. Außer Typ XI werden die anderen Kollagene im Herzmuskelgewebe exprimiert; Typ II hingegen nur vorübergehend während der Embryonalentwicklung des Herzens.

Aufgrund der Aggregatvielfalt der Kollagenmoleküle wird die Gruppe der nicht-fibrillären Kollagene weiter in Untergruppen unterteilt. Sie setzen sich zusammen aus: FACITs, flächenförmigen und perlschnurförmigen Kollagenen. Zu den FACITs gehören Kollagen IX, XII und XIV, deren Hauptunterscheidungsmerkmale die Interrupts in ihren Helixsequenzen sind. Kollagen IX wird als einziges vorübergehend während der Herzentwicklung exprimiert. Dabei orientiert es sich bei der Anordnung an der Oberfläche von Kollagen II-Fibrillen<sup>44</sup>. Kollagen IV, das in dieser Arbeit untersucht wurde, wird ebenso wie Typ VIII, in die Gruppe der flächenförmigen Kollagene eingeordnet. Letzteres ist ein wichtiger Bestandteil der Descemet'schen Membran und wird wie Kollagen II und IX zeitweise während der kardialen Entwicklungsphase exprimiert. Kollagen IV ist in der Basalmembran fast aller Gewebearten lokalisiert, somit auch im Myokard und bildet dort ein Netzwerk mit anderen Bestandteilen, wie Laminin und Proteoglykanen<sup>33</sup>.

Als letztes soll auf die Gruppe der perlschnurförmigen Kollagene kurz eingegangen werden, zu der Kollagen VI bisher als einziges Mitglied gezählt wird. Es besitzt Bindungstellen zu verschiedenen interstitiellen Proteinen und dient somit als Verbindung zwischen (extra)-zellulären Komponenten. Hauptbildungsort der Kollagene im Myokard sind die Fibroblasten, neben Endothel- und glatten Muskelzellen. Da die Kollagenmoleküle im Verhältnis zu der produzierenden Zelle einen größeren Durchmesser besitzen, werden statt Kollagenvorstufen, die Prokollagene gebildet. Diese Prokollagene bauen sich dann selbst, oder im Rahmen einer Kaskade, bei der bis zu 13 verschiedene Enzyme beteiligt sind, in ihre endgültige Kollagenform um. Obgleich nur ein kleiner Gehalt an Prokollagenen nötig ist, um das bereits bestehende Kollagengerüst zu unterhalten, werden übermäßige Kollagenakkumulationen im Gewebe vermieden, indem bis zu 60% des neusynthetisierten Kollagens entweder sofort intra-, oder extrazellulär mittels

Kollagenasen, den MMPs, abgebaut werden <sup>46</sup>. Als regulative Mechanismen für die Kollagenproduktion in Fibroblasten können Hormone (L-Thyroxin, Angiotensin II), Zytokine (TNF- $\alpha$ , Interleukine), Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta_1$ ), Adhäsionsmoleküle, Neurotransmitter und sogar mechanische Einflüsse dienen <sup>47-49</sup>.

Die drei Gewebekomponenten des Myokard beinhalten das Epimysium, Perimysium und Endomysium. Darin sind spezifische Proteine des Bindegewebes, vor allem Kollagene, Elastin und Proteoglykane angeordnet. Die Matrixstrukturen mit ihren zugehörigen Kollagentypen dieser 3 Unterteilungen variieren im normalen Myokard je nach Entwicklungsstadium. Dabei ist die endgültige Rolle der Kollagene während der Herzentwicklung, insbesondere in humanem Gewebe, noch immer nicht vollständig geklärt.

Man vermutet einen wichtigen Einfluß während der Entwicklung funktioneller Eigenschaften und der Morphogenese, z. B. bei der Zelldifferenzierung, Organisation, und Migration extrazellulärer Komponenten. Indes kann sich die vollständige Ausbildung der Kollagenstrukturen im Epi-, Peri-, Endomysium postpartum bis Wochen hinziehen <sup>50</sup>.

Viele der publizierten Daten beziehen sich auf Untersuchungen, die an Modellen von Ratten-, Mäuse- und Hühnerembryonen gewonnen wurden. Erst seit kürzerer Zeit kann man auf Studien mit molekularbiologischen Methoden zurückgreifen, die nun intensiv an menschlichem Myokardgewebe angewendet werden.

Kollagene bilden ein dreidimensionales Netzwerk im Interstitium des Myokards, das eine Vielzahl an Aufgaben erfüllen muß. Die Distribution der Kollagenfasern erfolgt daher in den unterschiedlichsten Konfigurationen.

Im Perimysium liegen die Kollagenbündel transversal, parallel und schräg zur Myozytenlängsachse der jeweiligen Myozytengruppen. Damit wird der physikalische Stress, dem die Gruppen ausgesetzt sind, limitiert und nötige Kräfte während der Diastole werden generiert. Der Durchmesser der endomysialen Kollagenfasern variiert zwischen 0.1 bis einigen Millimetern.

Die Kollagenfasern im Endomysium umgeben jeden individuellen Myozyten, verbinden sie untereinander, oder verankern Kapillaren mit Myozyten. Rezeptoren für die Insertion der Fasern an der Oberfläche des Myozyten befinden sich im Bereich des Z-Streifens <sup>50,51</sup>. Die intermyozytären Fasern sind transversal lateral zur Längsachse am Myozyten befestigt, die zwischen Myozyten und Kapillaren ziehen von transversal tangential zur Längsachse der Myozyten. Während der Diastole verhindern die intermyozytären Fasern durch Spannung ein Auseinandergleiten der Myozyten. In der Systole findet, in Gegenwart des erhöhten

ventrikulären Wanddruckes, ein Anspannen der transversal tangentialen Faserbündel statt, das die Kapillaren offenhält, um einen ausreichenden Blutfluß zu sichern<sup>29,50,52,53</sup>. Die Kontraktion der Muskelzellen wird als einheitliche Kraft auf das Gewebe übertragen. Es wird sichergestellt, dass die freiwerdenden Kräfteveränderungen während der Systole und Diastole effizient verwertet werden. Kollagene sind durch ihre Verankerung im Bereich des Z-Streifens mitverantwortlich für die Anordnung der Sarkomere während den Herzaktionen und verhindern ein Überdehnen der Muskelfibrillen<sup>53</sup>. Zusätzlich dienen die Kollagenfibrillen den interstitiellen Zellen als Leitstruktur für ihre Migration im extrazellulären Raum.

#### 4.2.2.1.1. Kollagen I und III

Kollagen I und Kollagen III gehören zur Gruppe der fibrillären Kollagene, die ubiquitär im extrazellulären Raum im Myokardgewebe vorkommen. Kollagen I ist ein Heterotrimer, das aus zwei  $\alpha_1$ -Ketten und einer  $\alpha_2$ -Kette besteht, hingegen Kollagen III, als Homotrimer aus drei identischen  $\alpha_1$ -Ketten. Die Länge der Moleküle beider Proteine beträgt ca. 300 nm Länge. Die longitudinale Anordnung der Moleküle erfolgt zunächst als Kopf-zu-Schwanz-Verbindung, die mit Hilfe weiterer parallel versetzter Moleküle eine Überlappungsformation bildet. Diese Art der Staffelung ist der Grundstock für den Aufbau der Kollagenfibrillen, die bis zu 100  $\mu\text{m}$  lang werden können. Zwischen den Molekülen stabilisieren Disulfidbrücken oder Lysinreste die Kollagenfibrille. Letztere Art der Stabilisierung gibt Kollagen I die ungeheure Zugfestigkeit, die von einigen Autoren mit der von Stahl verglichen wird.

Die Verankerung der Fibrillen an Zellen erfolgt über Integrine<sup>54</sup>. Hauptbildungsort beider Kollagenarten ist, neben glatten Muskelzellen und Endothelzellen, der Fibroblast<sup>55-58</sup>. Vergleicht man beide Kollagene miteinander, so erscheinen die Kollagen I-Fibrillen dicker im Durchmesser. Kollagen III tritt gehäuft in Kolokalisation mit Typ I auf und ist flexibler<sup>51,52</sup>. Kollagen I kommt in vielen Geweben wie Knochen, Sehnen, Haut und Herzgewebe vor, Kollagen III hingegen nur in Haut- und Herzgewebe. Auch wenn die Lokalisation begrenzt erscheint, so nehmen die Kollagene einen wichtigen Stellenwert in der Stabilität von Organen ein. Ein biochemischer Defekt der Kollagen III-Synthese, wie er z.B. beim Ehlers-Danlos-Syndrom vorkommt, kann lebensbedrohliche Folgen haben<sup>59</sup>.

Das Verhältnis beider Kollagene zueinander entwickelt sich während der Herzentwicklung prä- wie postpartal. 1974 identifizierten Johnson et al. mit Hilfe biochemischer Methoden und der Elektronenmikroskopie Kollagen I in Hühnereiherzen nach 30 - 45 Stunden Inkubation<sup>60</sup>. Dieser Zeitpunkt

korrespondiert mit dem Stadium der Herzhöhlenformation, Muskeldifferenzierung und den ersten Muskelkontraktionen<sup>60</sup>. Jackson et al. zeigten in einer detaillierten chronologischen Dokumentation, dass sich in humanen Feten ab der 12. Woche rudimentäre endomysiale Kollagen I und III-Strukturen nachweisen lassen. Dabei tritt Kollagen III vor Kollagen I mit stärkerer Distribution in Erscheinung. Im Perimysium konnten dagegen noch keine Kollagenstrukturen nachgewiesen werden. Ab der ca. 15. Woche sind prominente permysiale und intermyozytäre Kollagenfäden sichtbar, wobei wieder Kollagen III gegenüber Kollagen I (und selbst bei späteren Zeitpunkten) eine kontinuierlich vorherrschende Distribution aufweist<sup>61</sup>. Das ändert sich im weiteren Verlauf, wie man von Studienergebnissen von Marijjanowski et al. weiß<sup>62</sup>, die einen höheren Gehalt an Kollagen I in humanen neonatalen Herzen nachwiesen.

Postpartum wird die Kollagensynthese erneut gesteigert, zu einem Verhältnis Kollagen I zu Kollagen III von 1,3 bis 2:1, das schließlich dem Verhältnis in adulten Herzen entspricht<sup>29,62</sup>. Dabei ist dieses Verhältnis von mechanischen Faktoren beeinflussbar. So kann z.B. Dehnungsstress der Ventrikelwand die mRNA für Kollagen III in Fibroblasten erhöhen und somit das Verhältnis zu Kollagen I verändern<sup>47,63</sup>. Pauschinger et al. konnten zeigen, dass sich das Verhältnis Kollagen I zu Kollagen III mit dem Gesamtkollagengehalt bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie signifikant erhöhen kann<sup>64</sup>.

Aber nicht nur die Quantität der Kollagene ist entscheidend für die linksventrikuläre Dysfunktion, sondern auch die morphologischen Veränderungen einzelner Kollagenstrukturen. Einige Arbeitsgruppen haben herausgefunden, dass bei der dilatativen Kardiomyopathie die Zunahme des Durchmessers der Kollagenfibrillen und das Ausmaß ihrer Querverbindungen einen entscheidenden Einfluß auf die linksventrikuläre Dysfunktion haben<sup>65,66</sup>. Es findet eine Umstrukturierung der Faseranordnung statt. Durch die Zunahme der dünnen (Kollagen III) Fasern in der frühen Phase des Gewebsumbaus, resultiert eine Abnahme an stabilen lateral ansetzenden Kollagen I-Fasern. Eine Abnahme an lateralen dicken Fasern wird ursächlich für ein "slippage" der Myozyten und eine Ventrikelwandverdünnung gesehen<sup>67</sup>. Im weiteren Verlauf werden die feineren Kollagen III-Fasern durch stabilere Kollagen I-Fasern ersetzt, mit dem Erfolg, dass es die systolische und diastolische Steifheit im Ventrikel erhöht<sup>68,69</sup>.

Die zunehmende Genexpression von Kollagen mit der resultierenden erhöhten Kollagendistribution im extrazellulären Raum korreliert mit der linksventrikulären Dysfunktion, da es infolge zunehmenden linksventrikulären enddiastolischen Druckes zum Versagen des Frank-Starling-Mechanismus kommt<sup>70-72</sup>.

Der Kollagengehalt im Gewebe unterliegt den lokal ansässigen Matrixmetalloproteinasen (MMPs), einer Gruppe von Enzymen, die sich in die interstitiellen Kollagenasen, Gelantinasen, Stromelysine und membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) aufteilen. Alle Komponenten dieser Gruppe sind für den Abbau der Kollagenstrukturen bzw. Komponenten der Basalmembran verantwortlich. Zusätzlich sind die Proteinasen in der Lage sich gegenseitig zu aktivieren. Es liegen fast 6 verschiedene Unterformen vor, die im normalen Myokard in einem ausgewogenen Verhältnis zur Kollagensynthese am "remodeling" des Herzens beteiligt sind. Inhibitorisch wirken endogene TIMPs. Die Aktivität der MMPs kann durch den Einfluß von z.B. Zytokinen (TNF- $\alpha$ ), bioaktiven Substanzen (Katecholamine) oder mechanischen Einflüssen erhöht werden. Im Stadium der Herzinsuffizienz tritt ein Mißverhältnis auf. Es kommt zur gesteigerten Synthese von MMPs (ohne Erhöhung der inhibitorisch wirkenden TIMPs) in den Bindegewebezellen und in den Kardiomyozyten.

Dieses Phänomen der gesteigerten Synthese an Kollagen-abbauenden Enzymen erscheint Paradox, da das morphologische Charakteristikum der dilatativen Kardiomyopathie die Fibrose im Myokard ist. Die gesteigerte MMP-Synthese ist jedoch als Kompensationsmechanismus zur gesteigerten Kollagensynthese zu sehen und somit eher als ungünstig zu bewerten, da das Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese von Kollagenen gestört ist <sup>73-76</sup>.

Bei unseren Untersuchungen sah man durch die Sirius-Rot-Färbungen eine Verteilung von Kollagen I und III im Perimysium und Endomysium des Kontroll- sowie des DCM-Gewebes (Abb. 2A bis C). Es konnten im Gewebe mit dilatativer Kardiomyopathie Areale schwerster Fibrose dargestellt werden, in denen alle Kollagentypen lokalisiert waren (Abb. 2B und C). Dabei waren die Kollagene nicht nur im perivaskulären Raum von Venen und Arterien, sondern gleichfalls ubiquitär und fokal vermehrt zu finden. Die Kontrollgewebe wiesen insgesamt eine deutlich geringere Akkumulation der Kollagenarten auf (Abb. 2A).

In der Literatur wird zwischen zwei verschiedenen Fibroseformen unterschieden:

1. die *reaktive Fibrose*, die als Antwort auf neurohumorale Faktoren wie z.B. Aldosteron hervorgeht und nicht den Untergang von Myozyten voraussetzt. Man findet diese Form der Fibrose z.B. als Antwort auf eine erhöhte myokardiale Beanspruchung – z.B. bei Sportlern. Sie ist vorrangig perivaskulär im Interstitium lokalisiert.
2. die *Reparationsfibrose*, die mit dem Verlust von Myozyten einhergeht und daher vorrangig fokal im Interstitium zu finden ist. Dabei werden die nekrotischen Areale durch festes Narbengewebe ersetzt <sup>77</sup>. Andere Autoren differenzieren die

Reparationsfibrose weiter in eine segmentale Fibrose, wie man sie häufig bei einem Myokardinfarkt  $\geq 1 \text{ cm}^2$  findet. Narbengewebe, das sich nach fokalem Myozytenverlust entwickelt und kleiner als  $\leq 1 \text{ cm}^2$  ist, wird "replacement"-Fibrose genannt. Diese interstitielle Fibrose geht einher mit einer Erweiterung des extrazellulären Raumes, in dem das Kollagen vermehrt zwischen den Myozytengruppen vorzufinden ist - als Ergebnis auf einen diffusen Untergang der Myozyten<sup>78,79</sup>.

Bei der Beurteilung unserer kardiomyopathischen Gewebeschnitte wurde in einem Patienten die reaktive, sowie die reparative und/oder "replacement"-Fibrose beobachtet (Abb. 2C, 4B, 5B, 7D). Die Häufigkeit und Lokalisation der Fibrose ergibt sich dabei aus dem verantwortlichen Pathomechanismus. Ursächlich bei der dilatativen Kardiomyopathie für die Reparationsfibrose oder "replacement"-Fibrose ist der örtliche Verlust von Myozyten, hervorgerufen durch Vorgänge wie z.B. Apoptose, degenerative intrazelluläre oder fokal ablaufende immunoreaktive Prozesse, die den Untergang von Muskelzellen zur Folge hatten.

Die reaktive Fibrose, die im gesamten Gewebe zu sehen ist, wird durch veränderte neurohumorale Faktoren (Aldosteron, Angiotensin, Norepinephrin) verursacht, deren Plasmaspiegel bei diesen Patienten erhöht sind. Da die Narbenbildung im Myokard dynamischen Prozessen unterworfen ist, erscheint es plausibel, dass man in einem Präparat neben der abgeschlossenen Narbenbildung, ein zusätzliches frühes Fibrosestadium feststellen konnte.

Die Zunahme der Fibrose im Myokard gilt als hauptursächlich für die myokardiale Rigidity und sorgt damit für die schlechter werdende ventrikuläre Funktion. Wir schließen aus den hier diskutierten Befunden, dass die erhöhte Ventrikelsteifheit bei der dilatativen Kardiomyopathie auf die vermehrte Kollagen I und III Distribution zurückzuführen ist. Fokal verursacht diese Zunahme asynchrone Kontraktions-/Relaxationsabläufe der ventrikulären Aktionen<sup>80,81</sup>. Aufgrund der progredienten Ventrikelsteifheit kommt es zum steigenden enddiastolischen Füllungsdruck bei schlechter werdender Compliance und zunehmender Ineffizienz beim Frank-Starling-Mechanismus. Längerfristig etabliert sich dadurch eine manifeste Herzinsuffizienz mit schlechter Prognose.

#### 4.2.2.1.2. Kollagen IV

Kollagen IV gehört zu den flächenförmigen Kollagenen und ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären Basalmembran. Dieses Protein wurde u.a. ausführlich in *Drosophila melanogaster* (Stubenfliege) studiert. Trotz der Unterschiede im Genom können die gewonnenen Ergebnisse auf Vertebraten übertragen werden, so dass viele

Details über Kollagen IV im Menschen bekannt wurden <sup>33,44</sup>. Das Kollagen IV Monomer besteht aus einer Triplehelix von circa 400 nm Länge und 1.5 nm Breite. Von den Polypeptidketten, die die Helix bilden können, sind bisher 5 verschiedene  $\alpha$ -Ketten beschrieben worden. Somit existieren organspezifische Isoformen von Kollagen IV <sup>82</sup>. Die Triplehelix enthält 26 Unterbrechungen, die die gesamte Molekülstruktur biegsamer als die ihrer verwandten fibrillären Kollagene macht. Durch eine Kopf-an-Kopf-Bindung an der C-terminalen globulären Domäne mit einem anderen Monomer wird ein Dimer gebildet. Über laterale- bzw. weitere Kopf-an-Kopf-Verbindungen mit weiteren Dimeren entsteht nun ein sehr verzweigtes Gerüst, das sich in der Basalmembran zu einem mehrschichtigen Netzwerk zusammenfügt.

Kollagen IV wird von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten gebildet <sup>57,83</sup>. Die Funktion des Kollagen IV in der Basalmembran liegt in der Stabilität für die Zelle, die durch die zug-, und reißfesten Eigenschaften der Kollagene erreicht wird. Dabei wird sichergestellt, dass die Architektur der Basalmembran und deren Funktion während physiologischer Formveränderungen nicht beeinträchtigt wird, wie z.B. bei den Kontraktions/Relaxationszyklen. In dieser Lokalisation ist Kollagen IV ein wichtiger Baustein in der Basalmembran und ergänzt sich in der Funktion mit anderen Zellwandproteinen wie Laminin, Proteoglykanen und Integrinen <sup>33,84</sup>.

Im DCM-Gewebe sowie im Kontrollgewebe zeigten sich die Kollagen IV-Markierungen ähnlich wie die von Laminin: als feiner Saum, wie ein Netzwerk, umgibt Kollagen IV den Kardiomyozyten und folgt genau den Invaginationen der Zelle. Im Längsschnitt ist dies als T-System zu sehen. Im Vergleich mit dem Kontrollgewebe wiesen die Basalmembranen im Gewebe der dilatativen Kardiomyopathie oft inhomogene Strukturen auf (Abb. 6C). In Bereichen mit zunehmender Fibrose war besonders deutlich zu sehen, dass die sonst so zahlreichen T-Tubuli reduziert vorzufinden waren. Die Basalmembran erscheint verbreitert und fragmentiert. Dafür werden intrazelluläre Degenerationsvorgänge verantwortlich gemacht. Während der Erkrankung kommt es zur Degeneration der zytoskelettären Proteine wie Desmin, Vinculin und Talin, die alle eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Myofilamente zur Zellmembran spielen <sup>85,86</sup>. In diesem Rahmen kommt es aufgrund der Degenerationsvorgänge und der einhergehenden Myozytenhypertrophie zur Aufweitung der T-Tubuli.

Die vermehrten Kollagen IV-Ablagerungen in der Basalmembran könnten als reaktive Zellantwort auf die wachsende Instabilität der Muskelzelle zu deuten sein, sowie aufgrund einer überschüssigen Kollagen IV-Synthese nach Aktivierung durch verschiedene Stimulationsmechanismen bei den stattfindenden Entzündungs-

und Wundheilungsprozessen. Im Rahmen anderer Kardiomyopathieformen konnte die Arbeitsgruppe von Ohsato beobachten, dass die Kollagen IV Verteilung sich nicht länger auf die Basalmembran der Myozyten beschränkt, sondern vermehrt im Interstitium zu finden ist<sup>87</sup>. Diesen Befund konnte in unserem DCM-Gewebe vor allem in Bereichen der Fibrose häufig beobachtet werden. Es ist jedoch zu diskutieren, ob die Kollagen IV Strukturen, die vermehrt im Interstitium bei DCM-Patienten gefunden wurde, entweder als Produkt einer gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrixproteine zu sehen ist, oder Basalmembranfragmente bereits abgestorbener Myozyten sind.

Wir folgern aus den erhobenen Befunden im DCM-Gewebe, dass die erhöhte Kollagen IV-Synthese eine Verdickung des Sarkolemms zur Folge hat, dass die einzelnen Myozyten rigider werden – sie somit ineffizienteren Aktionsabläufen unterworfen sind. Wir sehen das als einen weiteren kausalen Faktor zur progredienten Ventrikelsteifheit im Rahmen dieser Erkrankung. Desweiteren sehen wir in der zunehmenden Dicke des Sarkolemms, infolge erhöhter Kollagen IV-Verteilung, eine kausale Rolle für ein Versorgungsdefizit des Myozyten, da der transmembrane Transfer von Elektrolyten, Sauerstoff und Signaltransmittern gestört wird.

#### 4.2.2.1.3. Kollagen VI

Kollagen VI wurde 1976 zuerst von Chung et al.<sup>88</sup> in der Intima von aortalen Gefäßwänden isoliert und beschrieben. Ursprünglich als Intimakollagen bekannt, wurden dem Protein später Namen wie: Kurzkettenkollagen oder Zebra-kollagen zuteil, bis man es schließlich in die Gruppe der perlschnurförmigen Kollagene einordnete. Die Grundmolekülstruktur von Kollagen VI besteht aus einem kurzen Monomer mit Bindungsdomänen an beiden Enden. Es setzt sich aus einer Triplehelix zusammen, bestehend aus drei Polypeptidketten, deren  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Kette ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa besitzen und die  $\alpha_3$ -Kette zwischen 180 und 260 kDa schwer ist. Die Monomeren ordnen sich zu Dimeren, diese wiederum zu Tetrameren zusammen. Letztere gehen untereinander in linearer Anordnung über ihre Bindungsdomänen in Kontakt - bis zu einer Länge von ca. 110 nm<sup>89,90</sup>. Die so gebildeten Filamente haben eine Breite von 7 bis 9 nm. Sie bauen zusammen ein komplexes Netzwerk im Interstitium, wobei sie über Disulfidbindungen miteinander verbunden und stabilisiert werden. Die Anordnung der Bindungsdomänen entlang der Filamente geben dem Protein ein perlschnurartiges Aussehen.

Bei der Auswertung unserer Fluoreszenzfärbungen konnten wir die Lokalisation von Kollagen VI in unmittelbarer Nähe zum Kardiomyozyten darstellen (Abb. 7B). Dabei schien das Kollagen mit seinen feinen Strukturen die Muskelzelle

strumpfförmig zu umschließen. Kollagen VI als Strukturkomponente der Basalmembran von Kardiomyozyten wurde bereits 1984 beschrieben<sup>91</sup>. Das erklärt unsere Befunde hinsichtlich der Markierungen des T-Systems, das weit in den Myozyten hineinreicht (Abb. 7A). Die Ausläufer der T-Tubuli ließen sich im Explantatgewebe vermehrt und deutlicher darstellen, was durch eine Dilatation der T-Tubuli erklärt werden kann<sup>92</sup>.

Kollagen VI steht in dieser räumlichen Nähe zum Myozyten über Bindungsstellen für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrine mit dem Laminin in Verbindung und ist so in der Lage die Zelladhäsion zu vermitteln. Zu den Bindungsstellen dieses Kollagens gehören bis zu 11 Sequenzen mit der typischen Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) - Folge, die eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Integrinen bzw. anderen Matrixproteinen spielt<sup>44,93</sup>. Die Anwesenheit der RGD-Sequenz könnte mitverantwortlich für die Adhäsion von Kollagen VI an der Zelloberfläche von Fibroblasten sein. Man konnte in unseren Untersuchungen den unmittelbaren Kontakt des Kollagen VI mit Fibroblasten mit Hilfe der Kollagen-VI/Vimentin-Doppelfärbung zeigen (Abb. 11B). Über diesen Kontakt werden Stressinformationen und andere Mediatorformen von Myozyten direkt an den Fibroblasten übermittelt und induzieren so die Synthese von Matrixproteinen. Neben Bindungsdomänen für Fibronectin sind weitere für den von Willebrandfaktor und andere Kollagene bekannt. Synthetisiert wird Kollagen VI in Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen.<sup>83,90</sup>

Positive Strukturen für Kollagen VI fanden sich in Bezug auf das Gefäßsystem in der Adventitia und in der Lamina media. Dieser Befund geht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen einher<sup>94</sup>.

Die Aufgaben von Kollagen VI, vor allem im myokardialen Gewebe, sind noch nicht eindeutig geklärt. Kollagen VI übernimmt die Rolle des Verbindungsglieds zwischen den Hauptkollagenen I und III und den zellulären Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Bei näherer Betrachtung der Fluoreszenzschnitte, sah man die spezifische Markierung für Kollagen VI als feines Netzwerk zwischen den Myozyten und den interstitiellen Zellen. Kollagen VI scheint bei der Formation und Migration von Zellen während der Ausbildung der Herzklappen und Septen im neonatalen Wachstum wichtig zu sein. Angeborene Herzfehler, die mit Kollagen VI assoziiert werden sind beim Down-Syndrom beschrieben worden. Man weiß, dass die Genloci von Kollagen VI in dem Areal auf Chromosom 21 liegen, welches der Triplikation unterliegt und verantwortlich für die Ausbildung des Trisomie 21-Phänotyps ist<sup>95,96</sup>. Aus Tierversuchen mit Kollagen VI-Knockout-Mäusen weiß man, dass es zu dramatischen strukturellen Veränderungen muskulärer Zellen kommt, wie man es vom klinischen Bild der Bethlem Myopathie kennt<sup>97</sup>. Kollagen VI

übernimmt somit wichtige Positionen in der Regulierung von Zellmigration, Zelldifferenzierung und embryonaler Entwicklung im muskulären Gewebe.

Beim Vergleich DCM-Gewebe versus Kontrollgewebe war die intensivere Fluoreszenz und die vermehrte Distribution von Kollagen VI im vergrößerten extrazellulären Raum sehr auffällig (Abb. 7 C und D). Die Lokalisation der vermehrten Kollagen VI Präsenz verlief parallel mit den Anordnungen der bekannten Kollagen I und III Strukturen.

Man weiß, dass es in Stadien verschiedener inflammatorischer Prozesse zur erhöhten Expression von Kollagen VI kommt <sup>72,98-100</sup>. Allerdings war eine Kreuzreaktion des Kollagen VI-Antikörpers zu Kollagen I oder III initial nicht auszuschließen. Wir führten daher eine Überprüfung der Spezifität des Antikörpers mit Hilfe der Westernblot Technik durch. Diese zeigte nur eine positive Bande für das Kollagen VI, so dass es sich bei den dargestellten Strukturen ausschließlich um Kollagen VI handeln muß (Abb. 13). Zu diskutieren ist der Aspekt, dass die welligen, dicken Formen der Kollagen VI-Fasern trotzdem den anderen Kollagentypen zugeordnet werden können. Kollagen VI hat im myokardialen extrazellulären Raum eine hohe Bindungsaktivität zu den Kollagenen I und III und überzieht mit seinem feinen Netzwerk die größeren Kollagen I-Fasern. Der Volumenanteil der feinen Kollagen VI-Fasern ist aber insgesamt geringer als der von Kollagen I. Dadurch wird der Eindruck erweckt, dass der Anteil an Kollagen VI dem von Kollagen I gleichgesetzt werden kann. Von dem Gesamtkollagengehalt an Kollagen VI im normalen und erkrankten Myokard ist bisher wenig berichtet worden.

Bashey et al. haben in einer Studie mit normalen Primaten-, Ratten- und Hundeherzen gezeigt, dass der Gesamtgehalt an Kollagen VI nicht mehr als 5% beträgt <sup>89</sup>. Intaktes Kollagen VI ist jedoch schwierig zu isolieren, da es in herkömmlichen Puffern unlöslich ist, so dass früher meist ein pepsinresistentes Fragment isoliert wurde und der Hauptanteil an Kollagen VI im Zuge der Reinigung verloren ging. Aufgrund der so gewonnenen niedrigen Mengen des Fragmentes wurde gefolgert, dass Kollagen VI einen niedrigen Anteil im Bindegewebe hat. Einige Forschergruppen vermuten daher, dass Kollagen VI einen erheblich höheren Anteil im myokardialen Bindegewebe darstellt <sup>101</sup>.

Letztendlich ist die Zunahme an Kollagen VI, wie aus den Befunden im DCM-Gewebe ersichtlich, als Ergebnis einer vermehrten Kollagen-VI-Synthese zu deuten, wie sie parallel mit der Zunahme der anderen Kollagentypen bzw. Matrixproteine einhergeht. Ursächlich sei hier die uniforme Gewebsantwort im Rahmen der vorliegenden lokalen inflammatorischen Prozesse. Die gesteigerte Kollagen VI-

Verteilung trägt zu einem steifer werdenden linken Ventrikel bei und ist als mitverantwortlich für die progrediente Funktionsstörung des Myokards im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie zu sehen.

#### 4.2.2.2. Adhäsionsproteine

##### 4.2.2.2.1. Fibronektin

Fibronektine können als große Glykoproteine (2 Untereinheiten bilden einen Dimer) in der extrazellulären Matrix, bzw. in der Basalmembran von Zellen, in löslichem Aggregatzustand im Plasma oder in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Durch "alternative gene splicing" entstehen verschiedene Strukturformen mit spezifischen Aufgaben. Der Vorgang des Spleißens ist jeweils zellspezifisch, so dass viele Isoformen von Fibronektin existieren. Aufgrund dieser Fülle an Distributionsmöglichkeiten wurden bestimmte Kriterien der Grundstruktur definiert <sup>102</sup>:

- 1) die Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 220-250 kDa
- 2) es besteht eine Disulfidbindung zwischen den 2 Untereinheiten
- 3) Fibronektin besitzt die Kapazität, an Gelatine zu binden
- 4) immunologische Kreuzreaktivität

Neben der Aggregatvielfalt unterliegt den Isoformen ein großes Aufgabenfeld. Das Fibronektinmolekül weist Bindungsstellen für Heparin, Fibrin, Gelatine, Kollagene und für spezifische Oberflächenrezeptoren unterschiedlichster Zelltypen auf. Auf diese Weise organisiert es die gesamte extrazelluläre Matrix und organisiert Zellen in ihrer Formation. Neben der Zelladhäsion mit extrazellulärem Material, fördert Fibronektin die Zellmigration während der Embryogenese, Onkogenese, der Phagozytose und vor allem die Wundheilung <sup>103,104</sup>.

In den untersuchten Gewebeschnitten bildeten die Fibronektinmarkierungen interzellulär gelegene lange dünne Fibrillen. Sie hatten Kontakt zu der Basalmembran der Myozyten, mit der sie mittels Integrinen in Kontakt stehen. Jeder Myozyt wurde mit einem feinem Netzwerk, das bis in die T-Tubuli hineinreichte, umgeben (Abb. 8A). Die Integrine stellen eine Verbindung zum Zytoskelett her. Somit ist Fibronektin an der Signalumwandlung bzw. am Signalaustausch zellulärer Einheiten unmittelbar beteiligt. Durch die Verbindung der Fibronektinstrukturen mit dem Kollagenetzwerk im Interstitium nimmt es Anteil an der myokardialen "compliance" <sup>105</sup>.

Fibronectin wird von glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert. Einen stimulierenden Einfluß auf die Transkription von Fibronectin in den synthetisierenden Zellen haben Mediatoren wie: EGF, PDGF, TGF- $\beta$ , cAMP, CTGF und Angiotensin <sup>58,106-109</sup>.

Wir fanden das Fibronectinnetzwerk insbesondere im perivaskulären Raum und im Perimysium. Beim Vergleich der Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie mit Kontrollgewebe war eine massive Fibronectinmarkierung im Kardiomyopathiegewebe auffällig (Abb. 8B). Sie korrelierte mit der Lokalisation der Fibrose. Die erhöhte Fibronectinmarkierung im Kardiomyopathiegewebe erklärt sich durch die Funktion des Proteins.

Der Expression von Fibronectin wird während der Herzentwicklung und kardiovaskulären Genese, bei der es für die frühe Zellmigration, Ausbildung der Herzscheife und Umbau in ein mehrkammeriges Organsystem mitverantwortlich sein soll, eine bedeutende Rolle zugeordnet, insbesondere bei Wundheilungsprozessen und den damit verbundenen Umbauvorgängen im Gewebe <sup>110,111</sup>. Im Zuge sofort einsetzender Reparationsmaßnahmen, z.B. nach Traumen oder beim Myokardinfarkt, kann Fibronectin sehr früh vermehrt nach dem pathologischen Ereignis nachgewiesen werden. In diesen Arealen findet sich anfänglich ein erhöhter Gehalt des schon vorhandenen zirkulierenden Plasmafibronectins. Ab dem 2. Tag findet eine de novo Synthese von Fibronectin statt, das von der gesteigerten Produktion in Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Plättchen, Makrophagen und Endothelzellen herrührt <sup>106,112-115</sup>. Fibronectin stimuliert die Migration und Adhäsion weiterer Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen) im Reparationsgewebe. Desweiteren werden die rekrutierten Zellen dazu angeregt, neben Fibronectin z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine zu exprimieren, die wiederum eine erhöhte Synthese von Fibronectin zur Antwort haben. Die gesteigerte Synthese an Fibronectin hält über einen bestimmten Zeitraum an, bis sich festes Narbengewebe, vorwiegend aus Kollagen I und III bildet, und fällt danach kontinuierlich ab <sup>112,116</sup>.

Anhand der Ergebnisse, die bei der Beurteilung der DCM-Gewebe gewonnen wurden, kann man sagen, dass Areale mit erhöhter Fibronectinexpression ein Indikator für Narbenbildung im Myokard sind. Dort findet im Rahmen von Entzündungsreaktionen der Beginn einer frischen Narbenbildung statt. Man findet Fibronectin im DCM-Gewebe gehäuft überall dort, wo eine feste, rigide Narbenbildung noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Diese Areale sind als potentielle myopathische Bereiche anzusehen, denn dort kommt es im Rahmen des Stabilisationsprozesses der Narbenareale zur Akkumulation von Kollagenen. Diese sind wiederum kausal für die abnehmende "compliance" einer effizienten Ventrikelleistung zu sehen.

#### 4.2.2.2. Laminin

Zu den Adhäsionsproteinen gehört Laminin, ein Multidomänen-Glykoprotein (ca. 850 kDa), das aus 3 Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) besteht. In ihrer Anordnung geben sie dem Laminin ein T-förmiges Aussehen mit 4 Bindungsarmen. Das Molekül besitzt Bindungsstellen zu einer Vielzahl von Proteinen, z.B. Fibronectin, Kollagen. Beide  $\beta$ -Ketten umwickeln die  $\alpha$ -Kette, wobei Disulfidbrücken den Aufbau stabilisieren. Da die einzelnen Ketten sich aus verschiedenen Genen ableiten, können bis zu 18 unterschiedliche Isoformen entstehen<sup>84</sup>. Je nach Zellart bzw. Distributionsort variiert die Isoform. In Muskelzellen wird die Isoform Merosin (Laminin-2) exprimiert. Hierbei ist die  $\alpha$ -Kette in ihrer Grundstruktur verändert<sup>117,118</sup>. Die unterschiedlichen Bedeutungen der Isoformen sind noch nicht endgültig bekannt, obgleich man weiß, dass sie sich in ihrer Molekülstruktur differenzieren und unterschiedliche Eigenschaften übernehmen.

Laminin ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran von Säugetierzellen. Lamininmoleküle bilden calciumabhängig Polymere und binden sich im Dreidimensionalen Raum innerhalb der Basalmembran mit Hilfe ihrer globulären Bindungsstellen an andere benachbarte Membrankomponenten, die Integrine, Kollagen IV, Nidogen, Heparansulfat und Dystrophin<sup>119-121</sup>. Sie geben der Zelle damit die wichtige architektonische Stabilität während der Kontraktions/Relaxationszyklen im Myokard. Desweiteren hat Laminin einen starken Einfluß auf Zellwachstum, -migration und -differenzierung<sup>121-124</sup>. In der Zellkultur übernimmt Laminin bei Interaktionen zwischen Zellen und Matrix die Rolle des Antagonisten zu Fibronectin und fördert das "cell-clustering"<sup>125,126</sup>. Desweiteren wirkt es regulierend während der embryonalen Herzentwicklung<sup>127</sup>.

Bei der Beschreibung der an die Zellen grenzenden Einheiten der Myozyten ist die Einhaltung der Nomenklatur wichtig. Die Basalmembran ist die feine Schicht, die die Basallamina, und die der zugehörigen extrazellulären Matrixkomponenten beinhaltet. Die Basalmembran ist bereits im Lichtmikroskop sichtbar. Die Basallamina läßt sich ausschließlich mit dem Elektronenmikroskop differenzieren (100 nm), und umfaßt Lamina densa, Lamina lucida und Lamina rara. Bei Kardiomyozyten ist das Sarkolemm die zellbegrenzende Einheit. Im Elektronenmikroskop läßt es sich differenzieren (von innen nach außen) in: Plasmalemm (phospholipidhaltig, 9 nm), die Glykokalix (beinhaltet Proteoglykane, 50 nm)<sup>128</sup> und darüber, die Lamina densa mit den Matrixkomponenten wie Kollagen IV und Laminin. Der Ausdruck Basalmembran bezieht sich auf die Struktur der Glykokalix (Lamina rara) und der Lamina densa.

Die Funktionen der Basalmembran werden von Zellfunktion, Architektur, Proliferation, Transformation, Zellmigration, zytoskelettären Organisation und interzellulären Verbindungen beeinflusst. Die Regulation transmembraner Signaltransduktion, interzellulärer biochemischer Abläufe und der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren fallen ebenso in den Aufgabenbereich der Basalmembran<sup>121</sup>.

Im Sarkolemm der Kardiomyozyten existieren folgende transmembrane Signalsysteme:

- transmembrane Glykoproteine, die nicht den Integrinen zugeordnet werden, z.B.  $\alpha$ -Dystroglykan
- membranassoziierte Proteine (Caveolin, Syntrophin),
- Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone und neurohumorale Substanzen
- Ionenkanäle und Gap-Junction Proteine (Connexine)

Die in der Herzmuskelzelle vorhandenen Adhäsionssysteme zum extrazellulären Substrat oder zur benachbarten Zelle basieren einerseits auf der Interaktion der Intermediärfilamente (Desmin) mit den extrazellulären Proteinen, andererseits existiert ein "actin-mediated system", das eine Verbindung der Aktinmoleküle zu extrazellulären Matrixproteinen vermittelt. Hierbei fällt der Interaktion von Laminin mit membranassoziierten Proteinen, oder fokalen Adhäsionsmolekülen (FAMs), Integrinen und weiteren Proteinen wie z.B. Talin, Vinkulin eine entscheidene Rolle zu<sup>92,118,129</sup>. Die Verbindungen intrazellulärer Proteine mit der extrazellulären Matrix sind für die Muskulatur essentiell. So wird sichergestellt, dass die drei wichtigsten Einheiten im Myokardgewebe, der kontraktile Apparat, das Sarkolemm und das Interstitium eine Einheit bilden. Fällt ein Teil dieser Einheit aus, ist mit schwerwiegenden Folgen zu rechnen, wie man es z.B. in der Skelettmuskulatur bei Muskeldystrophien (Duchenne) beobachtet. Allerdings kann der Herzmuskel im Gegensatz zur quergestreiften Skelettmuskulatur, auf mehrere Verbindungssysteme ausweichen. Trotzdem bekommen etwa 10% der Patienten mit Muskeldystrophien eine Kardiomyopathie.

Bei dem hier vorliegenden Kontrollgewebe stellte sich die Lamininmarkierung im Sarkolemm als homogene Struktur dar (Abb. 9A). Bei den Gewebeproben mit dilatativer Kardiomyopathie jedoch, wurden signifikante pathologische Veränderungen beobachtet. Oft fanden wir die Basalmembranen der Myozyten verdickt, teilweise fragmentiert, in einigen Arealen fehlte sie völlig (Abb. 9B). Fragmente von Lamininstrukturen wurden zusätzlich als Zelldebris im extrazellulären Raum identifiziert. Gründe für die Alterationen der Basalmembran

wären beispielsweise zirkulierende Anti-Laminin-Antikörper gegen die Komponenten der Basalmembran. Bei Patienten mit der Chagas-Kardiomyopathie, sowie bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie fanden die Arbeitsgruppen von Wolff und Milei zirkulierende Anti-Laminin-Antikörper im Blut<sup>130,131</sup>. Interessanterweise haben sich die morphologischen Veränderungen der Basalmembran bei der Chagas-Krankheit nicht von denen der idiopathisch dilatativen Kardiomyopathie unterschieden, obwohl letztere eher autoimmunologischer Genese ist. Dies zeigt, dass bei dem Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie mit Veränderungen der Lamininstrukturen inflammatorische Prozesse eine potentielle Rolle spielen.

Auffällig war im kardiomyopathischen Gewebe neben den fragmentierten Lamininmarkierungen die Verdickung der Basalmembran. Dies ist als Folge der uniformen Gewebsantwort zu sehen, extrazelluläre Matrixproteine (z.B. Fibronectin) zu produzieren, die eine gesteigerte Distribution von Laminin induzieren. Interessanterweise ließen sich bei Untersuchungen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie signifikant erhöhte Serumkonzentrationen an Laminin nachweisen. Sie korrelierten morphologisch mit dem ausgemessenen Gewebsanalogon. Gemäß Klappacher et al. wäre diese Untersuchung als Risikostratifikation zu diskutieren<sup>132</sup>. Ein weiterer Grund für die Verdickung der Basalmembran wäre die Myozytenhypertrophie, wie sie typisch im Krankheitsverlauf der dilatativen Kardiomyopathie ist. Die Hypertrophie hat eine verminderte Perfusion der einzelnen Myozyten zur Folge. Dies wiederum führt zu einer sekundären chronischen Ischämie aufgrund einer Verlängerung der Diffusionsstrecke<sup>133</sup>. Eine chronische Ischämie geht mit einer Verdickung der Basalmembran einher<sup>39,134</sup> - eine Verdickung der Basalmembran hält wiederum die Ischämie aufrecht und schließt den *circulus vitiosus*.

Als weiterer Aspekt seien die Mastzellen zu erwähnen. Mastzellen stehen im Verdacht, einen wesentlichen Beitrag zu Alterationen der Basalmembran von Kardiomyozyten zu leisten. Sie sind u.a. verantwortlich für Apoptose in Kardiomyozyten<sup>135</sup>. Devaux et al. fanden heraus, dass die Anzahl der Mastzellen im Gewebe bei fortgeschrittener dilatativer Kardiomyopathie signifikant erhöht ist, obgleich ihre Rolle nicht eindeutig geklärt werden konnte<sup>136</sup>. Mastzellen im Stadium der akuten Entzündung, sind für das Freiwerden von Entzündungsmediatoren und Heparin verantwortlich. Heparin verändert, bei lokaler Distribution, reversibel die Ausrichtung der Lamininmoleküle und modifiziert die Kollagen IV-Polymerisation in Basalmembranen<sup>33,137</sup>. Dadurch können sich die Ladungsanordnungen auf Zelloberflächen ändern. Die Zellmembran wird dadurch porös und kann die Funktion eines Molekülsiebes nicht mehr erfüllen. Als Folge

kommt es zu schwerwiegenden ionischen Veränderungen im Rahmen des transmembranen Molekülaustausches innerhalb des Myozyten. Die Permeabilität der Zellmembran würde sich verändern und die Funktion der Zelle beeinträchtigen. Dieses verursacht eine instabile Zelle, da durch die Alterationen der Basalmembran auch eine insuffiziente Ausrichtung von Kollagen IV-Polymeren hervorgerufen wird.

Aus den zugrunde liegenden Befunden schließen wir, dass Laminin, als wichtiger Bestandteil der Basalmembran der Kardiomyozyten, bei der Progression der dilatativen Kardiomyopathie eine zusätzliche wichtige Rolle spielt. Im Rahmen der vermehrten Expressierung und durch weitere Einflüsse (z.B. Mastzellen) kommt es zur Malfunktion des Sarkolemmes. Dieses führt zu Veränderungen der transmembranen Versorgung, somit zur Malnutrition der Herzmuskelzelle, sowie zur statischen Instabilität. Es kommt zum Zelluntergang des Kardiomyozyten, die Basalmembran fragmentiert und triggert über die Freisetzung von Lamininmolekülen in den extrazellulären Raum inflammatorische Prozesse, die die Progression der Fibrose unterhalten.

#### 4.2.2.2.3. Tenascin

Tenascin ist ein großes Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das in vielen Spezies (Säugetiere, Insekten, Amphibien u.s.w.) exprimiert wird und bis dato 5 entdeckte Isoformen besitzt<sup>138</sup>. Früher wurde es auch das Hexabrachion Protein genannt, das die sechsarmige Molekülstruktur dieses Proteins beschrieb<sup>139</sup>. Dabei verbinden sich drei identische Arme mit ihren proximalen Enden zu einem Knotenpunkt und erzeugen ein Trimer. Um die für Tenascin typische Hexameranordnung herzustellen, sind zwei Trimere über eine T-förmige Verbindung (Disulfidbrücken) in einem zentralen Knoten aneinandergesetzt.

Das gesamte Molekül ist bereits sequenziert und identifiziert. So fand man heraus, dass auf den einzelnen Molekülarmen homologe Bindungsstellen zu anderen Proteinstrukturen, wie Laminin, Fibronectin, Wachstumsfaktoren (EGF) und Fibrinogen existieren<sup>140-142</sup>. Das Molekulargewicht des Tenascinmoleküls variiert zwischen 190 und 300 kDa. Im humanen Gewebe lassen sich verschiedene Isoformen von Tenascin differenzieren: Tenascin-C (Cytotactin), Tenascin-R (Restrictin), Tenascin/J1 (Janusin) und Tenascin-X. Tenascin-R und Tenascin/J1 sind hauptsächlich in Nervengewebe und in Geweben mit Proliferationsvorgängen lokalisiert. Tenascin-X und Tenascin-C sind im Muskelgewebe vertreten und spielen eine wichtige Rolle bei der Herzentwicklung<sup>141,143,144</sup>.

Die Hauptaufgaben dieser Proteine liegen bei der Mitwirkung der Regulation von Zellproliferation, -migration und -differenzierung im adulten Gewebe, sowie

während der Embryogenese von Organen <sup>140,141,144,145</sup>. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe von Bristow einen Tenascin-X-Gendefekt mit dem Ehlers-Danlos-Syndrom in Verbindung bringen <sup>146,147</sup>. Tenascin-C wurde hauptsächlich bei der Onkogenese und epithelialen Wundheilungsprozessen studiert, so dass wenig über Expressionen von Tenascin-C und Tenascin-X im Myokard bekannt ist. Eine Arbeitsgruppe aus Boston konnte 1999 eine gesteigerte Synthese von Tenascin-C in Kardiomyocyten als Reaktion auf mechanischen Stress belegen <sup>148</sup>. Extrazellulär lokalisiert, ließen sich die Proteine morphologisch in Nähe zur Basalmembran nachweisen <sup>149-151</sup>. Das Protein wird außerdem in Fibroblasten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen und während aktueller Wundheilungs- und Narbenbildungsvorgängen exprimiert aber nicht in älteren Narbengeweben, in denen der Prozeß schon abgeschlossen ist <sup>152-155</sup>.

In Kontrollgeweben wurden von uns nur vereinzelt für Tenascin positive Strukturen beobachtet. Diese betrafen hauptsächlich Gefäße und sind als physiologische Expression z.B. von Endothelzellen zu betrachten. Es ist bekannt, dass Tenascin eine regulative Rolle in der VEGF-vermittelten Angiogenese, Vaskulogenese bzw. Endothelzellproliferation spielt <sup>156</sup>.

Im DCM-Gewebe konnten wir feststellen, dass Tenascinmarkierungen insgesamt vermehrt, jedoch überwiegend in Bereichen der Fibrose lokalisiert waren (Abb. 10B). Mit Hilfe von Doppelmarkierungen mit Fibronectin wurden diese Areale als frisches Narbengewebe identifiziert - Gebiete in denen die endgültige Fibrosebildung noch nicht abgeschlossen ist, bzw. erst vor kurzem begonnen hat (Abb. 10C). Unter Berücksichtigung der Fibroseform ließen sich die Tenascinakkumulationen Gebieten der reparativen bzw. der "replacement"-Fibrose zuordnen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass vermehrt myozytenangrenzende Strukturen positiv für Tenascin markiert waren. Die Tenascinmarkierung umgab in einigen Gewebeschnitten den Myozyten vollständig. Die Lokalisation von Tenascin zur Basalmembran der Myozyten wird über Integrine oder Zell-Oberflächen Proteoglykane (z.B. Chondroitinsulfat) reguliert und hat immunmodulatorische Einflüsse auf Makrophagen, B- und T-Lymphozyten <sup>151,155,157-159</sup>.

Die Induktion der Tenascinsynthese erfolgt über Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Angiotensin II oder mechanischen Stress <sup>141,148,160-162</sup>. Zusätzlich wirkt Tenascin mit seinen Bindungsdomainen mitogen und kann über die Fibroblastenproliferation eine gesteigerte Expression der Matrixproteine induzieren <sup>163</sup>.

Unsere Befunde zeigen, dass die vermehrte Tenascinmarkierung im DCM-Gewebe als Ausdruck der frischen myokardialen Fibrosebildung zu verstehen ist. Ähnlich wie beim Fibronectin zeigt die vermehrte Expressierung von Tenascin aktuelle, frühe

Prozesse der Narbenbildung im extrazellulären Raum. Über die Zell-Oberflächen Verbindungen markiert Tenascin selektiv degenerierte Kardiomyozyten und spielt eine entscheidene Rolle beim Umbau dieser Herzmuskelzellen zu Narbengewebe.

#### 4.2.2.2.4. Vimentin

Vimentin wird den Intermediärfilamenten der Zellen zugeordnet. Der Begriff Intermediärfilament entstand während elektronenmikroskopischer Analysen an Muskelzellen. Die damals neuentdeckten Filamente innerhalb der Zellen besaßen einen Durchmesser von 8-10 nm, der im Vergleich zwischen denjenigen von Aktin (8 nm) und Tubulinfilamenten (25 nm) einzuordnen ist. Sie bilden ein intrazelluläres Netzwerk zur Plasmamembran mit sehr widerstandsfähiger Konsistenz.

Die Intermediärfilamente der Wirbeltiere werden unterteilt in: Keratin-, Neuro-, Vimentin-, bzw. Vimentin-verwandte-Filamente. Letztere enthalten neben Vimentin als Gruppenmitglied, das Protein Desmin, das eine wichtige Einheit im Zytoskelett in Kardiomyozyten darstellt. Vimentin und Desmin haben während der neonatalen Entwicklung im humanen Myozyten wechselseitige Aufgaben. Ihre Expressionen verhalten sich reziprok, dabei ist mit Zunahme des Alters eine kontinuierliche Verminderung an myozytärem Vimentin zu beobachten <sup>164</sup>.

Die anderen Neurofilamente sind ausschließlich in Neuronen lokalisiert; Keratinfilamente findet man in Epithelzellen und ihren Derivaten (z.B. Haare, Nägel). Die Molekülstruktur der Intermediärfilamente ist komplex. Ein stabförmiges Monomer wickelt sich um ein anderes identisches Monomer, um ein Dimer zu bilden. Zwei Dimere ordnen sich versetzt parallel zueinander an und sind für die entstehende Tetramerstruktur verantwortlich, die zusammen in helikaler Anordnung mit vielen weiteren Tetrameren die endgültige, strangförmige Molekülstruktur bildet. Das Molekulargewicht von Vimentin liegt bei 54 kDa. Die Anzahl, Länge und Position der Filamente innerhalb der Zelle wird in der jeweiligen Zelle selbst reguliert <sup>165,166</sup>.

Vimentin ist bezüglich zytoplasmatischer Intermediärfilamente das am weitesten verbreitete Protein in Zellen mesenchymaler Herkunft, einschließlich Fibroblasten und Endothelzellen. Vimentinfibrillen errichten intrazellulär ein trabekelartiges Netzwerk, das den Zellen gegenüber Zug- und Scherkräften eine optimale Standfestigkeit gibt. Als Bindungsdomänen der Filamente innerhalb der Zelle agieren die "amino-terminal head domains" am Kopfende jedes Monomers, deren Vorhandensein essentiell für die Stabilität der Zellen ist <sup>167</sup>. Vimentinfibrillen füllen mit ihrem Netzwerk den gesamten intrazellulären Raum aus. Im

perinuklearen, mitochondrialen Bereich, in der Nähe des endoplasmatischen Retikulums und des Plasmalemmas, sorgen sie für Stabilität <sup>168</sup>. Sie ziehen außerdem von der Zellmitte zur Membran, wo sie in Interaktion mit Fibronektinkomponenten treten können <sup>169</sup>.

Somit werden die Funktionen von Vimentin auf andere Bereiche erweitert, indem sie mitverantwortlich für die Anordnung und Lokalisation von Zellorganellen sind und u.a. indirekt Anteil an Signalübertragungen und -umwandlungen vom Gewebe zu Zellorganellen haben.

In den Untersuchungen markierte Vimentin hauptsächlich Fibroblasten und zeigte somit den Gehalt an Bindegewebezellen im extrazellulären Raum an. Fibroblasten stellen die Majorität der nichtmyozytären Zellen im kardialen Interstitium und haben eine wichtige regulative Rolle während inflammatorischer Prozesse, da sie Hauptproduzent von extrazellulären Matrixproteinen sind <sup>42,57</sup>. Sie unterliegen regulativen Mechanismen, die neurohumoraler Natur sind, bzw. verändern ihre Proteinsynthese unter dem Einfluß von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. TGF- $\beta_1$  scheint ein entscheidender Stimulus für die Kollagensynthese in den Fibroblasten zu sein. Durch den Einfluß von TGF- $\beta_1$  kommt es in den Fibroblasten zur Bildung von Kollagenen, insbesondere Kollagen I, III und VI. Das erklärt die räumliche Nähe der Fibroblasten zu den Kollagenfasern, das in unseren Untersuchungen mit den Doppelmarkierungen gezeigt werden konnte. Die Pseudopodien der Fibroblasten umschlingen neben Kollagenfasern auch ganze Myozyten. Von Borg et al. wurden 1979 bereits erste Ergebnisse veröffentlicht, die die nahe Lokalisation der Fibroblasten zu Kollagenfasern beschrieben <sup>50</sup>.

Die Zell-Matrix-Verbindung der Fibroblasten wird über Integrine, Zelloberflächenproteoglykane und transmembrane Rezeptoren vermittelt. Zusätzlich dienen die Kollagenfasern den Fibroblasten als Leitstrukturen, um sich im extrazellulären Raum mittels haptokinetischer Zellmigration vorwärts zu bewegen. Der Durchmesser, sowie die Anzahl der Kollagenfasern haben entscheidenden Einfluß auf die Bewegungsfähigkeit der Fibroblasten <sup>170</sup>.

Im DCM-Gewebe waren die Vimentin-markierten Fibroblasten vor allem in fibrotischen Arealen deutlich erhöht und spiegelten das Ausmaß der Fibrose wider (Abb. □11C). Es gibt viele ursächliche Mediatoren für eine gesteigerte Fibroblastenproliferation. Sie reichen von Wachstumshormonen über Angiotensin II, cAMP und Norepinephrin bis zu Sauerstoffradikalen <sup>171-174</sup>. Diese Mediatoren können über spezifische Rezeptoren oder über transmembrane Signalwege stimulierend auf die Kollagensynthese wirken <sup>175-178</sup>. Zusätzlich können Fibroblasten

eigens die Synthese einiger Mediatoren, wie z.B. Angiotensin II durchführen, was die kontinuierliche gesteigerte Produktion an Matrixproteinen unterhält<sup>179</sup>.

Abschließend läßt sich folgern, dass Fibroblasten die Schlüsselstellung in der Entwicklung der Fibrose haben und stellen das Ausmass der kardialen Fibrose bei der dilatativen Kardiomyopathie dar. Vimentin ist als ein indirekter Indikator für die Lokalisation und Ausdehnung der Fibroblastenaktivität im Myokard zu sehen. Die Befunde der Vimentinmarkierung zeigen, dass im DCM-Gewebe von einer gesteigerten Fibroblastenaktivität auszugehen ist, die für die progressive Fibrosebildung verantwortlich gemacht werden kann.

#### 4.2.2.2.5. CD68

CD68 ist ein Oberflächenantigen, das im menschlichen Gewebe von Makrophagen und Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. Zu der myeloischen Reihe gehören u.a. die natürlichen Killerzellen, T-Zellen und die CD4- und CD8-T-Lymphozyten<sup>180</sup>. Das transmembrane Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa ist in den Primärgranula neutrophiler Granulozyten und in Monozyten in den zytoplasmatischen Granula untersucht worden. CD68 wird mit aktivierten T-Lymphozyten assoziiert, wo es in den sekretorischen Lysozymen lokalisiert ist<sup>181-184</sup>. Somit erscheint CD68 vorrangig als ein intrazelluläres Protein, das bei Aktivierung nach extrazellulär geklappt wird<sup>185</sup>.

Gewöhnlicherweise findet man im normalen Myokardgewebe nur vereinzelte Zellen, die positiv für CD68 markiert sind (Abb. □12A). Die Befunde zeigten vergleichsweise im DCM-Gewebe ein deutlich höheres Vorkommen an CD68 positiven Zellen (Abb. □12B). Charakteristisch fokal in perivaskulären Bereichen und in Arealen mit massiv erweitertem extrazellulären Raum sah man die Anhäufungen der CD68 positiven Zellen. Sie stellen die Gewebsmakrophagen dar, die im Rahmen aktivierter Entzündungsvorgänge aus dem vasalen Raum in den extrazellulären Raum migriert sind. Die inflammatorische dilatative Kardiomyopathie (DCMI) wird laut WHO/ISCF Task Force als Subgruppe der dilatativen Kardiomyopathie eingestuft. Jedoch lassen sich bei ca. 1/3 der Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie inflammatorische Kriterien nachweisen, so dass sich eine eindeutige Differenzierung z.B. zur chronischen Myokarditis manchmal nicht durchführen läßt. Die Ursache für die inflammatorischen Komponenten kann entweder eine virale Infektion sein oder einem Autoimmunprozeß zugeordnet werden. Beide Prozesse beinhalten die Aktivierung des Abwehrsystems mit der zugehörigen Antwort auf zellulärer und humoraler Ebene.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten im klinischen Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie zeigen, dass es infolge der stattfindenden Immunantwort zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, und Anhäufungen von Makrophagen und Lymphozyten kommt <sup>136,186,187</sup>. Makrophagen können neben Zytokinen auch Fibronectin und Wachstumsfaktoren produzieren <sup>116</sup>. Fibroblasten reagieren darauf wiederum mit einer vermehrten Produktion an Matrixproteinen, wie z.B. Kollagenen und fördern die Entstehung von Fibrose im Myokard.

Läßt man die infektiöse Genese der dilatativen Kardiomyopathie außer acht, so findet man weitere kausale Faktoren, die diesen persistierenden immunologischen Prozeß erklären könnten. Die im Zuge der Erkrankung entstehenden Kompensationsmechanismen, z.B. die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems leistet ebenfalls einen Beitrag zur Pathogenese und Progression der Erkrankung.

In Untersuchungen mit hypertensiven Ratten fanden sich Korrelationen zwischen Makrophagen-Densität, Plasma-Renin-Aktivität und Blutdruckerhöhung, so dass der Einfluß von Angiotensin und mechanischen Faktoren als weiterer bestimmender Stimulus für immunoreaktive Veränderungen in Betracht gezogen werden muß <sup>188</sup>. Eine weitere Ursache liegt u.a. in der Sequestrierung zellulärer Debris, ausgehend von geschädigten Myozyten, deren zelluläre Bestandteile (Sarkolemm) stimulierend und chemotaktisch auf die Gewebsmakrophagen wirken <sup>136,189</sup>.

Zugleich kommt es zur Erhöhung von weiteren unspezifischen Entzündungsmarkern z.B. CD3 <sup>136</sup>. Es liegt nahe, dass es sich bei der erhöhten Makrophagendensität im untersuchten DCM-Gewebe um chronische bzw. unspezifische Entzündungsreaktionen handelt. Sie sind als Ausdruck inflammatorischer Vorgänge, die zur progressiven Fibrosebildung führen zu sehen.

### **4.3. "Heart failure" und die Veränderungen der regulativen Mechanismen**

Fibrotische Umbauprozesse im Interstitium sind, morphologisch gesehen, das primäre charakteristische Merkmal der dilatativen Kardiomyopathie. Es zeigt die Antwort des Myokardgewebes auf endogene sowie exogene Noxen, sei es physiologisch oder pathophysiologisch, die als Induktoren der morphologischen Veränderungen in Frage kommen. Diese Veränderungen, die sich vorwiegend als Gewebeumbauvorgänge auszeichnen, unterliegen einem Zusammenspiel vieler regulativer Mechanismen und Mediatoren, wie z.B. mechanischem Stress, Zytokinen und Hormonen. Diese stimulieren die Synthese von extrazellulären Proteinen in den Bindegewebezellen, den Fibroblasten. Als Folge dessen entstehen

im Myokard fokale reaktive oder reparative Areale. Nach Abschluß des Umbauprozesses findet sich in diesen Arealen ein verbreiteter extrazellulärer Raum mit Zunahme extrazellulärer Matrixproteine, insbesondere Kollagen. Fibrose läßt sich somit durch einen erhöhten Gehalt an Kollagenstrukturen mit den zugehörigen Bindegewebezellen im Interstitium definieren.

Der Anteil an Bindegewebe läßt sich morphologisch quantifizieren. Setzt man das Myokardgewebe als 100% voraus, so liegt der Volumenanteil an Myozyten im normalen Myokard morphologisch gemessen bei 75%, und der des extrazellulärem Raums bei 25%. Von letzterem die Hälfte, 10 bis 12% repräsentiert den Anteil an Kollagenstrukturen mit den zugehörigen Bindegewebezellen. Bei der dilatativen Kardiomyopathie ist der Anteil für Kollagen durchschnittlich auf 26% erhöht<sup>26,190</sup>. Eine moderate Zunahme an interstitiellem Bindegewebe, unabhängig von kardialen Begleiterkrankungen, ist jedoch physiologisch mit dem Älterwerden des Menschen zu beobachten<sup>79,191</sup>.

Klinisch ist die Herzinsuffizienz ein komplexes Syndrom, bedingt durch die eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens. Im Myokard kommt es dadurch zu intrinsischen Konsequenzen in Form von Veränderungen beim Frank-Starling-Mechanismus, der Ventrikelgeometrie (Laplace) und führt zu einer myokardialen Hypertrophie. Bei Persistieren der insuffizienten Hämodynamik werden hämostatische, neurohumorale Kompensationsmechanismen durch eine gesteigerte Sympathikusaktivität und Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) in Gang gesetzt. Die gesteigerte Sympathikusaktivität führt einerseits über erhöhte Plasmakatecholaminspiegel zur Aufrechterhaltung einer suffizienten Hämodynamik, andererseits liegen die längerfristigen Folgen in einer gesteigerten myokardialen Narbenbildung.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass bei dilatativer Kardiomyopathie ein signifikant hoher Prozentsatz an Autoantikörper gegen myokardiale  $\beta$ -Rezeptoren im Patientenblut nachzuweisen sind<sup>192,193</sup>. Es findet eine Blockierung sowohl der  $\beta$ -Rezeptoren als auch eine dauerhafte Stimulierung dieser  $\beta$ -Rezeptoren statt. Dieser adrenerge "overdrive" führt zu einer Desensibilisierung der  $\beta$ -Rezeptoren und zusätzlich zu deren Herunterregulierung<sup>194</sup>. Im Rahmen des frustranen adrenergen Dauertonus scheint das Myokard im Verlauf der Erkrankung an Katecholaminen zu verarmen. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie konnten durch eine Hamburger Arbeitsgruppe ein verminderter myokardialer Katecholaminspiegel nachgewiesen werden, der sich über einen negativen Feedback-Mechanismus erklären läßt<sup>195</sup>.

Der Einfluß der Katecholamine auf die strukturellen Veränderungen im Myokard wird dabei als hoch eingeschätzt <sup>196</sup>. Das RAAS ist ein endokrines System, welches in klassischer Hinsicht die Vasokonstriktion und den Salz- und Volumenhaushalt reguliert. Bei chronischer Herzinsuffizienz stimuliert der abfallende intrarenale arterielle Druck die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin ist verantwortlich für das Abspalten von Aminosäuren am Angiotensinogen aus der Leber bis zum Dekapeptid Angiotensin I (Ang I). Aus Ang I wird unter Einwirkung des "angiotensin-converting-enzyme" (ACE), das in der Lunge und aus Endothelzellen freigesetzt wird, Angiotensin II (Ang II) gebildet. Am Herzmuskel besitzt Ang II positiv chronische und positiv inotrope Eigenschaften, verändert den kardialen Metabolismus und gilt als potenter Vasokonstriktor. Das Mineralkortikoidhormon Aldosteron unterliegt hingegen nicht dem Regelkreis vom Ang II, sondern wird weitgehend unabhängig davon freigesetzt <sup>197</sup>. Die Hauptwirkung von Aldosteron liegt in der Na<sup>+</sup>-Retention in den Nierentubuli, Darmepithelien, Schweiß- und Speicheldrüsen. Dadurch kommt es sekundär zur Flüssigkeitsretention und somit zur Erhöhung des arteriellen Blutdruckes.

Die vasoaktiven Peptide des RAAS werden jedoch nicht nur im zirkulierenden System bereitgestellt, sondern werden lokal in Blutgefäßen, Niere, Gehirn und dem Myokard synthetisiert. Dort fördern die vasoaktiven Substanzen neben hämodynamischen Effekten, die Proliferation von Zellen und die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen. Vor allem die vor Ort im Myokard gebildeten Hormone des RAAS, das ACE und das Ang II werden für die Langzeiteffekte in Form von Fibrosebildung verantwortlich gemacht. Produktionsort dieser Peptide sind die Endothelzellen, Fibroblasten und die Kardiomyozyten selbst. Nach der Freisetzung können die Substanzen entweder benachbarte Zellen (parakrine Aktivität) beeinflussen, oder auf die produzierende Zelle selbst (autokrine Eigenschaft) direkt einwirken.

Den direkten Wirkungsort von Aldosteron an Herzmuskelzellen zeigen die Ergebnisse von Lombès et al. <sup>198</sup>. Sie wiesen einen Mineralokortikoidrezeptor in kardialen Myozyten und Endothelzellen nach. Bekannt waren bereits Mineralokortikoidrezeptoren an Fibroblasten und glatten Muskelzellen und die durch Aldosteron induzierten Genexpressionen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Rattenkardiomyozyten <sup>199,200</sup>.

Brilla et al. fanden in Zellkulturexperimenten heraus, dass Fibroblasten, mit Aldosteron stimuliert, ihre Kollagensynthese steigern <sup>201</sup>. Allerdings steht dies im Widerspruch zu Ergebnissen von Köhler und Fullerton et al., die diesen direkten Einfluß in vitro nicht nachweisen konnten. Ihrer Meinung nach scheint die Kollagensynthese von Fibroblasten unabhängig vom Aldosteron abzulaufen <sup>202,203</sup>.

Trotz dieser Diskrepanz sollte Aldosteron als Promotor in Bezug auf Fibrose im menschlichen Myokard ein wichtiger Stellenwert zugesprochen werden. Aldosteron erhöht in vitro den  $\text{Na}^+$ -Einstrom in Kardiomyozyten, welches daraufhin  $\text{Na}^+$ -abhängige Glukosetransportersysteme aktiviert<sup>200,204</sup>. Erhöhte Glukoseaufnahmen steigern in in vitro Versuchen mit Endothel- und Mesangiumzellen die Synthese von Kollagen I, IV und VI<sup>205</sup>. Aber es scheint, dass sich dem Aldosteron unterstehende Abläufe langsamer auf das Gewebe auswirken, als die durch den Einfluß von Ang II. Sun et al. zeigten, dass sich durch Aldosteroneinfluß erste fibrotische Umbauprozesse im Myokardgewebe, im Vergleich mit Ang II, sehr viel später nachweisen lassen<sup>206</sup>. Ang II offenbart sich damit als potenteres Substrat in Bezug auf strukturelle Umbauprozesse im Herzen.

Dabei fungiert menschliches Myokard nicht nur als Zielorgan, sondern ist autokrine und parakrine Einheit für Ang II. Dieses Oktapeptid wird über bislang drei bekannte Transformationswege aus Ang I gebildet: 1. mit "angiotensin-converting-enzyme" (ACE), 2. mit Gewebschymasen-abhängigem Umbau und 3. mit Serin-Proteinasen, wie z.B. Kathepsin G, Kallikrein. Der Anteil der myokardialen ACE-abhängigen Transformation beträgt nur ca. 11%. Der andere wichtige Umbauweg im myokardialen Gewebe von Ang I zu Ang II läuft laut Urata et al. über myokardial ortsansässige Chymasen. Diese sind im Zytosol, in Granula von Endothelzellen und Mastzellen lokalisiert worden<sup>207,208</sup>. Devaux et al. konnten vermehrt Mastzellen im Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachweisen<sup>136</sup>. Mastzellen leisten damit indirekt einen wichtigen Beitrag zum myokardial gewebesansässigen Ang II.

Die Zink-Metalloprotease "angiotensin-converting-enzyme" (ACE) wird von Endothel-, Epithelzellen, Makrophagen gebildet und hat eine enge Beziehung zum Kallikrein-Kinin-System. Es zeigt zu der Kininase II, dem Abbauenzym für Bradykinin, deutliche Homologien. Substrate für ACE sind Ang I, Enkephalin, Substanz P und Bradykinin. Bradykinin wird normalerweise von der Kininase II durch Abspaltung eines Dipeptids abgebaut. In Arealen im Myokard mit fibrotischen Gewebsumbauvorgängen scheint das ACE eher Bradykinin als Substrat zu verwenden. Außerdem besteht eine Kolokalisation von ACE- und Bradykinin-Rezeptoren in den Fibroblasten, so dass beide Enzyme direkten Einfluß auf die Funktion der Bindegewebezellen nehmen können<sup>209</sup>. Dem Bradykinin werden protektive Effekte wie z.B. Verbesserung der Endothelfunktion, Verhinderung von Neutrophilen- und Plättchenaggregation zugesprochen. Bei der dilatativen Kardiomyopathie kommt es lokal zum Verlust an protektivem Bradykinin infolge von erhöhtem Abbau, stattdessen aber zur fibrosefördernden Akkumulation von Ang II.

Endothelzellen und Fibroblasten besitzen Rezeptoren über die die Synthese von Prostaglandinen angeregt wird <sup>210</sup>. Exogen gebildete Prostaglandine wiederum modulieren in Fibroblasten die Expression und Aktivität von Kollagenasen, die für den Kollagenabbau verantwortlich sind <sup>211</sup>. Damit kommt es bei Gabe von ACE-Hemmern zur verminderten lokalen Akkumulation von Ang II und folglich zu verminderten Proliferationsstimuli und Produktion von extrazellulären Matrixproteinen. Dem wäre der Nutzen durch verminderten Abbau von Bradykinin in Bezug auf die erhöhte Kollagenegradation hinzuzufügen. Obwohl ACE laut Urata et al. <sup>208</sup> ein niedriger Stellenwert in der myokardialen Angiotensintransformation zuteil wird, scheint die lokale ACE-Distribution ein ausschlaggebendes Regulativ für die Gewebsfibrose zu sein. Dies zeigen viele tierexperimentelle Studien mit Gabe von ACE-Hemmern, die, neben den hämodynamischen Verbesserungen, vielversprechende antifibrotische Resultate bei Hypertension <sup>212,213</sup>, Infarktrealverminderung <sup>214</sup> und Herzinsuffizienz <sup>215</sup> ergaben.

Hauptursächlich für die Fibrosebildung sind die Fibroblasten, indem sie vermehrt Matrixproteine synthetisieren. Mittels Rezeptoren für Ang II und ACE regulieren sie die lokale Wundheilung im Gewebe auf autokriner und parakriner Basis <sup>216</sup>. Der aus zwei Untereinheiten (Subtypen) bestehende Ang II-Rezeptor wird neben Fibroblasten von Kardiomyozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert. Der Ang II-subtyp-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) ist verantwortlich für Vasokonstriktion, Zellhypertrophie und Zellwachstum. Er ist in der Membran lokalisiert und mit den, für Signalmodulation mitverantwortlichen, G-Proteinen gekoppelt <sup>217</sup>. In Fibroblasten kann über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor direkt die Kollagen I-Genexpression induziert werden <sup>177</sup>.

Der Gegenspieler, der Ang II-subtyp-2-Rezeptor (AT<sub>2</sub>-Rezeptor) vermittelt bei Stimulation antiproliferative und antipressorische Effekte. Zusätzlich spielt der AT<sub>2</sub>-Rezeptor eine Rolle bei Zellentwicklung und Differenzierung in fötalen Entwicklungsstadien <sup>218</sup>. Vergleichend übermittelt zunächst der AT<sub>1</sub>-Rezeptor die physiologischen Antworten auf Ang II und ist vorherrschend in der Kontrolle von Ang II-induzierten Herzmuskelfunktionen. Sun et al. konnten eine Hochregulation des Ang II und des ACE Rezeptors im Myokard im Ischämiemodell aufgrund von Wundheilungsvorgängen nachweisen <sup>219</sup>. Andere Arbeitsgruppen haben die Veränderungen der Ang II-Rezeptorverteilung weiter differenziert und fanden heraus, dass es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu gravierenden Unterschieden der Rezeptordichte kommt. So kommt es bei dilatativer Kardiomyopathie zur Verminderung der AT<sub>1</sub>-Rezeptor mRNA Expression und Dichteverteilung des Rezeptors, sowie zu einer Hochregulierung der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Genexpression <sup>220-222</sup>. Wieso es zu diesen Veränderungen kommt, bleibt weiterhin zu klären.

Möglicherweise gibt es aufgrund des Überangebots an gewebständigen Ang II eine Art "downregulation" des AT<sub>1</sub>-Rezeptors<sup>223</sup>. Zu diskutieren wäre, ob sich nicht überschüssiges Ang II an den AT<sub>2</sub>-Rezeptor bindet und damit zur Hochregulierung dieses Subtyps führt. Diese letztere Hypothese läßt sich durch in vivo Versuche mit AT<sub>1</sub>-Blockern stützen. Man fand heraus, dass bei Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors vermehrt Renin freigesetzt wird. Es erfolgt eine erhöhte Ang II Produktion, die wiederum stimuliert verstärkt den AT<sub>2</sub>-Rezeptor und verursacht so dessen Hochregulation, vor allem in Fibroblasten. Die daraus resultierenden Effekte sind negativ hämodynamischer Art und charakterisieren sich in antiproliferativen Effekten<sup>222,224-226</sup>. In Tierversuchen ließ sich nach Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ein Rückgang kardialer Hypertrophie und eine Verminderung der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen induzieren. Es wird angenommen, dass durch Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors nach AT<sub>1</sub>-Blockade, intrazellulär bestimmte Signaltransduktionswege (MAPKinasen) inhibiert werden und damit die Expression von extrazellulären Matrixproteinen vermindert wird<sup>227-229</sup>. Trotz der vielversprechenden antiproliferativen Erfolge von AT<sub>1</sub>-Blockern konnte man in in vivo Versuchen im Hundemodell mit ventrikulärer Dysfunktion und mit kardiomyopathischen Hamstern durch AT<sub>1</sub>-Blockade die Progression der Erkrankung nicht verhindern<sup>230,231</sup>. Dies bestärkt erneut die Tatsache, dass die Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie ein multifaktorielles Geschehen ist.

Neben dem fördernden Einfluß auf die Synthese von Matrixproteinen kann Ang II aktiv am Zelltod von Herzmuskelzellen beteiligt sein. Ratajska et al. zeigten im Rattenmodell die toxische Wirkung von Ang II auf Kardiomyozyten bei erhöhtem Ang II-Plasmaspiegel<sup>232</sup>. Ang II kann in Kardiomyozyten über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor Apoptose induzieren<sup>233,234</sup>. Über diesen Rezeptor kommt es über die Phospholipase C zur Aktivierung der Protein Kinase C, mit Folge der Erhöhung des intrazellulären Calciums und der erhöhten Expression des Protoonkogens c-fos<sup>235,236</sup>. Durch hohe intrazelluläre Ca<sup>++</sup> Konzentrationen lassen sich Ca<sup>++</sup>-abhängige Endonukleasen aktivieren<sup>237</sup>. Sie sind verantwortlich für die Fragmentierung der nuklearen DNS, einem typischen Prozeß im Apoptoseprogramm von Zellen. Ca<sup>++</sup> als "second messenger", bzw. Ca<sup>++</sup>-abhängige Isoformen der PKC erscheinen für die intrazelluläre Signalmodulation von Ang II wichtig. Dies unterstützen Ergebnisse von Sadoshima et al., die eine Inhibition von Protoonkogenen mittels Gabe eines Ca<sup>++</sup>-Chelators erreichten<sup>236</sup>. Die zelluläre Expression von Protoonkogenen, wie z.B. c-fos, stellt einen wichtigen Faktor in der Induktion der Hypertrophie von Kardiomyozyten dar<sup>238</sup>.

Die Hypertrophie der Kardiomyozyten repräsentiert ein wichtiges morphologisches Kriterium in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie. Hypertrophie läßt

sich durch den parakrinen Einfluß von Ang II oder TGF- $\beta_1$  induzieren. TGF- $\beta_1$  spielt in der Produktion von Kollagenen und deren Deposition im myokardialen extrazellulären Raum eine wichtige Rolle. Im Myokard führt eine kontinuierliche Expression von TGF- $\beta_1$  zur gesteigerten Kollagenproduktion und Erhöhung der extrazellulären Matrixproteine auf mRNA-Ebene in den Fibroblasten. TGF- $\beta_1$  supprimiert die bFGF- vermittelte Kollagenaseproduktion und trägt damit zur erhöhten Kollagendeposition im extrazellulären Raum bei <sup>178,239</sup>.

In Fibroblasten regulieren intrazellulär MAPKinasen über Aktivierung der PKC die Synthese von TGF- $\beta_1$  <sup>240</sup>. Die Synthese von TGF- $\beta_1$  läßt sich durch Einfluß von ACE-Inhibitoren oder Blockade des AT<sub>1</sub>-Rezeptors signifikant herunterregulieren <sup>213,227</sup>. Durch vermehrte Sekretion von Endothelin-1 (ET-1) aus Fibroblasten im Rahmen einer adrenergen Stimulation, kann die Induktion der Kardiomyozytenhypertrophie über Ang II, TGF- $\beta_1$  und MAPKinasen in den Myozyten erreicht werden <sup>241-243</sup>.

Im Tiermodell mit kardiomyopathischen Hamstern korrelieren die Plasmaspiegel von ET-1 mit der Progression bzw. dem Stadium der Erkrankung <sup>244</sup>. Man weiß aus Gewebeproben von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, dass es im Krankheitsverlauf zur Hochregulation des "endothelin-converting-enzyme" kommt <sup>245</sup>. Obwohl ein dadurch erhöhter Plasmaspiegel sowie eine erhöhte Rezeptordichte bei diesen Patienten nachgewiesen wurden, konnten bisher keine erhöhten ET-1-induzierten inotropen Effekte im Myokard gezeigt werden <sup>246</sup>. Ursächlich wird dafür ein funktioneller Defekt auf subzellulärer Ebene diskutiert.

In klinischen Studien und in Tiermodellen wird den Zytokinen neben einem profibrotischen Effekt auf Fibroblasten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der linksventrikulären Dysfunktion zugesprochen. Torre-Amione et al. konnten in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie einen erhöhten Plasmaspiegel sowie eine vergleichsweise niedrigere Rezeptordichte für TNF- $\alpha$  nachweisen <sup>247</sup>. Insgesamt nimmt die Anzahl TNF- $\alpha$ - positiver Zellen im Gewebe mit dilatativer Kardiomyopathie zu, wie aus weiterführenden immunohistochemischen Untersuchungen bekannt ist <sup>136</sup>.

In Bezug auf die gesteigerte Fibrose im DCM-Myokard zeigen Ergebnisse von Gurantz et al., dass es durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  zur Hochregulation der AT<sub>1</sub>-Rezeptordichte in Fibroblasten kommt <sup>223</sup>. Syntheseort von TNF- $\alpha$  ist dabei der Fibroblast selbst und die Makrophagen. Es kommt zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen <sup>42</sup>. Die Adhäsion von Makrophagen an Kollagenstrukturen wird über zirkulierende Adhäsionsmoleküle gefördert, die bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erhöht im Serum vorliegen <sup>49</sup>. Diese Induktion der TNF- $\alpha$  Produktion wirkt sich regulativ auf die Matrixproduktion im extrazellulären

Raum aus <sup>248</sup>. Damit ist die erhöhte Expression an TNF- $\alpha$  direkt mitverantwortlich für eine gesteigerte Kollagensynthese im Myokard.

Zusätzlich kommt es im Krankheitsverlauf der idiopathischen Kardiomyopathie zur Erhöhung von Plasmaspiegeln anderer Zytokine, z.B. dem Neopterin <sup>249</sup>. Neopterin wird in aktivierten Makrophagen synthetisiert, die es durch Stimulation mit IFN von T-Lymphozyten produzieren. Neopterin induziert die Expression von HLA-Antigenen <sup>249,250</sup>. Einzelne geschädigte Myozyten exprimieren die MHC-Antigene auf der Plasmamembran und sind somit ein Ziel für T-Zellen. Diese antikörpervermittelten zytotoxischen Mechanismen wirken stimulierend auf die Matrixproteinproduktion in Bindegewebezellen. Die gesteigerte Expression an Zytokinen ist Ausdruck einer Infektion. Gegen eine generelle Infektionskrankheit bei der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie sprechen jedoch Faktoren wie z.B. die genetische Prädisposition, die unter anderem über die HLA II-Antigene assoziiert wird <sup>251</sup>. Auch sind von der Verteilung her mehr Männer als Frauen betroffen. Männer zeigen eine erhöhte Immunantwort auf zellulärer Ebene als Frauen, diese wiederum zeigen eine bessere humorale Antwort <sup>252,253</sup>.

#### **4.4. Ischämie, Apoptose, Energiemetabolismus und Therapieansätze**

In der Literatur wird zwischen morphologischen Vorgängen der Nekrose, Onkose und Apoptose unterschieden. Der Zelltod selbst ist ein unwiderruflicher Vorgang. Zellen sterben, je nach Zellart, unmittelbar oder lange bevor morphologische Zeichen sichtbar werden. Wie der Zelltod abläuft ist meist in der Ursache begründet.

Ischämie, Hitze, Toxine oder mechanische Traumen kommen als Auslöser in Betracht und führen zu morphologischen Veränderungen, die als Onkose bzw. als Nekrose definiert werden. Untersucht man onkotische Zellen unter dem Mikroskop, so imponiert charakteristisch das Anschwellen der Zelle bei zunächst intaktem Zellkern. Infolge erhöhter Membranpermeabilität durch Versagen von Ionenpumpen kommt es zu flüssigkeitsgefüllten Plasmamembranausstülpungen, dem "blebbing". Mit der Hypertrophie der Zelle schwellen auch die Zellorganellen an, insbesondere die Mitochondrien. Eine adequate Energiebereitstellung wird nun mit Abnahme der ATP-Speicher nicht mehr gewährleistet. Die intrazellulären Proteine denaturieren. Intrazelluläre Vakuolen bilden sich. Die Zellmembran rupturiert, intrazelluläre Enzyme treten in den extrazellulären Raum. Die Zelle desintegriert aus dem Zellverband und verursacht durch Austritt lysomaler Enzyme unspezifische Entzündungsreaktionen.

Laut histopathologischer Nomenklatur werden Onkose bzw. Nekrose nicht ganz eindeutig beschrieben. Von vielen Autoren wird die Onkose mit der Nekrose synonym verwendet. Bei anderen Autoren wird der Begriff Onkose bevorzugt mit der Ischämie als Ursache verwendet. Beide Formen zeigen keine Unterschiede in den Stadien der Morphologie, Zellzahl und biochemischen Veränderungen<sup>254</sup>. Die Onkose bzw. Nekrose ist ein inaktiver Prozeß, der ausschließlich unter pathologischen Bedingungen auftritt.

Im Gegensatz zur Onkose ist die Apoptose, die bereits 1885 von Walther Flemming als Chromatolyse in Kaninchenovarien beschrieben wurde<sup>255</sup>, heutzutage auch als programmierter Zelltod oder "cell suicide" bekannt. Es ist ein aktiver, energieabhängiger Prozeß, der in der Natur u.a. physiologisch vom Körper genutzt wird, um sich entweder krankhafter oder funktionsunfähiger Zellen zu entledigen oder einen wichtigen Stellenwert in der Entwicklung von Organen bzw. Zellverbänden einnimmt<sup>30,256,257</sup>. Einmal aktiviert kann dieser Vorgang ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr rückgängig gemacht werden.

Aufgrund der Potenz dieses Vorganges, müssen erst bestimmte Signaltransduktionen durchlaufen werden, damit eine Apoptose ablaufen kann. Die Induktion erfolgt über Rezeptoren und/oder Liganden auf der Zellmembran, welche das Signal nach intrazellulär steuern. Als wichtigstes apoptoseinduzierendes Molekül sei das CD95-Rezeptor-Protein aus der TNF-Rezeptor-Familie (FAS/APO-1-Protein) genannt. Nach Aktivierung geschieht intrazellulär eine Modulation mittels zellulären Proteinen/Enzymen, an dessen Ende Cysteinproteasen, die Kaspasen, in Form von Vorläuferenzymen vorliegen und letztendlich die Fragmentierung der chromosomalen DNS induzieren<sup>258,259</sup>. Charakteristisch für die Apoptose sind die morphologischen Veränderungen, die nur mittels Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können. Dabei kommt es zur Kondensation von Kernmaterial, bei morphologisch unveränderten Mitochondrien. Es folgt die Fragmentierung der Zelle in verschiedene apoptotische Körperchen ("budding") mit jeweiliger umgebender Membran, Zellorganellen und Kernmaterial. Die Geschwindigkeit in der diese Vorgänge ablaufen, ist abhängig von der Art des Stimulus und der Zielzelle und variiert von Minuten bis Stunden<sup>257,260</sup>. Als Einheit jedoch nicht mehr lebensfähig, unterliegen diese Vesikel bald einer sekundären Nekrose<sup>257</sup>. Nun folgt die Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Endothelzellen, die als lokale Reaktion und als Antwort einen fokalen Heilungsprozeß mit Narbenbildung nach sich zieht. Dieser führt zu der schleichenden Erweiterung des extrazellulären Raumes infolge Kollagenakkumulation. Der Verlust an Kardiomyozyten durch die Koexistenz von Nekrose

bzw. Onkose und Apoptose gilt somit als ein wichtiger Faktor zur Progression der reaktiven Fibrose.

Ein weiterer wesentlicher Grund für den Zelluntergang der Kardiomyozyten wird in der chronischen Ischämie gesehen, die sich mit Progredienz der Erkrankung entwickelt. Die Ursachen für diesen Zustand liegen in der Beeinträchtigung der Mikrozirkulation infolge Anschwellen von Endothelzellen und deren Basalmembran gegenüber dem Gefäßlumen <sup>134</sup>. Figulla et al. fanden außerdem heraus, dass es bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zu einer verminderten Kapillardichte kommt <sup>261</sup>. Außerdem erschwert fibrotisches Material, welches charakteristisch für die dilatative Kardiomyopathie ist, den wichtigen Transfer bzw. die Diffusion von Sauerstoff und nutritiven Substanzen von der Kapillare zum einzelnen Kardiomyozyten <sup>262</sup>.

Hypoxie gilt als ein regulativer Faktor für die Kollagen I- Genexpression und Proliferation in Fibroblasten, das letztendlich eine hypoxische Umgebung der einzelnen Herzmuskelzellen fördert. Wichtige Proteine des Zytoskeletts wie Tubulin und Desmin oder des kontraktiles Apparates, Aktin, Myosin, Tropomyosin, Troponin T zeigen durch Einfluß von Hypoxie früh spezifische Veränderungen der Degeneration <sup>263</sup>. Daraus resultiert ein Zellschaden, der je nach Ausprägungsgrad irreversibel wird und mit dem Untergang der Zelle endet.

Neben dem Zelltod im klassischen Sinne kann Hypoxie in in vitro Versuchen Apoptose in Kardiomyozyten induzieren <sup>264</sup>. Im Rahmen der Hypoxie werden vermehrt Sauerstoffradikale produziert, die, neben ihrem zytotoxischen Effekt, eine Apoptose in den Kardiomyozyten induzieren können <sup>265</sup>. Beweise von Apoptose im humanen Gewebe bei dilatativer Kardiomyopathie und im Tiermodell konnten parallel von verschiedenen Forschergruppen erbracht werden <sup>266-268</sup>. Welchen Stellenwert die Apoptose zum Fortschreiten der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie hat, wird jedoch noch kontrovers diskutiert.

Da die Apoptose ein energieabhängiger Prozeß ist, der ein ausreichendes Energieangebot erfordert, ließ sich von einigen Arbeitsgruppen im Krankheitsverlauf der dilatativen Kardiomyopathie eine verminderte Energiebereitstellung in den myokardialen Mitochondrien infolge verringerter Kreatinkinase Aktivität mit verringertem Gehalt des ADP/ATP-Carrier Proteins auf mRNA-Ebene nachweisen. Ursächlich werden Antikörper gegen das Carrier Protein gesehen, die im Serum von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie erhöht vorkommen. Zusätzlich besteht eine Kreuzreaktivität dieser Antikörper zum Calcium-Kanal im Sarkolemm, das einen erhöhten cytotoxischen intrazellulären Kalziumeinstrom verursacht. Neben diesen molekularen Alterationen in den Kardiomyozyten liegen noch die

ultrastrukturellen Degenerationen vor, die diesen schlechten Energiemetabolismus verstärken und konsequenterweise die diastolische Funktionsstörung der Ventrikel verursacht<sup>269-273</sup>. Anderson et al. konnten bereits 1979 bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie die perivaskuläre Fibrose, sowie die Myozytolyse in inflammatorischen Arealen morphologisch nachweisen<sup>79</sup>. Damit konnte schon früh das charakteristische morphologische Substrat bei dieser Form der Herzinsuffizienz identifiziert werden.

Mit 14 bis 19% steht die dilatative Kardiomyopathie an zweiter Stelle als Ursache für die chronische Herzinsuffizienz. Mit zunehmendem Kenntnisstand über die Pathogenese des klinischen Syndroms "heart failure" sind seitdem viele Fortschritte in Bezug auf mögliche Therapieansätze zur Behandlung der Patienten gemacht worden. Die medikamentöse Therapie verfolgt zum heutigen Zeitpunkt 2 Ziele: eine Lebensverlängerung und eine Verbesserung der Lebensqualität. Die Verbesserung der Lebensqualität ergibt sich aus der Verbesserung der: klinischen Symptome, Belastbarkeit und linksventrikulären Funktion. Die Reduktion der Mortalität wird durch eine Verlangsamung des progressiven Krankheitsverlaufes erreicht. Hauptansatzpunkt ist hierbei das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das sympathische Nervensystem. ACE-Hemmer sind ein wichtiger Bestandteil in der Basistherapie der Herzinsuffizienz.

Neben den positiven hämodynamischen Effekten kommt es zur signifikanten Verminderung des ventrikulären Remodeling und zur Erhöhung der lokalen Bradykininkonzentration und letztendlich zur signifikanten Reduktion der Mortalität. Das konnte ausgiebig in tierexperimentellen und klinischen Studien gezeigt werden<sup>274-276</sup>.

Aldosteron-Antagonisten und AT<sub>1</sub>-Blocker, die ebenfalls in der Inhibition des RAAS ansetzen und damit das ventrikuläre Remodeling verlangsamen, zeigen auch gute Erfolge in der Reduktion von Mortalität und Progression bei herzinsuffizienten Patienten<sup>277,278</sup>. Therapien, die das vaskuläre und kardiale Reninsystem hemmen, profitieren aus der signifikanten Reduktion der Fibrosebildung im Myokard, indem die Stimulation extrazellulärer Matrixproteine in glatten Muskelzellen, Fibroblasten und die Entstehung von Apoptose von Kardiomyozyten verhindert wird<sup>279,280</sup>. Ein weiterer wichtiger Nebeneffekt unter der ACE-Hemmer- und AT<sub>1</sub>-Blockertherapie ist das Ausbleiben einer reflektorischen Sympathikusaktivierung. Die  $\beta$ -Blockade ist ein weiterer wichtiger Therapiebestandteil der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz. Obwohl anfangs kontrovers diskutiert, konnten deutliche Reduktionen in der Mortalität, insbesondere des plötzlichen Herztodes bei Multicenter-Studien (CIBIS II- und MERIT-HF- Studie) nachgewiesen werden<sup>281,282</sup>.

Die Gabe von Vasopeptidaseinhibitoren ist ein weiterer Ansatzpunkt in der zukünftigen Herzinsuffizienztherapie, da es bei diesen Patienten zu veränderten Plasmaspiegeln des Atrialen-Natriuretischen-Peptids kommt <sup>283,284</sup>.

In Tierversuchen mit dem Chymaseninhibitor Chymostatin konnte eine Arbeitsgruppe aus den Vereinigten Staaten zeigen, dass kardiale Chymasen eine zusätzliche regulative Rolle in der Induktion der Fibrosebildung spielen, und geben damit zugleich einen Denkansatz für weitere therapeutische Möglichkeiten <sup>285</sup>.

Als weitere Möglichkeit seien Endothelin-Antagonisten zu erwähnen, deren cardioprotektiven Effekte genutzt werden können <sup>286</sup>.

Neue Denkansätze bietet auch die Behandlung mit Wachstumshormonen, wie es eine Berliner und eine Schweizer Arbeitsgruppe darlegt <sup>287,288</sup>. Diese Applikationen sind jedoch im Stadium von Phase II-Studien und erfordern noch weitere Beobachtung.

Letztendlich definiert sich die Prognose und Verlauf der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie über die Progression der Fibrosebildung und über den Zeitpunkt der Diagnosestellung und damit mit dem Beginn der Herzinsuffizienztherapie. Die gegenwärtige medikamentöse Therapie hat in der Kombination der einzelnen Medikamente gute Ansatzpunkte gefunden, dieses ventrikuläre Remodeling zu reduzieren und den Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität zu gewährleisten. Jedoch liegt die Mortalität weiterhin in einem nicht zufriedenstellenden Bereich. Da die Anamnese bei den Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie häufig mit einer positiven Familienanamnese vergesellschaftet ist, bleiben im Zeitalter der Gentechnik, -forschung noch weitere Therapiemöglichkeiten offen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Richardson P, McKenna W, Bristow M. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology on the Definition of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842.
2. Norman M, McKenna W. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Perspectives on disease. *Z Kardiol*. 1999;88:550-554.
3. Wynne J, Braunwald E. The Cardiomyopathies and Myocarditis. In: Braunwald E, ed. *Heart disease - a textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997:1404-1463.
4. Maisch B. Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC Task Force - Mehr Fragen als Antworten? *Med Klin*. 1998;93:199-209.
5. Grünig E, Brown B, Franz W, Zehelein J, Rottbauer W, Frey N, Scheffold T, Katus H. Klinik und Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie. *Z Kardiol*. 1984;Suppl. 4:39-48.
6. Abelmann W. Cardiomyopathies and inflammatory disorders. *Curr Opinion Cardiol*. 1992;7:417-421.
7. Grünig E, Brown B, Franz W, Zehelein J, Rottbauer W, Frey N, Scheffold T, Kattus H. Prognosis and clinical course of dilative cardiomyopathy. *Z Kardiol*. 1995;84:39-48.
8. Schultz K, Becker B, Schultheiss H. Antibodies to the ADP/ATP carrier, an auto antigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy, penetrate into myocardial cells and disturb energy metabolism in vivo. *Circ Res*. 1989;64:183-192.

9. Schaper J, Froede R, Buck A, Bleese N. Impaired myocardial ultrastructure and cytoskeleton in cardiomyopathic human myocardium. In: Schultheiß H, ed. *New concepts in viral heart disease*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1988:295-302.
10. Tashiro A, Masuda T, Segawa I. Morphometric comparison of mitochondria and myofibrils of cardiomyocytes between hypertrophic and dilated cardiomyocytes. *Virchow Archiv A Pathol Anat*. 1990;416:473-478.
11. Tomita T, Wilson L, Chiga M. Idiopathic dilated cardiomyopathy - an evidence of abnormal lipid accumulation. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1990;3:81-85.
12. Rochael M, de Lourdes Higuchi M, Lopes E. Bizarre nuclei of myocardial fibers in an infant with dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1990;3:312-324.
13. Wiegand V, Ebecke M, Figulla H, Schüler S, Kreuzer H. Structure and function of contractile proteins in human dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol*. 1989;12:656-660.
14. Schaper J, Speiser B, Brand T. The cytoskeleton and the extracellular matrix in human hearts with dilated cardiomyopathy. In: Figulla H, ed. *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1993:75-80.
15. Hein S, Schaper J. The cytoskeleton of cardiomyocytes is altered in the failing human heart. *Heart Failure*. 1996;12:128-132.
16. Heling A, Zimmermann R, Kostin S, Maeno Y, Hein S, Devaux B, Bauer E, Kloevekorn W, Schlepper M, Schaper W, Schaper J. Increased Expression of Cytoskeletal, Linkage, and Extracellular Proteins in Failing Human Myocardium. *Circ Res*. 2000;86:846-853.
17. Peters N. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci*. 1996;90:447-452.

18. Dodge S, Beardslee M, Darrow B, Green K, Beyer E, Saffitz J. Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:800-807.
19. Schadewaldt H. Herzpolypen. In: Werner, Schramm, eds. *Das Herz - ein Rätsel für die antike und mittelalterliche Medizin.* Wiesbaden: Brandstetter Druckerei GmbH & Co. KG; 1989:94-99.
20. Weber K. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Col Cardiol.* 1989;113:1637-1652.
21. Wynne J, Braunwald E. In: Braunwald E, ed. *Heart disease - a textbook of cardiovascular medicine.* Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997.
22. Laemmli V, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage TU I. DNA package events. *J Mol Biol.* 1973;80:575-599.
23. Diener W. Veränderungen der Kern-Zytoplasmarelation und andere degenerative Veränderungen bei dilatativer Kardiomyopathie. In: *Fachbereich Humanmedizin.* Giessen: Justus-Liebig-Universität Giessen; 1994.
24. Wiener J, Giacomelli F, Loud A, Anversa P. Morphometry of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension. *Am J Cardiol.* 1979;44:919-929.
25. Anversa P, Vitali-Mazza L, Visioli O, Marchetti G. Experimental cardiac hypertrophy: a quantitative ultrastructural study in the compensatory stage. *J Mol Cell Cardiol.* 1971;3:213-227.
26. Frank J, Langer G. The myocardial interstitium: it`s structure and it`s role in ionic exchange. *J Cell Biol.* 1974;60:586-601.
27. Kalman F, Viragh S, Modis L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat & Embryol.* 1995;191:451-464.

28. Sanchez-Quintana D, Garcia-Martinez V, Macias D, Hurle J. Structural arrangement of the extracellular matrix network during myocardial development in the chick embryo heart. *Anat Embryol.* 1991;184:451-460.
29. Borg T, Terracio L. Interaction of the extracellular matrix with cardiac myocytes during development and disease. In: Robinson T, Kinne RKH, ed. *Cardiac myocyte-connective tissue interactions in health and disease.* Basel: Karger; 1990:113-129.
30. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reis K, Krajewski S, Reed J, Quaini F, Sonnenblick E, Anversa P. Programmed cell death and the expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res.* 1995;219:110-121.
31. Pelouch V, Dixon I, Golfman L, Beamish R, Dhalla N. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 1994;129:101-120.
32. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Kapitel 14: Zell-Zell-Adhäsion, Zellverbindungen und die extrazelluläre Matrix. In: *Molecular biology of the cell - 2nd Edition.* New York: Garland Publishing Inc.; 1990:960-961.
33. Yurchenco P, Schittny J. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990;4:1577-1590.
34. Suzu S, Inaba T, Yanai N, Kawashima T, Yamada N, Oka T, Machinami R, Ohtsuki T, Kimura F, Kondo S, Torikata C, Nagata N, Motoyoshi K. Proteoglycan form macrophage colony-stimulating factor binds low density lipoprotein. *J Lab Invest.* 1994;94:1637-1641.
35. Raats C, van den Born J, Berden J. Glomerular heparan sulfate alterations: Mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* 2000;57:385-400.

36. Iida J, Meijne A, Knutson J, Furcht L, McCarthy J. Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumor cell adhesion, motility and invasion. *Semin Cancer Biology*. 1996;7:155-162.
37. Dubaybo B, Thet L. Effect of transforming growth factor beta on synthesis of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts. *Exp Lung Res*. 1990;16:389-403.
38. Shi Y, Niculescu R, Wang D, Ormont M, Magno M, San Antonio J, Williams K, Zalewski A. Myofibroblast involvement in glycosaminoglycan synthesis and lipid retention during coronary repair. *J Vasc Res*. 2000;37:399-407.
39. Weihrauch D, Zimmermann R, Arras M, Schaper J. Expression of extracellular matrix proteins and the role of fibroblasts and macrophages in repair processes in ischemic porcine myocardium. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40:105-116.
40. Gordon M, Riley G, Watt S, Greaves M. Compartmentalization of haematopoietic growth factors (GM-CSF) by glykosaminoglycans in the bone marrow micronenvironment. *Nature*. 1987;326:403-405.
41. San Antonio J, Karnovsky M, Gay S, Sanderson R, Lander A. Interactions of syndecan-1 and heparin with human collagens. *Glycobiology*. 1994;4:327-332.
42. Jordana M, Särnstrand B, Sime P, Ramis I. Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *Eur Respir J*. 1994;7:2212-2222.
43. Colin S, Jeanny J, Mascarelli F, Vienet R, Al-Mahmood S, Courtois Y, Labarre J. In Vivo Involvement of Heparan Sulfate Proteoglycan in the Bioavailability, Internalization, and Catabolism of Exogenous Basic Fibroblast Growth Factor. *Mol Pharm*. 1999;1:74-82.
44. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991;5:2814-2823.

45. Vuorio E, de Combrughe B. The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:837-872.
46. Laurent G. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol.* 1987;252:C1-C9.
47. Eghbali-Webb M. Cardiac fibroblasts. In: Eghbali-Webb M, ed. *Molecular biology of collagen matrix in the heart.* Austin, Tx.: R.G. Landes Company; 1995:23-40.
48. Plenz G, Song Z, Tjan T, Koenig C, Baba H, Erren M, Flesch M, Wichter T, Scheld H, Deng M. Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2001;3:415-21.
49. Klein R, Breuer R, Mundhenke M, Schwartzkopff B, Strauer B. Zirkulierende Adhäsionsmoleküle (cICAM-1, cVCAM-1) bei Patienten mit Verdacht auf entzündliche Herzmuskelerkrankungen. *Z Kardiol.* 1998;87:84-93.
50. Borg T, Caulfield J. Collagen in the heart. *Tex Rep Biol Med.* 1979;39:321-333.
51. Borg T, Terracio L. Interaction of the myocytes during development and disease. In: Robinson T, Kinne R, eds. *Cardiac myocyte-connective tissue interactions in health and disease.* Basel: Karger AG; 1990:113-129.
52. Campbell S. Collagen matrix in the heart. In: Eghbali-Webb M, ed. *Molecular biology of collagen matrix in the heart.* Austin, Tx.: R.G. Landes Company; 1995:1-21.
53. Robinson T, Cohen-Gould L, Factor S, Eghbali M, Blumenfeld O. Structure and function of connective tissue in cardiac muscle. Collagen types I and III in endomysial struts and pericellular fibers. *Scan Micros.* 1988;2:1005-1015.

54. Mercier I, Lechaire J, Desmouliere A, Gaill F, Aumailley M. Interactions of human skin fibroblasts with monomeric or fibrillar collagens induce different organization of the cytoskeleton. *Exp Cell Res.* 1996;225:245-256.
55. Eghbali M, OO B, Seifter S, Buttrick P, Leinwand L, Robinson T, Zern M, MA G. Localization of types I, III, IV collagen mRNAa in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:103-113.
56. Jensen L, Høst N. Collagen: scaffold for repair or execution. *Cardiovasc Res.* 1997;33:535-539.
57. Eghbali M, Czaja M, Zeydel M, Weiner F, Zern M, Seifter S, Blumenfeld O. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20:267-276.
58. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertension.* 1991;9:17-22.
59. Mao J, Bristow J. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *JCI.* 2001;107:1063-1069.
60. Johnson R, Manasek F, Vinson W. The biochemical and ultrastructural demonstration of collagen during early heart development. *Dev Biol.* 1974;36:252-271.
61. Jackson M, Connell M, Smith A. Development of the collagen network of the human fetal myocardium: an immunohistochemical study. *Int J Cardiol.* 1993;41:77-86.
62. Marijjanowski M, van der Loos C, Mohrschladt M. The neonatal heart has a relatively high content of total collagen and type I collagen, a condition that may explain the less compliant state. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23:1204-1208.

63. Carver W, Nagpal M, Nachtigal M, Borg T, Terracio L. Collagen expression in mechanically stimulated fibroblasts. *Circ Res.* 1991;69:116-122.
64. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck P, Kuhl U, Schultheiss H. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation.* 1999;99:2750-2756.
65. Heneghan M, Malone D, Dervan P. Myocardial collagen network in dilated cardiomyopathy; morphometry and scanning electron microscopy. *IJMS.* 1991;160:399-401.
66. Capasso J, Robinson T, Anversa P. Alterations in collagen cross-linking impair myocardial contractility in the mouse heart. *Circ Res.* 1989;65:1657-1664.
67. Weber K, Pick R, Janicki J, Gadodia G, Lakier J. Inadequate collagen tethers in dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 1988;116:1641-1646.
68. Iimoto D, Covell J, Harper E. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ Res.* 1988;63:399-408.
69. Okada H, Kawaguchi H, Kudo T, Sawa H, Okamoto H, Watanabe S, Urasawa K, Murakami T. Alteration of extracellular matrix in dilated cardiomyopathic hamster heart. *Mol Cell Biochemistry.* 1996;156:9-15.
70. Komamura K, Shannon R, Ihara T, Shen Y, Mirsky I, Bishop S, Vatner S. Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. *Am J Physiol.* 1993;265:H1119-H1131.
71. Bing O, Ngo H, Humphries D, Robinson K, Lucey E, Carver W, Brooks W, Conrad C, Hayes J, Goldstein R. Localization of  $\alpha(1)$  collagen mRNA in Myocardium from spontaneously hypertensive rat during transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2335-2344.

72. Kitamura M, Shimizu M, Ino H, Okeie K, Yamaguchi M, Funjio N, Mabuchi H, Nakanishi I. Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the significance of type III and VI collagens. *Clin Cardiol.* 2001;24:325-329.
73. Tyagi S, Kumar S, Voelker D, Reddy H, Janicki J, Curtis J. Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. *J Cell Biochem.* 1996;63:185-198.
74. Spinale F, Coker M, Bond B, Zellner J. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 2000;46:225-238.
75. Li Y, McTiermann C, Pei W, Moravec C, Wang P, Rosenblum W, Kormos R, Feldmann A. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation.* 2001;104:1147-1152.
76. Spinale F, Coker M, Heung L, Bond B, Gunasinghe H, Etoh T, Goldberg A, Zellner J, Crumbley A. A Matrixproteinase Induction/Activation System Exists in the Human Left Ventricular Myocardium and Is Upregulated in Heart Failure. *Circulation.* 2000;102:1944-1949.
77. Weber K, Brilla C. Factors associated with reactive and reparative fibrosis of the myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1992;87:291-301.
78. Beltrami C, Finato N, Rocco M, Feruglio G, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick E, Olivetti G, Anversa P. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 1994;89:151-163.
79. Anderson K, Sutton M, Lie J. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol.* 1979;128:79-85.

80. Swan H. Left ventricular dysfunction in ischemic heart disease: fundamental importance of the fibrous matrix. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1994;8:305-312.
81. Betocchi S, Hess O, Losi M, Nonogi H, HP K. Regional left ventricular mechanics in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1993;88:2206-2214.
82. Sanes J, Engvall E, Butkowski R, Hunter D. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol.* 1990;111:1685-1699.
83. He Q, Spiro M. Isolation of Rat Heart Endothelial Cells and Pericytes: Evaluation of their Role in the Formation of Extracellular Matrix Components. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1173-1183.
84. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Chapter 19: cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *Molecular biology of the cell - 3rd Edition.* New York: Garland Publishing Inc.; 1994:949-1011.
85. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1991;83:504-514.
86. Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The Cytoskeleton and Related Proteins in the Human Failing Heart. *Heart Failure Reviews.* 2000;5:271-280.
87. Ohsato K, Shimizu M, Sugihara N, Ino H, Yoshido H, Takagi Y, Takeda R. Type IV collagen in hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Heart J.* 1994;35:311-321.
88. Chung E, Rhodes R, Miller E. Isolation of three components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;71:1167-1174.
89. Bashey R, Martinez-Hernandez A, Jimenez S. Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. *Circ Res.* 1992;70:1006-1017.

90. Engel J, Furthmayr H, Odermatt E, von der Mark H, Aumailley M, Fleischmajer R, Timpl R. Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Ann New York Academy of Sci.* 1985;460:25-37.
91. Hesse H, Engvall E. Type VI collagen. *J Biol Chem.* 1984;259:3955-3961.
92. Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 1998;294:449-460.
93. Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes H, Timpl R. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp Cell Res.* 1993;206:167-176.
94. Rand J, Wu X, Potter B, Uson R, Gordon R. Co-localization of von Willebrand factor and type VI collagen in human vascular subendothelium. *Am J Pathol.* 1993;142:843-850.
95. Kitten G, Kolker S, Krob S, Klewer S. Type VI collagen in the cardiac valves and connective tissue septa during heart development. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29:1189-1193.
96. Davies G, Howard C, Farrer M, Colemann M, Bennett L, Cullen L, Wyse R, Burn J, Williamson R, Kessling A. Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). *Ann Hum Genet.* 1995;59:253-269.
97. Bonaldo P, Braghetta P, Zanetti M, Piccolo S, Volpin D, Bressan G. Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for the Bethlem myopathy. *Hum Mol Genet.* 1998;7:2135-2140.
98. Spiro M, Kumar B, Crowley T. Myocardial glycoproteins in diabetes: type VI collagen is a major PAS-reactive extracellular matrix protein. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24:397-410.

99. Wolf J, Carsons S. Distribution of type VI collagen expression in synovial tissue and cultured synoviocytes: relation to fibronectin. *Ann Rheum Diseases*. 1991;50:493-496.
100. Kittelberger R, Davis P, Stehbens W. Type VI collagen in experimental atherosclerosis. *Experientia*. 1990;46:264-267.
101. Trüb B, Schreier T, Bruckner P, Winterhalter K. Type VI collagen represents a major fraction of connective tissue collagens. *Eur J Biochem*. 1987;166:699-703.
102. Hynes R. Methods for identification of fibronectins. In: Hynes R, ed. *Fibronectins*. New York: Springer; 1990:7-23.
103. Hynes R. Introduction and historical overview. In: Hynes R, ed. *Fibronectins*. New York: Springer; 1990:1-5.
104. Hynes R, Yamada K. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982;95:369-377.
105. Ahumada G, Saffitz J. Fibronectin in rat heart: a link between cardiac myocytes and collagen. *J Histochem Cytochem*. 1984;32:383-388.
106. Ratajska A, Campbell S. Fibronectin Accumulation within Cardiac Myocytes in Rats with Elevated Plasma Angiotensin II. *Cardiovasc Pathol*. 1995;4:57-67.
107. Matsubara H, Moriguchi Y, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Uchiyama-Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Nose-Fujiyama A, Iba S, Tateishi E, Iwasaka T. Transactivation of EGF receptor by angiotensin II regulates fibronectin and TGF-beta gene expression via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Mol Cell Biochem*. 2000;212:187-201.
108. Booz G, Baker K. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995;30:537-543.

109. Chen M, Lam A, Abraham J, Schreiner G, Joly A. CTGF expression is induced by TGF-beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:1805-1819.
110. Farhadian F, Contard F, Sabri A, Samuel J, Rappaport L. Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 1996;32:433-442.
111. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel J. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:981-990.
112. Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Lehto M, Vuorio E. Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. *Lab Invest.* 1991;64:76-84.
113. Casscells W, Kimura H, JA S, Yu Z, Ferrans V. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 1990;137:801-810.
114. Barnes J, Hastings R, de la Garza M. Sequential expression of cellular fibronectin by platelets, macrophages, and mesangial cells in proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 1994;145:585-597.
115. Clark R, Quinn JI, Winn H, Lanigan J, Dellepella P, Colvin R. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J Exp Med.* 1982;156:646-651.
116. Hynes R. Wound healing, inflammation, and fibrosis. In: Hynes R, ed. *Fibronectins.* New York: Springer; 1990:349-364.
117. Ehrig K, Leivo I, Argraves W, Ruoslathi E, Engvall E. Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:3264-3268.

118. Campbell K. Three muscular dystrophies: loss of cytoskelton-extracellular matrix linkage. *Cell*. 1995;80:675-679.
119. Yurchenco P, Tsilibary E, Charonis A, Furthmayr H. Laminin polymerization in vitro: evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem*. 1985;260:7636-7644.
120. Timpl R, Fujiwara S, Dziadek M, Aumailley M, Weber S, Engel J. Laminin, proteoglycan, nidogen and collagen IV, structural models and molecular interactions. *Ciba Foundation Symposium*. 1994;108:25-43.
121. Dziadek M. Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development. *Experientia*. 1995;51:901-913.
122. Perris R, Brandenberger R, Chiquet M. Differential neural crest cell attachment and migration on avian laminin isoforms. *Int J Dev Neurosci*. 1996;14.
123. Bilozur M, Hay E. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Developmental Biology*. 1988;125:19-33.
124. Terranova V, Aumailley M, Sultan L, Martin G, Hk K. Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin. *J Cell Physiol*. 1986;127:473-479.
125. Noel A, Calle A, Emonard H, Nusgens B, Foidart J, Lapiere C. Antogonistic effects of laminin and fibronectin in cell-to-cell and cell-to-matrix interactions in MCF-7 cultures. *In vitro Cell Dev Biol*. 1988;24:373-380.
126. Hedin U, Bottger B, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1988;107:307-319.

127. Hierck B, Poelmann R, Vaniperen L, Brouwer A, Gittenbergerdegroot A. Differential expression of alpha-6 and other subunits of laminin binding integrins during development of the murine heart. *Dev Dyn.* 1996;206:100-111.
128. Severs N. The cardiomyocyte in tissue and in the isolated state. In: Piper H, Isenberg G, eds. *Isolated adult cardiomyocytes - volume I - structure and metabolism.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989:4-41.
129. Danowski B, Imanaka-Yoshida K, Sanger J, Sanger J. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol.* 1992;118:1411-1420.
130. Milei J, Sánchez J, Storino R, Yu Z, Denduchis B, Ferrans V. Antibodies to laminin and immunohistochemical localization of laminin in chronic chagasic cardiomyopathy: a review. *Mol Cell Biochem.* 1993;129:161-170.
131. Wolff P, Kuhl U, Schultheiss H. Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J.* 1989;117:1309-1309.
132. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, Pacher R, Grimm M, Pribill I, Eichler H, Glogar H. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol.* 1995;75:913-918.
133. Becker A, Heijmanns C, Essed C. Chronic non-ischemic congestive heart disease and endomyocardial biopsies. Worth the extra? *Eur Heart J.* 1991;12:218-223.
134. Suzuki H, Takeyama Y, Koba S, Suwa Y, Matsubara H, Murakami M, Katagiri T, Nakai Y. Comparative study of ultrastructural changes in blood capillaries among microvessel angina, hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Electron Microsc.* 1991;24:4-5.

135. Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang M, Miyamoto T, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation*. 1999;100:1443-1449.
136. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Kloevekorn W, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18:470-479.
137. Tsilibary E, Koliakos G, Charonis A, Vogel A, Reger L, Furcht L. Heparin type IV collagen interactions: equilibrium binding and inhibition of type IV collagen self-assembly. *J Biol Chem*. 1998;263:19112-19118.
138. Joester A, Faissner A. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol*. 2001;20:13-22.
139. Erickson H, Inglesias J. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature*. 1984;311:267-269.
140. Lightner V. Tenascin: does it play a role in epidermal morphogenesis and homostasis. *J Invest Dermatol*. 1994;102:273-277.
141. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*. 1995;51:853-862.
142. Bristow J, Tee M, Gitelman S, Mellon S, Miller W. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol*. 1993;122:265-278.
143. Burch G, Bedolli M, McDonough S, Rosenthal S, Bristow J. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn*. 1995;203:491-504.

144. Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Nishikawa T, Ishiyama S, Shimojo T, Ohta Y, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodelling after myocardial infarction. *Lab Invest.* 2001;81:1015-1024.
145. Hurle J, Garcia-Martinez V, Ros M. Immunofluorescent localization of tenascin during morphogenesis of the outflow tract of the chick embryo heart. *Anat Embryol.* 1990;181:149-155.
146. Burch G, Gong Y, Liu W, Dettmann R, Curry G, Smith L, Miller W, Bristow J. Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat Genet.* 1997;17:104-108.
147. Schalkeijk J, Zweers M, Steijlen P, Dean W, Taylor G, van Vlijmen I, van Haren B, Miller W, Bristow J. A recessive form of the Ehlers-Danlos Syndrome caused by Tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001;345:1167-75.
148. Yamamoto K, Dang Q, Kennedy S, Osathanondh R, Kelly R, Lee R. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 1999;274:21840-6.
149. Akimoto Y, Obinata A, Endo H, Hirano H. Immunohistochemical study of basement membrane reconstruction by an epidermis-dermis recombination experiment using cultured chick embryonic skin: introduction of tenascin. *J Histochem Cytochem.* 1992;40:1129-1137.
150. Luomanen M, Virtanen I. Distribution of tenascin in healing incision, excision and laser wounds. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:41-45.
151. Lightner V, Gumkowski F, Bigner D, Erickson H. Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy. *J Cell Biol.* 1989;108:2483-2493.

152. Deckner M, Lindholm T, Cullheim S, Risling M. Differential Expression of Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin/J1, and Tenascin-X in Spinal Cord Scar Tissue and in the Olfactory System. *Exp Neurol.* 2000;166:350-362.
153. Hashimoto K. Overexpression of tenascin in scleroderma skin. *Mie Med J.* 1991;41:31-40.
154. Betz P, Nerlich A, Tuebel J, Penning R, Eisenmenger W. Localization of tenascin in human skin wounds - an immunohistochemical study. *Int J Legal Med.* 1993;105:325-328.
155. Chilosi M, Lestani M, Benedetti A, Montagna L, Pizzolo G, Semenzato G. Constitutive expression of tenascin in T-dependent zones of human lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 1993;143:1348-1355.
156. Ikuta T, Ariga H, Matsumoto K. Extracellular matrix tenascin-X combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation. *Genes Cells.* 2000;5:913-927.
157. Joshi P, Chung C, Aukhil I, Erickson H. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-loke terminal knob of tenascin. *J Cell Sci.* 1993;106:389-400.
158. Sriamarao P, Mendler M, Bourdon M. Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Cell Sci.* 1993;105:1001-1012.
159. Saginati M, Siri A, Balza E, Ponassi M, Zardi L. A simple procedure for tenascin purification. *Eur J Biochem.* 1992;205:545-549.
160. Mackie E, Scott-Burden T, Hahn A, Kern F, Bernhardt J, Regenass S, Weller A, Bühler F. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol.* 1992;141:377-388.

161. Hahn AW, Resink T, Kern F, Bühler F. Peptide vasoconstrictors, vessel structure, and vascular smooth-muscle proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22:S37-S43.
162. Sharifi B, LaFleur D, Pirola C, Forrester J, Fagin J. Angiotensin II regulates tenascin gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1992;267:23910-5.
163. End P, Panayoto G, Entwistle A, Waterfield M, Chiquet M. Tenascin: a modulator of cell growth. *Eur J Biochem.* 1992;209:1041-1051.
164. Kim H. Expression of intermediate filament desmin and vimentin in the human fetal heart. *Anat Rec.* 1996;246:271-278.
165. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Chapter 16: the cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell - 3rd Edition.* New York: Garland Publishing Inc.; 1994:796-803.
166. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 1980;283:249-256.
167. Beuttenmüller M, Chen M, Janetzko A, Kuhn S, Traub P. Structural elements of the amino-terminal head domain of vimentin are essential for intermediate filament formation in vivo and in vitro. *Exp Cell Res.* 1994;213:128-142.
168. Katsumoto T, Mitsushima A, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biology of the Cell.* 1990;68:139-146.
169. Green K, Goldman R. Evidence for an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Cell Mot Cytoskeleton.* 1986;6:389-405.

170. Friedl P, Bröcker E. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:41-64.
171. Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg H, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res.* 2000;46:463-475.
172. Dubey R, Gillespie D, Mi Z, Jackson E. Endogenous cyclic AMP-adenosine pathway regulates cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* 2001;37:1095-1100.
173. Preeta R, Nair R. Superoxide anions mediate proliferative response in cardiac fibroblasts. *Indian J Med Res.* 2000;2000:127-132.
174. van Eickels M, Vetter H, Grohe C. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition attenuates insulin-like growth factor (IGF-I) induced cardiac fibroblast proliferation. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1592-1596.
175. Bhambi B, Eghbali M. Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment. *Am J Pathol.* 1991;139:1131-1142.
176. Villarreal F, Kim N, Ungab G, Printz M, Dillmann W. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation.* 1993;88:2849-2861.
177. Crabos M, Roth M, Hahn A, Erne P. Characterization of Angiotensin II Receptor in Cultured Adult Cardiac Fibroblasts. *J Clin Invest.* 1994;93:2372-2378.
178. Chua C, Chua B, Zhao Z, Diglio C, Perrin E. Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 1991;26:271-281.

179. Weber K, Sun Y, Campbell S. Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart.* 1995;16 Suppl N:12-18.
180. Hameed A, Hruban R, Gage W, Pettis G, Fox Wr. Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Hum Pathol.* 1994;25:872-876.
181. Holness C, Simmons D. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood.* 1993;81:1607-1613.
182. Strobl H, Scheinecker C, Csmarits B, Majdic O, Knapp W. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br J Haematol.* 1995;90:774-782.
183. Saito N, Pulford K, Breton-Gorius J, Masse J, Mason D, Cramer E. Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *Am J Pathol.* 1991;139:1053-1059.
184. Hameed A. What does CD68 in activated lymphocytes mean ? *H Pathol.* 1995;26:1285-1286.
185. Ramprasad M, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrophage and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:14833-14838.
186. de Lourdes Higuchi M, de Moraes C, Sambiasi N, Pereira-Baretto A, Bellotti G, Pileggi F. Histopathological criteria of myocarditis - a study based on normal heart, chagasic heart and dilated cardiomyopathy. *Jap Circ J.* 1990;54:391-400.
187. Kühl U, Daun B, Seeberg B, Schultheiss H, Strauer B. Dilatative Kardiomyopathie - eine chronische Myokarditis? *Herz.* 1992;17:97-106.

188. Nicoletti A, Heudes D, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, Michel J. Inflammatory cells and myocardial fibrosis - spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1996;32:1096-1107.
189. Schaper J, Hein S, Scholz D, and Mollnau H. Multifaceted morphological alterations are present in the failing heart. *1995.* 1995;27:857-861.
190. Scholz D, Diener W, Schaper J. Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience.* 1994;5:127-138.
191. Klima M, Burns T, Chopra A. Myocardial fibrosis in the elderly. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114:938-942.
192. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse M, Boege F. Autoantibodies Activating Human  $\beta_1$ -Adrenergic Receptors are Associated with Reduced Cardiac Function in Chronic Heart Failure. *Circulation.* 1999;99:646-654.
193. Wallukat G, Nissen E, Morwinski R, Müller J. Autoantibodies against  $\beta$ - and Muscarinic Receptors in Cardiomyopathy. *Herz.* 2000;25:261-266.
194. Khamssi M, Brodde O. The role of cardiac beta1- and beta2-adrenoreceptor stimulation in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:S133-7.
195. Schofer J, Bartels C, Hölscher D, Lierse W, Mathey D, Reimitz P, Tews A. Morphologische Befunde bei der dilatativen Kardiomyopathie und ihre Beziehung zur Hämodynamik und zu den Katecholaminkonzentrationen im Plasma und Myokard. *Z Kardiol.* 1990;79:302-307.
196. Doughty R, Sharpe N. Beta-adrenergic blocking agents in the treatment of congestive haert failure: mechanisms and clinical results. *Annu Rev Med.* 1997;48:103-114.

197. Struthers A. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail.* 1996;2:47-54.
198. Lombès M, Oblin M, Gasc J, Baulieu E, Farman N, Bonvalet J. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res.* 1992;71:503-510.
199. Meyer IW, Nicholls N. Mineralocorticoid binding in cultured smooth muscle cells and fibroblasts from rat aorta. *J Steriod Biochem.* 1981;14:1157-1168.
200. Ikeda U, Hyman R, Smith T, Medford R. Aldosterone-mediated regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem.* 1991;266:12058.
201. Brilla C, Zhou G, Matsubara L, Weber K. Collagen metabolism in cultured adult cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:809-20.
202. Fullerton M, Funder J. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1863-1867.
203. Köhler E, Bertschin S, Woodtli T, Resink T, Erne P. Does aldosterone-induced cardiac fibrosis involve direct effects on cardiac fibroblasts. *J Vasc Res.* 1996;33:315-326.
204. Wakisaka M, He Q, Spiro M, Spiro R. Glucose entry into rat mesangial cells is mediated by both Na<sup>(+)</sup>-coupled and facilitative transporters. *Diabetologia.* 1995;1995:291-297.
205. Spiro M, He Q, D'Autilia M. Effect of high glucose on formation of extracellular matrix components by cultured rat heart endothelial cells. *Diabetologia.* 1995;38:430-436.

206. Sun Y, Ratajska A, Zhou G, Weber K. Angiotensin-converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. *J Lab Clin Med.* 1993;122:395-403.
207. Urata H, Boehm K, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus F, Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest.* 1993;91:1269-81.
208. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. *Eur Heart J.* 1995;16:79-85.
209. Sun Y, Ratajska A, Weber K. Bradykinin Receptor and Tissue ACE Binding in Myocardial Fibrosis: Response to Chronic Angiotensin II or Aldosterone Administration in Rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:813-822.
210. Conklin B, Burch R, Steranka L, Axelrod J. Distinct bradykinin receptors mediate stimulation of prostaglandin synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;244:646-649.
211. Goshowaki H, Ito A, Mori Y. Effects of prostaglandins on the production of collagenase by rabbit uterine cervical fibroblasts. *Prostaglandins.* 1988;36:107-14.
212. Nagasawa K, Zimmermann R, Munkel B, Linz W, Schölkens B, Schaper J. Extracellular matrix deposition in hypertensive hearts - Antifibrotic effects of ramipril. *Eur Heart J.* 1995;16:33-37.
213. Zimmermann R, Kastens J, Linz W, Wiemer G, Schölkens B, Schaper J. Effect of Long-term ACE Inhibition on Myocardial Tissue in Hypertensive Stroke-prone Rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1447-1456.
214. Zhu Y, Zhu Y, Gohlke P, Stauss H, Unger T. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1997;80:110A-117A.

215. Ryoike T, Gu Y, Mao L, Hongo M, Clark R, Peterson K, Ross JJ. Progressive Cardiac Dysfunction and Fibrosis in the Cardiomyopathic Hamster and Effects of Growth Hormone and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Circulation*. 1991;100:1734-1743.
216. Sun Y, Ramires F, Zhou G, Ganjamin V, Weber K. Fibrous Tissue and Angiotensin II. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2001-2012.
217. Chung O, Unger T. Pharmacology of angiotensin receptors and AT1 receptor blockers. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:15-23.
218. Grady E, Sechi L, Griffin C, Schambelan M, Kalinyak J. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest*. 1991;88:921-33.
219. Sun Y, Weber K. Cells expressing angiotensin II receptors in fibrous tissue of rat heart. *Cardiovasc Res*. 1996;31:518-525.
220. Haywood G, Gullestad L, Katsuya T, Hutchinson H, Pratt R, Horiuchi M, Fowler M. AT1 and AT2 Angiotensin Receptor Gene Expression in Human Heart Failure. *Circulation*. 1997;95:1201-1206.
221. Asano K, Dutche rD, Port J, Minobe W, Tremmel K, Roden R, Bohlmeyer T, Bush E, Jenkin M, Abraham W, Reynolds M, Zisman L, Perryman M, Bristow M. Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation*. 1997;95:1193-200.
222. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res*. 1998;83:1035-46.

223. Gurantz D, Cowling R, Villarreal F, Greenberg B. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Upregulates Angiotensin II Type 1 Receptors on Cardiac Fibroblasts. *Circ Res.* 1999;85:272-279.
224. Liu Y, Yang X, Sharov V, Nass O, Sabbah H, Peterson E, Carretero O. Effects of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists in Rats with Heart Failure. *J Clin Invest.* 1997;99:1926-1935.
225. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau V, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Mastubara H. Cardiac-specific Overexpression of Angiotensin II AT2 Receptor causes Attenuated Response to AT1 Receptor-mediated Pressor and Chronotropic Effects. *J Clin Invest.* 1998;101:527-535.
226. Stoll M, Steckelings U, Paul M, Bottari S, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:651-7.
227. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor- $\beta$ -1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273:509-515.
228. Nakajima M, Hutchinson H, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt R, Dzau V. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:10663-7.
229. Ju H, Dixon I. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.* 1996;12:1259-1267.

230. Lanza G, Scott M, Davison G, Hall C, Christy D, Miller J, Wickline S. Angiotensin II receptor blockade in Syrian hamster (T0-2) cardiomyopathy does not affect microscopic cardiac material properties: implications for mechanisms of tissue remodeling. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997;11:521-9.
231. Tanimura M, Sharov V, Shimoyama H, Mishima T, Levine T, Goldstein S, Sabbah H. Effects of AT1-receptor blockade on progression of left ventricular dysfunction in dogs with heart failure. *Am J Physiol.* 1999;276:H1385-92.
232. Ratajska A, Campbell S, Sun Y, Weber K. Angiotensin II associated cardiac myocyte necrosis: role of adrenal catecholamines. *Cardiovasc Res.* 1994;28:684-90.
233. Diep Q, El Mabrouk M, Yue P, Schiffrin E. Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1635-41.
234. Papp M, Li X, Zhuang J, Wang R, Uhal B. Angiotensin receptor subtype AT(1) mediates alveolar epithelial cell apoptosis in response to ANG II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:L713-8.
235. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs L, Anversa P. Angiotensin II Induces Apoptosis of Adult Ventricular Myocytes In Vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:859-870.
236. Sadoshima J, Izumo S. Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res.* 1993;73:424-38.
237. Gerschenson L, Rotello R. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 1992;6:2450-5.
238. Zimmer H. Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *J Mol Med.* 1997;75:849-59.

239. Lijnen P, Petrov V, Fagard R. Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factor- $\beta_1$ . *Mol Genet Metab.* 2000;71:418-435.
240. Axmann A, Seidel D, Reimann T, Hempel U, Wenzel K. Transforming growth factor-beta1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:456-60.
241. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, Ogawa E, Igaki T, Yamashita J, Masuda I, Yoshimasa T, Tanaka I, Saito Y, Nakao K. Significance of Ventricular Myocytes and Nonmyocytes Interaction During Cardiocyte Hypertrophy. *Circulation.* 1997;96:3737-3744.
242. Gray M, Long C, Kalinyak J, Li H, Karliner J. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1998;40:352-63.
243. Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Namiki M, Yokoyama M. Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol Cell Biochem.* 1999;199:119-24.
244. Inada T, Fujiwara H, Hasegawa K, Araki M, Yamauchi-Kohno R, Yabana H, Fujiwara T, Tanaka M, Sasayama S. Upregulated expression of cardiac endothelin-1 participates in myocardial cell growth in Bio14.6 Syrian cardiomyopathic hamsters. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:565-71.
245. Ergul A, Grubbs A, Zhang Y, Spinale F. Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the failing human heart. *J Card Fail.* 2000;6:314-20.
246. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler B, Schlotthauer K, Maier L, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G. Functional Effects of Endothelin and Regulation of Endothelium Receptors in Isolated Human Nonfailing and Failing Myocardium. *Circulation.* 1999;99:1802-1809.

247. Torre-Amione G, Kapdia S, Lee J, Durand J, Bies R, Young J, Mann D. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor Receptors in the Failing Human Heart. *Circ.* 1996;93:704-711.
248. Eierman D, Johnson C, Haskill J. Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *J Immunol.* 1989;142:1970-1976.
249. Samsonov M, Nassonov E, Kostin S, Samko A, Alexandrova L, Masenko V, Naumov V, Mareev V, Shevlyagin S, Zhdanov V. Serum neopterin - possible immunological marker of myocardial inflammation in patients with dilated heart muscle disease. *Eur H J.* 1991;12:151-153.
250. Ansari A, Wang Y, Danner D, Gravanis M, Mayne A, Neckelmann N, Sell K, Herskowitz A. Abnormal expression of histocompatibility and mitochondrial antigens by cardiac tissue from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1991;139:337-354.
251. Woodruff J. Myocarditis - a review. *Am J Pathol.* 1980;101:425-426.
252. Paavonen T. Hormonal regulation of lymphocyte functions. *Med Biol.* 1987;65:229-236.
253. Grossman C. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* 1984;5:435-451.
254. Maisch B. How cardiac cells die - Necrosis, oncosis and apoptosis. *Herz.* 1999;24:181-8.
255. Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugetiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat Entw Gesch.* 1885:221-244.
256. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995;267:1445-1449.

257. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis - an overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146:3-15.
258. Holtz J, Heinrich H. Apoptose - was ist das? *Herz.* 1999;24:196-210.
259. Pankuweit S, Jobmann M, Crombach M, Portig I, Alter P, Kruse T, Hufnagel G, Maisch B. Zelluntergang bei entzündlichen Herzmuskelerkrankungen - Apoptose oder Nekrose? *Herz.* 1999;24:211-218.
260. Earnshaw W. Apoptosis: lessons from in vitro systems. *Trends in Cell Biol.* 1995;5:217-220.
261. Figulla H, Vetterlein F, Wiegand V, Schuler S, Kreuzer H. Capillary density and oxygen supply in human dilated cardiomyopathy. *Z Kardiol.* 1987;76:152-154.
262. Schaper J, Schaper W. Ultrastructural correlates of reduced cardiac function in human disease. *Eur Heart J.* 1983;4:35-42.
263. Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:89-98.
264. Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1994;75:426-433.
265. Li P, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett.* 1999;448:206-10.
266. Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K. The Role of Apoptosis in Dilated Cardiomyopathy. *Herz.* 1999;24:219-224.

267. Olivetti G, Rakesh A, Federico Q, Kajstura J, Cheng W, Nitahara J, Quanni E, Di Loretto C, Beltrami C, Krajewski S, Reed J, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997;336:1131-1141.
268. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze T, Anversa P. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest.* 1995;73:771-787.
269. Popovich M, Kostin S, Branishte T, Koberts V, Kapelko V. Cellular hypertrophy in cardiopathic patients is associated with lower creatine-stimulated mitochondrial respiration. *Mol Cell Biochem.* 1995;143:1-5.
270. Liao R, Nascimben L, Friedrich J, Gwathmey J, Ingwall J. Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* 1996;78:893-902.
271. Schultheiss H, Schulze K, Schauer R, Witzenbichler B, Strauer B. Antibody-mediated imbalance of myocardial energy metabolism. A causal factor of cardiac failure? *Circ Res.* 1995;76:64-72.
272. Kato M, Yamashina S, Takeda N, Mochizuki S, Morishita T, Nagano M. Molecular biological and quantitative abnormalities of ADP/ATP carrier protein in cardiomyopathic hamsters. *Eur Heart J.* 1995;16:78-80.
273. Flesch M, Schwinger R, Schnabel P, Schiffer F, van Gelder I, Bavendiek U, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Böhm M. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med.* 1996;74:321-332.
274. Masutomo K, Makino N, Maruyama T, Shimada t, Yanaga T. Effects of enalapril on the collagen matrix in cardiomyopathic Syrian hamsters (Bio 14.6 and 53.58). *Jpn Circ J.* 1996;60:50-61.

275. Group TCTS. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 1987;316:1429-35.
276. Investigators TS. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991;325:293-302.
277. Pitt B, Zannad F, Remme W, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999;341:709-717.
278. McKelvie R, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns R, Probstfield J, Tsuyuki R, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J. Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. *Circulation.* 1999;100:1056-64.
279. Brilla C. Aldosterone and myocardial fibrosis failure. *Herz.* 2000;25:299-306.
280. Anversa P, Leri A, Li B, Liu Y, Di Somma S, Kajastura J. Ischemic cardiomyopathy and the cellular renin-angiotensin system. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19:S1-11.
281. Group TC-IS. The Cardiac Insufficiency Study II (CIBIS-II): a randomized trial. *Lancet.* 1999;353:9-13.
282. Group M-HS. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet.* 1999;353:2001-7.

283. Pettersson A, Hedner J, Hedner T, Held P, Swedberg K, Towle A. Increased plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J*. 1986;7:693-6.
284. Trippodo N, Fox M, Monticello T, Panchal B, Asaad M. Vasopeptidase inhibition with omapatrilat improves cardiac geometry and survival in cardiomyopathic hamsters more than does ACE inhibition with captopril. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;34:782-90.
285. Wei C, Meng Q, Palmer R, Hagemann G, Durand J, Bradley W, Farrell D, Hanks G, Oparil S, Dell'Italia L. Evidence for Angiotensin-Converting Enzyme- and Chymase-Mediated Angiotensin II Formation in the Interstitial Fluid Space of the Dog Heart In Vivo. *Circulation*. 1999;99:2583-2589.
286. Miyauchi T, Goto K. Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20:210-7.
287. Osterziel K, Markus U, Willenbrock R, Strohm O, Dietz R. Therapie der dilatativen Kardiomyopathie mit rekombinanten humanen Wachstumshormon. *Z Kardiol*. 1997;86:803-811.
288. Dreifuss P. Die Therapie der terminalen dilatativen Kardomyopathie mit Wachstumshormonen. *Z Kardiol*. 1998;87:425-435.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	“angiotensin converting enzyme“
ADP	Adenosindiphosphat
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARVC	arrhythmogen-rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AT <sub>1</sub> -Rezeptor	Angiotensin II-subtyp-1-Rezeptor
AT <sub>2</sub> -Rezeptor	Angiotensin II-subtyp-2-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	“basic fibroblast growth factor“
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CTGF	“connective tissue growth factor“
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMI	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
DNA	“deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EGF	“endothelial growth factor“
Fa.	Firma
FACITs	“fibril-associated collagens with interrupted triple helices“
FAMs	“focal adhesion molecules“
FGF-2	“fibroblast growth factor-2“
g	Gramm
HLA-Antigen	Humanes-Leukozyten-Antigen

---

HOCM	hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie
IFN	Interferon
IFSC	“International Society and Federation of Cardiology“
kDa	Kilodalton
LVEDP	“left ventricular enddiastolic pressure“, linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAPKinase	“mitogen activated protein kinase“
MCSF	“makrophages colony stimulating factor“
MHC-Antigen	“major histocompatibility antigen“
MI	Mitralinsuffizienz
ml	Milliliter
MKE	Mitralklappenersatz
MMPs	“matrix-metalloproteinases“
MPAP	“mean pulmonary artery pressure“, durchschnittlicher Pulmonalarteriendruck
mRNA	“messenger ribonucleic acid“
MT-MMPs	“membrane bound matrix-metalloproteinases“
n.a.	“not available“, nicht verfügbar
NKCM	nicht klassifizierbare Kardiomyopathie
nm	Nanometer
NYHA	“New York Heart Association“
PBS	“phosphate-buffered saline“
PDGF	“platelet-derived growth factor“
PKC	Protein Kinase C
RAAS	Renin-Aldosteron-Angiotensin-System
RCM	restriktive Kardiomyopathie
RNA	“ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure

---

rpm	“rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TI	Trikuspidalinsuffizienz
TGF- $\beta$	“transforming growth factor- $\beta$ “
TIMPs	“tissue inhibitors of MMPs“
TKE	Trikuspidalklappenersatz
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VEGF	“vascular endothelial growth factor“
VF	“ventricular fibrillation“, Kammerflimmern
VES	ventrikuläre Extrasystole
WHO	“World Health Organization“, Weltgesundheitsorganisation

## 7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir das morphologische Korrelat des “endstage heart failure“ am Beispiel der dilatativen Kardiomyopathie näher untersucht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der morphologischen Beurteilung des extrazellulären Raumes mit seinen Proteinen im humanen Myokard zu einem Zeitpunkt, wo der Krankheitsverlauf keine medikamentöse Therapie mehr zuließ und als ultima ratio nur noch die Herztransplantation zur Verfügung stand.

Als Untersuchungsmaterial diente humanes Myokard von Kontrollpatienten und von Patienten, die sich aufgrund der Progredienz der dilatativen Kardiomyopathie einer Herztransplantation unterziehen mußten. Die Gewebeprobe wurden bereits im Operationssaal für die folgenden Untersuchungen aufbereitet. Von jedem Patienten wurden Gewebestücke des linken Ventrikels immunohistochemisch auf folgende Proteine untersucht: Kollagen I, III, IV, VI, Laminin, Fibronectin, Tenascin, CD68 und Vimentin. Zur Orientierung ist zuvor eine Sirius-Rot-Färbung der jeweiligen Gewebestücke durchgeführt worden. Die immunohistochemischen Färbungen wurden dann mit konfokaler Lasermikroskopie ausgewertet.

Bereits bei der Auswertung der Sirius-Rot-Färbungen, die generell alle Kollagentypen anfärben, wurden im DCM- Gewebe vergleichsweise massive Kollagenakkumulationen im Interstitium ersichtlich. Man sah im Rahmen dieser Kollagendistributionen eine deutliche Verbreiterung des extrazellulären myokardialen Raumes, oft vom perivaskulären Raum ausgehend. Es kam gehäuft zur Isolation von einzelnen Myozyten oder Myozytenverbänden durch massive Bindegewebdistributionen. Diese Beobachtungen sind als morphologisches Leitbild in dieser Arbeit anzusehen, da es bei den weiteren Auswertungen allgegenwärtig bleibt.

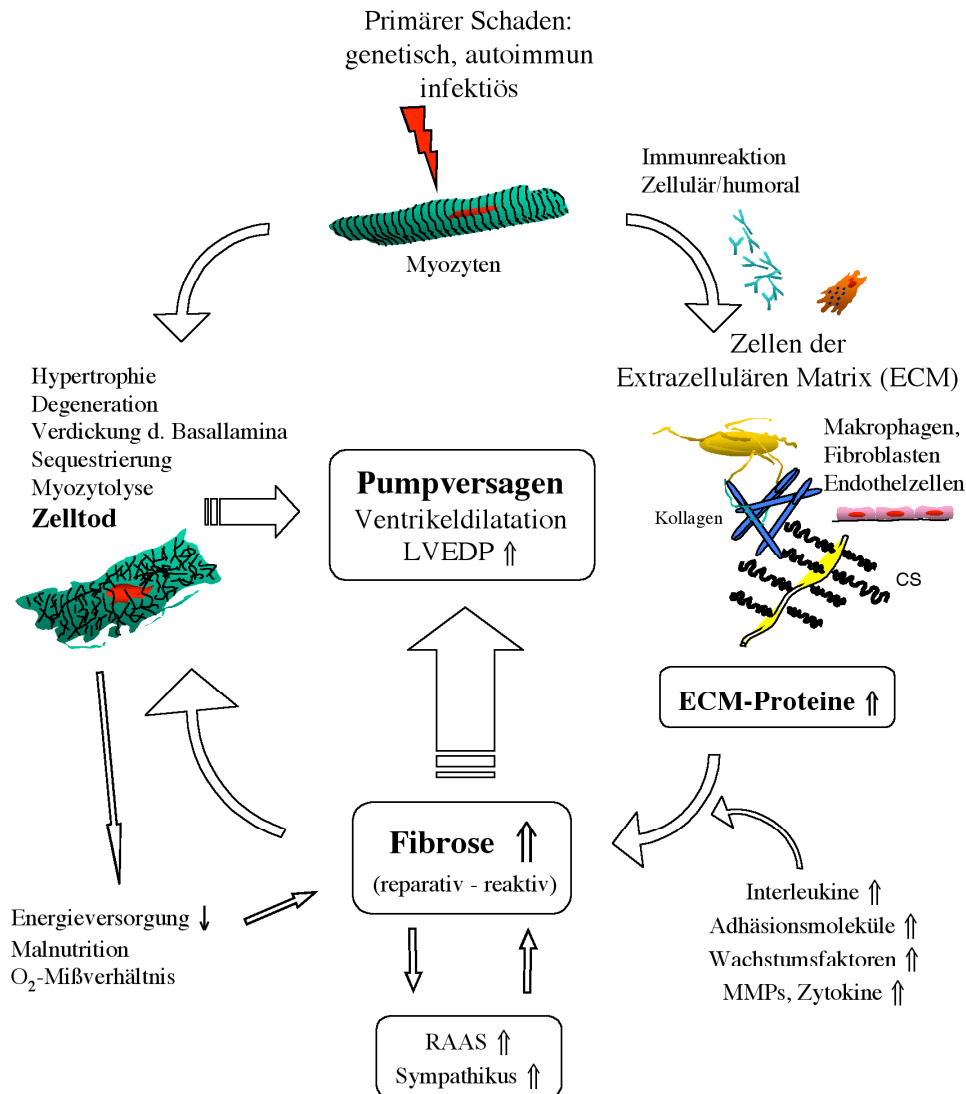
Bei näherer Differenzierung der Kollagentypen konnten wir bei den Kollagen I- und III- Färbungen im DCM-Gewebe ähnliche Befunde erheben wie bei den Sirius-Rot-Färbungen: in Form von massiven Distributionen im extrazellulären Raum, die sich als reparative oder als “replacement“-Fibroseform einteilen ließ. Kollagen VI als weiterer Kollagentyp wurde ebenfalls gesteigert exprimiert vorgefunden. Die vermehrte Expression der Kollagene ist u.a. aufgrund verstärkt stimulierter Fibroblasten, z.B. durch Aktivierung über neurohumorale Mechanismen (RAAS, Aldosteron) zu deuten. Die fibrotischen Areale sind als abgeschlossene Wundheilungsprozesse zu sehen, deren Zunahme an Quantität sich klinisch nachteilig auf die kardiale Hämodynamik auswirkt.

Zum Nachweis frühzeitiger Wundheilungsstadien dienten die Färbungen mit Fibronectin und Tenascin. Beide Proteine waren fokal vermehrt lokalisiert. Sie fördern die Zellmigration und Zelladhäsion von interstitiellen Zellen in diesen Gebieten und sichern somit den Umbau in rigides Narbengewebe.

Als kompensatorischer Mechanismus mittels seiner hydrophilen Eigenschaften oder im Rahmen einer uniformen Gewebsantwort ist die gesteigerte Distribution an Chondrotinsulfat zu werten. Unklar ist, inwieweit die dadurch gesteigerte Reservoirfunktion für profibrotische Signalmoleküle und Nährstoffe einen fördernden Einfluß auf die Progression der Fibrosebildung hat. Hauptbildungsort dieser Proteine sind die Fibroblasten, die im DCM- Gewebe aufgrund vieler verschiedener Noxen, wie z.B. der neurohumoralen Aktivierung, vermehrte Distribution an Zytokinen oder Wachstumshormonen in ihrer Anzahl stark vermehrt vorliegen. Diese Fibroblasten haben wir mit Hilfe der Vimentin- Färbung nachweisen können.

Mit den Laminin- und Kollagen IV- Färbungen konnten wir die destruktiven Veränderungen des Sarkolemm im DCM-Gewebe, bzw. mit Hilfe der  $\alpha$ -Aktinin-Färbung die zytoskelettären Degenerationen nachweisen. Beide Formen der Veränderungen bieten einen adequaten Trigger für die Bindegewebezellen zur gesteigerten Synthese von extrazellulären Matrixproteinen. Abschließend konnten wir das Vorhandensein von CD68 positiv markierten Zellen zeigen, die im DCM-Gewebe vermehrt waren. Diesen Befund kann man als inflammatorische Reaktionen deuten - entweder spezifisch oder unspezifisch, z.B. aufgrund von chemotaktisch wirkenden Bestandteilen ausgehend vom Sarkolemm von degenerierten Myozyten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, kommt es zur gesteigerten Distribution aller untersuchten extrazellulären Matrixproteine im Stadium des "endstage heart failure". Diese Veränderungen leisten ihren Beitrag zu einem kardialen Pumpversagen, dadurch dass das Myokard diesem entgegen zusteuern versucht (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Entstehung eines circulus vitiosus im Rahmen der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie.

Ausgehend von einem primären Schaden in den Myozyten, der autoimmun, genetischer, infektiöser Genese ist, kommt es zu intrazellulären Veränderungen der Kardiomyozyten, die über Degenerationsstadien letztendlich zum Zelltod führen. Dabei können z.B. die degenerativen Veränderungen der Herzmuskelzellen das Ergebnis einer Autoimmunreaktion von antisarkolemmalen Proteinen sein. In den Zellen der extrazellulären Matrix (vorrangig Fibroblasten) wird aufgrund von multifaktoriellen Stimuli eine gesteigerte Proteinsynthese an Matrixproteinen hervorgerufen. Diese Stimuli können Zytokine, Interleukine, Adhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren sein, die im Rahmen der uniformen Gewebsantwort ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Fokal findet man daraufhin im Interstitium vermehrt Areale mit ablaufenden Entzündungsreaktionen. Es werden extrazelluläre Matrixproteine als Erwidern im Interstitium exprimiert und damit resultiert eine Zunahme an fibrotischen Umbauprozessen, die schließlich in Narbengewebe resultiert. Mit Zunahme der myokardialen Fibrose und infolge zytoskelettären Degenerationen und dem myozytären Zellverlust, leiden die Myozyten an einer chronischen Unterversorgung an Nährstoffen bzw. Energiebereitstellung und stellen somit eigene Faktoren, die die Myozytolyse unterstützen. Es kommt zum Auseinandergleiten der Myozyten aus dem Zellverbund, dem "slippage" und zur gesteigerten Ventrikelsteifigkeit durch die Zunahme der Fibrose. Die myokardiale Arbeitsleistung wird dadurch schlechter, da das Myokard sich nicht mehr ökonomisch kontrahieren und relaxieren kann. Klinisch läßt sich eine Herzinsuffizienz diagnostizieren infolge Ventrikeldilatation mit erhöhtem LVEDP. Als hämodynamische Kompensationsmechanismen werden u.a. das RAAS lokal im Myokard sowie systemisch, das sympathische Nervensystem getriggert und aktiviert. Mit dem Ergebnis durch diese Kompensationsmechanismen, eine gesteigerte extrazelluläre Proteinsynthese in den Bindegewebezellen zu induzieren. Damit schließt sich ein Kreislauf, da das wachsende Ausmaß der Fibrose wiederum zur Progredienz des kardialen Pumpversagens führt.

## 8. Lebenslauf

Name: Mollnau  
Vorname: Hanke  
Geburtsdatum: 03.09.1968  
Geburtsort: Bremerhaven  
Wohnort: Eidelstedter Weg 11, 20255 Hamburg  
Familienstand: ledig, ein Sohn: Neels Bornschieer  
Schulbildung: 1974-1985 Grundschule; Gymnasium  
1985-1986 Lafayette High School; Williamsburg,  
Virginia (USA)  
1986-1988 Abitur: 1988  
Ersatzdienst: 1988-1990 Zentrallabor, ZKH Reinkenheide, Bremerhaven  
Studium: 1990-1997 Justus-Liebig -Universität Giessen,  
Praktisches Jahr im Krankenhaus Lich und Bad Hersfeld  
Gesamtnote: 3 (2,66)

seit November 1997: Arzt im Praktikum, Assistenzarzt in der Medizinischen  
Klinik III im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Schwerpunkte: Kardiologie und Angiologie, Direktor der  
Klinik: Prof. Dr. Thomas Meinertz;  
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Münzel  
(Schwerpunkte: Endothelfunktion, NO)

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h. c. Jutta Schaper für die Überlassung des Themas, ihrer stetigen Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie Ihrer vorbildlichen Betreuung, Motivationsgabe und Unterstützung.

Großer Dank geht an Frau Brigitte Matzke, die mir seit Beginn eine treue Freundin gewesen ist, auf die ich mich immer verlassen konnte und im Verlauf auch an Herrn Gunther Schuster, der mit gleicher Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichte.

Für die wertvollen und anregenden Diskussionen mit “maximum results“ möchte ich Dr. Sawa Kostin danken.

Herrn Gerd Stämmler gebürt ebenfalls Dank für seine Ratschläge bei EDV-Problemen, sowie bei der digitalen Fertigstellung der Arbeit.

Frau Beate Grohmann und Frau Renate Möhren danke ich für ihre stetige Freundlichkeit und tatkräftige Hilfe im Labor und der damit verbundenen angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Für die geselligen Unterhaltungen mit Herrn Dr. Stefan Hein und Herrn Dr. Albrecht Elsässer bedanke ich mich. Dadurch habe ich so einen frühen Einblick in den klinischen Alltag bekommen.

Frau Renate Nordgren und Frau Elke Conradi sage ich danke, die als gute Seelen der Abteilung immer freundlich und zuvorkommend waren.

Zuletzt möchte ich herzlich meinen Eltern und meiner Freundin Birgit Kolodzick für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung danken.