Der Einfluß von Trijodtyronin auf die extrazelluläre Matrix von Rattenherzen und Rattennieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von Christoph Kraft
aus Kottenheim

Giessen 2001

Aus dem Max-Planck-Institut
für Physiologische und Klinische Forschung
Kerkhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr.Dr. h.c. W. Schaper
Gutachter: Prof. Dr. Rainer M. Bohle

Tag der Disputation: 11. September 2002

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1

1.1. Trijodtyronin (T3) 1

1.1.1. Allgemeine Gesichtspunkte der Schiddrüsenhormone und biochemische Eigenschaften 1

1.1.2. Wirkungsweise 2

1.1.3. Physiologische Wirkungen 3

1.2. Hyperthyreoidismus und allgemeine klinischen Auswirkungen 5

1.3. Hyperthyreoidismus und kardiovaskuläre Auswirkungen 6

1.4. Hyperthyreoidismus und seine Auswirkungen auf die Niere 9

1.5. Fragestellung der Arbeit 10

2. Material und Methoden 13

2.1. Tierexperimentelles Vorgehen 13

2.2. Verwendete cDNA-Klone 13

2.3. Analyse von DNA und Präparation von Restriktionsfragmenten 14

2.3.1. Analyse von DNA im Agarose-Gel 14

2.3.2. Isolierung von DNA-Fragmenten durch Adsorption an eine Silica-Matrix 15

2.4. Präparation und Analyse von RNA 15

2.4.1. Präparation von totaler RNA mit Hilfe einer Guanidin-Methode 15

2.4.1.1. Homogenisierung des Gewebes 15

2.4.1.2. Isolierung der RNA 16

2.4.1.3. Quantifizierung der RNA 16

2.4.2. Northern Blot Hybridisierung 16

2.4.2.1. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese 16

2.4.2.1.1. Gelpräparation 16

2.4.2.1.2. Probenvorbereitung und Laufenlassen des Gels 17

2.4.2.2. RNA-Transfer aus dem Gel auf eine Membran (Kapillar-Blot) 17

2.4.2.3. Radioaktive Markierung von cDNA-Proben 18

2.4.2.4. Hybridisierung 19

2.4.2.5. Quantifizierung 19

3. Ergebnisse 21

3.1. Auswirkungen des Hyperthyreoidismus auf Rattenherzen und Rattennieren 21

3.1.1. Genexpression in Rattenherzen 21

3.1.1.1. TGF-$ß_1$ Genexpression 21

3.1.1.2. Fibronektin Genexpression 21

3.1.1.3. Laminin B_2 Genexpression 24

3.1.1.4. Kollagen α_1 (I) Genexpression 24

3.1.1.5. α-Myosin Genexpression 27

3.1.1.6. ß-Myosin Genexpression 27

3.1.1.7. ANF Genexpression 30

3.1.1.8. VEGF Genexpression 30

3.1.2. Genexpression in Rattennieren 33

3.1.2.1. TGF-$ß_1$ Genexpression 33

3.1.2.2. Fibronektin Genexpression 33

3.1.2.3. Laminin B_2 Genexpression 36

3.1.2.4. Kollagen α_1 (I) Genexpression 36

4. Diskussion **39**

4.1. Die Bedeutung der ”Extrazellulären Matrix” 39

4.2. Myokardiale Genexpression der extrazellulären Matrixproteine 40

4.2.1. TGF-$ß_1$ 40

4.2.2. Kollagen 43

4.2.3. Fibronektin 46

4.2.4. Laminin 47

4.2.5. Zusammenfassung und Arbeitshypothese 48

4.3. Myokardiale Genexpression von Myosin 50

4.4. Myokardiale Genexpression von ANF 52

4.5. Myokardiale Genexpression von VEGF 54

4.6. Renale Genexpression der extrazellulären Matrixproteine 55

4.6.1. TGF-$ß_1$ 55

4.6.2. Kollagen, Fibronektin, Laminin 57

5. Zusammenfassung **59**

5.1. Herz 59

5.2. Niere 62

5.3. Schlußfolgerung 63

6. Literatur **65**

7. Danksagung **83**

8. Lebenslauf **84**

1. Einleitung

1.1. Trijodtyronin (T3)

1.1.1. Allgemeine Gesichtspunkte der Schiddrüsenhormone und biochemische Eigenschaften

In der Schilddrüse werden die jodhaltigen Hormone Trijodtyronin (T3) (s. Abb.1) und Tetrajodtyronin (Thyroxin oder T4) gebildet. Die Synthese beider Hormone erfolgt in den Schilddrüsenzellen (Thyreozyten). Hierfür benötigt der Organismus eine ausreichende Menge Jod, das in Form von Jodid aus der Nahrung und dem Trinkwasser aufgenommen wird, in den Blutkreislauf gelangt und über die Basalmembran in die Thyreozyten der Schilddrüse aufgenommen wird. Der tägliche Jodbedarf beträgt etwa 150-300 μg. Wird man diesem Bedarf nicht gerecht, so entwickelt sich die sogenannte Jodmangelstruma, die häufigste Schilddrüsenerkrankung, die entweder durch alimentären Jodmangel oder erhöhten Jodbedarf, wie in der Gravidität oder in der Wachstumsphase, entsteht. Deutschland ist übrigens Jodmangelgebiet.

Nachdem nun das Jodid zu Jod oxidiert worden ist und an Tyrosin eingebaut wurde, entstehen die Schilddrüsenhormonvorstufen 3-Monojodtyrosin und das zweifach jodierte 3,5-Dijodtyrosin, die entweder zu 3'5'3-Trijodtyronin (T3) oder 3'5'3'5-Tetrajodtyronin (Thyroxin, T4) reagieren.

Die Speicherung der beiden Schilddrüsenhormone erfolgt im Thyreoglobulin der Schilddrüse. Thyreoglobulin ist Depot- und Syntheseort für T3 und T4[1].

Die Ausschüttung beider Hormone ins Blut erfolgt nach Proteolyse des Thyreoglobulins unter dem Einfluß übergeordneter Zentren im Hypothalamus und in der Hypophyse. Im Hypothalamus wird TRH (Thyreotropin Releasing Hormone) freigesetzt, welches Synthese und Abgabe von TSH (Thyroid Stimulating Hormone) aus dem Hypophysenvorderlappen bewirkt. TSH fördert die enterale Jodresorption, die Schilddrüsenhormonbildung und die Entleerung der Thyreoglobulinspeicher für T3 und T4.

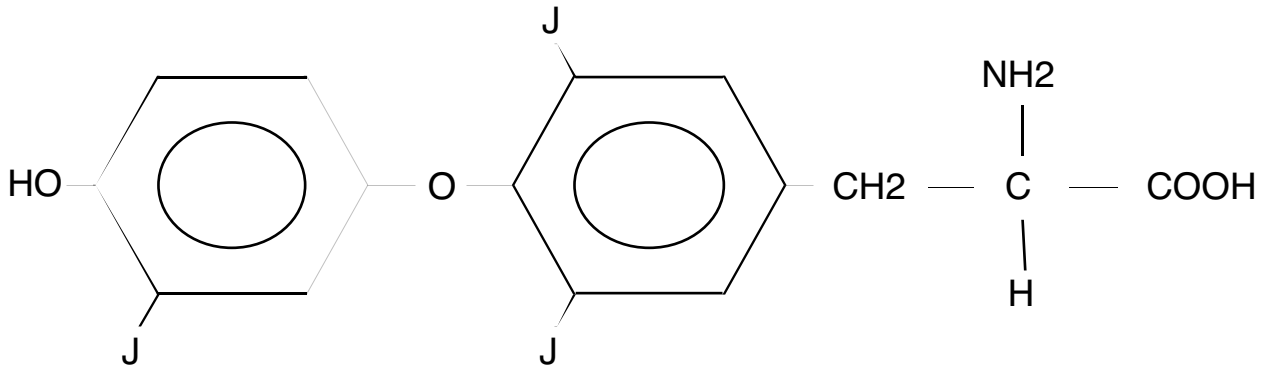

Abb. 1 Biochemische Formel von Trijodthyronin (T3)3'5'3-Trijodtyronin entsteht aus zwei Aminosäuren (3-Monojodtyrosin und 3,5-Dijodtyrosin), die über eine Ätherbrücke verknüpft werden. Der Einbau des Jods erfolgt in Position 3 am Benzolring des Tyrosins.

In Form eines Rückkopplungsmechanismus stehen die T4- und T3-Sekretion mit der TSH-Sekretion in einem regulatorischen Gleichgewicht: Abnahme der Schilddrüsenhormonkonzentration im Blut wird mit einer vermehrten TSH-Sekretion beantwortet, umgekehrt führt ein Anstieg zu einer Abnahme der TSH-Sekretion. Die tägliche Hormonabgabe aus der Schilddrüse beim Gesunden beträgt im Durchschnitt 100 μg T4 und 10 μg T3[2].

Im zirkulierenden Blut liegen die Schilddrüsenhormone zum größten Teil in gebundener Form, d.h. vorwiegend als Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Thyroxin-bindendes Präalbumin (TBPA) und Albumin, vor. Biologisch aktiv ist jedoch nur die freie Form von T3 und T4. Das sind lediglich 0,03% des T4 und 0,3% des T3.

Die Konzentration von T4 im Blutplasma beträgt etwa das 40 fache der T3 Konzentration. Das biologisch wirksame Schilddrüsenhormon ist allerdings das T3, das eine etwa 3 mal höhere biologische Aktvität besitzt[3].

Das gesamte im Blut befindliche T4 wird von der Schilddrüse sezerniert, jedoch nur 10-20% des im Blut zirkulierenden T3. Das bedeutet, daß etwa 80 - 90% des T3 extrathyreoidal durch Dejodierung von T4 entstehen. Etwa 35% des T4 werden so zu T3 umgewandelt. Die biologische Halbwertszeit beträgt für T4 8 Tage, für T3 20 Stunden.

1.1.2. Wirkungsweise

Wie die Steroidhormone wirken vor allem die Schilddrüsenhormone nach dem Prinzip „Hormonwirkung durch Beeinflußung der Genaktivität". Sie gelangen über einen energieabhängigen Prozeß in das Cytosol der Zielzelle und von dort über spezifische

Rezeptoren am Zellkern in den Nukleus[4]. T3 besitzt dabei eine höhere Affinität zum Rezeptor als T4 und hat damit auch eine höhere biologische Aktivität[3].

Man hat solche Rezeptoren im Herzen[5], in der Niere[6,5], in der Hypophyse[7,5] Leber[6,8,5], Gehirn[5], Milz[5] und Hoden[5] gefunden. Die physikalischen Charakteristika der T3-Rezeptoren des Zellkerns sind übrigens sowohl in verschiedenen Organen der selben Spezies, wie z.B. in der Ratte[5], als auch unter verschiedenen Arten, wie z.B. der Forelle[9], Kaulquappe[10], Hühner[11] und dem Menschen[12], gleich. Bisher sind vier Formen dieser Rezeptoren beschrieben worden. Die α_1-, $ß_1$- und $ß_2$-Rezeptoren besitzen eine hohe Bindungsaffinität für T3, wobei der α_2-Rezeptor wahrscheinlich als T3-Antagonist funktioniert. Die Verteilung der 4 Rezeptorformen in den verschiedenen Organen ist unterschiedlich[13,14].

Im Zellkern bindet das Hormon an den Rezeptorkomplex, der aus dem eigentlichen Rezeptorprotein, einem akzessorischen Protein und DNA besteht. Dieser Rezeptor ändert durch die Bindung des Hormons seine Konformation derart, daß eine Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an die DNA möglich wird. Hier wird dann die Transkription spezifischer DNA -Sequenzen angeregt, die zu einer Veränderung der Expression verschiedener Gene führt[15].

Über die gebildete m-RNA und die nachfolgende Proteinsynthese wird dann die Hormonwirkung vermittelt.

Die Quantität und die Qualität der Hormonwirkung ist von den jeweiligen Bedürfnissen des Organismus abhängig. So müssen bei der Umstellung auf verschiedene Stoffwechsellagen bestimmte Gene in verschiedenen Organen sehr genau in ihrer Aktivität angepaßt werden, d. h. die Aktivität von Genen und ihre Expression ist nicht immer gleich, was bedeutet, daß Gene hoch- und runterreguliert werden, und von der Schilddrüsenhormonkonzentration abhängig.

Zusätzlich sind extranukleäre Bindungsstellen beschrieben worden[16]. Ihre physiologische Bedeutung wird kontrovers diskutiert[13].

1.1.3. Physiologische Wirkungen

Schilddrüsenhormone stimulieren den gesamten Metabolismus des Körpers und haben einen modulierenden Effekt auf den Stoffwechsel aller Organsysteme. Sie erhöhen den Sauerstoffverbrauch, bewirken eine vermehrte Wärmeproduktion und führen somit zu einer Steigerung des Grundumsatzes. Diese Wirkung auf den Organismus kommt durch

die gesteigerte Expression des Gens der Na^+/Ka^+-ATPase und der damit verbundenen verstärkten Aktivität dieses Enzyms unter dem Einfluß der Schilddrüsenhormone zustande[17]. Die Na^+/Ka^+-ATPase ist ein zellmembranständiges Enzym, das den Austausch von Natrium und Kalium zwischen dem intra- und extrazellulärem Raum katalysiert. Es handelt sich dabei um einen ATP-abhängigen Prozeß, der für einen beträchtlichen Teil des Sauerstoffverbrauchs der Gewebe verantwortlich ist und somit auch den erhöhten Sauerstoffverbrauch erklärt. Ein Teil der bei der ATP-Spaltung freiwerdenden Energie wird in Form von Wärme frei und führt zu einer vermehrten Wärmeproduktion und zu Wärmeintoleranz.

Neben der Steigerung des Grundumsatzes sind der Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel beeinflußt[18,19]. Im Kohlenhydratstoffwechsel führen die Schilddrüsenhormone zu einer verminderten Bildung von Glykogen und zu einem vermehrten Anstieg der Glukoseresorption. Die Utilisation von Kohlenhydraten wird unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonen verstärkt.

Eine Zunahme der Lipolyse und eine Abnahme des Fettgewebes kennzeichnen den Fettstoffwechsel.

Im Bereich des Eiweißstoffwechsels führen erhöhte Schilddrüsenhormonkonzentrationen zu einer katabolen Stoffwechsellage (Proteolyse).

Ebenfalls nachgewiesen sind Einflüsse auf den Mineralstoffwechsel. Vor allem der Kalzium-und Phosphatumsatz ist bei Schilddrüsenhormonanstieg gesteigert, welches einen gesteigerten Knochenstoffwechsel zur Folge hat. Die Schilddrüsenhormone fördern so das Körperwachstum über einen direkten Effekt auf den Knochen und über eine Stimulation der Biosynthese von Wachstumshormon in der Hypophyse[20]

T3 und T4 besitzen auch eine Schlüsselfunktion bei der Hirnentwicklung bei Neugeborenen[21] durch Förderung der Dendritenbildung und der Myelinisierung.

Schilddrüsenhormone sensibilisieren die Rezeptoren gegenüber Katecholaminen auf Rezeptor-und Postrezeptorebene. Dies führt im Herzen bei der Hyperthyreose zu einer Zunahme der ß-Rezeptoren[22] und zu Tachykardien und tachykarden Rhythmusstörungen (siehe auch 1.3). In anderen Organen kommt es zu Hyperhidrosis, Mydriasis, Tremor und gesteigerter Darmperistaltik mit der Folge von Diarrhöen.

Gegensinnige Symptome treten bei der Hypothyreose auf.

Die gestörte Gonadenfunktion bei Schilddrüsenfunktonsstörungen äußert sich bei Frauen in Zyklusstörungen; bei beiden Geschlechtern treten Libido-und Potenzstörungen auf, sowie eine Verminderung der Fertilität.

Die quergestreifte Muskulatur reagiert bei einer hyperthyreotischen Stoffwechsellage mit einer Atrophie im Bereich des Schulter-und Beckengürtels, bei einer hypothyreotischen Stoffwechsellage mit einer Pseudohypertrophie und verlangsamten Sehnenreflexen.

Wirkungen auf das Nervensystem machen sich als Apathie während einer Hypothyreose und Überregbarkeit während einer Hyperthyreose bemerkbar.

1.2. Hyperthyreoidismus und allgemeine klinischen Auswirkungen

Bei einer Hyperthyreose besteht ein den Bedarf übersteigendes Angebot an Schilddrüsenhormonen.

Es gibt unterschiedliche Arten der Entstehung einer hyperthyreotischen Stoffwechsellage. Von größter klinischer Relevanz sind die Immunthyreopathie (Morbus Basedow) und die thyreoidale Autonomie.

Die Patienten klagen über eine sogenannte Struma, verbunden mit psychomotorischer Unruhe mit feinschlägigem Tremor der Finger, gesteigerter Nervosität und Schlaflosigkeit, über Sinustachykardie (Pulsfrequenz über 88 Schläge/min) und eventuellen Rhythmusstörungen (siehe auch 1.3), einer gesteigerten Blutdruckamplitude über 60 mmHg, Atemnot bei körperlicher Belastung, gesteigerter Ermüdbarkeit und über Gewichtsverlust, trotz Heißhunger und gesteigerten Durst. Dazu kommen dann Hyperglykämie, Wärmeintoleranz und Schweißausbrüche, eine gesteigerte Stuhlfrequenz, eventuell Durchfälle, eine Myopathie mit insbesonderer Schwäche der Oberschenkelmuskulatur und Adynamie, sowie Osteopathie durch eine negative Kalziumbilanz, verbunden mit einer eventuellen Fettleber, Zyklusstörungen und Infertilität. (siehe auch 1.1)

Zusätzlich treten bei Patienten, die an Morbus Basedow leiden, in 50% der Fälle die endokrine Ophthalmopathie und in 5% der Fälle ein prätibiales Myxödem auf.

1.3. Hyperthyreoidismus und kardiovaskuläre Auswirkungen

Kardiovaskuläre Manifestationen sind ein häufiger Befund im Rahmen des Hyperthyreoidismus.

Um die Pathophysiologie der schilddrüsenhormoninduzierten Herzkrankheit zu verstehen, ist es wichtig, die Wirkungen von T3 und T4 auf die periphere Zirkulation und somit indirekte Wirkungen genauso zu berücksichtigen, wie die direkten Wirkungen auf das Myokard[23,24,25].

In den nächsten Abschnitten folgen einige Erläuterungen zu den kardiovaskulären Auswirkungen des Hyperthyreoidismus.

Eine hyperthyreote Stoffwechsellage stimuliert den zellulären Sauerstoffverbrauch und die Substratverwertung[15,4,26]. Dieser erhöhte Bedarf, aber auch die Entsorgung der anfallenden Wärmeproduktion benötigt genügend Energie, die mit einem gesteigerten Sauerstoff- und Nahrungsbedürfnisses des peripheren Gewebes einhergeht. Um diesem Mehrbedarf gerecht zu werden reagiert das Herz mit einem erhöhten Herzzeitvolumen[25].

Eine der ersten Reaktionen des Organismus auf Hyperthyreoidismus ist eine Reduktion des peripheren Gefäßwiderstandes[25,27,28]. So ist die Durchblutung der Haut, der Nieren, des Herzens und der Muskeln erhöht. Klein (1989) vermutet, daß die erhöhte Zellatmung zu einer Ausschüttung von lokalen Vasodilatatoren führt[25].

Eine andere Theorie geht von einer Wirkung der Schilddrüsenhormone direkt auf die glatten Muskelzellen der Gefäße aus, indem sie den Natrium-Kalium-Transport derart beeinflußen[29,30], daß die Elektrolytverschiebung zu einer Verminderung der Kontraktilität der glatten Muskelzellen und des Gefäßwiderstandes führt[25].

Die Beeinflussung des Gefäßwiderstandes durch das cholinerge System und das Renin-Angiotensin-System muß ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Die Verminderung des systemischen Gefäßwiderstandes erniedrigt den diastolischen Blutdruck und erhöht das Herzschlagvolumen, so daß das erhöhte Schlagvolumen und die vermehrte Herzarbeit auch aus den Veränderungen des Gefäßwiderstandes resultieren können[28].

Hyperthyreoidismus geht beim Menschen einher mit einer Vermehrung des Blutvolumens[31]. Man hat festgestellt, daß die Erythropoese und der Erythropoetin-Blutspiegel sich einem verändertem Schilddrüsenhormonspiegel anpassen[32]. Einem

vermehrten Blutvolumen folgt ein erhöhter Füllungsdruck im rechten Vorhof, der mit einer gesteigerten Vorlast und einem gesteigerten Herzschlagvolumen einhergeht[33,34].

Eine andere Theorie für die Vermehrung des Blutvolumens wäre eine Steigerung des Renin-Angiotensin- und Aldosteron-Spiegels[33].

Schilddrüsenhormone erhöhen die Katecholaminempfindlichkeit des Herzens. Der Grund dafür ist nicht etwa eine erhöhte Katecholaminkonzentration, sondern eine erhöte Dichte der ß-Rezeptoren im Herzmuskel[35,36].

Als Resultat entstehen Tachykardie, Tremor und Nervosität.

Ein anderes Hormonsystem, das Einfluß auf das kardiovaskuläre System nimmt, ist das Renin-Angiotensin-System (RAS)[37]. Die biologisch aktive Komponente des RAS ist das Angiotensin II. Angiotensin II vermittelt seine Wirkung über spezifische Rezeptoren und kann Vasokonstriktion, positive Inotropie und Chronotropie, sowie kardiovaskuläre Hypertrophie verursachen[38].

Eine hyperthyreote Stoffwechsellage hat einen positiv inotropen Einfluß auf das Herz[24,33,39-41,42]. Dabei nimmt die Geschwindigkeit der Entwicklung des Ventrikeldrucks und die Kontraktionsgeschwinigkeit zu[41,42-44].

Einen Erklärungsansatz liefert die Steigerung der ATPase-Aktivität im Myosin[44], die in Zusammenhang steht mit der Änderung der Verteilung der Myosin-Isoenzyme während des Hyperthyreoidismus. So findet unter dem Einfluß von T3 eine Verschiebung vom sich langsam zusammenziehenden ß-Myosin, mit einer verminderten Myosin ATPase-Aktivität, zum schnellen α-Myosin, mit einer höheren Myosin ATPase-Aktivität, statt, wie in dieser Arbeit später auch gezeigt. Als Konsequenz resultiert ein Anstieg der Verkürzungsgeschwindigkeit der Muskelfibrillen[46]. Man muß dazu ergänzen, daß die Änderung der Myosin-Isoenzyme in der Ratte nachgewiesen werden konnten, allerdings nicht für alle Tiermodelle zutrifft und beim Menschen der Nachweis noch fehlt.

Einen anderen positiven inotropen Einfluß auf das Herz besitzt die herzspezifische Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums. Dabei handelt es sich um eine Ionenpumpe, die für den Rücktransport des Kalziums aus dem Zytosol ins sarkoplasmatische Retikulum verantwortlich ist. Die verminderte Kalzium-konzentration während der Diastole führt zu einer Relaxation des Herzmuskels und je größer die Anzahl dieser Ionenpumpen, desto schneller verschwindet Kalzium aus dem Zytosol und desto kürzer ist die diastolische Relaxationsphase[47].

Die Behauptung, daß die positiven Effekte auf die Herzkontraktilität unabhängig von den Katecholaminen und als direkter Einfluß der Schilddrüsenhormone zu verstehen sind[23], unterstützt die Feststellung (s.u.), daß der ß-Blocker Propranolol nicht in der Lage sei, die gesteigerte Ejektionsfraktion zu ändern[48].

Nicht zu vergessen sind in diesem Zusammenhang die positiv inotropen Effekte der Katecholamine und des Renin-Angiotensin-Systems.

Der positiv chronotrope Effekt der Schilddrüsenhormone wird, wie teilweise oben schon beschrieben, unterschiedlich diskutiert. So gehen die einen von einer Interaktion mit dem autonomen Nervensystem[49] oder dem Renin-Angiotensin-System[38] aus, wobei andere an einen direkten chronotropen Effekt der Schilddrüsenhormone glauben[50].

Der experimentelle Hyperthyreoidismus führt zu Herzwachstum und Herzhypertrophie[51-53]. Diskutiert werden ein direkter Einfluß der Schilddrüsenhormone, infolge einer erhöhten Proteinsyntheserate[54,52], und ein indirekter Einfluß infolge einer verstärkten Herzarbeit während einer hyperthyreoten Stoffwechsellage. Welcher Effekt letzendlich für die Hypertrophie des Herzens verantwortlich ist, versucht Klein 1990 zu erläutern[55].

Hier nun einige seiner Thesen: Wie oben bereits erwähnt, verstärkt Hyperthyreoidismus die Wirkung von Katecholaminen. Katecholamine wirken positiv inotrop, chronotrop und dromotrop, so daß sie nach einer gewissen Wirkzeit in der Lage sind, eine Herzhypertrophie hervorzurufen. Um diesen Effekt zu antagonisieren hat Klein in einem Experiment gleichzeitig zur Schiddrüsenhormongabe den ß-Blocker Propanolol verabreicht. Er konnte damit zeigen, daß die gleichzeitige Applikation von Propanolol und Schilddrüsenhormonen die erhöhte Herzfrequenz und die Hypertrophie verhindern konnten[53] und somit Katecholamine ursächlich an der Herzvergrößerung beteiligt sein sollen.

Andere Veröffentlichungen in diesem Zusammenhang, wie von Zierhut et al. 1989, beschreiben keinen Einfluß auf den Grad der Herzhypertrophie bei gleichzeitiger Gabe von Schilddrüsenhormonen und ß-Blockern [56,57].

Amos et al. (1994) behandelte Ratten die ersten Tage ausschließlich mit T3 bis zur Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens und verabreichte anschließend den ß-Blocker Atenolol. Sie konnten zeigen, daß der ß-Blocker keinen Einfluß auf den Schweregrad der Herzhypertrophie nahm[58].

Diese Erfahrung würde für einen direkten Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die Herzhypertrophie sprechen.

In einem anderen Experiment transplantierte Klein 1987 ein Spenderherz einer Ratte an die Seite der Aorta abdominalis, so daß es normal funktionierte, aber keine Herzarbeit zu leisten hatte. Nachdem Schilddrüsenhormone in hoher Konzentration verabreicht worden waren und beide Herzen mit identischem Blut perfundiert worden waren, hypertrophierte das in situ, also im Thorax, arbeitende Herz, wobei das heterotope Herz in Höhe der Aorta abdominalis sich in der Größe nicht von den Herzen der Kontrolltiere unterschied[51].

Ein Versuch, der gegen einen direkten Effekt und für verstärkte Herzarbeit unter Schilddrüsenhormoneinfluß auf die Herzhypertrophie spricht.

Man darf in diesem Zusammenhang allerdings den Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems nicht unterschätzen.

Der Blutdruck verändert sich unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonen. Ratten, die über 14 Tage mit T3 behandelt wurden zeigen einen deutlichen Anstieg des systolischen Drucks[58]. Dabei spielt das erhöhte Schlagvolumen eine entscheidende Rolle. Der diastolische Blutdruck ist dabei, aufgrund der peripheren Vasodilatation, normal bis erniedrigt[25].

Hyperthyreoidismus ist in der Lage, Herzrhythmusstörungen zu verursachen. Dazu zählen Extrasystolen und Vorhofflimmern[59].

1.4. Hyperthyreoidismus und seine Auswirkungen auf die Niere

Hyperthyreoidismus verursacht eine Hypertrophie der Niere[60]. Obwohl die Tatsache schon lange bekannt ist, wurde bisher wenig darüber geschrieben. Die meiste Literatur versucht die renale Hypertrophie zu erklären, wobei kaum Auswirkungen auf die Nierenfunktion selbst beschrieben werden.

Kobori et al. (1997) erklären die renale Hypertrophie über eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems[61] in ähnlicher Weise, wie bei der Entstehung der Herzhypertrophie auch. Dabei kommt dem Angiotensin II eine besondere Bedeutung zu. Angiotensin II spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks, sondern besitzt auch eine Funktion als Wachstumsfaktor.[38]

1.5. Fragestellung der Arbeit

Seit langem ist die Tatsache bekannt, daß unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonen eine Hypertrophie des Rattenherzens und der Rattenniere verursacht wird[61,62,63]. Aus diesem Grund sind die beiden Organe Herz und Niere auch interessante Forschungsobjekte, um ausfindig zu machen, wie sich auf der Ebene der Transkription bestimmte Proteine im hyperthyreoten und hypertrophierten Zustand verändern.

Bis vor nicht all zu langer Zeit wurden viele wissenschaftliche Untersuchungen besonders im Zusammenhang mit der Hypertrophie des Herzens und die damit verbundende eingeschränkte Herzfunktion auf die Myozyten beschränkt. Dann erweiterte sich diese Perspektive auf die extrazelluläre Matrix und sein fibrilläres Kollagen[64], da insbesondere die Ablagerung von Kollagen zu einer verschlechterten Organfunktion und zum abnormen mechanischen Verhalten des hypertrophierten Myokardiums führt.

Untersuchungen an anderen, ebenfalls mit einer Hypertrophie einhergehenden Tiermodellen zeigten Veränderungen auf der Ebene der Transkription bestimmter Proteine. Als ein Beispiel ist die spontane hypertensive Ratte zu nennen, die bis zum Alter von 21 Monaten über eine stabile linksventrikuläre Hypertrophie, eine Herzfibrose und eine Herzinsuffizienz entwickelt[65,66]. Während des Stadiums der Hypertrophie, ohne Herzinsuffizienzzeichen, zeigen Northern blot Hybridisierungen von linksventrikulärem Gewebe folgende Veränderungen: α-Myosin wird runterreguliert, aber in geringerem Ausmaß, als bei den Ratten, die ein Herzversagen entwickelt haben[67], ß-Myosin verändert sich nicht[67], ANF wird lediglich im linken Ventrikel, nicht aber im rechten Ventrikel, hochreguliert[67], Fibronektin, Kollagen I, Kollagen III[67] und TGF-$ß_1$[65] werden nicht signifikant erhöht. Anders sieht es da bei den spontanen hypertensiven Ratten aus, die eine Herzinsuffizienz entwickelt haben: α-Myosin wird runterreguliert[67,68], ß-Myosin verändert sich nicht[67], wobei ANF[67,68], Kollagen I[65,66,67], Kollagen III[67,68], Fibronektin[65,67] und TGF-$ß_1$[65,68] hochreguliert werden. Behandelt man nun die spontanen hypertensiven Ratten mit einem ACE-Hemmer, vor der Entwicklung eines Herzversagens, so können Veränderungen in den eben genannten Proteinen und eine Herzinsuffizienz vorgebeugt werden[68]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß der krankheitsvorbeugende Nutzen der ACE-Hemmer, zumindest teilweise, durch Effekte auf die Expression spezifischer Gene, wie α-Myosin, ß-Myosin, ANF, Kollagen, Fibronektin, TGF-$ß_1$ und Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, vermittelt wird, und das diese Gene eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von Hypertrophie, Fibrose und Herzinsuffizienz spielen.

Ähnliche Veränderungen in der Niere werden im Rahmen der diabetischen Nephropathie beobachtet. Diese Nierenerkrankung ist durch eine Hypertrophie der glomerulären und tubulären Elemente, als auch durch eine progressive Akkumulation von Komponenten der extrazellulären Matrix und eine tubulointerstitielle Fibrose charakterisiert[69]. Dabei scheinen interessanterweise die Veränderungen der extrazellulären Matrix die Basis für die renalen Dysfunktionen, wie Proteinurie, Hypertension und Niereninsuffizienz zu sein.

Für mich stellt sich nun die Frage, wie sich die oben genannten Proteine im hypertrophierten, hyperthyreoten Rattenherzen und in der hypertrophierten, hyperthyreoten Rattenniere verhalten.

Zusammenfassend kann man das Ziel dieser Arbeit folgendermaßen beschreiben: mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen soll der Einfluß des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin auf die extrazelluläre Matrix von Rattenherzen und -nieren, beziehungsweise den Einfluß auf Myosin, VEGF und ANF von Rattenherzen untersucht werden. Dabei soll beobachtet werden, ob die genannten Proteine auf der Ebene der mRNA im hyperthyreoten Zustand hoch- oder runterreguliert werden. Besonderes Augenmerk wird auf die Expression von Kollagen gelegt, da gerade seine Ablagerungen für eine verschlechterte Organfunktion und Fibrose verantwortlich sind.

Außerdem behaupten Studien von Eghbali et al. [70,71,72] und Karim et al. [73] während einer hyperthyreoten Stoffwechsellage eine Abnahme der Kollagen-mRNA im Rattenherzen beobachtet zu haben, wobei wir, bei einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, eher eine Zunahme des Kollagens erwarten.

2. Material und Methoden

2.1. Tierexperimentelles Vorgehen

Alle Tierversuche wurden von dem „University of Queensland Animal Experimentation Ethics Committee“ unter der Nummer Phys/Ph/534/97 und 544/98 genehmigt. Die Induzierung von Hyperthyreoidismus erfolgte durch tägliche subkutane Injektion von 1 mg/kg T3 in 25 Wistar-Ratten. Jeweils fünf Tiere erhielten diese Dosis über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d. Fünf unbehandelte Wistar-Ratten dienten als Kontrolltiere. 24h nach Gabe der letzten T3 Dosis wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Pentobarbitalinjektion (150 mg/kg) narkotisiert und anschließend getötet, Herzen und Nieren rasch entnommen, sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren, um einer Gewebezerstörung entgegenzuwirken, und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde dann, verpackt in Trockeneis, über den Luftweg nach Bad Nauheim transportiert und dort ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2. Verwendete c DNA-Klone

Tabelle 1: Verwendete cDNA-Klone

Klon	Spezies	Vektor	Insert	Northern Blot	Quelle
TGF-$ß_1$	human	*pGEM-4Z*	1,05 kb *Eco*R1	1,05 kb *Eco*R1	R. Derynck
Fibronektin I	rat	*pBS*	3,50 kb *Eco*R1	3,50 kb *Eco*R1	K. Boheler
Kollagen α_1(I)	human	*pBS SK*$^+$	1,46 kb *Eco*R1	1,46 kb *Eco*R1	ATCC
Laminin B_2	human	*pBR 322*	3,6 kb *Eco*R1	3,6 kb *Eco*R1	ATCC
α-Myosin	rat	*pBS*	0,14 kb *Eco*R1-*Hind*III	0,14 kb *Eco*R1-*Hind*III	Mercadier
ANF	rat	*pU9*	0,80 kb *Eco*R1-*Hind*III	0,80 kb *Eco*R1-*Hind*III	G. Potter
ß-Myosin	rat	*pBS*	0,26 kb *Eco*R1-*Hind*III	0,26 kb *Eco*R1-*Hind*III	Mercadier
VEGF 121	human	*pBS SK*$^+$	0,52 kb *Eco*R1-*Bam*H1	0,52 kb *Eco*R1-*Bam*H1	K. Weindel[151]
18s rRNA	mouse	*pUC830*	0,74 kb *SPH*I-*BAM*HI	0,77kb *Eco*RI-*Bam*HI	I. Oberbäumer[150]

2.3. Analyse von DNA und Präparation von Restriktionsfragmenten

2.3.1. Analyse von DNA im Agarose-Gel

Zur Isolierung der cDNA-Fragmente aus der Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsansatz hergestellt, in dem sich 30 μg Plasmid-DNA, 1-3 U des entsprechenden Restriktionsenzyms und der jeweils empfohlene Reaktionspuffer befand. Der Ansatz wurde mit A.dest. aufgefüllt und drei Stunden bei 37°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden zwei Agarose-Gele vorbereitet. Dazu wurde 0,7 g Agarose (Seakem GTG Agarose; Biozym, Hameln) in 100 ml 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, Sigma, München) im Mikrowellenherd aufgekocht und gelöst. Das Gemisch wurde auf 50°C abgekühlt und 2 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, um später im UV-Licht die DNA im Gel sichtbar zu machen. Eine kleine und eine große DNAGelkammer wurden vorbereitet, die Gele gegossen, jeweils ein Kamm eingesetzt und nach dem Aushärten mit 1 x TBE-Puffer aufgefüllt. Das kleine Gel wurde als Testgel verwendet, um beurteilen zu können, ob die Plasmid-DNA geschnitten worden war oder nicht. Aus dieser Absicht heraus wurden 5 μl der geschnittenen und 1 μl der ungeschnittene Probe mit 2 μl bzw. 5 μl Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF [Serva, Heidelberg], 15% Ficoll [Sigma, München] in A.dest.) versetzt und auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese bei etwa 75 V durchgeführt und die Banden unter UV-Beleuchtung betrachtet.

Stellte sich nun heraus, daß die Plasmid-DNA geschnitten wurde, gab man zu den restlichen Proben ebenfalls 0,1 Vol. Probenpuffer hinzu, trug die Proben auf das große Gel auf und ließ die Elektrophorese bei etwa 75 V 2h laufen.

Grund für die Auftrennung der DNA im elektrischen Feld ist das negativ geladene Zucker-Phosphat-Gerüst. Die DNA läßt sich somit durch die gewählte Porengröße des Geles der Länge nach auftrennen.

Zusätzlich zu den Proben wurde zur Größenabmessung auch ein Molekulargewichtsmarker geladen (λ-*Hind*III und ϕX174-*Hae*III, Gibco BRL, Eggenstein).

2.3.2. Isolierung von DNA-Fragmenten durch Adsorption an eine Silica-Matrix

Für diese Methode wurde das „Geneclean III-Kit“ (Bio 101, Hamburg) verwendet. Die Firma lieferte 6 M NaJ-Lösung, TBE-Modifizierer, Glasmilch (Silica-Matrix), „New Wash“-Lösung und „Elution Solution“ mit.

Die Bande mit dem cDNA-Fragment wurde aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und zusammen mit 0,45 Vol. NaJ und 0,5 Vol. TBE-Modifizierer in ein Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend erhitzte man das Gefäß auf 55°C bis die Agarose geschmolzen war. Dann wurde die Glasmilch hinzugegeben (5 μl zu bis zu 5 μg DNA) und 15 min bei Raumtemperatur belassen. Es folgte nun ein kurzes Abzentrifugieren, währenddessen sich die Glasmilch mit der gebundenen DNA zu einem Pellet absetzte. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 700 μl eiskalter „New Wash“-Lösung gewaschen. Der Vorgang des Waschens wurde 3 mal wiederholt. Dann pipettierte man die Waschlösung ab und resuspendierte das Pellet mit 10 μl Elution Solution. Abschließend wurde die Lösung zur Entfernung der Glasmilch 30 sek. bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der DNA vorsichtig abgenommen und in ein neues sauberes Eppendorfgefäß gegeben. Zur besseren Ausbeute wurde der Elutionschritt wiederholt und beide Überstände vereinigt. Die so gewonnene DNA wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4. Präparation und Analyse von RNA

2.4.1. Präparation von totaler RNA mit Hilfe einer Guanidin-Methode

2.4.1.1. Homogenisierung des Gewebes

Die Isolation von totaler RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi. Dabei wurde ein 14 ml Polypropylen-Röhrchen mit 4 ml Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung (4 M Guanidinium-Isothiocyanat [Serva, Heidelberg], 25 mM Natriumcitrat pH 7 [Roth, Karlsruhe], 0,5% Natrium-Sarcosyl [Sigma, München], 0,1 M Mercaptoethanol [Roth, Karlsruhe]) vorbereitet, 300 mg der Gewebeprobe direkt aus flüssigem Stickstoff hinzugegeben und mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (Jahnke und Kunkel, IKA Labortechnik) homogenisiert. Anschließend wurden 0,4 ml 2 M Natriumacetatlösung (ph 4,0), 0,8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 4 ml Phenol hinzupipettiert, gut geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben

bei 4°C und 8000 rpm für 40 Minuten abzentrifugiert (Sorvall, SS-34 Rotor, Du Pont, Bad Homburg). In der Zwischenzeit wurden 15 ml Corex-Röhrchen vorbereitet und die oberste, der nach dem Zentrifugieren entstandenen drei Phasen in das Corex-Röhrchen überführt. In diesem Schritt wurde die totale RNA von Proteinen und der DNA getrennt, die in der Interphase und der untersten organischen Phase zurückblieben.

2.4.1.2. Isolierung der RNA

Zu diesem Zweck wurden dem Corex-Röhrchen 4 ml Isopropanol hinzugefügt, das Ganze gemischt und die RNA bei -20°C 1h präzipitiert. Anschließend wurden die Röhrchen 30 min bei 4°C und 10000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das sich am Boden des Röhrchens gebildete Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde das Pellet in 800 μl Guanidinium-Isothiocyanat-Lösung gelöst, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 800 μl Isopropanol gemischt und mindestens 1h bei -20°C inkubiert. Die Eppendorfgefäße wurden anschließend 20 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, Vakuum-getrocknet und in 100 μl A.dest. für 10 min bei 65°C im Schüttelinkubator gelöst.

2.4.1.3. Quantifizierung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt. Dabei wurden jeweils 3 μl des entsprechenden RNA Ansatzes in 497 μl A.dest. verdünnt und die RNA Konzentration photometrisch bestimmt. 500 μl A.dest. dienten als Leerwert. Eine OD_{260} von 1,0 entspricht einer RNA-Menge von 40 μg/ml. Die Reinheit der RNA-Präparation läßt sich über die Ratio OD_{260}/OD_{280} ermitteln. Sie sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 einnehmen[74,75]. Zur Stabilisierung erfolgte die Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.4.2. Northern Blot Hybridisierung

2.4.2.1. Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

2.4.2.1.1. Gelpräparation

Zur Herstellung eines 1% Agarose-Gels wurden 2,5 g Agarose (Seakem LE, Biozym, Hameln) in 220 ml A.dest. und 25 ml 10 x MOPS-Puffer (0,2 M MOPS [Roth, Karlsruhe],

50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7) in einem Erlenmeyerkolben im Mikrowellenherd zum Kochen gebracht und vollständig gelöst. Nachdem die Agaroselösung auf 50°C abgekühlt war, wurden 13 ml Formaldehyd (37%, Merck, Darmstadt, Endkonzentration: 0,66 M)[76] hinzugegeben und das flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen, einen Probekamm eingesetzt und 30 min aushärten lassen.

2.4.2.1.2. Probenvorbereitung und Laufenlassen des Gels

In der Zwischenzeit wurden Eppendorfgefäße vorbereitet, 15 μg RNA eingefüllt und im Vakuum getrocknet, 12 μl Probenpuffer (750 μl deionisiertes Formamid [Gibco BRL, Eggenstein], 150 μl 10 x MOPS-Puffer, 240 μl Formaldehyd, 100 μl Glyzerin, 8 mg Bromphenolblau auf 1,5 ml mit A.dest.) und 1 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hineingegeben und 15min im Schüttelinkubator bei 65°C gelöst. Dabei kam es zu einer Denaturierung der RNA. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt.

Das nun in der Gelkammer erstarrte Gel wurde mit 1 x MOPS-Puffer bedeckt und die einzelnen Proben auf das Gel aufgetragen. Da RNA aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Gerüstes in der Lage ist im elektrischen Feld zu wandern, ermöglicht es eine Auftrennung der RNA ihrer Größe nach im denaturierenden Formaldehyd-Gel.

Die Gelelektrophorese wurde bei 100 Volt und etwa 4h Laufzeit durchgeführt.

Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurde das Gel 2min in A.dest. und 5min in 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7, Roth, Karlsruhe) gewaschen, um das Formaldehyd weitgehend zu entfernen.

2.4.2.2. RNA-Transfer aus dem Gel auf eine Membran (Kapillar-Blot)

Dann erfolgte der Transfer der RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran. Dazu brachte man eine Zellstofflage, die mindestens so dick war wie das Gel selbst, auf eine Glasplatte, die zwei mit 20xSSC Lösung gefüllte Pufferbehälter verband. Auf den Zellstoff kamen zwei Lagen Whatman 3MM-Papier, die in 10xSSC angefeuchtet wurden. Anschließend legte man auf das 3MM-Papier eine in A.dest. und anschließend in 10xSSC getränkte Nylonmembran (Duralon-UV Membranes, Stratagene, Heidelberg) in der Größe des zu blottenden Geles und auf diese Nylonmembran blasenfrei das Gel. Auf das nicht mit dem Gel bedeckte 3MM-Papier legte man eine Lage Frischhaltefolie, um zu vermeiden, daß der Puffer aus den Behältern direkt in die Zellstofflagen läuft. Danach wurden zwei Streifen 3MM-Papier auf das Gel gelegt, die so groß waren, daß sie das Gel vollständig bedeckten und an den Seiten in beide Pufferbehälter reichten. Anschließend wurde auf

den Stapel eine Glasplatte gelegt und mit 500 g Gewicht beschwert. Der 20xSSC-Puffer floß nun über die beiden Streifen 3MM-Papier durch das Gel in die Nylonmembran und wurde von der darunter liegenden Zellstofflage aufgesaugt. Dabei wurden die RNA-Moleküle aus dem Gel eluiert und auf die Membran geblottet. Der Transfer vollzog sich über 18h.

Anschließend wurde das Gel und die Membran auf dem Transilluminator (Herolab, UVT 2035) untersucht, um zu überprüfen, ob die RNA vollständig auf die Nylonmembran übergegangen war.

Danach wurde die Nylonmembran 1min in 2xSSC rotierend gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte mittels UV-Licht mit dem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, Heidelberg) bei 120 mJ/cm^2. Unter UV-Licht wurde die 18s- und die 28s-Bande auf der Membran mit Bleistift markiert. Die Membran wurde zwischen zwei Schichten Whatman 3MM-Papier im Dunkeln gelagert.

2.4.2.3. Radioaktive Markierung von cDNA-Proben

Zur Markierung der cDNA-Proben, die durch Einbau radioaktiver Desoxynukleotide während der DNA-Neusynthese erfolgte, wurde das „Rediprime DNA labelling system“ von Amersham verwendet. In diesem Kit waren enthalten das Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI, welches aufgrund seiner fehlenden 5'-3' Exonuklease-Aktivität bei der DNA-Synthese eingesetzt wurde, heterogene Nonadesoxynukleotide, die als Primer eingesetzt wurden und die das Klenow Fragment zur Initiierung dieses Prozesses an einer DNA-Matrize benötigte, da sie an vielen Stellen Hybride mit einzelsträngiger DNA bilden können, sowie ein Nukleotidmix, aus dATP, dGTP und dTTP.

Zur Denaturierung wurden 50 ng eines DNA-Fragmentes mit 45 μl A.dest. verdünnt und 5min aufgekocht. Anschließend wurde dieses Gemisch in ein vorgefertigtes Eppendorf-Gefäß mit der oben beschriebenen Mixtur von Amersham gegeben und gelöst. Es wurden 4 μl radioaktiv markiertes (α-^{32}P)dCTP vorsichtig hinzugefügt und 10min bei 37°C inkubiert.

Zur Messung der Menge an inkorporierten Nukleotiden wurde 1 μl des Ansatzes auf das Ende eines etwa 10 cm langen Streifens Whatman DE81-Papier getropft. Das Whatman DE81-Papier hat die Eigenschaft DNA im Gegensatz zu nicht inkorporierten Nukleotiden zu binden. Im Anschluß daran kam der Papierstreifen in eine Pufferwanne mit 0,5 M KH_2PO_4-Lösung (Merck, Darmstadt) als Laufpuffer. Die DNA wurde gebunden und blieb an der Auftragungsstelle zurück. Die nicht inkorporierten Nukleotide

wanderten mit der Laufmittelfront. Im Anschluß an die Papierchromatographie wurde der Papierstreifen unter Rotlicht getrocknet und direkt unter der Auftragsstelle abgeschnitten. Beide Papierstreifen wurden in Szintillationsröhrchen gesteckt und die Cerenkow-Strahlung gemessen. In der Regel wurden etwa 60-80% der eingesetzten Radioaktivität in die cDNA-Proben eingebaut mit einer spezifischen Aktivität von etwa 10^8 cpm/μg DNA.

2.4.2.4. Hybridisierung

Die geblottete Nylonmembran und etwa 0,1 ml/cm^2 Hybridisierungspuffer (50% deionisiertes Formamid, 10% Dextransulfat [Pharmacia, Freiburg], 1 M NaCl, 1% SDS, 100 μg/ml 5 SS-DNA) wurden in ein Glasröhrchen mit Schraubdeckelverschluß gegeben. Die Prähybridisierung fand in einem Rollofen (Bachofer, Reutlingen) bei 42°C 1h lang statt. Anschließend wurde die ^{32}P-markierte cDNA- Probe (siehe Kapitel 2.2.2.3) 5min aufgekocht, 1 x 10^6 cpm/ml in die Hybridisierungsröhrchen gegeben und 16h bei 42°C im Rollofen belassen. Danach wurde die radioaktive Flüssigkeit aus den Röhrchen entfernt und die Nylonmembran 3 x 15min mit einer stringenten Waschlösung (0,1 x SSC/0,1% SDS) bei 42°C gewaschen.

Die feuchte Membran wurde dann in Frischhaltefolie eingepackt und die Signale quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.2.5). Im Anschluß daran erfolgte die Autoradiographie, indem auf die Nylonmembran ein Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm gelegt wurde und je nach der eingesetzten cDNA-Probe bis zu 8 Tagen bei -80°C im Gefrierschrank belassen wurde. Die Abschätzung der Expositionszeit erfolgte während der Signalquantifizierung mit dem PhosphorImager. Anschließend wurde der Filter mit kochender 0,1 x SSC/0,1%SDS-Lösung dehybridisiert. Der Filter wurde mehrmals hintereinander mit unterschiedlichen cDNA-Proben hybridisiert. Am Schluß erfolgte die Hybridsierung mit einer 18S cDNA-Probe aus Kontrollzwecken.

2.4.2.5. Quantifizierung

Im Anschluß an die Hybridisierung erfolgte die Quantifzierung der Signale mit Hilfe des PhosphorImagers (Molecular Dynamics, Krefeld) unter Gebrauch der ImageQuant Software (Molecular Dynamics). Die Ergebnisse wurden normiert, um eventuelle unterschiedlich geladene Mengen an RNA zu berücksichtigen. Aus diesem Grund wurden die Werte für jedes Hybridisierungssignal durch die des entsprechenden 18S rRNA Signales geteilt.

Danach wurde der Mittelwert der Daten für die Rattenherzen und Rattennieren der Kontrolltiere errechnet und als 100% standardisiert. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Um Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Gruppen eines Tiermodells zu bestimmen, wurde der t-Test für verbundene Stichproben (2-seitige Fragestellung) beim Vergleich der für die experimentellen und Kontrollregion ermittelten Werte eingesetzt, sowie der t-Test für unverbundene Stichproben (2-seitige Fragestellung) durchgeführt. Die Werte galten als statistisch signifikant, wenn $p < 0,05$. Es wurde das Statistikprogramm Sigmastat 2.03 (SPSS Science, Erkrath) angewendet.

3. Ergebnisse

3.1. Auswirkungen des Hyperthyreoidismus auf Rattenherzen und Rattennieren

3.1.1. Genexpression in Rattenherzen

3.1.1.1. TGF-ß$_1$ Genexpression

Im Rattenherzen war für TGF-ß$_1$ eine Transkript der Größe von ca. 2,5 kb nachweisbar.

In diesem Modell wurde nach unterschiedlicher Behandlungsdauer mit T3 die Genexpression der Rattenherzen der behandelten Tiere mit denen der unbehandelten Kontrolltiere verglichen (Abb. 2).

Dabei konnte festgestellt werden, dass die TGF-ß$_1$ mRNA nach 0,5 und 1d einen signifikanten Anstieg auf das 1,5 ($p<0,05$) bzw. 1,6fache ($p<0,05$) der TGF-ß$_1$ Genexpression gegenüber den Kontrolltieren aufwies, der nach 1d in gradueller Weise wieder abnahm. Nach 3d T3 Behandlung war immer noch eine signifikante 1,5fache ($p<0,05$) Zunahme des mRNA-Spiegels im Vergleich zur Kontrollregion zu beobachten. Auch nach 7 bzw. 10d war sie immer noch höher als in den Herzen der Kontrolltiere, wenn auch nicht mehr signifikant. Dies konnte durch Quantifizierung der Daten bestätigt werden (Abb. 3).

3.1.1.2. Fibronektin Genexpression

Fibronektin exprimiert im Rattenherzen ein Transkript der Größe von ca. 7 kb.

Northern Blot Hybridisierungen (Abb. 4) und die anschließende Quantifizierung der Expression zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Fibronectin in den Herzen der behandelten und unbehandelten Kontrolltiere.

Allerdings gab es doch einen deutlichen Anstieg der Fibronektin mRNA Konzentration nach 1d Behandlung mit T3 (Abb. 5) zu beobachten. Nach längerer T3-Anwendungsdauer gingen die Werte fast wieder auf den Ausgangswert zurück.

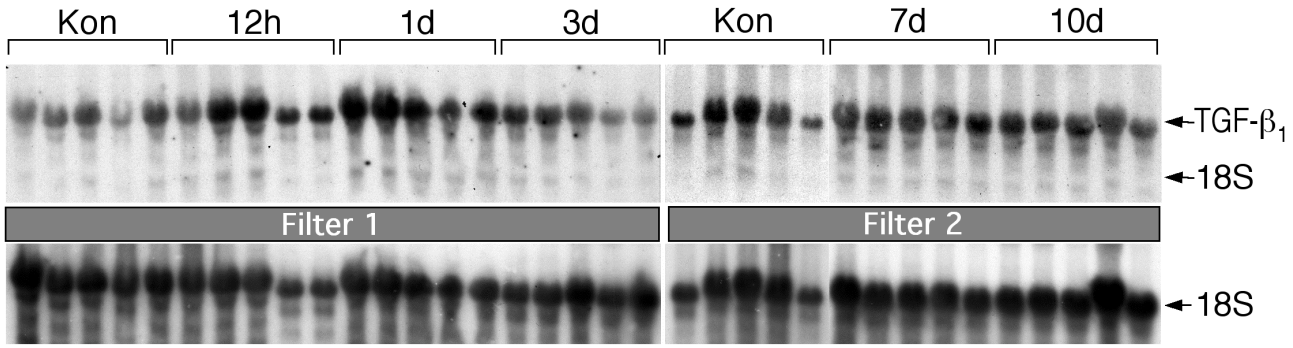

Abb. 2: Expression von TGF-β_1-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der TGF-β_1 Genexpression betrug 6d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

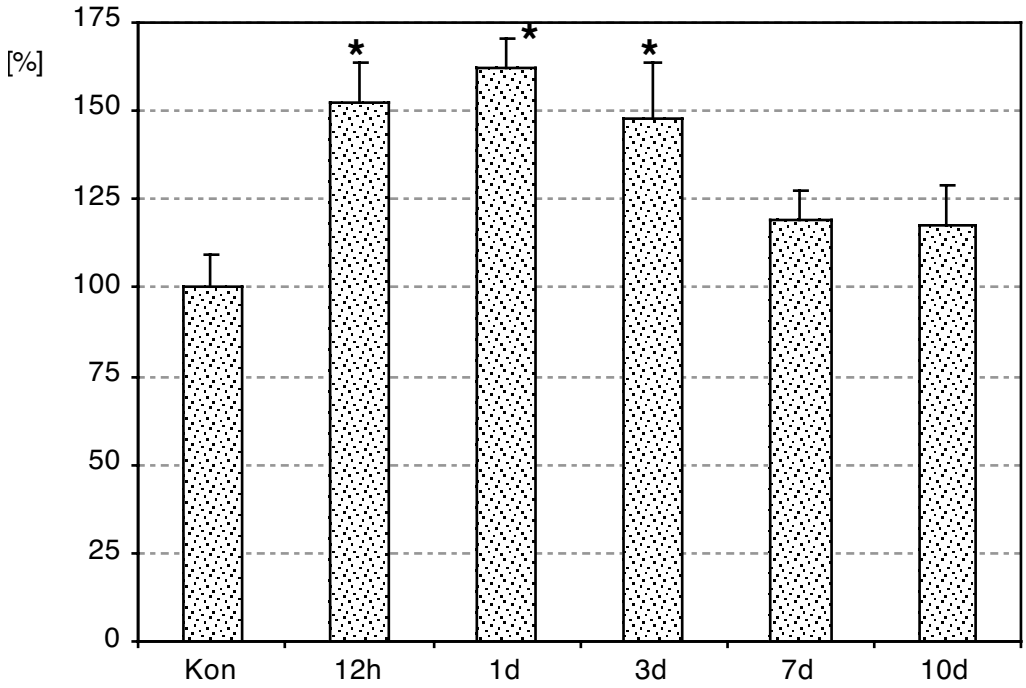

Abb. 3: Quantifizierung der TGF-β_1-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung*. Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

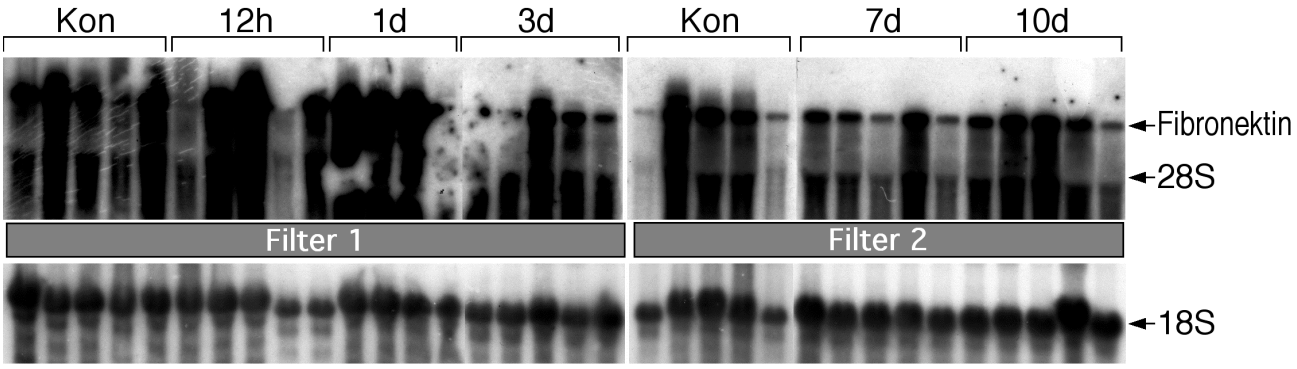

Abb. 4: Expression von Fibronektin-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Fibronektin Genexpression betrug 4d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

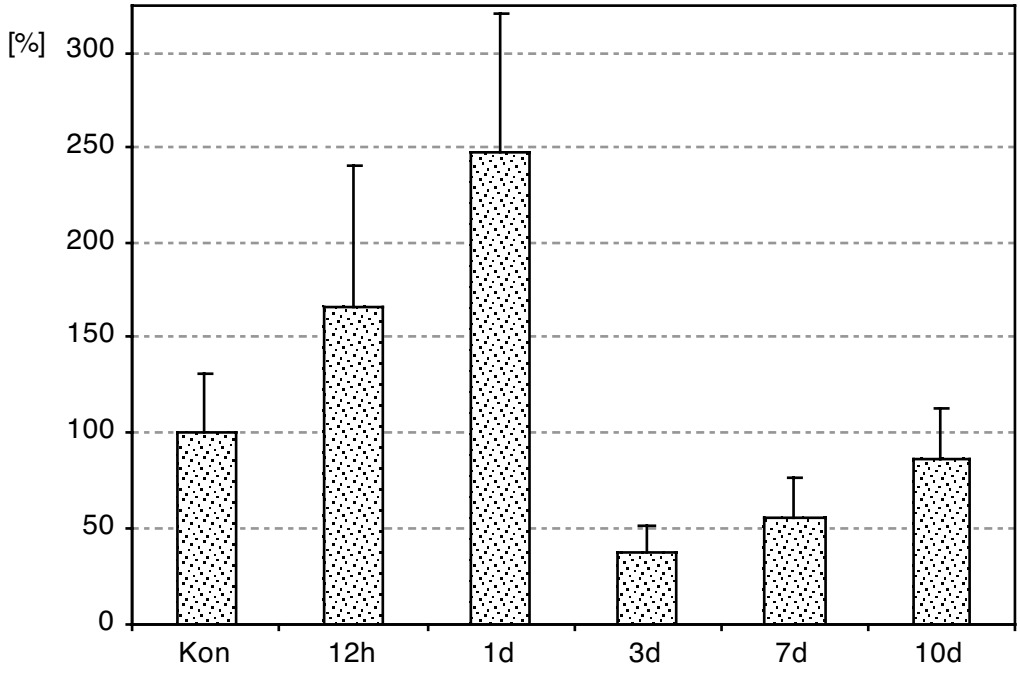

Abb. 5: Quantifizierung der Fibronektin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als*

Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.

3.1.1.3. Laminin B_2 Genexpression

In den mit T3 behandelten Rattenherzen ließ sich mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen ein Transkript der Größe von ca. 7.5 kb nachweisen (Abb. 6*)*.

Nach 0,5 Tagen T3-Gabe war eine minimale Abnahme der Laminin B_2 mRNA Konzentration zu beobachten. 1d T3-Applikation führte zu einem signifikanten 2,1 fachen Anstieg ($p<0,05$) der Transkripte im behandelten Rattenherzen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 7). Die Werte blieben dann an den folgenden Tagen unter dem Ausgangswert.

3.1.1.4. Kollagen α_1 (I) Genexpression

Im Rattenherzen waren für Kollagen α_1 (I) die Transkripte der Größe von ca. 6 und 7 kb nachweisbar.

Mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierungen (Abb. 8) konnte ein signifikanter Anstieg der Menge der Transkripte um etwa das 2,6fache ($p<0,05$) nach einem Tag T3-Behandlung (Abb. 9) gezeigt werden. Nach 3, 7 und 10d T3-Gabe war eine Expressionsabnahme unter die der Ausgangswerte zu beobachten.

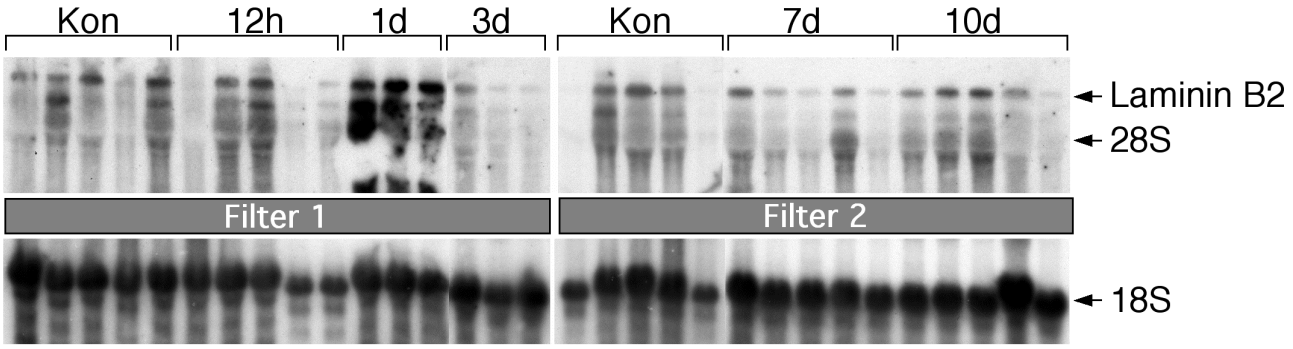

Abb. 6: Expression von Laminin-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Laminin-Genexpression betrug 5d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

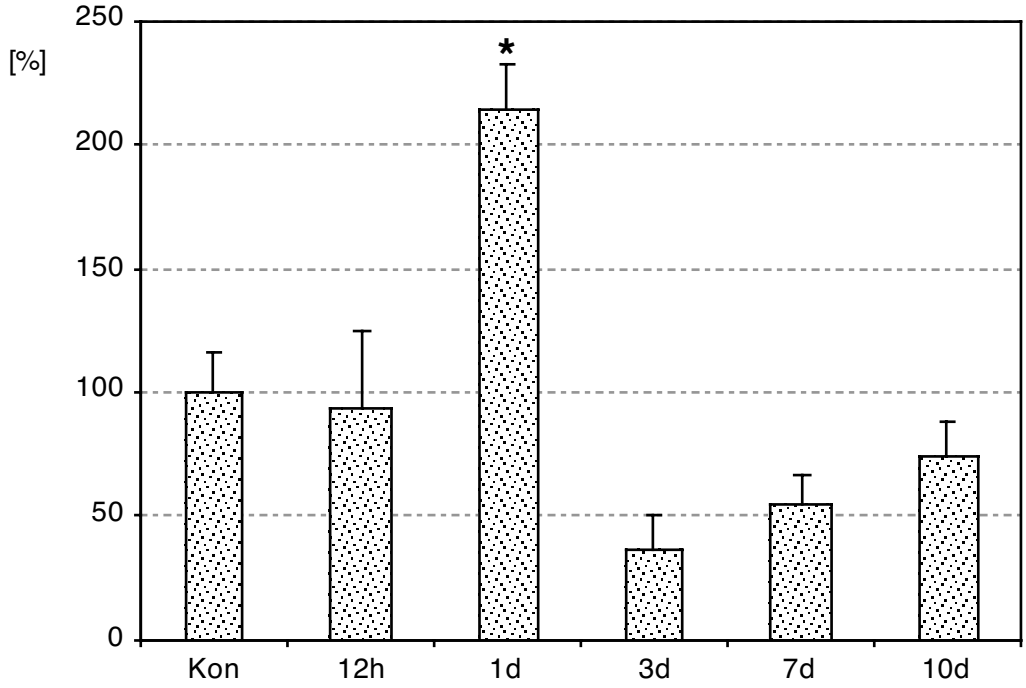

Abb. 7: Quantifizierung der Laminin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

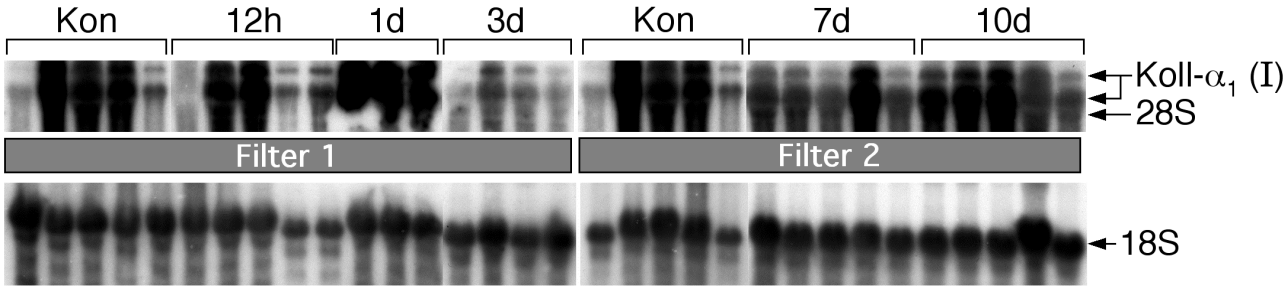

Abb. 8: Expression von Kollagen α_1 (I)-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Kollagen α_1 (I) Genexpression betrug 6d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt. Da es sich in diesem Fall um 2 Transkripte handelte, erfolgte die Bestimmung der Kollagen α_1(I) mRNA Konzentration nach densitometrischer Auswertung der Northern Blot Hybridisierungen der beiden jeweils zu einer Probe gehörenden Banden, und der Bestimmung der jeweiligen Mittelwerte, unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18S rRNA Signale.*

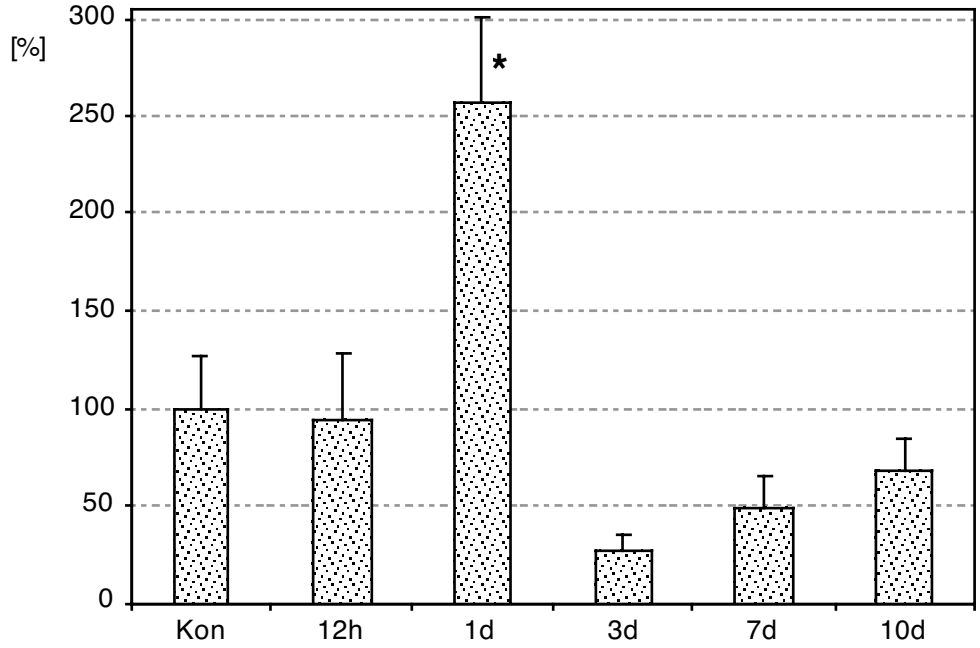

Abb. 9: Quantifizierung der Kollagen α_1 (I)-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

3.1.1.5. α-Myosin Genexpression

Für α-Myosin ließ sich mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierungen ein Transkript der Größe von ca. 6 kb nachweisen. (Abb. 10)

Nach 1d war eine signifikante 2fache Zunahme ($p<0,05$) der mRNA Konzentration mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierungen zu verzeichnen. Anschließend erfolgte am 3, 7 und 10d ein allmählicher Rückgang der Transkripte auf das Niveau der Ausgangswerte (Abb. 11).

Auffällig war auch hier, wie bei den extrazellulären Matrixproteinen und TGF-$ß_1$, ein starker und schneller Anstieg der α-Myosin mRNA Konzentration nach 1d. Allerdings war im Gegensatz zu diesen Proteinen nach 3d keine abrupte Abnahme, sondern ein allmähliches Abfallen der Transkripte zu beobachten.

3.1.1.6. ß-Myosin Genexpression

Myosin ß, bei der Ratte die embryonale und neonatale Isoform, exprimiert im Rattenherzen ein Transkript der Größe von ca. 6 kb (Abb. 12).

Nach 1d T3 Applikation zeigten die Northern Blot Hybridisierungen ein Abfall der Genexpression auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes. Am Tag 7 und am Tag 10 ließ sich eine signifikante Abnahme der Transkripte auf das 0,1 fache ($p<0,05$) bzw. auf das 0,08 fache ($p<0,05$) feststellen (Abb. 13) Nach 10 Tagen wurden also nur noch 8% des Ausgangswertes transkribiert.

In Gegensatz dazu nimmt die Expression von α-Myosin, der Isoform im adulten Tier, um das ca. 2fache nach 1d zu ($p<0.05$), um dann nach 10d wieder in etwa Normalwerte zu erreichen.

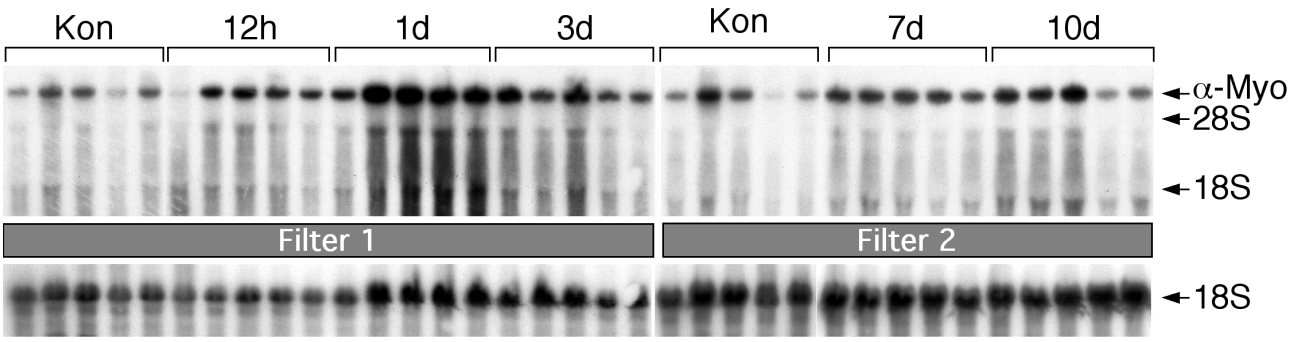

Abb. 10: Expression von α-Myosin-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der α-Myosin Genexpression betrug 5d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

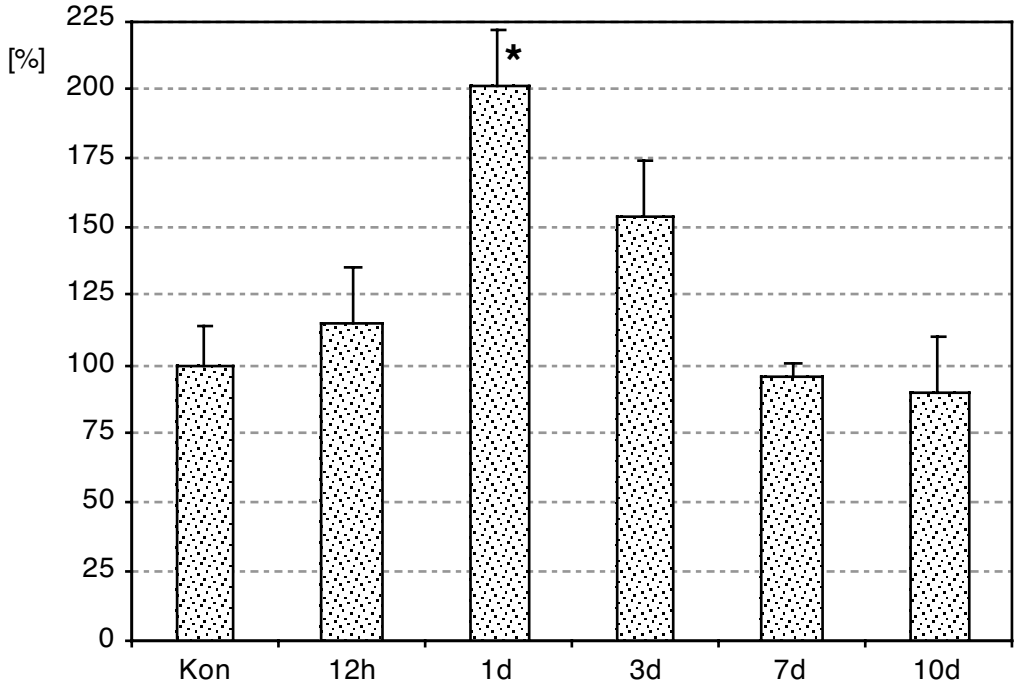

Abb. 11: Quantifizierung von α-Myosin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

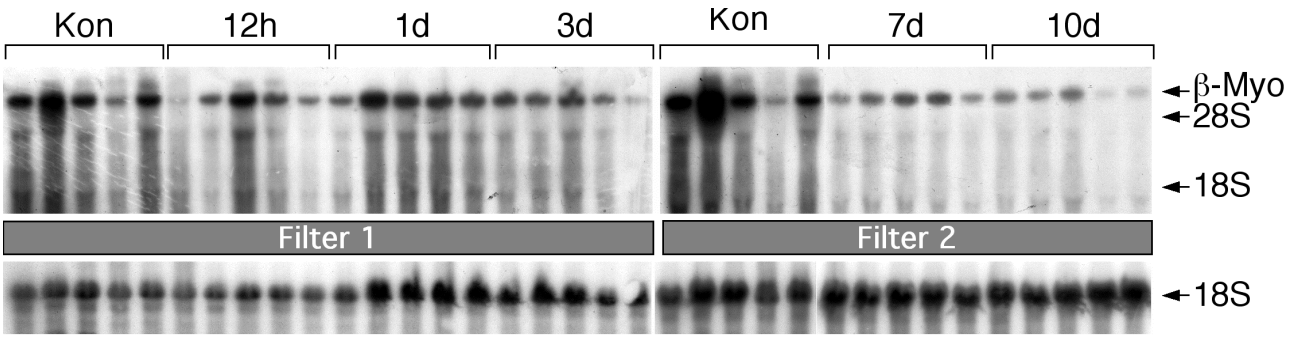

Abb. 12: Expression von β-Myosin-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der β-Myosin Genexpression betrug 7d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

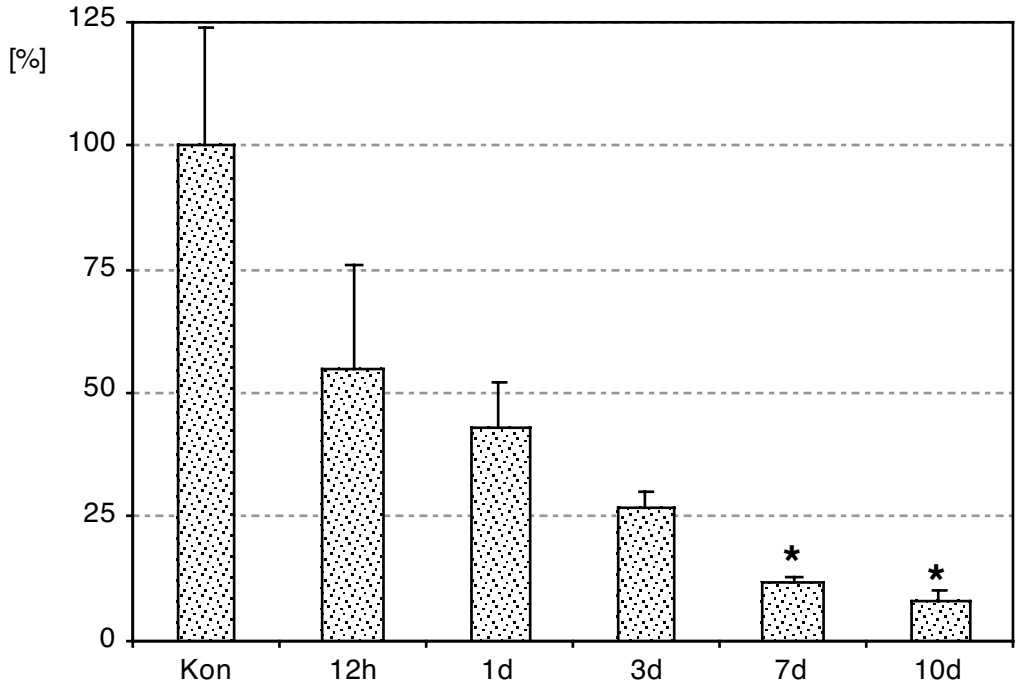

Abb. 13: Quantifizierung der β-Myosin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

3.1.1.7. ANF Genexpression

Im Rattenherzen war für ANF nach Northern Blot Hybridisierungen ein Transkript der Größe von ca. 1,7 kb nachweisbar (Abb. 14).

Insgesamt ergaben sich während der gesamten Behandlungsdauer keine signifikanten Unterschiede in der ANF mRNA Konzentration, allerdings eindeutige tendentielle Veränderungen. So wurde nach 0,5d T3 Applikation ein 1,7facher Anstieg der ANF Transkripte in den behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. Nach längerer T3 Behandlung gingen die ANF mRNA Konzentrationen unter den Ausgangswert zurück (Abb. 15).

3.1.1.8. VEGF Genexpression

In den mit T3 behandelten Rattenherzen ließ sich für VEGF mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen ein Transkript der Größe von ca. 3.9 kb (Abb. 16) nachweisen.

Keinerlei signifikante Veränderungen der VEGF mRNA Konzentration waren über die gesamte Zeitdauer auszumachen. Erwähnenswert war lediglich eine Tendenz zur Expressionsabnahme nach 7 bzw. 10d (Abb. 17).

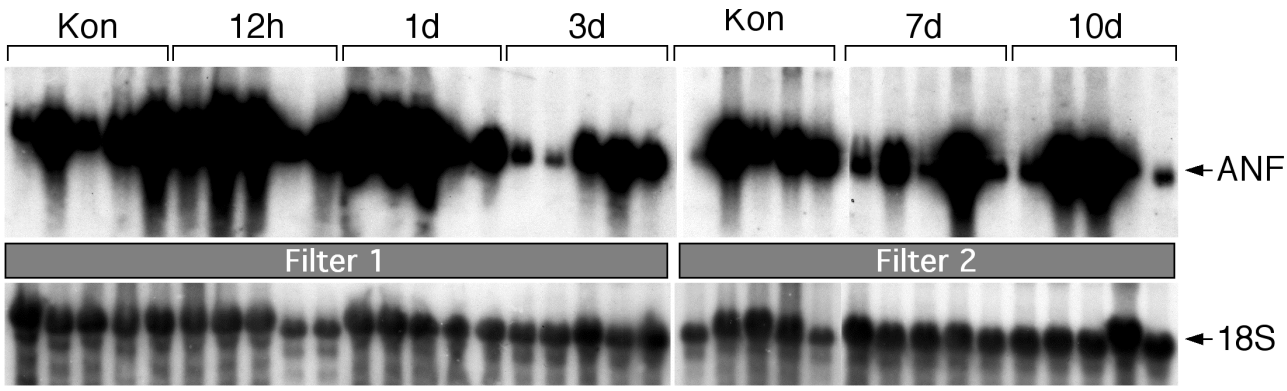

Abb. 14: Expression von ANF-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung*. Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der ANF Genexpression betrug 8d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

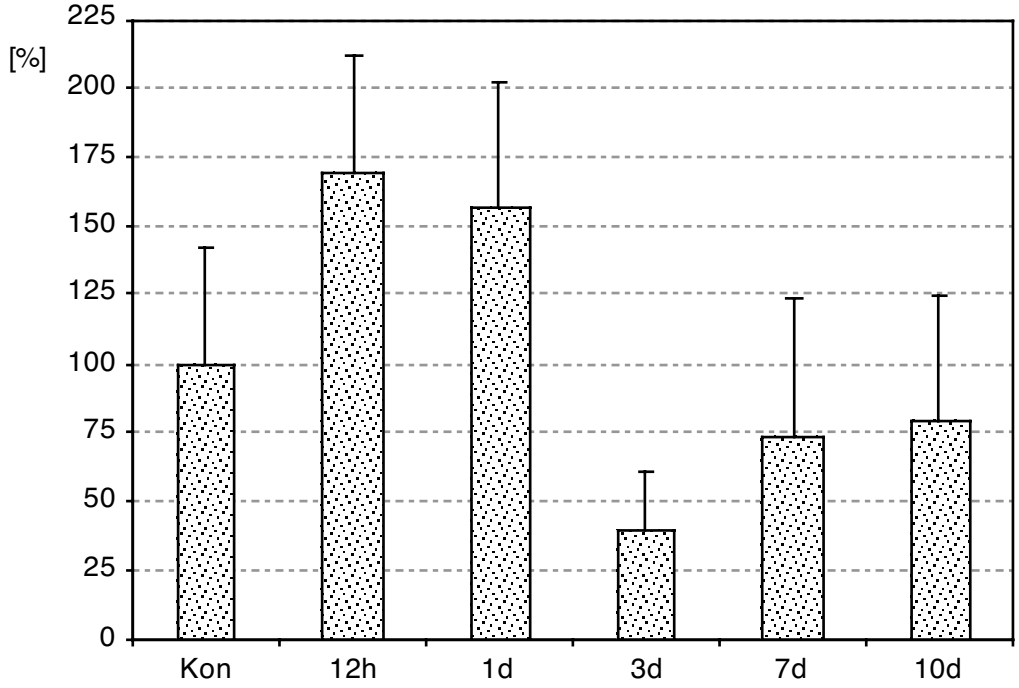

Abb. 15: Quantifizierung der ANF-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung*. Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

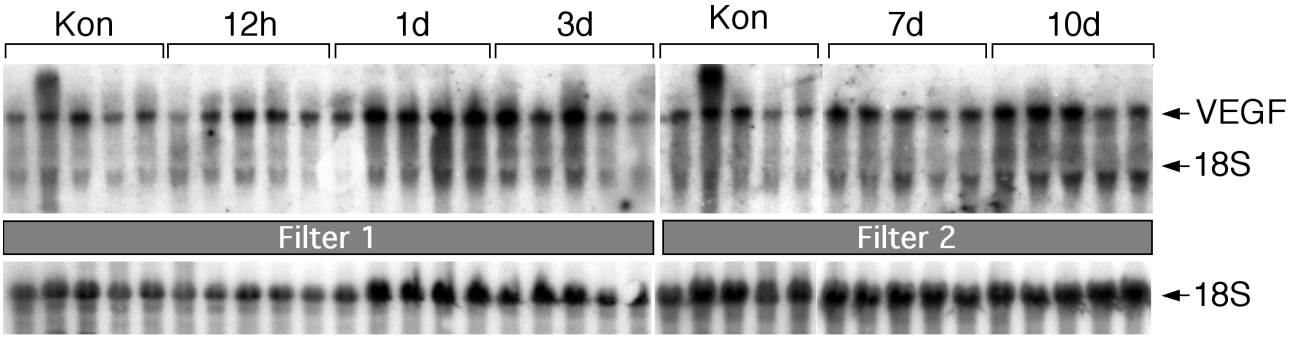

Abb. 16: Expression von VEGF-mRNA im Rattenherzen nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenherzen isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der VEGF Genexpression betrug 3d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

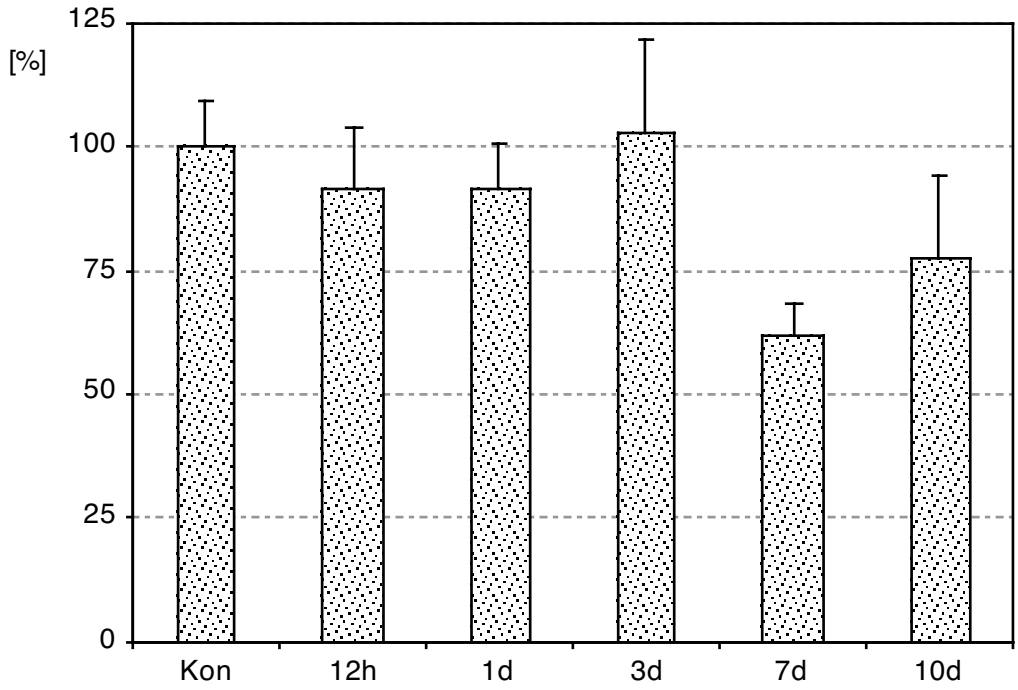

Abb. 17: Quantifizierung der VEGF-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

3.1.2. Genexpression in Rattennieren

3.1.2.1. TGF-$ß_1$ Genexpression

Mit Hilfe der Northern Blot Hybridisierungen war in den Rattennieren für TGF-$ß_1$ ein Transkript der Größe von ca. 2,5 kb nachweisbar (Abb. 18).

Nach 0,5 Tagen war eine signifikante maximale Zunahme der TGF-$ß_1$ mRNA Konzentration um das 1,4fache ($p<0,05$) im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (Abb. 19). 1d T3 Applikation führte zu einer Abnahme auf das 0,8fache der TGF-$ß_1$ Transkripte bei den behandelten Tieren. Nach 3,7 bzw. 10d nach der Induktion von T3 konnte man immer noch eine signifikante 0,4fache Abnahme ($p<0,05$) nach 3d bzw. eine 0,6fache Abnahme an den Tagen 7 und 10 ($p<0,05$; $p<0,05$) feststellen.

3.1.2.2. Fibronektin Genexpression

Für die Fibronektin mRNA war in den Rattennieren ein Transkript der Größe von ca. 7 kb nachzuweisen (Abb. 20).

Die Genexpression war während der T3 Applikation, bis auf den 0,5 Tag, über den gesamten Versuchszeitraum erhöht (Abb. 21). Signifikante Veränderungen waren nicht nachweisbar, allerdings war eine Tendenz hin zu erhöhten Fibronektin mRNA-Spiegeln nach 10d Versuchsdauer nachzuweisen.

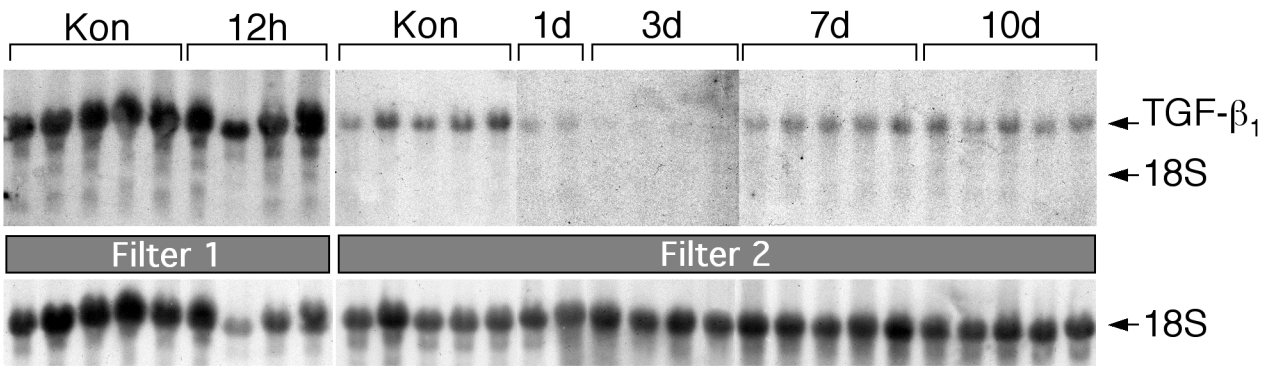

Abb. 18: Expression von TGF-β_1-mRNA in der Rattenniere nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattenniere isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der TGF-β_1 Genexpression betrug 6d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

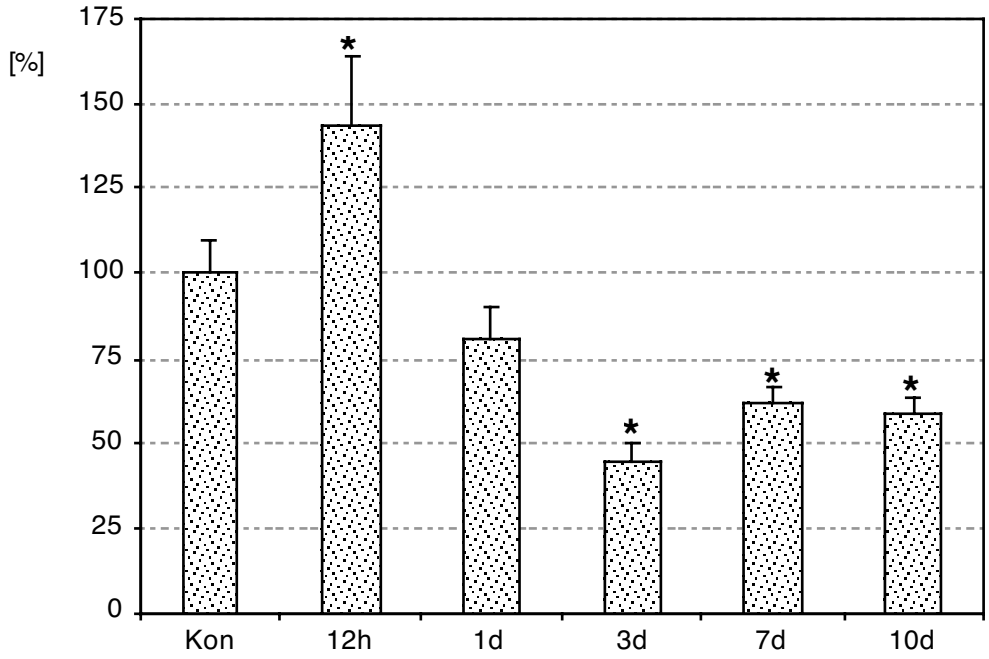

Abb. 19: Quantifizierung der TGF β_1 mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

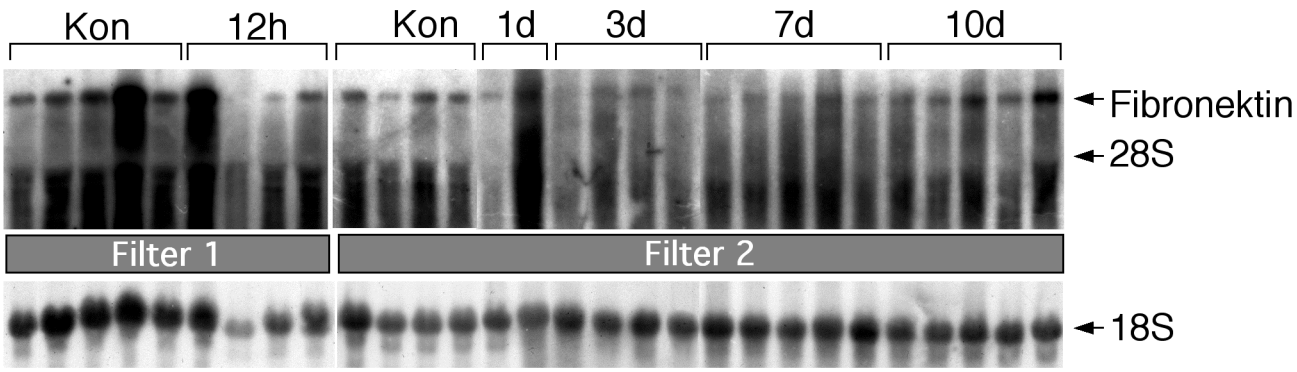

Abb. 20: Expression von Fibronektin-mRNA in der Rattenniere nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattennieren isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Fibronektin Genexpression betrug 4d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

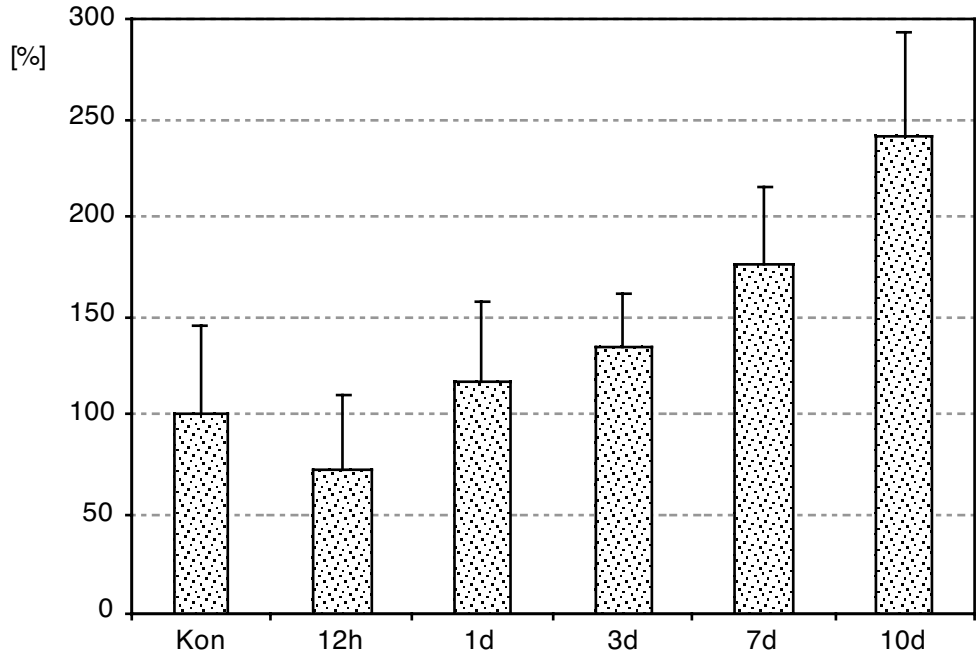

Abb. 21: Quantifizierung der Fibronektin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

3.1.2.3. Laminin B_2 Genexpression

Die mRNA für Laminin B_2 besitzt in der Rattenniere eine Größe von ca. 7,5 kb (Abb. 22)

Die Genexpression von Laminin B_2 war nach 1, 3, 7 und 10d T3 Applikation in den behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Abb. 23). Signifikante Zunahmen waren am 10d um das 2,6fache ($p<0,05$) zu beobachten.

Auffällig war ein kontinuierlicher Anstieg der Laminin B_2 mRNA Konzentration.

3.1.2.4. Kollagen α_1 (I) Genexpression

Kollagen α_1(I) exprimiert in der Rattenniere zwei Transkripte der Größe von ca. 6 und 7 kb (Abb. 24).

Die Kollagen α_1(I) mRNA Konzentration lag während der gesamten Behandlungsdauer mit T3 über dem Ausgangswert (Abb. 25). Ähnlich der Laminin und Fibronectin Genexpression konnte nach 10d T3 Applikation tendentiell die höchste Konzentration an Kollagen α_1(I) Transkripten festgestellt werden. Signifikante Ergebnisse konnte die statistische Analyse am 10d mit einer 2,8fachen Synthesesteigerung ($p<0,05$) erbringen.

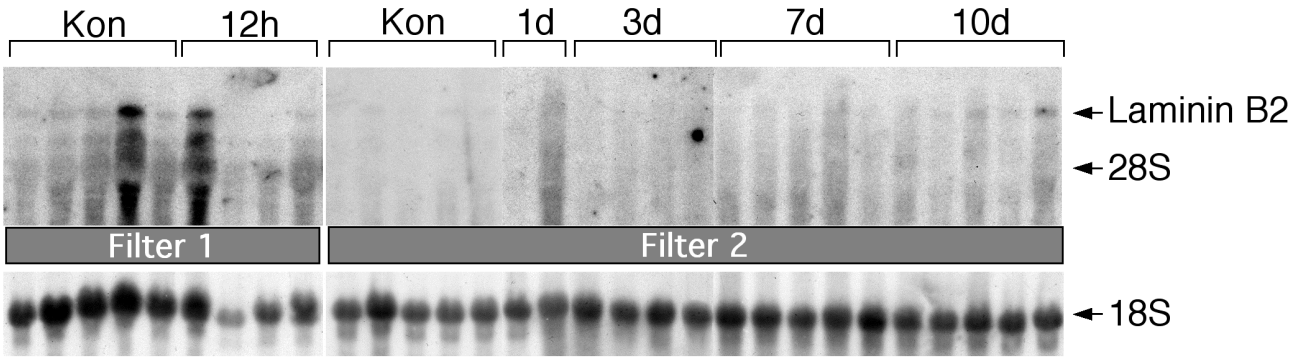

Abb. 22: Expression von Laminin-mRNA in den Rattennieren nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattennieren isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Laminin Genexpression betrug 5d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

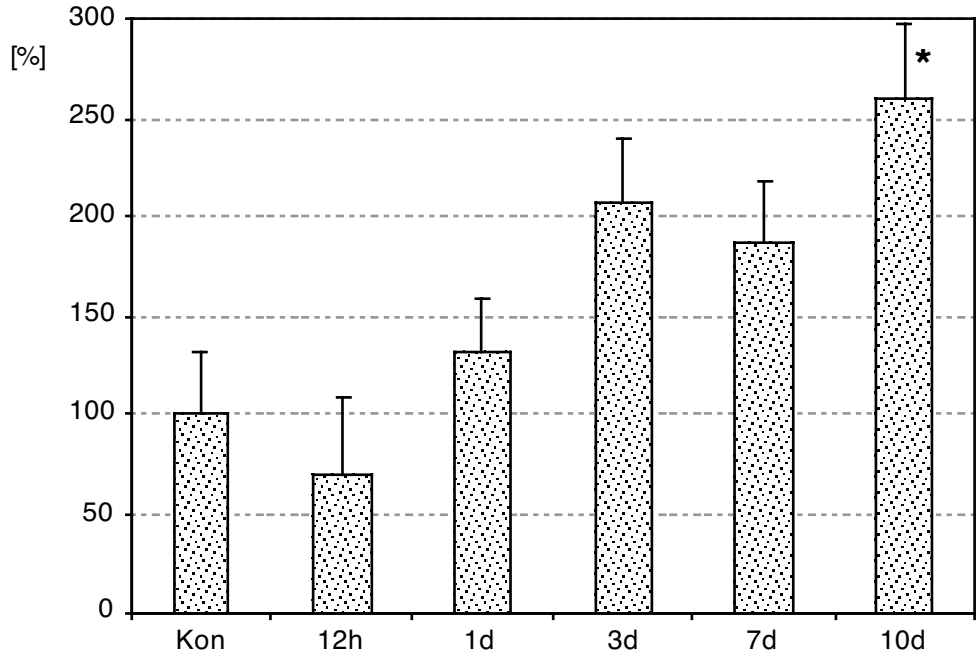

Abb. 23: Quantifizierung der Laminin-mRNA Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert.*

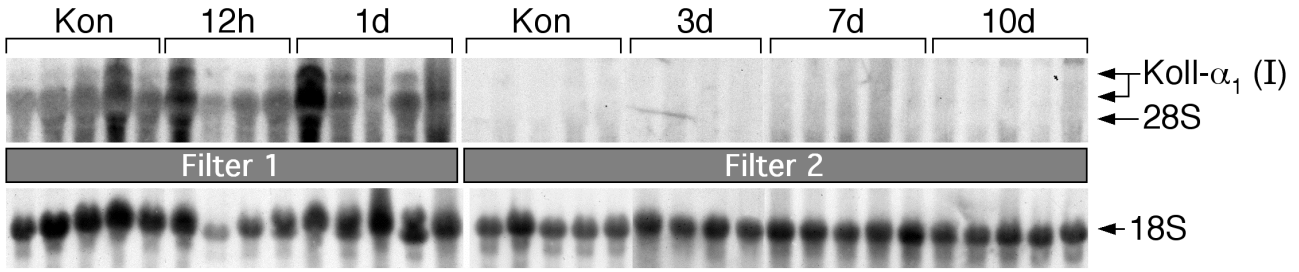

Abb. 24: Expression von Kollagen α_1 (I) mRNA in den Rattennieren nach Trijodthyronin-Behandlung. *Totale RNA wurde nach täglicher subcutaner Injektion von 1 mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über einen Zeitraum von 12h, 24h, 3d, 7d und 10d aus den Rattennieren isoliert und bei Northern Blot Hybridisierungen eingesetzt. Dabei wurden, aufgrund der hohen Anzahl, die Proben auf zwei Filter verteilt und über die zugehörigen Kontrollwerte normiert. Die Expositionszeit zur Bestimmung der Kollagen α_1 (I) Genexpression betrug 6d. Die Markierungen der 28s bzw. 18s entsprechen ungefähren Angaben. Die konstante Auftragung der RNA-Proben wurde durch Hybridisierung mit 18s cDNA beurteilt.*

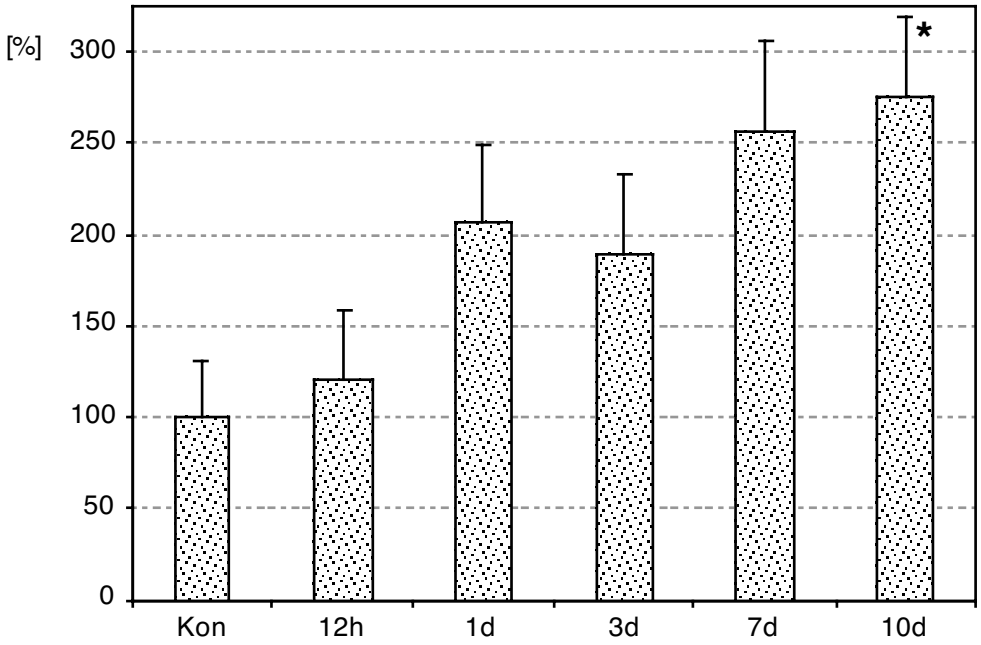

Abb. 25: Quantifizierung der Kollagen α_1 (I) Expression nach Trijodthyronin-Behandlung. *Die Bestimmung der mRNA Konzentration erfolgte nach densitometrischer Auswertung von Northern Blot Hybridisierungen unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18s rRNA Signale. Dabei wurden die Änderungen in der Genexpression im obigen Säulendiagramm aufgezeigt. Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Genexpression der Kontrolltiere wurde als 100% standardisiert. Da es sich in diesem Fall um 2 Transkripte handelte, erfolgte die Bestimmung der Kollagen α_1(I) mRNA Konzentration nach densitometrischer Auswertung der Northern Blot Hybridisierungen der beiden jeweils zu einer Probe gehörenden Banden, und der Bestimmung des jeweiligen Mittelwertes, unter Normierung der Daten auf die Werte der entsprechenden 18S rRNA Signale.*

4. Diskussion

4.1. Die Bedeutung der ”Extrazellulären Matrix”

Das Interstitium ist das Areal, das sich zwischen den organpezifischen Zellen, wie den Myozyten im Herzen, befindet. Es enthält die extrazelluläre Matrix, die zum einen aus den extrazellulären Matrixproteinen, wie Kollagen, Fibonektin und Laminin, zum anderen aus den Zellen, die sie synthetisieren, d.h. hauptsächlich Fibroblasten[77] besteht.

Die Matrixproteine wiederum lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen, nämlich die Glukosaminoglykane und die Faserproteine. Die wiederum selbst lassen sich in Strukturproteine, wie Kollagen, und in Adhäsionsproteine, wie Fibronektin und Laminin, unterteilen.

Die extrazelluläre Matrix stellt das strukturelle und protektive Grundgerüst der Organe dar und verbindet im Herzen die Myozyten untereinander, richtet die kontraktilen Elemente aus, verhindert die Übersteckung und Unterbrechung der Myozyten, überträgt Kraft und gibt eine Zugfestigkeit, die einer Ruptur vorbeugt. Die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix sind Kollagen und Fibronektin.

Herzkrankheiten und Nierenkrankheiten, wie durch Diabetes mellitus oder Bluthochdruck verursacht, gehen mit einer Erhöhung des Kollagens und Fibronektins einher. Dieser Vorgang wird als Fibrose bezeichnet. Insbesondere die myokardiale Fibrose wird auch als eine der bedeutendsten Grundlagen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz betrachtet.[78]

Weber und Mitarbeiter[79] unterscheiden die perivaskuläre-interstitielle Fibrose von der reaktiven Fibrose.

Die kardiale perivaskuläre Fibrose, geht einher mit einer Anhäufung insbesondere des Kollagens Typ I in der Adventitia der intramyokardialen Koronararterien und Arteriolen und breitet sich progressiv in benachbarten interstitiellen Räumen aus und verursacht eine interstitielle Fibrose. Die perivaskuläre Fibrose ist nicht zu verwechseln mit der reaktiven Fibrose, die als Reaktion auf nekrotisierendes Parenchym, wie beispielsweise beim Myokardinfarkt, entsteht und auch Ersatzfibrose genannt wird.

Eine Fibrose im Interstitium führt zu einer erhöhten Steifigkeit des Gewebes und zu einer verminderten Organfunktion, im Falle des Herzens auch zu Arrhythmien. Bei der Entstehung einer Fibrose spielt das Renin-Angiotensin-System, und insbesondere das

Angiotensin II als Stimulator der TGF-ß$_1$-Synthese, eine besondere Rolle[80]. (s. 4.2.1) So spielt die ausgewogene Synthese und der Abbau der Matrix eine Schlüsselrolle in der normalen Entwicklung von Organen und deren Funktion.

4.2. Myokardiale Genexpression der extrazellulären Matrix-proteine

4.2.1. TGF-ß$_1$

TGF-ß (=transforming growth factor-ß) ist ein Polypeptid, das Zellwachstum und –differenzierung kontrolliert. Es existieren fünf unterschiedliche Formen, TGF-ß$_1$-TGF-ß$_5$, von denen drei, TGF-ß$_1$-TGF-ß$_3$, in Säugetieren vorkommen[73]. Zwei dieser Formen, TGF-ß$_1$ und TGF-ß$_3$ existieren vorwiegend im Myokardium.

TGF-ß$_1$ wird aus Fibroblasten aber nicht aus Myozyten freigesetzt[81]. Ihm werden wichtige regulatorische Effekte zugeschrieben. Dies betrifft sowohl die Funktion der Myozyten, als auch die der Fibroblasten des Herzens.

Es wird beschrieben, daß TGF-ß$_1$ die Aktivität von Wachstum und Kontraktilität in neonatalen, kardialen, kultivierten Myozyten beeinflußt[82]. In kultivierten, kardialen Fibroblasten des Kaninchens ist TGF-ß$_1$ als wichtiger Faktor der Regulation der Kollagensynthese im Myokardium enttarnt worden[83]. Eghbali beschreibt eine Zunahme der Kollagen I-mRNA und Kollagen III-mRNA um 112% bzw. 97% nach einer 24stündigen Behandlung der Fibroblasten mit TGF-ß$_1$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen[83]. Dies weist darauf hin, daß TGF-ß$_1$ ein Hauptregulator der Kollagenbiosynthese darstellt und somit mitverantwortlich ist für die myokardiale Fibrose. Außerdem stellen Fibroblasten einer der Hauptangriffspunkte von TGF-ß$_1$ dar.

Ähnliche Beobachtungen sind von Ignotz und Mitarbeiter[84] für Kollagen und Fibronektin gemacht worden. Auch hier hat der Zusatz von TGF-ß$_1$ zu kultivierten Fibroblasten zu einer Erhöhung der Fibronektin- und Kollagen-mRNA geführt und deren Inkorporation in die extrazelluläre Matrix gefördert.

Villarreal und Dillmann[85] konnten eine Erhöhung der TGF-ß$_1$-mRNA in vivo beobachten. Mit Hilfe von ”thoracic aortic banded” Ratten, einem Tiermodell, bei dem die Aorta thoracalis mechanisch verengt wird und als Folge dessen eine Hypertonie und kardiale Hypertrophie verursacht wird (s.auch 4.2.2 und 4.2.3), konnte eine Erhöhung der

TGF-ß$_1$-mRNA um das 1,9fache nach 12h und um das 1,1fache gegenüber den Kontrolltieren nach 1d festgestellt werden. Nach 7d waren die Werte in etwa wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere. Am ersten Tag wurde gleichzeitig mit der Erhöhung von TGF-ß$_1$ eine Erhöhung der Fibronektin-mRNA, nicht aber der Kollagen I-mRNA, um das 2,5fache beschrieben, wobei Fibronektin und Kollagen I am dritten Tag ihr Maximum ihrer Steigerung erreichten und bis zum 7d wieder zu den Kontrollwerten zurückkehrten. (s.auch 4.2.2 und 4.2.3) Auffällig war, daß das Maximum der TGF-ß$_1$-mRNA den höchsten Werten, die für Kollagen I-mRNA und Fibronektin-mRNA am 3d entdeckt wurden, vorausging.

Spontane hypertensive Ratten zeigten im Stadium der Herzinsuffizienz neben der Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine auch eine signifikante Erhöhung der TGF-ß$_1$-mRNA, die einherging mit einer erhöhten kardialen Muskelsteiffheit[65,68]. (s. auch 4.2.2, 4.2.3, 4.3 u. 4.5) Im Gegensatz zu meiner Studie und den oben beschriebenen hypertensiven Experimenten von Villarreal und Dillmann[85], bleibt die TGF-ß$_1$-mRNA bei spontan-hypertensiven Ratten im Stadium der Herzinsuffizienz auf etwa gleichem Niveau erhöht.

Es kann davon ausgegangen werden, daß TGF-ß$_1$ eine wichtige Rolle in der Ablagerung der extrazellulären Matrixproteine und somit in der Entwicklung der myokardialen Fibrose spielt. Wie weiter oben ja schon erwähnt, konnten Eghbali und Mitarbeiter nachweisen, daß der Zusatz von TGF-ß$_1$ zu kultivierten kardialen Fibroblasten eine Steigerung der Genexpression des Kollagens hervorgerufen hat[83]. Daher wäre es interessant zu wissen, welche physiologischen Ereignisse für eine gesteigerte TGF-ß$_1$-Expression verantwortlich sind. Wie in den obigen Abschnitten beschrieben, führt eine Druckerhöhung im vaskulären System, beobachtet beim ”thoracic aortic banding” und spontanen hypertensiven Ratten, zu einer Hypertonie und infolgedessen zur kardialen Hypertrophie und zu einer Erhöhung von TGF-ß$_1$. Aber auch die schilddrüsenhormoninduzierte kardiale Hypertrophie geht einher mit einer Erhöhung von TGF-ß$_1$-mRNA, wie in dieser Arbeit gezeigt, wie aber auch von Eghbali und Mitarbeiter[83] beobachtet.

Angiotensin II wird als potentieller humoraler Faktor beschrieben, der zur Entwicklung einer erhöhten Kollagenablagerung während der myokardialen Hypertrophie beiträgt[86]. In kultivierten kardialen Fibroblasten der Ratte wurde Angiotensin II als Stimulator der TGF-ß$_1$-mRNA Produktion beschrieben.[87] TGF-ß$_1$ wiederrum ist in der Lage die Genexpression von Kollagen zu steigern[83], so daß nach dieser Theorie zusammengefaßt,

eine myokardiale Hypertrophie und Herzfibrose über die Reaktionskette Angiotensin I, TGF-$ß_1$ und Kollagen verursacht werden könnte.

Eine andere Theorie für eine vermehrte Freisetzung von TGF-$ß_1$ während der Entwicklung einer beispielsweise hochdruckbedingten Herzhypertrophie, ist die mechanische Deformation von Zellen, wobei nur indirekte Beweise dafür existieren[88].

In meiner Studie wurde eine Hypertrophie des Herzens in kurzer Zeit durch die tägliche Applikation des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin verursacht. Nach 12h war eine 1,5fache signifikante Zunahme der TGF-$ß_1$-mRNA zu verzeichnen, nach 1d erreichte sie ihr Maximum mit einer signifikanten 1,6fachen Zunahme gegenüber den Kontrolltieren. Nach 7 bzw. 10d sanken die Werte, waren aber immer noch höher als die der Kontrollen. (s. 3.1.1.1)

Meine Ergebnisse sind ähnlich ausgefallen, wie die von Villarreal und Dillmann[85]. (s.o.) Infolgedessen wäre für die Erklärung der Ergebnisse dieser Studie ebenfalls die Theorie denkbar, die schilddrüsenhormoninduzierte Herzhypertrophie und Veränderung der extrazellulären Matrix sei über eine Stimulation von Angiotensin II und infolgedessen von TGF-$ß_1$ und Kollagen verursacht worden. Es ist bekannt, daß eine druckbedingte Hypertrophie und darausfolgende Veränderung der extrazellulären Matrix, wie bei Villarreal und Dillmann beschrieben[85], in Zusammenhang steht mit dem Renin-Angiotensin-System und somit auch mit Angiotensin II.

Die in meiner Arbeit beobachteten Resultate sagen nichts darüber aus, ob die vermehrte Synthese der TGF-$ß_1$-mRNA auch letztendlich zum Endprodukt Protein führt. Allerdings zeigt meine Studie, ähnlich der von Villarreal und Dillmann[85], daß die Synthese der TGF-$ß_1$-mRNA der mRNA, die für die extrazellulären Matrixproteine kodiert, vorausgeht. Das bedeutet, daß TGF-$ß_1$ signifikant nach 12h auf das 1,5fache ansteigt und sein Maximum, eine signifikante 1,6fache Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren, nach 1d Hyperthyreoidismus erreicht. Kollagen, Fibronektin und Laminin weisen nach 12h noch keine Synthesesteigerung auf, erreichen jedoch nach 1d Maximalwerte.

Falls die mRNA tatsächlich in das aktive Endprodukt übersetzt werden sollte, lassen diese Beobachtungen vermuten, daß die frühe Bildung des TGF-$ß_1$ auf einem autokrinen oder parakrinen Wege agieren könnte, um die Genexpresion der extrazellulären Matrixproteine Kollagen, Fibronektin und Laminin zu regulieren.

4.2.2. Kollagen

Die Kollagenfasern des Herzens bestehen zum größten Teil aus den fibrillären Kollagenen I und III, wobei Kollagen I mehr als 80% des Kollagens des ventrikulären Myokardiums ausmacht.

Kollagen I ist ein Heterotrimer und bildet eine Trippelhelix mit sich den wiederholenden Sequenzen Hydroxyprolin-Glycin-Prolin. Durch die parallel angeordneten stabförmige Fasern, die zwischen 50 und 150 nm im Durchmesser messen, gibt Kollagen I dem Gewebe Zugstärke.

Kollagen III ist ein Homotrimer, das im Gewebe um die Kollagenfasern ein feines Fasernetzwerk bildet.

Für die Synthese des Kollagens im Herzen sind Fibroblasten verantwortlich. Die Kollagensynthese und der -abbau werden sehr genau koordiniert. Gealtertes Kollagen wird mit Hilfe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), insbesondere MMP-1 und MMP-8 (Kollagenasen) abgebaut. Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) kontrollieren die Aktivität der MMPs.[89]

In unseren Versuchen wurde die Reaktion der mRNA von Kollagen I auf die tägliche Applikation von Trijodthyronin untersucht, und festgestellt, daß die Kollagen-mRNA nach einem Tag Hyperthyreoidismus ihr Maximum erreichte und an den folgenden Tagen unter den Ausgangswerten blieb. (s. auch 3.1.1.4)

Ähnliche Beobachtungen wurden während der hypertensiven Hypertrophie gemacht. Ein Beispiel ist auch hier die spontane hypertensive Ratte. Bing und Mitarbeiter beobachteten einen deutlichen Anstieg der Kollagen I-mRNA im Stadium der Herzinsuffizienz[65,66,67]. Sowohl für die Kollagen I-mRNA, als auch für die Kollagen III-mRNA[68] war der Wert um das drei- bis vierfache gegenüber den gleichaltrigen Kontrolltieren erhöht. Eine mRNA-Erhöhung mit ähnlichen Werten ist bei den hypertensiven Ratten ebenfalls für die Fibronektin-mRNA beschrieben worden. (s. 4.2.3) Im Gegensatz zu unserem Experiment blieben die Werte für Kollagen und Fibronektin während der Herzinsuffizienz bei den spontan hypertensiven Ratten erhöht.

In dem Experiment von Villarreal und Dillmann[85], die mit der Methode des ”thoracic-aortic-banding” (s. 4.2.1) eine Hypertonie in Ratten verursachten, reagierte Kollagen I ähnlich wie in meinen hyperthyreoten Tieren. Im Gegensatz zu den, in dieser Arbeit, mit Trijodthyronin behandelten Ratten waren die Werte für die Kollagen I-mRNA am ersten Tag fast identisch mit den Daten der Kontrolltiere, erreichten ihr Maximum nach drei

Tagen und gingen nach 7d "thoracic-aortic-banding" wieder auf Kontrollwerte zurück. In ähnlicher Weise wie Kollagen I verhielt sich unter anderem in diesem Experiment auch die Kollagen III-mRNA. Die Daten von Villarreal und Dillmann[85] stimmen mit einer Studie von Chapman und Mitarbeiter überein, die Hypertonie durch Ligieren der Aorta abdominalis und der rechten Arteria renalis hervorriefen[90].

Entgegengesetzte Aussagen zu unseren Ausführungen machen Eghbali und Mitarbeiter[70,71,72,91], die, unter Einfluß von Schilddrüsenhormonen eine Abnahme der Kollagen-mRNA beobachtet haben.

Bei Eghbali gibt es methodisch einige Unterschiede zu unseren Versuchen. Zum einen bediente sie sich in ihren Studien[70,71,72] der intraperitonealen Applikation von L-Thyroxin, statt des stärker wirksamen Trijodthyronins, und zum anderen benutzte sie eine wesentlich geringeren Hormondosis, nämlich 1 μg/kg Körpergewicht statt 1 mg/kg Körpergewicht. Weiterhin wurde repräsentativ für den Kollagentyp I die Genexpression von pro Kollagen α_2(I) im Unterschied zu der in dieser Studie verwendeten Kollagen α_1(I)-bestimmt.

Trotz des geringer wirksamen L-Thyroxins und trotz der erheblich geringeren Hormonkonzentration berichtet Eghbali von eine drastische Beeinflussung der Kollagen I-mRNA-Konzentration. Schon nach 2h L-Thyroxin-Behandlung beschreibt sie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren eine signifikante Abnahme der pro-Kollagen α_2(I)-mRNA um 53%, die ihren tiefsten Wert, eine Abnahme um 60%, nach 1 Tag erreicht hat und nach 12 Tagen in etwa wieder auf die Werte der Kontrolltiere angestiegen war. Diese Beobachtungen würden mit einem Fehlen einer Fibrose, trotz der Induktion einer Herzhypertrophie einhergehen, was sie auch immunhistochemisch nachgewiesen hat. Parallel dazu beschreibt sie eine Zunahme von TGF-ß$_1$, in ähnlicher Weise, wie auch ich sie beobachten konnte, und eine Proliferation der Fibroblasten.

Die Resultate der Kollagen-mRNA von Eghbali und Mitarbeiter können durchaus unterschiedlich diskutiert werden, geht man davon aus, daß TGF-ß$_1$ das Zytokin darstellt, welches die extrazellulären Matrixproteine im Herzen steuert, und somit bei einer Zunahme des TGF-ß$_1$ auch eine Zunahme des Kollagens, wie in dieser Arbeit übrigens geschehen, zu erwarten gewesen wäre (s. 4.2.1). Außerdem würde man bei einer Proliferation der kollagenproduzierenden Fibroblasten ebenfalls eine Steigerung der Kollagen-mRNA erwarten. Zusätzlich ist auffällig, daß das von Eghbali und Mitarbeiter gewählte Hormon und dessen Konzentration nach nur 2h in der Lage sein soll, eine so eindrucksvolle Veränderung der Kollagen I-mRNA hervorzurufen. Meine Ergebnisse

betrachtend, beobachtet man trotz der Applikation des stärker wirksamen Trijodthyronins und der deutlich höher verwendeten Hormondosis nach 12h Behandlung kaum einen Unterschied der Kollagen I-mRNA-Synthese zum Ausgangswert.(s.o.)

In einem anderen Experiment beschreiben Eghbali und Mitarbeiter[71] eine Regression einer kardialen Fibrose. Dazu applizierten sie der TSK (tight skin)-Maus, einem genetisch veränderten Tiermodell, das Kollagen im Übermaß produziert und zwangsläufig eine Herzfibrose entwickelt, L Thyroxin in gewohnter Dosis (s.o.) und beobachteten einen Rückgang der Kollagen I-mRNA um 32% und Kollagen III-mRNA um 47% nach 24h Hormonbehandlung. In den normalen mit L-Thyroxin behandelten Mäusen wiederholt sie die weiter oben beschriebenen Beobachtungen für Kollagen I-mRNA und berichtet über eine Abnahme der Kollagen III-mRNA. Nach der Aussage von Eghbali und Mitarbeiter zeige dieses Experiment erste Forschungsansätze einer möglichen Verhinderung einer schon existenten Fibrose.

In einem nächsten Artikel berichten Eghbali und Mitarbeiter[91] von thyroidektomierten Ratten. Sie versucht den Umkehrschluß zu beweisen, daß Hypothyreoidismus zu einer Zunahme der Kollagen-mRNA führt. Ratten wurde die Schilddrüse entfernt und 14 Tage später, mit einem erniedrigten Schilddrüsenhormonspiegel von mehr als 85% im Vergleich zu den scheinoperierten Ratten, getötet und die mRNA für Kollagen I und Kollagen III aus dem Myokardium bestimmt. Als Resultat berichtet sie über eine Zunahme der Kollagen I-mRNA und unveränderte Werte für Kollagen III im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Nebenbei beschreibt sie eine Abnahme des Körpergewichts der thyroidektomierten Ratten, wobei bekannt ist, daß Hypothyreoidismus in der Regel zu einer Gewichtszunahme führt.

Eghbali vertritt die Meinung, einen Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsenhormonblutspiegel und der Kollagen I-Biosynthese im kardialen Myokardium zu erkennen. Dieser Meinung kann ich mich anschließen, nur, daß in meiner Studie im Gegensatz zu Eghbali bei hohem Schilddrüsenhormonblutspiegel eine Zunahme der Kollagen I-mRNA, und nicht eine Abnahme beobachtet worden ist, und ich somit der Meinung bin, daß Schilddrüsenhormone einen stimulierenden Einfluß auf die Kollagen-mRNA-Synthese besitzen. (s. auch 1.3)

Auch an dieser Stelle muß daran erinnert werden, daß in dieser Arbeit Veränderungen auf der Ebene der Transkription beobachtet worden sind und somit über eine veränderte Proteinsynthese lediglich spekuliert werden kann.

Sollte aber die Kollagen-mRNA in das Protein umgesetzt werden, dann bedeutete dies eine erhöhte KollagenI-Produktion und eine vermehrte Ablagerung im Myokard . Dieses wiederrum würde auf eine fibrotischen Umbau hinweisen.

4.2.3. Fibronektin

Fibronektin ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (s. 4.1) und gehört in die Gruppe der Adhäsionsproteine. Es ist ein 440 kD großes dimeres Glykoprotein, das sich aus drei wiederholenden Sequenzen I, II und III zusammensetzt[92], und das spezifische Bindungsstellen für Kollagen, Fibrin, Heparin und auch für Zellen besitzt. Auf diese Weise verbindet Fibronektin nicht nur die einzelnen Komponenten der extrazellulären Matrix miteinander, sondern ist auch über die Integrine am direkten Kontakt des intrazellulären Zytoskeletts mit den extrazellulären Strukturproteinen beteiligt.[93,94,95].

Fibronektin kommt als lösliche dimere Form im Plasma vor, als Oligomer angeheftet an Zelloberflächen und als Geflecht aus unlöslichen Fibrillen in der Matrix. So spielen die Fibronektine eine Rolle in der Blutgerinnung, bei Entzündung und Wundheilung, in der Embryogenese, sowie für die Migration und Adhäsion von Zellen[96,97,98].

Desweiteren lassen embryologische Studien vermuten, daß Fibronektin die initiale Matrix bildet, auf der sich Kollagen ablagert und außerdem entscheidend für den Prozeß der erfolgreichen embryologischen Organentwicklung und –wachstum zu sein scheint.

Fibronektin reagierte in unseren Untersuchungen unter Einfluß von T3 mit einem Anstieg der mRNA mit einem Maximum nach einem 1d und einem anschließenden Abfall seiner Expression, wobei nach kontinuierlichem Anstieg am 7 und 10d die Werte nach 10tägiger Behandlung immer noch unter dem Ausgangswert liegen. (s. 3.1.1.2)

Ähnliche Beobachtungen wurden von Mamuya und anderen beschrieben[99], nur mit dem Unterschied, daß er die Ratten mit 10 μg T3/100g Körpergewicht und nicht mit 1 mg/kg Körpergewicht, wie in meiner Studie, behandelt hat und einen kontinuierlichen Anstieg bis 6d Trijodthyroningabe beobachtete, bevor die Werte wieder zu den Kontrollwerten zurückkehrten.

Bluthochdruck bewirkt ähnliche Veränderungen des Fibronektins wie der Hyperthyreoidismus. Ein Beispiel sind die Versuche von Villarreal und Dillmann[85], die mit der Methode des ”thoracic banding“ (s. 4.2.1) eine arterielle Hypertonie erzeugten und einen signifikanten 2,5fachen Anstieg nach einem Tag und einem Maximum nach 3

Tagen beobachteten (ca. das 3fache gegenüber den Kontrolltieren). Diese kehrten nach 7 Tagen wieder zu den Kontrollwerten zurück.

Ein anderes Beispiel sind die spontan hypertensiven Ratten. Sie zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Fibronektin m-RNA, während der Entwicklung zur Herzinsuffizienz[65,67]. So konnten bis zu 5fach höhere Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden, die allerdings nicht wie in den hyperthreoten Ratten und "thoracic aortic banding"-Ratten zurückgingen, sondern in dem Zustand der Herzinsuffizienz erhöht blieben.

Wie weiter oben angedeutet, spielt Fibronektin eine Rolle bei der Adhäsion des fibrillären Kollagens an die kardialen Myozyten. Es ist aus diesem Grund wahrscheinlich, daß dieses Molekül eine wichtige Rolle bei dem Organwachstum spielt, insbesondere bei pathophysiologischen Phänomenen, die mit einer Umgestaltung des Interstitiums einhergehen, wie beispielsweise die myokardiale Hypertrophie. Da vermehrt gebildetes Fibronektin, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch mehr Kollagen anheften kann, bedeutet eine erhöhte Produktion von Fibronektin auch mehr Fibrose.

Die in dieser Studie gelieferten Ergebnisse unterstützen einen möglichen Zusammenhang zwischen Fibronektin und der durch Hyperthyreoidismus hervorgerufenen kardialen Hypertrophie, da die Applikation von Trijodthyronin zu einer gesteigerten Synthese der Fibronektin-mRNA und somit veränderten extrazellulären Matrix geführt hat.

4.2.4. Laminin

Laminin ist ein Protein der Basalmembran, kommt also ubiquitär vor[100,101] und ist wie Kollagen und Fibronektin Bestandteil der extrazellulären Matrix. (s. 4.1) Es besteht aus drei Polypeptidketten, der A Kette (400 kD), der B_1Kette (215 kD) und der B_2Kette (205 kD). Das gesamte Laminin hat eine kreuzförmige Struktur und besitzt verschiedene Bindungsstellen, ähnlich dem Fibronektin, für Heparin, Kollagen und Zellen. Laminin ist in der Zellkultur wichtig für das Anheften, Ausbreiten und Wachstum der Zellen. Als Bestandteil der Basalmembran spielt es eine Rolle in der Angiogenese.

Allerdings bleibt anzumerken, daß nicht alle Zellen von einer Basalmembran umgeben werden. So besitzen Kardiomyozyten, Endothelzellen und auch glatte Muskelzellen eine Basalmembran, nicht aber dagegen Fibroblasten.

In unserem Experiment verhielt sich Laminin ähnlich wie die anderen extrazellulären Matrixproteine Kollagen und Fibronektin, nämlich in der Weise, daß nach einem Tag T3-Behandlung die mRNA ihr Maximum erreichte und anschließend die Genexpression abfiel, um dann nach kontinuierlichem Anstieg am 7 und 10d immer noch unter dem Ausgangswert zu liegen. (s. 3.1.1.4)

Die Literatur über Laminin im Rahmen der Herzhypertrophie ist sehr spärlich, abgesehen von einem Artikel von Contard et al[102], die Laminin im Zusammenhang mit Bluthochdruck untersuchten. Die Hypertonie wurde durch eine Verengung der Aorta bei Ratten verursacht. Allerdings benutzten diese Autoren keine Northern Blots zur Quantifizierung, sondern immunhistochemische Methoden und somit ist ein Vergleich problematisch. Als Ergebnis zeigte sich jedenfalls in den fibrotischen Arealen, in denen die Myozyten so gut wie verschwunden waren, kaum noch Laminin. Unsere Ergebnise betrachtend, hätte man aber einer Zunahme des Laminins erwartet.

4.2.5 Zusammenfassung und Arbeitshypothese

Zusammenfassend kann die Genexpression der extrazellulären Matrixproteine folgendermaßen beurteilt werden: aufgrund des Kurvenverlaufs der mRNA-Synthese in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf, ist klar, daß Kollagen, Fibronektin und Laminin sehr ähnlich auf den Einfluß von Trijodthyronin reagierten.

Nach 12h ist bei Kollagen und Laminin noch kaum eine Reaktion zu erkennen, wobei Fibronektin tendentiell, aber nicht signifikant, ansteigt. Nach 1d T3-Behandlung ist von allen drei extrazellulären Matrixproteinen ein maximaler Anstieg der Genexpression zu beobachten.

Nach 3d T3-Gabe ist wiederum eine deutliche Parallele festzustellen. Die mRNA aller drei Proteine fällt weit unter den Ausgangswert. Am 7 und 10d tendieren Kollagen, Fibronektin und Laminin mit ähnlichem ansteigendem Verlauf wieder zum Ausgangswert, erreichen diesen jedoch nicht. (s. auch 3.1.1.2, 3.1.1.3 und 3.1.1.4)

Die deutlichen Gemeinsamkeiten der Synthese der extrazellulären Matrixproteine auf die Gabe von Trijodthyronin geben einen Hinweis darauf, daß sie gemeinsam von einem oder mehreren Systemen (s.u.) kontrolliert werden. Außerdem deutet der deutliche Anstieg der Genexpression nach 1d T3-Behandlung auf eine fibrotische Veränderung des Herzparenchyms hin.

Im Gegensatz zu den Matrixproteinen steigt die Synthese der TGF-ß$_1$-mRNA schon nach 12h signifikant, um das 1,5fache, an. Es sieht also so aus, als ob die Snythese der TGF-ß$_1$-mRNA der Synthese der extrazellulären Matrixproteine vorausgeht, d.h. der Anstieg der ECM-Proteine mit einer leichten Zeitverzögerung erfolgt. Am 1d erreicht die TGF-ß$_1$-mRNA, wie die der extrazellulären Matrixproteine, ihr Maximum mit einer 1,6fache-Zunahme. Anschließend fallen die Werte am 7 und 10d, bleiben aber gegenüber den Kontrollwerten leicht erhöht. (s. 3.1.1.1)

Der Kurvenverlauf der extrazellulären Matrixproteine läßt sich in drei Abschnitte einteilen. Bei dieser Einteilung reicht der erste Abschnitt bis zum ersten Tag T3-Behandlung, an dem, sowohl die Kollagen-, als auch die Fibronektin- und Laminin-mRNA maximal ansteigen. Am dritten Tag erreicht die mRNA der extrazellulären Matrixproteine den zweiten Abschnitt, mit einem gemeinsamen Abfall bis weit unter die Ausgangswerte. Anschließend kommt es im dritten Abschnitt, am 7 und 10d, wieder zu einem geringfügigen Anstieg.

Denkbar wäre, daß alle drei Abschnitte von unterschiedlichen Systemen kontrolliert werden. Dem ersten Abschnitt geht ein Anstieg der TGF-ß$_1$-mRNA, vor dem der Matrixproteine, um 12h voraus. TGF-ß$_1$ und die extrazelluläre Matrixproteine erreichen gemeinsam eine maximalen Syntheseleistung am ersten Tag. Es scheint so, als ob dieser Zeitraum von TGF-ß$_1$ kontrolliert würde. Der kurzfristige Anstieg der TGF-ß$_1$-mRNA könnte in der Lage sein eine Folgereaktion in Gang zu setzen.

TGF-ß$_1$ fällt bis zum dritten Tag geringfügig, wobei die extrazellulären Matrixproteine während dieser Zeit einen immensen Rückgang erfahren. Ein anderes unbekanntes System könnte dafür verantwortlich sein. Denkbar wären andere Zytokine, wie z.B. TNF-α oder NO-Synthase, von denen man weiß, daß sie ebenfalls Kontrollfunktionen im Herzen übernehmen.

Der langsame Anstieg der extrazellulären Matrixproteine, am 7 und 10d, im dritten Abschnitt, geht einher mit einem Abfall der TGF-ß$_1$-mRNA, so daß auch hier über ein anderes Kontrollsystem spekuliert werden kann.Vorstellbar wäre an dieser Stelle eine Beeinflussung durch das Renin-Angiotensin-System, das bekanntermaßen zum einen unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonüberschuß aktiviert wird und zum anderen bis zu diesem Zeitpunkt aktiviert ist[103].

Sicherlich könnte durchaus auch spekuliert werden, daß TGF-ß1 beteiligt sein könnte, da der Anstieg der extrazellulären Matrixproteine in Richtung Ausgangswert erfolgt und

TGF-ß1 ebenfalls in Richtung Ausgagngswerte abfällt und somit der Einfluß dieses Zytokins auf die extrazellulären Matrixproteine nachläßt.

Kurz zusammengefaßt, kann davon ausgegangen werden, daß die extrazellulären Matrixproteine gemeinsam, aber von komplexen Mechanismen gesteuert, beeinflußt werden. Denkbar wäre, daß die Schilddrüsenhormone direkten stimulierenden Einfluß auf die TGF-$ß_1$-mRNA-Synthese nimmt. Darauffolgend könnte TGF-$ß_1$ das entscheidende Zytokin darstellen, das die Reaktion weiter in Gang setzt.

4.3. Myokardiale Genexpression von Myosin

Die Herzmuskelfaser ist eine ein- bis zweikernige Zelle. Die Zellkerne liegen immer in der Mitte und werden von den randständigen, quergestreiften Myofibrillen umzogen. Fast die Hälfte des Gesamtproteingehalts einer Myofibrille, in etwa 43%, werden vom Myosin gestellt.[104]

Das dicke Filament (~500 kD) im Skelett- und Herzmuskel, dessen Hauptbestandteil Myosin darstellt, besteht aus 6 Bausteinen, aus 2 schweren (~200 kD), heavy chains, und 4 leichten Ketten (~16-28 kD), auch light chains genannt.[105] Von diesen einzelnen Proteinen existieren verschiedene Isoformen, die unterschiedliche Eigenschaften haben. So gibt es für die schweren Ketten α-und ß-Isoformen, die im Atrium und Ventrikel vorkommen und die Hauptbestandteile des Myokardiums darstellen und als Dimer αα-V1, αß-V2 und ßß-V3 genannt werden. Die Unterschiede der heavy chain Isoformen liegen in der ATPase Aktivität, wobei V1 eine 4 mal höhere Aktivität besitzt als V3. Dieser gesteigerte Umsatz von ATP hat neben einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit auch einen höheren Sauerstoffverbrauch zur Folge[46,106].(siehe auch 1.3)

Die unterschiedlichen Variationen der Isoformenzusammensetzung des Myosins sind vom Entwicklungsstand,[107] Beanspruchung[108] und Hormonen[109-115] abhängig.

Das Muster der Isoformverteilung für Myosin heavy chain ist unter physiologischen Bedingungen im Ventrikel kleiner Säuger wie Maus oder Ratte fast ausschließlich V1, wobei größere Spezies wie Hund, Schwein, Rind und auch der Mensch dagegen hauptsächlich V3, und nur noch einen V1 Gehalt von 15% aufweisen.[116]

Die Funktion der leichten Ketten ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Im Herzen lagert sich an jede schwere Kette des Myosin eine durch alkalische Detergenzien abtrennbare

(LC1) und eine phosphorylierbare leichte Kette (LC2). Der Grad der Phosphorylierung hat steuernde Einflüße auf die Aktin-aktivierende-ATPase. Die Rolle der LC1 ist unklar. Man vermutet regulierende Funktionen auf den Proteinumsatz des dicken Filaments. Im glatten Muskel spielen sie eine wichtige Rolle bei der Ca^{++}-Regulierung.

In dieser Arbeit wurden die α-und ß-Isoformen der schweren Kette des Myosins untersucht. Die Ergebnisse zeigten unter dem Einfluß von T3 einen deutlichen Anstieg der α-Myosin-mRNA mit einem Maximum nach einem Tag und einer anschließenden Abnahme bis fast zum Ausgangswert nach 10d. Eine kontinuierlichen Abnahme der ß-Myosin-mRNA bis auf 8% des Ausgangswertes beobachtete man nach 10d T3-Behandlung. (s. auch 3.1.1.5 und 3.1.1.6) Diese Entwicklung unter Trijodthyronin auf das Rattenherz ist in der Literatur ein häufig bestätigtes Ergebnis[109,111-115]. Sogar am menschlichen Herzen werden ähnliche Beobachtungen beschrieben[110]. So führt eine Hyperthyreose genauso wie regelmäßige sportliche Betätigung zu einer gesteigerten α-Myosin Expression und Hypothyreose, Alterung und Bluthochdruck zu einer gesteigerten ß-Myosin Expression des menschlichen Herzens.

Allerdings wird auch Gegenteiliges berichtet. So beschreiben Green und andere, einen signifikanten Anstieg der ß-Myosin-mRNA im rechten Ventrikel von hyperthyreoten Ratten, ohne Einfluß auf den linken Ventrikel, beobachtet zu haben[117].

In hypothyreoten Ratten kommt es zu einer entgegengesetzten Reaktion wie in den hyperthyreoten Tieren: ß-Myosin-mRNA wird hochreguliert, wobei eine Abnahme der α-Myosin-mRNA beschrieben wird[112]. Behandelt man nun hypothyreote Ratten mit T3, so erfolgt ein Anstieg der α-Myosin-mRNA schon 3h Stunden nach der Injektion und erreicht nach 24h Normalwerte[113,114].

Ähnlich wie in hypothyreoten Ratten verhält sich Myosin unter dem Einfluß von Bluthochdruck, Diabetes mellitus und während des Alterungsprozesses[118].

Es existieren unterschiedliche Hypertoniemodelle, wie das renovaskuläre[118] oder das spontan hypertensive Modell,[67,68] aber auch das durch eine Einengung der Aorta hervorgerufene Hypertoniemodell (”aortic coarctation”),[109] die alle einen Abfall des α-Myosins und eine Anstieg des ß-Myosins zeigen.

Izumo und andere[109] benutzten das Modell der ”aortic coarctation”, stellten eine rasche Induktion der ß-Myosin-mRNA mit entsprechender Hypertrophie des linken Ventrikels fest, und gaben den Tieren Thyroxin. Interessanterweise stellte sich nun eine schnelle Deinduktion des ß-Myosins und eine Induktion des α-Myosins, sowohl auf der Ebene der

mRNA, als auch auf der Ebene der Proteine, ein, bei gleichzeitiger Progression der linksventrikulären Hypertrophie.

Buttrick und andere[118] setzten gealterten, 24 Monate alten Ratten, einer renovaskulären Hypertonie aus. Der Alterungsprozeß an sich führte zu einer Verschiebung von V1 zu V3, aber der zusätzliche Hochdruck führte zu einer weiteren Verteilung in Richtung V3. Zusätzlich hat man den Versuchstieren den Schilddrüsenhormonblutspiegel bestimmt und festgestellt, daß sowohl die gealterten Tiere, als auch die gealterten und hypertonen Ratten einen signifikant niedrigeren Hormonspiegel als die Kontrolltiere aufwiesen, wobei bei letzteren der T3- und T4-Spiegel noch unter dem der "nur" hypertonen Ratten lag.

Die Frage stellt sich nun, ob es sich bei den Veränderungen des Myosins unter Schilddrüsenhormoneinfluß um direkte oder indirekte Effekte des Trijodthyronins handelt. Dabei gibt Izumo[109] einen deutlichen Anhalt für einen direkten Effekt des T3, da totz der Verschiebung in Richtung V3 unter Hypertoniebedingungen, ein Anstieg des α-Myosins und ein Abfall des ß-Myosins nach Gabe von Thyroxin unter beibehaltenen Hochdruckbedingungen zu verzeichnen ist. Ebenso gibt Buttrick einen Hinweis auf einen direkten Einfluß des Trijodthyronins, weil die Schilddrüsenhormonspiegel bei "gealterten" und "gealterten und hypertonen" Tieren, bei gleichzeitiger Verschiebung von V1 zu V3 im Rahmen des Alterungsprozesses und Hypertonie, unter denen der Kontrolltiere lagen und somit ein direkter Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonen und der Myosinverteilung vermutet werden kann.

Meine Ergebnisse zeigten unter T3-Einfluß eine Induktion des α-Myosins und eine Deinduktion des ß-Myosins und stimmen somit mit der gängigen Literatur überein.[22,119,120,121,122,123]

4.4. Myokardiale Genexpression von ANF

ANF (=atrialer natriuretischer Faktor) ist ein aus 151 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das von Myozyten v.a. des linken Vorhofs aber auch von den Ventrikeln synthetisiert und unter anderem nach Vorhofdehnung in das zirkulierende Blut sezerniert wird. Es kommt ebenfalls im Gehirn, Aortenbogen, Nebenniere und Niere vor. ANF regelt das Blutvolumen und den Salzhaushalt durch Steigerung der Natriurese und Diurese, durch Gefäßdilatation, Senkung des arteriellen Blutdrucks und des Herzschlagvolumens.

Bei einer Herz- und Niereninsuffizienz sowie bei Leberzirrhose sind erhöhte ANF-Konzentrationen im Plasma nachweisbar.

Eine Veränderung der ANF-mRNA Genexpression gibt Hinweise auf eine beginnende pathologische Antwort des Herzens, wie z.B. die Entwicklung einer Hypertrophie[119]. Dies war auch der Grund, warum in dieser Studie dieser Faktor gemessen wurde, obwohl Ogawa und Mitarbeiter[120] beschreiben, daß sich die Transkription von ANF anscheinend hypertonieabhängig, nicht aber hypertrophieabhängig verändere. Dazu behandelten sie hypertensive, "aortic-banded" Ratten, mit Ramipril in niedriger Dosierung und konnten eine Hypertrophie des Herzens, nicht aber einer Hypertonie vorbeugen. Die gemessene ANF-mRNA war in diesem Fall erhöht, obwohl eine Herzhypertrophie vermieden werden konnte.

In einem anderen Experiment wurden Ratten vor dem „aortic-banding" mit einer hohen Dosis Ramipril behandelt und sowohl eine Hypertrophie, als auch eine Hypertonie vorgebeugt. Die anschließend gemessene ANF-Genexpression hat abgenommen.

Signifikante Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Studie für die ANF-mRNA nicht nachgewiesen werden, aber tendentielle Veränderungen, wie eine maximale 1,7fache Steigerung der Genexpression nach 12h T3-Applikation. Auch nach 1d war noch eine Erhöhung um das 1,6fache nachweisbar. Anschließend fielen die Werte am 3d weit unter den Ausgangswert und stiegen am 7 und 10d wieder in Richtung Kontrollwerte an, blieben aber darunter.(s.auch 3.1.1.7)

Andere Studien, in denen die ANF-Genexpression während eines hyperthyreoten Zustandes gemessen wurde, zeigten unter ähnlichen Bedingungen erhöhte ANF-Werte[91], wobei Gardner und Mitarbeiter[121] diesen Anstieg auf einen direkten Effekt des T3 auf die ANF mRNA-Transkription zurückführten.

Im Gegensatz dazu konnten Izumo und andere[122], bei einer durch Hyperthyreoidismus hervorgerufene Hypertrophie, keine Induktion der ANF-mRNA feststellen. In der selben Studie überprüften sie die ANF-Genexpression unter bluthochdruckbedingter Hypertrophie und konnten eine Steigerung beobachten.

Spontane hypertensive Ratten entwickelten im Stadium der Herzinsuffizienz eine Steigerung der ANF-mRNA, sowohl im rechten, als auch im linken Ventrikel,[67,68] wobei die Werte für die ANF-Genexpression erhöht blieben.

Verabreichte man den spontanen hypertensiven Ratten vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz den ACE-Hemmer Captopril, so wurde sowohl die Induktion von ANF,

als auch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindert[68]. Folglich könnte auch hier, ähnlich den extrazellulären Matrixproteinen, der Eindruck entstehen, als ob das Renin-Angiotensin-System einen Einfluß auf die Genexpression von ANF näme. Allerdings muß einschränkend erwähnt werden, daß nach einer maximalen Steigerung nach 12h das RAS-System noch nicht aktiviert sein[103] dürfte und somit vielleicht doch T3 einen direkten Einfluß nimmt oder gar TGF-$ß_1$ eine Rolle spielt.

4.5. Myokardiale Genexpression von VEGF

VEGF (=vascular endothelial growth factor) ist ein 46 kD großer, heparin-bindender Wachstumsfaktor, der spezifisch auf vaskuläre, endotheliale Zellen wirkt und Bedeutung in der Angiogenese besitzt. Er ist mit PDGF verwandt.

Die Familie von VEGF besteht aus fünf bekannte Varianten. Dazu gehören VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. Alle sind Teil einer Familie zu der auch die verwandten PDGF (platelet-derived growth factor) und PlGF (placenta growth factor) gehören.

Lokalisiert wurde der Faktor in embryonalen Geweben, in denen vaskuläres Wachstum mit der embryonalen Entwicklung assoziiert waren[123], während des Tumorwachstums[124] und im weiblichen Geschlechtstrakt[125]. Zusätzlich beschleunigt zugeführtes VEGF die Kollateralgefäßbildung im Modell der koronaren Okklusion[126]. Hypoxie und/oder Ischämie führt zu einer VEGF-mRNA Expression in Myozyten in vitro[127] und im Herzgewebe in vivo[128]. Desweiteren wurden VEGF-mRNA Transkripte in normalem und infarziertem menschlichem Myokardium entdeckt[129]. Zusätzlich gilt VEGF als Hypertrophiemarker.

Herzgewebe ist in dieser Arbeit auf die VEGF-mRNA Synthese überprüft worden, da eine Mehrexpression auf Angiogenese hingewiesen hätte, und es interessant erschien, ob ein Organismus in hyperthyreotem Zustand mit einer Gefäßneubildung im Herzen reagiert hätte. Unsere Ergebnisse zeigten keine signifikanten, aussagekräftigen Veränderungen während der gesamten Behandlungszeit. Tendentiell war eine Abnahme der Genexpression am 7 und 10d zu beobachten. (s. auch 3.1.1.8)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die tägliche Applikation von Trijodthyronin in dieser Studie zu keinen bedeutenden Veränderungen der VEGF-mRNA geführt hat und somit eine Angiogenese im Herzen nicht nachgewiesen werden konnte. Vergleichbare Studien über VEGF und Hyperthyreoidismus sind nicht bekannt.

4.6. Renale Genexpression der extrazellulären Matrixproteine

4.6.1. TGF-$ß_1$

Wie unter 4.2.1 bereits beschrieben, ist TGF-$ß_1$ ein Schlüsselmolekül in der Regulation und Kontrolle der Fibroblastenaktivität und ist an unterschiedlichen Krankheitsbildern, die durch eine exzessive Fibrose charakterisiert sind, beteiligt.

In der Niere existieren verschiedene Zellsysteme, wie die Glomeruli, wobei die glomerulär-epithelialen Zellen und die glomerulär-mesangialen Zellen von besonderem Interesse sind, die Tubuli mit seinen tubulo-epithelialen Zellen und das renale Interstitium. In der Rattenniere ist eine besondere Fülle an TGF-$ß_1$-mRNA und auch an Protein in den Glomeruli entdeckt worden[130], wobei, mit Hilfe von Northern Blots bestimmt, der Anteil der TGF-$ß_1$-Transkripte in den Glomeruli um eine vielfaches höher ist, als in der gesamten Niere[131].

Mehrere Studien untersuchten die Rolle von TGF-ß in der Herstellung der extrazellulären Matrix der Niere. So wurde beschrieben, daß TGF-$ß_1$ zu eine Steigerung der Produktion von Kollagen I, Kollagen IV und Fibronektin in mesangialen Zellen der Maus führt[132,133]. In einer anderen Studie wurden keine Veränderungen der Kollagenproduktion, allerdings bezogen auf mesangialen Rattenzellen, beschrieben[134].

Glomeruläre-epitheliale Zellen zeigten, unter dem Einfluß von TGF-$ß_1$, eine Erhöhung von Fibronektin[132] und Kollagen IV[135].

Faßt man die oben beschriebenen unterschiedlichen Effekte von TGF-$ß_1$, auf die verschiedenen glomerulären Zellen in kultiviertem Gewebe, zusammen, so geben diese indirekte Beweise für eine Beteiligung von TGF-ß in der Herstellung und Aufrechterhaltung der glomerulären Basalmembran und der mesangialen Matrix in vivo.

Eine ständige Erhöhung von TGF-$ß_1$, wie sie in bestimmten Krankheitszuständen der Niere vorkommt (s.u.), kann also zu einer Überproduktion von mesangialen Matrixkomponenten, zu einer Verdickung der glomerulären Basalmembran und zu einer Störung der normalen glomerulären Filtration, führen.

Die Wirkung von TGF-$ß_1$ auf die Matrixproduktion von Fibroblasten des normalen Interstitiums der Niere und der renalen tubuloepithelialen Zellen ist ebenfalls untersucht worden. So steigert TGF-$ß_1$ die Produktion von Kollagen I, III und V in kultivierten renalen Fibroblasten.[136]

Unter dem Einfluß von TGF-$ß_1$ produzieren tubulo-epitheliale Zellen des proximalen Tubulus vermehrt Kollagen VI.

Diese Effekte sind sehr wahrscheinlich wichtig in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose.

Im folgenden Abschnitt werden nun einige Krankheitsbilder der Niere betrachtet, bei denen TGF-$ß_1$ im Zusammenhang mit Fibrose eine besondere Bedeutung spielt.

Zunächst einmal ist die Glomerulonephritis zu nennen. Es gibt eine gesicherte kausale Beziehung zwischen einer erhöhten Produktion von TGF-ß und der Glomerulonephritis. Studien von Okuda und Mitarbeiter[137] und Coimbra und Mitarbeiter[138] waren die ersten, die klar dokumentierten, daß in den Glomeruli, während der postinflammatorischen Phase nach einem akuten inflammatorischen Insult, eine deutliche Steigerung der TGF-$ß_1$-Expression und -Bioaktivität, zu verzeichnen war.

Ein anderes wichtiges Krankheitsbild, das in diesem Zusammenhang zu nennen ist, ist die diabetische Nephropathie. Sie ist charakterisiert durch eine Hypertrophie der glomerulären und tubulären Elemente, einer progressiven Akkumulation von extrazellulären Matrixkomponenten des glomerulären Mesangiums, einer Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran und einer progressiven tubulointerstitiellen Fibrose[139,140]. Studien an kultivierten mesangialen[141,142] und proximal-tubulären Zellen[143,144] zeigten, daß eine erhöhte Glukosekonzentration die Biosynthese von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixmolekülen stimulieren und zu einer Veränderung der Zellgröße, und dabei die Entwicklung einer tubulär-epithelialen Hypertrophie mit eingeschlossen, führen konnte. In diesem Zusammenhang haben Ziyadeh und Mitarbeiter nachgewiesen, daß proximal-tubuläre Zellen[145] und mesangiale Zellen[146], kultiviert in hoch konzentrierten Glukoselösungen, eine erhöhte TGF-$ß_1$-mRNA-Expression und Bioaktivität verzeichneten. Alle in diesem Zusammenhang erwähnten Studien deuten daraufhin, daß TGF-$ß_1$ eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie spielen kann.

In dieser Studie wurde untrsucht, ob Hyperthyreoidismus zu einer Steigerung oder Reduktion der TGF-$ß_1$-mRNA im gesamten renalen Gewebe führen würde.

Wir beobachteten nach 12h Trijodthyroninbehandlung eine maximale, signifikante Erhöhung der TGF-ß1-mRNA um das 1,4fache. Im weiteren Verlauf allerdings gingen die Werte tendentiell am 1 und signifikant am 3, 7 und 10 Tag unter den Ausgangswert, so

daß am letzten Tag T3-Behandlung nur noch 60% des Ursprungwertes zu verzeichnen waren.

Allerdings sieht es so aus, als ob TGF-$ß_1$ in der Niere keinen direkten Einfluß auf die extrazellulären Matrixproteine nimmt, die sich zwar in vergleichbarer Weise verhalten, jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit TGF-$ß_1$ zu stehen scheinen.

Die Expansion der zellulären Hypertrophie von tubulären Zellen der Niere ist in den meisten renalen Hypertrophien für die gesamte Nierenvergrößerung verantwortlich. In einer Studie von Ziyadeh und Mitarbeiter[147] wurde gezeigt, daß TGF-$ß_1$ über eine Stimulation von Angiotensin II zu einer Hypertrophie von kultivierten tubulären Zellen führt. Da die Vergrößerung der Niere mitunter ein entscheidendes Merkmal des Hyperthyreoidismus in unserer Studie darstellt, ist zu spekulieren, ob die renale Hypertrophie auf TGF-$ß_1$, Angiotensin II und eine späte Synthesesteigerung der extrazellulären Matrixproteine zurückzuführen ist.

Kobori und Mitarbeiter[148,61] veröffentlichten Studien, in welchen sie die Hypothese untersuchten, daß renale Hypertrophie während des hyperthyreoten Zustands durch die renale Expression von Renin-mRNA und somit über eine Stimulation des RAS vermittelt werden würde. Ihre Hypothese bestätigen sie, indem sie nachweisen konnten, daß hyperthyreote Ratten tatsächlich vermehrt Renin-mRNA synthetisierten. Welche Rolle TGF-$ß_1$ in diesem System spielte wurde nicht geklärt.

4.6.2. Kollagen, Fibronektin, Laminin

Die Tatsache der renalen Hypertrophie in hyperthyreoten Tieren ist schon länger bekannt[149]. Über die extrazellulären Matrixproteine im Zusammenhang mit renaler Hypertrophie im Zustand des Hyperthyreoidismus wurde bisher keine Literatur veröffentlicht.

Ein Artikel von Nakamura und Mitarbeiter[150] befaßt sich mit dem Einfluß von TGF-$ß_1$ auf die glomeruläre Produktion der extrazellulären Matrix in glomerulär-epithelialen Zellen. Nakamura setzte glomeruläre epitheliale Zellen TGF-$ß_1$ aus, und beobachtete eine Synthesesteigerung von Fibronektin, Kollagen IV und Laminin.

Kurz zusammengefaßt, reagierten in meiner Studie die extrazellulären Matrixproteine Laminin, Fibronektin und Kollagen I in der Niere gleichermaßen mit einem kontinuierlichen Anstieg, wobei bei Fibronektin keine signifikanten, jedoch signifikante Erhöhungen der Kollagen- und Laminin-mRNA nach 10d zu beobachten waren, die im

Gegensatz zum Herzen, nach 10d Hyperthyreoidismus auch kontinuierlich erhöht blieben. (s.auch 3.1.2.2.-3.1.2.4)

Wie eben bereits erwähnt scheint TGF-$ß_1$, das nach 12h eine maximale signifikante Steigerung erfuhr, und an den folgenden Tagen bis unter den Ausgangswert abfiel, keinen direkten Einfluß auf die extrazellulären Matrixproteine zu nehmen. (s.auch 3.1.2.1) Wahrscheinlich wird ein anderes System verantwortlich sein, das über einen direkten oder indirekten Weg von Trijodthyronin aktiviert wird. Auch hier kann spekuliert werden, ob das Renin-Angiotensin-System Einfluß nimmt und somit eine Erhöhung von Kollagen I, Fibronektin und Laminin herbeiführt und für die renale Hypertrophie mitverantwortlich ist.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Northern Blot-Technik der Einfluß von Trijodthyronin auf die extrazelluläre Matrix von Rattenherzen und Rattennieren untersucht. Dazu gehörten RNA-Analysen von ausgewählten Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronektin und Laminin. Zusätzlich beobachteten wir aber auch Wachstumsfaktoren wie TGF-$ß_1$ und in den Rattenherzen VEGF, sowie allerdings nur im Herzen, die Reaktionen von α- und ß-Myosin der kontraktilen Proteine, sowie des Hypertrophiemarkers ANF.

Seit längerem schon ist bekannt, daß die extrazelluläre Matrix eine große Bedeutung im Zusammenhang mit der Organhypertrophie, -insuffizienz und -fibrose spielt. So wurden die obengenannten Proteine gerade deshalb ausgewählt, da einige von ihnen die extrazelluläre Matrix repräsentieren und außerdem in anderen, ebenfalls mit einer Organhypertrophie und -fibrose einhergehenden Tiermodellen, wie beispielsweise der spontanen hypertensiven Ratte, ihre Genexpression veränderten. Zusätzlich sind sie ausreichend gut untersucht und eine quantitative Änderung der jeweiligen mRNA kann einer bestimmten Aussage zugeordnet werden. Ziel war es, aus dem Verlauf der mRNA-Transkription die Umgestaltungen innerhalb der extrazellulären Matrix zu verstehen und Hinweise für die schilddrüsenhormoninduzierte Herzhypertrophie und Veränderungen der kontraktilen Proteine des Herzens zu erhalten.

Bei dem Gewebe handelte es sich um Herzen und Nieren von hyperthyreoten Wistar-Ratten. Der Zustand des Hyperthyreoidismus wurde durch tägliche subcutane Applikation von 1mg/kg T3 an jeweils 5 Tieren über 12h, 24h, 3d, 7d und 10d erreicht. 5 unbehandelte Ratten dienten als Kontrolltiere.

Nach dem Töten der Tiere wurden die makroskopisch auffallend hypertrophierten Organe entnommen, eingefroren und mit Hilfe von Northern Blots eine Zu- oder Abnahme der zu untersuchenden mRNAs bestimmt.

5.1. Herz

Die myokardiale Genexpression der extrazellulären Matrixproteine war fast einheitlich, d.h. unter dem Einfluß von Trijodthyronin war nach 1d ein maximaler Anstieg der Kollagen-, Fibronektin- und Laminin- mRNAs festzustellen. Nach 3d fiel die Genexpression weit unter den Ausgangswert, um nach 7 und 10d T3-Behandlung wieder in Richtung Anfangswerte anzusteigen.

Die deutlichen Gemeinsamkeiten der mRNA-Synthese der extrazellulären Matrixproteine nach Gabe von Trijodthyronin geben einen Hinweis darauf, daß sie zusammen von einem oder mehreren Systemen kontrolliert werden. Außerdem deutet der deutliche gemeinsame Anstieg der Genexpression nach 1d T3-Behandlung auf eine fibrotische Veränderung des Herzparenchyms hin.

Im Gegensatz zu den Matrixproteinen stieg die Synthese der TGF-$ß_1$-mRNA allerdings schon nach 12h signifikant an, d.h. die Synthese der TGF-$ß_1$-mRNA lag vor der Synthese der extrazellulären Matrixproteine. Es ist durchaus möglich, daß in diesem Fall ebenso wie in anderen in vivo und in vitro Modellen TGF-$ß_1$ die Expression der Matrixproteine steuert. Am 1d erreichte die TGF-ß1-mRNA, wie die der extrazellulären Matrixproteine, ihr Maximum. TGF-$ß_1$ fiel dann bis zum dritten Tag geringfügig, wobei die extrazellulären Matrixproteine während dieser Zeit einen deutlichen Rückgang verzeichneten. Ein anderes, noch unbekanntes System könnte dafür verantwortlich gewesen sein. Denkbar wären Zytokine, wie z.B. TNFα oder NO-Synthase, von denen man weiß, daß sie ebenfalls Kontrollfunktionen im Herzen übernehmen. An den Tagen 7 und 10 fielen die Werte für TGF-$ß_1$ weiter, blieben aber gegenüber den Kontrollwerten leicht erhöht, während die m-RNA der extrazellulären Matrixproteine ebenfalls fast wieder Ausgangswerte erreichten.

Der homogene Kurvenverlauf der extrazellulären Matrixproteine läßt sich in drei Abschnitte einteilen, wobei der erste Abschnitt, nach Erreichen der maximalen Syntheseleistung, bis zum ersten Tag T3-Behandlung reicht. Der zweite Abschnitt erstreckt sich bis zum dritten Tag, währenddessen die mRNA Produktion weit unter die Ausgangswerte abfällt. Der dritte Abschnitt ist nach 10d T3-Behandlung erreicht, nachdem die Transkripte der Genexpression fast wieder zu den Ausgangswerten angestiegen sind.

Denkbar wäre, daß alle drei Abschnitte von unterschiedlichen Systemen beeinflußt werden.

Es scheint so, als ob der erste Abschnitt von TGF-$ß_1$ kontrolliert würde, da der Anstieg der TGF-$ß_1$-mRNA der der Matrixproteine um 12h vorausgeht. Somit könnte die kurzfristige Steigerung der TGF-$ß_1$-mRNA die Synthese der Matrix-mRNA als Folgereaktion in Gang setzen. TGF-$ß_1$ und die extrazelluläre Matrixproteine erreichten gemeinsam eine maximalen Syntheseleistung am ersten Tag.

Bis zum dritten Tag fiel die Expression von TGF-$ß_1$ geringfügig, wohingegen die Matrixproteine einen deutlichen Rückgang ihrer mRNA-Synthese erfuhren. Wie weiter

oben schon erwähnt könnten andere Zytokine, wie TNFα oder NO-Synthase, dafür verantwortlich sein.

Der langsame Anstieg der extrazellulären Matrixproteine wieder bis fast auf Ausgangswerte, am 7 und 10d, im dritten Abschnitt, geht einher mit einem Abfall der TGF-$ß_1$-mRNA, ebenfalls bis fast auf Ausgangswerte, so daß auch hier über ein anderes Kontrollsystem spekuliert werden kann.Vorstellbar wäre an dieser Stelle eine Regulation sowohl durch TGF-$ß_1$, da der Anstieg der extrazellulären Matrixproteine auf Normalwerte zurückkehrt und TGF-$ß_1$ ebenfalls fast auf die Ausgangswerte abfällt und somit der Einfluß dieses Zytokins auf die extrazellulären Matrixproteine nachläßt, als auch durch andere Kontrollmechanismen, wie das Renin-Angiotensin-Systems, das bis zu diesem Zeitpunkt aktiviert ist[10].

Kurz zusammengefaßt, kann davon ausgegangen werden, daß die extrazellulären Matrixproteine gemeinsam, aber von komplexen Mechanismen gesteuert, beeinflußt werden. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Schilddrüsenhormone direkten stimulierenden Einfluß auf die TGF-$ß_1$-mRNA-Synthese nehmen. Darauffolgend könnte TGF-$ß_1$ das entscheidende Zytokin darstellen, welches weitere Reaktionen in Gang setzt.

Im Gegensatz zu den extrazellulären Matrixproteinen hatte TGF-$ß_1$ keinen Einfluß auf die myokardiale Genexpression von Myosin. Beim Myosin untersuchten wir die α-und ß-Isoformen der schweren Ketten, die die Hauptbestandteile des Myokardiums darstellen. Die Ergebnisse zeigten unter dem Einfluß von T3 einen deutlichen Anstieg der α-Myosin-mRNA mit einem Maximum nach einem Tag und einer anschließenden Abnahme bis fast zum Ausgangswert nach 10d sowie einer kontinuierlichen Abnahme der ß-Myosin-m-RNA bis auf 10% des Ausgangswertes nach 10d T3-Behandlung.

Vieles deutet daraufhin, daß Trijodthyronin direkten Einfluß auf die myokardiale Genexpression von Myosin nimmt. So wird in der Literatur beschrieben, daß bei hypertonen Ratten eine rasche Induktion der ß-Myosin-mRNA mit entsprechender Hypertrophie des linken Ventrikels festgestellt wurde. Erhielten die Tiere im Anschluß das Schilddrüsenhormon Throxin, so stellte sich nun eine schnelle Deinduktion des ß-Myosins und eine Induktion des α-Myosins, sowohl auf der Ebene der mRNA, als auch auf der Ebene der Proteine, ein, bei gleichzeitiger Progression der linksventrikulären Hypertrophie. (s.auch 4.3)

Für die Genexpression des Hypertrophie-Markers ANF, konnten keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden. Tendentiell aber war eine deutliche Steigerung der

Genexpression nach 1d T3-Applikation feststellbar. Anschließend gingen die Werte am 3, 7 und 10d wieder auf die Kontrollwerte zurück.

Herzgewebe ist in dieser Arbeit auch auf die VEGF-mRNA Synthese überprüft worden, da eine Mehrexpression auf Angiogenese hingewiesen hätte, und es interessant erschien, ob ein Organismus in hyperthyreotem Zustand mit einer Gefäßneubildung im Herzen reagiert hätte. Unsere Ergebnisse zeigten keine signifikanten, aussagekräftigen Veränderungen während der gesamten Behandlungszeit. Tendentiell war eine Abnahme der Genexpression am 7 und 10d zu beobachten (s. auch 3.1.1.8). Eine Angiogenese konnte unter dem Einfluß von Trijodthyronin nicht nachgewiesen werden.

5.2. Niere

Es wurde häufig beschrieben, daß TGF-$ß_1$ in der Niere ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Fibrose und somit in der Veränderung der extrazellulären Matrix spielt. Die diabetische Nephropathie und die Glomerulonephritis sind Krankheitsbilder, in denen eine ansteigende Fibrose nachgewiesen werden konnte.

In meiner Studie konnte nach 12h Trijodthyroninbehandlung eine signifikante Erhöhung der TGF-$ß_1$-mRNA um das 1,4fache beobachtet werden. Im weiteren Verlauf allerdings gingen die Werte tendentiell am 1 und signifikant am 3, 7 und 10 Tag unter den Ausgangswert, so daß am letzten Tag T3-Behandlung nur noch ca. 60% des Ursprungwertes zu verzeichnen. (s. 3.1.2.1)

Die extrazellulären Matrixproteine Laminin, Fibronektin und Kollagen I reagierten in meiner Studie gleichermaßen mit einem kontinuierlichen Anstieg, wobei bei Fibronektin keine signifikanten, jedoch signifikante Erhöhungen der Kollagen- und Laminin-mRNA nach 10d zu beobachten waren, die im Gegensatz zum Herzen, nach 10d Hyperthyreoidismus auch kontinuierlich erhöht blieben. (s.auch 3.1.2.2.-3.1.2.4) Es kann dabei vermutet werden, daß sich eine Fibrose in der Niere ausgebildet hat.

TGF-$ß_1$, das nach 12h eine maximale signifikante Steigerung erfährt, und an den folgenden Tagen bis unter den Ausgangswert abfällt, scheint keinen direkten Einfluß auf die extrazellulären Matrixproteine zu nehmen. (s.auch 3.1.2.1) Wahrscheinlich wird ein anderes System verantwortlich sein. Auch hier kann spekuliert werden, ob das Renin-Angiotensin-System über eine Trijodthyroninstimulation Einfluß nimmt und somit eine Erhöhung von Kollagen I, Fibronektin und Laminin herbeiführt und für die renale Hypertrophie und ggf. Fibrose mitverantwortlich ist.

5.3 Schlußfolgerung

Als Schlußfolgerung ist davon auszugehen, daß die Applikation von Trijodthyronin zu einer Beeinflussung der extrazellulären Matrix des Herzens und der Niere in der Weise geführt hat, daß in beiden Organen eine Synthesesteigerung der Genexpression erfolgte und somit sehr wahrscheinlich auch eine Fibrose entstanden ist.

Ebenfalls konnte eine Induktion der α-Myosin-mRNA und Deinduktion der ß-Myosin-mRNA als Einfluß von T3 beobachtet werden.

Zu spekulieren ist über die Art und Weise, wie T3 Einfluß nimmt. Es gibt Argumente für eine direkte, aber auch für eine indirekte Beeinflussung. Wie genau Trijodthyronin wirkt kann lediglich spekuliert werden und erfordert in Zukunft noch die Beantwortung vieler Fragen.

6. Literatur

1. Löffler G, Petrides P: Endokrine Gewebe: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. Lehrbuch „*Physiologische Chemie*“. 1990; 678-688

2. Green WL: The Thyroid. Elsevier, New York, Amsterdam; 1987

3. Koerner D, Schwartz HL, Surks MI, Oppenheimer JH, Jorgensen EC: Binding of selected iodotyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei: high correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity. *J. Biol. Chem.*. 1975; 250: 6417-6423

4. Samuels HH, Tsai JS: Thyroid hormone action in cell culture: demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 1973; 70: 3488-3491

5. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI: Tissue differences in the concentration of trijodthyronin nuclear binding sites in the rat: Liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology*. 1974; 96: 897-903

6. Oppenheimer JH, Koerner D, Schwartz HL, Surks MI.: Specific nuclear trijodthyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab*..1972; 35: 330-333

7. Schadlow, AR, Surks MI, Schwartz HL, Oppenheimer JH.: Specific trijodthyronin-binding sites in the anterior pituitary of the rat. *Science*. 1972; 176: 1252-1254

8. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Koerner D, Surks MI: Limited binding capacity sites for L-triiodthyronin in rat liver nuclei. *J. Clin. Invest.*. 1974; 53: 668-777

9. Oppenheimer JH, Jump DB, Mariash CN: Transport and molecular action of trijodthyronin (T3) at the nuclear level [Abstract]. *Proceedings of the 7th International Congress of Endocrinology*. 1984; 206

10. Galton VA: Putative nuclear trijodthyronin receptors in tadpole erythrocytes: Regulation of receptor number by thyroid hormone. *Endocrinology*. 1984; 114: 735-742

11. Bellabarba D, Dedard S, Fortier S, Lehour JG.: 3,5,3´-Trijodthyronine nuclear receptor in chick embryo: Properties and ontogeny of brain and lung receptors. *Endocrinology*. 1983; 112: 353-359

12. Schuster LD, Schwartz HL, Oppenheimer JH: Nuclear receptors for 3,5,3´-trijodthyronine in human liver and kidney: Characterization, quantitation and similarities to rat receptors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*. 1979; 176: 1252-1254

13. Oppenheimer JH: Thyroid hormone action at the molecular level. In Braverman L, Utiger R*: Werner and Ingbar´s The Thyroid*. Philadelphia, JB Lippincott, 1991: 204-224

14. Dillmann WH: Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am. J. Med.*. 1990; 88: 626-630

15. Oppenheimer JH: Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*. 1979; 203: 971-979

16. Dillmann WH: Mechanism of action of thyroid hormones. *Med. Clin. North Am.*. 1985; 69: 849-861

17. Ismail-Beigi F, Edelmann IS: Mechanism of thyroid calorigenesis: Role of active sodium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 1970; 67: 1071-1078

18. Barker SB and Klitgaard HM: Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. *Am. J. Physiol.*. 1952; 170-81

19. Hoch FL: Metabolic effects of thyroid hormone. *Handbook of physiology. Section7, Endocrinology. Vol. III, Thyroid (Greep RO, Astwood EB)* Washington D.C. American Physiological Society, 1974

20. Hervas F, Moreale de Escobar G, Escobar del Rey, F: Rapid effect on single small doses of L-thyroxin and triiodo-L-thyroxin on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunassay. *Endocrinology*. 1975; 97: 91-101

21. Eayrs JT, Taylor SH: The effect of thyroid deficiency induced by methyl thiouracil on the maturation of the central nervous system. *J. Anat.*. 1951; 85: 350-358

22. Williams LT, Lefkowitz RJ: Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*. 1977; 252: 2787-2789

23. Polikar R, Burger AG, Scherrer U, Nicod P: The thyroid and the heart. *Circulation*. 1993; 87: 1435-1441

24. DeGroot LJ: Thyroid and the heart. *Mayo Clin. Proc.*. 1972; 47: 864-871

25. Klein I: Thyroid hormone and high blood pressure. *Laragh JH, Brenner BM, Kaplan NM: Endocrine mechanism in hypertension. Volume 2*. New York: Raven Press, 1989; 61-80

26. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Surks MI.: Advances in our understanding of thyroid hormone at the cellular level. *Endocr. Rev.*. 1987; 8: 288-308

27. Kapitola J, Vilimoska D: Inhibition of the early ciculatory effects of triiodthyronin in rats by propanolol. *Physiol. Bohemoslov.*. 1981; 30: 347-352

28. Theilen EO, Wilson WR: Hemodynamic effects of peripheral vasoconstriction in normal and thyrotoxic subjects. *J.Appl.Physiol.*. 1967; 22: 207-210

29. Haber RS, Loeb JN: Effect of 3-5-3´-triiothyronine treatment on potassium efflux from isolated rat diaphragm: role of increased permeability in the thermogenic response. *Endocrinology*. 1982; 3:1217-1223

30. Ismail-Beigi F, Haber RS, Loeb JN: Stimulation of active Na and K transport by thyroid hormone in a rat liver cell line: role of enhanced Na entry. *Endocrinology*. 1986; 119: 2527-2536

31. Gibson JG, Harris AW: Clinical studies of the blood volume. Hyperthyroidism and myxedema. *J. Clin. Invest.*. 1938; 18: 59-65

32. Klein I, Levey GS: Unusual manifestations of hypothyroidism. *Arch. Intern. Med.*. 1984; 144: 123-128

33. Morkin E, Flink IL, Golgman S: Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. *Prog. Cardiovasc. Dis.*. 1983; 25: 435-464

34. Guyton AC: The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation*. 1981; 64: 1079-1088

35. Bilezikian JP, Loeb JN: The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α- and ß-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr. Rev.*.1983; 414: 378-387

36. Hammond HK, White FC, Buxton ILO, Saltzstein P, Brunton LL, Longhurst JC: Increased myocardial ß- receptors and adrenergic responses in hyperthyroid pigs. *Am. J. Physiol.*. 1987; 252: H283-H290

37. Ganong WF: Thyroid hormone and renin secretion. *Life Sci.*. 1982; 30:561-569

38. Katz A: Angiotensin II: hemodynamic regulator or growth factor? *J. Mol. Cell. Cardiol.*. 1990; 22: 739-747

39. Klein I, Levey GS: New perspectives on thyroid hormone, catecholamines and the heart. *Am. J. Med.*. 1981; 76: 167-171

40. Grossman W, Rubin NL, Johnson LW: The enhanced myocardial contractility of thyrotoxicosis. *Ann. Intern. Med.*. 1971; 74: 869-874

41. Amidi M, Leon DF, DeGroot WJ, Kroetz FW, Leonard JJ: Effect of the thyroid state on myocardial contractility and ventricular injection rate in man. *Circulation*. 1968; 38: 229-239

42. Nixon JW, Anderson RJ, Cohen ML: Alterations in left ventricular mass and performance in patients treated effectively for thyrotoxicosis. *Am J. Med.*. 1979; 67: 268-276

43. Ikram H: The nature and prognosis of thyrotoxic heart disease. *Q. J. Med.*. 1985; 54: 19-28

44. Friedman MJ, Okada RD, Ewy GA, Hellman DJ: Left ventricular systolic and diastolic function in hyperthyroidism. *Am. Heart J.*. 1982; 104: 1303-1308

45. Hoh JFY, McGrath PA, Hale PT: Electrophoretic analysis of multiple forms of cardiac myosin: effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Mol. Cell Cardiol*. 1978; 10: 1053-1076

46. Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL: Myosin isoenyme distribution correlates with speed of mycardial contraction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*. 1981; 13: 1071-1075

47. Limas CJ: Calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmatic reticulum in exoerimental hyperthyreoidism. *Am. J. Physiol.*. 1978; 235: H745-H751

48. Forfar JC, Muir AL, Sawers SA, Toft AD: Abnormal left ventricular function in hyperthyroidism. *N. Engl. J. Med.*.1982; 307: 1165-1170

49. Marcus RH, Butkov N, Whaetley AM, Lippe I, Norton G, Rosendorff C: Independent mechanisms for the chronotropic and inotropic responses in hyperthyroidism. *Basic. Res. Cardiol*.. 1987; 82: 261-270

50. Valente M, De Santo C, De Martino Rosaroll P, Di Maio V, Di Meo S, De Leo T: The direct effect of the thyroid hormone on cardiac chronotropism. *Arch. Int. Physiol. Biochem*.. 1988; 97: 431-440

51. Klein I, Hong C: Effects of thyroid hormone on the myosin content and myosin isoenzymes of the heterotopically transplanted heart. *J. Clin. Invest*.. 1986; 77: 1694-1698

52. Sanford CF, Grifiin EE, Wildenthal K: Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxin-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ. Res*.. 1978; 43:688-694

53. Klein I: Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: time course of development and inhibition by propranolol. *Endocrinology*. 1988; 123: 203-210

54. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN: Advances in our understanding of thyroid hormone on the cellular level. *Endocr. Rev*..1987; 8: 288-308

55. Klein I: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am. J. Med*.. 1990; 88: 631-637

56. Zierhut W, Zimmer HG: Differential effects of Triiodothyronine on rat left and right ventricular function and the influence of metoprolol. *J. Mol. Cell. Cardiol*.. 1989; 21: 617-24

57. Zierhut W, Zimmer HG: Triiodothyronine-induced changes in function, metabolism, and weight of the rat heart: effects of the α- and ß-adrenergic blockade. *Basic. Res. Cardiol*..1989; 84: 359-70

58. Amos G, Kerr D, Sernia C, Brown L: ß-Adrenoceptor antagonism and the hyperthyroid rat heart. *J. Cardiovasc.. Pharmacol*.. 1994; 24: 336-343

59. Woeber KA: Thyrotoxicosis and the Heart. *N. Engl. J. Med*..1992; 327: 94-98

60. Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, Reville P: The thyroid and the kidney. *Kidney Int*. 1974; 6: 346-365

61. Kobori H, Ischihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T: Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy in rats. *J. Endocrinol*..1998; 159: 9-14

62. Kobori H, Ischihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T: Role of the renin- angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am. J. Physiol*.. 1997; 273: H593-599

63. Kobori H, Ischihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T: Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *J Endocrinol*.. 1999; 160 (1): 43-47

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

65. Boluyt MO, Bing OH, Lakatta EG: The aging spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur. Heart. J*.. 1995; 16: 19-30

66. Bing OH, Ngo HQ, Humphries DE, Robinson KG, Lucey EC, Carver W, Brooks WW, Conrad CH, Hayes JA, Goldstein RH: Localization of alpha 1 (I) collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J. Mol. Cell. Cardiol*.. 1997; 29(9): 2335-2344

67. Boluyt MO, O´Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG: Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ. Res.*. 1994; 75(1): 23-32

68. Brooks WW, Bing OH, Conrad CH, O´Neill L, Crow MT, Lakatta EG, Dostal DE, Baker KM, Boluyt MO: Captopril modifies gene expression in hypertrophied and failing hearts of aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 30(6): 1362-1368

69. Ziyadeh FN: The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.*. 1993; 22(5): 736-744

70. Yao J, Eghbali M: Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone- induced myocardial hypertrophy. *Circ. Res.*. 1992; 71 (4): 831-839

71. Yao J, Eghbali M: Decreased collagen mRNA and regression of cardiac fibrosis in the ventricular myocardium of the tight skin mouse following thyroid hormone treatment. *Cardiovasc. Res.*. 1992; 26: 603-607

72. Yao J, Eghbali M: Thyroid hormone decreases the steady state levels of mRNA for pro α_2 (I) collagen in the rat myocardium and in cardiac fibroblasts in culture (abstract). *J. Cell. Bioch.*. 1991; 15E: 24

73. Henry AL, Norman AW: Contributions to cellular and molecular endocrinology. *Proc. Annu. UCR- Nicolas Inst. Symp. Cell. Mol. Endocrinol. 11th Riverside CA*. 1989; 31-39

74. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989

75. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K: *Current potocols in molecular biology*. Current protocols; 1993

76. Leonard GD, Dibner MD, Battey JF: *Basic methods in molecular biology*. New York: Elsevier Science Publ. Co., Inc.: 1986

77. Eghbali M : Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res. Cardiol.*. 1992; 87 (suppl 1): 183-189

78. Schaper J, Speiser B: The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res. Cardiol.*. 1992; 87 (suppl 1): 303-309

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

80. Sun Y, Weber KT: Cardiac remodeling by fibrous tissue: role of local factors and circulating hormones. *Ann. Med.*. 1998; 30: 3-8

81. Eghbali M: Cellular origin and distribution of transforming growth factor-$ß_1$ in the normal rat myocardium. *Cell Tissue Res.*. 1989; 256: 553-558

82. MacLellan WR, Brand T, Schneider MD: Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Circ. Res.*. 1993; 73: 783-791

83. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B: Differential effects of transforming growth factor-ß1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. *Circ. Res.*. 1991; 69: 483-490

84. Ignotz RA, Massague J: Transforming growth factor-ß stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*.1986; 261: 4337-4345

85. Villarreal FJ, Dillmann WH: Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-ß$_1$, fibronectin, and collagen. *Am. J. Physiol.*. 1992; 262: 1861-1866

86. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P: Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am. J. Cardiol.*.1990; 65: 1G-7G

87. Lee AA, Dillmann WH, Mc Culloch AD, Villarreal FJ: Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-ß$_1$ in adult rat cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*. 1995; 27: 2347-2357

88. Sumpio BE, Banes AJ, Link WG, Johnson G: Enhanced collagen production by smooth muscle cells during repetitive mechanical stretching. *Arch. Surg.*.1988; 123: 1233-1236

89. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM: Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ. Res.*. 1995; 77: 863-868

90. Chapman D, Weber KT, Eghbali M: Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.*. 1990; 67: 787-794

91. Klein LE, Sigel AV, Douglas JA, Eghbali-Webb M: Upregulation of collagen type I gene expression in the ventricular myocardium of thyriodectomized male and female rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*. 1996; 28: 33-42

92. Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, Hynes RO: Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.*. 1987; 2573-2580

93. Ahumada G, Saffitz J: Fibronectin in rat heart: a link between cardiac myocytes and collagen. *J. Histochem. Cytochem.*. 1984; 32: 383-388

94. Albelda S, Buck C: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*. 1990; 4: 2868-2880

95. Green K, Goldman R: Evidence of an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 1986; 6: 389-405

96. Hynes R, Yamada K: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell. Biol*..1982; 95: 369-377

97. Repesh L, Fitzgerald T, Furcht L: Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J. Histochem. Cytochem*..1982; 30: 351-358

98. Wakui S, Fursato M, Nikaido T, Yokota K, Sekigushi J, Ohmori K, Kano J, Uschigome S: Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in human granulation tissue in relation to capillary development. *Cell Struct.Func.*. 1990; 15: 201-210

99. Mamuya WS, Brecher P: Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. *J. Clin. Invest*.. 1992; 89: 392-401

100. Timpl R, Rohde H, Gehron Robey P, Rennard S, Foidard J-M, Martin G: Laminin-A Glycoprotein from basement membranes. *Biol. Chem*..1979; 254: 9933-9937

101. Wan Y, Wu T, Chung A, Damjanov I: Monoclonal antibodies to laminin reveal the heterogeneity of basement membranes in the developing and adult mouse tissues. *J. Cell. Biol*.. 1984; 98: 971-979

102. Contard F, Koteliansky V, Marotte F, Dubus I, Rappaport L, Samuel JL: Specific alterations in the distribution of extracellular matrix components within rat myocardium during the development of pressure overload. *Lab. Invest*.. 1991; 64: 65-75.

103. Marchant C, Sernia C., Brown L: Renin-Angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 22: 449-455

104. Yates L, Greaser M: Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. *J. Mol. Biol.*. 1983; 168: 123-141

105. Warrick H, Spudich J: Myosin structure and function in cell motility. *Ann. Rev. Cell. Biol.*.1987; 3: 379- 421

106. Wikman-Coffelt J, Sievers R, Parmley W: Influence of myocardial isomyosins on cardiac performance and oxygen consumption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*.1985; 133: 1314-1323

107. Lyons G, Schiaffino S, Sassoon S, Barton P, Buckingham M: Developmental regulation of myosin gene expression in normal mouse cardiac muscle. *J. Cell. Biol.*. 1990; 111: 2427-2436

108. Brown L, Passmore M, Duce B, Sernia C: Angiotensin receptors in cardiac and renal hypertrophy in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*. 1997; 29: 2925-2929

109. Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V: Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 970-977

110. Nakao K, Minobe W, Roden R,Bristow MR, Leinwand LA: Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J. Clin. Invest.*. 1997; 100: 2362-2370

111. Lompre A M, Nadal-Ginard B, Mahdavi V: Expression of the cardiac ventricular α- und ß-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.*. 1984; 259: 6437-6446

112. Green NK, Franklyn JA, Ahlquist JA, Gammage MD, Sheppard MC: Differential regulation by thyroid hormones of myosin heavy chain alpha and beta m-RNAs in the rat ventricular myocardium. *J. Endocrinol.*. 1989; 122: 193-200

113. Dillmann WH, Barrieux A, Shanker R: Influence of thyroid hormone on myosin heavy chain mRNA and other messenger RNAs in the rat heart. *Endocr. Res.*. 1989; 15: 565-577

114. Dillmann WH, Rohrer D, Popovich B, Barrieux A: Thyroid hormone induced changes in cardiac proteins and mRNAs. *Horm. Metab. Res.*. 1987; 17: 26-29

115. Swynghedauw B: Developmental and functional adaption of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev.*. 1986; 66: 710-730

116. Clark W, Chizzonite R, Everett A, Rabinowitz M, Zak R: Species correlation between cardiac isomyosins. *J. Biol. Chem.*. 1982; 257: 5449-5454

117. Green NK, Gammage MD, Franklyn JA, Heagerty AM, Sheppard MC: Regulation of ß-myosin heavy chain, c-myc and c-fos proto-oncogenes in thyroid hormone-induced hypertrophy of the rat myocardium. *Clin. Sc.*. 1993; 84: 61-67

118. Buttrick P, Malhotra A, Factor S, Geenen D, Leinwand L, Scheuer J: Effect of aging and hypertension on myosin biochemistry and gene expression in the rat heart. *Circ. Res.*. 1991; 68: 645-652

119. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S: Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.*. 1991; 5: 3037-3046

120. Ogawa T, Linz W, Stevenson M, Bruneau BG, de Bold MLK, Chen JH, Eid H, Schölkens BA, de Bold AJ: Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation*. 1996; 93: 2059-2067

121. Gardner DG, Gertz BJ, Hane S: Thyroid hormone increases rat natriuretic peptide messenger ribonucleic acid accumulation in vivo and in vitro. *J. Mol. Endocrinol*..1987; 1: 260-265

122. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V: Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci*.. 1988; 85: 339-343

123. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992; 114: 521-532

124. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992; 359: 845-848

125. Karnat B, Brown LF, Mansean EJ, Senger DR, Dvorak HF: Expression of permeability factor by human granulosa and theca lutein cells. *Am. J. Pathol*.. 1995; 146: 157

126. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M,: Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; 89: 2183-2189

127. Laddoux A, Fredlin C: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1993; 195 (2): 1005-1011

128. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc. Res*. 1994; 28: 1176-1182

129. Shinohara K: The expression and role of vascular and endothelial growth factor (VEGF) in human normal and myocardial infarcted heart. *Hokkaido J. Med. Sci*..1994; 69: 978-981

130. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellinsworth LR, Roberts AB, Sporn MB: Expression of transforming growth factor ß1 in specific cells and tissues of adult and noenatal mice. *J. Cell. Biol*. 1989; 108: 661-669

131. MacKay K, Kondiah P, Danielpour D, Austin III AH, Brown PD: Expression of transforming growth factor ß1 and ß2 in rat glomeruli. *Kidney Int*..1990; 38: 1095-1100

132. MacKay K, Striker L, Stauffer JW, Doi T, Agodoa LY, Striker GE: Transforming growrth factor-ß: murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. *J. Clin. Invest*.. 1989; 83: 160-167

133. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of transforming growth factor-ß. *J. Cin. Invest*.. 1994; 93: 536-542

134. Border WA, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E: Transforming growth factor-ß regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int*..1990; 37: 689-695

135. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA: Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor –ß1. *Kidney Int*.. 1992; 41: 1213-1221

136. Alvarez R, Haverty JTP, Watanabe M, Iozzo R, Neilson EG: Biosynthetic and proliferative heterogeneity of anatomically distinct fibroblasts probed with paracrine cytokines. *Kidney Int*.. 1992; 41: 14-23

137. Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA: Elevated expression of transforming growth factor-ß and proteoglycan production in expermintal glomerulonephritis. *J. Clin. Invest*.. 1990; 86: 453-462

138. Coimbra T, Wiggins R, Noh JW, Merrit S, Phan SH: Transforming growth factor-ß production in anti- glomerular basement membrane disease in the rabbit. *Am. J. Pathol*.. 1991; 138: 223-234

139. Ziyadeh FN, Goldfarb S: The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int*.. 1991; 39: 464-475

140. Ziyadeh FN, Goldfarb S, Kern EFO: Diabetic nephropathy: metabolic and biochemical mechanisms. In: *The kidney in Diabetes*, edited by Brenner BM and Stein JH. New York: Churchill Livingstone, 1989, p. 87-113

141. Ayo SH, Radnik RA, Glass WF, Garoni AJ, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI: Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am. J. Physiol*.; 1991; 260: F185-F191

142. Ayo SH, Radnik RA, Garoni J, Glass WF, Kreisberg JI: High glucose causes an increase in extracellular matrix proteins in cultured mesangial cells. *Am. J. Pathol*..1990; 136: 1339-1348

143. Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanbe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collage gene transcription in proximal tubule. *Am. J. Physiol*.. 1990; 259: F704-F714

144. Ziyadeh FN, Simmons DA, Snipes ER, Goldfarb S: Effect of myo-inositol on cell proliferation and collagen transcription and secretion in proximal tubule cells cultured in elevated glucose. *J. Am. Soc. Nephrol.*.1991; 1: 1220-1229

145. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN: Elevated glucose stimulates TGF-ß gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int*.. 1992; 41: 4167-4171

146. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Erickson M, Ziyadeh FN: High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-ß. *Kidney Int*.. 1992; 42: 647-656

147. Wolf G, Müller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous TGF-ß. *J. Clin. Invest*.. 1993; 92: 1366-72

148. Kobori H, Ischihara A, Suzuki H, Takenaka T, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T: Role of the renin- angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. *Am. J. Physiol*.. 1997; 273: H593-599

149. Katz AI, Emmanouel DS, Lindheimer MD: Thyroid hormone and the kidney. *Nephron*. 1975; 15: 223-249

150. Oberbäumer I: Retroposons do jump: a B2 element recently integrated in an 18s rDNA gene. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 671-677

151. Weindel K, Marme D, Weich HA: AIDS-associated Kaposi sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm*.. 183: 1167-1174

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- meinem Doktorvater **Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper** für die fachliche Beratung und Unterstützung
- meinem Betreuer **Dr. Rene Zimmermann** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die erfolgreiche Zusammenarbeit und die geduldige Unterweisung auf dem Gebiet der Molukularbiologie
- dem Urheber der Arbeit **Dr. Lindsay Brown**, der mir bei allen Fragen, trotz der weiten lokalen Entfernung, mit seinem Rat zur Seite stand
- **Frau Prof. Dr. J. Schaper**, die mir wertvolle Tips im Rahmen meiner Korrekturen gab
- den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekularbiologie, insbesondere **Petra Strauch** und **Claudia Ullmann**
- **Gerhard Stämmler**, der maßgeblich an der statistischen Auswertung, der Gestaltung der Graphiken und der Textgestaltung beteiligt war
- **meinen Eltern** für die Ermöglichung, sowohl meines beruflichen Werdegangs, als auch meines privaten Lebensweges

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kraft

Vornamen:	Christoph Ewald
Beruf:	Arzt
Geburtsdatum/-ort:	01.05.1969 in Mayen
Konfession:	Römisch-Katholisch
Anschrift:	Georg-von-Boeselagerstr. 36, 53117 Bonn
Familienstand:	ledig
Eltern:	Kurt Kraft, Rechtsanwalt Erika Kraft, geb. Müller, Hausfrau
Geschwister:	Susanne Kraft, Dipl. Psychologin Birgit Bauer, Erzieherin

Schulbildung

1975-1979	Grundschule Kottenheim
1979-1987	Neuspr. Gymnasium, Mayen
1987-1989	Privatschule in Bonn Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

01/1990-03/1990	Panzergrenadierbataillon 342
04/1990-09/1991	Panzerbataillon 344

Hochschulbildung

10/91-10/99	Justus-Liebig-Universität zu Gießen: Studiengang Medizin
09/94	Ärztliche Vorprüfung
03/96	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/98	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/98-09/99	Praktisches Jahr
10/99	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

wissenschaftliche Arbeit

04/97-05/98 und 11/99-01/00	Labortätigkeit am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Abteilung Kardiologie; Arbeitsgruppe Molekularbiologie Prof. Schaper; Thema:Einfluß von Trijodtyronin auf die extrazelluläre Matrix von Rattenherzen und Rattennieren

AiP-Zeit

01.02.00-31.03.00	Urologische Abteilung KH Mayen; Dr. Ocko/ PD Dr. Winter
01.04.00-31.03.01	Chirurgische Abteilung KH Mayen; CA Dr. Engelke
01.04.01-20.05.01	Urologische Abteilung KH Mayen; Dr. Ocko/ PD Dr. Winter
21.05.01-31.07.01	Urologische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Bonn; Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. S. C. Müller

Assistenzarzt

ab 01.08.01	Urologische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Bonn; Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. S.C. Müller