

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Klinik für Innere Medizin-Kardiologie

Direktor: Prof. Dr. B. Maisch

**PPARalpha induzierte Hemmung der TNFalpha-mRNA-Expression
bei durch Talkum induzierter Perikarditis der Ratte**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von

Heiko König

aus Kandel

Marburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 21.11.2002

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. B. Maisch

Coreferent: PD Dr. S. Vogt

Meinen Eltern sowie meinem Großvater Walter König (1926-1982).

In Liebe und Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Perikard und Epikard.....	4
1.2 Perikarditis.....	5
1.2.1 Pathophysiologie der durch Talkum induzierten Perikarditis	9
1.2.2 Therapie der Perikarditis	11
1.3 Transkriptionsfaktoren.....	14
1.3.1 Nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B)	14
1.3.2 Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs).....	21
1.4 Antisense-Oligonukleotide zur selektiven Gen-Suppression	24
1.5 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α).....	26
1.6 Kollagen I und Kollagen-System.....	29
1.7 AT1A-Rezeptor und Renin-Angiotensin-System (RAS).....	31
1.8 Problemstellung	33
2. Material und Methoden.....	37
2.1 Material	37
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits	37
2.1.2 Geräte	39
2.2 Versuchstiere.....	40
2.2.1 Charakterisierung der Ratten und der Haltungsbedingungen	40
2.3 Methoden.....	40
2.3.1 Operationstechnik der talkum-induzierten Perikarditis	40
2.3.2 Entfernung des Perikards	41
2.3.3 Anästhesie.....	42
2.3.4 Applikation der Antisense-Oligodesoxynukleotide	43
2.3.5 RNA-Isolierung.....	44
2.3.6 cDNA-Synthese	44
2.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	45

2.3.8	Primer	46
2.3.9	Interner Standard.....	48
2.3.10	Agarosegelelektrophorese.....	48
2.4	Statistische Methoden	50
2.4.1	Mittelwertbildung.....	50
2.4.2	Korrelationen	50
2.4.3	Ermittlung der Fallzahl	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Statistische Auswertungen.....	51
3.1.1	Mortalität	51
3.1.2	Körpergewicht	52
3.1.3	Perikardgewicht.....	53
3.1.4	Perikardgewicht bezogen auf das Körpergewicht.....	54
3.1.5	Perikardiale GAPDH-mRNA-Expression.....	55
3.1.6	Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.....	56
3.1.7	Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression	57
3.1.8	Perikardiale AT1A-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH	58
3.1.9	Perikardiale AT1A-mRNA-Expression.....	59
3.1.10	Perikardiale NF-κB1 (p50)-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH	60
3.1.11	Perikardiale NF-κB1 (p50)-mRNA-Expression.....	61
3.1.12	Perikardiale NF-κB p65-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.....	62
3.1.13	Perikardiale NF-κB p65-mRNA-Expression	63
3.1.14	Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.....	64
3.1.15	Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression	65
3.2	Korrelationen.....	66
3.3	Einfluss der perikardialen NF-κB p65-Antisense-Applikation auf die peri- und myokardiale AT1A-mRNA-Expression	72

4. Diskussion	73
4.1 Methodenkritik.....	73
4.1.1 Wahl des Perikarditismodells.....	73
4.1.2 Wahl der Labortiere.....	75
4.1.2.1 Pilotversuche	75
4.1.3 Statistische Methoden	78
4.2 Diskussion der Ergebnisse	79
4.2.1 Einfluss von Talkum auf das Perikard.....	79
4.2.2 Einfluss des PPARalpha-Agonisten Fenofibrat auf inflammatorische Prozesse im Perikard der Ratte im talkum-induzierten Entzündungsmodell.....	82
4.2.3 Effekt der NF-κBp65-Antisense-Applikation auf die peri- und myokardiale AT1A-mRNA-Expression der Ratte im talkum-induzierten Entzündungsmodell	84
Zusammenfassung.....	86
Literaturverzeichnis.....	88
Anhang	111
Abbildungen der Agarosegelelektrophorese.....	111
Abkürzungen.....	112
Verzeichnis der akademischen Lehrer	115
Danksagung.....	116
Ehrenwörtliche Erklärung.....	117

1. Einleitung

1.1 Perikard und Epikard

Das Herz ist von einer Hüllstruktur, dem sogenannten Herzbeutel (Perikard), faltenlos umgeben. Diese Struktur setzt sich aus einem inneren, viszeralen und einem äußeren, parietalen Blatt zusammen. Das äußere Blatt wird als lamina parietalis pericardii serosi bezeichnet und zeigt an seiner Außenfläche kompaktes, kollagenfaseriges und elastisches Gewebe, dessen Fasern scherengitterartig angeordnet sind (Pericardium fibrosum). An der Innenfläche findet sich eine einschichtige Lage flacher bis kubischer Mesothelzellen, die sich auf die Herzaußenfläche umschlägt und somit das viszerale Blatt des Perikards bzw. die lamina visceralis pericardii serosi (Epikard) bildet (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000). Das Epikard bildet die äußere Bedeckung des Herzens und ist fest mit dem Myokard verbunden. Die Mesothelzellschicht ruht hier auf einem Stroma aus lockerem, kollagenfaserigem Stützgewebe. Dieses enthält elastische Fasern, die Herzwände versorgenden großen Arterien und die größeren Venenäste, welche Blut aus der Herzwand führen. In Bereichen, in denen größere Äste der Koronararterien und -venen im Epikard eingebettet sind, ist die kollagenfaserige Schicht durch unterschiedlich starke Fetteinlagerungen verdickt, wodurch sich eine Polsterung der Blut- und Lymphgefäße sowie der sich hier befindlichen nervalen Strukturen ergibt (Gratzl 2002). Der von Mesothel ausgekleidete Raum zwischen den beiden Serosablättern wird als Herzbeutelhöhle (cavum pericardii) bezeichnet. Hier befindet sich beim Menschen eine geringe Menge seröser Flüssigkeit (ca. 10-20 ml), welche als Verschiebeschicht fungiert und das nahezu reibungsfreie Aneinandergleiten der viszeralen und parietalen Anteile des Perikards während der Herzaktion gewährleistet (Leonhardt et al. 1987, Schiebler und Schmidt 1991, Frick et al. 1992, Fleischhauer 1994, Moll 1995).

Der Herzbeutel isoliert das Herz von anderen Thoraxstrukturen und sichert die geometrische Position bei Änderung der Körperlage, Bewegungsrichtung und seitendifferentem Druck im Pleuraraum. Im weiteren erfüllt der Herzbeutel neben diesen mechanischen Funktionen auch hämodynamische Aufgaben, indem unter anderem der Dehnbarkeit des Herzmuskels bei Volumenbelastung eine obere Grenze

gesetzt wird. Diese Funktion wird durch das wenig dehnbare Pericardium fibrosum sichergestellt (Holt 1970, Bubenheimer 1996).

Der Herzbeutel ist mit seinem fibrösen Anteil am Vorderrand seiner Zwerchfellfläche und in der Umgebung des Foramen venae cavae mit dem Centrum tendineum des Zwerchfells fest verwachsen. Nach dorsal zeigt sich eine durch lockere Bindegewebsstränge sichergestellte Verbindung mit Trachea und Ösophagus, nach ventral mit dem Sternum (Lippert 1993).

1.2 Perikarditis

Als Perikarditis bezeichnet man eine Entzündung der Herzbeutelblätter, welche isoliert oder sekundär im Rahmen einer bestehenden Grunderkrankung auftreten kann. Die Ursachen einer Perikarditis sind ausgesprochen vielgestaltig und in Tabelle 1 aufgeführt. Grundsätzlich ist bei der Perikarditis jede Form der Entzündung (serös, fibrinös, eitrig, etc.) möglich (Sandritter und Thomas 1986). Das entzündliche Geschehen kann per continuitatem durch Übergreifen von benachbarten Strukturen wie beispielsweise der Lunge, der Pleura oder des Ösophagus oder auch traumatisch durch mechanische Reizungen im Rahmen eines verschluckten Fremdkörpers entstehen. Häufig werden das Epikard sowie das angrenzende Myokard in das zunächst lokalisierte entzündliche Geschehen miteinbezogen. Die klinischen Manifestationen einer Perikarditis zeigen ein breites Spektrum und hängen von einer großen Anzahl unterschiedlicher Faktoren ab. Dies sind vor allem die Ursache der Erkrankung, die Geschwindigkeit des Fortschreitens, das Ausmaß von Fibrose oder Perikarderguss sowie die durch Perikardfibrosierungen oder Flüssigkeitsansammlungen im Perikardspalt bedingte Beeinträchtigung von Kammerfüllung und Kammerentleerung (Riede et al. 1995a). Akute Perikarditiden können folgenlos abheilen. Chronische Verlaufsformen können hingegen zu Verschielungen, Schrumpfungen und Verkalkungen mit massiver Beeinträchtigung der kardialen Dynamik führen (Mügge und Daniel 1999). Abbildung 1 zeigt das Spektrum der Perikarderkrankungen.

Die Prognose einer unbehandelten Perikarditis, insbesondere der viralen Perikarditis, ist nicht zuletzt auch aufgrund einer möglichen Miteinbeziehung benachbarten Gewebes in den Entzündungsprozess ungünstig. Der Herzinsuffizienz liegen neben Erkrankungen der Herzkranzgefäße, der Herzklappen und des Herzmuskels auch entzündliche Erkrankungen des Herzbeutels zugrunde. Dabei stellt die Herzerweiterung, die dilatative Kardiomyopathie, häufig das Endstadium einer Entzündungserkrankung des Herzmuskels oder des Herzbeutels dar. Nachfolgende Aufzählung gibt einen Überblick über die Ursachen von Erkrankungen des Perikards (modifiziert nach Hort 1977, Butany 1991, Lorell 1997, Maisch 2000a):

I. Idiopathisch

II. Infektiöse Perikarditiden

- Viral: Adeno, Coxsackie A9, B1-4, Echo 8, Mumps, EBV, CMV, Varicella, HIV
- Bakteriell: Mykoplasmen, Pneumokokken, Meningokokken, Gonokokken, Haemophilus, Treponema pallidum, Borrelien, Chlamydien, Tuberkulose
- Pilze: Candida-Spezies, Histoplasmen
- Parasiten: Entamoeba histolytica, Echinokokken, Toxoplasmen

III. Perikarditis bei Kollagenosen

- Systemischer Lupus erythematoses
- rheumatoide Arthritis
- Spondylitis ankylosans
- Systemische Sklerose
- Dermatomyositis
- Periarteriitis nodosa
- Morbus Reiter

IV. Perikarditis bei Überempfindlichkeitsreaktionen oder Autoimmunerkrankungen

- rheumatisches Fieber
- Postperikardiotomiesyndrom
- Nach Myokardinfarkt: Dressler-Syndrom
- Autoreaktive (chronische) Perikarditis

V. Perikarditis und Perikarderguss bei Erkrankungen der benachbarten Organe

- Akuter Myokardinfarkt
- Myokarditis
- Aortenaneurysma
- Lungeninfarkt
- Pneumonie
- Erkrankungen des Ösophagus

VI. Perikarditis bei Stoffwechselerkrankungen

- Urämie
- Myxödem
- Morbus Addison
- Diabetische Ketoazidose
- Cholesterol-Perikarditis

- Schwangerschaft

VII. Traumatische Perikarditis

- stumpfe oder penetrierende Thoraxtraumen
- perforierende Verletzungen des Ösophagus, Fremdkörper
- Bestrahlung

VIII. Neoplastischer Perikarderguss bei

- kardialen Primärtumoren
- sekundären Tumoren / Metastasen
- Bronchialkarzinom
- Mammakarzinom
- gastrointestinale Karzinome
- Leukosen / Lymphome
- Sarkome
- Melanome
- u.a.

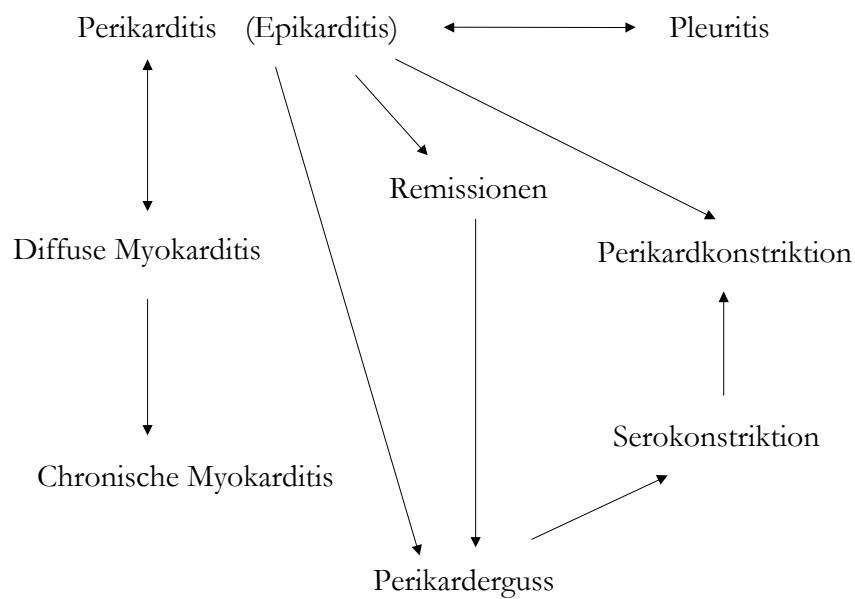


Abbildung 1: Spektrum der Perikarderkrankungen (Goldman 1975)

1.2.1 Pathophysiologie der durch Talkum induzierten Perikarditis

Die Entzündungsreaktion ist eine aktive Reaktion des Organismus auf unterschiedliche ätiologische Faktoren und wird über chemische Mediatoren und das Immunsystem moduliert. Grundlage der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente bildete das Modell der durch Talkum, chemisch Magnesiumhydroxypolysilikat, induzierten Entzündungsreaktion. Hierbei wurden definierte Mengen einer sterilen Talkumsuspension per injectionem intraperikardial appliziert. Talkum hat, wie auch das Urat, aufgrund seiner schlechten Abbaubarkeit als kristalline Substanz Fremdkörpereigenschaften und kann deshalb eine Entzündungsreaktion auslösen (Raisys 1961).

Im Bereich der Talkumpartikel kommt es zunächst zu einer exsudativen Reaktion mit Übertritt eiweißreicher flüssiger Bestandteile aus dem Kapillarbett in den Herzbeutel sowie zur Einwanderung von Granulozyten. In Abhängigkeit von der entzündlichen Schädigung bzw. Permeabilitätssteigerung an der Gefäßwand kommt es zusätzlich zu Fibrinabscheidungen im Sinne einer fibrinösen Entzündungsreaktion (fibrinöse Perikarditis). Außerhalb der Gefäße zeigt sich eine Polymerisation des Fibrinogens zu Fibrin, wodurch zunächst eine feine, samtartige Trübung und im weiteren Verlauf weißlich-gelbe Membranen in Erscheinung treten. Bei starker exsudativer Reaktion kann die Oberfläche des Perikards durch Zusammensinterung des eosinophilen Materials von einem makroskopisch nachweisbaren zottenartigen Fibrinmantel umgeben sein (Sandritter und Beneke 1981).

Da es im Zuge der intraperikardialen Talkumapplikation neben der Fremdkörperreaktion auch zu einer mechanischen Alteration und damit zu einer ausgeprägten Schädigung des Mesothels kommt, liegen die unterschiedlich dichten Fibrinbeläge dem submesothelialen Gewebe zum Teil direkt auf und können durch das fibrinolytische System des Organismus nicht entfernt werden. Die fibrinolytisch aktiven Mesothelzellen, die bereits in einem frühen Stadium beschädigt werden, sind hierzu ebenfalls nicht in der Lage. Aufgrund der Tatsache, dass die Talkumpartikel durch die eingeleiteten Mechanismen nicht neutralisiert und eliminiert werden können und die zunehmende Interzellularflüssigkeit sowie die lytischen Enzyme der eingewanderten Granulozyten den Abtransport derselben nicht bewirken können, schließt sich im weiteren Verlauf eine ausgeprägte Makrophageneinwanderung an.

Die Makrophagen treten hierbei über Zytoplasmaausläufer mit den kristallinen Fremdkörperpartikel in Berührung und nehmen diese über mundförmige Einsenkungen der Zellmembran in das Zytoplasma auf. In Abhängigkeit von der Größe der zu phagozytierenden Substanzen kann es durch Konfluenz mehrerer Makrohagen zur Bildung von Riesenzellen vom Fremdkörpertyp kommen. Die Zellfusion wird hierbei durch den von aktivierten Lymphozyten sezernierten Makrophagen-Fusions-Faktor (MFF) hervorgerufen (Rodriguez et al. 1983).

Im histologischen Schnitt imponieren bei dieser Entzündungsform neben Rundzellen, Epitheloidzellen und Histiozyten die in den Riesenzellen eingeschlossenen, vereinzelt und in Haufen angeordneten kristallinen, in polarisiertem Licht doppelbrechenden Fremdkörperpartikel (Riede et al. 1995b). Im Rahmen der persistierenden Auseinandersetzung mit dem unlöslichen, nicht resorbierbaren Material setzen die Makrophagen eine ausgeprägte Vielfalt unterschiedlicher Substanzen frei, welche in den Entzündungsprozess eingreifen (Nathan 1987, Adams und Hamilton 1984). Die Sekretion der Makrophagen wird durch Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und Strukturen der unmittelbaren Umgebung reguliert. Hierzu gehören beispielsweise sich in Nachbarschaft der Makrophagen befindliche Zellen, Bestandteile der extrazellulären Matrix (z. Bsp. Fibronectin) oder Bestandteile des Serums (z. Bsp. Komplement). Die wichtigsten Makrophagenprodukte umfassen unter anderem neutrale Proteasen und Elastase, chemotaktische Substanzen, Komplementkomponenten, Zytokine wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor-alpha sowie Gerinnungsfaktoren, die für die lokale Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin verantwortlich sind. Arachidonsäuremetabolite, sowohl Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Produkte, die eine Vasodilatation und eine erhöhte Gefäßpermeabilität induzieren sowie Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Kapillarsprossen werden ebenfalls von Makrophagen sezerniert.

1.2.2 Therapie der Perikarditis

Die Anwendung der Perikardioskopie zur gezielten perikardialen Biopsie sowie Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie und Immunologie haben in den letzten Jahren einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung von Zielstrukturen entzündlicher Prozesse geleistet und somit neue Wege zu einer pathophysiologisch und ätiopathogenetisch begründeten Therapie der Perikarditis eröffnet. Die Therapie der Perikarditis erfolgt je nach Ätiologie antibakteriell, tuberkulostatisch, antiphlogistisch. Bei Vorliegen einer Herzbeutelamponade erfolgt evtl. eine diagnostische und/ oder therapeutische Perikardpunktion (Tabelle 1) Die häufigste Form der Herzbeutelentzündung stellt die meist serofibrinöse, akute benigne Perikarditis dar. Die Ursache ist bislang ungeklärt (idiopathische Perikarditis). Virologische, biochemische, molekularbiologische und immunologische Untersuchungstechniken lassen jedoch virale und autoimmune Prozesse vermuten (Maisch 1992, Maisch et al. 1994). Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick hinsichtlich des diagnostischen und therapeutischen Verhaltens bei Vorliegen einer idiopathischen Perikarditis.

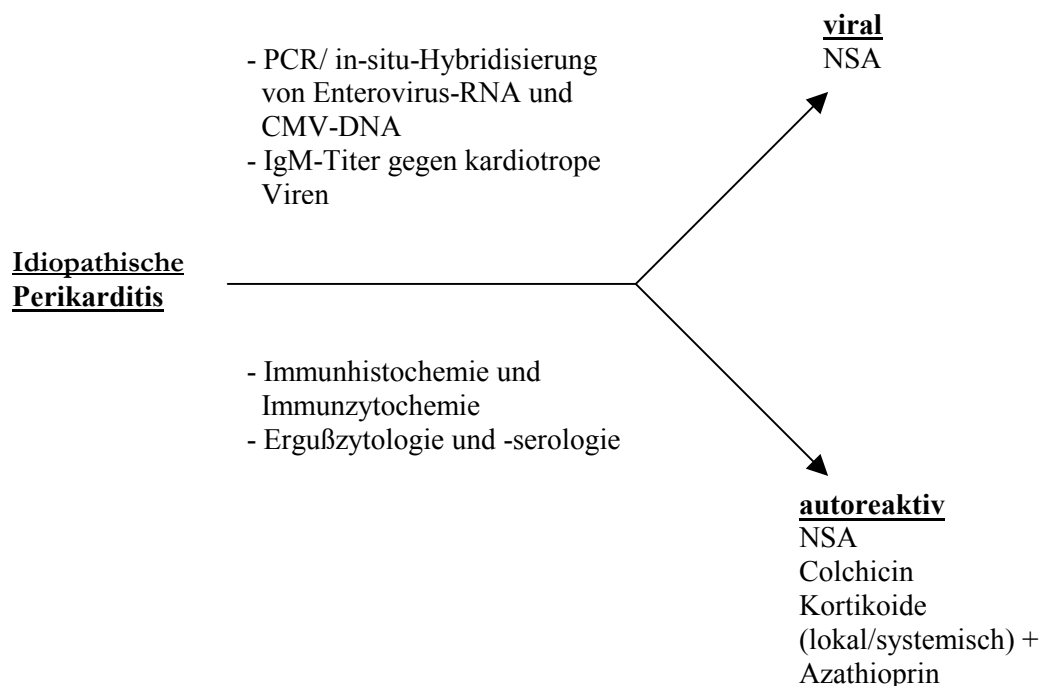


Abbildung 2: Diagnostisches und therapeutisches Verhalten bei Vorliegen einer idiopathischen Perikarditis (Maisch 2000b).

Tabelle 1: Ätiologie und Therapie der akuten Perikarditis (Maisch 2002)

Ätiologie	Therapie
<p><i>Infektiöse Perikarditis</i></p> <p>durch Viren (z. Bsp. Coxsackie A und B, CMV, Mumps, EBV)</p> <p>durch Bakterien (z. Bsp. Pneumokokken, Meningokokken, Gonokokken)</p> <p>durch säurefeste Stäbchen (Tbc)</p> <p>durch Pilze (Candida, Histoplasma)</p> <p>durch Parasiten (Entamoeba histolytica, Echinokokkus, Toxoplasma)</p>	<p>Hyperimmunserum (CMV), virustatisch</p> <p>Antibiotika (gezielt)</p> <p>tuberkulostatische Dreifachtherapie</p> <p>Antimykotika</p> <p>Antibiotika (gezielt)</p>
<p><i>Perikarditis bei Kollagenkrankheiten</i></p> <p>Lupus erythematodes disseminatus</p> <p>rheumatoide Arthritis</p> <p>Spondylitis ankylopoetica</p> <p>Sklerodermie</p> <p>Dermatomyositis</p> <p>Panarteriitis nodosa</p> <p>Morbus Reiter</p>	<p>Kortikoide und Immunsuppressiva</p>
<p><i>Perikarditis als Überempfindlichkeitsreaktion oder Autoimmunprozess</i></p> <p>rheumatisches Fieber</p> <p>Postkardiotomiesyndrom</p> <p>Postmyokardinfarktsyndrom</p>	<p>Kortikoide und Immunsuppressiva</p> <p>Antiphlogistika, evtl. Kortikoide*</p> <p>Antiphlogistika, evtl. Kortikoide*</p>
<p><i>Perikarditis als Miterkrankung benachbarter Organe</i></p> <p>Myokardinfarkt (Pericarditis epistenocardica)</p> <p>Myokarditis</p> <p>Aortenaneurysma</p> <p>Lungeninfarkt</p> <p>entzündliche Lungenerkrankungen</p> <p>Erkrankungen des Ösophagus</p>	<p>konservativ</p> <p>konservativ, evtl. Kortikoide</p> <p>Operation</p>

<p><i>Perikarditis bei Stoffwechselerkrankungen</i></p> <p>Niereninsuffizienz (Urämie)</p> <p>Myxödem</p> <p>Addison-Krise</p> <p>diabetische Ketoazidose</p> <p>Cholesterinperikarditis</p>	<p>Dialyse, PPkt. (PF)</p> <p>Schilddrüsenhormone</p> <p>Prednison</p> <p>Behandlung der Grundkrankheit</p> <p>PPkt., PF</p>
<p><i>Perikarditis bei Traumen</i></p> <p>direkte Einwirkung</p> <p>penetrierende Thoraxtraumen</p> <p>Perforation des Ösophagus</p> <p>Fremdkörper</p> <p>indirekte Einwirkung</p> <p>nichtpenetrierende Thoraxtraumen</p> <p>Bestrahlung (z. Bsp. bei Mediastinaltumoren)</p>	<p>Operation (falls notwendig)</p> <p>Operation (falls notwendig)</p> <p>Operation (falls notwendig)</p> <p>PPkt., PF, PE</p>
<p><i>Perikarditis bei Tumoren</i></p> <p>primär</p> <p>sekundär</p>	<p>PPkt. (Cisplatininstallation), PF</p> <p>PPkt. (Cisplatininstallation), PF</p>

* bei hämodynamisch relevantem Erguß

1.3 Transkriptionsfaktoren

Zellen müssen auf äußere Reize umgehend reagieren können. Hierzu sind zytoplasmatische Botenstoffe (“messenger“) notwendig, die eintreffende Signale von der Zelloberfläche an den Zellkern weitergeben. Einige dieser Botenstoffe vermitteln ihre Wirkung indem sie nach Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Zellkern translozieren und dort an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotorregionen von Genen binden. Auf diesem Wege kann die Transkription verschiedener Zielgene induziert, verstärkt oder inhibiert werden. Hierdurch wird das Proteinspektrum der Zelle verändert und eine Anpassung an den Reiz ermöglicht. Solche Reaktionen werden häufig durch induzierbare Transkriptionsfaktoren vermittelt. Diese DNA-bindenden Proteine sind in unstimulierten Zellen inaktiv und finden sich häufig an inhibitorischen Untereinheiten gebunden im Zytoplasma. Wird eine Zelle gereizt, kann es zu einer äußerst schnellen Aktivierung solcher Transkriptionsfaktoren kommen, was im weiteren Verlauf die Transkription verschiedener Zielgene zur Folge hat. Die Einleitung einer derart schnellen Reaktion ist insbesondere als Antwort auf pathobiologische Reaktionen auslösende Reize erforderlich (Frankel und Kim 1991, Pabo und Sauer 1992).

1.3.1 Nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B)

Nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B) ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, dem bei der Expression meist immunologisch relevanter Zielgene eine regulative Aufgabe zukommt. NF- κ B wurde erstmalig von Sen und Baltimore 1986 als B-Zell-spezifisches nukleäres Protein beschrieben, welches an ein DNA-Fragment des Enhancers des Genes für die leichte Kappa-Immunglobulinkette bindet. Auf diesem Fragment konnte eine zehn Basenpaare umfassende Sequenz (5'-GGGAATTTCC-3') als Bindungsstelle für NF- κ B identifiziert werden. Zunächst wurde angenommen, dass NF- κ B nur in Kernextrakten von B- und Plasmazellen vorhanden sei. Heute jedoch weiß man, dass es sich hierbei um einen ubiquitären, schnell reagierenden Transkriptionsfaktor handelt, der in zahlreichen Zellen exprimiert wird und bei der Synthese verschiedener Genprodukte eine zentrale Rolle spielt (Baeuerle und Henkel 1994, Siebenlist et al. 1994).

Eine große Anzahl von Genen, welche zum Beispiel für Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Immunrezeptoren, Akutphasenproteine oder Transkriptionsfaktoren kodieren, tragen NF- κ B-bindende Promotor- oder Enhancersequenzen (Tabelle 2).

In den meisten Zellen liegt NF- κ B in einer inaktiven, zytoplasmatischen Form vor, die durch die Interaktion von NF- κ B mit inhibitorischen Molekülen bedingt ist. Diese Inhibitoren werden als I κ B bezeichnet und verhindern, daß NF- κ B in den Zellkern wandert und somit in die aktive nukleäre Form überführt wird (Bauerle und Baltimore 1988, Zabel und Bauerle 1990). Eine Vielzahl interner oder externer Stimuli wie beispielsweise bakterielle oder virale Infektionen, inflammatorische Zytokine oder ionisierende Strahlung (Tabelle 3) induziert die Phosphorylierung und Ubiquitinylierung des I κ B-Moleküls und darauf folgend eine schnelle Dissoziation des Komplexes sowie eine anschließende Degradation von I κ B. NF- κ B transmigriert vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es durch Bindung an κ B-Motive in Promotor- und Enhancersequenzen die Transkription einer Vielfalt immunregulatorischer Gene initiieren oder verstärken kann und dabei in Verbindung mit anderen proentzündlichen Transkriptionsfaktoren tritt (Bauerle und Baltimore 1996) (Abbildung 3). Die Expression der NF- κ B-Zielgene dient der systemischen Aktivierung des Immunsystems und somit der schnellen Abwehrreaktion der Zelle. Dem Transkriptionsfaktor NF- κ B ist somit die Rolle als zentraler Koordinator der menschlichen Immunantwort zuzuschreiben.

Die Inhibition von NF- κ B stellt ein wichtiges therapeutisches Ziel dar, um unerwünschte, durch NF- κ B hervorgerufene biologische Reaktionen zu verhindern bzw. therapeutisch anzugehen.

Zahlreiche Gene, die bei Immun- und Entzündungsreaktionen, bei Akutphasenreaktionen, im Rahmen der Onkogenese oder bei viraler Replikation eine wichtige Rolle spielen, tragen κ B-bindende Sequenzen innerhalb ihrer regulatorischen Elemente. Verschiedene Proteine binden an κ B-Motive und aktivieren somit die Transkription ihrer Zielgene. Diese Proteine werden als κ B-bindende Proteine bezeichnet. Die NF- κ B/Rel-Protein-Familie gehört zur Gruppe dieser κ B-bindenden Proteine.

Bisher sind fünf Mitglieder der NF- κ B/Rel-Protein-Familie identifiziert und in zwei Gruppen klassifiziert worden (Thanos und Maniatis 1995). Gruppe 1-Proteine beinhalten NF- κ B1 (auch als p50 bezeichnet) und NF- κ B2 (auch als p52 bezeichnet). NF- κ B1 und NF- κ B2 entstehen durch Proteolyse der Vorläuferproteine (precursor) p105 und p100.

Gruppe 2-Proteine werden durch RelA (auch als p65 bezeichnet), RelB und c-Rel repräsentiert. Im Gegensatz zu den Gruppe 1-Proteinen zeigen die Proteine der Gruppe 2 keine Vorläufermoleküle.

Eine separate Gruppe bildet die Familie der I κ B-Proteine. Diese inhibitorischen Proteine umfassen das I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- δ , I κ B- ϵ und Bcl-3 (Blackwell und Christman 1997). I κ B- α ist das bisher am ausführlichsten charakterisierte I κ B-Protein. Aus den Vorläuferproteinen p100 und p105 werden neben NF- κ B1 und NF- κ B2 auch die inhibitorischen Proteine I κ B- γ und I κ B- δ synthetisiert. I κ B- β , I κ B- ϵ und Bcl-3 wurden bisher weniger ausführlich untersucht (Abbildung 4).

Verschiedene experimentelle Arbeiten konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B sequenzspezifisch an die DNA bindet und sich aus den verschiedenen homo- oder heterodimeren Kombinationsmöglichkeiten des NF- κ B/Rel-Proteins zusammensetzt (Kunsch 1992, Schmid 1994, Rothwarf 1999). Die prototypisch induzierbare Form zeigt sich als ein aus NF- κ B1 (p50)- und RelA (p65)-Protein-Untereinheiten zusammengesetztes Heterodimer. Verschiedene NF- κ B-Dimere zeigen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer transkriptionellen Aktivität (Baldwin 1996). NF- κ B liegt im Zytoplasma als ein inaktiver molekularer Komplex vor, der an ein I κ B- oder ein Gruppe 1-Vorläuferprotein gekoppelt ist. I κ B-Proteine bilden Trimere, die überwiegend mit RelA oder c-Rel enthaltenden Dimeren assoziiert sind, wohingegen Gruppe 2-Proteine mit NF- κ B/Rel-Proteinen Dimere bilden (Miyamoto und Verma 1995, Schmitz und Baeuerle 1995).

NF- κ B/Rel-Proteine besitzen an ihrem N-terminalen Ende ein gut konserviertes Segment, welches als Rel-Homologie-Domäne bezeichnet wird (Blank et al. 1992).

Diese Struktur vermittelt die DNA-Bindung, die Dimerisation und nukleare Translokation sowie die Interaktion mit I κ B. Die Rel-Homologie-Domäne enthält ein nukleäres Translokationssignal (NLS), welche die Translokation des NF- κ B-Komplexes in den Zellkern vermittelt. p105 und p100 zeigen am C-terminalen Ende mehrere Kopien einer Sequenzwiederholung (das sogenannte Ankyrinrepeat), das sich entsprechend auch bei der Familie der I κ B-Proteine finden lässt. Gruppe 2-Proteine enthalten eine oder mehrere Transaktivierungsdomänen, welche für die Transkription der Zielgene von wesentlicher Bedeutung sind. I κ B-Proteine zeigen mehrere Ankyrinrepeat-Motive, welche für die inhibitorische Funktion unverzichtbar sind. Am C-terminalen Ende findet sich eine Destabilisierungssequenz, welche die proteolytische Degradation des I κ B-Moleküls erleichtert.

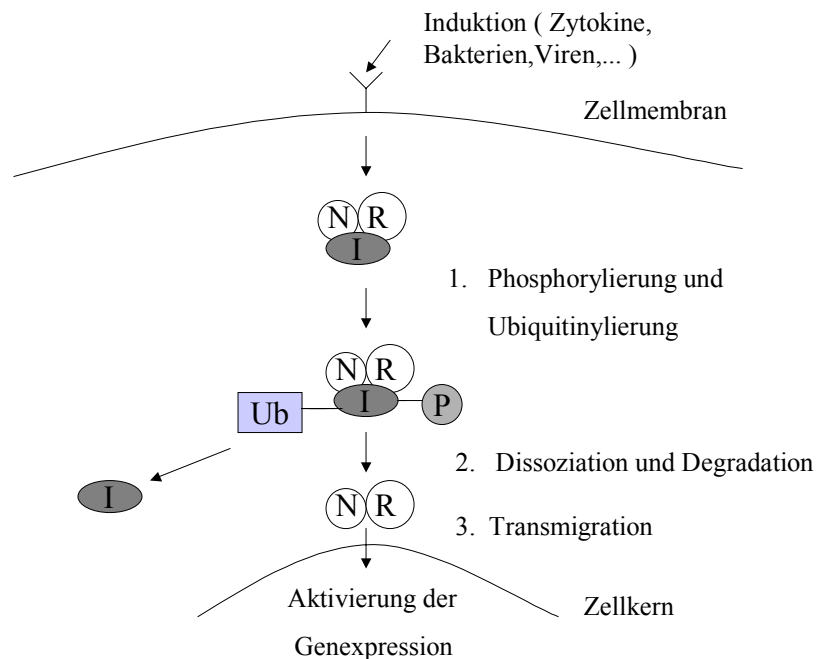


Abbildung 3: Aktivierungsschema von NF- κ B, beispielhaft dargestellt anhand des NF- κ B/Rel/I κ B Trimer (Baldwin 1996).

Tabelle 2: Zusammenstellung einiger physiologisch relevanter Zielgene, deren Expression durch NF- κ B reguliert wird. Modifiziert nach Grilli et al. 1993, Baeuerle und Henkel 1994, Siebenlist et al. 1994.

Zytokine	Tumornekrosefaktor (TNF)- α TNF- β Interferon (IFN)- β IFN- γ Interleukin (IL)-1 β IL-2 IL-6 IL-12
Chemokine	IL-8 Makrophagen Chemotaktisches Peptid-1
Adhäsionsmoleküle	E-Selektin Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-)-1 Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül (VCAM-)-1
Akutphasenproteine	C-reaktives Protein (CRP) Komplementfaktor Bf Komplementfaktor C3
Wachstumsfaktoren	IL-3 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (GM-CSF) Granulozyten-Kolonie-Stimulations-Faktor (G-CSF) Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (M-CSF)
Immunrezeptoren	Ig κ Leichtkette MHC Klasse I MHC Klasse II T-Zell Rezeptor β -Kette IL-2 Rezeptor α -Kette

Enzyme	NO-Synthase Cyclooxygenase-2 12-Lipoxygenase Phospholipase A2
Transkriptionsfaktoren	IκB-α p105 p100 c-Rel Bcl 3

Tabelle 3: Zusammenstellung einiger wichtiger Agentien, welche den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren. Modifiziert nach Grilli et al. 1993, Baeuerle und Henkel 1994, Siebenlist et al. 1994.

Zytokine	TNF-α TNF-β IL-1 IL-2 IL-17
Wachstumsfaktoren	GM-CSF Insulin
Immunrezeptoren	IgM
Mediatoren	Angiotensin II Thrombin Leukotrien B4 Prostaglandin E2
Stressreaktionen	Hypoxie Hämorrhagie
Physikalischer Stress	UV-Licht Ionisierende Strahlung Ozon

Bakterien und deren Produkte	M. tuberculosis L. monocytogenes Lipopolysaccharide Exotoxin B Toxisches Schock Syndrom Toxin
Viren und deren Produkte	HIV-1 HTLV-1 CMV EBV

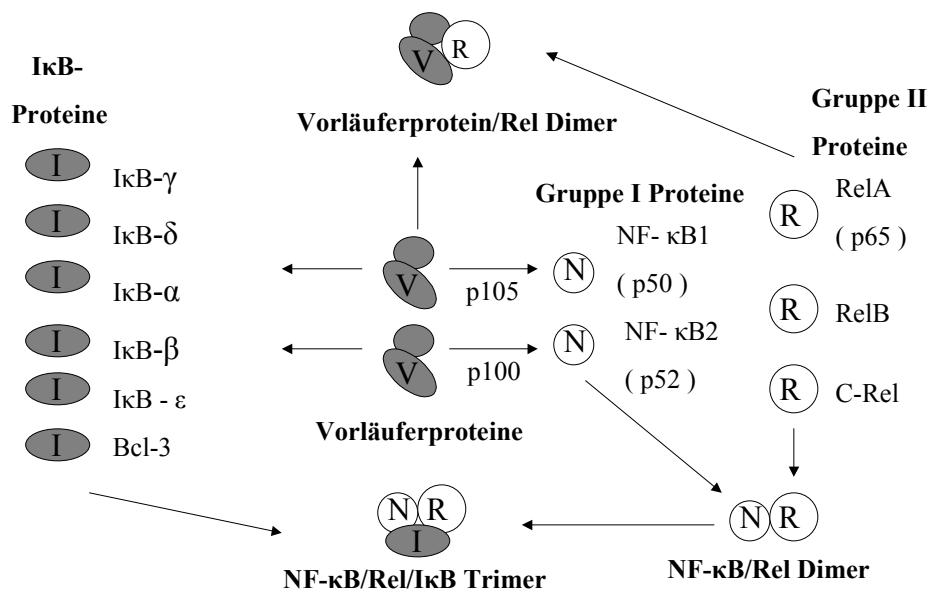


Abbildung 4: NF-κB/Rel/IκB-Proteine (Lee und Burckart 1998).

1.3.2 Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind spezifische Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, welche zur Überfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren gezählt werden (Isseman und Green 1990). PPARs regulieren die Genexpression, indem sie nach Ausbildung eines heterodimeren Komplexes mit dem "retinoid X receptor (RXR)", einem verbreiteten Bindungspartner für zahlreiche nukleäre Hormonrezeptoren wie beispielsweise dem Schilddrüsenhormon- oder Vitamin D-Rezeptor (Mangelsdorf und Evans 1995), PPAR-response Elemente (PPAREs) erkennen, welche in der Promotorregion der Zielgene lokalisiert sind (Schoonjans et al. 1996, Tugwood et al. 1992). RXR existiert in verschiedenen Isoformen, RXRalpha, beta und gamma und wird durch die 9-cis-Retinoinsäure aktiviert (Kliwer et al. 1992) (Abbildung 5). PPARs entfalten ihre Wirkung u.a. in der Regulation des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels sowie der Glukosehomöostase. Weiterhin sind PPARs an der Zellproliferation und -differenzierung, dem Vorgang der Apoptose und an Entzündungsreaktionen beteiligt (Chinetti et al. 2000).

Bislang konnten drei PPAR-Subtypen, PPARalpha, PPARbeta (NUC-1 oder PPARdelta) und PPARgamma identifiziert werden (Dreyer et al. 1992), wobei jeder Subtyp von einem separaten Gen kodiert wird und durch eine unterschiedliche Gewebeverteilung (Auboeuf et al. 1997, Grannemann et al. 1998) charakterisiert ist. PPARalpha wird in hohem Maße in Geweben wie Leber, Niere, Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert (Braissant et al. 1995), wo es zentrale Prozesse im Lipidmetabolismus reguliert (Peters et al. 1997, Aoyama et al. 1998). PPARbeta ist ubiquitär vorhanden. Seine Funktion ist bislang ungeklärt. PPARgamma ließ sich vorwiegend im Intestinum und im Fettgewebe nachweisen (Tontonoz et al. 1994, Mansen et al. 1996). PPARgamma spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Adipogenese und kontrolliert in Adipozyten die Expression der Lipoproteinlipase sowie anderer Gene. Es sind bisher zwei Isoformen bekannt, die als PPARgamma1 und PPARgamma2 bezeichnet werden. Die Expression von PPARgamma2 scheint auf Adipozyten beschränkt zu sein, wohingegen PPARgamma1 in unterschiedlichen Geweben wie Leber, Herz, Nieren, Skelettmuskulatur sowie Dünn- und Dickdarm nachgewiesen werden konnte (Auboeuf et al. 1997, Brockmann et al. 1998).

PPARs unterscheiden sich jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe (Tabelle 4), sondern besitzen auch für sie zum Teil spezifische Liganden (Peroxisom-Proliferatoren, PP). Synthetische Liganden sind u.a. lipidsenkende Fibratderivate wie z. Bsp. das Fenofibrat und eine Gruppe neuer Antidiabetika, sogenannte Thiazolidindione, wie Troglitazon und Rosiglitazon. Zu den natürlich vorkommenden Peroxisom-Proliferatoren gehören neben den Fettsäurederivaten auch Eicosanoide wie Prostaglandine und das Leukotrien B₄ (Forman et al. 1995, Devchand et al. 1996, Kliewer et al. 1995, Krey et al. 1997, Nagy et al. 1998). Verschiedene Autoren konnten in den vergangenen Jahren zeigen, daß PPARalpha und PPARgamma in der Gefäßwand vorhanden sind und in Monozyten/ Makrophagen (Chinetti et al. 1998), Endothelzellen (Delerive et al. 1999, Marx et al. 1999, Inoue et al. 1998) und glatten Muskelzellen (Staels et al. 1998, Marx et al. 1999) exprimiert werden. In Monozyten/ Makrophagen führt die Aktivierung von PPARalpha zur Reduktion der prokoagulatorischen Aktivität wohingegen die Aktivierung von PPARgamma u.a. die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine inhibiert (Jiang et al. 1998). In Endothelzellen blockiert Fenofibrat als synthetischer PPARalpha-Ligand die Adhäsionsmolekülexpression sowie die Leukozytenadhäsion (Marx et al. 1999), was einer weiteren Leukozytenrekrutierung entgegenwirkt. PPARgamma hemmt in Endothelzellen die Expression chemotaktisch wirksamer Proteine und unterbindet somit die Migration proinflammatorischer Zellen aus dem Blut (Marx et al. 1999). PPARalpha-Aktivatoren inhibieren in glatten Gefäßmuskelzellen die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin 6 (IL-6). Die Beobachtung, dass Mäuse, welchen das PPARalpha-Gen fehlt, eine verlängerte Immunantwort auf Entzündungsreize zeigen, legt die Vermutung nahe, dass PPARalpha an der Regulierung der Dauer von Entzündungsreaktionen entscheidend beteiligt ist (Devchand et al. 1996). Berücksichtigt man die zahlreichen Mechanismen, die von PPARs beeinflusst werden, so ist von einer Schlüsselrolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen auszugehen. Auch ist zu erwarten, dass von diesen Transkriptionsfaktoren ein therapeutisches Nutzen bei inflammatorischen Prozessen ausgeht.

Ein Teil der PPAR-Aktivatoren wie Fenofibrat (Lipidsenker) als PPARalpha-Ligand und Troglitazon und Rosiglitazon (in den USA als Antidiabetika bereits zugelassen) als PPARgamma-Ligand befinden sich bereits in klinischer Anwendung.

Diese Medikamente könnten über ihre PPAR-aktivierende Wirkung inflammatorische Prozesse beeinflussen und so einen weiteren therapeutischen Nutzen für Patienten mit Hyperlipoproteinämie oder Diabetes mellitus Typ II bringen.

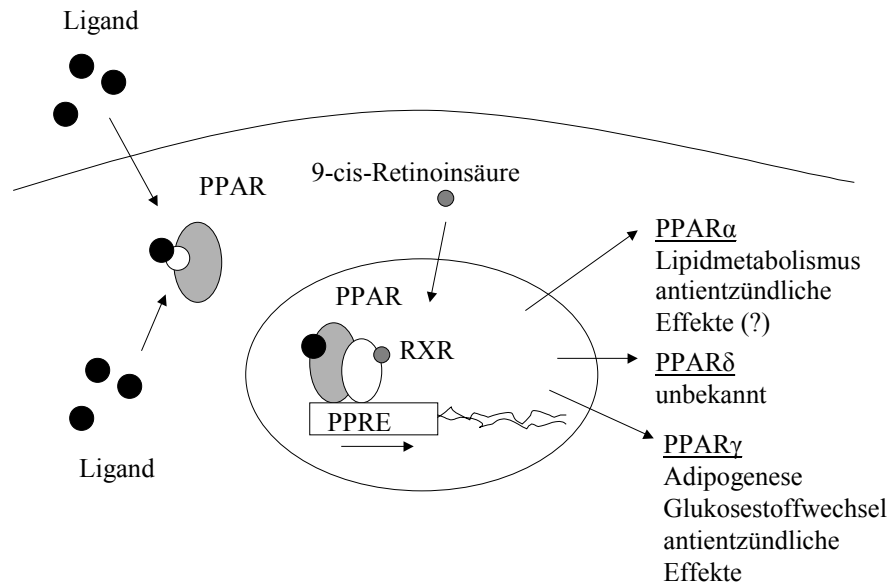


Abbildung 5: Aktivierung des PPAR-Rezeptors (Bishop-Bailey 2000)

Tabelle 4: Relative Gewebeverteilung von PPAR- und RXR-Isoformen (Bishop-Bailey 2000).

Gewebe	PPARalpha	PPARbeta	PPARgamma	RXRalpha	RXRbeta	RXRgamma
Herz	+++	++	++	+	+++	+++
Leber	+++	+	+	+++	+	+++
Lunge	+	+++	+/-	++	+++	+/-
Milz	+	++	++	++	+++	-
Niere	+++	+++	++	++	++	+
Gehirn	-	+++	+	+/-	+++	++
Intestinum	+	++	++	+	+	-
Nebenniere	++	++	++	+	+++	+
Skelettmuskulatur	+++	++	++	++	+++	+++

1.4 Antisense-Oligonukleotide zur selektiven Gen-Suppression

Um ihre Funktion aufrechtzuerhalten, muss eine Zelle in der Lage sein, Tausende Gene zum gleichen Zeitpunkt synthetisieren zu können. Die genetische Information ist in der DNA durch die lineare Abfolge der vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin kodiert. Jede Base im Doppelstrang bestimmt eindeutig ihre gegenüberliegende, komplementäre Base, wodurch eine exakte Weitergabe der genetischen Information sichergestellt wird. Der Fluss der genetischen Informationsübertragung erfolgt von der DNA zum Protein. Zur Expression eines Gens, d.h. zur Synthese eines entsprechenden Proteins, muss die Sequenzinformation der DNA in eine Proteinsequenz umgesetzt werden. Da die DNA nicht selbst an der Proteinsynthese teilnimmt, wird die Information aus dem Zellkern zum Ort der Proteinsynthese im Zellplasma, den Ribosomen, übertragen. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet und geschieht mittels eines RNA-Zwischenträgers, der sog. m-RNA oder Boten-RNA. RNA enthält die gesamte Information der DNA-Sequenz, von der sie abkopiert wird. Anstelle der Base Thymin enthält RNA die sehr ähnliche Base Uracil.

Eine wirkungsvolle Methode zur spezifischen Inhibition der Biosynthese bzw. Expression bestimmter Gene stellt die Antisense-Technologie dar. Während zahlreiche Arzneimittel ihre Wirkung über eine Funktionshemmung von Proteinen entfalten, verfolgt die Antisense-Technologie das Ziel der Synthesehemmung dieser Proteine (Branch 1996). Unter einem Antisense-Oligonukleotid versteht man eine kurzkettige synthetische Nukleinsäure mit einer definierten Sequenz, welche durch Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen an eine entsprechende Sense-Sequenz, die RNA des Zielproteins, bindet und so deren Translatierbarkeit blockiert. Die Bauanleitung für ein bestimmtes Protein wird auf diesem Wege unbrauchbar gemacht und die Zelle ist nicht mehr in der Lage, das betreffende Protein zu synthetisieren (Abbildung 6). Eine ausreichende Stabilität gegenüber dem hydrolytischen Abbau durch Nukleasen kann mittels spezieller Modifikationen erreicht werden (Shaw et al. 1991). In diesem Zusammenhang ist die Phosphorothioat-Modifikation, bei der ein Sauerstoffatom im Phosphat durch ein Schwefelatom ersetzt ist, als eine der wichtigsten Modifikationen zu nennen (Eckstein 1983).

Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotide sind gut wasserlöslich und werden von den Zellen in geringer Menge spontan aufgenommen. Eine Verbesserung der Aufnahme kann darüber hinaus durch Verwendung bestimmter Träger-Substanzen (z. Bsp. Lipide) erreicht werden (Bennett et al. 1992, Hartmann et al.1998). Die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden ist in vitro sowie auch in vivo gut belegt (Askari und McDowell 1996, Neurath et al. 1996, Nyce und Metzger 1997).

Es ist zu erwarten, dass die Antisense-Techniken in naher Zukunft Eingang in die Entwicklung neuer Pharmaka finden werden. So haben sich in den USA schon mehrere Biotechnologie-Unternehmen auf die Entwicklung von Antisense-Molekülen als Pharmaka spezialisiert.

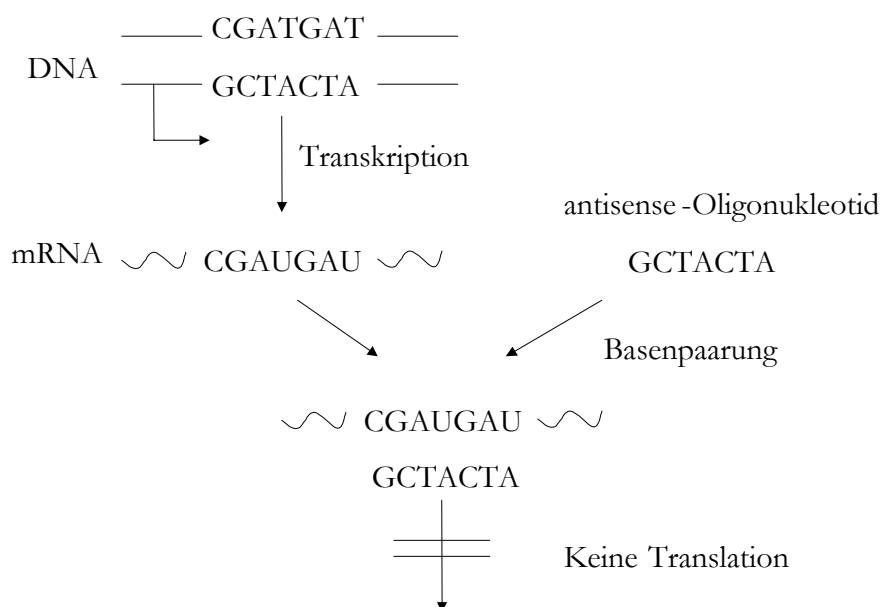


Abbildung 6: Nutzung der Antisense-Therapie zur Hemmung spezifischer mRNAs: Ein Oligonukleotid mit einer Basensequenz, die komplementär zu einem Abschnitt einer Ziel-mRNA ist, wird in eine Zelle eingeschleust. Durch Basenpaarung mit der Ziel-mRNA verhindert es deren Translation. Der nach rechts abgeknickte Pfeil zeigt die Richtung der Transkription des unteren DNA-Stranges des DNA-Doppelstranges an.

1.5 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor-alpha ist ein hitzelabiles Protein (Semenzato 1990) und gehört wie die Interleukine und Interferone zu der Gruppe der Zytokine. Biochemisch handelt es sich um ein nicht-glykosiliertes Polypeptid aus 157 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 17 kD (Beutler et al. 1985). In seiner aktiven Form liegt TNF-alpha in trimerer Struktur vor (Smith und Baglioni 1987). Der Faktor besteht aus drei identischen Untereinheiten (Monomeren), wobei jedes Monomer zwei antiparallel zueinander gerichtete Aminosäurestränge aufweist. Zwischen der Aminosäure 69 und 101, jeweils Cystein, befindet sich eine Disulfidbrücke (Aggarwal et al. 1985, Jones et al. 1989). Das TNF-alpha-Gen ist mit dem MHC-1-Gen gekoppelt und liegt beim Menschen auf Chromosom 6, bei der Maus auf Chromosom 17 (Cerami und Beutler 1988).

Die Transkription des Gens und der Anstieg von TNF-alpha-mRNA wird durch einen extrazellulären Stimulus induziert (Beutler et al. 1986). Das translatierte TNF-Protein (Propeptid) wird in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo von dem 233 AS langen Propeptid (Kriegler et al. 1988) ein Signalpeptid mit 76 AS abgespalten wird. Nach Abgabe des Vorläufermoleküls in das Cytoplasma wird dieses als Speicherform von TNF an die Zellmembran gebunden gespeichert (Wang et al. 1985). Erfolgt ein adäquater Stimulus, wird das Speichermolekül durch serinartige Leukozyten-Proteasen zum 17 kD-TNF-Molekül hydrolysiert (Jue et al. 1990) und kann extrazellulär abgegeben werden (Scuderi 1989). Die Sekretion des Faktors erfolgt seitens der Makrophagen (Tracey et al. 1989, Mannel et al. 1980, Matthews 1981) nach Stimulation durch Endotoxin, Komplementfaktoren (Beutler und Cerami 1987), Viren (Beutler et al. 1986, Aderka et al. 1986), Parasiten, Interferon (z. Bsp. IFN-gamma) (Pace et al. 1983, Johnson und Adams 1984, Beutler et al. 1986) sowie Interleukinen (z. Bsp. IL-2) und bestimmten wachstumsfördernden Faktoren (z. Bsp. GM-CSF). Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen und zahlreiche maligne entartete Zellen sind ebenfalls in der Lage, TNF-alpha zu produzieren (Semenzato 1990).

TNF-Rezeptoren werden in nahezu allen körperlichen Gewebezellen exprimiert (Scheurich et al. 1986, Volpes et al. 1992, Palladino et al. 1987). Die Dichte der Rezeptoren kann hierbei in Abhängigkeit von der Zelle um mehrere Zehnerpotenzen variieren (Kull et al. 1985).

Unabhängig davon wird in der Regel bereits ab einer Rezeptordichte von 5 % maximale biologische Aktivität erreicht (Baglioni et al. 1985, Freudenberg et al. 1989). Bei dem Rezeptor handelt es sich vermutlich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 300.000 Dalton. Die für die TNF-alpha-Bindung verantwortliche Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von 75.000 Dalton (Yoshie et al. 1986, Smith et al. 1986, Smith und Baglioni 1987, Creasey et al. 1987).

Es gibt Hinweise dafür, dass in unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Wege der Signalübertragung existieren und der Rezeptor über definierte Regulationsmechanismen TNF-alpha-spezifische Zellveränderungen induziert (Scheurich et al. 1987).

TNF-beta, für den auch das Synonym Lymphotoxin-alpha verwendet wird, gehört ebenfalls zur Proteinklasse der Zytokine und bindet an denselben Rezeptor wie TNF-alpha. Untersuchungen haben ergeben, dass es sich hierbei um ein Glykoprotein mit 30% Homologie in der Aminosäuresequenz zu TNF-alpha handelt. TNF-beta zeigt nahezu das gleiche Wirkungsspektrum und ist ebenfalls wie TNF-alpha auf dem Chromosom Nummer 6 lokalisiert (Beutler und Cerami 1987).

Der Tumornekrosefaktor erzeugt viele Symptome des septischen Schocks (Stephens et al. 1988) und lässt sich während einer Sepsis (Waage et al. 1986) und nach LPS-Gabe (Fong und Lowry 1990) in erhöhten Konzentrationen nachweisen. Sepsis-Auswirkungen können durch TNF-Ak oder TNF-Synthesehemmung abgeschwächt werden (Engelberts et al. 1992, Tracey et al. 1987). Im weiteren fungiert der Tumornekrosefaktor als chemotaktisch-aktives Molekül für Neutrophile und Makrophagen. Tabelle 5 fasst einige relevante Effekte des Tumornekrosefaktors auf zellulärer Ebene zusammen.

Die Aktivierung des Immunsystems spielt bei der Erforschung der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle und es gibt Hinweise dafür, dass dem Tumornekrosefaktor als proinflammatorisches Zytokin hierbei eine zentrale Rolle zukommt (Levine et al. 1990, McMurray et al. 1991, Dutka et al. 1993).

Tabelle 5: Zusammenstellung einiger relevanter TNF-Effekte unter zellulären Aspekten. Modifiziert nach Pohlmann et al. 1986, Kawakami et al. 1986, Libby et al. 1986, Nawroth und Stern 1986, Pober et al. 1986, Feinmann et al. 1987, Hoffmann und Weinberg 1987, Camussi et al. 1987, Wendel et al. 1991, Oliver 1992.

Makrophagen	<p>Erhöhung der Zytotoxizität</p> <p>Stimulation zur Sekretion von Peptiden und Lipidmediatoren, welche die Fähigkeit besitzen, Schocksymptome auszulösen</p> <p>Stimulation zur Sekretion von Sauerstoff-Radikalen</p> <p>Produktion von TNF, IL-1, PAF</p> <p>Stimulation der MHC-Expression</p>
Neutrophile Granulozyten	<p>Erhöhung der Zytotoxizität durch die Produktion von Wasserstoffperoxyd und die Bildung von Sauerstoffradikalen</p> <p>Steigerung der Phagozytose</p> <p>Steigerung der Membranadhärenz</p> <p>Erhöhung der Dichte an Komplementfaktor-Rezeptoren</p>
Endothelzellen	<p>Produktion von PDGF, PAF, CSF und anderen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren</p> <p>Aktivierung der prokoagulatorischen Aktivität</p> <p>Induktion der Leukozyten-Adhäsions- Proteine</p>
Fettzellen	<p>Steigerung der Triglyzeridproduktion in der Leber</p> <p>Inhibition der fettzellspezifischen Proteinsynthese</p>

1.6 Kollagen I und Kollagen-System

Kollagen, das fibrilläre Protein, aus dem Kollagenfasern bestehen, ist das im Körper am meisten verbreitete Protein und repräsentiert etwa 25 % aller Proteine. Das Kollagenmolekül setzt sich aus zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette zusammen, die untereinander durch Wasserstoffbrücken verbunden sind und sich zu einer Tripel-Helix aneinander lagern, welche um eine gemeinsame Längsachse gewunden ist. Die genetisch determinierte Aminosäuresequenz der Peptidkette (Primärstruktur) bestimmt die Ausbildung der tripel-helikalen Formation und die Anordnung der Helices zu den Fibrillen (Martin et al. 1976). Jede α -Kette besteht in ihrer Primärstruktur aus ca. 1000 Aminosäuren, die mittels Peptidbindungen verbunden sind (Bailey und Robins 1976). Mit Ausnahme kurzer, nicht helikaler Bereiche an beiden Kettenenden wiederholt sich in den Kollagenketten sehr häufig die Sequenz -Gly-X-Y-, wobei Glycin als kleinste Aminosäure im Zentrum der Helix lokalisiert ist. In der Position X und Y findet man häufig die Aminosäure Prolin, die Position Y wird oft von 4-Hydroxyprolin eingenommen, aber auch 3-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin kommen vor. Die hydroxylierten Aminosäuren sind für Kollagene charakteristisch (Koolman und Röhms 1994a).

Die Kollagensynthese erfolgt u.a. in Fibroblasten. Zunächst werden sehr lange Polypeptidketten mit mehreren Tausend Aminosäuren gebildet. Dieses Prokollagen wird in die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (ER) geschleust und unterliegt dort einer umfangreichen posttranslationalen Modifizierung. Zahlreiche Prolin- und Lysin-Reste werden hydroxyliert, wobei die Einführung der Hydroxy-Gruppen durch Hydroxylierung mit molekularem Sauerstoff erfolgt. Kosubstrat ist hierbei 2-Oxoglutarat. Die Prokollagen-Hydroxylasen, welche in ihrem aktiven Zentrum Eisen enthalten und durch Fe^{2+} Ionen und Ascorbinsäure aktiviert werden, hydroxylieren Prolin-Reste in Position 3 und 4 bzw. Lysin-Reste in Position 5. Der Vorgang der Hydroxylierung der Prolin- und Lysin-Reste ist für die Festigkeit der Tripelhelix von Bedeutung, da unvollständig hydroxylierte Ketten bei Körpertemperatur keine festen Tripelhelices ausbilden und infolgedessen nicht aus der Zelle ausgeschleust werden. Nach erfolgter Hydroxylierung wird das Prokollagen an mehreren Hydroxylysin-Resten glycosyliert.

Durch Oxidation von Cystein-Gruppen der Propeptide werden intra- und intermolekulare Disulfid-Brücken geschaffen, wodurch die korrekte Zusammenlagerung der Peptidstränge zu einer Tripelhelix sichergestellt wird. Im weiteren Verlauf wird das Prokollagen in den Extrazellulärraum transportiert, wo schließlich längere Peptide vom N-Terminus und C-Terminus proteolytisch abgespalten werden. Das Endprodukt der Modifizierung von Prokollagen stellt das Kollagenmonomer dar. Kollagene Fasern entstehen dadurch, dass sich viele Kollagen-Monomeren nebeneinander lagern (Karlson et al. 1994).

Aminosäureanalysen von Kollagen zeigten, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Kollagentypen im menschlichen Organismus vorhanden sind. In den vergangenen zehn Jahren konnten viele Arten von Kollagenen nachgewiesen werden und bis heute sind mindestens 14 verschiedene Typen bekannt (Mollnau et al. 1995). Unter physiologischen Bedingungen findet ein kontinuierlicher Auf- und Abbau von Kollagenen statt. Die exakte Kontrolle dieser Auf- und Abbauprozesse ist bei zahlreichen physiologischen Prozessen wie z.B. der Wundheilung und Gewebserneuerung eine wichtige Voraussetzung für den Erhalt einer intakten Organfunktion.

Kollagen Typ I und III sowie Typ IV, V und VI stellen die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des Herzens dar. Die hinsichtlich des Auf- und Abbaus dysproportionale Regulation der Synthese von Kollagen Typ I konnte in jüngster Zeit für die Akkumulation von Kollagenfibrillen im Interstitium des Herzmuskelgewebes und somit als Wegbereiter der Myokardfibrose bei chronischer Druckbelastung oder auch entzündlicher Herzerkrankung verantwortlich gemacht werden (Wilke et al. 1995, Nicoletti et al. 1996). Nach Sun und Weber spiegelt der Umbau der extrazellulären Matrix im erkrankten Herzen einen Wundheilungsprozess wider. Fibroblasten, die nach Myozytenschädigung in das betreffende Areal einwandern, spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Elektronenmikroskopisch zeigen sich diese Zellen (Myofibroblasten) erheblich größer als die physiologischerweise vorhandenen Fibroblasten. Ferner imponiert ein deutlich vergrößertes endoplasmatisches Retikulum sowie ein vergrößerter Zellkern. Im Weiteren konnte eine stark erhöhte Expression von Kollagen-Typ-I-mRNA in den eingewanderten Fibroblasten nachgewiesen werden (Sun und Weber 1996).

1.7 AT1A-Rezeptor und Renin-Angiotensin-System (RAS)

Die Regulation der Blutdruck-, Salz- und Flüssigkeitshomöostase wird wesentlich durch das Renin-Angiotensin-System (RAS) beeinflusst. Angiotensin II vermittelt als Effektorpeptid die biologischen Wirkungen einer Aktivierung dieses Systems durch Stimulation von Angiotensin-Rezeptoren (Dzau et al. 1988, Griendling et al. 1993). Bisher wurde das Renin-Angiotensin-System als klassisches Hormonsystem angesehen. Verschiedene experimentelle Arbeiten konnten in den vergangenen Jahren den Nachweis erbringen, dass neben dem zirkulierenden Enzym-Hormon-System mit Nieren und Leber als Enzym- und Substratquellen auch lokale RAS in unterschiedlichen Organen wie z.B. Herz, Gefäßwand und Gehirn existieren (Unger et al. 1996, Haulica 1999, Allen 2000).

Renin, eine in den juxtaglomerulären Zellen synthetisierte Aspartat-Proteinase, spaltet sein Substrat Angiotensinogen, ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein, unter Freisetzung des hämodynamisch noch inaktiven Prohormons Angiotensin I (Okuyama et al. 1988). Das Angiotensin-Konversionsenzym, eine Dipeptidylcarboxypeptidase, welche in den Membranen der Blutgefäße besonders der Lunge zu finden ist, entfernt die beiden C-terminalen Aminosäuren vom Angiotensin I, um das aktive Hormon Angiotensin II zu synthetisieren (Haber 1985). Bradykinin, ein potenter Vasodilatator, wird durch das Angiotensin-Konversionsenzym zu inaktiven Peptidfragmenten metabolisiert. Angiotensin II wird über die Aminopeptidase A in Angiotensin III abgebaut, welches wiederum über die Aminopeptidase B in Angiotensin IV umgewandelt wird. Endopeptidasen und Carboxypeptidasen bauen das Angiotensin IV in weitere, biologisch inaktive Fragmente ab. Die Halbwertszeit von Angiotensin II im Plasma beträgt nur 1 Minute (Koolman und Röhm 1994b).

Angiotensin II stellt eines der potentesten pressorischen endogenen Substanzen dar und wirkt über eine direkte Stimulation membranständiger Rezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen von Blutgefäßen, die über eine intrazelluläre Erhöhung des Kalziumspiegels eine Vasokonstriktion vermitteln. Weitere klassische Wirkungen des Angiotensins II sind u.a. Sympathikusaktivierung sowie Förderung der renalen Natrium- und Wasserretention direkt oder indirekt über Sekretion von Aldosteron aus den Nebennieren.

Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Angiotensin II auch wachstumsmodulierende Effekte besitzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II wesentlich bei der Neointimabildung nach Intimaläsion an Gefäßen sowie bei Umbauprozessen des Herzmuskels nach Myokardinfarkt eine Rolle spielt (Regitz-Zagrosek et al. 1994, Bauer et al. 1996).

Angiotensin II entfaltet seine funktionelle Wirkung als Effektorpeptid des RAS über Angiotensin 1 (AT1)-Rezeptoren in den Blutgefäßen, den Nieren, den Nebennieren, dem Herz und dem zentralen und peripheren autonomen Nervensystem (Navar et al. 1996, Unger et al. 1996). Es handelt sich bei dem AT1-Rezeptor um einen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor, der ein klassisches, intrazelluläres Second messenger-System unterhält (Unger et al. 1996). Der AT1-Rezeptor ist als G-Protein gekoppelter Rezeptor in seiner Expression variabel. Die AT1-Rezeptordichte an der Zelloberfläche unterliegt verschiedenen Einflüssen. Die Expression des AT1-Rezeptors nimmt somit einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit des RAS (Murphy et al. 1991, Timmermans et al. 1993). Beim Menschen wird nur eine Form des AT1-Rezeptorsubtyps exprimiert, bei Ratten und Mäusen kommt der AT1-Rezeptor in den 2 Isoformen, AT1A und AT1B, vor (Kakar et al. 1992).

Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems spielt bei der Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle (Swedberg et al. 1990, Schrier und Abraham 1999). Zahlreiche experimentelle Studien konnten in jüngster Zeit zusätzlich eine Interaktion des RAS mit Entzündungsmediatoren nachweisen. In den Zellen des kardiovaskulären Systems wird die Expression proinflammatorischer Gene unter anderem durch Bindung von Angiotensin II an den Angiotensin II Rezeptor 1 (AT1) induziert (Dechend et al. 2001, Ruiz-Ortega et al. 2001). Von besonderem Interesse ist die Erkenntnis, dass die Stimulation des AT1-Rezeptors zu einer Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B, AP-1 und STATs führt (Brasier et al. 2000). Aus der Erkenntnis heraus, dass die pathophysiologischen Effekte des AT1-Rezeptors über die Aktivierung des bei Entzündungsreaktionen hauptsächlich beteiligten Transkriptionsfaktors NF- κ B geprägt sind (Kranzhoefer et al. 1999, Rouet-Benzineb et al. 2000), stellt die Blockade der über den AT1-Rezeptor vermittelten Effekte auf der Ebene des Transkriptionsfaktors NF- κ B einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar.

1.8 Problemstellung

Entzündliche Erkrankungen des Perikards haben in den letzten Jahren zunehmend an klinischer Bedeutung gewonnen. Dies ist zu einem durch eine Zunahme der auslösenden Ursachen (u.a. virale und bakterielle Infektionen), zum anderen aber auch durch eine Verbesserung der kardiologischen Diagnostik wie z. B. der Perikardioskopie (Maisch und Drude 1991 und 1992, Maisch et al. 1994) bedingt. In Anbetracht der zahlreichen Ursachen der Perikarditis und der bisher unbefriedigenden Therapieerfolge ist die Perikarditis ein wichtiges diagnostisches und therapeutisches Problem. Die Auskultation, die klinische Untersuchung, die Farbdopplerechokardiographie und die Herzkatheteruntersuchung sind heute in der Abklärung der Ursachen entzündlicher Herzmuskel- und Herzbeutelkrankungen nicht mehr ausreichend. Vielmehr sind es virologische, biochemische, molekularbiologische und immunologische Methoden, die wichtige Einblicke in den Krankheitsprozess erlauben und dem Patienten Perspektiven zu einer entzündungshemmenden oder antiviralen Behandlung eröffnen. Die diagnostischen Bemühungen auf molekularbiologischer Ebene leisteten in den letzten Jahren einen ganz wesentlichen Beitrag hinsichtlich der Charakterisierung von Zielstrukturen entzündlicher Prozesse. Die schnelle Entwicklung neuer molekularbiologischer Verfahren wie beispielsweise der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie der In-situ-Hybridisierung hat unser Verständnis von zugrundeliegenden pathophysiologischen Vorgängen unter anderem auch auf dem Gebiet der entzündlichen Herzerkrankungen entscheidend verbessert.

Eine zur Zeit in Europa durchgeführte randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Multicenterstudie (European Study on the Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Disease, ESETCID) beschäftigt sich mit dieser Problematik (Maisch et al. 1995, Hufnagel et al. 2000). Im Rahmen dieser Studie werden drei unterschiedliche Therapiekonzepte zur Behandlung entzündlicher Herzerkrankungen auf ihre Wirksamkeit hin geprüft. Die Untersuchung endomyokardialer Biopsien auf das Vorhandensein enteroviraler RNA sowie von Adenoviren, Cytomegalieviren, Herpes simplex-Viren und Borrelioseerregern stammender DNA mittels PCR bildet in diesem Zusammenhang die Grundlage der therapeutischen Ansätze.

Als Endpunkte werden u.a. eine Verbesserung der linksventrikulären Auswurfraction um mehr als 5%, gemessen im Herzbinnenraumszintigramm, und eine Verbesserung der

körperlichen Leistungsfähigkeit, gemessen im Belastungs-EKG, festgelegt. Das American Myocarditis Treatment Trial stellte bei histologisch gesicherter Myokarditis die erste doppelblind randomisierte Studie dar, bei der eine immunsupprimierte Therapie eingesetzt wurde (Hahn et al. 1995, Mason et al. 1995). Es konnten hierbei jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verbesserung der Ejektionsfraktion zwischen einer mit Cyclosporin- und Prednisolon-behandelten Patientengruppe und einer Placebogruppe festgestellt werden. Hämodynamik sowie auch die Prognose der Patienten blieben durch die Therapie unverändert. Die Ergebnisse der ESETCID-Studie müssen abgewartet werden.

Aufgrund der Feststellung, dass die erhofften Therapieerfolge häufig nicht ausreichend sind, ergibt sich die Notwendigkeit innovativer Therapieansätze. Hierfür sind experimentelle Untersuchungen am Tiermodell erforderlich. Ein solches Modell sollte u.a. eine innerhalb von wenigen Tagen ablaufende, massive Entzündung aufweisen, wobei der Mechanismus der Entzündungsinduktion genau definiert und die Entzündungsvorgänge quantifizierbar sein sollten. Im weiteren sollte die Möglichkeit gegeben sein, den entzündlichen Prozess durch lokale Verabreichung verschiedener Substanzen therapeutisch zu beeinflussen. Die durch steriles Talkum (Magnesiumsilikat) induzierbare Perikarditis bei der Ratte wurde von uns als mögliches Modell genauer charakterisiert. Das Modell ist vielversprechend, da das Perikard operativ gut zugänglich, einfach zu präparieren und leicht zu entnehmen ist. Weiterhin ist durch die Verabreichung verschiedener Substanzen in den Herzbeutel eine pharmakologische Beeinflussung der Entzündungsreaktion möglich. Dieses Modell lässt jedoch nur eine begrenzte Aussage für die unterschiedlichen Ätiologien der Perikarditis zu, hat aber bei der Interpretation aufgrund des definierten Entzündungsreizes entscheidende Vorteile.

Die Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte bei Herzerkrankungen blieben lange Zeit begrenzt. Die Vielzahl experimenteller molekularbiologischer und immunologischer Therapieverfahren, die durch das zunehmende Verständnis der Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen, insbesondere auch im Bereich der molekularen Kardiologie, in jüngster Zeit möglich geworden sind, eröffnen aber neue therapeutische Horizonte.

So konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass Zellen auf äußere Reize mit einer spezifischen Veränderung der Genexpression reagieren. Durch eine Veränderung des Proteinspektrums ist es der Zelle möglich sich an den Reiz zu adaptieren. Solche Reaktionen werden häufig durch Transkriptionsfaktoren vermittelt und kontrolliert (Frankel und Kim 1991, Pabo und Sauer 1992). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die nach Aktivierung aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandern und dort spezifisch an bestimmte Sequenz-Bereiche der DNA binden können. Durch direkte DNA-Bindung kann im Zusammenspiel mit RNA-Polymerasen die Transkription von Genen initiiert, verstärkt oder inhibiert werden.

Der Transkriptionsfaktor „Nukleärer Faktor Kappa B (NF- κ B)“ zeigt seine Hauptfunktion in der transkriptionellen Regulation verschiedener entzündlicher und immunmodulatorisch relevanter Gene (Wulczyn et al. 1996) und hat in letzter Zeit immer wieder zur Entwicklung neuer experimenteller Therapieverfahren angeregt (Kazmi et al. 1995, Neurath et al. 1996). NF- κ B-bindende DNA-Sequenzen sind in den Promotorregionen von zahlreichen proentzündlichen Zytokinen als auch in den Genen fast aller anderen Entzündungsmoleküle nachgewiesen worden. In den meisten Zellen liegt NF- κ B in einer inaktiven, zytoplasmatischen Form vor, welche durch die Assoziation mit einer inhibitorischen Untereinheit (I κ B) bedingt ist. Eine Vielzahl aktivierender Stimuli wie z. Bsp. bakterielle und virale Infektionen induziert die spezifische Phosphorylierung des I κ B-Moleküls und darauf folgend die Dissoziation des Komplexes. NF- κ B wandert anschließend vom Zytoplasma in den Zellkern, wo es die Transkription von an Entzündungsreaktionen beteiligten Genen initiieren oder verstärken kann. Die Aktivierung von NF- κ B erscheint daher von zentraler Bedeutung bei der Genese akut- und chronisch-entzündlicher Herzerkrankungen.

In jüngster Zeit konnte eine Gruppe neuer Regulatoren der Genexpression, Peroxisomproliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPARs), nachgewiesen werden. PPARs sind spezifische, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren (Yu et al. 1995, Brun et al. 1996, Kliewer et al. 1995 und 1997, Forman et al. 1997, Nagy et al. 1998) aus der Familie der Steroidhormon-Rezeptoren (Isseman und Green 1990). PPARs entfalten ihre Wirkung in der Regulation des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels sowie der Glukosehomöostase.

Weiterhin sind PPAR an der Zellproliferation und -differenzierung sowie dem Vorgang der Apoptose beteiligt (Chinetti et al. 1998, Bishop-Bailey 2000). Neuere Arbeiten lassen darüber hinaus vermuten, daß PPARs auch antiinflammatorische Effekte besitzen (Chinetti et al. 2000). Es konnten bislang drei Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren charakterisiert werden: PPARalpha, PPARbeta (NUC-1 oder PPARdelta) und PPARgamma. PPARalpha kommt in diesem Zusammenhang ein besonderes Interesse zu, da nachgewiesen werden konnte, dass PPARalpha-aktivierende Fibratderivate in glatten Gefäßmuskelzellen die Interleukin-1 (IL-1) induzierte IL-6-Freisetzung sowie die Synthese von Cyclooxygenase-2 vermindert (Staels et al. 1998). Diese Befunde werden durch Berichte von einer prolongierten Immunantwort auf Entzündungsreize bei PPARalpha-defizienten Mäusen unterstützt. Es muß daher vermutet werden, daß PPARalpha an der Regulierung der Dauer von Entzündungsreaktionen entscheidend beteiligt ist (Devchand et al. 1996). Die Wirkung von PPARalpha scheint vor allem über die Beeinflussung anderer transkriptioneller Signalwege vermittelt zu werden (Staels et al. 1998).

Therapeutische Interventionen auf der Ebene von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise des NF- κ B oder der PPAR, stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung entzündlicher Krankheitsbilder dar und sollen in der vorliegenden Arbeit unter dem Gesichtspunkt der Expression von Genen, welche bei der Entstehung, Regulation und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse entscheidend beteiligt sind, untersucht werden. Grundlage dieser Untersuchungen bildet das Modell der talkum-induzierten Perikarditis der Ratte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
123 Basenpaar-Marker	GibcoBRL, Eggenstein
DEPC-Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
DNTP-Mix 10 mM	GibcoBRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid 50 mM	GibcoBRL, Eggenstein
M-MLV Reverse Transkriptase 40,000U (200U/ μ l)	GibcoBRL, Eggenstein
PCR-Puffer	GibcoBRL, Eggenstein
Random Primers (3 μ g/ μ l)	GibcoBRL, Eggenstein
RNase Inhibitor 5,000U (40U/ μ l)	GibcoBRL, Eggenstein
Taq DNA Polymerase 100U (5U/ μ l)	GibcoBRL, Eggenstein
Fenofibrat	Sigma, München
Mineralöl	Sigma, München
Talkum	Sigma, München
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Lilly
Halothan	Lilly

Molekularbiologische Kits

Roti-Quick-Kit (zur phenolischen RNA-Extraktion) Roth, Karlsruhe

Puffer und Lösungen

Ladepuffer (DNA)

125 mg Bromphenolblau

125 mg Xylolcyanol

in 50 ml Glycerin/ Aqua dest (50%)

TAE 50fach, pH 8,0

242 g TRIS-Puffer (Roth, Karlsruhe)

57,1 ml Eisessig

auf 900 ml mit Aqua dest auffüllen, anschließend autoklavieren

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 zusetzen

0,5 M EDTA, pH 8,0

93 g EDTA 2 H₂O

400 ml Aqua dest

10 g NaOH zugeben, pH 8,0 einstellen

500 ml Aqua dest zugeben, autoklavieren

2.1.2 Geräte

Beatmungspumpe für Kleintiere

Ugo Basile, Comerio-Varese, Italien

Magnetrührwerk/ Heizgerät

Heidolph MR 2002

PCR-Thermocycler

MWG Biotech Hybaid Omni Gene

Appligene oncor Crocodile

Präzisionswaage

Sartorius MC1 Analytic AC 210P

Sartorius PT 600

Spektralphotometer

Pharmacia Biotech Ultrospec 2000

Stromversorgungsgerät (für Gelelektrophorese)

Bio Rad Modell 300 Xi

Boskamp Pherostat

Verdampfer

Dräger Vapor 19

Vortex

Heidolph Reax 2000

Zentrifugen

Hettich Universal 30RF

2.2 Versuchstiere

Pilotversuche wurden mit einem Hausschwein sowie mit Mäusen durchgeführt, welche in konventioneller Haltung in den Medizinischen Forschungseinheiten der Philipps-Universität-Marburg bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einem der Tageszeit angepassten Tag- und Nachtrhythmus gehalten wurden. Die Versuchstiere wurden täglich gesehen und es bestand ein uneingeschränkter Zugang zu frischem Wasser und Futter. Infektionen wurden bei den Tieren nicht beobachtet.

2.2.1 Charakterisierung der Ratten und der Haltungsbedingungen

Die Versuche wurden mit männlichen herzgesunden Wistar-WU-Ratten durchgeführt, die von der Firma Charles River bezogen wurden. Die Tiere wurden paarweise in speziellen Rattenkäfigen mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Trockenfutter in den Medizinischen Forschungseinheiten der Philipps-Universität-Marburg gehalten. Hier wurde bei einer Raumtemperatur von 22° ein künstlicher, der Tageszeit angepasster Tag- und Nachtrhythmus hergestellt. Die Tiere wurden täglich gesehen und im Abstand von 2 Tagen mit frischem Wasser und Trockenfutter versorgt. Die Umsetzung in einen sauberen Käfig erfolgte in einwöchigen Abständen. Die Ratten kamen mit anderen Tieren nicht in Kontakt und befanden sich in einem separaten Raum. Infektionen wurden bei den Tieren nicht beobachtet.

2.3 Methoden

2.3.1 Operationstechnik der talkum-induzierten Perikarditis

Die Ratten wurden im Alter von sechs Wochen und mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 180 g operiert. Nach Einleiten der Anästhesie wurde die Ratte auf einem speziell angefertigten und auf Körpertemperatur vorgewärmten Operationstisch in Rückenlage gelagert und fixiert. Nach chemischer Desinfektion des Operationsfeldes wurde der Thorax in Höhe des 2. ICR rechts parasternal eröffnet und der Operationssitus mit Hilfe eines modifizierten Lidspreizers dargestellt. Unter behutsamer Verdrängung des Thymus wurde anschließend mittels einer großlumigen Kanüle (Microlance® 3, 20G1,5, 0,9x40) eine Öffnung in das äußere, parietale Blatt des Perikards eingebracht. Hier erfolgte die Injektion der Talkumsuspension (20 mg/kg KG;

10 µl Saline/mg Talkum) mit Hilfe einer Eppendorfpipette der Größe 10-100 µl sowie einer den Anforderungen entsprechend zugeschnittenen und autoklavierten Pipettenspitze. In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte zusätzlich die Applikation von 1 mg Fenofibrat bzw. die Applikation der NF-κB-Antisense-Oligonukleotide (100 nmol). Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss mittels Naht.

Die Versuchstiere wurden postoperativ für 48 Stunden paarweise und mit Ausnahme der Talkum-Fenofibrat-Ratten ohne Therapie gehalten. Diese erhielten, um einer möglichen Resorption des intraperikardial applizierten Fenofibrats entlang eines Konzentrationsgradienten zu vermeiden, fenofibrathaltiges Mehlfutter in einer Konzentration von 0,5 % (Hill et al. 1999). Der postoperative Verlauf war komplikationslos.

2.3.2 Entfernung des Perikards

Nach Einleitung der Anästhesie sowie entsprechender Lagerung und Fixierung der Ratte in Rückenlage wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt. Der Herzbeutel wurde sodann mit Hilfe einer atraumatischen Pinzette und einer Schere schonend von seinen Ansatzstellen im Bereich des diaphragmalen Centrum tendineum, des Ösophagus, der Trachea und des Sternum gelöst, in eiskalte Ringerlösung getaucht, mit einem sterilen Mulltupfer (Pagasling®) abgetupft und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es folgte die Durchtrennung der Vena cava superior, Vena cava inferior, des Truncus pulmonalis sowie der Aorta und darauffolgend die Entnahme des Herzens. Der linke Ventrikel wurde am entnommenen Herzen unter Spreizung der Aortenwurzel und Durchtrennung der Aortenwand zwischen den Valvulae semilunares dextra und sinistra eröffnet. Ein Teil der Wand des linken Ventrikels wurde zur anschließenden Weiterverarbeitung entfernt, in eiskalte Ringerlösung getaucht, mit einem sterilen Mulltupfer abgetupft und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebeproben wurden schließlich im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert.

2.3.3 Anästhesie

Zur Narkoseeinleitung wurde initial das Inhalationsanästhetikum Halothan in einer maximal kurzfristigen Konzentration von 4 Vol% verwendet. Das Versuchstier wurde hierfür in einen speziellen, luftdichten Glasbehälter (Exsikkator) gesetzt, dem über ein Schlauchsystem das Narkosegemisch zugeführt wurde (Abbildung 7). Nach Bewusstseinsverlust wurde die Ratte mittels eines 16G Angiokatheters intubiert und an eine Beatmungspumpe für Kleintiere (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italien) angeschlossen. Hier wurde zunächst mit Isofluran in einer anfänglichen Konzentration von 4 Vol% beatmet. Mit Sistieren der Spontanatmung war das für die Operation benötigte Narkosestadium erreicht und die Beatmung erfolgte im weiteren Verlauf mit Isofluran in einer Konzentration von 2-2,5 Vol%. Die Versuchstiere wurden bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 180 g mit einer Atemfrequenz von 40/min und einem Atemzugsvolumen von 2 ml beatmet. Die Narkoseeinleitung wie auch die Narkoseführung zeichneten sich durch eine gute Steuerbarkeit aus und zeigten keine Komplikationen. Der Trachealtubus wurde nach Wiederauftreten des Schluckreflexes entfernt. In der Aufwachphase wurden die Tiere überwacht, auf eine weiche und isolierende Unterlage gelegt und mittels einer Heizlampe warm gehalten.

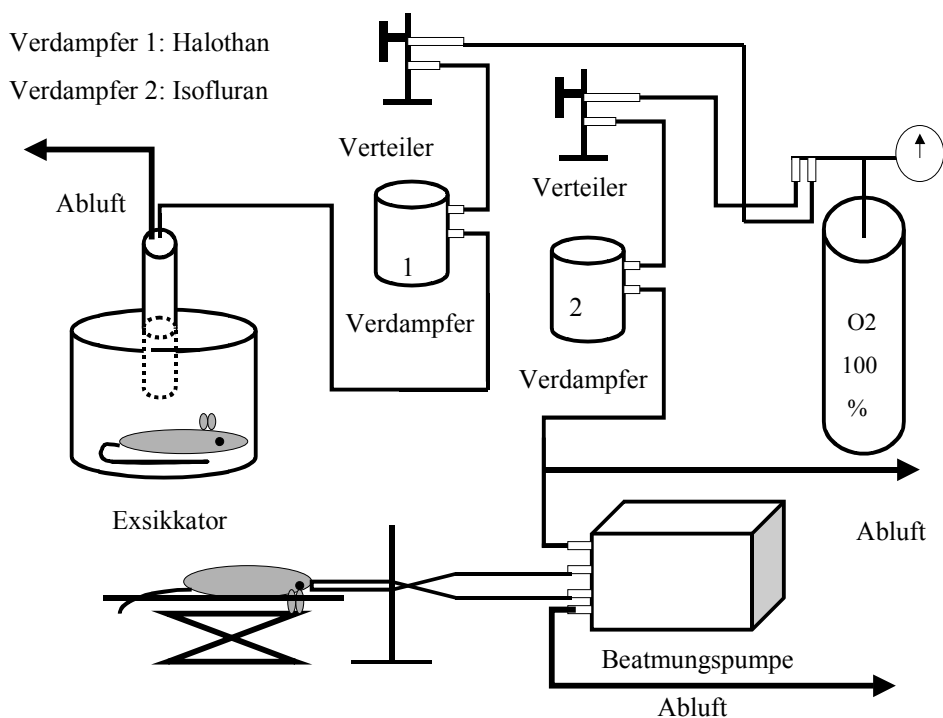


Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau.

2.3.4 Applikation der Antisense-Oligodesoxynukleotide

Eine wirkungsvolle Methode zur spezifischen Hemmung der Expression bestimmter Gene stellt die Antisense-Technologie dar. Hierbei werden synthetische Nukleotidketten in Zielzellen eingebracht. Diese Moleküle sind in der Lage, unter Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen an komplementäre Abschnitte der mRNA des bestimmten Genes zu binden und deren Translatierbarkeit zu blockieren. Die Bauanleitung für ein bestimmtes Protein wird auf diesem Wege unbrauchbar gemacht und die Zelle ist nicht mehr in der Lage, das betreffende Protein neu zu synthetisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Ratte als Nf-kappaB p65-antisense-Oligodesoxynukleotid folgende Sequenz verwendet:

5'-GGGAAACAGATCGTCCATGGT-3' (Autieri et al. 1995)

Der HPLC-gereinigte Oligodesoxynukleotidstrang (Dr. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) wurde vor Applikation 10 min auf 95°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. 100 nmol Antisense-Oligodesoxynukleotide wurden zusammen mit der Talkumsuspension in den Herzbeutel eingebracht.

2.3.5 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde jeweils 40 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes Perikard- bzw. linksventrikuläres Myokardgewebe mittels eines entsprechend vorgekühlten Metallstössels und -mörser zerkleinert, in einen mit 500 µl Guanidiniso-thiocyanat benetzten, sterilen (bei 200°C für 4 Stunden erhitzten) Glaspotter überführt und homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 650 µl Phenol/Chloroform für 1 Minute mit einem Vortex gemischt. Der Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zur Phasentrennung 15 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die organische Phase und die Interphase wurden verworfen, die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Dieser Ansatz wurde für 40 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend ein weiteres Mal zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 150 µl Guanidinisothiocyanat und 150 µl Isopropanol gelöst und ein zweites Mal ausgefällt. Nach dem Waschen und vorsichtigen Trocknen des Präzipitats wurde die RNA in 100 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mittels eines Spektralphotometers bestimmt. Hierbei wurden 5 µl der RNA-Probe in 495 µl H₂O aufgenommen und die Absorption im UV-Bereich bei 260 nm gemessen. Die RNA-Präparationen wurden auf eine Endkonzentration von 500 µg/ml eingestellt und im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert.

2.3.6 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde mit 4 µl (2 µg) der zuvor isolierten Gesamt-RNA durchgeführt, zu der in einem ersten Reaktionsansatz 1 µl Random Hexamer und 50 µl Mineralöl hinzupipettiert wurde. Dieser Ansatz wurde mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert, mit einem Vortex gemischt und für 10 Minuten bei 70°C und darauffolgend für 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch Zugabe einer definierten Menge eines Standard-Ansatzes von Magnesiumchlorid, 10x PCR-Puffer, dNTPs (10 mM), RNase Inhibitor (10 U/µl) und Reverser Transkriptase (200 U/µl) durchgeführt.

Die Proben wurden zentrifugiert, mit einem Vortex gemischt und für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C die Denaturierung der Enzyme. Die cDNA wurde aliquotiert und im Tiefkühlschrank bei -80°C aufbewahrt.

2.3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Der Nachweis von mRNA Transkripten ist für viele Fragestellungen von besonderem Interesse. Es stehen hierfür im wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung – der Northern Blot und die RT-PCR, das heißt die Amplifikation einer cDNA-Zielsequenz nach reverser Transkription von mRNA durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase. Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) abschnitte, welche von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann (Mullis et al. 1986, Mullis und Faloona 1987, Mullis 1990). Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion entspricht dem der DNA-Replikation in der Zelle. Als Ausgangssubstanz ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül erforderlich, das unter Hitzeeinwirkung denaturiert wird. Zur Amplifikation benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer. Hierbei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die synthetisch hergestellten Primer koppeln unter den richtigen Reaktionsbedingungen an die einzelsträngige, denaturierte DNA-Matrize (Hybridisierung). Die Oligonukleotidprimer dienen dabei als Starter der DNA-Polymerase, die in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) einen zur Matrize komplementären Strang synthetisiert. Es werden also zur PCR-Reaktion eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, zwei Primer (sense- und antisense- bzw. for- und backward-Primer) sowie ein Puffersystem, welches die PCR-Reaktion ermöglicht, benötigt. Wiederholt man Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation, so verdoppelt sich jeweils die Ausgangsmenge an DNA und es erfolgt eine exponentielle Zunahme.

Zur Amplifizierung bestimmter Gene aus der cDNA wurden 5 µl des obigen Ansatzes für die PCR eingesetzt.

Die PCR wurde in einem Standardansatz von 32,19 µl DEPC-Wasser, 2,0 µl Magnesiumchlorid (50mM), 4,5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,25 µl Taq-Polymerase durchgeführt. Über die Reaktionskomponenten wurden 50 µl Mineralöl geschichtet, um eine Verdunstung der Probe zu verhindern. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert und in den auf 82°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Nach Denaturierung der Matrizen-DNA wurden 5,0 µl Primer (jeweils 2,5 µl forward- und backward-Primer) hinzugegeben. Zur exponentiellen Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenzen wurden 35 Zyklen mit jeweils 45 Sekunden bei 94 °C, 45 Sekunden bei 55°C und 2 Minuten bei 72°C durchgeführt. Die Temperatur wurde abschließend für 10 Minuten auf 72°C eingestellt. Die PCR-Produkte wurden im Eisschrank bei -20°C aufbewahrt.

2.3.8 Primer

Der Erfolg der Polymerasekettenreaktion ist entscheidend von der Primerwahl abhängig, da Primerlänge und Basenzusammensetzung die Hybridisierungstemperatur beeinflussen. Die synthetisierten Oligonukleotide sollten zwischen 22 und 30 Basen lang sein und sollten sich in A/T- und G/C-Gehalt nicht unterscheiden, damit die optimale Hybridisierungstemperatur der beiden Primer ähnlich ist. Hier wurden zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion die nachstehend angegebenen Primersequenzen verwendet:

Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Tazawa et al. 1999):

5'-GATGCTGGTGCTGAGTATGT -3' und

5'-TCATTGAGAGCAATGCCAGC-3'

TNF-alpha (TNF- α) (Primer wurden mit Hilfe des Programmes MacVector, Genetics Computer Group, Pharmacoepia, Princeton, NJ, erstellt):

5'-TGAGCACAGAAAGCATGATCCG -3' und

5'-GGAAGTCTCCTTGTGGGAC -3'

Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor (AT1A) (Matsubara et al. 1994):

5'-GCACACTGGCAATGTAATGC-3' und

5'-GTTGAACAGAACAAGTGACC-3'

Kollagen $\alpha 1$ (I) (Tazawa et al. 1999):

5'-TGCCGTGACCTCAAGATGTG-3' und

5'-CACAAGCGTGCTGTAGGTGA-3'

NF- κ B1 (p50) (Primer wurden mit Hilfe des Programmes MacVector, Genetics Computer Group, Pharmacopeia, Princeton, NJ, erstellt):

5'-CACTGTGAGGACGGGGTATGC-3' und

5'-AGCTGGCTTTGTAATGTTGAC-3'

NF- κ B p65 (Primer wurden mit Hilfe des Programmes MacVector, Genetics Computer Group, Pharmacopeia, Princeton, NJ, erstellt):

5'-CGATCTGTTTCCCCTCATCTTTC-3' und

5'-TTCTCTCGCCAGGAATACTGCC-3'

2.3.9 Interner Standard

Die Menge an PCR-Produkt kann von PCR-Reaktion zu PCR-Reaktion variieren, obwohl zur Amplifikation standardisierte experimentelle Bedingungen gewählt wurden. Zur Umgehung dieser Problematik wurde mit der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, einem Enzym der Glykolyse, ein interner Standard benutzt. GAPDH ist ein sog. "housekeeping gene", das in allen Geweben exprimiert wird. Die erfolgreiche Amplifikation dieser mRNA dient als Kontrolle und beweist die Präparation intakter RNA und zeigt darüber hinaus, dass alle Komponenten der RT-PCR funktionieren.

2.3.10 Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgte mittels Gelelektrophorese (2% Agarosegel). Hierfür wurde jeweils 30 µl des zuvor mit 5 µl Ladepuffer versehenen PCR-Produktes eingesetzt. Zum Gießen des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose (3 g Agarose/150 ml TAE-Puffer bei kleinem Gelschlitten (10x20 cm), 4 g Agarose/200 ml TAE-Puffer bei großem Gelschlitten (15x25 cm)) in TAE-Puffer auf einem beheizbaren Magnetrührwerk oder in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Nach Abkühlen auf ca. 55°C wurde die Lösung in die Elektrophoreseapparatur gegossen und ein Kamm zur Formung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach dem Abkühlen des Gels wurde der Kamm entnommen und die Kammer mit TAE-Puffer so gefüllt, dass das Gel gerade mit Puffer bedeckt war. Nach Beladen des Gels mit den PCR-Produkten wurden an den seitlichen Geltaschen jeweils 20 µl eines 123 Basenpaarmarkers aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit 15 µl Ethidiumbromid in 200 µl H₂O für 20 Minuten angefärbt und darauffolgend mit 200 µl H₂O für 30 Minuten bei leichtem Schütteln gewaschen.

Die Darstellung der DNA-Fragmente durch Anfärbung mit Ethidiumbromid ist eine häufig eingesetzte Methode. Wie viele andere Farbstoffe für Nukleinsäuren bindet dieses Molekül, indem es sich zwischen benachbarte Basen eines DNA- oder RNA-Stranges schiebt und so einen relativ stabilen Komplex bildet. Dieser Vorgang wird auch als „Interkalation“ bezeichnet.

Durch die eingestrahelte Energie in Form von UV-Licht werden Elektronen des Moleküls derart angeregt, dass sie auf ein höheres Energieniveau gehoben werden (Anregungswellenlänge 302 nm). Beim Zurückfallen in den Grundzustand wird ein Teil der Energie in Form von sichtbarem Licht wieder abgegeben (Emissionswellenlänge 590 nm). Man kann die DNA und RNA schließlich als helle Bande vor einem dunklen, größtenteils nicht-fluoreszierenden Hintergrund leuchten sehen. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wurde in der vorliegenden Arbeit unter UV-Licht betrachtet und mit einer Digitalkamera aufgenommen. In Abhängigkeit von dem Mengenverhältnis des zu bestimmenden PCR-Produktes zeigte sich eine unterschiedliche Helligkeit der DNA-Bande und somit eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität. Je mehr PCR-Produkt vorhanden war, desto heller leuchtete die DNA-Bande und desto größer zeigte sich die Fluoreszenzintensität. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels spezieller Software (Image Quant, Molecular Dynamics). Die Fluoreszenzintensität wurde hierbei zum Vergleich der Banden in relativen Einheiten angegeben.

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Mittelwertbildung

Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Der Mittelwert ist mit \bar{a} definiert und kennzeichnet das arithmetische Mittel aller Daten innerhalb einer Versuchsgruppe. Die Formel ist mit $\bar{a} = \sum a/n$ beschrieben, wobei n die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe darstellt.

Die Normalität der Verteilung wurde durch den „Kolmogorov-Smirnov Test“ und die Gleichheit der Varianzen nach Levene (Statistica, Statsoft, Tulsa, OK) geprüft. Statistische multiple Vergleiche wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse gefolgt von dem „Duncan multiple new range test“ durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei $P < 0.05$ angenommen.

2.4.2 Korrelationen

Signifikante lineare Korrelationen zwischen den morphologischen, funktionellen und biochemischen Parametern können als Indiz für die Richtigkeit des Betrages und der unterstellten Bedeutung der einzelnen Parameter gewertet werden (Statistica). Der Korrelationskoeffizient r gibt eine Aussage darüber, wie eng der lineare statistische Zusammenhang zwischen zwei Grössen ist. Die Gleichung der Regressionsgerade ist mit $y = ax + b$ definiert.

2.4.3 Ermittlung der Fallzahl

In nicht aufgeführten Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine Fallzahl von $n=6 - 8$ ausreichend ist, um statistisch signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen nachweisen zu können.

3. Ergebnisse

3.1 Statistische Auswertungen

3.1.1 Mortalität

Innerhalb der ersten 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation sind aus der Talkum-Gruppe (n=8) keine Ratten verstorben. Aus der Talkum-Nf- κ B p65-Antisense- (n=8) und Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) sind ebenfalls keine Ratten innerhalb der ersten 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Nf- κ B p65-Antisense-, bzw. Talkum-Fenofibrat-Applikation verstorben.

3.1.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht von allen Ratten betrug 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum- bzw. Talkum-Fenofibrat-Applikation im Mittel 198.5 ± 13.6 g.

Das Körpergewicht der Ratten aus der Talkum-Gruppe (n=8) betrug 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation im Mittel 191.1 ± 13.2 g und zeigte somit keine signifikanten Unterschiede zu dem ermittelten Körpergewicht der Ratten aus der Talkum-Fenofibrat- (205.8 ± 12.8 g; n=8) und der Kontrollgruppe (198.8 ± 12.2 g; n=8) (Abbildung 8).

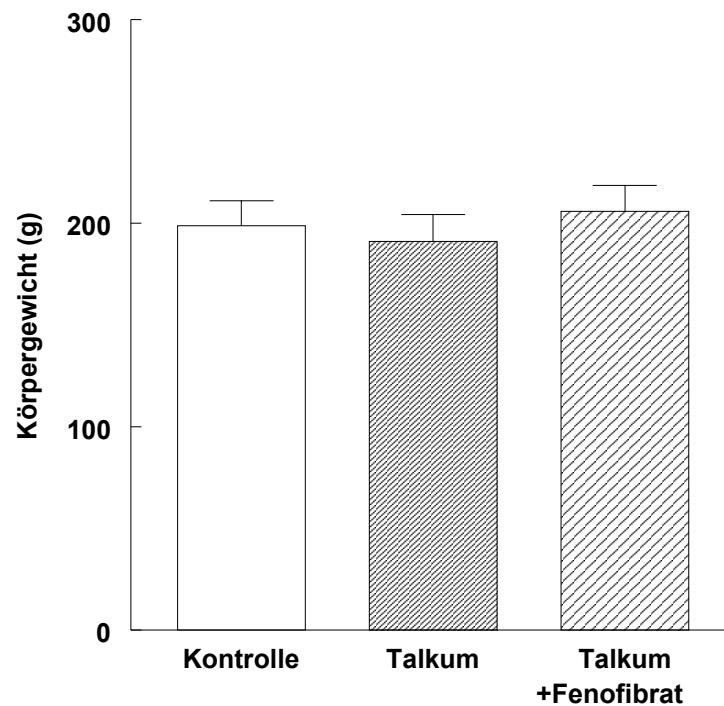


Abbildung 8: Körpergewicht (g).

3.1.3 Perikardgewicht

Das Perikardgewicht des entzündeten Perikards der Ratten aus der Talkum-Gruppe (n=8) war mit 64.1 ± 10.2 mg 48 Stunden nach Talkum-Applikation im Mittel um 19.3 mg und somit signifikant ($p = 0.0006$) schwerer als das Perikardgewicht der Ratten aus der Kontrollgruppe mit nicht-entzündetem Perikard (44.8 ± 6.6 mg; n=8). Dies entsprach einer Zunahme des Perikardgewichts um 43 %. Die mit Fenofibrat behandelten Ratten (n=8) zeigten 48 Stunden nach Talkum-Fenofibrat-Applikation ein mittleres Perikardgewicht von 61.6 ± 10.2 mg. Das mittlere Perikardgewicht war in dieser Gruppe somit um 2.5 mg, jedoch nicht signifikant leichter als das mittlere Perikardgewicht der Ratten aus der Talkum-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Perikardgewichts ließ sich in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen ($p = 0.002$) (Abbildung 9).

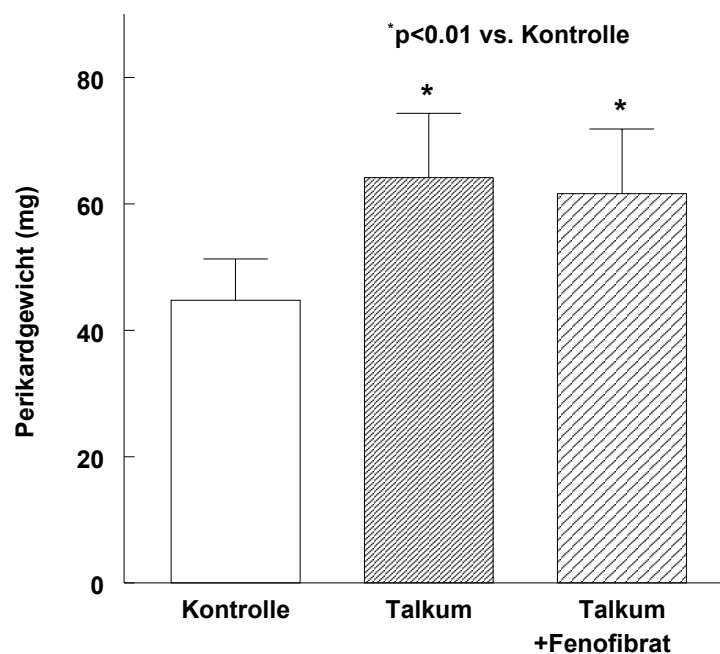


Abbildung 9: Perikardgewicht (mg).

3.1.4 Perikardgewicht bezogen auf das Körpergewicht

Bezieht man innerhalb einer Gruppe das jeweilige Perikardgewicht auf das betreffende Körpergewicht, so erhält man in der Talkum-Gruppe (n=8) einen Mittelwert von 0.34 ± 0.06 . Dieser Wert ist signifikant höher als der Wert, der sich in der Kontrollgruppe (0.23 ± 0.03 ; n=8) ermitteln lässt ($p = 0.0002$).

Die Werte in der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) ergeben einen Mittelwert von 0.30 ± 0.06 und lassen somit ebenfalls einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe erkennen ($p = 0.004$). Das auf das Körpergewicht bezogene Perikardgewicht zeigt im Gruppenvergleich zwischen der Talkum- und Talkum-Fenofibrat-Gruppe keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10).

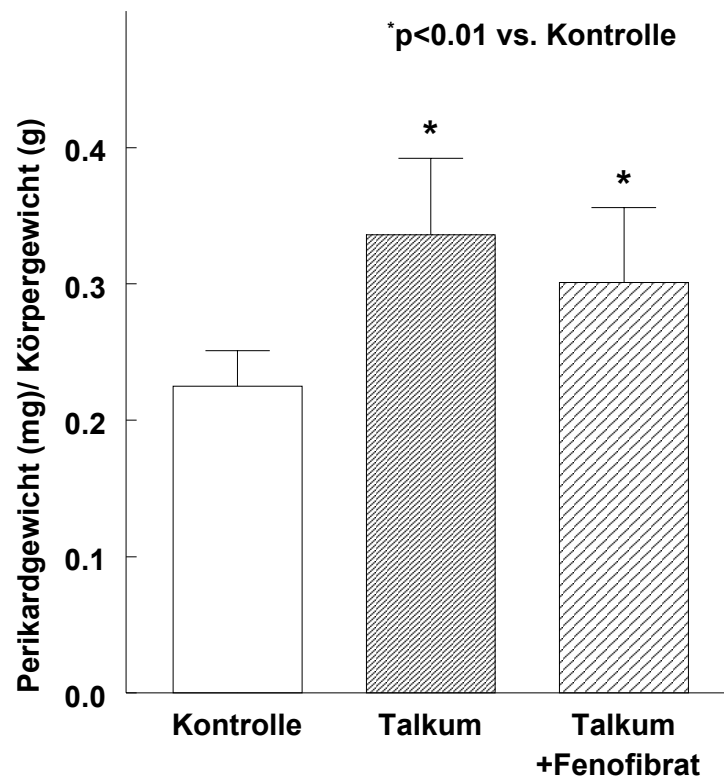


Abbildung 10: Perikardgewicht (mg) bezogen auf das Körpergewicht (g).

3.1.5 Perikardiale GAPDH-mRNA-Expression

Hinsichtlich der perikardialen GAPDH-mRNA-Expression konnte in der Talkum-Gruppe (n=8) ein mittlerer Wert von 33709 ± 4824 ermittelt werden. In der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) ließ sich ein Mittelwert von 30203 ± 4739 und in der Kontrollgruppe (n=8) ein Mittelwert von 31841 ± 5275 bestimmen.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren somit nur gering und es konnten bezüglich der perikardialen GAPDH-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 11).

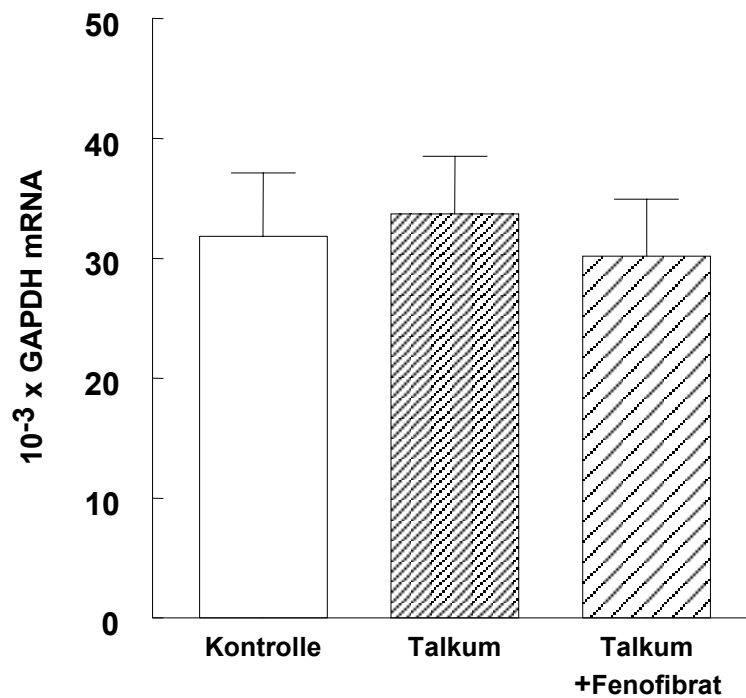


Abbildung 11: Perikardiale GAPDH-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.1.6 Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH

Der auf GAPDH bezogene TNF-alpha-Wert zeigte sich in der Talkum-Gruppe (n=8) mit 3.4 ± 0.6 signifikant höher als in der Talkum-Fenofibrat- (2.4 ± 0.6 ; $p = 0.002$; n=8) und in der Kontrollgruppe (1.9 ± 0.2 ; $p = 0.0001$; n=8). Dies entsprach 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe einer Zunahme der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression um 79 %. In der Talkum-Fenofibrat-Gruppe ließ sich eine Reduktion der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression um 67 % nachweisen. Die Unterschiede zwischen der Talkum-Fenofibrat- und der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 12).

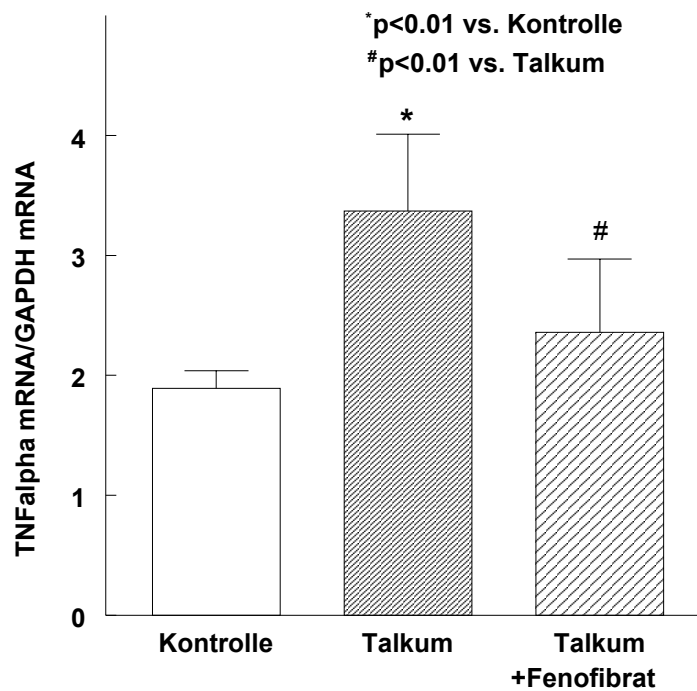


Abbildung 12: Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.

3.1.7 Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression

Hinsichtlich der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression zeigten die Ratten 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum- bzw. Talkum-Fenofibrat-Applikation in der Talkum-Gruppe (n=8) mit einem Mittelwert von 111054 ± 6351 signifikant höhere Werte als die Ratten aus der Talkum-Fenofibrat- (70067 ± 17248 ; $p = 0.0001$; n=8) und der Kontrollgruppe (59197 ± 8317 ; $p = 0.0001$; n=8). Dies entsprach 48 Stunden nach Talkum-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe einer Zunahme der perikardialen TNF-alpha-mRNA- Expression um 88 %. In der Talkum-Fenofibrat-Gruppe ließ sich eine Reduktion der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression um 79 % verzeichnen. Die perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression war zwischen der Talkum-Fenofibrat- und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden (Abbildung 13).

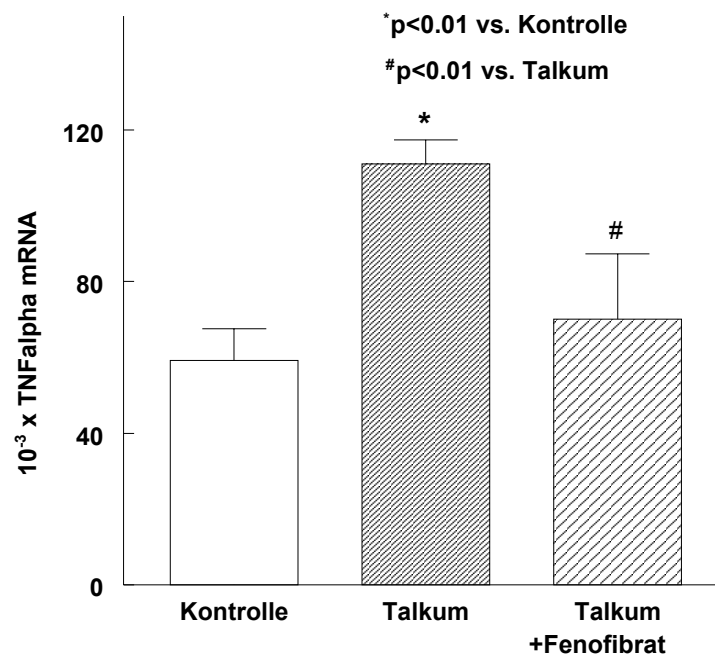


Abbildung 13: Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.1.8 Perikardiale AT1A-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH

Die Werte der perikardialen AT1A-mRNA-Expression zeigten im Gruppenvergleich in Bezug auf den jeweiligen Wert der perikardialen GAPDH-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede. Mit 1.4 ± 0.3 war dieser Wert in der Kontrollgruppe (n=8) am größten, jedoch nicht signifikant höher als in der Talkum-Fenofibrat- (1.3 ± 0.3 ; n=8) und der Talkum-Gruppe (1.1 ± 0.2 ; n=8) (Abbildung 14).

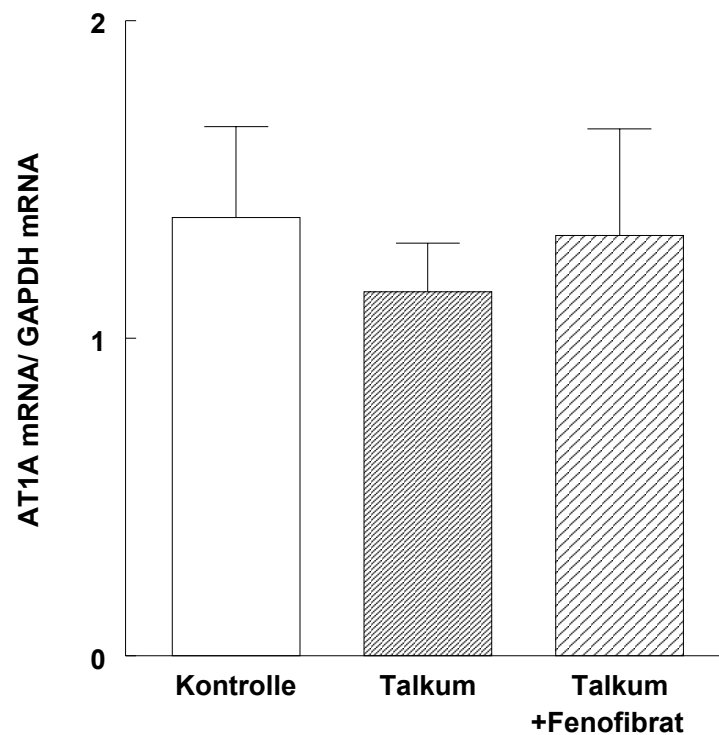


Abbildung 14: Perikardiale AT1A-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.

3.1.9 Perikardiale AT1A-mRNA-Expression

Die perikardiale AT1A-mRNA-Expression zeigte im Gruppenvergleich 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-, bzw. Talkum-Fenofibrat-Applikation keine signifikanten Unterschiede. In der Kontrollgruppe (n=8) war der gemessene Mittelwert mit 44813 ± 10399 am größten und im Vergleich zur Talkum- (38326 ± 5788 ; n=8) und Talkum-Fenofibrat-Gruppe (37433 ± 9162 ; n=8) nur gering erhöht (Abbildung 15).

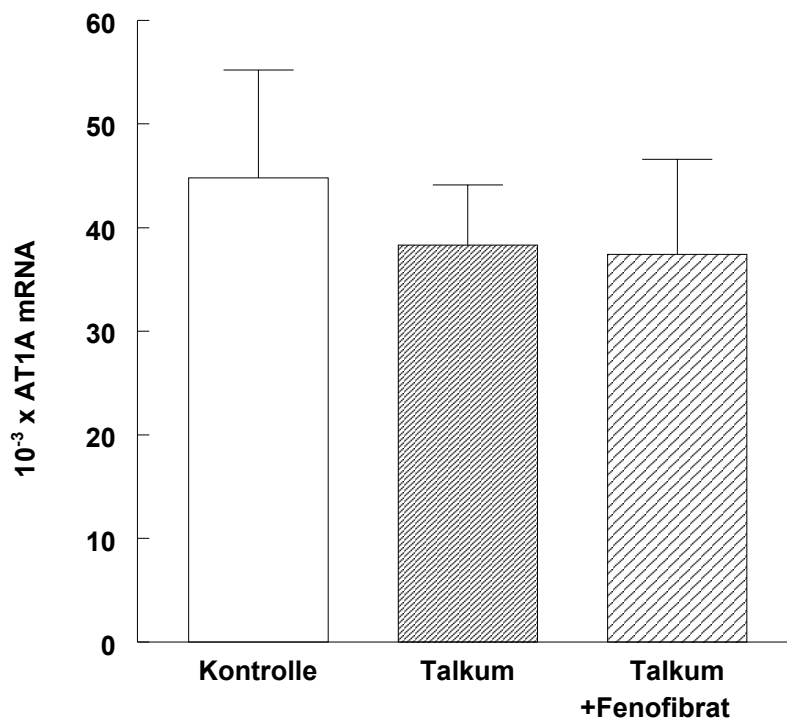


Abbildung 15: Perikardiale AT1A-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.1.10 Perikardiale NF- κ B1 (p50)-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH

In der Talkum-Gruppe (n=8) war der ermittelte Wert der perikardialen NF- κ B p50-mRNA-Expression bezogen auf den Wert der jeweiligen GAPDH-mRNA-Expression mit 0.29 ± 0.12 am geringsten. In der Kontrollgruppe (n=8) war der Mittelwert 0.42 ± 0.04 und in der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) 0.46 ± 0.18 . Es waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden (Abbildung 16).

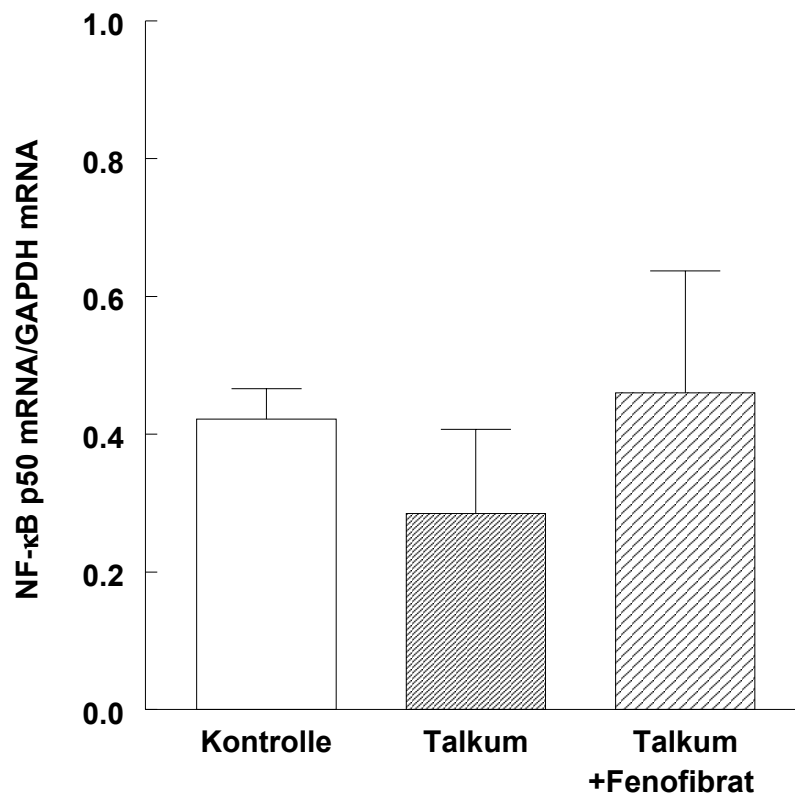


Abbildung 16: Perikardiale NF- κ B p50-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.

3.1.11 Perikardiale NF- κ B1 (p50)-mRNA-Expression

Die perikardiale NF- κ B1-mRNA-Expression war in der Kontrollgruppe (n=8) mit einem Mittelwert von 15633 ± 3494 im Vergleich zur Talkum-Fenofibrat-Gruppe (15177 ± 7144 ; n=8) nur gering erhöht. In der Talkum-Gruppe (n=8) war die NF- κ B1-mRNA-Expression mit einem Mittelwert von 10313 ± 5596 am niedrigsten. Insgesamt waren die ermittelten Werte im Gruppenvergleich nicht signifikant verschieden (Abbildung 17).

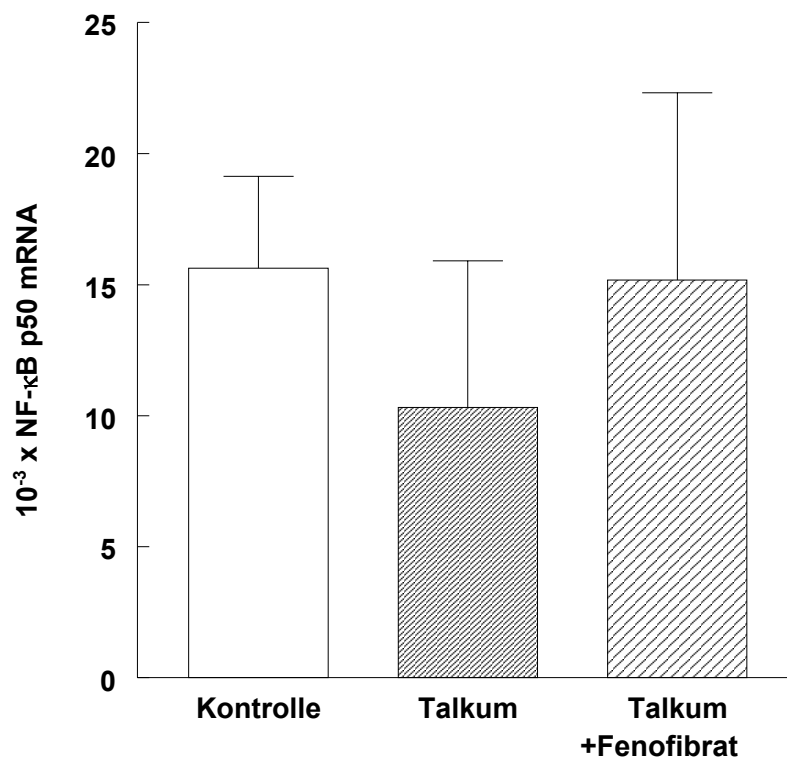


Abbildung 17: Perikardiale NF- κ B p50-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.1.12 Perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH

Die perikardiale mRNA-Expression von Nf- κ B p65 war bezogen auf den jeweiligen Wert der perikardialen GAPDH-mRNA-Expression in der Kontrollgruppe (n=8) mit einem Mittelwert von 1.7 ± 0.3 am geringsten. In der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) war der Mittelwert 2.0 ± 0.3 , in der Talkum-Gruppe (n=8) 1.9 ± 0.3 . Die Unterschiede verhielten sich im Gruppenvergleich nicht signifikant (Abbildung 18).

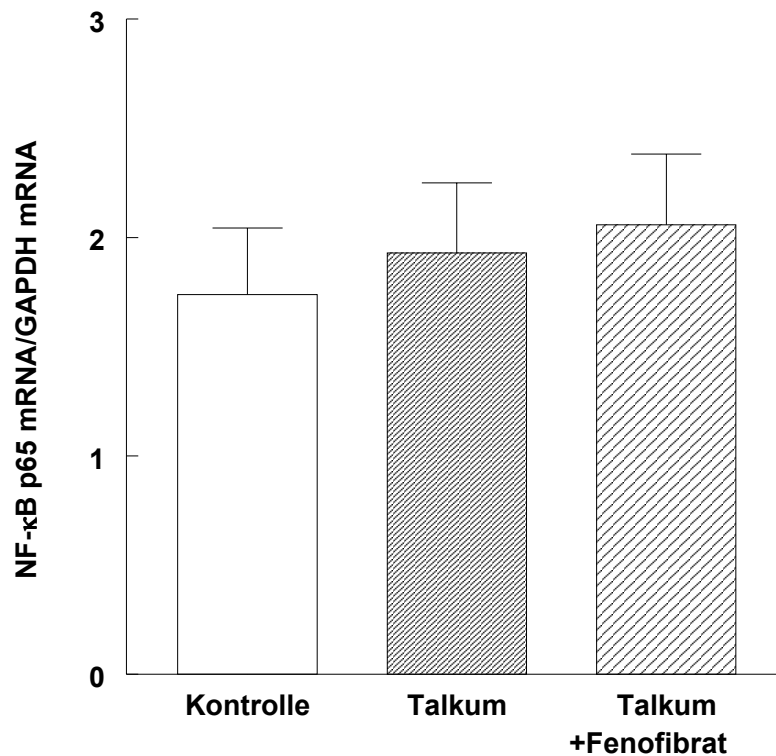


Abbildung 18: Perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.

3.1.13 Perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression

Die perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression war in der Talkum-Gruppe (n=8) nach 24 Stunden intraperikardialer Talkum-Applikation mit einem Mittelwert von 63714 ± 1913 gegenüber der Kontrollgruppe (54950 ± 5748 ; n=8) signifikant erhöht ($p = 0.0003$). Dies entsprach einer Zunahme der perikardialen NF- κ B p65-mRNA-Expression um 14 %. In der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) war der Mittelwert 61039 ± 2972 . Dieser Wert erwies sich im Vergleich mit den Werten aus der Kontrollgruppe als signifikant erhöht ($p = 0.005$). Die ermittelten Werte aus der Talkum- und Talkum-Fenofibrat-Gruppe waren im Gruppenvergleich nicht signifikant (Abbildung 19).

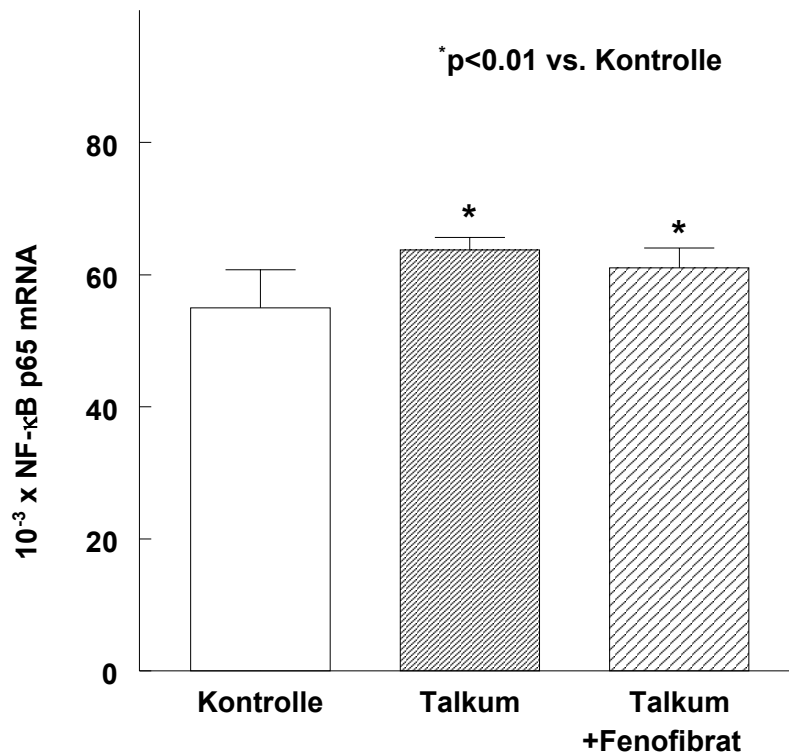


Abbildung 19: Perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.1.14 Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH

Bezieht man die Werte der perikardialen Kollagen I-mRNA-Expression auf den jeweiligen Wert der perikardialen GAPDH-mRNA-Expression, so erhält man in der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) mit 2.3 ± 0.5 den größten Mittelwert. In der Kontrollgruppe (n=8) ergibt sich ein Mittelwert von 2.2 ± 0.4 und in der Talkum-Gruppe (n=8) ein Mittelwert von 2.0 ± 0.4 . Die Mittelwerte unterschieden sich im Gruppenvergleich nicht signifikant (Abbildung 20).

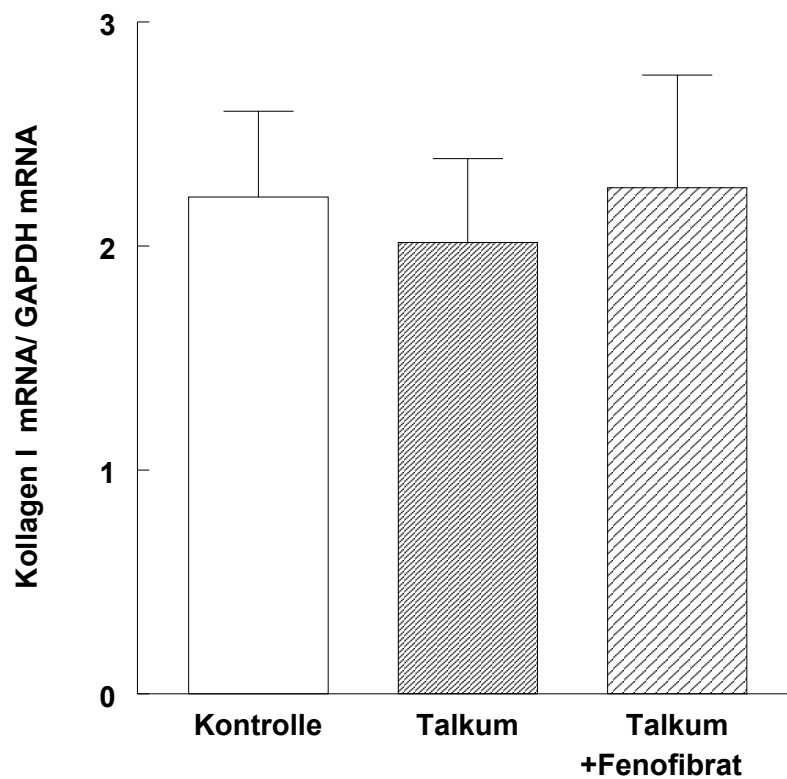


Abbildung 20: Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH.

3.1.15 Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression

In der Kontrollgruppe (n=8) war die mittlere perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression 74934 ± 19683 . In der Talkum-Gruppe (n=8) lag dieser Wert bei 66848 ± 9731 und in der Talkum-Fenofibrat-Gruppe (n=8) bei 66350 ± 13699 .

Hinsichtlich der perikardialen Kollagen I-mRNA-Expression konnten 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum- ,bzw. Talkum-Fenofibrat-Applikation im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 21).

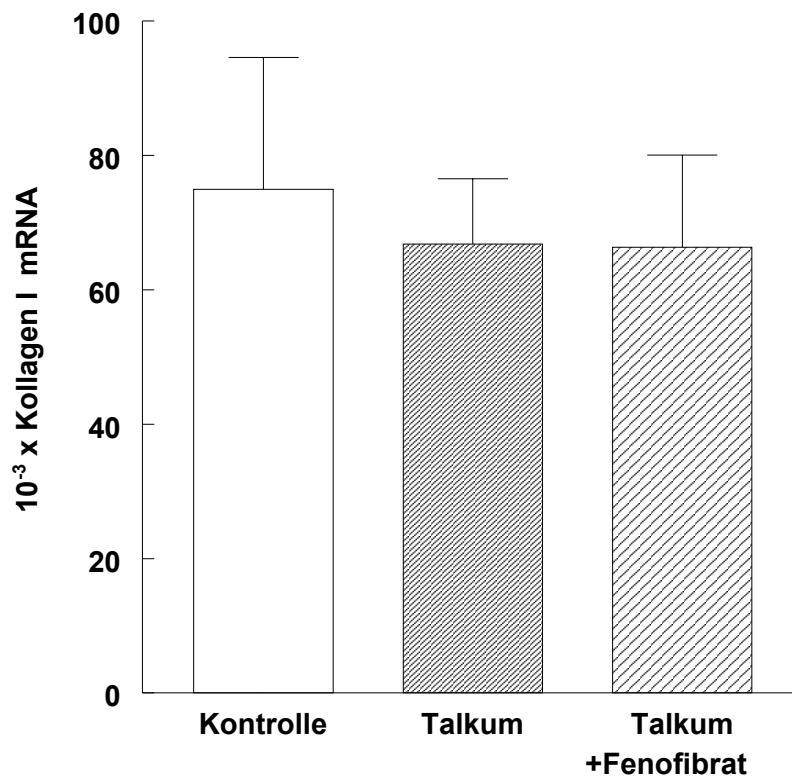


Abbildung 21: Perikardiale Kollagen I-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten).

3.2 Korrelationen

Das Perikardgewicht korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha-($r = 0.595$; $p = 0.03$; $y = 0.9x + 25.9$; Abbildung 22) und NF- κ B p65-mRNA-($r = 0.621$; $p = 0.02$; $y = 0.2x + 48.6$; Abbildung 23) sowie der auf GAPDH bezogenen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.559$; $p = 0.047$; $y = 0.04x + 0.6$; Abbildung 24).

Das auf das Körpergewicht bezogene Perikardgewicht korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.591$; $p = 0.002$; $y = 227.2x + 14.8$; Abbildung 25).

Die perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.821$; $p = 0.001$; $y = 2.9x - 89.2$; Abbildung 26).

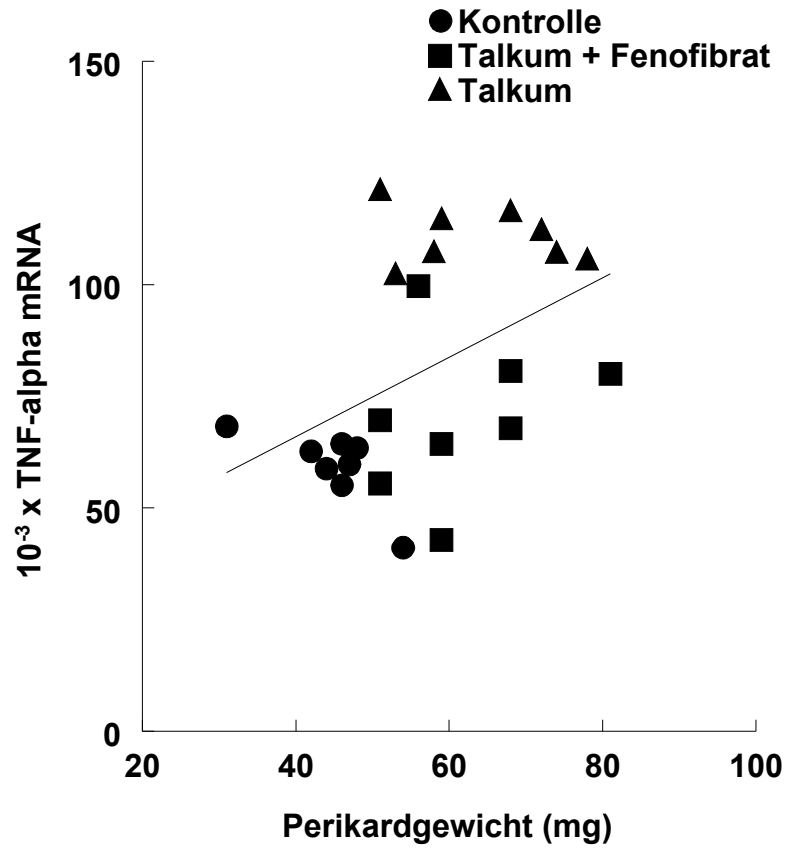


Abbildung 22: Korrelation zwischen dem Perikardgewicht (mg) und der perikardialen TNF- alpha- mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten) ($r = 0.595$; $p = 0.03$; $y = 0.9x + 25.9$).

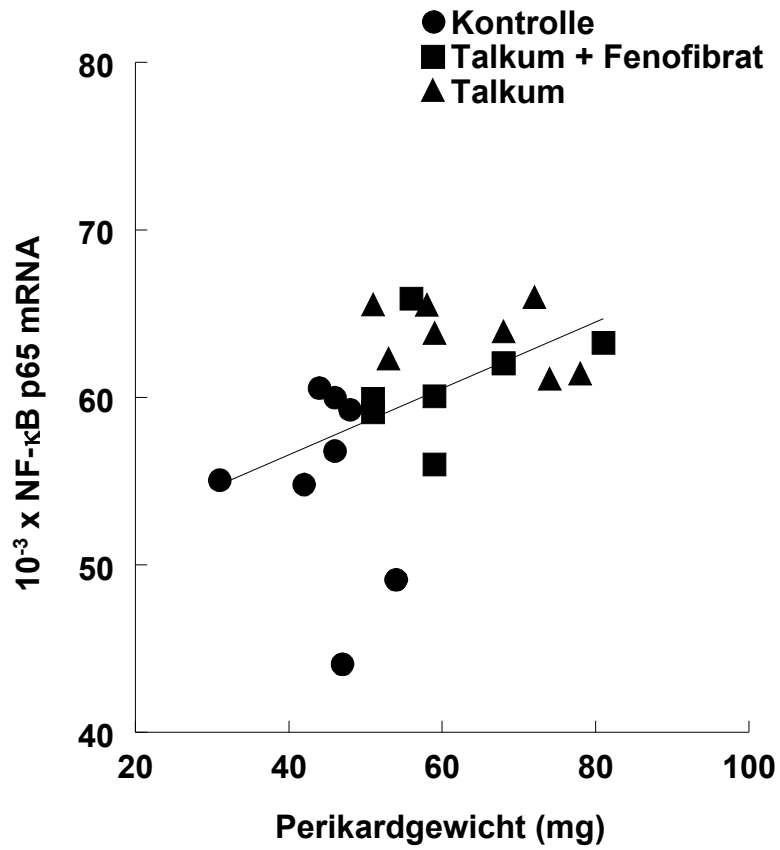


Abbildung 23: Korrelation zwischen dem Perikardgewicht (mg) und der perikardialen NF-κB p65-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten) ($r = 0.621$; $p = 0.02$; $y = 0.2x + 48.6$).

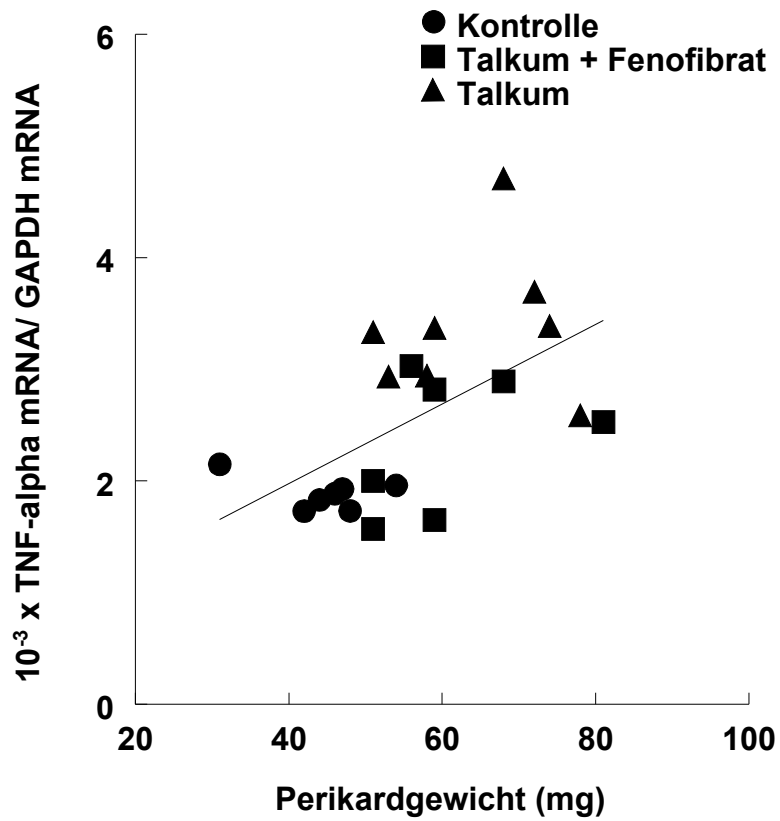


Abbildung 24: Korrelation zwischen dem Perikardgewicht und der auf GAPDH bezogenen perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.559$; $p = 0.047$; $y = 0.04x + 0.6$).

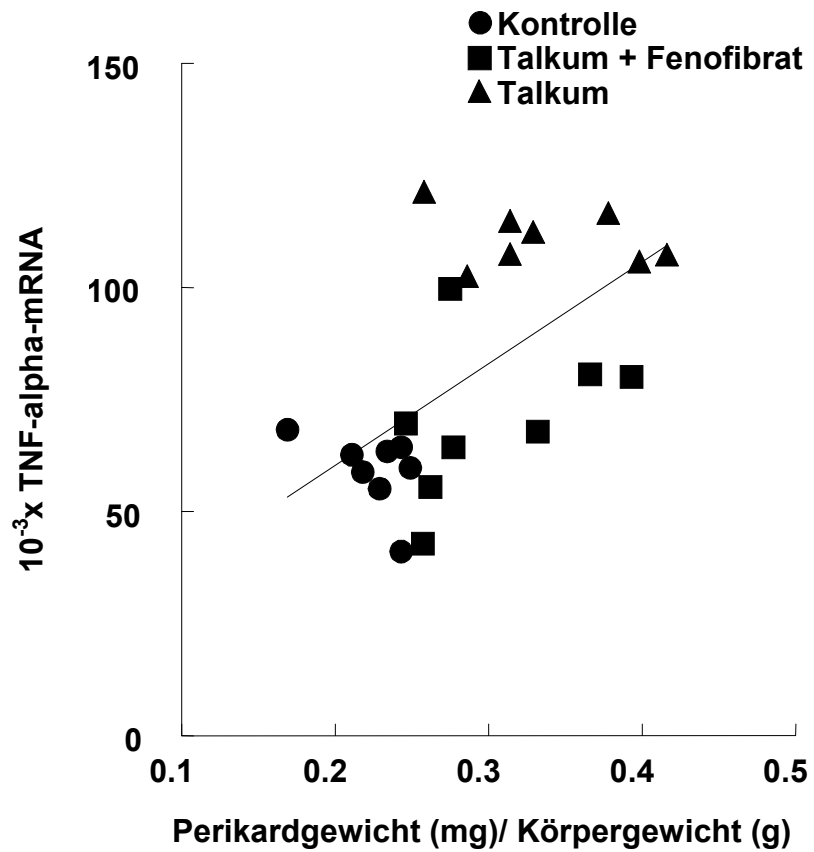


Abbildung 25: Korrelation zwischen dem auf das Körpergewicht (g) bezogenen Perikardgewicht (mg) und der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten) ($r = 0.591$; $p = 0.002$; $y = 227.2x + 14.8$).

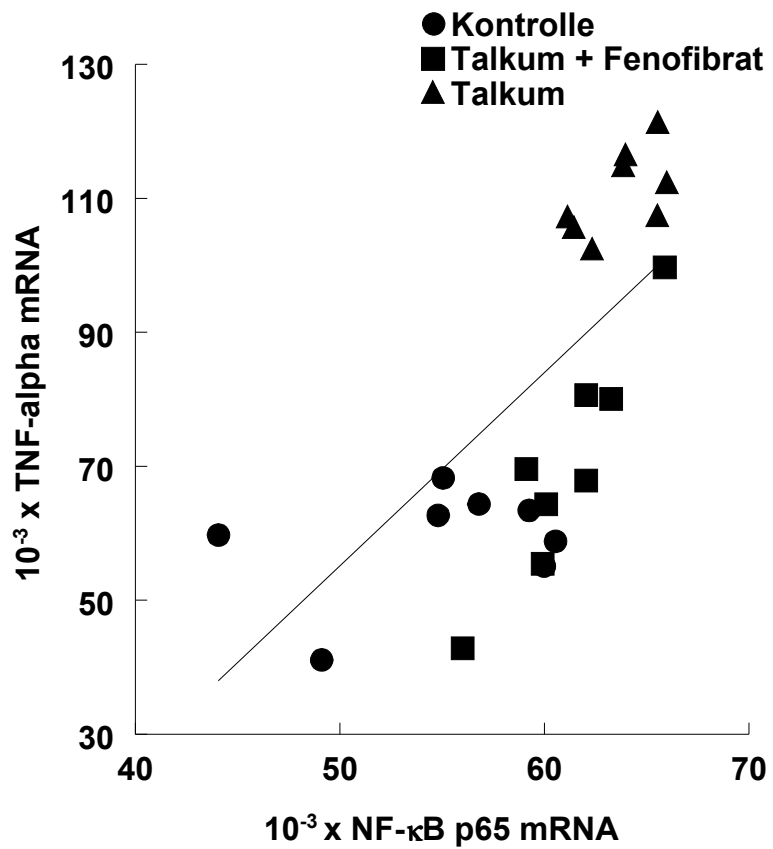


Abbildung 26: Korrelation zwischen der perikardialen NF-κB p65- und der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression (Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten) ($r = 0.821$; $p = 0.001$; $y = 2.9x - 89.2$).

3.3 Einfluss der perikardialen NF- κ B p65-Antisense-Applikation auf die peri- und myokardiale AT1A-mRNA-Expression

In der mit Talkum behandelten Kontrollgruppe (n=8) war im Perikard der Mittelwert der auf GAPDH bezogenen AT1A-mRNA-Expression 0.72 ± 0.25 , im Myokard des linken Ventrikels 0.44 ± 0.22 . In der mit Talkum und NF- κ B-Antisense (n=8) behandelten Gruppe war im Perikard der Mittelwert der auf GAPDH bezogenen AT1A-mRNA-Expression 0.49 ± 0.23 und im Myokard des linken Ventrikels 0.23 ± 0.13 . Nach gemeinsamer Talkum- und NF- κ B p65-Antisense-Applikation ergab sich eine Abnahme der auf GAPDH bezogenen, perikardialen AT1A-mRNA-Expression um 32 % ($p = 0.099$). Im linksventrikulären Myokard konnte dagegen eine Reduktion der auf GAPDH bezogenen AT1A-mRNA-Expression um 48 % ($p = 0.052$) ermittelt werden. Diese Werte ließen eine Tendenz zur Signifikanz erkennen (Abbildung 27).

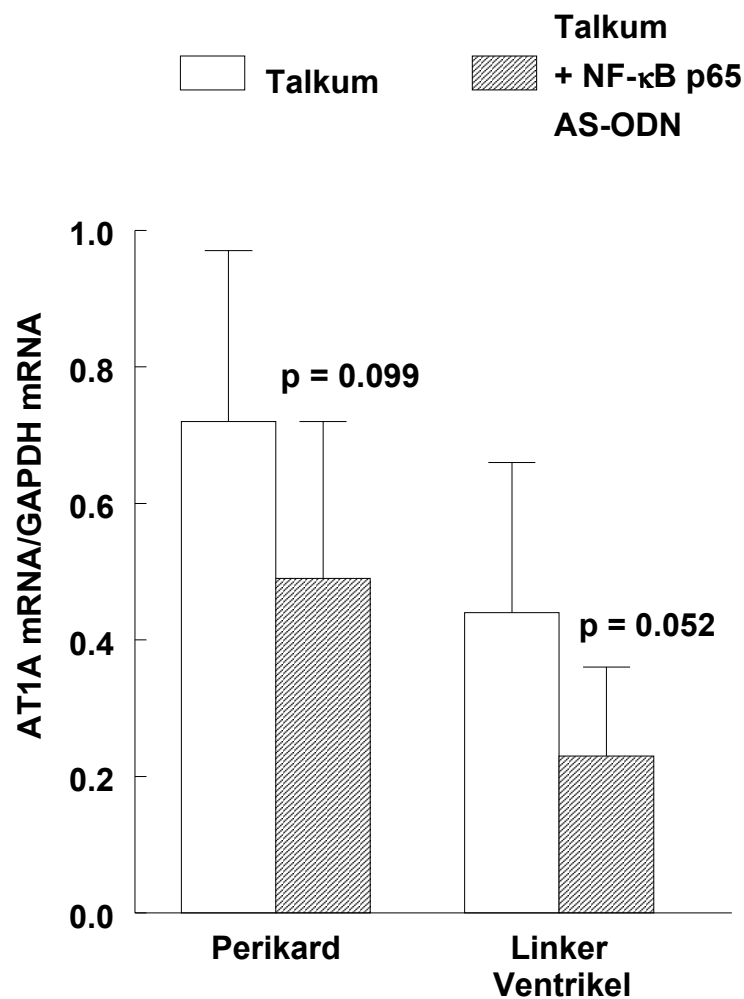


Abbildung 27 : Peri- und myokardiale AT1A-mRNA-Expression bezogen auf GAPDH 48h nach intraperikardialer Talkum- bzw. Talkum-NF- κ B p65-Antisense-Applikation.

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Wahl des Perikarditismodells

Für die Suche nach innovativen Therapieansätzen bei entzündlichen Herzerkrankungen war es zu Beginn der vorliegenden Arbeit notwendig, ein tierexperimentelles Entzündungsmodell zu entwickeln. Der Mechanismus der Entzündungsinduktion sollte in diesem Zusammenhang genau definiert und der Entzündungsvorgang unter Zuhilfenahme molekularbiologischer Methoden messbar sein. Ein ganz wesentliches Kriterium unserer Überlegungen stellte die Möglichkeit dar, den entzündlichen Prozess durch lokale Verabreichung verschiedener Substanzen therapeutisch beeinflussen zu können.

Das Modell der virusinduzierten Myokarditis beinhaltet eine komplexe Interaktion zwischen direkten, virusinduzierten Effekten und entzündlich-reparativen Reaktionen. Das Modell der autoimmuninduzierten Myokarditis erfordert hingegen einen aufwendigen und langdauernden Immunisierungsprozess (Izumi et al. 2000). Die vorliegende Arbeit hat sich in Anbetracht dessen mit der Frage befasst, ob eine definierte Entzündungsreaktion im Bereich der faltenlosen Hüllstruktur des Herzens, dem Perikard, als experimentelles Modell für die Untersuchung pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten zur Unterdrückung inflammatorischer Prozesse herangezogen werden kann. Das Modell der experimentellen Perikarditis beinhaltet die Möglichkeit der lokalen Applikation antiinflammatorischer Substanzen in die Herzbeutelhöhle. Ivanyi et al. beschrieben im Jahre 1981 die Induktion einer experimentellen Perikarditis mittels Einbringen einer sterilen Talkum-Suspension in die Herzbeutelhöhle von Mäusen. Es zeigte sich hierbei, dass der Instillation einer sterilen Talkum-Suspension in die Herzbeutelhöhle eine Einwanderung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen folgt (Ivanyi et al. 1981). Dunbar et al. beschrieben dieses Modell im Jahre 1986 zur Untersuchung therapeutischer Interventionen der durch Talkum ausgelösten atrialen Tachyarrhythmien bei Hunden (Dunbar et al. 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auslösung einer Makrophagen-induzierten Entzündung steriles Talkum in den Herzbeutel von sechs Wochen alten Ratten instilliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Induktion der Perikarditis durch Talkum ein reproduzierbares Perikarditismodell darstellt. Das Ausmaß der Entzündungsreaktion wurde nach einem Zeitraum von 12, 24 und 48 Stunden nach Talkumapplikation unter dem Gesichtspunkt des Perikardgewichts sowie der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression beurteilt. Der Tumornekrosefaktor zählt wie die Interleukine zu der Gruppe der Zytokine. Die Transkription des Gens und der Anstieg der TNF-alpha-mRNA wird durch einen extrazellulären Stimulus induziert (Beutler et al. 1986). Die Aktivierung des Immunsystems spielt bei der Erforschung der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine bedeutende Rolle und es gibt vermehrt Hinweise, dass dem Tumornekrosefaktor als proinflammatorisches Zytokin hierbei eine zentrale Rolle zuzuschreiben ist (Levine et al. 1990, McMurray et al. 1991, Dutka et al. 1993).

Weiterhin wurde die perikardiale mRNA-Expression des bei Entzündungsreaktionen hauptsächlich beteiligten Transkriptionsfaktors NF- κ B (Baeuerle und Baltimore 1996), sowie des hiermit in Interaktion stehenden AT1-Rezeptors (Kranzhoefer et al. 1999) und des Kollagen I als ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Herzens (Sun und Weber 1996) untersucht. Eine signifikante Zunahme des Perikardgewichts konnte, einhergehend mit einer signifikanten Zunahme der TNF-alpha-mRNA-Expression, nach einem Zeitraum von 48 Stunden nach Talkumapplikation nachgewiesen werden, so dass dieses Zeitfenster für nachfolgende Untersuchungen verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Darstellung der Ergebnisse einer Reihe von Vorversuchen verzichtet. Detailliert beschrieben sind die Ergebnisse eines Ansatzes bei dem der Einfluss von Fenofibrat bei einer Talkum-induzierten Perikarditis untersucht wurde.

4.1.2 Wahl der Labortiere

Bei der Auswahl der Labortiere spielen verschiedene Kriterien wie einfaches Behandeln, kleine Körpergröße, Fügsamkeit, Höhe der Unterhaltungskosten und Stand der Kenntnisse über die Eigenschaften der jeweils verwandten Tierart eine große Rolle (Earl und Taylor 1966, Mount und Ingram 1971). Als Tiermodell für die entzündliche Herzerkrankung wurde in der vorliegenden Arbeit die durch steriles Talkum induzierbare Perikarditis bei der Ratte verwendet. Für die Etablierung dieses Modells waren zahlreiche Vorversuche notwendig, da sich die Narkoseeinleitung, -aufrechterhaltung und -ausleitung sowie auch die Technik der Perikarditisinduktion durch das Einbringen einer definierten Menge einer sterilen Talkumsuspension zunächst als schwierig erwies.

4.1.2.1 Pilotversuche

Ein Pilotversuch wurde beim 20 Kilogramm schweren Schwein durchgeführt. Nach Bustad und McClellan nimmt das Schwein in der biomedizinischen Forschung eine bedeutende Rolle ein, weil Mensch und Schwein sich in zahlreichen biologischen Merkmalen ähneln und sich experimentelle Resultate bei beiden Spezies wechselseitig übertragen lassen (Bustad und McClellan 1965). So ähneln sich Mensch und Schwein in der Skelett- und Körpergröße, ferner als Omnivoren in der Physiologie des Gastrointestinaltrakts, in den Nahrungsanforderungen und im Fettstoffwechsel, in der äußeren Haut, in der koronaren Blutversorgung und in der Lage des Herzens (Booth et al. 1966). Durch diese günstigen Eigenschaften ist das Schwein insbesondere in der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen besonders gut geeignet. Die vorliegenden anatomischen Verhältnisse ließen darüber hinaus neben der einfach durchzuführenden Anästhesie auch eine unproblematische Präparation des Herzbeutels erwarten. In diesem Zusammenhang gestaltete sich das Einbringen der sterilen Talkumsuspension mittels einer großlumigen Injektionsspritze nach rechts-lateraler Thorakotomie und Verdrängung des rechten Lungenlappens einfach. Erwartungsgemäß zeigte das Perikard 24 Stunden postoperativ eine eindrucksvolle inflammatorische Reaktion als Folge auf den durch die Talkumpartikel bewirkten Fremdkörperreiz.

Das massiv entzündlich veränderte Perikard war nach Entnahme des Herzens leicht vom Myokard abzupräparieren, wobei für die anschließend erfolgende molekularbiologische Weiterverarbeitung eine gute Ausbeute entzündlich veränderten Perikardgewebes gewonnen werden konnte. Die beim Schwein durch Talkum induzierte Perikarditis ist daher ein gut funktionierendes und durchführbares Tiermodell. In Anbetracht des großen Versuchstieres war aber die für die Verhinderung einer Entzündungsreaktion erforderliche große Substanzmenge jedoch ein limitierender Faktor, so dass aus diesen Gründen diese Versuche nicht weitergeführt wurden.

In dem Bestreben, ein kostengünstigeres jedoch gleichsam effizientes Tiermodell zu entwickeln, entschlossen wir uns im weiteren Verlauf dazu, unsere Experimente mit durchschnittlich 22 bis 25g schweren männlichen Mäusen fortzuführen. Die Maus bot sich aufgrund der im Vergleich zum Schwein erheblich geringeren Körpergröße und der sich daraus ergebenden geringer zu verabreichenden Menge an Substanz/Antisense Oligonukleotiden als geeignetes Versuchstier an. Die gute Verfügbarkeit genetischer Daten erwies sich darüber hinaus für die Planung unserer Experimente als günstig. Für das technisch anspruchsvolle Versuchsvorhaben stellte sich die Narkose aber zunächst als problematisch heraus. Als Narkotikum wurde zu Beginn der Versuchsreihe eine Kombinationsmedikation aus Xylazinhydrochlorid (Rhompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von 13 mg/kg Körpergewicht und Ketaminhydrochlorid (Ketanest®, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht verwendet, welches intraperitoneal appliziert wurde. Dieses Narkoseverfahren zeigte jedoch eine schlechte Steuerbarkeit hinsichtlich der für den chirurgischen Eingriff erforderlichen Narkosetiefe.

Im weiteren Verlauf wurde versucht, der Maus ein Inhalationsanästhetikum über eine spezielle Atemmaske zuzuführen, was sich jedoch ebenso schwierig gestaltete wie die orotracheale Intubation der Labortiere mit Hilfe eines eigens angefertigten Laryngoskops, was aufgrund der geringen Körpergröße nur beschränkt möglich war. Ein gutes Verfahren stellte hingegen die Tracheotomie mit Einbringen einer der Größe des Versuchstieres entsprechenden Endotrachealkanüle dar, die nach Prämedikation mit Xylazinhydrochlorid/ Ketaminhydrochlorid in einer niedrigen Dosierung durchgeführt wurde.

Die intraoperative Beatmung erfolgte mit Isofluran in einer Konzentration von 2 Vol%. Mit Hilfe dieses Verfahrens war es möglich, ein für die Operation notwendiges Narkosestadium herbeizuführen und aufrechtzuerhalten. Das Operationsverfahren gestaltete sich bei der ausgewachsenen Maus mit einem durchschnittlichen Herzgewicht von 100 mg, einer Herzhöhe von ca. 0,8 cm und einem Herzumfang von etwa 2 cm schwierig und wurde, um den vorliegenden anatomischen Verhältnissen Rechnung zu tragen, unter dem Mikroskop durchgeführt. Nach rechtslateraler Thorakotomie und behutsamer Verdrängung des Thymus wurde zunächst der Operationssitus mittels eines modifizierten Lidspreizers dargestellt. Hierbei imponierte das Perikard als sehr dünne, durchsichtige und seröse Membran, welche das Herz und den proximalen Anteil der großen Gefäße einschließt. Das Einbringen der sterilen Talkumsuspension in den Herzbeutel erfolgte nach leichtem Anheben des Perikards mit einer atraumatischen Pinzette unter Zuhilfenahme einer kleinumigen Kanüle (Microlance®), welche wir nach entsprechender Kürzung auf eine Pipettenspitze aufbrachten. Es zeigten sich jedoch wiederholt Pipettierungenauigkeiten, da unterschiedliche Mengen der sterilen Talkumsuspension in dem sehr kleinen Lumen der Kanüle sedimentierte. Die Entfernung des Herzbeutels erwies sich im weiteren Verlauf aufgrund der durch die geringe Größe des Versuchstieres bedingten unübersichtlichen anatomischen Verhältnisse als entsprechend schwierig und eine anatomisch exakte Resektion war somit nicht immer möglich. Als Konsequenz ergaben sich nach einem Zeitraum von 12, 24 sowie 48 Stunden nach Talkumapplikation nicht reproduzierbare Unterschiede hinsichtlich des Entzündungsverlaufes, welcher in seinem Ausmaß unter dem Gesichtspunkt des Perikardgewichts sowie der perikardialen TNF-alpha-Expression, ermittelt durch RT-PCR, beurteilt wurde. Zusammenfassend stellte bei dieser Versuchsreihe der ungünstige Zugang zum Perikard für das technisch anspruchsvolle Versuchsvorhaben einen limitierenden Faktor dar, so dass die Versuche mit Mäusen nicht weitergeführt wurden. Im Anschluss wurden weitere Versuche bei Ratten mit einem durchschnittlichen Zuchtgewicht von 180 bis 200g und einem durchschnittlichen Zuchalter von 6 Wochen durchgeführt. Ausschlaggebend für die Wahl dieses Versuchstieres war neben der komplikationslosen Narkotisierung mittels orotrachealer Intubation die Tatsache, dass der Herzbeutel aufgrund der im Vergleich zur Maus übersichtlicheren anatomischen Verhältnisse besser zugänglich, einfacher zu präparieren und somit leichter zu entnehmen war.

Die Injektionsmenge der sterilen Talkumsuspension erwies sich mit Hilfe einer Eppendorf®-Pipette und einer speziell zugeschnittenen Pipettenspitze als gut steuer- und reproduzierbar. Die in den Herzbeutel eingebrachte Menge (20 mg/kg KG; 10 µl Saline/mg Talkum) erwies sich hinsichtlich einer erwünschten Entzündungsinduktion als ausreichend. Die Entwicklung einer Herzbeutelamponade wurde nicht beobachtet. Die für das Versuchsvorhaben notwendige Möglichkeit einer therapeutischen Intervention stellte sich bei der Ratte aufgrund der günstigen anatomischen Verhältnisse auf der Ebene des Perikards als unproblematisch heraus.

4.1.3 Statistische Methoden

In nicht aufgeführten Vorversuchen hat sich gezeigt, dass zur Vermeidung möglicher Fehler als Folge einer unterschiedlich starken Ethidiumbromidfärbung, -entfärbung oder einer Veränderung der Kameraeinstellung bei Quantifizierung des Agarosegels sämtliche Proben einer Versuchsgruppe unter gleichen Bedingungen in einer einzigen Versuchsreihe zu messen sind. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der cDNA-Probe im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel. Die Fluoreszenzintensität wurde in relativen Einheiten angegeben.

Die Normierung erfolgte über einen internen Standard. Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse, wird in allen Geweben exprimiert und als "housekeeping gene" bezeichnet. Die erfolgreiche Amplifikation dieser mRNA dient als Kontrolle und beweist die Präparation intakter RNA. Darüber hinaus wird gezeigt, dass alle Komponenten der RT-PCR funktionieren.

Übereinstimmende Ergebnisse konnten auch ohne Normierung auf einen internen Standard ermittelt werden, wobei eine definierte Menge (40 mg) Myokard- bzw. Perikardgewebes verwendet wurde.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss von Talkum auf das Perikard

Eine Fülle epidemiologischer und pathologisch-anatomischer Daten belegen heute einen klaren Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und entzündlichen Prozessen (Cavusoglu et al. 2001, Jousilathi et al. 2001, Kanda 2001). Fothergill beschrieb 1879 das Gicht Herz, welches durch Uratablagerungen im Myokard gekennzeichnet ist (Fotherhill 1879). Gicht stellt eine der stärksten Entzündungen überhaupt dar und zum damaligen Zeitpunkt wurde jede kardiale Erkrankung als Folge einer Entzündungsreaktion angesehen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts hatte Sir William Osler die Vermutung angestellt, dass der koronaren Herzerkrankung eine entzündliche Genese zugrunde liegt (Osler 1908). Hinsichtlich der zahlreichen, gut dokumentierten nicht-infektiösen Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung wurde diese Hypothese jedoch nicht weiter verfolgt. Neue Erkenntnisse zeigen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen wie die Atherosklerose viele Merkmale eines chronisch entzündlichen Prozesses aufweisen. Atherosklerotische Läsionen enthalten Entzündungszellen, aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen. In jüngster Zeit konnten differenzierte Erkenntnisse zur Pathogenese der Entzündungsreaktion auf der Ebene der Signalübertragung erarbeitet werden, wobei nachgewiesen werden konnte, dass von vaskulären Zellen exprimierte oder freigesetzte inflammatorische Mediatoren (wie z.Bsp. Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und proteolytische Enzyme) den Entzündungsprozess fördern und unterhalten. Es gibt zunehmend mehr Hinweise dafür, dass sich der Entzündungsvorgang hierbei auf molekularbiologischer Ebene im wesentlichen auf die Aktivierung einiger weniger Transkriptionsfaktoren wie dem NF- κ B, AP-1 und dem Jak/Stat-System konzentriert (Torgerson et al. 1998). Richtungsweisenden Studien mangelte es bislang an adäquaten Modellen einer akuten kardialen Entzündungsreaktion.

Das Perikard lässt histologisch Epithelzellen, Fibroblasten, Adipozyten sowie eine zarte Vaskularisierung erkennen. Die Fähigkeit der im Perikard vorhandenen Zellen, auf einen entzündlichen Stimulus verschiedene Zytokine zu produzieren, sind in der Literatur beschrieben (Boylan et al. 1992, Gurantz et al. 1999, Ichinose et al. 1995).

Die Arbeitsgruppe von Ivanyi zeigte vor mehr als 20 Jahren, dass der Instillation einer sterilen Talkum-Suspension in die Herzbeutelhöhle eine Einwanderung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen folgt (Ivanyi et al. 1981). Dieses Modell der durch steriles Talkum (Magnesiumsilikat) induzierbaren Perikarditis wurde von uns als mögliches Modell bei Ratten genauer charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte bei sechs Wochen alten Ratten 48 Stunden nach dem Einbringen einer sterilen Talkum-Suspension (20 mg/kg KG; 10 µl Saline/mg Talkum) in den Herzbeutel eine signifikante Zunahme des Perikardgewichts im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Weiterhin war das auf das Körpergewicht bezogene Perikardgewicht erhöht. Die Zunahme des Perikardgewichts ist ursächlich in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen als Reaktion auf den durch das Talkum bewirkten Fremdkörperreiz zu sehen. Der Entzündungsprozess setzt sich hierbei aus lokalen Zell- und Gewebsschädigungs-Reaktionen des Gefäß- und Bindegewebes zusammen, welcher im wesentlichen zu einer lokalen Anhäufung von Blutzellen und Flüssigkeit führt.

Rössle konnte bereits vor 50 Jahren zeigen, dass auf seröse Häute aufgebracht Talkum Entzündungsreaktionen mit und ohne Riesenzellbildung hervorruft. Tierversuche von C. Klemm aus dem Jahre 1947 belegen, daß sich nach Einbringen von Talkum in die Bauchhöhle von Meerschweinchen mikroskopisch und makroskopisch die gleichen Befunde zeigen, wie sie beim Menschen von ihm und vorher auch von anderen (Antopol 1937, Raisys 1961) beobachtet wurden. Das Perikardgewebe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigte 48 Stunden nach Talkum-Applikation eine leichtgradige Verdickung, Exsudation sowie multiple kleine, weißlich-gelbe, stippchenförmige Auflagerungen. Der Befund ließ sich mit den Beobachtungen von Iványi et al. (1981) vereinbaren, die bei Mäusen nach intraperikardialer Injektion einer Talkumsuspension eine serofibrinöse und zum Teil granulomatöse Entzündungsreaktion beschreiben konnten.

Mittels RT-PCR wurde die mRNA-Expression im Perikard ermittelt. Im nur mit Talkum behandelten Perikard war die TNF-alpha-mRNA-Expression nach einem Zeitraum von 48 Stunden signifikant erhöht. Der Tumornekrosefaktor zählt wie die Interleukine und Interferone zu der Gruppe der Zytokine. Die Transkription des Gens und der Anstieg der TNF-mRNA wird durch einen extrazellulären Stimulus induziert.

Die Sekretion des Faktors erfolgt u.a. seitens Fibroblasten und Makrophagen (Tracey et al. 1989, Mannel et al. 1980, Matthews 1981), welche im Rahmen der talkuminduzierten Entzündungsreaktion in das Gewebe einwandern. TNF-alpha induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6, was wiederum zur Induktion von Cyclo- und Lipoxygenasen sowie zur Aktivierung von B- und T-Zellen führt. Der Tumornekrosefaktor spielt bei der Unterhaltung zahlreicher Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle. Nachdem die Arbeitsgruppe von Levine im Jahre 1990 erstmals zeigen konnte, dass bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz die TNF-Plasmaspiegel signifikant erhöht sind, haben sich mehrere Studien mit der Rolle proinflammatorischer Zytokine bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz befasst (Levine et al. 1990, McMurray et al. 1991, Dutka et al. 1993). So konnte im Myokard chronisch herzinsuffizienter Patienten eine vermehrte TNF-Synthese nachgewiesen werden (Torre-Amione et al. 1996).

Der Tumornekrosefaktor führt über eine Beeinflussung des Kalziumstoffwechsels zu einer verminderten myokardialen Kontraktilität und zeigt somit eine direkt kardiale Wirkung (Yokoyama et al. 1993, Krown et al. 1995). Die Applikation einer TNF-hemmenden Substanz stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei der Therapie entzündlicher Herzerkrankungen bzw. der chronischen Herzinsuffizienz dar. Bei intestinalen Entzündungsreaktionen wie beispielsweise dem M. Crohn findet die Applikation einer TNF-hemmenden Substanz bereits klinische Anwendung. Infliximab, ein Tumornekrosefaktor-alpha-Antikörper, bindet mit hoher Affinität und Spezifität an lösliche als auch an Rezeptor gebundene TNF-alpha-Moleküle. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass durch diese Bindung die biologische Funktion dieses potenten Entzündungsmediators neutralisiert und die Entzündungskaskade unterbrochen werden kann (Blam et al. 2001, Asakura et al. 2001).

Hinsichtlich der perikardialen mRNA-Expression des Typ I-Kollagens sowie des Angiotensin II Typ 1A-Rezeptors, welche bei kardialer Fibrose erhöht sind (Sun und Weber 1994, Gurantz et al. 1999), konnten 48 Stunden nach dem Einbringen einer sterilen Talkum-Suspension in den Herzbeutel keine signifikanten Veränderungen detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Reparationsprozesse verzögert einsetzen. Ebenso zeigten sich bei der Untersuchung der perikardialen NF- κ B1 (p50)-mRNA-Expression im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede.

Die perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression ließ jedoch 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation eine signifikante Zunahme erkennen. Weitere Untersuchungen ließen eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Perikardgewicht und der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression sowie der perikardialen mRNA-Expression der p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B, einem „zentralen Schaltermolekül“ für Entzündungsgene, erkennen. Die positive Korrelation zwischen der perikardialen NF- κ B p65- und der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression kann als weiterer Hinweis für die Bedeutung von NF- κ B bei der Entstehung der Entzündung gewertet werden. Der Nachweis eines regulatorischen Effekts des Transkriptionsfaktors NF- κ B hinsichtlich der TNF-alpha-Genexpression konnte bereits in verschiedenen Arbeiten erbracht werden (Schutze et al. 1995, Liu et al. 2000).

4.2.2 Einfluss des PPARalpha-Agonisten Fenofibrat auf inflammatorische Prozesse im Perikard der Ratte im talkum-induzierten Entzündungsmodell

Zahlreiche Daten deuten darauf hin, dass der Aktivierung einer Gruppe neuerer Rezeptoren – sog. PPARs – bei Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle zukommt (Chinetti et al. 1998 und 2000). Es konnte gezeigt werden, dass PPARalpha in hohem Maße in der Herzmuskulatur exprimiert wird (Braissant et al. 1995). Vor dem Hintergrund, dass PPARalpha durch lipidsenkende Fibratderivate, wie z. Bsp. Fenofibrat, aktiviert werden kann, kam die Frage auf, ob PPARalpha-Agonisten entzündliche Vorgänge im Bereich des Herzmuskelgewebes beeinflussen können.

Es zeigte sich, dass der PPARalpha-Aktivator Fenofibrat die TNF-alpha-mRNA-Expression der mit Talkum behandelten Ratten reduzierte. Dieser Effekt ist vereinbar mit der Beobachtung, dass PPARalpha-Aktivatoren in glatten Gefäßmuskelzellen die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie z. Bsp. Interleukin 6 (IL-6) hemmen (Staels et al. 1998). In Endothelzellen blockiert Fenofibrat als synthetischer PPARalpha-Ligand die durch TNF-alpha induzierte Adhäsionsmolekülexpression sowie die Leukozytenadhäsion, was einer weiteren Leukozytenrekrutierung entgegenwirkt (Marx et al. 1999).

Delerive et al. konnten im Jahre 1999 nachweisen, dass PPARalpha-Aktivatoren darüber hinaus die Thrombin-induzierte Endothelin-1-Synthese hemmen und an der Einleitung der Apoptose in TNF-alpha aktivierten Makrophagen wesentlich beteiligt sind. Die Effekte des PPAR-alpha Liganden Fenofibrat auf TNF-alpha sind vergleichbar mit denen des antientzündlich wirksamen Kortisols, welches bei Patienten mit entzündlicher Herzbeutelkrankung noch immer als das Medikament der Wahl zum Einsatz kommt. Kortisol wird hierbei in Form eines kristallinen Bolus verabreicht (Hufnagel et al. 2000). Diese Form der Applikation wurde auch in der vorliegenden Arbeit für das Fenofibrat verwendet. Die Beobachtung, dass Kortisol und Fenofibrat vergleichbare Effekte hinsichtlich der perikardialen TNF-alpha-Expression zeigen, lässt einen ähnlichen Wirkungsmodus vermuten. Die Arbeitsgruppe von Aljada konnte nachweisen, dass Kortisol die IκB-Expression stimuliert und die Expression der NF-κB p65-Untereinheit inhibiert (Aljada et al. 1999). Neuere Arbeiten zeigen ähnliche Effekte für PPARalpha-Liganden. Delerive et al. konnten zeigen, dass PPARalpha-Aktivatoren eine Zunahme der IκB-Expression bewirken, was mit einer herabgesetzten NF-κB-DNA-Bindungsaktivität einhergeht (Delerive et al. 2000).

Eine signifikante Reduktion des Perikardgewichts konnte im Rahmen der perikardialen Fenofibrat-Applikation nicht herbeigeführt werden, so dass es in diesem Zusammenhang weitere Entzündungs- und Reparationsmechanismen auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen gilt. Hierbei scheinen neben dem NF-κB die Transkriptionsfaktoren AP-1 und STATs interessante und vielversprechende therapeutische Ziele zu sein.

4.2.3 Effekt der NF- κ Bp65-Antisense-Applikation auf die peri- und myokardiale AT1A-mRNA-Expression der Ratte im talkum-induzierten Entzündungsmodell

Zahlreiche experimentelle Daten konnten in jüngster Zeit belegen, dass dem zirkulierenden und kardialen Renin-Angiotensin-System (RAS) eine entscheidende Rolle bei der kardialen Fibrose als Folge einer Entzündungsreaktion zukommt. Die Identifizierung nukleärer Signalkaskaden haben in diesem Zusammenhang einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung von Genen geleistet, die durch Angiotensin II reguliert werden. In den Zellen des kardiovaskulären Systems wird die Expression proinflammatorischer Gene unter anderem durch Bindung von Angiotensin II, dem Effektorpeptid des RAS, an den Angiotensin II-Rezeptor 1 (AT1) induziert (Dechend et al. 2001, Ruiz-Ortega et al. 2001). Die Expression des AT1-Rezeptors unterliegt verschiedenen Einflüssen. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptordichte einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit des RAS hat (Murphy et al. 1991, Timmermans et al. 1993).

Beim Menschen wird nur eine Form des AT1-Rezeptorsubtyps exprimiert, bei der Ratte hingegen kommt der AT1-Rezeptor in den zwei Isoformen AT1A und AT1B vor (Kakar et al. 1992). Von besonderem Interesse ist, dass die Stimulation des AT1-Rezeptors zu einer Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B, AP-1 und STATs führt (Brasier et al. 2000). Verschiedene experimentelle Befunde lassen darauf schließen, dass die pathophysiologischen Auswirkungen des AT1-Rezeptors im wesentlichen durch den bei Entzündungsreaktionen hauptsächlich beteiligten Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt werden (Kranzhoefer et al. 1999, Muller et al. 2000, Ruiz-Ortega et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mittels der Antisense-Technologie eine Reduktion der Angiotensin II-Rezeptor 1 (AT1)-mRNA-Expression bewirken kann. Zur Auslösung einer Makrophagen-induzierten Entzündung wurde steriles Talkum in den Herzbeutel von sechs Wochen alten Ratten infundiert. Die Hemmung des NF-kappa B erfolgte mittels NF- κ Bp65 Antisense-Oligonukleotiden (5'-GGG AAA CAG ATC GTC CAT GGT-3') (Autieri et al. 1995).

Mit RT-PCR wurde 48 Stunden nach Talkum- und NF- κ B p65-Antisense-Applikation die AT1A-mRNA-Expression im Perikard sowie im Myokard des linken Ventrikels, bezogen auf GAPDH, bestimmt. Im Perikard ließ sich 48 Stunden nach Talkum- und NF- κ B p65-Antisense-Applikation eine Reduktion der AT1A-mRNA-Expression um 32 % ($p = 0.099$) im Vergleich zum lediglich mit Talkum behandelten Perikard nachweisen. Einen vergleichbaren Befund konnte im Myokard des linken Ventrikels erhoben werden, wo sich eine Reduktion der AT1A-mRNA-Expression um 48 % ($p = 0,052$) zeigte. Obwohl die Aufnahme von markierten Oligodesoxynukleotiden nicht geprüft wurde, kann man davon ausgehen, dass die Antisense-Oligodesoxynukleotide auch von Kardiozyten aufgenommen werden. So konnte nachgewiesen werden, dass der VEGF165-Vektor nach intramyokardialer Injektion ohne Transfektionsmedium im Myokard exprimiert wird. Die Aufnahme erfolgt vermutlich über für Kardiozyten spezifische "gap junctions" (Tio et al. 1999).

Die vorliegenden Daten sprechen für eine Blockade der AT1-mRNA-Expression durch NF- κ B p65-Antisense-Oligonukleotide und deuten darauf hin, dass dem Transkriptionsfaktor NF- κ B eine regulative Funktion hinsichtlich der Expression des Angiotensin II Rezeptor 1 (AT1) zukommt. Die Verhinderung der kardialen Fibrose als Folge eines inflammatorischen Prozesses könnte unter Berücksichtigung aktueller experimenteller Befunde neben der Applikation von Angiotensin II- und Aldosteron-Antagonisten auch durch die Inhibition beteiligter Transkriptionsfaktoren wie z. Bsp. dem NF- κ B mittels der Antisense-Technologie möglich sein. Der Einfluss anderer Faktoren des RAS und des Endothelinsystems sowie verschiedenen Mediatoren der Entzündungskaskade (z.B. IL-2, IL-6) auf inflammatorische Prozesse sind derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassung

1. Es gibt vermehrt Hinweise, dass inflammatorische Prozesse die Pathogenese verschiedener Herzerkrankungen beeinflussen. Molekularbiologische Verfahren haben in den letzten Jahren einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung von Zielstrukturen entzündlicher Vorgänge geleistet und damit neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet. Zur Entwicklung innovativer Therapieansätze, die inflammatorische Prozesse berücksichtigen, bedarf es experimenteller Studien am Tiermodell. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb zunächst die Entwicklung und Etablierung eines akuten kardialen Entzündungsmodells, welches bestimmte Kriterien erfüllen sollte. Diese sind u.a. eine innerhalb von wenigen Tagen ablaufende, massive Entzündung, wobei der Mechanismus der Entzündungsinduktion genau definiert und die Entzündungsvorgänge quantifizierbar sein sollten. Im weiteren sollte die Möglichkeit gegeben sein, den entzündlichen Prozess durch lokale Verabreichung verschiedener Substanzen therapeutisch zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auslösung einer Makrophagen-induzierten Entzündung steriles Talkum in den Herzbeutel von sechs Wochen alten Ratten instilliert. Diese Induktion der Perikarditis durch Talkum stellt ein reproduzierbares Perikarditismodell dar. Zur Aktivierung des bei der Regulation entzündlicher Prozesse entscheidend beteiligten Transkriptionsfaktors PPARalpha wurde Fenofibrat als gut charakterisierter PPAR-alpha-Ligand zusammen mit Talkum infundiert. Zur Hemmung des bei Entzündungsreaktionen hauptsächlich beteiligten Transkriptionsfaktors NF-κB wurden in einem weiteren Ansatz NF-κB p65-Antisense-Oligonukleotide gemeinsam mit Talkum in den Herzbeutel eingebracht .

2. Es wurde die Hypothese geprüft, ob die intraperikardiale Applikation von Talkum zu einer Zunahme des Perikardgewichts und der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression führt. TNF-alpha wurde als repräsentativer Marker der Entzündungsreaktion mit pathogenetischer Schlüsselfunktion gemessen. Im weiteren wurde die Hypothese aufgestellt, dass der PPARalpha-Ligand Fenofibrat eine inhibitorische Wirkung auf die durch Talkum ausgelöste Entzündungsreaktion hat. 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation (20 mg/kg KG; 10 µl Saline/mg Talkum) zeigte sich bei sechs Wochen alten Ratten eine Zunahme des Perikardgewichts um 43 % (p = 0.0006). Die gleichzeitige Applikation von 1 mg Fenofibrat ließ eine nicht-signifikante Reduktion des Perikardgewichts erkennen.

Die mit Talkum behandelten Ratten zeigten nach einem Zeitraum von 48 Stunden eine Zunahme der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression um 88 % ($p = 0.0001$), bezogen auf GAPDH entsprachen die mittels RT-PCR ermittelten Werte einer Zunahme um 79 % ($p = 0.0001$). Die gleichzeitige Applikation von 1 mg Fenofibrat bewirkte eine Reduktion der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression um 79 % ($p = 0.0001$). Bezogen auf die perikardiale GAPDH-mRNA-Expression entsprach dies einer Reduktion um 67 % ($p = 0.002$). Die perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression war 48 Stunden nach intraperikardialer Talkum-Applikation um 14 % ($p = 0.0003$) erhöht. Die perikardiale mRNA-Expression von NF- κ B p50, Kollagen I und des Angiotensin II Typ 1A (AT1A)-Rezeptors war nicht verändert. Diese Daten deuten darauf hin, dass Reparationsprozesse verzögert einsetzen.

3. Das Perikardgewicht korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha- ($r = 0.595$; $p = 0.03$) und NF- κ B p65-mRNA- ($r = 0.621$; $p = 0.02$) sowie der auf GAPDH bezogenen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.559$; $p = 0.047$). Das auf das Körpergewicht bezogene Perikardgewicht korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.591$; $p = 0.002$). Die perikardiale NF- κ B p65-mRNA-Expression korrelierte signifikant positiv mit der perikardialen TNF-alpha-mRNA-Expression ($r = 0.821$; $p = 0.001$).

4. Zahlreiche experimentelle Daten konnten in jüngster Zeit belegen, dass dem zirkulierenden und kardialen Renin-Angiotensin-System (RAS) eine entscheidende Rolle bei der kardialen Fibrose als Folge einer Entzündungsreaktion zukommt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B einen Einfluss auf die Expression des Angiotensin II Rezeptor 1 (AT1) hat. Zur Auslösung einer Makrophagen-induzierten Entzündung wurde steriles Talkum in den Herzbeutel von sechs Wochen alten Ratten infundiert. Die Inhibition des NF-kappa B erfolgte mittels der Ko-Applikation von NF- κ B p65-Antisense-Oligonukleotiden (5'-GGGAAACAGATCGTCCATGGT-3') (Autieri et al. 1995). Mit RT-PCR wurde 48 Stunden nach Talkum- und NF- κ Bp65-Antisense-Applikation die AT1A-mRNA-Expression im Perikard sowie im Myokard des linken Ventrikels, bezogen auf GAPDH, bestimmt. Im Perikard ließ sich 48 Stunden nach Talkum- und NF- κ B p65-Antisense-Applikation eine Reduktion der AT1A-mRNA-Expression um 32 % im Vergleich zum nur mit Talkum behandelten Perikard nachweisen.

Literaturverzeichnis

Adams DO and Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:283-318

Aderka D, Holtmann H, Toker L, Hahn T, Wallach D. Tumor necrosis factor induction by Sendai virus. *J Immunol* 1986; 136: 2938-2942

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985; 260: 2345-2354

Aljada A, Ghanim H, Assian E, Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Dandona P. Increased I κ B expression and diminished nuclear NF κ B in human mononuclear cells following hydrocortisone injection. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3368-3369

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertension* 2000; 13: 31-38

Antopol W. Lycopodium granuloma. It's clinical and pathological significance. Together with a note on granuloma produced by talc. *Arch Path* 1933;16: 320-331

Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 1998; 273: 5678-5684

Asakura H, Yao T, Matsui T, Koganei K, Fukushima T, Takazoe M, Hobara R, Nakano H, Okamura S, Matsueda K, Kashida H, Makiyama K, Hiwatashi N, Kashiwagi K, Hibi T. Efficacy of treatment with chimeric monoclonal antibody (Infliximab) to tumor necrosis factor-alpha for Crohn's disease in Japan: evaluation by rapid turnover proteins, and radiologic and endoscopic findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 763-769

Askari FK, Mc Donnell MW. Antisense-oligonucleotide therapy. *New Engl J Med* 1996; 334: 316-320

Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Liver X Receptor α in humans. *Diabetes* 1997; 46: 1319-1327

Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ and Ohlstein E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappaB inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem and Biophys Res Comm* 1995; 213: 827-836

Baeuerle PA, Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* 1988; 53: 211-217

Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988; 242: 540-546

Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179

Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B : ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20

Baglioni B, McCandless S, Tavernier J, Fiers W. Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *J Biol Chem* 1985; 260: 13395-13397

Bailey AJ and Robins SP. Current topics in the biosynthesis, structure and function of collagen. *Sci Prog, Oxf* 1976; 63: 419-444

Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B-proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-681

Bauer P, Regitz-Zagrosek V, Hofmeister J, Lokies J, Rolfs A, Hildebrandt A, Hetzer R, Fleck E. Reduced atrial angiotensin receptor type 1 mRNA content in end-stage human heart failure: assessment by a novel quantitative PCR-ELISA technique. *J Mol Med* 1996; 74 : 447-454

Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JF and Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 1992; 41 :1023-1033

Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami AC. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; 161: 984-995

Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunisation against cachectin/ tumor necrosis factor protects mice from lethal effects of endotoxin. *Science* 1985; 229:869-871

Beutler B, Tkacenko V, Milsark IW, Krochin N, Cerami AC. Effect of gamma-Interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes: a reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 1791-1796

Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986; 232: 977-980

Beutler B, Krochin N, Milsark IW. Induction of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis by influenza virus: deficient production by endotoxin-resistant (C3H/ HeJ) macrophages. *Clin Res* 1986; 34: 491a (abstract)

Beutler B and Cerami A. Cachectin : more than a tumor necrosis factor. *N Eng J Med* 1987; 316: 379-385

Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 823-834

Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 3-9

Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR. Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1977-1997

Blank V, Kourilsky P, Israel A. NF- κ B and related proteins: Rel/ dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem* 1992; 17: 135-140

Booth NH, Maaske CH, Hastings SG and Hopwood ML. Swine production for biomedical research. *Lab Anim Care* 1966; 16: 237-245

Boylan AM, Ruegg C, Kim KJ, Hebert CA, Hoeffel JM, Pytela R, Sheppard D, Goldstein IM, Broaddus VC. Evidence of a role for mesothelial cell-derived interleukin 8 in the pathogenesis of asbestos-induced pleurisy in rabbits. *J Clin Invest* 1992; 89: 1257-1267

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors: tissue distribution of PPARalpha, beta and gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1995; 137: 354-366

Branch AD. A hitchhikers guide to antisense and nonantisense biochemical pathways. *Hepatology* 1996; 24: 1517-1529

Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem* 2000; 212: 155-169

Brockmann JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 1998; 115: 1049-1055

Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM and Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 1996; 10: 974-984

Bubenheimer P. Perikarditis. In: Roskamm H, Reindell H. *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Auflage; 1996: 872-887

Bustad LK and McClellan RO. Use of pigs in biomedical research. *Nature (London)*; 1965; 208, 531-535

Butany J. The pericardium and its diseases. In Silver DM, editor. *Cardiovascular Pathology*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1991: 847-894

Camussi G, Bussolino F, Slavidio G, Baglioni C. TNF/ cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils and endothelial cells to synthesize and release platelet activating factor. *J Exp Med* 1987; 166: 1390-1404

Cavusoglu Y, Gorenek B, Alpsoy S, Unalir A, Ata N, Timuralp B. Evaluation of C-reactive protein, fibrinogen and antithrombin III as risk factors for coronary artery disease. *Isr Med Assoc J* 2001; 3: 36-38

Cerami A, Beutler B. The role of cachectin/ TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today* 1988; 9: 28-31

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-25580

Chinetti G, Fruchart JC and Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49: 497-505 (Review)

Creasey AA, Yamamoto R and Vitt CR. A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. *Proc natn Acad Sci USA* 1987; 84: 3293-3297

Dechend R, Fiebler A, Lindschau C, Bischoff H, Muller D, Park JK, Dietz R, Haller H, Luft C. Modulating angiotensin II-induced inflammation by HMG C reductase inhibition. *Am J Hypertens* 2001; 14: 55-61

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the AP-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999; 85: 394-402

Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of I κ B alpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* 2000; 275: 36703-36707

Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43

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

Dunbar DN, Tobler HG, Fetter J, Gornick CC, Benson DW and Benditt DG. Intracavitary electrode catheter cardioversion of atrial tachyarrhythmias in the dog. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 1015-1027

Dutka DP, Elborn JS, Delamere F, Shale DJ, Morris GK. Tumor necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. *Br Heart J* 1993; 70: 141-143

Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the renin-angiotensin-system. *Am J Physiol* 1988; 255: 563-573

Earl RF and Taylor JC. The housing and management of swine for biomedical research. Swine in biomedical research by L.K. Bustad and R.O. McClellan eds. (Seattle) 1966; 645-659

Eckstein F. Phosphorothioate analogues of nucleotides—Tools for the investigation of biochemical processes. *Angewandte Chem* 1983; 22: 423-506

Engelberts I, Moller A, Leeuwenberg JF van der Linden CJ, Buurman WA. Administration of tumor necrosis factor alpha inhibitors after exposure to TNF-alpha prevents development of the maximal biological effect – an argument for clinical treatment with TNF-alpha inhibitors. *J Surg Res* 1992; 53: 510-514

Feinmann R, Hendriksen-DeStefano D, Tsujimoto M, Vilcek J. TNF is a potent mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol* 1987; 138: 635-640

Fleischhauer H. Das Herz. In: Benninghoff A *Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg, 15 Auflage; 1994: 644-646

Fong Y, Lowry SF. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clin Immunol Immunopath* 1990; 55: 157-170

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

Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4312-4317

Fothergill JM. The heart and its diseases, with their treatment: including the gouty heart. *Landsay and Blakston (London)* 1879;34: 275-279

Frankel AD, Kim PS. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell* 1991; 65: 717-719

Freudenberg MA, Schalk J, Galanos C. Identification and percentage frequency of isolated non-parenchymal liver cells in the mouse. *Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989; 57 (2) : 109-115

Frick H, Leonhardt H, Starck D. Spezielle Anatomie II, Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 4. Auflage; 1992: 45-46

Goldman MJ. Pericarditis. *West J Med* 1975; 123: 467

Grannemann J, Skoff R, Yang X. Member of peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1998; 51: 563-573

Gratzl M. Histologie. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 5. Auflage; 2002: 175-176

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin-system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828

Grilli M, Chiu JJ-S, Leonardo MJ. NF- κ B and Rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993; 143: 1-62

Gurantz D, Cowling RT, Villareal FJ, Greenberg BH. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiotensin II type I receptors on cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1999; 85:272-279

Haber E. Defining the physiologic and pathophysiologic roles of renin: the role of specific inhibitors. *Am J Kidney Dis* 1985; 5: A14-A22

Hahn EA, Hartz VL, Moon TE, O'Connell JB, Herskowitz A, McManus BM, Mason JW. The Myocarditis Treatment Trial: design, methods and patient enrollment. *Eur Heart J* 1995; 16: Suppl O: 162-167

Hartmann G, Krug A, Bidlingmaier M, Hacker U, Eigler A, Albrecht R, Strasburger CJ, Endres S. Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 920-928

Haulica I, Petrescu G, Slatineanu S, Bild W. Current data on the extrarenal renin-angiotensin system. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 1999; 103: 25-34

Hill MR, Clarke S, Rodgers K, Thornhill B, Peters JM, Gonzalez FJ, Gimble JM. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia. *Infect Immun* 1999; 67: 3488-3493

Hoffmann M, Weinberg D. TNF induces hydrogen peroxide production and FC receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. *J Leuk Biol* 1987; 42: 704-709

Holt JP. The normal pericardium. *Am J Cardiol* 1970; 26: 455

Hort W. Kreislauforgane Herz Perikarditis. In: Eder M, Gedigk P, editors. *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie*. Berlin Heidelberg New York, D: Springer Verlag; 1977: 323-326

Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönian U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 2000; 25: 279-285

Ichinose Y, Asoh H, Yano T, Yokoyama H, Inoue T, Tayama K, Ueda T, Takai E. Use of pericardial fat pad flap for preventing bronchopleural fistula: an experimental study focusing on the angiogenesis and cytokine production of the fat pad. *Surg Today* 1995; 25: 811-815

Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 370-374

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

Iványi JL, Rády P, Uzvöglyi É and Kiss A. Experimental model of leukemic infiltrative pericarditis reflecting a human disease. *Exp Path* 1981; 20: 11-16

Izumi T, Takehana H, Matsuda C, Yokoyama H, Kohno K, Suzuki K and Inomata T. Experimental autoimmune myocarditis and its pathomechanism. *Herz* 2000; 25:274-278

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

Johnson WJ, Adams DO. Activation of mononuclear phagocytes for tumor cytotoxicity: analysis of inductive and regulatory signals. In: Volkman A, ed. *Mononuclear phagocyte biology*. New York: Marcel Dekker, 1984: 279-300

Jones EY , Stuart DI and Walker NPC. Structure of tumor necrosis factor. *Nature* 1989; 338: 225-228

Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. The association of C-reactive protein, serum amyloid a and fibrinogen with prevalent coronary heart disease-baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis* 2001; 156: 451-456

Jue DM, Sherry B, Luedke C, Manogue KR, Cerami A. Processing of newly synthesized cachectin/ tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem* 1990; 29: 8371-8377

Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neil JD. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 1090-1096

Kanda T. C-reactive protein (CRP) in the cardiovascular system. *Rinsho Byori* 2001; 49: 395-401

Karlson P, Doenecke D, Koolman J. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 14. Auflage; 1994: 518-522

Kawakami M, Ishibashi S, Ogawa H, Murase T, Takaku F, Shibata S. Cachectin/TNF as well as Interleukin-1 induces prostacyclin synthesis in cultured vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1986; 141: 482-493

Kazmi SMI, Plante RK, Visconti V, Taylor GR, Zhou L, Lau CY. Suppression of NF- κ B activation and NF- κ B-dependent gene expression by tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Cell Biochem* 1995; 57: 299-310

Kleist von S, Sandritter W und Riede UN. Abwehrmechanismen des Organismus. In: Sandritter W, Beneke G Allgemeine Pathologie. Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Stuttgart New York, D: Schattauer Verlag, 2. Aufl. 1981: 470-472

Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis-retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992; 358: 771-774

Kliwer SA, Lenhard JM, Wilson TM, Patel I, Morris DC and Lehmann JM A. prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptors gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-819

Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM and Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4318-4323

Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1994a:306-307

Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1994b:298-299

Kranzhoefer R, Browatzki M, Schmidt J, Kuebler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 826-828

Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11 (6): 779-791

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/ cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53

Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in the rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients. *FEBS Lett* 1995; 376: 24-30

Kull FC, Jacobs S, Cuatrecasas P. Cellular receptor for 125I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity, labeling and relationship to sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5756-5760

Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4412-4421

Lee JJ, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 981-993

Leonhardt H, Tillmann B, Toendury G, Zilles K. Kreislaufsystem; Herz und Herzbeutel. In: Rauber/Kobsch Anatomie des Menschen. Lehrbuch und Atlas, Band II (Innere Organe). Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1987: 30-62

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Eng J Med* 1990; 323: 236-241

Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1986; 124: 179-185

Lippert H. Lehrbuch Anatomie. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 3. Auflage; 1993: 235-236

Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J, Pope RM. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 2000; 164: 4277-4285

Lorell BH. Pericardial disease. In Braunwald E, editor. Heart disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1997: 1478-1534

Maisch B, Drude L. Pericardioscopy: A New Diagnostic Tool in Inflammatory Diseases of the Pericardium. *Eur Heart J* 1991; 12 (suppl D): 2-6

Maisch B. Myocarditis and pericarditis – old questions and new answers. *Herz* 1992; 17: 65-70

Maisch B, Drude L. Epi- and Pericardial Biopsy by Pericardioscopy. *Circulation* 1992; 82 (suppl 3): 417

Maisch B. Entzündliche Herzerkrankungen (Endokarditis, Myokarditis und Kardiomyopathien). In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 4.Auflage, 1998; 20.9:1185-1216

Maisch B, Bethge C, Drude L, Hufnagel G, Herzum M, Schönian U. Pericardioscopy and epicardial biopsy – new diagnostic tools in pericardial and perimyocardial disease. *Eur Heart J* 1994; 15 (suppl C): 68-73

Maisch B, Hufnagel G, Schönian U, Hengstenberg C for the ESETCID Investigators. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Disease (ESETCID). *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O): 173-175

Maisch B. Pericardial inflammation: Etiology, Pathology and Pathophysiology. In: Seferović PM, Spodick DH, Maisch B. *Pericardiology, Contemporary Answers to Continuing Challenges*. Belgrade, Science, 2000a ; 9-17

Maisch B. Treatment of Idiopathic Pericarditis: Viral versus Autoreactive Disease. In: Seferović PM, Spodick DH, Maisch B. *Pericardiology, Contemporary Answers to Continuing Challenges*. Belgrade, Science, 2000b ; 373-380

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

Mannel DN, Moore RN, Mergenhagen SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 1980; 30: 523-530

Mansen A, Guardiola-Diaz H, Rafter J, Branting C, Gustafsson JA. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 844-851

Martin GR, Byers PH, Piez KA. Procollagen. *Advanc Enzymology* 1975 ; 42 : 167-191

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

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

Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Eng J Med* 1995; 333: 269-275

Matthews N. Tumor-necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits. *Br J Cancer* 1981; 44: 418-424

Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S, Tsukaguchi Y, Nio Y and Inada M. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J Clin Invest* 1994; 93: 1592-1601

McMurray J, Abdullah I, Dargie HJ, Shapiro D. Increased concentrations of tumor necrosis factor in "cachectic" patients with severe chronic heart failure. *Br Heart J* 1991; 66: 356-358

Miyamoto S, Verma IM. Rel/ NF- κ B/ I κ B story. *Adv Cancer Res* 1995; 66: 255-292

Moll KJ, Moll M. Anatomie, Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm Lübeck Ulm, 14. Auflage; 1995: 392-393

Mollnau H, Münkel B, Schaper J. Kollagen VI in der extrazellulären Matrix im normalen und insuffizienten Humanmyokard. *Herz* 1995; 20:89-94

Mount LE and Ingram DL. The pig as a laboratory animal. Academic Press, London, 1971

Mügge A, Daniel WG. Perikarderkrankungen. In: Thiemes Innere Medizin: TIM Thieme, Stuttgart New York; 1999:1196-1203

Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF- κ B inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 2000; 35: 193-291

Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Ehrlich HA. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-273

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

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56-61

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991; 351: 233-236

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H and Evans RM. Oxidised LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 1998; 93: 229-240

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-326

Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 1996; 76: 425-536

Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by TNF. *J Exp Med* 1986; 163: 740-745

Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Med* 1996; 2: 998-1004

Nicoletti A, Heudes D, Mandet C, Hinglais N, Bariety J, Michel JB. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 1096-1107

Nyce JW, Metzger WJ. DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature* 1997; 385: 721-725

Okuyama A, Nonomura N, Nakamura M, Namiki M, Sonoda T. Renin-Angiotensin-System. *Arch Androl* 1988; 21: 169-180

Oliver JA. Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. *J Cell Physiol* 1992; 151: 506-511

Osler W. Diseases of the arteries. In: Osler W, MacCrae T, editors. *Modern Medicine. Its Theory and Practice in Original Contributions by Americans and Foreign Authors.* Vol 4. Philadelphia, PA: Lea & Fabiger, 1908: 426-427

Pabo CO, Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 1053-1095

Pace JL, Russel SW, Torres BA, Johnson HM, Gray PW. Recombinant mouse gamma-interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J Immunol* 1983; 130: 2011-2013

Palladino MA Jr, Shalaby MR, Kramer SM, Ferraiolo BL, Baughman RA, Deleo AB, Crase D, Marafino B, Aggarwal BB, Figari IS. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines. *J Immunol* 1987; 138: 4023-4032

Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J. Alterations in lipoprotein metabolism in PPARalpha-deficient mice. *J Biol Chem* 1997; 272: 27307-27312

Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by IL-1, TNF and immune interferon. *J Immunol* 1986; 137: 1893-1896

Pohlmann TH, Stannes KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol* 1986; 136: 4548-4553

Raisys VA. Gewebsschäden durch Talkum und deren Bedeutung für die Abdominalchirurgie (Talkumgranulome). Inauguraldissertation, Universität Saarland, 1961

Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, Steffen C, Hildebrandt A, Hetzer R, Fleck E. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* 1994; 91: 1461-1471

Riede UN, Müntefering H, Drexler H, Ihling CH und Schäfer HE. Kardiovaskuläres System. In: Riede UN, Schäfer HE Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart New York, D: Georg Thieme Verlag, 4.Aufl. 1995a: 514-515

Riede UN, Herbst EW, Böhm N und Schäfer HE. Störungen der Individualitätswahrung. In: Riede UN, Schäfer HE Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart New York, D: Georg Thieme Verlag, 4.Aufl. 1995b: 246-247

Rodriguez Acosta FA, Galindo B, Cesari IM Chemical nature of the interaction between macrophage fusion factor and macrophage membranes. *Scand J Immunol* 1983; 18: 407-410

Rössle R. Ref. Zbl Path 1949;85: 225

Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. Funktionelle Histologie. Schattauer Verlagsgesellschaft, 4. Auflage; 2000: 159

Rothwarf DM, Karin M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. Sci STKE 1999; 5:RE 1 (Review)

Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II induces nuclear factor-kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. J Mol Cell Cardiol 2000; 32: 1767-1778

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, König S, Wittig B, Egidio J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappa B through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. Circ Res 2000; 86: 1266-1272

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egidio J. Proinflammatory action of angiotensins. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001; 10: 321-329

Sandritter W, Thomas C. Histopathologie. Lehrbuch und Atlas für die Kurse der allgemeinen und speziellen Pathologie. Schattauer, Stuttgart New York; 10. Auflage; 1986: 74-75

Scheurich P, Ucer U, Kronke M, Pfizenmeyer K. Quantification and characterization of high-affinity membrane receptors for tumor necrosis factor on human leukemic cell lines. Int J Canc 1986; 38: 127-133

Scheurich P, Thoma B, Ucer U, Pfizenmeyer K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) alpha: Induction of TNF receptors on human T-cells and TNF alpha mediated enhancement of T-cell response. J Immunol 1987; 138: 1786-1790

Schiebler TH, Schmidt W. Lehrbuch der gesamten Anatomie des Menschen. Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 5. Auflage; 1991: 538-540

Schmitz MI, Baeuerle PA. Multi step activation of NF- κ B/Rel transcriptional factors. Immunobiology 1995; 193: 116-127

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

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. N Engl J Med 1999; 341: 577-583

Schutze S, Wiegmann K, Machleidt T, Kronke M. TNF-induced activation of NF- κ B. Immunobiology 1995; 193: 193-203

Scuderi P. Suppression of human leukocyte tumor necrosis factor secretion by the serine protease inhibitor TAME. J Immunol 1989; 143: 168-173

Schmid RM, Liptay S, Betts JC, Nabel GJ. Structural and functional analysis of NF- κ B. Determinants of DNA binding specificity and protein interaction. J Biol Chem 1994; 269: 32162-32167

Semenzato G. Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. Br J Cancer 1990; 61: 354-361

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986; 46: 705-716

Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J and Froehler B. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. Nucl Acids Res 1991; 19: 747-750

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455

Smith RA, Kirstein M, Fiers W and Baglioni C. Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. A comparative study of tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 1986; 261: 14871-14874

Smith RA and Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987; 262: 6951-6954

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J and Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998; 393: 790-793

Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1364-1370

Sun Y and Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1623-1628

Sun Y and Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. *J Lab Clin Med* 1996; 127: 94-101

Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe chronic heart failure and their relation to mortality. Consensus Trial Study Group. *Circulation* 1990; 98: 1730-1736

Tazawa S, Nakane T and Chiba S. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents up-regulation of angiotensin II type 1A receptors in rat injured artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 898-904

Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532

Timmermans PBMW, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993 ; 45 : 205-251

Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH, Lebherz C, Magner M, Kearny M, Esakof DD, Isner JM, Symes JF. Intramyokardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 : 2953-2960

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPARgamma2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994; 8: 1224-1234

Torgerson TR, Colosia AD, Donahue JP, Lin YZ and Hawiger J. Regulation of NF- κ B, AP-1, NFAT and Stat1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappaB p50. *J Immunol* 1998; 161: 6084-6092

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 1996; 93: 704-711

Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/ TNF-monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330: 662-664

Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/ tumor necrosis factor. *Lancet* 1989; 20: 1122-1126

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

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Huehle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. Angiotensin receptors. *J Hypertens* 1996; 14: 95-103

Volpes R, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. Hepatic expression of type A- and B-receptors for tumor necrosis factor. *J Hepatol* 1992; 14: 361-369

Waage A, Espevik T, Lamvik J. Detection of tumor necrosis-like cytotoxicity in serum from patients with septicaemia but not from untreated cancer patients. *Scand J Immunol* 1986; 24: 739-743

Wang AM, Creasy AA, Ladner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdell JN, Yamamoto R, Mark DF. Molecular cloning of the complementary DNA for human TNF. *Science* 1985; 288: 149-154

Wendel A, Niehörster M, Tiegs T. Oxygen radicals, eicosanoids and cytokines in endotoxemic rodents. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; 372: 243-244

Wilke A, Schonian U, Herzum M, Hengstenberg C, Hufnagel G, Brilla CG, Maisch B. The extracellular matrix and cytoskeleton of the myocardium in cardiac inflammatory reaction. *Herz* 1995; 20: 95-108

Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996 ; 74: 749-769

Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest* 1993; 92: 2303-2312

Yoshie O, Tada K and Ishida N. Binding and crosslinking of 125I-labeled recombinant tumor necrosis factor to cell surface receptors. *J Biochem* 1986; 100: 531-541

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M and Lazar M. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 1995; 270: 23975-23983

Zabel U, Baeuerle PA. Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 1990; 61: 255-265

Anhang

Abbildungen der Agarosegelelektrophorese

Dargestellt sind repräsentative Auszüge aus der Agarosegelelektrophorese.

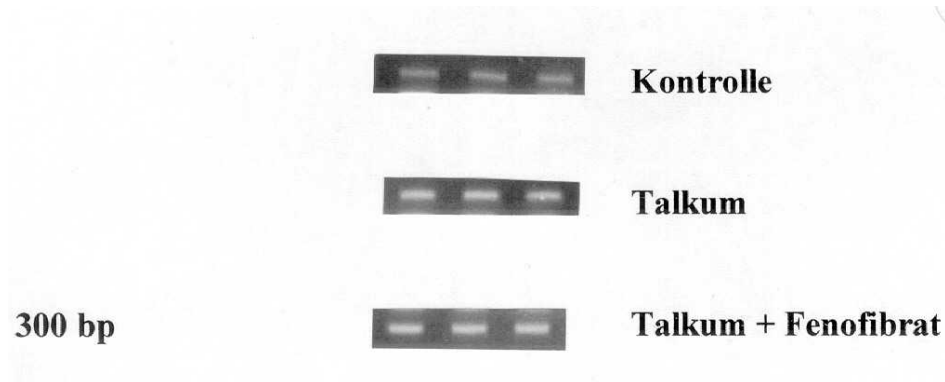


Abbildung 28: Perikardiale GAPDH-mRNA-Expression.

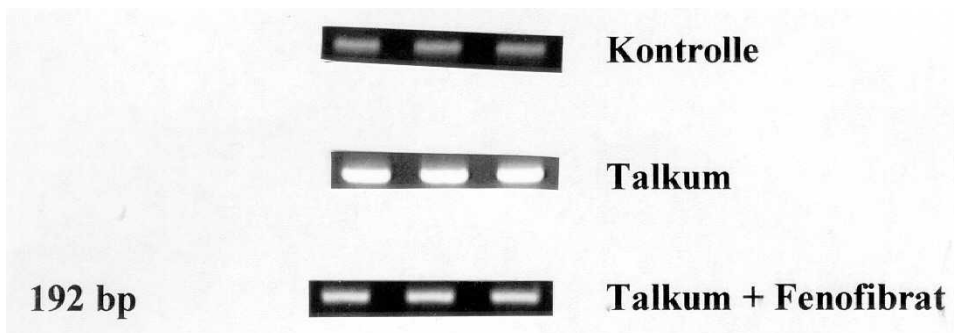


Abbildung 29: Perikardiale TNF-alpha-mRNA-Expression.

Abkürzungen

A	Adenin
AP-1	Aktivator Protein-1
Aqua dest	Aqua destillata
AS	Aminosäure/n
AT1A	Angiotensin II Typ 1A-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
CSF	colony stimulating factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetat
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	etcetera
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
G-CSF	granulozyte colony stimulating factor
Gly	Glycin
GM-CSF	granulozyte macrophage colony stimulating factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HTLV	Humanes Lymphotropes T-Zell Leukämievirus
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon/e
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitorprotein der I-Kappa-B-Familie
IL	Interleukin/e

JAK	Janus Kinase/n
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MFF	Makrophagen-Fusions-Faktor
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
M-MLV	murine Maloney Leukemia virus
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor Kappa B
NLS	Nukleäres Translokationssignal
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NSA	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PAF	platelet activating factor
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Perikardektomie
PF	Perikardfensterung
PP	Peroxisom-Proliferator/en
PPAR	Peroxisomproliferator-aktivierte Rezeptoren
PPARE	PPAR-response Elemente
PPkt.	Perikardpunktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase

RXR	retinoid X receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
U	Uracil
UV	ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
z. B.	zum Beispiel

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Bartalaffny, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Beato, Berger, Berndt, Besedovsky, Bien, Bittinger, Brilla, Cetin, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Doss, Effendy, Ehlenz, Eissele, Elsässer, Engel, Engelhardt-Cabillic, Ernst, Eschenbach, Fehmann, Feuser, Fischer, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Görg, Gohlenhofen, Gotzen, Greger, Gressner, Grezeschick, Griss, Gropp, Habermehl, Happle, Hartmann, Hasilik, Hasse, Havemann, Heeg, Hellwig, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hoffmann, Hofmann, Huffmann, Jones, Josef, Kälble, Kaffarnick, Kalbfleisch, Katschinski, Kern, Kienapfel, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koehler, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lang, Lange, Lennarz, Lill, Löffler, Lührmann, Maisch, McGregor, Meinhardt, Mennel, Mittag, Mönnikes, Moll, Moosdorf, Mühlberger, Müller R., Müller U., Mutters, Netter, Neubauer, Neumann, Nies, Niessing, Noll, Oertel, Peter, Pfab, Pfeiffer, Pohlen, Portig, Prinz, Radsak, Remschmidt, Rheder, Richter, Riedmiller, Röhm, Rogausch, Rothmund, Rupp, Schachtschabel, Schäfer, Schlegel, Schmidt, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz J., Seitz R., Seyberth, Simon, Slenczka, Sodomann, Sommer, Steininger, Steinmetz, Stinner, Stempel, Sturm, Thomas, Vogt, Vohland, Voigt, Wagner H.J., Wagner U., Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, von Wichert, Wilke, Wolf, Zelder

Meine akademischen Lehrer an der Ludwig-Maximilians-Universität München waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Breit, Haberl, Habermeyer, Hartenstein, Hartinger, Hertlein, Hoffmann, Horn, Korting, Lindlbauer, Nathrath, Pösl, Scherberich, Stalla, Weiss

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. B. Maisch (Abteilung für Innere Medizin-Kardiologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg) für die Überlassung des Dissertationsthemas. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. H. Rupp (Molekular-kardiologisches Labor der Philipps-Universität Marburg) als Betreuer dieser Arbeit für die Einführung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Für das Korrekturlesen danke ich meinen Freunden Herrn Dr. M. Anlauf sowie Herrn Dipl.-Betriebswirt (FH) T. Schlick.

Für die geduldige Unterstützung danke ich meinen lieben Eltern Herbert und Bärbel König.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „PPARalpha induzierte Hemmung der TNFalpha-mRNA-Expression bei durch Talkum-induzierter Perikarditis der Ratte“ in der Klinik für Kardiologie (Leiter: Herr Prof. Dr. B. Maisch) unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. H. Rupp (Molekular-kardiologisches Labor) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 21.11.2002