



**Institut für Biochemie und Molekularbiologie III:  
Biochemische Endokrinologie  
Direktor Prof. Dr. H.-J. Seitz**

# **Expression und hormonelle Regulation von Matrix Metalloproteinasen im Herzen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Wiebke Rathmann  
aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter:

Prüfungsausschuss: 3.Gutachter:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2003 bis Juli 2004 am Institut der medizinischen Biochemie und Molekularbiologie III, Abteilung für Biochemische Endokrinologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Dr. K. R. Sultan und Prof. Dr. H.-J. Seitz angefertigt.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das DFG-Graduiertenkolleg 336.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>S. 7</b>
1.1	Das Herz	S. 7
1.1.2	Feingeweblicher Aufbau des Myokards	S. 7
1.1.3	Myokardiales Interstitium	S. 8
1.1.3.1	Bindegewebe	S. 8
1.1.3.2	Intramyokardiales Bindegewebe	S. 9
1.1.3.3	Kardiale Fibroblasten	S. 10
1.1.3.4	Kollagene Fasern	S. 10
1.2	Proteasen	S. 11
1.2.1	Matrix Metalloproteinasen (MMP)	S. 12
1.2.2	Struktur und Wirkungsweise von MMP	S. 14
1.2.3	Kardiale MMP	S. 14
1.2.4	<i>tissue inhibitor of MMP</i> (TIMP)	S. 16
1.3	Pathomechanismus der Herzfibrose	S. 16
1.4	Die Schilddrüsenhormone T4 und T3	S. 18
1.4.1	Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen	S. 19
1.5	Reversible myokardiale Fibrose im hypothyreoten Tier	S. 20
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>S. 21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>S. 23</b>
3.1	Material	
3.1.1	Chemikalien	S. 23
3.1.1.1	Reaktionsgefäße und Pipetten	S. 23
3.1.1.2	Membranen und Fertiggele	S. 24
3.1.1.3	Molekulargewichtsmarker	S. 24
3.1.2	Geräte	S. 24
3.1.3	Zellkultur	S. 25
3.1.3.1	Zellen	S. 25
3.1.4	Antikörper	S. 25
3.1.5	Primer	S. 26
3.1.6	Positivkontrollen	S. 26
3.1.7	Zusammensetzung von Medien, Standardlösungen und Puffern	S. 27
3.1.8	Stimulatoren	S. 29
3.1.9	Tiere	S. 29
3.2	Methoden	

3.2.1	Zellkultur	S. 30
3.2.1.1	Zellkulturmodell	S. 30
3.2.1.2	Zellpräparation	S. 30
3.2.1.3	Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten	S. 31
3.2.2	molekularbiologische Methoden	S. 31
	3.2.2.1 quantitative real-time-RT-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	S. 31
	3.2.2.1.1 RNA Extraktion / Quantifizierung	
	3.2.2.1.2 RNA-cDNA Umschreibung	
	3.2.2.1.3 LightCycler Reaktionsaufbau	
3.2.3	Protein-chemische Methoden	S. 33
3.2.3.1	Präparation von Gewebeproben	S. 33
3.2.3.2	Proteinextraktion aus Gewebehomogenaten	S. 33
3.2.3.3	Proteinpräparation aus Zellen	S. 33
3.2.3.4	Konditioniertes Medium (KM)	S. 34
3.2.3.5	Proteinbestimmung	S. 34
3.2.3.6	SDS-PAGE (SDS-Gelelektrophorese)	S. 35
3.2.3.7	Zymographie	S. 35
	3.2.3.7.1 Gelatin-Zymographie	
	3.2.3.7.2 Kasein-Zymographie	
	3.2.3.7.3 Kollagen Typ I-Zymographie	
3.2.3.8	Reverse Zymographie	S. 38
3.2.3.9	Western Blotting	S. 39
	3.2.3.9.1 Proteintransfer mit der Semi-Dry-Methode	
	3.2.3.9.2 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine	
	3.2.3.9.3 „Enhanced Chemiluminiscense“ (ECL)-Detektion der gebundenen Antikörper	
3.3	Densitometrie	S. 41
3.4	EDV-Unterstützung und Statistik	S. 42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S. 43</b>
4.1	Zellkulturmodell aus primären kardialen Fibroblasten vom Schwein	S. 43
4.1.2	Morphologie adulter kardialer Fibroblasten in Kultur	S. 43
4.2	Nachweis spezifischer mRNA von MMP in nativem Herzgewebe	S. 43
4.2.1	Nachweis von MMP-Aktivität in nativem Herzgewebe	S. 45
4.2.2	Nachweis von MMP im Western Blot	S. 47
4.2.3	Identifikation der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9	S. 47

4.2.4	Einfluss von T3 und Dexamethason auf die Genexpression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9	S. 48
4.2.5	Genexpression weiterer MMP-Subtypen nach Behandlung mit T3 oder Dexamethason	S. 49
4.2.6	Steigerung der Genexpression von MMP-3 und MMP-13 durch T3	S. 50
4.2.7	Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 nach Behandlung mit T3 und Dexamethason	S. 50
4.2.8	Einfluß von Estrogen, Testosteron und dem Zytokin TNF $\alpha$ auf die Aktivität von MMP	S. 54
4.3	TIMP-mRNA in nativem Herzgewebe	S. 55
4.3.1	Aktivität von TIMP im Herzgewebe	S. 56
4.3.2	Genexpression von TIMP nach Behandlung mit T3, Glukokortikoiden und Estrogen	S. 56
4.3.3	TIMP-1 im Western Blot nach Behandlung mit T3 und Dexamethason	S. 57
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S. 60</b>
5.1	MMP-2 im Herzgewebe	S. 60
5.2	Regulation der Aktivität von MMP-2	S. 61
5.3	MMP-9 als Ziel regulatorischer Hormone	S. 62
5.4	Effekte von Estrogen und TNF $\alpha$	S. 63
5.5	Effekte von Glukokortikoiden	S. 64
5.6	Effekte von T3	S. 64
5.7	TIMP-1 als Ziel regulatorischer Hormone	S. 65
5.8	Schlussfolgerung	S. 66
5.9	Ausblick	S. 67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S. 69</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>S. 71</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>S. 72</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> <b>Veröffentlichungen</b> <b>Danksagung</b> <b>Curriculum vitae</b> <b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>S. 77</b>

# 1 Einführung

## 1.1 Das Herz

Der Herzmuskel hat die Aufgabe, das zirkulierende Blutvolumen im Körper zu verteilen. Es funktioniert nach dem Prinzip der Saug-Druck-Pumpe: durch rhythmische Kontraktion wird das Blut angesaugt und durch Druck wieder abgegeben, das desoxygenierte Blut des großen Kreislaufs wird in den Lungenkreislauf gepumpt und wieder reoxygeniert, das oxygenierte Blut des Lungenkreislaufes wird wieder zurück in den großen Kreislauf gepumpt. Für den reibungslosen Ablauf der Kontraktion sorgt der regelhafte Aufbau des Herzmuskelgewebes (Myokard) mit seiner inneren- (Endokard) und äußeren Deckschicht (Epikard) sowie die Physiologie des Herz-Kreislaufsystems.

### 1.1.2 Feingeweblicher Aufbau des Myokards

Das Myokard besteht zu 85-90% aus quergestreiftem Muskelgewebe. Der interstitielle Raum zwischen den Muskelzellen enthält Binde- und Fettgewebe, Gefäß- und Nervenbahnen (Fleischhauer 1994). Zum Myokardaufbau siehe Abb. 1.1. Die Muskelfasern im Herzen bestehen aus mehreren Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten). Die einzelnen Kardiomyozyten sind untereinander End zu End oder Seit zu Seit durch Disci intercalares (Glanzstreifen) verbunden (Sommer 1982), deren histologisches Korrelat Gap Junctions (Nexus), Desmosomen und Fasciae adhaerentes darstellen (Sjöstrand et al. 1958; Poche und Linder 1955). Durch dieses funktionelle Synzytium ist einerseits eine metabolisch- elektronische Kopplung untereinander und andererseits eine Übertragung der Kontraktionskraft auf andere Kardiomyozyten möglich. Das dreidimensionale Netzwerk aus Muskelzellen wird vom interstitiellen Raum umgeben, der etwa 12-15% des Myokardvolumens einnimmt (Anversa et al. 1980; Mall et al. 1986, 1988). Die Kapillargefäße sind davon der größte Anteil (10%), während der nichtvaskuläre Anteil nur 3-5% ausmacht. Eine Besonderheit des Myokard stellt das Reizleitungssystem dar, welches aus spezialisierten Kardiomyozyten ohne kontraktile Filamente besteht, die sich durch bestimmte Connexine in den Nexus auszeichnen. Sie sind in der Lage Potenzialänderungen, die in sog. „Schrittmacherzellen“ generiert werden, auf das Myokard zu übertragen und so eine gezielte Kontraktion auszulösen (Drenckhahn 1994). Im gesunden Herzen verläuft die Reizüberleitung gleichmäßig und rhythmisch, konsekutiv dadurch auch die nachfolgende Kontraktion, bei der sich die einzelnen Kardiomyozyten verkürzen. Durch die Anordnung einzelner Lagen miteinander vernetzter Kardiomyozyten,

deren Ausrichtung scherengitterartig gegeneinander verläuft, hat die normale Herzkontraktion einen Auswring-Charakter. Epi- und Endokard bestehen aus einer Mesothelschicht mit darunter liegendem Fettgewebe, das periphere Nerven, Koronargefäßäste und Lymphgefäße enthält.

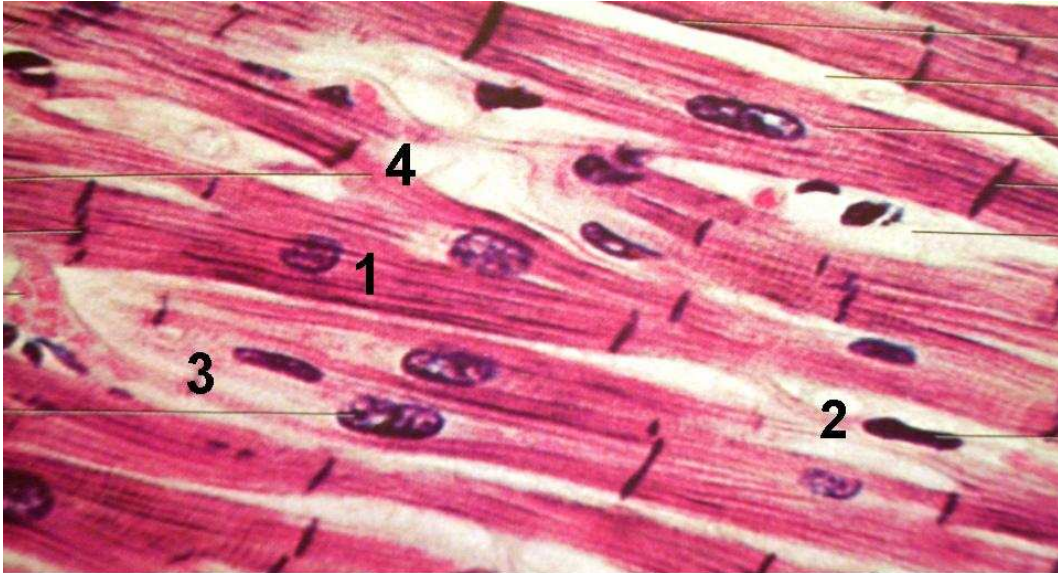


Abb.1.1: Humanes Myokard. 1 Kardiomyozyt, 2 Fibrozyt, 3 Interstitielles Bindegewebe, 4 Verzweigungen eines Kardiomyozyten. Färbung Brillantschwarz-Tuloidinblau-Safranin, Vergr. 200fach. Aus: Kühnel W, Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 11.Aufl., Thieme Stuttgart-New York, 2002.

### 1.1.3 Myokardiales Interstitium

#### 1.1.3.1 Bindegewebe

Bindegewebe oder Interzellularsubstanz bildet u.a. das Stroma von Organen. Es besteht aus zwei Komponenten: dem zellulären- und dem azellulären Anteil. Zellulärer Anteil sind fixe Zellen (Fibroblasten, Fibrozyten) und mobile Zellen (vor allem Zellen der spezifischen- und unspezifischen Abwehr), azellulärer Anteil ist die extrazelluläre Matrix (EZM), die sich wiederum in feste Bestandteile und in eine amorphe Grundsubstanz aufteilt (Drenckhahn und Kugler 1994). Die festen Bestandteile sind Fasern (kollagene Fasern, elastische Fasern), die Grundsubstanz enthält Makromoleküle wie Glykoproteine, Proteoglykane und Glukosaminoglykane sowie interstitielle Flüssigkeit (Aumailley und Gayraud 1998). Für den Turnover der Substanzen der EZM sind die fixen Zellen zuständig.





Abb.1.2: Lockeres kollagenes Bindegewebe. Mesenterium der Ratte. 1 Kollagenfaserbündel, 2: Elastische Faser, 3 Fibroblast, 4 Mastzelle. Safranin-Methylenblau-Azur-II-Färbung, Vergr. 380fach. Modifiziert nach Sobotta/Hammersen: Histologie. Farbatlas der mikroskopischen Anatomie, 3. Auflage, Urban&Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1985

### 1.1.3.2 Intramyokardiales Bindegewebe

Beim intramyokardialen Bindegewebe handelt es sich um lockeres kollagenes Bindegewebe (siehe Abb. 1.2). Dieses *Perimysium internum* spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität des Herzmuskelgewebes (Doering et al. 1988). Arbeitsphysiologisch wichtig ist die stützende Funktion der EZM und die Funktion als Wider- bzw. Gleitlager für die Kontraktion. Durch Verbindungen zu den subendokardialen- und subperikardialen Kollagenetzen wird zusätzlich eine Überdehnung des Myokards verhindert. Die Belastbarkeit der EZM wird der aktuellen Herzbelastung durch Umbau ständig angepasst (Remodeling), untergegangenes Gewebe wird durch Bindegewebe ersetzt. Nutritiv-metabolische Funktion der EZM bedeutet das Führen und Fixieren von Gefäß-Nerven-Strängen und Stoffwechsel im interstitiellen Raum. Zellmigration findet in der EZM entlang den Kollagenfasernetzen statt und Zellen oder Substrate können an EZM-Bestandteilen adhären. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das myokardiale Bindegewebe selbst Ziel von Hormonen, Zytokinen und Transmittern ist und aktiv den Gewebestoffwechsel und den Aufbau des Myokards steuert (Spinale 2002; Weber et al. 1994). Das lockere myokardiale Bindegewebe besteht zu 1/3 aus EZM und zu 2/3 aus zellulären Bestandteilen. Die Fasern der EZM umhüllen die einzelnen Kardiomyozyten und werden wie aufgeteilt in endomysiale-, perimysiale- und

epimysiale Anteile (Caulfield und Borg 1979). Die Zellen sind Fibrozyten, Fibroblasten, undifferenzierte mesenchymale Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Ferrans und Thiedemann 1983).

### **1.1.3.3 Kardiale Fibroblasten**

Obwohl der Volumenanteil der nicht vaskulären interstitiellen Zellen klein ist, liegt ihre Anzahl in der Größenordnung der Myozytenanzahl (Anversa et al. 1980; Mall et al. 1986). Der größte Anteil dieser Zellen sind Fibroblasten bzw. Fibrozyten. Der Fibroblast ist die spezifische Zelle des adulten Bindegewebes, er ist teilungsfähig und zeigt eine hohe Stoffwechselaktivität. Fibroblasten mit niedriger Stoffwechselaktivität (Erhaltungsumsatz) werden als Fibrozyten bezeichnet. Fibroblasten synthetisieren die Bestandteile der EZM, vor allem Kollagene und Elastine, aus denen die Fasern aufgebaut sind, aber auch Signalpeptide und Proteasen. Da sie sowohl den Großteil der EZM synthetisieren (Aufbau- oder Synthesystem) aber auch die Proteasen zum Abbau der EZM bereitstellen (Abbau- oder Degradationssystem), obliegt dem Fibroblasten die Kontrolle über die Beschaffenheit der EZM und damit über den Festigkeitsgrad des Gewebes sowie den allgemeinen Protein-Turnover. Fibroblasten sind über Zellausläufer miteinander verbunden, sie kommunizieren untereinander über Gap Junctions und mit der EZM über Aggregine, deren Fasern und Zellbestandteile mit Filaggreginen der Fibroblastenmembran anhaften. Bei Zugbelastung des Gewebes wird so eine Signalkaskade zum Zellkern in Gang gesetzt und der Fibroblast passt seine Syntheseleistung der jeweiligen Zug- oder Druckbelastung an. Unter Stressbedingungen können sich kardiale Fibroblasten in Myofibroblasten umwandeln („aktivierte Fibroblasten“). Myofibroblasten enthalten Stressfasern (kontraktile Bündel aus Aktin- und Myosinfilamenten) und können sich dadurch aktiv kontrahieren.

### **1.1.3.4 Kollagene Fasern**

In der EZM finden sich hauptsächlich fibrilläres Kollagen Typ I (80%) und Kollagen Typ III (20%). Weitere Kollagentypen des Herzgewebes s. Tabelle 1.1. Fibrilläre Kollagene sind aus einzelnen Tropokollagenmolekülen aufgebaut und bilden Triplehelices aus drei  $\alpha$ -Ketten, sie sind hochgradig resistent gegen Proteolyse. Durch kovalente Querbrücken der Lysinseitenketten werden einzelne Fibrillen (2 nm Durchmesser) zu 20-200 nm dicken Fasern zusammengefasst. Die Fasern unterliegen ständigen Umbauvorgängen, die durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Die Halbwertszeit der Fibrillen beträgt etwa 2-3 Tage (Drenckhahn und Kugler 1994). Fasern aus Kollagen Typ I sind besonders reißfest

und haben die geringste Elastizität (Doering et al. 1988). Die Fasern des Epimysiums, die ganze Muskelzüge wie z.B. einen Papillarmuskel einschneiden können und dem Muskel annähernd parallel anliegen, bestehen aus breiten Kollagenfasern und enthalten hauptsächlich Kollagen Typ I und wenig Elastin. Das Perimysium umgibt einzelne Gruppen von Kardiomyozyten und verbindet das Epimysium mit dem Endomysium, die Fasern liegen hier spiralig angeordnet quer zur Muskelfaser und enthalten Kollagen Typ I und wenig Kollagen Typ III. Das Endomysium verbindet einzelne Kardiomyozyten untereinander und besteht vor allem aus retikulären Fasern (Kollagen Typ III) und wenig Kollagen Typ I (Caulfield und Borg 1979). Die Kollagene I, III und IV werden von kardialen Fibroblasten synthetisiert (Agocha und Eghbali-Webb 1995).

**Tabelle 1.1: Kollagene**

<b>Fibrilläre Kollagene</b>	
Kollagen Typ I:	kollagene Fasern
Kollagen Typ III:	zusammen mit Kollagen Typ I in retikulären Fasern
Kollagen Typ V:	als Mischpolymer in Typ I- und Typ III Fibrillen
<b>nicht-fibrilläre Kollagene</b>	
Kollagen Typ VI:	als Tetramere sog. „Perlschnurfilamente“
<b>Elastin</b>	
Tropoelastin:	Mikrofibrillen-assoziiert
Desmosin/Isodesmosin:	Tropoelastin-Vernetzungen

Tab. 1.1: Kollagentypen des lockeren Bindegewebes des Menschen.  
(modifiziert nach Drenckhahn und Kugler 1994)

## 1.2 Proteasen

Proteasen bauen die EZM ab, insbesondere Kollagenfasern. Dies geschieht im Rahmen des Gewebeturnover sowie bei physiologischen Umbauprozessen von Geweben (Remodeling) wie Morphogenese und Wachstum, Angiogenese, Trophoblastimplantation, Wundheilung und Involution des postpartalen Uterus sowie der postlaktierenden Mamma. Proteasen werden je nach Lokalisation ihrer spezifischen Schnittstelle am Protein in Exopeptidasen (terminale Schnittstelle) und Endopeptidasen (interne Schnittstelle) eingeteilt (Woessner 1998). Die Endopeptidasen teilen sich aufgrund ihrer Primärstruktur, ihrer Kofaktoren und ihrer katalytischen Mechanismen in verschiedene Klassen auf: die Serin-, Zystein- und Aspartatproteasen und die Metalloproteinasen. Die Matrix Metalloproteinasen gehören

neben drei weiteren Subgruppen zur Gruppe der Metzinkine, eine von mehreren Metalloproteinase-Superfamilien (Nagase und Woessner 1999).

### **1.2.1 Matrix Metalloproteinasen (MMP)**

Der Familie der Matrix Metalloproteinasen oder Matrixine gehören z.Zt. mehr als 20 Wirbeltier-Enzyme an (siehe Tabelle 1.2), davon sind einige menschliche Homologe bekannt (Nagase und Woessner 1999, Lohi et al. 2001). Sie werden als Proform von Fibroblasten inaktiv als Zymogen sezerniert und können inaktiv in der EZM „gelagert“ werden, je nach Typ Membran-, EZM-gebunden oder frei. Der Name „Metalloproteinasen“ bedeutet, dass die Proteinasen Metallatome binden müssen, um aktiv zu sein. Sie enthalten Bindungsstellen für Zink- und/oder Calcium-Atome und entfalten ihre katalytische Aktivität nach Entfernung des N-terminalen Propeptids im neutralen pH-Bereich. Die Funktion der MMP ist der proteolytische Abbau verschiedener Proteine und Proteoglykane der EZM, außerdem haben sie Anteil an der Kollagenbiosynthese. Neuere Studien konnten zeigen, dass MMP Membran- oder EZM-gebundene Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, wachstumsfaktorbindende Proteine und Proteaseinhibitoren schneiden und damit aktivieren oder modulieren können (McCawley und Matrisian 2001; Sternlicht und Werb 2001). Die Aktivität der MMP kann auf unterschiedliche Weise und auf mehreren Ebenen reguliert werden: (i) Auf der Ebene der DNA, (ii) durch die Stabilität der mRNA, (iii) auf Proteinebene durch die Sekretion und Bindung an Strukturen, (iv) in vitro durch Reagenzien mit Thiolgruppen, (v) durch partielle und vollständige Aktivierung des Zymogens und (vi) durch Bindung und damit Inaktivierung durch endogene Inhibitoren (Nagase und Woessner 1999). Zymogene können Strukturen der EZM binden und stellen ein Reservoir dar, dass bei Bedarf schnell aktiviert werden kann (Yu et al. 2000). Bei fehlerhafter Regulation von MMP kann es zu vermehrtem Untergang von Gewebe (Überaktivierung von MMP z.B. bei chronischen Wunden oder chronischer Polyarthritits) oder Akkumulation von Kollagenen kommen (z.B. Fibrose, Vaskulopathien). MMP spielen auch bei Migrationsprozessen wie Nidation und Metastasierung von Tumoren sowie Angiogenese eine Rolle (Zucker et al. 1999). Auf Transkriptionsebene werden die meisten MMP durch verschiedenen Faktoren reguliert, bekannt ist eine Regulation durch den Transkriptionsfaktor NFκB, der Promotor verfügt über AP-1- und/oder Est-Sites (Tsuruda et al. 2004) und verschiedene regulatorische Elemente wie TRE und ERE.

**Tab. 1.2: Matrix Metalloproteinasen**

Enzym	EZM-Komponenten	Potenzielle Substrate	Andere
<b>Kollagenasen</b>			
MMP-1	Kollagen Typ I,II,III,VII,VIII, X,XI; Gelatin; Entactin;Aggrecan; Tenascin;MBP;Perlecan; IGFBP 2,3		proMMP-1,2;Kasein; a2M;a2AC;a1PI; proTNF-a
MMP-8	Kollagen Typ I,II,III;Gelatin; Entactin;Aggrecan; Tenascin		proMMP-8;a2M;a1PI
MMP-13	Kollagen Typ I,II,III,IV,IX,X,XIV; Gelatin;Entactin; Aggrecan;Tenascin; Osteonectin;Fibrinogen/Fibrin		proMMP-9,13;a2M;a2AC; PAI
<b>Gelatinasen</b>			
MMP-2	Gelatin;Elastin;Fibronectin;Laminin; Kollagen Typ I,IV, V,VII,X,XI; Aggrecan; Vitronectin;Decorin;MBP;		proMMP-1,2,13;Kasein, Plasminogen;proTNF-a; a2M; proIL-1 $\beta$ ;proTGF $\beta$ 2; FGFr1; IGFBP-3,5 a2AC;a1PI;
MMP-9	Gelatin; Elastin; Fibrillin; Fibronectin; Aggrecan; Kollagen Typ IV, V, VII, XI, XIV, XVII; Fibrinogen/Fibrin; MBP		Plasminogen; Kasein; a2M; a1PI; proTNFa; proTGF $\beta$ 2; proIL-1 $\beta$
<b>Stromelysine</b>			
MMP-3	Fibronectin;Laminin;Gelatin;Elastin; Decorin; Kollagen Typ III,IV, V, VII, IX, X, XI; Nidogen; Fibrin/Fibrinogen; Fibrillin;Entactin;Vitronectin; IGFBP-3		proMMP-1,3,7,8,9,13; Plasminogen;Kasein; a2M; a2AC;a1PI proTNF-a; E-cadherin;proIL-1 $\beta$ ; proHB-EGF
MMP-10	Fibronectin;Laminin;Gelatin;Elastin; Decorin; Kollagen Typ III,IV, V, VII, IX, X, XI; Nidogen; Fibrin/Fibrinogen; Fibrillin;Entactin;Tenascin; Aggrecan; Vitronectin		proMMP-1,8,10
MMP-11	Laminin;Fibronectin;Aggrecan; IGFBP-1		a2M; a1PI
<b>Matrilysine</b>			
MMP-7	Fibronectin;Laminin;Gelatin; Kollagen Typ IV; Aggrecan;Decorin; Nidogen;Elastin;Fibrillin; MBP;Osteonectin;Tenascin;Vitronectin		proMMP-2,7;Kasein; a1PI; pro a-Defensin;FasL; proTNF-a; Plasminogen; $\beta$ -4-Integrin; E-cadherin
MMP-26	Kollagen Typ IV; Gelatin; Fibronectin; Fibrin/Fibrinogen		proMMP-9; Kasein; a1PI
<b>Andere</b>			
MMP-12	Elastin;Fibronectin;Laminin; Fibrin/Fibrinogen		Plasminogen;Kasein
MMP-19	Kollagen Typ IV;Gelatin;Fibronectin; Tenascin; Aggrecan;COMP		
MMP-20	Amelogenin;Aggrecan;COMP		
MMP-23	Gelatin		
MMP-28	?		Kasein
<b>MT-MMP (membrane-type MMP)</b>			
MMP-14 MT-MMP-1	Kollagen Typ I,II,III;Gelatin;Nidogen; Fibronectin; Vitronectin;Laminin-1,5; Aggrecan;Tenascin; Perlecan;Fibrillin;Fibrinogen/Fibrin		proMMP-2,13;proTNFa; CD44; a2M;Gewebetansglutaminase
MMP-15 MT-MMP-2	Kollagen Typ I;Gelatin;Fibronectin; Laminin-1; Vitronectin;Aggrecan; Tenascin;Nidogen;Perlecan; Fibrinogen/Fibrin		proMMP-2; Membranständige Gewebetansglutaminase
MMP-16 MT-MMP-3	Kollagen Typ III;Gelatin;Fibronectin; Laminin-1; Vitronectin;Aggrecan		proMMP-2;Kasein
MMP-17 MT-MMP-4	Gelatin;Fibrillin;Fibronectin		proTNF-a
MMP-24 MT-MMP-5	Heparansulfat;Chondroitinsulfat; Proteoglykane; Gelatin;Fibronectin		proMMP-2
MMP-25 MT-MMP-6	Kollagen Typ IV;Gelatin;Fibronectin; Vitronectin Fibrinogen/Fibrin;		a1PI

Modifiziert nach McCauley and Matrisian 2001; Sternlicht und Werb 2001. a1PI: a1-proteinase inhibitor; a2AC: a2-Antichymotrypsin; a2M:a2-Makroglobulin; CD44: cluster of differentiation 44; COMP: cartilage oligomeric matrix protein; EGF: epithelial growth factor; FAS-L:FAS-Ligand; FGF: fibroblast-derived growth factor; IGFBP: insuline-like growth factor binding protein; IL: Interleukin; MBP: myelin basic protein; PAI: plasminogen activator inhibitor TGF: transforming growth factor; TNF: tumor necrosis factor

### 1.2.2 Struktur und Wirkungsweise von MMP

MMP werden nach strukturellen- und funktionellen Kriterien in Untergruppen eingeteilt, in die freien Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membrangebundene MMP (*membrane-type* MMP, MT-MMP), siehe Tabelle 1.2. Die Substrataffinität einiger MMP ist spezifisch. Kollagenasen sind als einzige Enzyme in der Lage native Kollagen Typ I-Helices zu schneiden (Barrett et al. 1998) und Kollagen Typ IV und denaturiertes Kollagen Typ I (Gelatin) sind spezifische Substrate der Gelatinasen. Die molekulare Struktur der MMP ist hochkonserviert, die Grundstruktur entspricht dem Aufbau einer Kollagenase aus fünf Domänen (siehe Abb. 1.3). Die verschiedenen MMP-Typen zeichnen sich durch mehr zusätzliche- oder fehlende Domänen aus. Die erste N-terminale Domäne besteht aus einer kurzen Sequenz aus hydrophoben Aminosäureresten. Sie stellt eine Signalsequenz dar, die der Sekretion in den Extrazellulärraum dient und wird durch die Sekretion verloren. Am N-terminalen Ende befindet sich bei den meisten MMP, die in einer latenten inaktiven Proform sezerniert werden, ein Propeptid aus 77-87 Aminosäureresten, in dessen Mitte eine konservierte Region aus Cysteinresten liegt. Diese Region verhindert die Interaktion des Zinkatoms mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Wenn das Propeptid aus seiner Lage entfernt wird, kann das Zinkatom mit dem aktiven Zentrum reagieren und so das Enzym aktivieren, dieser Vorgang wird als *cystein Switch* bezeichnet. Die Aktivierung von MMP geschieht in vivo durch verschiedene Aktivierungskaskaden:

(i) Plasmin-Kallikrein-System, (ii) autokatalytisch durch partiell aktive/vollständig aktive freie MMP, (iii) Bindung an MT-MMP und (iv) partielle Komplexbildung mit einem Inhibitor und MT-MMP (Itoh et al. 2001).

Mehr als durch Induktion oder Repression auf Genexpressionsebene werden die unterschiedlichen Aktivitäts- und damit Wirkungsgrade der MMP durch posttranslationale Modifizierung beeinflusst.

### 1.2.3 Kardiale MMP

Im menschlichen Herzen sind bisher folgende Mitglieder der MMP-Familie nachgewiesen worden (siehe Tab. 1.3). Neuere Studien konnten zeigen, dass MMP im Herzen teilweise auch in geringen Mengen von Kardiomyozyten synthetisiert und sezerniert werden (Coker et al. 2001).

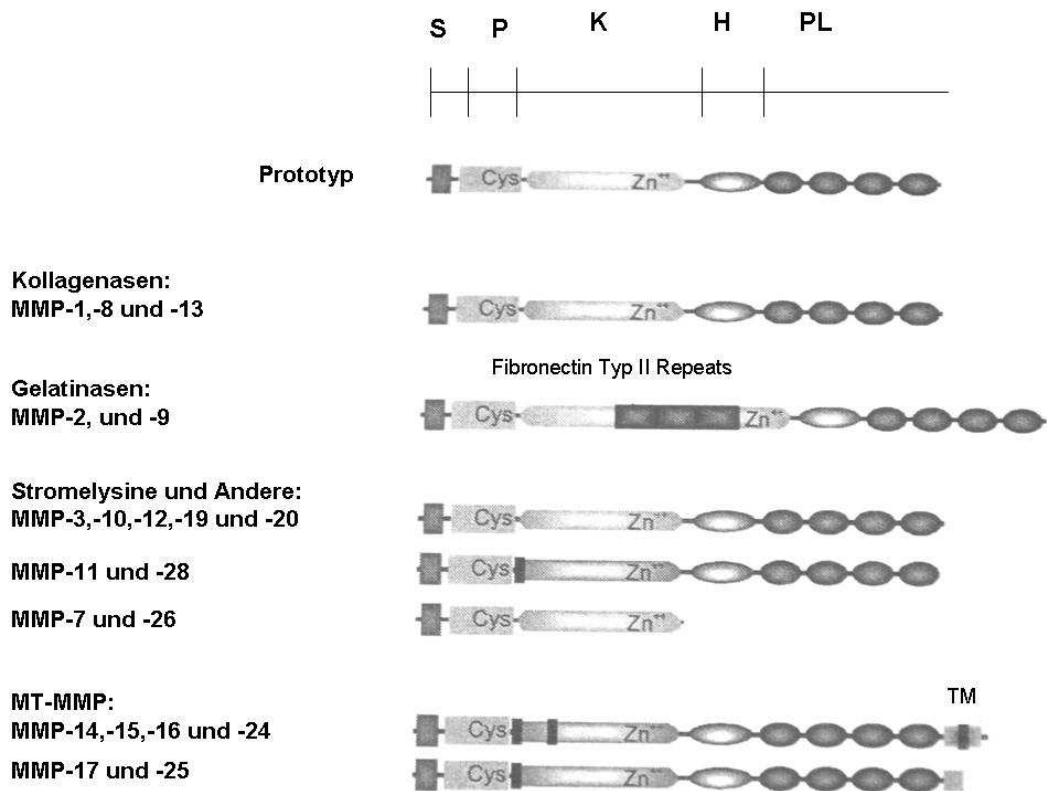


Abb. 1.3: Domänen von Matrix Metalloproteinasen. S: Signalpeptid-Prodomäne, P: Prodomäne, K: katalytische Domäne, H: Hinge (Verbindungsstück), PL: Pexin-like-Domäne, TM: Transmembrandomäne. Modifiziert nach Brinckerhoff und Matrisian, 2002.

**Tabelle 1.3: Matrix Metalloproteinasen im Säugerherzen**

<b>Kollagenasen:</b>	
	MMP-1 ( <i>interstitial collagenase</i> )
	MMP-8
	MMP-13 (Kollagenase-3)
<b>Gelatinasen:</b>	
	MMP-2 (Gelatinase-2)
	MMP-9 (Gelatinase-B)
<b>Stromelysine:</b>	
	MMP-3 (Stromelysin-3)
<b>Matrilysine:</b>	
	MMP-8
<b>Andere:</b>	
	MMP-12
<b>MT-MMP:</b>	
	MMP-14 (MT-MMP-1)

Tab. 1.3 : MMP im Säugermyokard, modifiziert nach Lindsey (Lindsey et al. 2005) und Spinale (Spinale et al. 2002a)

### 1.2.4 Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase (TIMP)

Die vier Subtypen der TIMP (TIMP 1-4) regulieren als endogene Inhibitoren die Aktivität von MMP im Gewebe. TIMP bestehen aus einer größeren N-Terminalen- und einer kleineren C-Terminalen Domäne, die durch drei Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinresten stabilisiert werden. TIMP können die meisten MMP in aktiver Form inhibieren indem sie nicht-kovalente 1:1 Komplexe mit den MMP bilden. Dabei spielt die N-terminale Domäne die entscheidende Rolle, die C-terminale Domäne allein kann die MMP nicht vollständig inaktivieren. TIMP-2 spielt zusätzlich eine Rolle in der Aktivierung von proMMP-2, indem er mit seinem N-Terminalen Ende am aktiven Zentrum von aktiviertem MT-MMP-1 bindet und mit seinem C-Terminalen Ende proMMP-2 hält (Butler et al. 1997; Itoh et al. 2001) . Dieser Komplex bewirkt eine optimale Aktivierung von proMMP durch membranständige, nicht-TIMP-gebundene aktive MMP und ist konzentrationsabhängig: in hoher Konzentration blockiert TIMP-2 alle aktiven MT-MMP-1, während in niedriger Konzentration die vermehrte Aktivierung von MMP-2 gefördert wird (Strongin et al. 1995). TIMP können nicht nur am aktivem Zentrum aktivierter MMP binden sondern auch an alternativen Bindungsstellen und so MMP nicht nur inhibieren sondern auch modulieren.

**Tab. 1.4: TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)**

Inhibitor	Größe	Lokalisation	Induktion durch:
<b>TIMP-1</b>	28 kDa	frei	TGF-β; FGF-2; EGF; TNF-a; PDGF; IL 1,6; Retinsäure; Progesteron;
<b>TIMP-2</b>	21 kDa	frei	cAMP; LPS; Retinsäure; Progesteron;
<b>TIMP-3</b>	21-24 kDa	EZM gebunden	TGF-β; PMA
<b>TIMP-4</b>	22 kDa	frei	?

Modifiziert nach Henriët et al. 1999. cAMP: *cyclic adenosine monophosphate*; EGF: *epithelial-derived growth factor*; FGF: *fibroblast-derived growth factor*; IL: Interleukin; LPS: Lipopolysaccharid; PDGF: *platelet-derived growth factor*; PMA: *phorbolic myristyl acetate* (Phorbolster); TGF: *transforming growth factor*; TNF: *tumor necrosis factor*.

### 1.3 Pathomechanismus der Herzfibrose

Wenn sich kollagenes Bindegewebe in einem Organ übermäßig vermehrt, spricht man von Fibrose. Die Fibrose kann am Anfang des Prozesses als Vergrößerung (mehr Masse) imponieren, später kann sie zur Schrumpfung und Verhärtung des Organs führen (Zirrhose) und/oder zu vermehrter Brüchigkeit mangels Elastizität. Bezogen auf die Lokalisation der Fibrose kann die lokal-begrenzte Fibrose ( z.B. Ersatz von untergegangenem Gewebe durch Bindegewebe in einer Narbe, reparative Fibrose) von der



diffusen interstitiellen Fibrose unterschieden werden. Letztere entsteht durch systemische Einwirkung eines profibrotischen Agens (Medikamente, Strahlung oder Hormone) oder durch vermehrten Druck im Organ selbst ( z.B. Leberzirrhose bei kardialer Leberstauung ). Bei der Herzfibrose handelt es sich um die interstitielle Form der Fibrose (siehe Abb. 1.4). Durch exzessive Akkumulation von Bestandteilen der EZM, vor allem Kollagen Typ I, kommt es zuerst zu vermehrter Steifigkeit und Massenzunahme der Ventrikel und damit zu einer diastolischen Insuffizienz (unzureichende Füllung des Herzens während der Diastole). Daraus resultieren Minderung des effektiven Volumenauswurfes und Rückstau vor dem Herzen. Besteht diese über längere Zeit kann es durch den auf dem Gewebe lastenden Druck zur Erweiterung der Ventrikel („Ausleihen“) und schließlich zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM) kommen, mit dem Endstadium Herzinsuffizienz. Auf zellulärer Ebene werden die einzelnen Kardiomyozyten auseinandergedrängt (Gefügedilatation), die Diffusionsstrecke von den Kapillaren zum Kardiomyozyten wird verlängert und die Kommunikation zwischen den Zellen untereinander und den Kardiomyozyten und den Fibroblasten wird gestört, was in veränderten Signalen und gestörter Reizweiterleitung gipfeln kann. Das kollagene Netzwerk verliert seine Stützfunktion während der Kontraktion und bietet weder Widerlager noch Überdehnungsschutz. Durch die veränderte Ventrikelarchitektur wird die Arbeitsbelastung der Kardiomyozyten zu hoch, sie hypertrophieren (sichtbar an Mehrkernigkeit und Größenzunahme) und bilden keine organisierte dreidimensionale Struktur mehr aus. Durch die schlechte Sauerstoffversorgung nekrotisieren einzelne Kardiomyozyten, die freien Stellen werden wiederum durch kollagenes Bindegewebe besetzt. Zu einer Herzfibrose kommt es, wenn mehr EZM produziert- als abgebaut wird. Doering et al. beobachteten eine Vermehrung und Verdickung der Kollagenfasern des Peri- und Endomysiums (Doering et al. 1988). Auch die Zusammensetzung der EZM verändert sich, es werden mehr Kollagen Typ I-Fasern gebildet und weniger Kollagen Typ III oder amorphe Grundsubstanz, was sich negativ auf die Compliance der Ventrikel auswirkt (Weber et al. 1987).

Die Ätiologie der Herzfibrose ist bislang noch nicht ausreichend geklärt, arterieller Hypertonus (Thiedemann et al. 1983), chronische Urämie (Mall et al. 1988), eine diabetische Stoffwechsellage (Baandrup et al. 1981; Factor et al. 1980) und Hypothyreose (Klein und Ojamaa 2001) werden damit assoziiert. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass nukleär agierende Hormone wie Aldosteron bei der Induktion der Fibrose möglicherweise die Hauptrolle spielen könnten (Brilla et al. 1990) und dass auch im

alternden Herzen ein Geweberemodelling im Sinne eines fibrotischen Umbaus stattfindet (Lindsey et al. 2005).

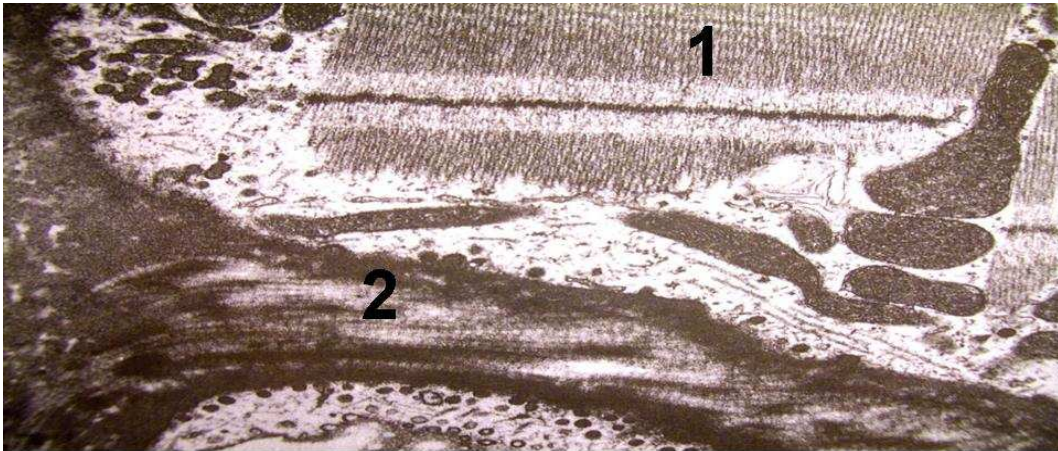


Abb.1.4: Elektronenmikroskopische Darstellung des myokardialen Interstitiums einer chronisch urämischen Ratte mit Herzfibrose (Vergr. 16900fach). Vermehrt verbreiterte Kollagenfaserbündel im Interstitium sichtbar. 1 Kardiomyozyt, 2 Kollagenfasern.

Modifiziert nach Doerr/Seifert/Uehlinger: Spezielle pathologische Anatomie, Bd.22: Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen I, Springer Berlin-Heidelberg-New York, 1993)

#### 1.4 Die Schilddrüsenhormone T3 und T4

In der Schilddrüse werden hauptsächlich die beiden Schilddrüsenhormone 3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin (T4, Thyroxin) und 3,5,3'-Triiod-L-thyronin (T3) synthetisiert. Synthese und Ausschüttung werden über einen negativen feed-back-Mechanismus auf das hypothalamisch-hypophysäre System kontrolliert. Schilddrüsenhormone werden mit Hilfe von Transportproteinen über das Blut vom Ort ihrer Sekretion zu ihrem Zielgewebe befördert. Es wird überwiegend T4 synthetisiert, welches dann im peripheren Gewebe (Niere, Leber) durch 5'-Monodeiodierung in das biologisch wesentlich aktivere T3 umgewandelt wird. Schilddrüsenhormone haben einen essentiellen Einfluss auf den Energiestoffwechsel, sie steigern den Sauerstoffverbrauch und Grundumsatz in fast allen Geweben. Sie besitzen eine Schlüsselfunktion bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, vor allem bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Schilddrüsenhormone aktivieren in der Leber die Gluconeogenese, Glycogenolyse und Lipogenese durch Induktion der jeweils beteiligten Schlüsselenzyme (Jameson und Weetman 2003). Durch die Beeinflussung zahlreicher Intermediärstoffwechselwege in vielen Organen hat die Erkrankung der Schilddrüse eine komplexe Symptomatik zur Folge: Bei Schilddrüsenüberfunktion oder Hyperthyreose mit erhöhten T4/T3-Werten im

Blut ist die allgemeine Stoffwechsellistung gesteigert, Symptome sind u.a. Gewichtsabnahme, starkes Schwitzen und Diarrhoe. Klinische Befunde sind Tachykardie mit Rhythmusstörungen, Myopathie und Hypertonie. Bei Schilddrüsenunterfunktion oder Hypothyreose klagen die Patienten über Schwäche und Müdigkeit, schlechten Appetit und Kältegefühl. Der Stoffwechsel ist allgemein verlangsamt, durch Einlagerung mukoider Substanzen erscheint die Haut verdickt (Myxödem). Die Herzaktion ist verlangsamt (Bradykardie). Das Herz ist vergrößert und weist häufig eine diastolische Insuffizienz auf. Eine myokardiale Fibrose wird selten am lebenden Patienten diagnostiziert, da die Diagnostik (Herzbiopsie) invasiv und selten gerechtfertigt ist.

#### **1.4.1 Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen**

Das T<sub>3</sub> gelangt durch membranständige T<sub>3</sub> / T<sub>4</sub>-Transporterproteine in das Zytosol der Zielzelle, von dort aus zeigt es zwei Arten der Wirkung. Zum einen eine schnelle Wirkung, bei der innerhalb von Minuten über extranukleäre Signalwege eine Regulation bewirkt wird. Hierzu gehören die Effekte auf das Mitochondrium, die über einen mitochondrialen Rezeptor vermittelt werden sowie weitere Veränderungen der intrazellulären Konzentration von Ca<sup>2+</sup> und cAMP über Wechselwirkungen mit der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Adenylatcyclase, wodurch in zwei wichtige Peptidhormon-Signalwege eingegriffen wird. Zum anderen existiert ein langsamer nukleärer Weg, über den die Schilddrüsenhormone überwiegend ihre Wirkung entfalten. Bei diesem Weg gelangt T<sub>3</sub> in den Zellkern, bindet dort an Kernrezeptoren und beeinflusst die Regulation der Genexpression. Klonierung und molekulare Charakterisierung der Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) haben zur Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von Schilddrüsenhormonen beigetragen (Weinberger et al. 1986; Sap et al. 1986). Ihre molekulare Charakterisierung ergab die Einordnung in die Steroidrezeptor –Superfamilie (dazu gehören noch die Estrogen-, Androgen-, Glukokortikoid-, Retinsäure- und Orphan-Rezeptoren mit noch unbekanntem Liganden). Die TR binden bevorzugt an Schilddrüsenhormonresponsive-Elemente (TRE) der DNA. Es existieren zwei Hauptformen der TR, TR $\alpha$  und TR $\beta$  (Lazar 1993). Im Herzen sind bisher die TR-Subtypen TR $\alpha$ 1 und TR $\beta$ 1 sowie TR $\beta$ 2 nachgewiesen worden (Sussmann 2001).

### 1.5 Reversible myokardiale Fibrose im hypothyreoten Tier

Im Tierexperiment mit hypothyreoten Ratten (Thyreodektomie oder medikamentös depletiert) wurde eine Vergrößerung des Herzens beobachtet, ähnlich wie bei hyperthyreoten Tieren. Anders als bei den hyperthyreoten Tieren handelte es sich aber nicht um eine physiologische Hypertrophie sondern um eine Zunahme des Anteils an kollagenem Bindegewebe, also um eine interstitielle Fibrose (siehe Abb. 1.5). Es zeigte sich in weiteren Experimenten, dass Schilddrüsenhormone eine regulatorische Funktion in der Kollagenproduktion in kardialen Fibroblasten wahrnehmen, indem sie die Expression des pro- $\alpha$ -1(I) Kollagen-Gens negativ regulieren (Chen et al. 2000; Klein et al. 1995). Nach Injektion von T3 wurden die Tiere im Versuch euthyreot und die Fibrose bildete sich zurück (Klein et al. 1995).

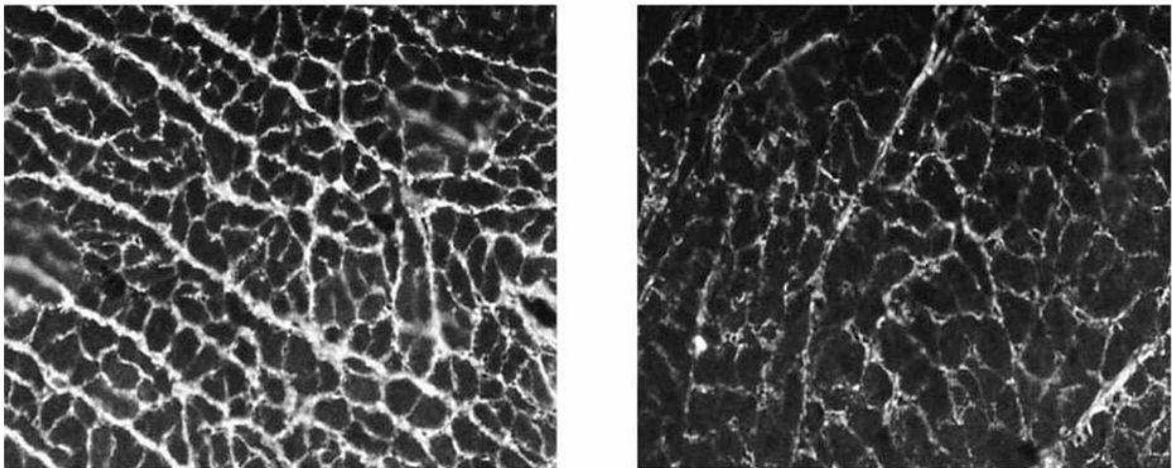


Abb. 1.5: Herzfibrose der Ratte nach Thyreodektomie. Myokardbiopsie (Immunofluoreszenz-Mikrophotographie von Gefrierschnitten (12  $\mu$ m), Vergr. 200fach). Li.: nach Thyreodektomie, Re.: nach Scheinoperation. Modifiziert nach Klein et al., 1995.

## 2 Problemstellung

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der myokardialen Fibrose bei Hypothyreose zu leisten. Die Regulation der Genexpression von Kollagen Typ I durch T3 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die von Klein et al. postulierte negative Regulation der Kollagen Typ I-Synthese (Klein et al. 1995) durch T3 würde im Umkehrschluss die vermehrte Deposition von Kollagen Typ I im Myokard bei hypothyreoter Stoffwechsellaage erklären, nicht aber die ausbleibende Degradation, die erst nach T3-Stimulation wieder einsetzte. Andere Autoren konnten im Gegensatz dazu *in vitro* eine vermehrte Kollagensynthese in Fibroblasten nach T3-Behandlung zeigen (Ziegelhöffner-Mihalovičová et al. 2003).

Da es sich bei gesundem Herzgewebe um Gewebe unter euthyreoten Bedingungen handelt, stehen Synthese und Abbau der EZM im Gleichgewicht. Bei der hypothyreoten Myokardfibrose wird von einer Dysbalance von Synthese und Degradation ausgegangen, da eine zu erwartende Regulation der MMP-Aktivität durch T3 ausbleibt. Karim et al. konnten wie auch Ziegelhöffner-Mihalovičová et al. zeigen, dass bei hyperthyreoten Ratten, denen über einen längeren Zeitraum L-Thyroxin injiziert worden war, eine verstärkte Kollagen Typ I-Synthese stattfand (Ziegelhöffner-Mihalovičová et al. 2003), aber ohne resultierende Akkumulation von Kollagen im Sinne einer physiologischen Hypertrophie (Karim et al. 1999), Yao und Eghbali zeigten dies bereits auf zellulärer Ebene an kardialen Fibroblasten *in vitro* (Yao and Eghbali 1992).

Als Ziel einer Regulation durch T3 eignet sich der kardiale Fibroblast. Fibroblasten exprimieren TR (Hayashi Y 1993) und sind verantwortlich für die Synthese von Kollagen und den größten Anteil der MMP. T3 reguliert die Aktivität des pro- $\alpha$ -1(I) Kollagen-Gen-Promotors in kardialen Fibroblasten über ein AP-1-responsives Element (Lee et al. 1998); es wäre vorstellbar dass T3 gleichsinnig über AP-1 die MMP-Synthese positiv regulieren könnte und im Falle der Hypothyreose beide Stimulationen nicht stattfinden könnten. Responsive Elemente für Schilddrüsenhormone (TRE) wurden im Promotor des Gens für MMP-11 (Ludwig et al. 2000), MMP-9 und -13 identifiziert (Pereira et al. 1999). Für TIMP-1 und TIMP-2 (Ziegelhöffner-Mihalovičová et al. 2003) wurde eine Regulation durch T3 in der Literatur erwähnt, aber bisher wurden keine Veränderungen der Genexpression oder der Aktivität von MMP im Herzen durch T3 beschrieben.

Im Vergleich mit T3 wird der Effekt von Glukokortikoiden und anderen Steroidhormonen untersucht, da ihre Rezeptoren der Steroidrezeptoren-Superfamilie angehören und ein

ähnlicher Wirkmechanismus erwartet wird. Wie für T3 wurde auch für sie eine Regulation von MMP in der Literatur beschrieben: Glukokortikoide regulieren die Genexpression von MMP über Glukokortikoidrezeptoren (GR) durch DNA-Bindung oder via Transkriptionsfaktoren wie AP-1 bei MMP-3 und MMP-13 (Tuckermann et al. 1999) oder NFκB oder ETS bei MMP-9 (Eberhardt et al. 2002) in Fibroblasten. Estrogen beeinflusst die Genexpression von MMP-2 in Epithelzellen (Marin-Castaño et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit soll die Auswirkung der Behandlung von kultivierten adulten Herzfibroblasten mit T3, Glukokortikoiden und Steroidhormonen auf die Genexpression und Aktivität von MMP und deren Gegenspieler TIMP im Herzen untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Pipettenspitzen in autoklavierten Gefäßen durchgeführt, als Wasser wurde Aqua dest. VE (voll entsalzt) aus einer Filteranlage mit Ionenaustauschsäule (Millipore) verwendet. Alle angewandten Chemikalien wurden nach den jeweiligen aktuellen Vorschriften des Herstellers behandelt und dementsprechend entsorgt. Dabei wurden alle relevanten R- und S-Sätze beachtet und die organischen Lösungsmittel in entsprechende Sammelbehälter nach Schadstoffkategorie getrennt entsorgt. Beim Arbeiten mit biologischem Zellmaterial der Sicherheitsstufe 1 sind ebenfalls die aktuellen Vorschriften eingehalten worden.

BioRad, München:	BioRad Proteinassay, Ponceau-Rot
Gibco, New York:	Gefriermedium, HEPES Solution 1M
Merck, Darmstadt:	Aceton, Calciumchlorid-2-hydrat kristal. $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Chloroform, Ethanol, Isopropylalkohol, 2-Mercaptoethanol, $\text{ZnCl}_3$
Pharmacia, Freiburg:	TEMED plus one
Roth, Karlsruhe:	Rotiphorese Gel 30:Acrylamide 30 %/Bisacrylamide 0,8 %; Glycin, Trockenmilchpulver Art. T145.2
Serva, Bergneustadt:	BSA:Albuminfraktion V 11926, Dodecylsulfate Na-salt; TWEEN x100
Sigma, Steinheim:	EDTA, Trizma Base, Triton x-100; Collagene Type I Solution calf origin 0,1 % in 0,1 acetic acid, Gelatin Type A from porcine skin bloom 175

#### 3.1.1.1 Reaktionsgefäße und Pipetten

Küvetten:	Plastibrand 1,5ml Fa. Brand, UVetten 220-1600nm Fa. Eppendorf
Pipetten:	Fa. Eppendorf, Fa. Gilson

Pipettenspitzen: Fa. Eppendorf  
Reagenzglasständer: Fa. Falcon  
Reaktionsgefäße: 1,5 ml und 2 ml Fa. Eppendorf, 10 ml Fa Falcon,  
Fa. Sarstedt;

### **3.1.1.2 Membranen und Fertiggele**

Kaseingele: Novex pre-cast gels Fa. Invitrogen, Paisley, Schottland  
Membran: Protran Nitrocellulose transfer membrane,  
Fa. Schleicher&Schuell  
Filterpapier: Fa. Whatman

### **3.1.1.3 Molekulargewichtsmarker**

Precision Plus Protein Standards, All Blue, Katalognummer 161-0373, Fa. Biorad, 2000  
Alfred Noble Dr., Hercules, CA 94547

### **3.1.2 Geräte**

Densitometer: BioDocAnalyze, BDA digital, Fa. Biometra  
Folienschweißgerät: Severin Folio, Fa. Severin  
Generatoren: Power Pac P25 und 300, Fa. BioRad; 2301 Macrodrive 1 Power  
Supply, Fa. LKB Bromma; Laboratory Power Supply PS 303  
Pro, Fa. Voltcraft  
Heizblöcke: Thermomixer 5436 und Thermostat 3401, Fa. Eppendorf  
Homogenisator: UltraThurrax Polytron, Fa. Kinematica, Schweiz  
Magnetrührer: Hotplate Magnetic Stirrer, Fa. Cenco Geschardt  
Mikrowelle: microwave 2000, Fa. TEC  
pH-Meter: research digital ionizer 501, Fa. Orion  
Präzisionswaage: Fa. Sauter  
Schüttler: GFL 311, Fa. Edmund Bühler; Schüttelmaschine LS10,  
Fa. Geschardt; logic shaker, Fa. NeoLab  
Thermocycler: LightCycler, Fa. Roche  
Vortex: Minishaker, Fa. IKA; Reaxx 2000, Fa. Heidolph  
Waage: PM 300, Fa. Mettler



Wasserbad: Fa. GFL  
Zentrifugen: Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D und Kühlzentrifuge  
Centrifuge 5402, Fa. Eppendorf; Zentrifuge Universal  
32, Fa. Hettick Zentrifugen

### **3.1.3 Zellkultur**

Kamera: Kamedia C 4040 Zoom, Fa. Olympus  
Mikroskop: Phasenkontrastmikroskop, Fa. Olympus  
Zellplatten und Röhrchen: Fa. Falcon  
Zellkulturflaschen: Cell Star T175/T75, Fa. Greiner Bio-One  
Zentrifuge: GL, Fa. Heraeus Christ

#### **3.1.3.1 Zellen**

Primäre kardiale Fibroblasten von gesunden adulten Schweinen;  
Zelllinie L6, Skelettmuskelzellen (Myoblasten) von der Ratte

### **3.1.4 Antikörper**

Anti-MMP-13: Rabbit Anti-MMP-13[Collagenase-3], C-terminal Polyclonal Antibody,  
Katalognummer AB19056, Lot-Nummer 20021257, Fa. Chemicon international inc.,  
28820 Single Oak Drive, Temecula, CA 92590

Anti-MMP-14: Mouse Anti-Human-MT1-MMP Monoclonal Antibody, Katalognummer  
MAB3317, Lot-Nummer 23100185, Fa. Chemicon international inc., 28820 Single Oak  
Drive, Temecula, CA 92590

Anti-TIMP-1: Mouse Anti-Bovine TIMP-1 Monoclonal Antibody, Katalognummer  
MAB3300, Lot-Nummer 21070562, Fa. Chemicon international inc., 28820 Single Oak  
Drive, Temecula, CA 92590

RP-konjugierter Antikörper: Peroxidase-conjugated AffiniPure Sheep Anti-Mouse IgG  
(H+L), Codenummer 515-035-003, Lot-Nummer 55621, Fa. Jackson ImmunoResearch  
Laboratories inc., dianova Forschungsreagenzien, Mittelweg 176, 20148 Hamburg, DE

### 3.1.5 Primer

Zielgene	PCR-Produktlänge (bp)	5'→3'	Primer Sequenz	Genbank accession no
GSa	210	forward reverse	AAGCAGGATGACTACGTGCC CATGTTGTAGCTGCTGCTGG	NM_214312
MMP-1	187	forward reverse	GCGCACAAATTCCTTCTACC TGTGGATGTCCTTGGGGTAT	X54724
MMP-2	139	forward reverse	GTAACCTGTTCGTGCTGAAGG GTTGTAATTGGCCACGTCG	NM_214192
MMP-3	241	forward reverse	TGTGGAGTTCCTGATGTTGG CTGAAGTCTCCGTGTTCTCG	AF201725
MMP-13	149	forward reverse	GGCCATTCCCTTAGGTCTTGA GTTGGGGTCTTCATCTCTCG	AF069643
MT1-MMP	227	forward reverse	GGGCTGCAGAAACTCTTGAC TCCTGTTCCCTCTGACTGCT	NM_214239
TIMP-1	189	forward reverse	ACTCCGACCTTGTCATCAGG TGGGACCTGTGGAAGTATCC	AF156029
TIMP-2	185	forward reverse	AGGAGTACCTCATCGCAGGA CCGGAGAGGAGATGTAGCAG	AF156030
TIMP-3	239	forward reverse	CTGACAGGCCGTGTCTATGA GGCGTAGTGTGGACTGGT	AF156031
TIMP-4	184	forward reverse	GAGCCCTGGGAGAACCTATC ACATAATGCTGGGCCTGGTA	AF156032

### 3.1.6 Positivkontrollen

Positivkontrolle für MMP-1, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2: Positive Control for Type-I Collagenase (Interstitial Collagenase; MMP-1), Stromelysin-1 (MMP-3), TIMP-1 and TIMP-2, Katalognummer AG770, Lot-Nummer 21042035, Fa. Chemicon international inc., 28820 Single Oak Drive, Temecula, CA 92590.

Positivkontrolle für MMP-2 und MMP-9: Positive Control for Gelatinase A and Gelatinase B, Katalognummer AG771, Lot-Nummer 21100792, Fa. Chemicon international inc., 28820 Single Oak Drive, Temecula, CA 92590.

### 3.1.7 Zusammensetzung von Medien, Lösungen und Puffern

#### Medien

Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM) mit 2 mM Glutamin (Gibco), 10% v/v fetales Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), 100 IU/mL Penicillin, 100 IU/mL Streptomycin (Gibco, Grant Island, New York).

#### Lösungen

Blocklösung:

BSA	100 mg (0,5%)
Milchpulver	400 mg (2%)

ad 20 ml TBS+Tween 0,1%-Waschpuffer

#### Celsior-Lösung:

Mannitol 60 mM, Laktobionsäure 70 mM, Glutamat 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 13 mM, NaOH 100 mM, Histidin 30 mM, Glutathion (reduziert) 3 mM, BDM 20 mM, pH 7,3

Coomassie Blau-Färbungslösung:

0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250	1 g
0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G	250 mg
50% (v/v) Methanol	250 ml
10% (v/v) Eisessig	50 ml

ad 500 ml Aqua dest.

Entfärbelösung:

50 % Methanol	250 ml
10 % Eisessig	50 ml

ad 500 ml Aqua dest.

#### PCR-Lösungen:

DEPC: H<sub>2</sub>O, 0,1 % Diethylpyrocarbonat

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit, Firma Roche

TriZol Reagenz; Firma Invitrogen

PCR-Kit, Firma Invitrogen

#### Tyrode-Lösung:

NaCl 120 mM, KCl 3,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, Glukose 11,1 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4

#### Puffer

Aktivierungspuffer: Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 µM, HEPES 20 mM, pH 7,45

Elektrophoresepuffer (10x Stammlösung): Tris 30 g (25 mM)  
Glycin 144 g (0,2 M)  
ad 1 l Aqua dest.

Elektrophoresepuffer („Laufpuffer“): Elektrophoresepuffer 10x Stammlösung: 100 ml  
SDS 20% 5 ml  
ad 1 l Aqua dest.

PBS: KH<sup>2</sup>PO<sub>4</sub> 4 mM, NaH<sup>2</sup>PO<sub>4</sub> 6 mM, NaCl<sup>-</sup> 115 mM, pH 7.2

Probenpuffer („sample buffer -“): SDS 20 % 0,5 ml (1 %)  
Sammelgelpuffer (pH 6,8) 1,25 ml  
Glyzerin 50 % 4 ml (20 %)  
ad 10 ml Aqua dest.

Probenpuffer mit Mercaptoethanol („sample buffer +“):  
SDS 20 % 0,5 ml (1 %)  
Sammelgelpuffer (pH 6,8) 1,25 ml  
Mercaptoethanol 0,2 ml (2 %)  
Glyzerin 50 % 4 ml (20 %)  
ad 10 ml Aqua dest.

Sammelgelpuffer (pH 6,8): Tris (0,5 M) 6,06 g  
SDS 20 % 2 ml  
ad 100 ml Aqua dest.

TBS-Waschpuffer 10x : Tris 42,2 g  
NaCl 80 g  
ad 1 l Aqua dest.

TBS+Tween 0,1 %-Waschpuffer 1x: 100 ml 10x TBS-Waschpuffer und 5 ml Tween 20 %

Trenngelpuffer (pH 8,8): Tris (1,5 M) 18,17 g  
SDS 20 % 2 ml  
ad 100 ml Aqua dest.

<u>Tris-Glyzerin-Puffer:</u>	Tris 0,5 M	1ml(40 mM)
	<u>Glyzerin 50 %</u>	<u>1 ml(10 %)</u>
		ad 10 ml Aqua dest.

### 3.1.8 Stimulatoren

#### Dexamethason

Mit Dexamethason (Firma Sigma, D4902 ) wurde mit DMSO eine 10 mM Stammlösung angesetzt und als 0.5 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde mit Wasser (steril) auf eine 100 nM Arbeitslösung verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### $\beta$ -Estradiol

Mit  $\beta$ -Estradiol (Firma Sigma, Katalognummer E2257) wurde mit 100 % Ethanol eine 1 mM Stammlösung angesetzt und als 0.5 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde mit Wasser (steril) auf eine 100 nM Arbeitslösung verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### Testosteron

Mit Testosteron (Firma Sigma, Katalognummer T1500) wurde mit DMSO eine 100  $\mu\text{M}$  Stammlösung angesetzt und als 0.5 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde mit Wasser (steril) auf eine 100 nM Arbeitslösung verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  (Firma Roche, Katalognummer 1271-156) wurde als Aliquot mit einer Konzentration von 10 ng/ml in DMSO bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 3,5,3'-Triiod-L-thyronin (T3)

3,5,3'-Triiod-L-thyronin (Firma Sigma, Katalognummer T2752) wurde als eine 10 mM Stammlösung mit DMSO angesetzt und als 0.5 ml Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Stammlösung wurde mit Wasser (steril) auf eine 100 nM Arbeitslösung verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.1.9 Tiere

Ausgewachsene 25 kg schwere männliche und weibliche Schweine *suis scrofa* aus Stallhaltung, Schlachthof Fülcher Fleisch KG Seestermühle. Eine Genehmigung durch eine Ethikkommission war nicht nötig, da keine in vivo-Versuche gemacht wurden und es sich bei den Tieren um Schlachtvieh handelte.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Zellkulturmodell**

Für die Experimente wurde ein Modell aus primären kardialen Fibroblasten vom Schwein entwickelt. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen auf einer sterilen Werkbank (Heraeus, Hanau) statt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (Heraeus B 5060 EC CO<sub>2</sub>). Die verwendeten Medien und Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C temperiert. Das verwendete Zellkulturmedium war Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), zur Anzucht der Zellen wurde 10% fetales Kälberserum zugegeben. Die Zellen wurden je nach Zelldichte passagiert. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und kurz mit Trypsin-EDTA (Gibco) inkubiert. Danach erfolgte die Abnahme der Trypsin-EDTA-Lösung und die Inkubation der Zellen für 5-10 min bei 37°C im Brutschrank. Durch Klopfen lösten sich die Zellen von der Zellkulturflasche und konnten im Zellkulturmedium resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und Ausplattierung der Zellen für die Kultur mit einer Zelldichte von 2-3 x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

#### **3.2.1.2 Zellpräparation**

Schweineherzen wurden dem noch lebenden Tier in CO<sub>2</sub>-Narkose während der Schlachtung entnommen und sofort in einen Beutel mit steriler eisgekühlter Tyrode-Lösung überführt. Nach zweimaligem Waschen des Organs mit eiskalter Tyrode-Lösung wurde das blutfreie Herz im Beutel auf Eis gelagert und die LAD mit 2 l eisgekühltem sterilem Tyrode-Puffer unter Druck perfundiert, bis das Gefäßsystem blutfrei war. Danach wurde das Organ im Beutel mit eiskalter steriler Celsior-Lösung auf Eis in das Labor gebracht (1 h) und auf einer sterilen Werkbank präpariert. Dazu wurde der linke Ventrikel ausgeschnitten und das Endokard entfernt. Kleine Gewebeblöcke (0,5 x 0,5 cm) wurden mit dem Skalpell entnommen und in Petrischalen mit Medium aufgenommen. In den Schalen wurden die Blöcke mit einem scharfen Haken mechanisch zerkleinert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop war danach ein Zellgemisch aus einzelnen vitalen Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, Blutzellen und Zellklumpen zu sehen. Kardiomyozyten wurden frisch im Medium verwendet oder maximal 24 h in

Zellkulturflaschen gehalten. Durch 30 min Trypsinverdau (0,3 mg/ml) wurden die Fibroblasten von den Kardiomyozyten, durch Waschen mit Medium von den Blutzellen getrennt und in frischem Kulturmedium (DMEM + 10% v/v FCS) aufgenommen. Nach einer Passage wurden die Zellen in Gefriermedium (Gibco) eingefroren und für die Experimente wiederum aufgetaut und ausgesät ( $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ). Per Sichtkontrolle (Phasenkontrastmikroskop) und Immunhistochemie (Vimentinnachweis) wurden die Fibroblasten identifiziert.

### **3.2.1.3 Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten**

Die primären kardialen Fibroblasten wurden in Medium (DMEM) mit 10% v/v FCS, 2 mM Glutamin (Gibco) und 100 IU/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (PenStrep, Gibco) im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert (Aussaat  $5 \times 10^3$  Zellen /  $\text{cm}^2$ ). Für die Experimente wurden die konfluenten Zellen in 75-T Zellkulturflaschen ausgesät und in serumfreiem Medium nach der Methode von Goto et al. gehalten (Goto et al. 1998). Für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h (4 Tage) wurden die Zellen mit T3, Dexamethason oder anderen Steroidhormonen (Testosteron oder Estrogen) mit einer Konzentration von 100 nM im Medium stimuliert oder nur mit Medium versorgt (Kontrollgruppe) und danach geerntet und aufbereitet (mRNA-Extraktion und Zellhomogenat). Das Medium wurde jedes Mal entnommen und aufbereitet (Konditioniertes Medium). Bei jedem Experiment wurden die Zellen aus drei Kulturflaschen gepoolt und jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt. Zusätzlich wurde noch eine Versuchsreihe mit dem Zytokin TNF $\alpha$  durchgeführt, bei dem die Zellen 24 h mit TNF $\alpha$  (10 ng in DMSO) im Medium stimuliert wurden.

## **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.2.1 Quantitative (real-time) PCR (Polymerase Kettenreaktion)**

#### **3.2.2.1.1 RNA-Extraktion / Quantifizierung**

Zur Gewinnung der RNA aus dem Gewebepulver wurde das TriZol® (Invitrogen) Reagenz verwendet. Durchführung (auf Eis) nach Angaben des Herstellers: 100 mg Gewebepulver wurde in 2 ml TriZol® aufgenommen und 2 x 20 sec im UltraThurrax® zerkleinert. Durch 15faches Aufnehmen durch eine 9 µm Nadelspitze (einsaugen und ausspritzen) wurde der Zerkleinerungsprozess weiter fortgesetzt. Das Homogenat wurde dann mit 400 µl Chloroform versetzt und 15 sec mit dem Vortex geschüttelt. Nach Inkubation bei

Raumtemperatur für 2-3 min wurde es für 15 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Isopropylalkohol vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 15 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugiert. Die RNA, die sich dabei als Pellet abgesetzt hatte, wurde mit 75% Ethanol gewaschen und erneut 5 min bei 4°C mit 12.000 g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in DEPC gelöst. Die Quantifizierungsmessung wurde mit dem Eppendorf Photometer durchgeführt. Die RNA wurde in einem Verhältnis von 1:99 verdünnt und bei 260 nm gemessen. Es konnten zwischen 10-60 µg RNA je nach Gewebe isoliert werden. Die RNA-Gelelektrophorese wurde als Qualitätskontrolle durchgeführt.

#### **3.2.2.1.2 RNA-cDNA Umschreibung**

1µg RNA wurde mit Wasser auf insgesamt 17 µl aufgefüllt. Dann wurden 1µl dN6 – und 1µl dT – Primer dazugegeben und das Gemisch wurde 10 min bei 70°C inkubiert. Abgekühlt wurde das Gemisch auf Eis, um einen vorzeitigen Beginn der Reaktion zu verhindern. Dann wurden 5x first strand buffer, 0,1 M DTT und reverse Transkriptase aus dem PCR-Kit von Invitrogen und der dNTP- Mix aller vier Nukleinsäuren dazugegeben und das Ganze für 60 min bei 42°C inkubiert.

#### **3.2.2.1.3 LightCycler- Reaktionsaufbau**

Vor dem Start der Reaktion muss für jede Kapillare ein Reaktionsgemisch hergestellt werden (siehe Lösungen). Negativproben, das heißt Kapillaren mit Reaktionsgemisch ohne die zu vervielfältigende cDNA oder ohne Primer, wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Die quantitative real-time RT-PCR am Roche LightCycler besteht aus mehreren Phasen. In der ersten Phase wird das Reaktionsgemisch initial auf 95°C erhitzt. Dabei zerfallen sämtliche Dimere, seien sie aus RNA oder DNA und die Primer können sich an jeden DNA-Einzelstrang anlagern. Anschließend wird in der zweiten Phase in mehreren Wiederholungen die PCR durchgeführt. Die drei sich wiederholenden Temperaturschritte sind die der klassische PCR, allerdings mit leicht abgewandelten Temperaturen den Eigenschaften der verwendeten Primern nachempfunden. Annealing bei 57-59°C, Elongation bei 72°C, Denaturierung bei 95°C. In Phase drei wird das Reaktionsgemisch kontinuierlich wieder auf 95°C erhitzt und dabei durchgehend die Fluoreszenz des Farbstoffs SYBRGreen gemessen. Dieser bindet an Doppelstrang- DNA und fluoresziert nur im gebundenen Zustand. Gebundenes SYBRGreen erhöht also die Fluoreszenz der Kapillare. Wird während des Schmelzvorgangs in Phase drei ein Fluoreszenzabfall



gemessen, so lässt das deshalb auf das Vorhandensein einer gewissen Menge an Doppelstrang-DNA einer bestimmten Größe schließen, die in diesem Moment gerade denaturiert wurde. In dieser Phase drei kann so die so genannte Schmelzkurve aufgezeichnet werden. Anschließend folgt in Phase vier die Abkühlung auf Raumtemperatur.

### **3.2.3 Protein-chemische Methoden**

#### **3.2.3.1 Präparation von Gewebeproben**

Frisches Gewebe aus dem linken Ventrikel und aus der Leber wurde aus kleinen Gewebeblöcken (0,5 x 0,5 cm) wie oben beschrieben gewonnen. Als Vergleichsgewebe mit hohem MMP-Gehalt wurden die Lebern der gleichen Schlachtschweine entnommen wie die Herzen und steril auf Eis ins Labor transportiert (1 h). Die Gewebeblöcke wurden in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert und im Stickstofftank tiefgefroren (-169°C)

#### **3.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebehomogenaten**

Gewebepulver vom linken Ventrikel und der Leber wurden aus dem Stickstofftank genommen, abgewogen und 1:3 w/v mit Probenpuffer vermischt und 15 sec auf Eis homogenisiert (UltraThurrax, 20.5000 rpm). In der Kühlzentrifuge wurden die Proben vom anschließend 30 min bei 4°C mit 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

#### **3.2.3.3 Proteinpräparation aus Zellen**

Kardiale Fibroblasten: Die T75-Zellkulturflasche mit adhärennten Fibroblasten wurde nach Absaugen des Mediums auf Eis gelagert und die Zellen zweimal mit PBS-Lösung gewaschen. Nach Absaugen der PBS-Lösung wurden die Zellen mit 0,5 ml Tris-Glycerin-Puffer mit einem Cellscrapper geerntet und für 30 min bei -80°C eingefroren, um die Zellmembranen zu zerstören. Mit dem UltraThurrax wurden die Zellen 2 x 30 sec auf Eis bei 20.5000 rpm homogenisiert und danach 30 min bei 4°C mit 1.000 g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

Kardiomyozyten: frisch präparierte Kardiomyozyten in Medium wurden bei Raumtemperatur 10 min bei 1.000 g runterzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet (Zellen) wurde auf Eis gelagert, in 1ml Probenpuffer aufgenommen und resuspendiert. Dann wurden sie wie oben beschrieben homogenisiert und zentrifugiert. Der

Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

#### **3.2.3.4 Konditioniertes Medium**

Konditioniertes Medium (KM, *conditioned media*) ist das Zellkulturmedium, welches von den Zellen „konditioniert“ wurde, d.h. Medium mit den sezernierten Produkten und Stoffwechselmetaboliten der in ihm lebenden Zellen. Während eines dreitägigen Experimentes wurde täglich das Medium der Zellen (DMEM unter serumfreien Bedingungen), bei der Kontrollgruppe und der stimulierten Gruppe, entnommen (12 ml pro Kulturflasche) und 30 min bei 4°C mit 2.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und auf Eis gelagert, das Pellet (Zelldetritus) wurde verworfen. Vom Überstand wurde jeweils ein Aliquot von 2 ml entnommen und unbehandelt bei -80°C eingefroren. 10 ml wurden mit 40 ml (1:4 v/v) eiskaltem Aceton aufgefüllt und über Nacht bei -20°C gelagert, um die Proteine auszufällen. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min bei 4°C mit 2.500 g) pelletiert; der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde 15 min unter dem Abzug bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann auf Eis mit 0,5 ml eiskaltem Probenpuffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Auf diese Weise wurde das KM 20fach konzentriert. Vor Verwendung wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Der Proteingehalt im KM wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt, dazu wurde das auf Eis aufgetaute unkonzentrierte Aliquot benutzt.

KM von L6-Zellen (Rattenskelettmuskelzellen) wurde konzentriert als Positivkontrolle und im Gel und bei der Reversen Zymographie benutzt. Die Zellen nahmen nicht am Experiment teil und dienten nur der Gewinnung von MMP-2.

#### **3.2.3.5 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen zu einem Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 595 nm hat und so vom ungebundenen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 465 nm unterschieden werden kann. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad Proteinassay. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA). Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden 100 µl des Mediums in 300 µl Aqua dest. aufgenommen und mit 100 µL Proteinassay-Puffer bei Raumtemperatur 10 min inkubiert.

Die Proben wurden anschließend in einem Photometer bei 595 nm gemessen. Als Referenz zur Berechnung der OD-Werte diente ein proteinfreier Ansatz. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde eine Eichkurve mit BSA hergestellt, an welcher die Proteinmengen abgelesen werden konnten.

### **3.2.3.6 SDS-PAGE (SDS-Gelelektrophorese)**

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) werden Proteine unter denaturierenden- und reduzierenden Bedingungen im Polymer-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Denaturierung lösen sich Proteinbindungen auf und das Protein liegt in seiner Primärstruktur vor, durch das negativ-geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung der Proteine maskiert, so dass die Trennung nach Größe der Proteine erfolgt. Im elektrischen Feld mit hoher Spannung wandern die Proteine von der Anode zur Kathode, die kleinsten Proteine wandern am schnellsten. Dazu wurden die Proteinproben auf Eis aufgetaut und je Probe 1 µg – 10 µg Protein mit 0,01% Bromphenol Blue (Load Mix, BioRad, München) vermischt und mit Probenpuffer mit 2% Mercaptoethanol auf 22,5 µl aufgefüllt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben für 10 min im Heizblock bei 95°C denaturiert und direkt in die Taschen des Gels gegeben. Das Gel, bestehend aus einem 4%igen Polyacrylamid (PAA)-Sammelgel und einem 7,5%igen PAA- Trenngel wurde vorher aus 30% Acrylamid, 50% Glycerin, Tris-Gelpuffer, TEMED und 10% APS hergestellt und in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer (Doppelkammer, Biometra, Göttingen) eingespannt. Nach Beladung des Gels mit den Proben und 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers wurden die Proteine 30 min bei 90 V und 1 h bei 120 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und direkt in die Farblösung Coomassie Blue überführt. Nach 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler hatte das Gel die Farbe vollständig angenommen und wurde über Nacht im geschlossenen Gefäß auf dem Schüttler entfärbt. Durch die Färbung und Entfärbung werden die Proteine fixiert und stellen sich im klaren Gel als blaue Banden dar. Zur Aufbewahrung wurden die Gele eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

### **3.2.3.7 Zymographie**

Die (Substrat-) Zymographie ist ein Verfahren zum Nachweis proteolytischer Aktivität von Proteasen. Zuerst werden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, wobei die SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wird. Das heißt ohne den

Zusatz von Mercaptoethanol zur Probe und ohne Erhitzen, die Denaturierung erfolgt ausschließlich durch das SDS. Bei Herstellung des Gels wird dem Gel aber ein Substrat der Protease zugesetzt, welches sich gleichmäßig im Gel verteilt und der Protease als in situ-Substrat zur Verfügung steht. Nach der SDS-PAGE wird das SDS in zwei Waschgängen mit einem Detergenz ohne eigene Ladung (Triton X-100) aus dem Gel gewaschen, da SDS als reversibler Inhibitor die Proteasen in ihrer Struktur zwar schützt, ihre Aktivität aber blockieren würde. Die so renaturierten Proteasen können nach dem Waschen in einem Aktivierungspuffer mit neutralem pH und den benötigten Metallionen über Nacht eingelegt- und so aktiviert werden. Wenn die Proteasen aktiv sind, prozessieren sie das Substrat an der Stelle im Gel an der sie nach der Auftrennung fixiert wurden. Danach wird das Gel mit Coomassie Blau gefärbt und das gesamte Gel wird durch das Substrat homogen gefärbt. An den Stellen an denen proteolytische Aktivität stattgefunden hat sind klare Banden zu sehen, da das Substrat dort die Farbe nicht mehr binden kann. Vorteile der Methode sind die Lösung von MMP-TIMP-Komplexen und die gleichzeitige Aktivierung von Zymogen und aktiver Form der MMP durch den Denaturations-Renaturations-Prozess, die anhand unterschiedlicher Molekulargewichte unterschieden werden können. Zum Beweis, dass es sich im Zymogramm um MMP handelt, kann ein Teil eines Gel-Duplikates mit 100 mM EDTA inkubiert werden. EDTA hemmt Metalloproteinasen durch Entzug der Metallionen.

#### **3.2.3.7.1 Gelatin-Zymographie**

Gelatin-Zymographie zeigt Gelatinase-Aktivität an und diente der Untersuchung der Aktivität von MMP-2 nach Behandlung. Nach der Methode von Hawkes et al. (Hawkes et al. 2001) wurde ein Minigel mit 7,5% PAA-Trenngel hergestellt. Zuerst wurden die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen werden sollte, mit 70% Ethanol entfettet. Dann wurden sie aneinandergelegt, mit einer Gummidichtung abgedichtet und mit Aqua dest. auf Dichtigkeit geprüft. Das Trenngel wurde aus 30% Acrylamid/8% Bisacrylamid, Trenngelpuffer pH 8,8 und 0,12% Gelatin bei Raumtemperatur hergestellt. Die Gelatinlösung aus Gelatinpulver und Aqua dest. wurde zum Lösen kurz in der Mikrowelle erhitzt. Vor dem Gießen des Geles wurde die Gelatinlösung 20 min im Wasserbad bei 40°C erwärmt. Zum Start der Polymerisation des Gels wurde kurz vor dem Einfüllen 10% APS und TEMED dazugegeben, anschließend wurde das flüssige Gemisch zügig zwischen die Glasplatten pipettiert. Zum vollständigen Auspolymerisieren wurde das Gel 1 h bei Raumtemperatur erschütterungsfrei stehengelassen, damit es nicht austrocknen konnte

wurde es noch mit 1-2 ml Aqua dest. bedeckt. Auf das feste Gel wurde dann nach dem Abkippen des Wassers das 4% PAA-Sammelgel aus 30% Acrylamid, Sammelgelpuffer pH 6,8, TEMED, Aqua dest. und APS gegossen und der Gelkamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel gesteckt. Nach 30 min Polymerisation wurde der Kamm aus dem Gel gezogen und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült. Nach Einspannen der Gelplatten in die Elektrophoresekammer und Auffüllen dieser mit Elektrophoresepuffer wurden die Luftblasen unter dem Gel entfernt, um einen widerstandsfreien Stromdurchlauf zu gewährleisten. Die Proben wurden in der Zwischenzeit vorbereitet. Dazu wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit Probenpuffer und 0,01% Bromophenol Blue (Loadmix, Biorad) gemischt. In jede Tasche des Gels kamen 22,5 µl Probe und jede Probe enthielt 0,5 µg Protein. Zusätzlich zu den Proben wurde in eine Tasche 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Precision Plus Protein Standard, Biorad) und in eine andere Tasche 5 µl einer Positivprobe für die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 gegeben. Als „Negativkontrolle“ diente Zellmedium (20fach konzentriert) in einer der Taschen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit einer Tischzentrifuge kurz runterzentrifugiert und dann sorgfältig in die Taschen des Gels pipettiert. Zum Sammeln der Proben im Sammelgel wurde ein konstanter Strom von 10 mA angelegt mit einer Spannung von 50 V. Wenn die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde der Strom auf 15 mA eingestellt mit einer Spannung von 100 V. Nach ca. 2 h, wenn die Lauffront ca. 1-2 mm vor dem unteren Gelrand sichtbar war, wurde das Gel aus den Glasplatten herausgelöst und zweimal für 20 min in einer 2,5%igen Triton-Lösung gewaschen, um das SDS vollständig zu entfernen. Nach kurzem Abspülen mit Aqua dest. wurde das Gel in eine Plastikschaale mit 25 ml Aktivierungspuffer überführt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank in der geschlossenen Schale aufbewahrt. Zum Färben wurde das Gel kurz abgespült, mit Coomassie Blau-Lösung bedeckt und 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Färben wurde das vollständig blaugefärbte Gel für 30 min mit Entfärber auf dem Schüttler entfärbt. Das fertige Zymogramm wurde auf der Leuchtplatte photographiert, in Folie geschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

#### **3.2.3.7.2 Kasein-Zymographie**

Für die Kasein-Zymographie wurden 12% PAA-Fertiggele der Firma Invitrogen benutzt und wie empfohlen vorbereitet (Novex pre-cast gels, Invitrogen). Die Proben wurden wie bei der Gelatin-Zymographie auf Eis aufgetaut und nativ belassen. Dann wurden sie in die Taschen geladen (1 µg Protein / Tasche, bei allen Proben 22,5 µl pro Tasche) und 4 h lang

bei einer konstanten Spannung von 60 V bei Raumtemperatur getrennt. Auch bei der Kasein-Zymographie wurde ein Molekulargewichtsmarker und eine Positivprobe für MMP-1, MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2 benutzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel zweimal 20 min in einer 2,5%igen Triton-Lösung gewaschen und für 24 h oder 48 h im Aktivierungspuffer im Brutschrank verwahrt. Nach dem Färben und Entfärben wurde das Gel photographiert und aufbewahrt.

### **3.2.3.7.3 Kollagen Typ I-Zymographie**

Kollagen Typ I ist das bevorzugte Substrat der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13. Die Kollagen-Zymographie wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt wie die Gelatin-Zymographie, nur mit dem Substrat Kollagen Typ I. Das Sammelgel war 4%ig (Herstellung siehe oben). Das 7,5%ige PAA Trenngel wurde wie oben beschrieben hergestellt, anstatt des Gelatins wurde Kollagen Typ I-Lösung verwendet (0,1%). Die Proben wurden wie beschrieben vorbereitet und in der Sammelphase konstant mit 10 mA (ca. 50 V), in der Trennphase mit 15 mA (ca. 100 V) getrennt. Nach dem Waschen wurden die Gele über Nacht in Aktivierungspuffer bei 37°C inkubiert, gefärbt und entfärbt und anschließend aufbewahrt.

### **3.2.3.8 Reverse Zymographie**

Die reverse Zymographie ist eine Methode zum Nachweis von TIMP und entstand durch Modifikation der Zymographie. Die Proben werden zuerst nach dem Prinzip der Zymographie im Gelatin-Gel separiert. Nach dem Waschen mit Triton wird für mehrere Stunden zusätzlich zum Aktivierungspuffer MMP-2-haltiges KM zugegeben. Nach Verdau des Gelatins im Gel durch MMP aus dem Medium resultiert nach dem Färben und Entfärben ein klares Gel mit dunklen Banden an den Stellen, wo TIMP fixiert wurde und so das Gel vor Degradation schützen konnte. Um TIMP-Banden von anderen unspezifischen dunklen Banden unterscheiden zu können sollte mit den gleichen Proben unter gleichen Bedingungen eine SDS-PAGE durchgeführt werden. TIMP-Banden wären dort durch niedrige Konzentration von Protein nicht sichtbar. Die modifizierte Variante der Reversen Zymographie nach Oliver et al. beschreibt das Zugeben von MMP-haltigem KM mit dem Gelatin zum Gel kurz vor der Polymerisation, alle anderen Schritte entsprechen der Gelatin-Zymographie (Oliver et al., 1997). Vor der Durchführung der Reversen Zymographie nach der modifizierten Variante wurde erst eine Zeitkinetik mit Gelen ohne Proben in Aktivierungspuffer mit KM durchgeführt, das beste Resultat war eine Inkubation

von 20 - 30 h. Dazu wurde KM von L6-Myoblasten-Zellen, welches MMP-2 enthielt, konzentriert und mit 1% SDS angereichert. Das Trenngel wurde als 15% PAA Minigel wie in der oben beschriebenen Gelatin-Zymographie angefertigt, es enthielt 0,05% Gelatin und 23,5% (v/v) KM, das Sammelgel war 5%ig. Bei einer konstanten Spannung von 165 V über 1 h und 20 min wurden die Proteine getrennt, danach wurde das Gel wie oben beschrieben gewaschen und anschließend 20 h im Brutschrank mit Aktivierungspuffer inkubiert. Danach erfolgte das Waschen und Färben des Gels wie oben beschrieben. Als Objektivierung einer erwarteten TIMP-Bande in der Reversen Zymographie wurde unter den gleichen Bedingungen ein SDS-Gel hergestellt (Methode siehe oben).

### **3.2.3.9 Western Blotting**

Western Blotting bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Auf der Membran können bestimmte Proteine nun mit spezifischen Antikörpern markiert werden, die wiederum durch Peroxidase-gekoppelte Antikörper gebunden werden und sich durch eine Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektieren lassen. Die gebundenen Antikörper können durch Waschen wieder eluiert werden, so dass in einem Blot verschiedene Proteine mit verschiedenen Antikörpern immer wieder markiert werden können (Immunoblotting).

#### **3.2.3.9.1 Proteintransfer mittels Semi-Dry Blotting**

Die Proteine wurden zuerst mit einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, danach wurden die Taschenstege und nicht relevante Bereiche der Gele entfernt. Die Gele wurden 10 min auf dem Schüttler in 1x Transferpuffer äquilibriert. Die verwendete Nitrocellulose-Membran (0.45 µm, Schleicher&Schuell) wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und auch in 1x Transferpuffer äquilibriert, ebenso wie auf die Gelgröße zugeschnittenes Whatman Papier. Auf die untere Elektrode der semi-dry Blotkammer (Pegasus, Phase, Kiel) wurden drei Lagen 3 mm dickes Whatman Papier aufgelegt. Darauf wurden erst das Gel, dann die Nitrocellulose-Membran und schließlich wieder drei Lagen Whatman Papier gelegt. Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit wurden mit einer Walze vorsichtig entfernt. Dann wurde die obere Platinelektrode aufgesetzt und die Spannung angelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 0.8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 1 h. Das SDS-Gel wurde zur Überprüfung des Proteintransfers 1 h mit Coomassie Blau gefärbt. Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran wurde die Membran zuerst in Aqua dest. äquilibriert, dann mit dem reversiblen Proteinfärbemittel Ponceau-Rot 3-5 min gefärbt und 1-2 min mit

Aqua dest. entfärbt. Zum Bandenvergleich wurde die Membran in einer Plastikhülle photokopiert. Zum Entfernen der Farbe wurde die Membran in TBS-Waschpuffer mit 0,1% Tween 5 min gewaschen. Nach dem Waschen kann die Membran luftgetrocknet und zum Aufbewahren eingefroren- oder mit Antikörpern gegen spezifische Proteine inkubiert werden.

### **3.2.3.9.2 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine**

Vor dem Markieren mit Antikörpern muss die Membran zuerst mit einer proteinreichen Lösung „blockiert“ werden: Protein im Überschuss bindet unspezifische Bindungsstellen an den Proteinen auf der Membran und maskiert sie so vor den Antikörpern, die dann nur ihre spezifischen Bindungsstellen an den Proteinen binden können. Die Blockierlösung aus BSA (1%) und Milchpulver (5%) in TBS-Waschpuffer mit 0,1% Tween wurde frisch hergestellt, die Membran wurde darin für 1,5 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht wurde die Membran dann in Folie eingeschweißt auf dem Schüttler bei 4°C in 3 ml Blocklösung inkubiert, die den ersten Antikörper im Verhältnis 1:500 (Anti-MT1-MMP), 1:750 (Anti-TIMP-1), 1:1000 (Anti- $\alpha$ -Aktin) oder 1:5000 (Anti-MMP-13) enthielt. Nachdem die Membran 3x für 15 min in TBS-Waschpuffer mit 0,1% Tween gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem RP-konjugierten zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 in Blocklösung. Nach der Inkubation wurde die Membran 2x für 5 min in TBS-Waschpuffer mit 0,1% Tween gewaschen, dann 2x für 5 min in TBS. Die Detektion der gebundenen ersten Antikörper erfolgte mittels ECL-Reaktion.

### **3.2.3.9.3 „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)-Detektion der gebundenen Antikörper**

Bei der ECL-Detektion (Pierce) werden, durch das an den zweiten Antikörper gebundene Peroxidase-Enzym, Luminolmoleküle gespalten, wodurch ein Lichtsignal erzeugt wird. Wird ein Röntgenfilm damit belichtet, entstehen an der Stelle der Protein-Banden auf der Membran belichtete Banden auf dem Film. Der Vorteil dieses Systems liegt in der höheren Empfindlichkeit durch Verstärkung des vorhandenen Signals und der Möglichkeit zur Wiederverwendung der Membran mit verschiedenen Antikörpern. Ferner hält das Lichtsignal nach dem Auftragen der Luminollösung etwa 1 h an, so dass mehrere Röntgenfilme hintereinander mit unterschiedlicher Intensität belichtet werden können. Zur Detektion wurde die Membran nach dem Waschen trocken getupft und die



proteinbindende Seite 1 min mit ECL-Lösung benetzt, welche vorher nach Vorschrift des Herstellers (Pierce) vorbereitet wurde. Danach wurde die Membran wieder trockengetupft, luftblasenfrei mit Frischhaltefolie bedeckt und mit der proteinbindenden Seite nach oben in die Röntgenkassette (X-Omatic Cassette, Kodak) gelegt. Entwickelt wurden die Filme (Röntgenfilm Super RX, Fuji Medical) in der Dunkelkammer mit einem Entwicklungsgerät (Crurix 60, Agfa; Entwicklungsreagenzien: Agfa).

### **3.3 Densitometrie**

Die Densitometrie ist ein Verfahren, welches die Dicke und Stärke von Banden auf SDS-Gelen, Röntgenfilmen, Agarosegelen und Zymogrammen misst, die so miteinander verglichen werden können und deren Dichte bzw. Menge damit einer statistischen Auswertung zugänglich gemacht wird. Dazu wurden die Gele bzw. die Röntgenfilme auf einer Leuchtplatte von einem Densitometer (BioDocAnalyze, BDA digital) gescannt und die Lichtdurchlässigkeit der Banden durch das integrierte Computerprogramm gemessen. Zum Auswerten werden die Gele oder Filme mit der Digitalkamera (Power Shot G3, Canon), über die auch gescannt wird, fotografiert, gespeichert und im Auswertungsprogramm (BioDocAnalyze) geöffnet. Das Programm erkennt automatisch dunkle Banden vor hellem Hintergrund oder je nach Einstellung helle Banden vor dunklem Hintergrund. Durch weitere Einstellung des Programms kann die Genauigkeit eingestellt und können die Banden manuell markiert werden. Im Vergleich zum Hintergrund (Leuchtplatte oder gefärbtes Gel/geschwärzter Film) wird die Lichtdurchlässigkeit der markierten Bande gemessen. Die Lichtdurchlässigkeit, also Intensivität des Signals durch die Breite der Bande geteilt, ergibt eine Zahl mit der Einheit „arbitrary units“ oder „relative Aktivität“. Für die Western Blots wurden die Originalfilme verwendet, dazu wurden sie auf die Leuchtplatte gelegt, mit der zum Gerät gehörigen Digitalkamera mit gleich bleibendem Abstand zur Leuchtplatte zweimal fotografiert und beide Aufnahmen eines Western Blots mit dem Computerprogramm ausgewertet (um die Reproduzierbarkeit des Vorganges zu sichern). Die Zymogramme wurden als Gel auf eine 0,5 cm dicke Glasplatte aufgelegt und nach dem gleichen Prinzip behandelt wie die Western Blots. Die Banden wurden manuell einzeln markiert und das Programm wurde so eingestellt, dass das gefärbte Gel als „dunkel“ erkannt wurde, die klaren Banden dagegen als „hell“. Je klarer und größer die Banden waren, desto größer wurde die Arbituarität. Aus den so gewonnenen Rohdaten wurde einer Excel-Datei erstellt und statistisch ausgewertet, um die einzelnen Experimente miteinander zu vergleichen.

### **3.4 EDV und Statistik**

Die benutzten Computer waren alle mit dem Betriebssystem Windows von Microsoft ausgestattet, in den Versionen Windows 98, Windows 2000 und Windows XP professional, das verwendete Statistikprogramm war Excel (t-test). Die densitometrische Analyse erfolgte mit dem Computerprogramm BioDocAnalyse der Firma Biometra, Göttingen. Für die Erstellung von Graphiken und die Archivierung und Bearbeitung von Fotos wurde Adobe Photoshop 5 verwendet.

Die Literatursuche und –vergleiche liefen über die NCBI-Homepage und die ärztliche Zentralbibliothek des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Zur statistischen Auswertung mit Excel wurden jeweils zwei Fotos eines Geles oder Western Blots gegeneinander ausgewertet, die Mittelwerte der Banden wurden für die endgültige Berechnung verwendet. Für die endgültige Berechnung galt  $n = 3$ , also einzelne Ergebnisse dreier Gele oder Blots mit identischen Proben flossen in das endgültige Resultat ein. Die Balken der Graphiken zeigen den Mittelwert aus diesen 3  $n$  sowie die Standardabweichung an, in den Graphiken werden die einzelnen Tage eines Experimentes miteinander verglichen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Zellkulturmodell aus primären kardialen Fibroblasten vom Schwein**

Für die Experimente wurde ein Modell aus primären kardialen Fibroblasten vom adulten Schwein entwickelt. Das Schweineherz ähnelt von Aufbau, Größe und Gewebestruktur her dem Menschlichen und lässt so Rückschlüsse auf das Verhalten von MMP im menschlichen Herzen zu. Der Fibroblast ist interessant, weil er MMP, TIMP und EZM-Bestandteile synthetisiert und weil Fibroblasten durch T3 reguliert werden sowie TR exprimieren (Hayashi et al. 1993). Ob es sich um eine reine Fibroblastenkultur oder um eine Mischung mit Myofibroblasten bzw. Umwandlung in diese nach mehreren Passagierungen handelte, wurde nicht gesichert. Die Veränderung der Zellmorphologie und der Zelldichte wurde regelmäßig kontrolliert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben präpariert und kultiviert.

#### **4.1.2 Morphologie adulter kardialer Fibroblasten**

Während der Experimente wurde die Morphologie der Zellen in Kultur beobachtet und beurteilt. Sie veränderte sich unter der Behandlung durch T3 und Dexamethason, nicht nach Behandlung mit TNF $\alpha$  oder anderen Steroidhormonen. normal große und geformte kardiale Fibroblasten mit normaler Konfluenz siehe Abb. 4.1. Unter serumfreien Bedingungen (Kontrollgruppe während des Experimentes) wurden die Zelle klein und schmal mit wenigen Zellausläufern zu Nachbarzellen (keine Abb. ). Unter T3-Behandlung wurden die Zellen etwas kleiner und rundlicher, waren aber vital (Vitalfärbung) und hatten normale Zellausläufer (siehe Abb. 4.1.). Unter Glukokortikoid-Behandlung vergrößerten sich die Zellen fast um das doppelte der Ausgangsgröße (siehe Abb. 4.1.).

### **4.2 Nachweis spezifischer mRNA von MMP in nativem Herzgewebe**

Um zu prüfen, ob die erwarteten MMP aus dem Säugerherzen auch in den verwendeten Herzen vom Schwein exprimiert werden und um welche MMP es sich handelte, wurde mRNA von MMP durch quantitative real-time RT-PCR nachgewiesen. Der Nachweis spezifischer mRNA von MMP gelang in Gewebeproben vom linken Atrium und linkem Ventrikel, in frisch isolierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten sowie in kardialen Fibroblasten in Kultur ohne Behandlung. Puffer und Zellmedien waren frei von MMP-mRNA. Spezifische mRNA wurde von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13 und MMP-14 nachgewiesen. Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren

überein, die diese MMP-Subtypen bereits im Myokard von Säugern zeigen konnten (siehe Tab. 1.3).

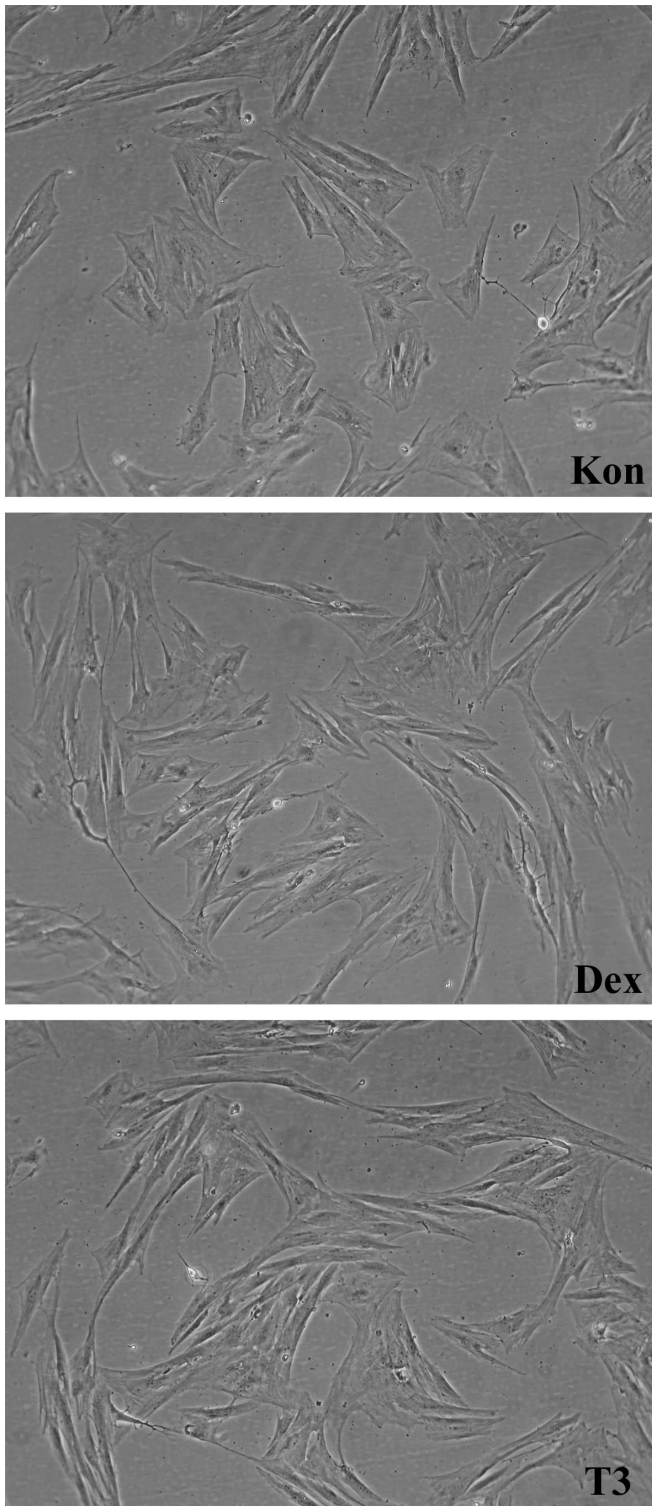


Abb. 4.1: Primäre kardiale Fibroblasten wurden 4 Tage lang mit Dexamethason (100 nM) und T3 (100 nM) unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Das Medium wurde täglich erneuert inklusive der Stimulatoren. Vergr.:10fach (Phasenkontrastmikroskop)  
Dex: Dexamethason, Kon: Kontrolle

#### **4.2.1 Nachweis von MMP-Aktivität in nativem Herzgewebe**

Um nachzuweisen, ob die im Herzgewebe exprimierten MMP auch relevant für die Arbeitshypothese sind, wurde deren Aktivität im Herzgewebe mittels Substrat-Zymographie ermittelt. Die Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet, es handelte sich um Gewebhomogenat aus dem linken Ventrikel, Homogenate aus reinen Kardiomyozyten- und reinen kardialen Fibroblastenisolierungen sowie um KM un behandelter kardialer Fibroblasten in Kultur. Zum Vergleich mit dem Herzgewebe wurde eine Probe aus Lebergewebe vom Schwein herangezogen, da Lebergewebe viel MMP enthält und so auch zur Überprüfung der Methode diente. Die Zymogramme wurden jeweils dreimal unter denselben Bedingungen angefertigt (Triplikate). Zum Ausschluss einer Kontamination durch andere Proteasen wurde je ein Zymogramm einer Serie mit 5 mM EDTA behandelt, sämtliche proteolytische Aktivität ließ sich dadurch hemmen. Alle Banden wurden nicht näher klassifiziert und lediglich im Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker beurteilt.

Gelatinolytische Aktivität: Die Aktivität der Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 wurde mit der Gelatin-Zymographie gemessen. Gelatinolytische Aktivität zeigte sich bei allen Proben, am stärksten bei KM (siehe Abb. 4.2). Aktivitäten bei Leberhomogenaten waren bei 250 kDa, 200 kDa, 150 kDa, 90 kDa, 75 kDa, 60 kDa im Gel sichtbar (siehe Abb. 4.2.). Ventrikelhomogenate zeigten Aktivität bei 250 kDa, 200 kDa, 150 kDa, 90 kDa und bei 70 kDa eine Doppelbande, siehe Abb. 4.2. Wurden reine Kardiomyozytenhomogenate verwendet, zeigten sich Aktivitäten bei 90 kDa und 60 kDa im Gel (siehe Abb. 4.3), bei reinen Fibroblastenhomogenaten zeigte sich nur eine schwache Aktivität zwischen 50 kDa und 75 kDa (keine Abb.). KM von kardialen Fibroblasten in Kultur zeigte 3 Banden zwischen 100- und 150 kDa sowie eine starke Doppelbande bei ca.70 kDa (siehe Abb. 4.2.). Damit wurden die bereits in Herzgewebe beobachteten gelatinolytischen Banden aus der Vergleichsliteratur bestätigt (Nagase und Woessner 1999).

Kaseinolytische Aktivität: Die Aktivität von Stromelysinen kann mittels Kasein-Zymographie nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die als mRNA nachgewiesene MMP MMP-3 Aktivität im Herzgewebe zeigt, wurden Kaseinzymogramme mit den oben beschriebenen Proben angefertigt. Kaseinolytische Aktivität konnte bei keiner der Proben nachgewiesen werden.

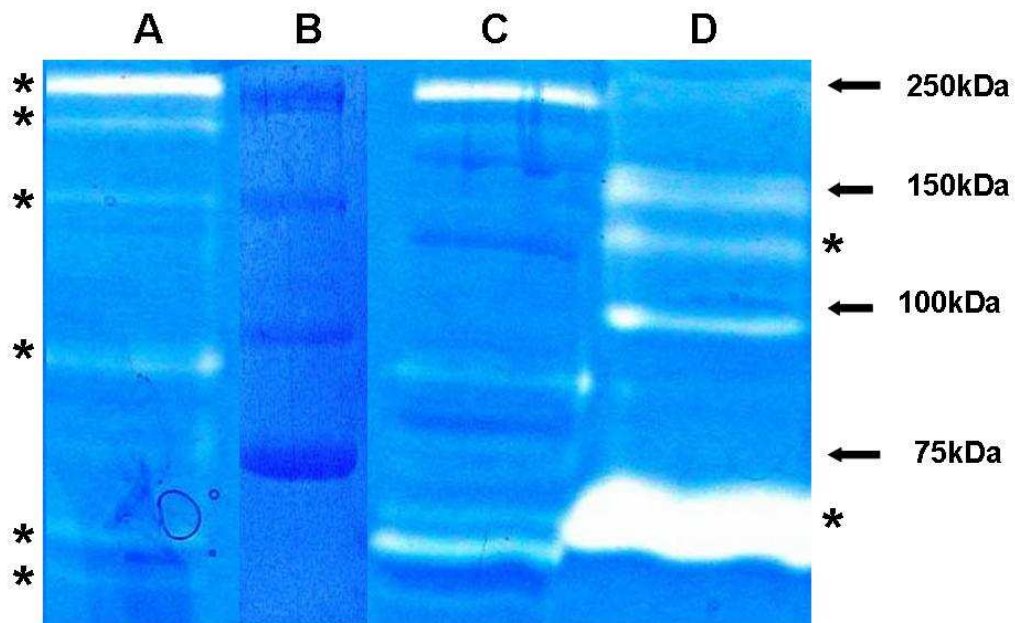


Abb. 4.2: MMP in Herzgewebe, alle Proben unbehandelt.

A: Gewebekomogenat linker Ventrikel; B: Molekulargewichtsmarker;

C: Gewebekomogenat Leber; D: KM von Herzfibroblasten.

\* gelatinolytische Aktivität

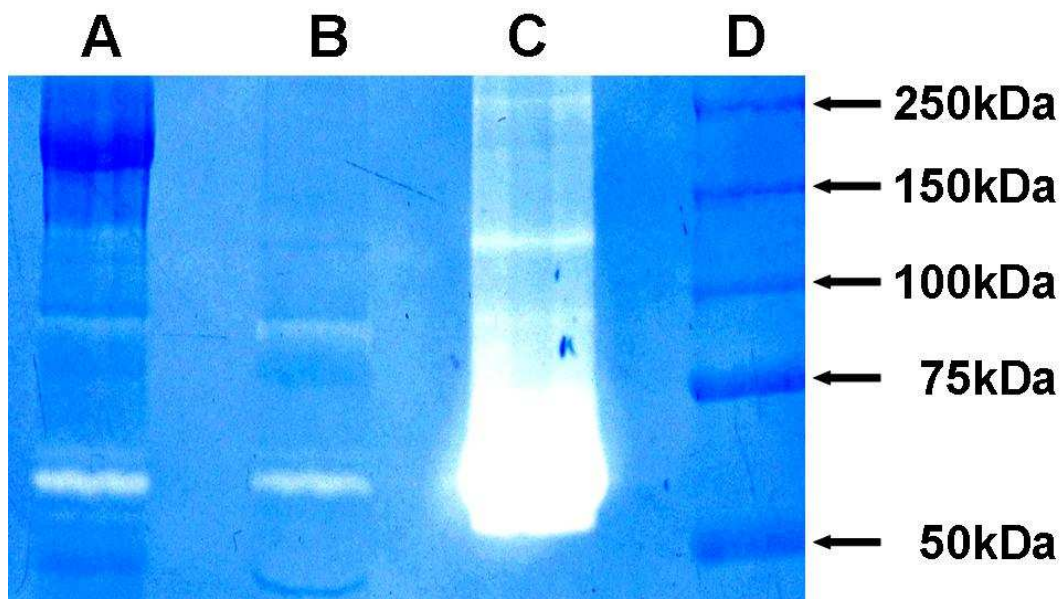


Abb. 4.3: MMP in unbehandelten Kardiomyozyten.

A: Gewebekomogenat linker Ventrikel; B: Kardiomyozyten;

C: Positivprobe MMP-2/MMP-9; D: Molekulargewichtsmarker.

Kollagenolytische Aktivität: Um die Aktivität der Kollagenasen wie MMP-1 und MMP-13 im Herzgewebe nachzuweisen, wurden Zymogramme mit dem Substrat Kollagen Typ I angefertigt. Bei allen Proben zeigte sich im Kollagen Typ I-Zymogramm eine breite,

unspezifische kollagenolytische Bande zwischen 100 kDa und 70 kDa. Auf Grund der Unschärfe und Unspezifität wurde das Ergebnis nicht ausgewertet und konnte keiner MMP zugeordnet werden. Die Gele werden nicht gezeigt.

#### 4.2.2 Nachweis von MMP im Western Blot

Um die MMPs MMP-9, MMP-13 und MMP-14 als Protein nachzuweisen, wurden mit den gleichen Proben Western Blots angefertigt. Die Gelatinase MMP-9 konnte im Western Blot nur bei reinen Kardiomyozytenisolationen als spezifische Bande bei ca. 90 kDa nachgewiesen werden, dem Molekulargewicht von MMP-9. Als Vergleich diente eine MMP-9-Positivprobe. MMP-13 konnte in keiner der Proben im Western Blot nachgewiesen werden. MMP-14 zeigte im Western Blot bei reinen Kardiomyozytenisolationen eine spezifische Bande zwischen 45-55 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht von MMP-14. Als Vergleich diente eine MMP-14-Positivprobe. Alle Western Blots wurden zweimal durchgeführt und nicht densitometrisch ausgewertet. Eine statistische Auswertung fand nicht statt und die Ergebnisse werden nicht gezeigt.

#### 4.2.3 Identifikation der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9

##### MMP-2 (Gelatinase A)

Die Gelatinase MMP-2 wurde anhand ihres Molekulargewichtes von 66-72 kDa und durch gelatinolytische Aktivität im Gelatinzymogramm identifiziert. Im Gewebe des linken Ventrikels sowie in isolierten kardialen Fibroblasten dominierte die gelatinolytische Aktivität von MMP-2. Die spezifischen Banden im Gelatinzymogramm wurden mit den Banden einer MMP-2-Positivkontrolle verglichen. Die gelatinolytische Aktivität imponierte im Zymogramm als Doppelbande mit einer schwachen oberen Bande und einer starken unteren Bande (siehe Abb. 4.4).

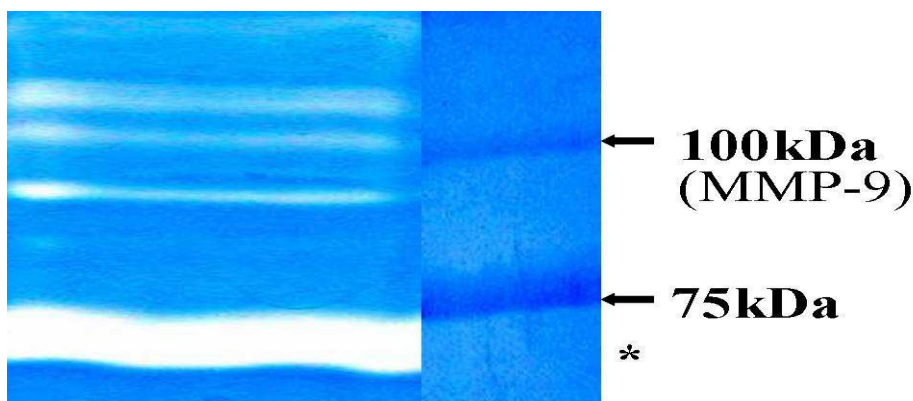


Abb. 4.4: MMP-9-Aktivität in Herzgewebe. Proben: Ventrikelhomogenat und konditioniertes Medium, unbehandelt. Lytische Banden im Zymogramm bei 90-100 kDa.\* MMP-2.

### MMP-9 (Gelatinase B)

Die Gelatinase MMP-9 wurde bereits als mRNA im Herzgewebe und als Protein im Western Blot bei Kardiomyozyten nachgewiesen (siehe oben). In einer Linie von primären kardialen Fibroblasten wurde in KM im Gelatin-Zymogramm eine Aktivität bei 90-100 kDa sichtbar, das entspricht dem Molekulargewicht der Gelatinase B oder MMP-9 (siehe Abb. 4.4). Identifiziert wurde die Gelatinase durch den Vergleich der spezifischen gelatinolytischen Banden mit den Banden einer Positivprobe für MMP-9. In allen Zymogrammen konnte bei dieser Zelllinie MMP-9-Aktivität nachgewiesen werden, in anderen Linien kardialer Fibroblasten fehlte MMP-9. In der Vergleichsliteratur gelang in einigen Fällen ebenfalls der Nachweis von MMP-9 (Siwik et al. 2000).

#### **4.2.4 Einfluss von T3 und Dexamethason auf die Genexpression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9**

Nachdem die spezifische mRNA der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in nativem Herzgewebe nachgewiesen worden waren, wurde die Menge an spezifischer mRNA von MMP-2 und MMP-9 nach der Behandlung gemessen, um einen Effekt von T3 und Dexamethason auf die Expression der Gelatinasen zu zeigen. Die Zellen wurden vier Tage lang unter serumfreien Bedingungen in Zellkultur gehalten und jeden Tag mit frischem Medium, welches die Stimulatoren erhielt, versorgt. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Jedes Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Am 2. und am 4. Tag wurde jeweils behandelte Zellen und Kontrollen geerntet und die mRNA isoliert.

Für MMP-2 zeigten die Daten der quantitativen real-time RT-PCR keine Veränderung der Menge an spezifischer mRNA nach Behandlung mit T3 oder Dexamethason (siehe Abb. 4.5). Auch bei MMP-9 änderte sich die Menge an spezifischer mRNA nicht nach Behandlung mit T3 oder Dexamethason (Daten werden nicht gezeigt).



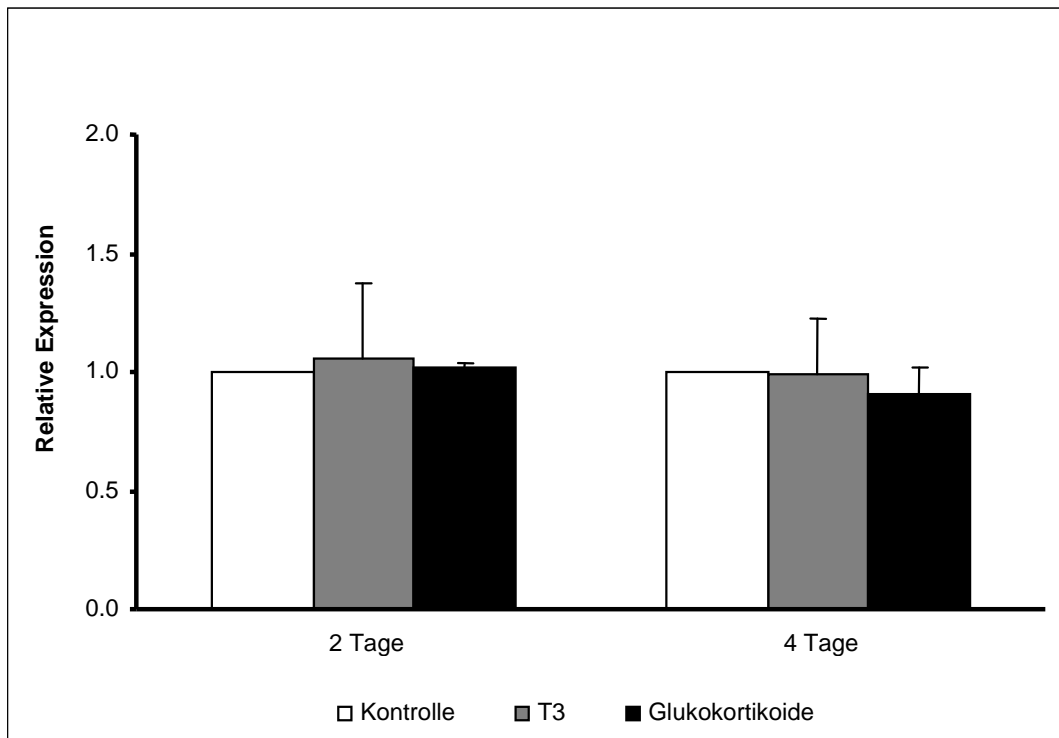


Abb. 4.5: MMP-2 mRNA nach viertägiger Behandlung mit T3 (100 nM) und Dexamethason (100 nM) in primären kardialen Fibroblasten. Ernte jeweils am 2. und am 4. Tag. 2.Tag: T3:  $1,06 \pm 0,32$ , Dexamethason:  $1,02 \pm 0,02$ ; 4.Tag: T3:  $0,99 \pm 0,23$ , Dexamethason:  $0,91 \pm 0,11$ . Angaben relative Expression als MW  $\pm$  SD in (n = 3). Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

#### 4.2.5 Genexpression weiterer MMP-Subtypen nach Behandlung mit T3 und Dexamethason

Als weitere MMP wurden neben den Gelatinasen die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13, das Stromelysin MMP-3 und die MT-MMP MMP-14 in nativem Herzgewebe nachgewiesen. Um einen Einfluß von T3 und dem Glukokortikoid Dexamethason auf die Menge an synthetisierter spezifischer mRNA dieser MMP-Subtypen nachzuweisen, wurde die Menge an spezifischer mRNA nach der jeweiligen Behandlung mit der quantitativen real-time RT-PCR gemessen.

Die Zellen wurden vier Tage lang unter serumfreien Bedingungen in Zellkultur gehalten und jeden Tag mit frischem Medium, welches die Stimulatoren erhielt, versorgt. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Jedes Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Am 2. und am 4. Tag wurde jeweils behandelte Zellen und Kontrollen geerntet und die mRNA isoliert.

Weder unter T3-Behandlung noch unter Dexamethason-Behandlung veränderte sich die Menge an spezifischer mRNA von MMP-1, MMP-13 und MMP-14.

### Steigerung der Genexpression von MMP-3 und MMP-13 durch T3

Erst nach Behandlung mit T3 über 7 Tage kam es zu einem Anstieg der Menge an spezifischer mRNA für MMP-3 und MMP-13 am 7. Tag. Die Menge an spezifischer mRNA von MMP-3 betrug  $3,63 \pm 1,01$  SD und war im t-test mit  $p = 0,013$  signifikant. Die Menge an spezifischer mRNA von MMP-13 betrug  $3,55 \pm 0,86$  SD und war im t-test mit  $p = 0,001$  sogar hochsignifikant (siehe Abb. 4.6). Alle Mengenangaben sind Mittelwerte und beschreiben die relative Expression. Die Behandlung der Zellen fand mit Medium statt, welches Hormon-depletiertes Serum (stripped serum) enthielt und täglich gewechselt wurde.

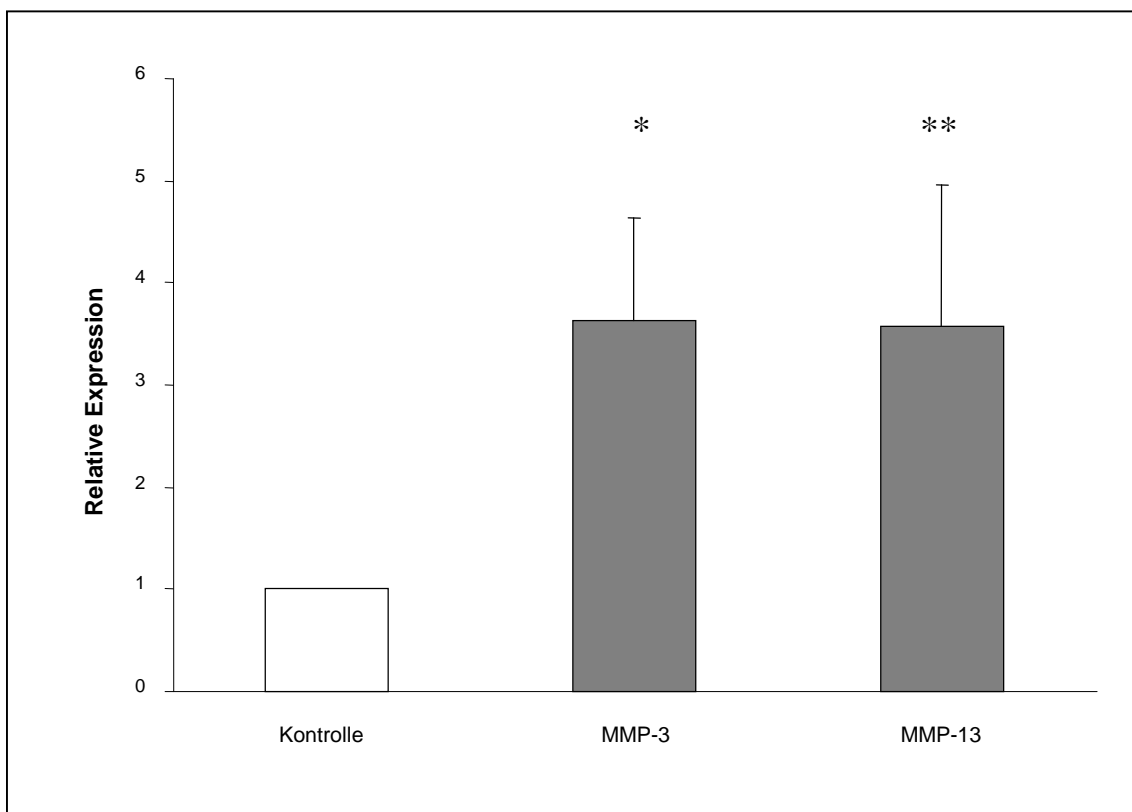


Abb. 4.6: Genexpression von MMP-3 und MMP-13 in primären kardialen Fibroblasten nach Stimulation mit T3 (100 nM) über sieben Tage in Medium mit hormon-depletiertem Serum (stripped serum) mit täglichem Mediumwechsel. MMP-3:  $3.63 \pm 1,01$ ,  $p = 0,013$ ; MMP-13:  $3.55 \pm 0,68$ ,  $p = 0,001$ ; \* statistisch signifikant; \*\* statistisch hochsignifikant; Angaben relative Expression als MW  $\pm$  SD (n = 3).

#### 4.2.6 Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 nach Behandlung mit T3 oder Dexamethason

Parallel zum Nachweis spezifischer mRNA der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurde die gelatinolytische Aktivität im Gelatinzymogramm gemessen, um einen Effekt von T3 und Dexamethason auf die Aktivität der Proteasen zu zeigen. Die Aktivität nach der

jeweiligen Behandlung wurde in KM und in Fibroblasten densitometrisch im Zymogramm gemessen. Die Behandlung der Zellen dauerte 4 Tage, nach jedem Tag (24 h nach Stimulation) wurde KM gewonnen und mit Zymographie und Densitometrie ausgewertet. Die Zellen wurden nach dem 4. Tag geerntet und ebenfalls mit Zymographie und Densitometrie ausgewertet. Die Experimente wurden viermal wiederholt und die Proben jedes Experimentes wurden dreimal unter gleichen Bedingungen im Zymogramm ausgewertet (Triplikate). Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD, sie sind normiert auf die Kontrolle (Kon = 1).

#### Aktivitätsminderung durch T3:

Die messbare Aktivität von freiem MMP-2 in KM wurde durch Behandlung der Zellen mit T3 leicht verringert, sichtbar im Zymogramm (siehe Abb. 4.7). Die densitometrische Analyse der Zymogramme ergab ebenfalls eine leichte Minderung der Aktivität auf  $0,89 \pm 0,23$  SD relative Aktivität am 2. Tag, die aber durch die relativ große Standardabweichung nicht signifikant ist. Verlauf siehe Abb. 4.8 a), Daten siehe Abb. 4.8 b).

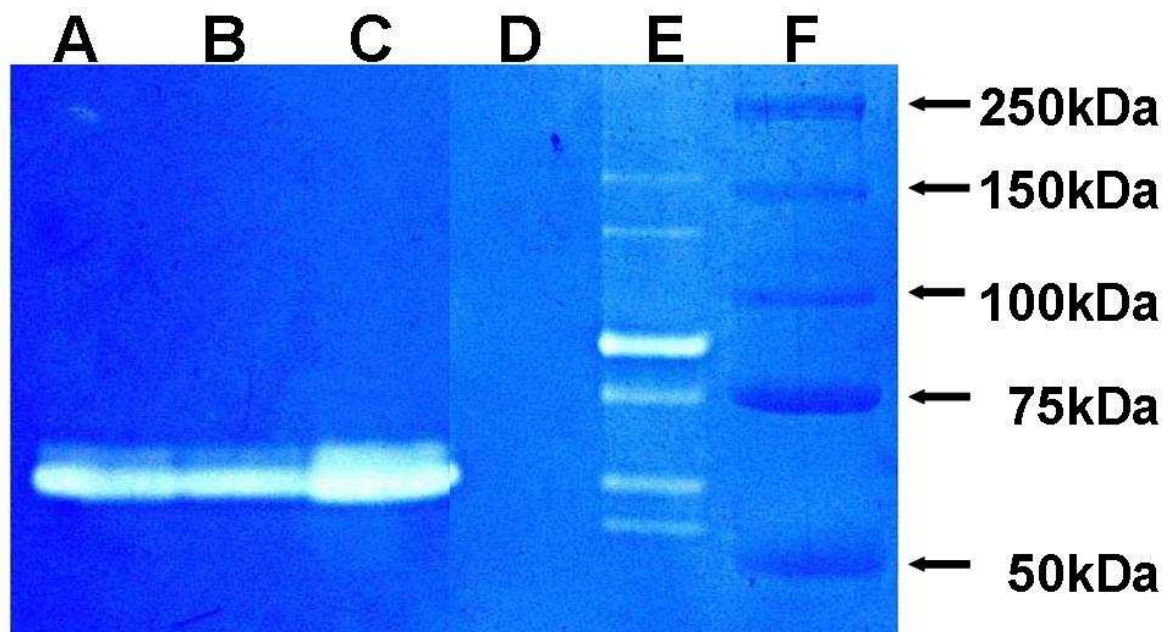


Abb. 4.7: MMP-2-Aktivität nach zweitägiger Behandlung mit T3 (100nM) oder Dexamethason (100nM). A: unbehandelte Kontrolle; B: T3; C:Dexamethason; D: Negativkontrolle; E: Positivkontrolle MMP-2/MMP-9; F: Molekulargewichtsmarker

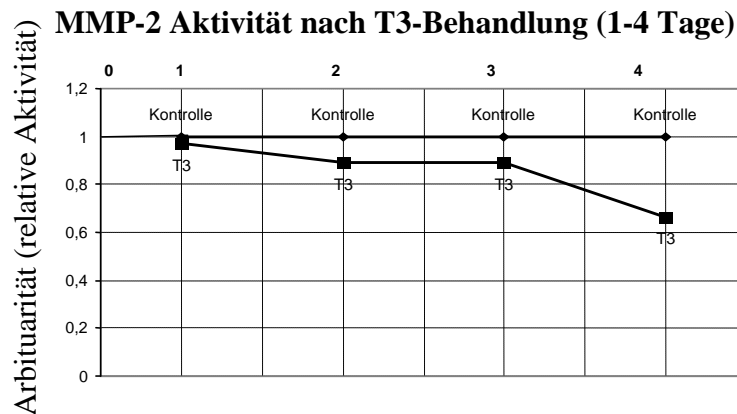


Abb. 4.8: a) Aktivität von MMP-2 in primären kardialen Fibroblasten im Verlauf über vier Tage nach täglicher Behandlung mit T3 (100 nM). Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment und sind nicht signifikant.

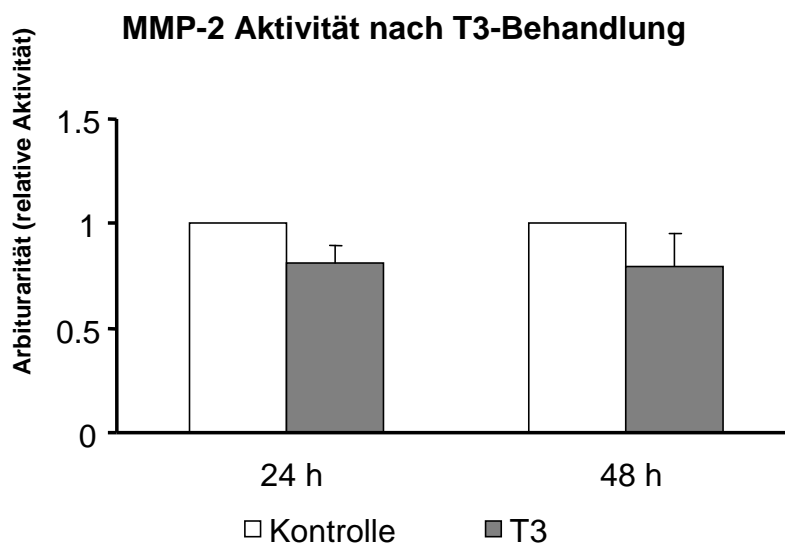


Abb. 4.8: b) Aktivität von MMP-2 in primären kardialen Fibroblasten nach ein- und zweitägiger Behandlung mit T3 (100 nM). 24 h:  $1,07 \pm 0,15$ ; 48 h:  $0,89 \pm 0,23$ ; Kon: Kontrolle. Angaben Arbituarität (relative Aktivität) als MW  $\pm$  SD (n = 3) Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

Aktivitätssteigerung durch Dexamethason:

Im Gegensatz dazu wurde unter Dexamethason-Behandlung eine Aktivitätssteigerung im Zymogramm beobachtet (siehe Abb. 4.7), densitometrisch  $1,29 \pm 0,03$  SD Arbituarität (relative Aktivität) am ersten Behandlungstag,  $1,85 \pm 0,32$  SD Arbituarität (relative

Aktivität am zweiten Behandlungstag. Der t-test ergab  $p = 0,015$ , die Ergebnisse sind daher statistisch signifikant. Insgesamt fand eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 1,5 statt. Verlauf siehe Abb. 4.9 a), Daten siehe Abb. 4.9 b).

Die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 blieb unbeeinflusst von der Behandlung mit T3 oder Dexamethason.

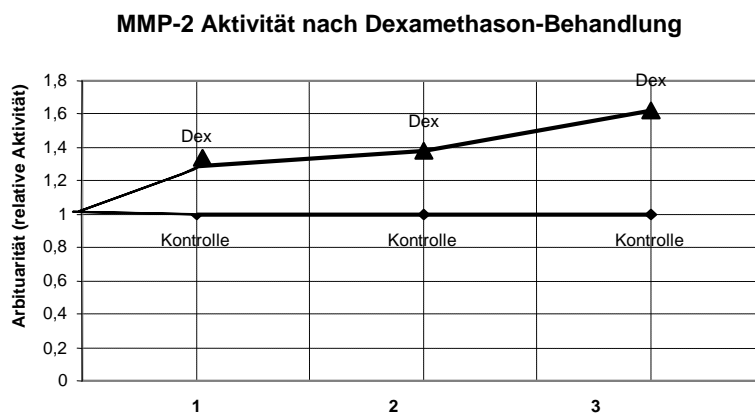


Abb. 4.9: a) Aktivität von MMP-2 in primären kardialen Fibroblasten im Verlauf über vier Tage nach täglicher Behandlung mit Dexamethason (100 nM). Die Ergebnisse stammen aus einem repräsentativen Experiment und sind nicht signifikant.

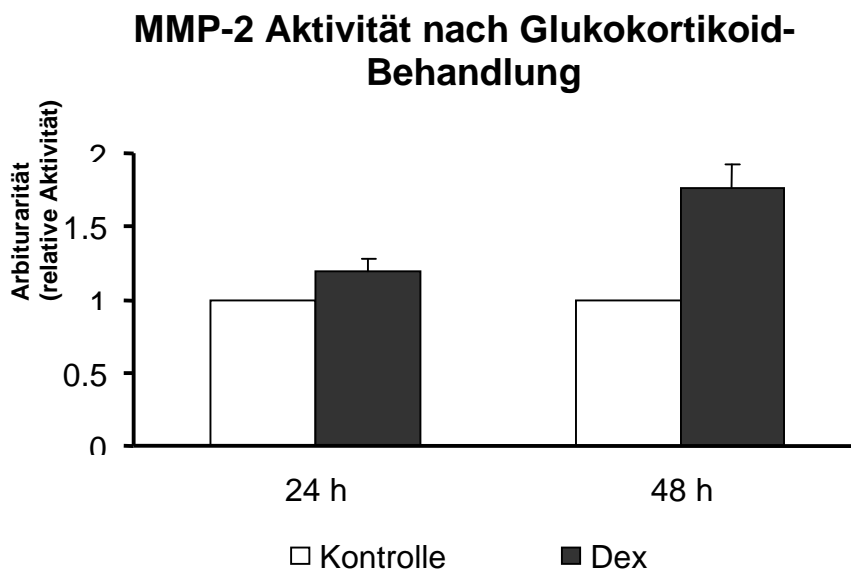


Abb. 4.9: b) MMP-2 Aktivität von MMP-2 in primären kardialen Fibroblasten nach ein- und zweitägiger Behandlung mit Dexamethason (100 nM). 24 h:  $1,29 \pm 0,03$ ; 48 h:  $1,85 \pm 0,32$ ,  $p = 0,015$ . Angaben Arbitrarität (relative Aktivität) als  $MW \pm SD$  ( $n = 3$ ).

Kon: Kontrolle, Dex: Dexamethason, \* statistisch signifikant

#### **4.2.7 Einfluss von Estrogen, Testosteron und dem Zytokin TNF $\alpha$ auf die Aktivität von MMP**

Die Untersuchungen der spezifischen mRNA der Proteasen ergaben nach der Behandlung mit Estrogen, Testosteron und TNF $\alpha$  keinen Hinweis auf eine Regulation. Um trotzdem eine erwartete Regulation zu zeigen, wurde die Aktivität der Proteasen beurteilt. Die Aktivitäten der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sowie des Stromelysins MMP-3 wurden jeweils im spezifischen Substrat-Zymogramm gemessen. Die Aktivität nach der jeweiligen Behandlung wurde in konditioniertem Medium und in Fibroblasten densitometrisch im Zymogramm gemessen. Die der Zellen Behandlung dauerte 4 Tage, nach jedem Tag (24 h nach Stimulation) wurde KM gewonnen und mit Zymographie und Densitometrie ausgewertet. Die Zellen wurden nach dem 4. Tag geerntet und ebenfalls mit Zymographie und Densitometrie ausgewertet. Die Experimente wurden viermal wiederholt und die Proben jedes Experimentes wurden dreimal unter gleichen Bedingungen im Zymogramm ausgewertet (Triplikate). Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD, sie sind normiert auf die Kontrolle (Kon = 1).

Aktivitätssteigerung von MMP-2 durch Estrogen, Testosteron und TNF $\alpha$ : Die Aktivität von MMP-2 bei KM im Gelatinzymogramm war nach 24 h Behandlung der Fibroblasten mit dem Zytokin TNF $\alpha$  auf 1,3 Arbituarität (relative Aktivität) erhöht, durch die hohe Standardabweichung von  $\pm$  2,6 SD war das Ergebnis aber nicht signifikant. Nach Behandlung der Fibroblasten mit den Steroidhormonen Testosteron und Estrogen nach 24 h, 48 h und 72 h war bei KM nach Behandlung mit Estrogen nach 24 h eine Aktivitätserhöhung von  $1,18 \pm 0,06$  SD Arbituarität (relative Aktivität), nach 48 h von  $1,04 \pm 0,08$  SD Arbituarität (relative Aktivität) und nach 72 h von  $1,14 \pm 0,04$  SD Arbituarität (relative Aktivität). Bei Testosteron war nach 48 h eine leicht verstärkte MMP-2 Aktivität ( $1,22 \pm 0,02$  SD Arbituarität (relative Aktivität)) in KM im Zymogramm sichtbar und messbar. Die Aktivitätssteigerung von MMP-2 durch 48 h Testosteron-Behandlung entsprach dem Faktor 0,2. Die Zymogramme wurden als Triplikate hergestellt und die Ergebnisse der densitometrischen Analyse sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant, da die Werte stark streuen und teilweise nicht reproduzierbar waren.

Kein Einfluss von Estrogen, Testosteron und TNF $\alpha$  auf MMP-9: Die Aktivität von MMP-9 in kardialen Fibroblasten blieb unbeeinflusst von den Steroidhormonen Testosteron und

Estrogen und dem Zytokin TNF $\alpha$ . in drei unabhängigen Versuchen über drei Tage mit einer MMP-9 produzierenden Zellreihe.

Aktivitätssteigerung von MMP-3 durch TNF $\alpha$ : Eine kaseinolytische Aktivität war sichtbar und meßbar bei Zelllysaten von kardialen Fibroblasten nach TNF $\alpha$ -Stimulation (48 h Inkubation). Im Kaseingel wurde sie zwischen 50 kDa und 75 kDa nachgewiesen; proMMP-3 hat ein Molekulargewicht von 57 kDa. Die Aktivität korrelierte mit der Positivprobe für MMP-3 (Siehe Abb. 4.10.). Die Kaseinzymogramme wurden wie oben beschrieben- und jeweils als Triplikate hergestellt. Eine densitometrische oder statistische Auswertung fand nicht statt.

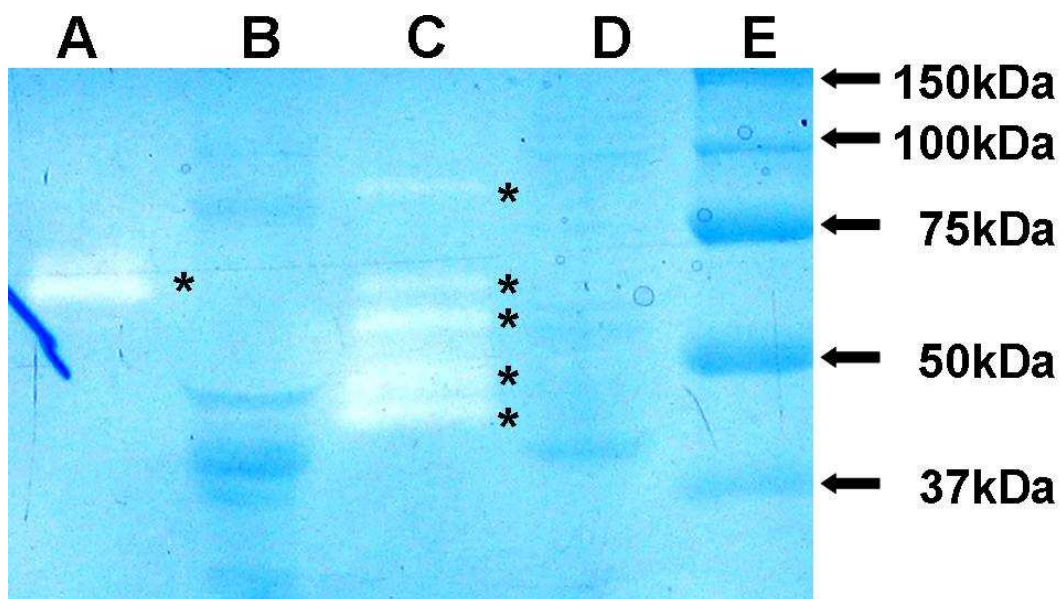


Abb. 4.10: Kaseinolytische Aktivität von MMP in kardialen Fibroblasten nach Stimulation mit TNF $\alpha$ . A: KM kardialer Fibroblasten nach Behandlung mit TNF $\alpha$ ; B: Kardiomyozyten, unbehandelt; C: Positivprobe MMP-1/MMP-3; D: kardiale Fibroblasten; E: Molekulargewichtsmarker. \* kaseinolytische Aktivität

#### 4.3 TIMP-mRNA in nativem Herzgewebe

Eine Regulation der Aktivität von MMP kann auch durch den spezifischen Inhibitor TIMP stattfinden. Um zu zeigen, dass auch TIMP im Herzen exprimiert wird, wurde mit Hilfe von real-time RT-PCR spezifische mRNA aller vier TIMP (TIMP-1 -4) in frischem unbehandeltem Gewebe des linken Ventrikels nachgewiesen. Der Nachweis gelang in Gewebeproben von drei unterschiedlichen Präparationen jeweils dreimal pro Präparation (Triplikate). Die Daten werden nicht gezeigt.

#### **4.3.1 TIMP-Aktivität im Herzgewebe**

Nachdem mRNA aller vier TIMP in Herzgewebe nachgewiesen worden war wurden, um die TIMP-Aktivität im nativem Herzgewebe zu zeigen, reverse Zymogramme angefertigt. Die Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet, es handelte sich um Gewebehomogenat aus dem linken Ventrikel, Homogenate aus reinen Kardiomyozyten- und reinen kardialen Fibroblastenisolierungen sowie um KM unbehandelter kardialer Fibroblasten in Kultur. Zum Vergleich mit dem Herzgewebe wurde eine Probe aus Lebergewebe vom Schwein herangezogen, da Lebergewebe viel MMP enthält und so auch zur Überprüfung der Methode diente. Die Zymogramme wurden jeweils dreimal unter denselben Bedingungen angefertigt (Triplikate). Die Ergebnisse der Reversen Zymographie zeigten keine TIMP-Aktivitäten bei allen Proben. Auch die Positivproben für TIMP-1/-2 zeigten keine Aktivitäten in der reversen Zymographie, so dass angenommen werden muss, dass die Methode nicht optimal funktioniert hat, obwohl sie wie oben beschrieben durchgeführt wurde. Der Proteaseverdau des Substrates im Gel war unter den beschriebenen Bedingungen reproduzierbar.

#### **4.3.2 Genexpression von TIMP nach Behandlung mit T3, Glukokortikoiden und Estrogen**

Da die TIMP-Aktivität nicht durch die reverse Zymographie gezeigt werden konnte wurde nur die Veränderung der Menge an spezifischer mRNA von TIMP nach Behandlung mit T3, Dexamethason und Estrogen mit der quantitativen real-time RT-PCR gemessen. Die Zellen wurden vier Tage lang unter serumfreien Konditionen in Zellkultur gehalten und jeden Tag mit frischem Medium, welches die Stimulatoren erhielt, versorgt. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Jedes Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Am 2. und am 4. Tag wurden jeweils behandelte Zellen und Kontrollen geerntet und die mRNA isoliert.

##### Keine Veränderung der Menge an spezifischer mRNA von TIMP-2, -3 und -4 durch T3:

Unter der Behandlung mit T3 zeigten TIMP-2, -3 und -4 keine Veränderung der spezifischen mRNA-Menge, die Menge an spezifischer mRNA von TIMP-1 sank leicht ab auf 0,8 relative Expression im Vergleich mit der Kontrolle von 1,0 relativer Expression.

##### Steigerung der Expression von TIMP-1 durch Dexamethason:

Unter der Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason zeigten TIMP-2, -3 und -4 keine Veränderung der Menge an spezifischer mRNA, die mRNA für TIMP-1 stieg an auf  $2,0 \pm 0,49$  SD relative Expression am 2. Behandlungstag und auf  $2,4 \pm 0,37$  relative Expression am



3. Behandlungstag im Vergleich mit der Kontrolle mit einer relativen Expression von 1 (siehe Abb. 4.11).

Keine Veränderung der Menge an spezifischer mRNA durch Estrogen: Bei der Behandlung mit Estrogen veränderte sich die Menge an spezifischer mRNA für TIMP-1-4 nicht.

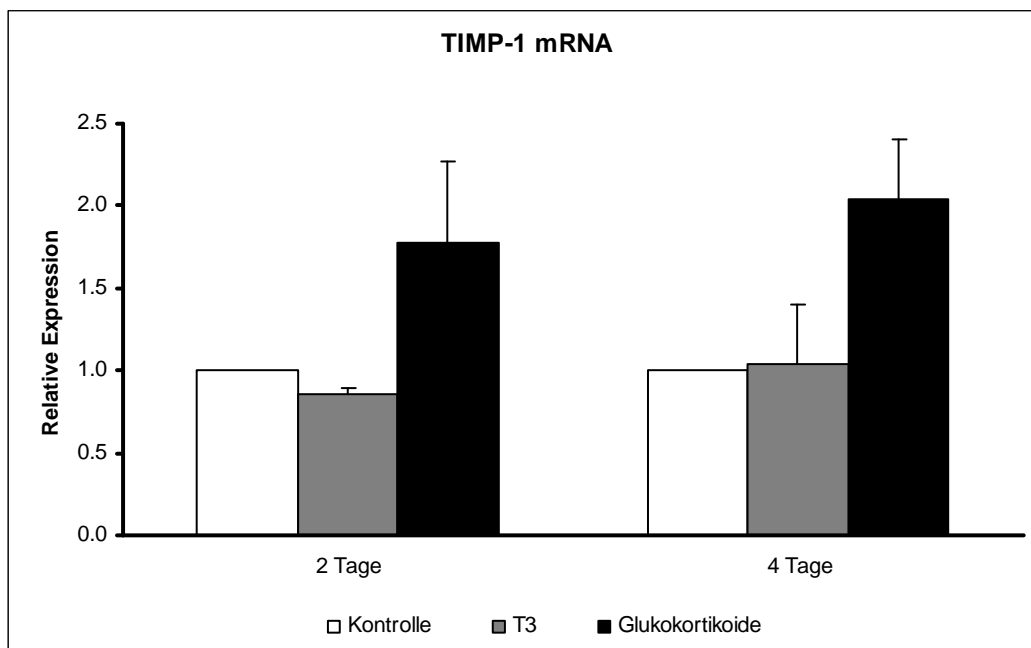


Abb. 4.11: TIMP-1 mRNA nach viertägiger Behandlung mit T3 (100 nM) und Dexamethason (100 nM) in primären kardialen Fibroblasten. Ernte jeweils am 2. und am 4. Tag. 2.Tag: T3:  $0,8 \pm 0,03$ ; Dexamethason:  $2 \pm 0,49$ . 4.Tag: T3:  $0,86 \pm 0,06$ ; Dexamethason:  $2,4 \pm 0,37$ . Angaben relative Expression als MW  $\pm$  SD (n = 3). Das Ergebnis ist nicht signifikant.

#### 4.3.3 TIMP-1 im Western Blot nach Behandlung mit T3 und Dexamethason

Um zu prüfen, ob die Veränderung der Menge an spezifischer mRNA von TIMP-1 nach Dexamethason-Behandlung auch eine Veränderung der Menge an TIMP-1-Protein bewirkt, wurden Western Blots angefertigt. Die Zellen wurden vier Tage lang unter serumfreien Bedingungen in Zellkultur gehalten und jeden Tag mit frischem Medium, welches die Stimulatoren erhielt, versorgt. Als Kontrolle galten unbehandelte Zellen die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Jedes Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Am 4. Tag wurden jeweils behandelte Zellen und Kontrollen geerntet homogenisiert. Die Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet, es handelte sich um Homogenate von Fibroblasten und KM aus dem Experiment mit den jeweiligen Kontrollen.

Verringerung der Menge an TIMP-1 durch T3: Effekte von T3 auf TIMP-1 waren nicht auf Genexpressionsebene, dafür aber auf Proteinebene sichtbar. Im Western Blot war der TIMP-1 Gehalt in den behandelten Fibroblasten auf 25% im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle gesunken, in Arbitrarität  $0,25 \pm 0,5$  SD im Vergleich mit der Kontrolle (siehe Abb. 4.12, 4.13). Bei KM konnte TIMP-1 nach T3-Behandlung im Western Blot nicht nachgewiesen werden.

Steigerung der Menge an TIMP-1 nach Dexamethason-Behandlung: Auf Proteinebene bestätigte sich das Ergebnis durch Western Blot-Analysen: Der TIMP-1 Gehalt in Fibroblasten war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um den Faktor 2,59 höher, densitometrisch gemessen  $2,59 \pm 4,3$  SD Arbitraritätseinheiten im Vergleich zur Kontrolle (1,0 Arbitraritätseinheiten). Im KM konnte TIMP-1 nach Dexamethason nachgewiesen werden, bei der Kontrollgruppe war das Ergebnis im Western Blot negativ (Daten werden nicht gezeigt).

Der Western Blot wurde zweimal unter den gleichen Bedingungen angefertigt. Die TIMP-1 Bande stellte bei 37 kDa dar (Vergleich mit TIMP-1 Positivkontrolle). Die Banden wurden mit der Densitometrie nach Stärke analysiert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus zwei Messungen des Programmes BioDocAnalyze (Biometra)  $\pm$  SD. Um zu zeigen, dass gleiche Proteinmengen in der Probe vorhanden waren, wurde die Membran jeweils noch einmal mit Anti- $\alpha$ -Aktin markiert (siehe Abb. 4.12). Eine Regulation von TIMP-1 in Herzfibroblasten durch T3 oder Glukokortikoiden wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

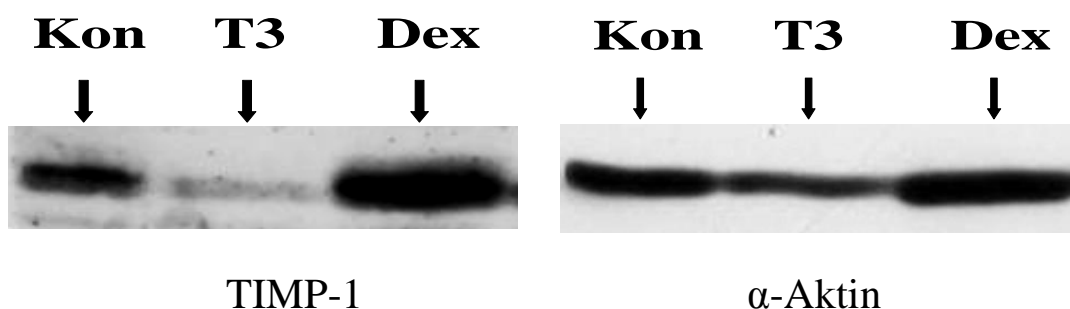


Abb. 4.12: TIMP-1-Protein im Western Blot nach viertägiger Behandlung mit T3 (100 nM) oder Dexamethason (100 nM). a) markiert mit Anti-TIMP-1; b) markiert mit Anti-  $\alpha$ -Aktin. Kon: Kontrolle

### Effekt von T3 und Glukokortikoiden auf TIMP-1

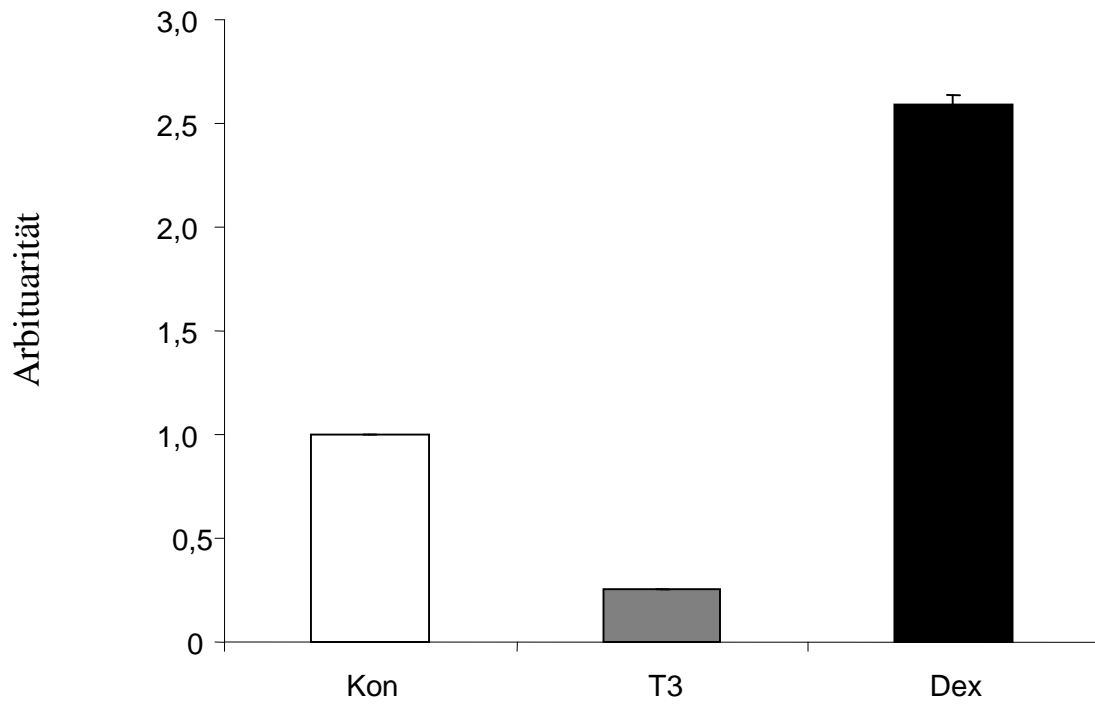


Abb. 4.13: TIMP-1-Protein in kardialen Fibroblasten nach zweitägiger Behandlung mit T3 (100 nM) oder Dexamethason (100 nM) im Western Blot. T3:  $0,25 \pm 0,05$ ; Dexamethason:  $2,59 \pm 0,43$ . Angaben in Arbitrarität als MW  $\pm$  SD (n = 2). Die Daten sind nicht signifikant, da n = 2.

## 5 Diskussion

### 5.1 MMP-2 im Herzgewebe

Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen mit nativem Ventrikelgewebe und KM bestätigen die Aussagen der Fachliteratur, dass MMP-2 die Haupt-MMP im Herzgewebe darstellt und ungebunden im Extrazellulärraum vorliegt (Brinckerhoff und Matrisian 2002), siehe Abb. 4.2 und 4.3. MMP-2 (Gelatinase A, 72 kDa-Gelatinase, Typ IV Kollagenase) gehört neben MMP-9 (Gelatinase B) zu den Gelatinasen. Die Gelatinasen unterscheiden sich von anderen MMP durch drei Fibronectin-ähnliche Repeats (*fibronectin-like* Domäne), die dem Kollagen-bindenden Teil des Fibronectins ähneln und mit deren Hilfe sie an die Kollagene und andere EZM-Bestandteile binden können, um sie zu schneiden (Steffensen et al. 1994). MMP-2 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert, während andere MMP nur nach bestimmten Reizen exprimiert werden. MMP-2 hat in seiner Proform ein Molekulargewicht von 72 kDa (ProMMP-2) bzw. nach Aktivierung 66 kDa. Das spezifische Substrat ist Gelatin, andere Substrate sind fragmentierte Kollagene Typ I und -IV, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, unfragmentierte Kollagene Typ V, VII und X und alle degradierten Kollagene. Weitere Substrate sind andere MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-13) und verschiedene bioaktive Faktoren wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$  und Interleukine. In vivo wird MMP-2 eine Rolle bei der Metastasierung (Degradation von Basalmembranen) und der allgemeinen Zellmigration zugesprochen, seine Substrate dabei sind aber größtenteils nicht genau bekannt (Sternlicht und Werb 2001). MMP-2 ist außerdem in der Lage, als Proform mit TIMP-2 einen Komplex zu bilden (Goldberg et al. 1989). Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass MMP-2 nicht nur in kardialen Fibroblasten und deren Medium vorkommt, sondern auch in Kardiomyozyten und deren Medium, wie bereits in der Literatur beschrieben (Coker et al. 1999). In Kardiomyozyten hat MMP-2 Einfluss auf die Prozessierung des kontraktile Apparates (Wang et al. 2002) und steuert neben der Integrität der Muskelfasern auch deren Kontraktions- und Dehnungsfähigkeit. Es liegt nahe, dass MMP-2 eine zentrale Rolle bei der EZM-Degradation spielt und so potenzielles Ziel eines regulatorischen Agens im Falle der Myokardfibrose sein könnte. Die Experimente untersuchen daher vor allem die Auswirkung der Behandlung auf die Aktivität von MMP-2.

### Abbildung 5.1 Teil 1: Regulationsmechanismen von MMP-Aktivität

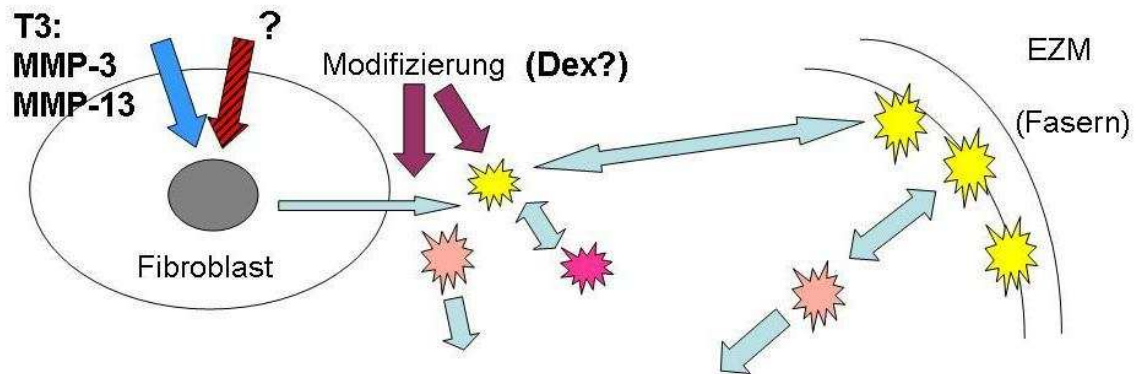
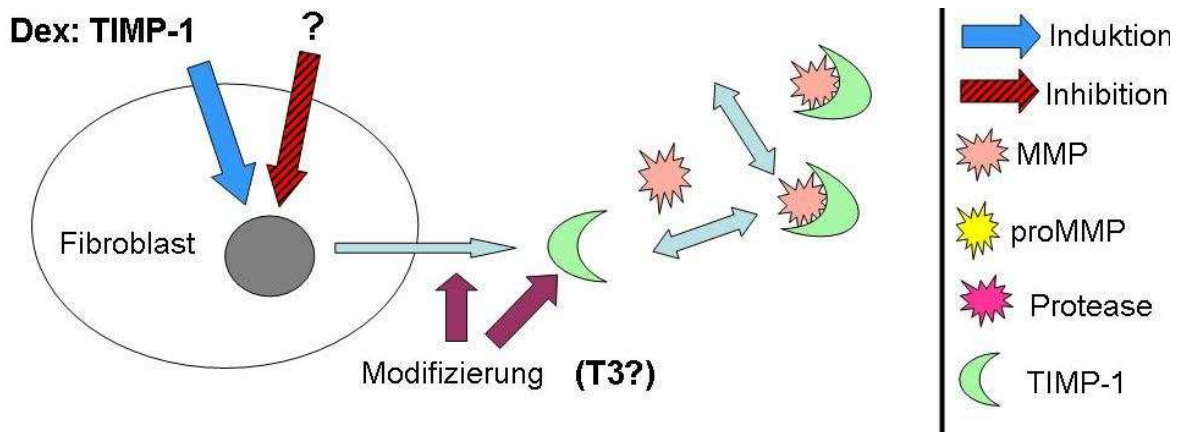


Abb. 5.1: Aktivierungsschema von nicht-gebundenen MMP. Nach Synthese im Fibroblasten werden proMMP und TIMP sezerniert. proMMP kann im Extrazellärraum durch andere freie MMP (MMP-3/MMP-13) aktiviert werden. proMMP-2 kann auch mit seiner fibronectin-like-Domäne an Komponenten der EZM binden und dort als Depot lagern, bis es durch freie MMP (MMP-3/13, MMP-2/9) aktiviert wird. Ein weiterer Aktivierungsweg spezifisch von proMMP-2 ist die Aktivierung durch Komplexbildung mit TIMP und MMP-14 (MT-MMP-1) an Zelloberflächen. Dieser Aktivierungsweg wird durch T3 und Glukokortikoide (Dexamethason = Dex) beeinflusst, neben Induktion und Repression am Zellkern gibt es noch einen Weg über die posttranslationalen Modifizierung von MMP und TIMP.



### Abbildung 5.1 Teil 2: Regulationsmechanismen von TIMP

#### 5.2 Regulation der Aktivität von MMP-2

Das wichtigste Kriterium zur Beurteilung einer Protease ist ihre Aktivität. Anders als bei anderen Proteinen führt bereits eine geringe Aktivitätssteigerung zu verstärkter Proteolyse, da Proteasen Mediatoren wie Zytokine und Proformen anderer Proteasen prozessieren können und so eine Art Schneeballeffekt entsteht.

Im Gegensatz zur unveränderten Expression spezifischer mRNA von MMP-2 zeigt die Substrat-Zymographie von MMP-2 eine leichte Aktivitätsminderung unter T3- und eine Steigerung der Aktivität unter Glukokortikoid-Behandlung (siehe Abb. 4.7, 4.8 a/b, 4.9 a/b). Im Hinblick auf die antifibrotische Wirkung von Glukokortikoiden ist das verständlich. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Resultaten wird in der Literatur eine Aktivitätsminderung von MMP durch Glukokortikoide beschrieben (Pross et al. 2002). Da die gesteigerte Aktivität nicht auf eine gesteigerte Expression von mRNA zurückzuführen ist, könnte es sich in diesem Fall um (i) Instabilität von mRNA oder um (ii) Aktivierung durch posttranslationale Modifizierung von MMP-2 handeln. Zum Modulieren der Aktivität von sezernierten MMP gibt es unterschiedliche Angriffspunkte: Änderung der Sekretion von proMMP, Mobilisierung oder Deposition von proMMP aus/in der EZM, Modulation der Autokatalyse, Aktivierung oder Hemmung von externen Aktivierungskaskaden (Kallikrein-Plasmin-System), Veränderung der Menge aktiver MMP in der EZM, Veränderung der Menge von Inhibitoren und schließlich die Modifizierung durch andere MMP, die eine Rolle bei der proMMP-Aktivierung spielen, wie MMP-3, MMP-13 und speziell für die Aktivierung von proMMP-2 MT-MMP und TIMP als Komplex (Itoh et al. 2001; Overall et al. 2000). In vivo wäre besonders die Mobilisation und Aktivierung von in der EZM gelagerten Zymogenen interessant, die einen schnellen, nicht-genomischen Effekt der Aktivitätsverstärkung darstellt (siehe Abb. 5.1). In der vorliegenden Arbeit ist eine Modifikation durch EZM-Material im Experiment nahezu ausgeschlossen, da die Zellkulturflaschen nicht gecoated waren und eine Beeinflussung durch externe Aktivierungskaskaden ist unwahrscheinlich, da die Zellen in serumfreien Zellmedien gehalten wurden.

### **5.3 MMP-9 als Ziel regulatorischer Hormone**

Zu MMP-9 gibt es in der Literatur unterschiedliche Meinungen. In verschiedenen Untersuchungen wurde MMP-9 in „gesunden“ unbehandelten Zellpopulationen des Herzens gefunden (Eberhardt et al. 2002; Etoh et al. 2001), andere Autoren beschrieben MMP-9 nur in Geweben von erkrankten Herzen oder bei pathologischen Prozessen (Coker et al. 1997; Moshal et al. 2005). Eine weitere These besagt, MMP-9 im Herzgewebe stamme von eingewanderten Immunzellen (Danielsen et al. 1998) oder ortsständigen Mastzellen (Spinale et al. 2002a). Kwan et al. konnten zeigen, dass MMP-9 in Kardiomyozyten vorkommt und dort eine Rolle bei der Prozessierung der DNA spielt und vermuten eine Rolle von MMP-9 im Stoffwechsel von Zytoskelettbestandteilen (Kwan et

al. 2004). Der Nachweis der Aktivität von MMP-9 im Konditionierten Medium gelang in einer einzigen Linie kardialer Fibroblasten, das Ergebnis war reproduzierbar und der Nachweis gelang auch nach mehreren Passagierungen der Zellen. Dass es sich dabei um MMP-9 aus eingewanderten Immunzellen handeln könnte ist sehr unwahrscheinlich, da nach mehreren Passagen keine Immunzellen mehr in der Kultur erwartet werden können. Tsuruda et al. konnten zeigen, dass MMP-9 von Fibroblasten produziert wird, die sich in Myofibroblasten umgewandelt haben und Streßfasern ausbilden (Tsuruda et al. 2002). In der Literatur wird auch von „aktivierten Fibroblasten“ synonym zu Myofibroblasten gesprochen (Powell et al. 1999). In dieser einen Zelllinie könnte es sich um Myofibroblasten handeln, ein sicherer Nachweis durch Immunhistochemie liegt aber nicht vor. Außerdem gelang der Nachweis von MMP-9 durch Aktivität im Gelatin-Zymogramm bei 90-100 kDa (Molekulargewicht von MMP-9) in Leberhomogenaten, Homogenaten vom linken Ventrikel und von isolierten Kardiomyozyten und im Western Blot von Kardiomyozyten. Das untermauert die These von Kwan et al., dass MMP-9 intrazellulär in Kardiomyozyten vorkommt und nicht sezerniert wird (Kwan et al. 2004). Damit scheidet MMP-9 als Angriffspunkt für hormonelle Regulation bei der Entstehung der interstitiellen Fibrose aus.

#### **5.4 Effekte von Estrogen, Testosteron und TNF $\alpha$**

Es gibt in der Literatur Hinweise auf die Regulation von MMP-2 durch Estrogen (Marin-Castaño et al. 2003) und Androgene (Liao et al. 2003) mit der Folge einer EZM-Akkumulation. In kardialen Fibroblasten gibt es aktive Estrogenrezeptoren (Pelzer et al. 1997). Seit längerem wird ein „Kardioprotektiver Effekt“ von Estrogen vermutet und im Promotor einiger MMP wurde ein ERE (Estrogen-responsives Element) gefunden (Marin-Castaño et al. 2003). Die vorliegenden Ergebnisse konnten die These einer MMP-Regulation durch Androgen oder Estrogen nicht bestätigen: auf die Genexpression von MMP-2 hatte weder Estrogen noch Testosteron einen Effekt (siehe Kapitel 4.2.7). Die Aktivität von MMP-2 wurde nur unwesentlich beeinflusst (siehe Kapitel 4.2.7) und die Genexpression des Inhibitors TIMP-1 zeigte auch keine Regulation durch Estrogen (siehe Kapitel 4.3.2). Testosteron zeigte allenfalls eine leichte Aktivitätssteigerung von MMP-2 (siehe Kapitel 4.2.7). Künftige Experimente könnten diesen Ansatz weiter verfolgen. Für TNF $\alpha$  ist eine Steigerung der Aktivität von MMP (Siwik et al. 2000) und von MMP-2 in Fibroblasten beschrieben worden (Eberhardt et al. 2002). Die kurze Behandlungsdauer (24 h) wäre ausreichend, um einen Effekt zu erzielen, die Steigerung der MMP-2-Aktivität

fiel allerdings geringer aus als erwartet (siehe Kapitel 4.2.7). Da TNF $\alpha$  zu den Substraten von MMP-2 zählt könnte auch eine Stimulation der MMP-2-Synthese und danach eine Degradation von TNF $\alpha$  im Medium stattgefunden haben (Gearing et al. 1994).

### **5.5 Effekte von Glukokortikoiden**

Die Arbeitshypothese besagt, dass ein antifibrotischer Effekt von T3 auf eine Steigerung der Genexpression oder der Aktivität von MMP zurückzuführen wäre. Im Falle der gezeigten Aktivitätssteigerung durch Glukokortikoid-Behandlung (siehe Abb. 4.7) könnte es durch vermehrt synthetisierte MMP-3 oder andere nicht untersuchte MMP zu einer Aktivierung von sezerniertem proMMP-2 gekommen sein und so zu vermehrter gelatinolytischer Aktivität im Zymogramm. Ein indirekter Effekt von Glukokortikoiden könnte aber genauso gut möglich sein, da Glukokortikoide über ein GRE und mit AP-1 die MMP -13 und -3 regulieren können (Tuckerman et al.1999).

### **5.6 Effekte von T3**

MMP-2: Im Modell der kardialen Fibroblasten wurde die MMP-2-Genexpression nach Behandlung mit T3 mit der empfindlichen und präzisen RT-PCR gemessen. Der vermutete T3-Effekt auf die Fibroblasten wurde als Steigerung der MMP-2-Expression erwartet, da MMP-2 im Herzen unter den MMP dominiert. Doch die Ergebnisse (siehe Abb. 4.5) zeigten keinerlei Veränderung der MMP-2-Expressionsrate. Die Rolle von T3 bei der Modifikation der Aktivität von MMP-2 bleibt unklar- die erwartete Aktivitätssteigerung der Arbeitshypothese blieb aus, im Gegenteil dazu wurde die Aktivität der Protease auch noch leicht gehemmt. Wenn man von einer Regulation von MMP-2 als wichtigstem Stellglied bei der Entstehung der interstitiellen Fibrose ausgehen würde, zeigte T3 in vitro also keinen antifibrotischen Effekt, weder auf Genexpressions-, noch auf Aktivitätsebene. Ziegelhöffner-Mihalovičková et al. konnten ebenfalls keine Veränderung der Aktivität von MMP-2 unter Behandlung mit T3 feststellen (Ziegelhöffner-Mihalovičková et al. 2002).

MMP-3 und MMP-13: Die Induktion von MMP-13, einer Kollagenase, und MMP-3, ein Stromelysin, welches eine Schlüsselrolle in der Aktivierung anderer latenter MMP spielt, durch T3 (siehe Kapitel 4.2.5, Abb. 4.6) gibt der Hypothese einer DNA-abhängigen T3-Regulation von MMP eine neue Perspektive. Beide MMP verfügen über ein TRE und gehören damit zu potenziellen Zielen einer Regulation durch T3 (Iudwig et al. 2000). Interessant ist außerdem, daß der Effekt nicht in den ersten Tagen der Behandlung auftritt



sondern erst im Langzeitexperiment über 7 Tage sichtbar wird. Wenn man bedenkt dass die Klinik einer Hypothyreose sich erst aus einem langen Stadium der latenten hypothyreoten Stoffwechsellage entwickelt und die Rückbildung hypothyreoter Symptome erst nach längerer Behandlung mit L-Thyroxin stattfindet paßt die Hypothese gut mit den Resultaten zusammen. Das Degradationssystem des kardialen Bindegewebes besteht aus mehreren MMP-Subtypen. Der in vivo gezeigte T3-Effekt (Rückbildung der Fibrose nach T3-Gabe) könnte also nicht nur von der MMP-2-Aktivität abhängen, sondern vielmehr von der Aktivität der Kollagenasen (MMP-1, MMP-13) und der Stromelysine (MMP-3). Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Kapitel 1.3) findet bei der myokardialen Fibrose ein „Switch“ der Kollagenproduktion im Fibroblasten statt (Weber et al. 1987) und es wird vermehrt Kollagen Typ I und weniger Elastin und Kollagen Typ IV synthetisiert. Gelatinasen wie MMP-2 sind zwar auch bedingt in der Lage Kollagen Typ I abzubauen, doch Kollagen Typ I ist das spezifische Substrat der Kollagenasen, die als einzige MMP in der Lage sind, seine native Form zu prozessieren. Neben MMP-2 sind MMP-1 und -3 die Schlüsselenzyme des Abbaus fibrillärer Kollagene (He te al. 1989; Woessner et al. 1991). Es wäre daher denkbar, dass Schilddrüsenhormone passend zur negativen Regulation der pro-Kollagen Typ I-Synthese zusätzlich und synergistisch die Kollagenasen und MMP-3 positiv regulieren könnten. Es würde also auch im Degradationssystem der EZM zu einem „Switch“ der MMP-Produktion kommen und zusätzlich zu konstitutiv exprimiertem MMP würden Kollagenasen induziert, die sonst nicht oder nur wenig exprimiert werden. Stromelysine haben viele Substrate und können weitere MMP aktivieren und Bestandteile der EZM degradieren und stellen so ein wichtiges Stellglied in der Aktivierungskaskade der Proteasen in der EZM dar (siehe Abb. 5.1). Durch MMP-3 wird bevorzugt MMP-1 aktiviert, das Schlüsselenzym des Kollagen Typ I-Abbaus (Birkedal-Hansen et al. 1992; Woessner et al. 1991). Ihre Rolle ist durch fehlende Aktivitätsuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht klar definiert, möglicherweise aktivieren sie ebenfalls vermehrt die Kollagenasen MMP-13 und vor allem MMP-1 wie bereits beschrieben.

### **5.7 TIMP-1 als Ziel regulatorischer Hormone**

Die Genexpression bestimmter TIMP-Subtypen variiert im Herzgewebe (siehe Tab. 1.4), das Expressionsmuster ändert sich im pathologisch veränderten Herzen (Li et al. 1998). Je nach stöchiometrischem Verhältnis zueinander inhibiert TIMP aktive MT-MMP oder bildet mit aktiven MT-MMP und proMMP-2 einen Komplex zur Aktivierung von proMMP-2. Wenn TIMP in einer gleichen oder größeren Menge vorliegt bildet TIMP mit

MT-MMP 1:1 Komplexe und ist damit inaktiv. Wenn weniger TIMP vorhanden ist, kann MMP-2 durch oben genannte Komplexbildung effektiver aktiviert werden. Dazu kommt, dass vor allem TIMP-2 eine hohe Affinität zu proMMP-2 hat. TIMP spielen hier, ähnlich wie MMP-2, eine Schlüsselrolle in der Regulation der EZM-Degradation. Diese Inhibierungs-Aktivierungstheorie war bisher für MT-MMP-1, TIMP-2 und proMMP-2 bekannt (Strongin et al. 1995). Die Ergebnisse der mRNA-Analyse von MT-MMP-1 zeigten keine Veränderungen unter T3- oder Glukokortikoidbehandlung, ebensowenig die Ergebnisse für TIMP-2 bis -4 (siehe Kapitel 4.3.2).

Glukokortikoide: Als einziger Inhibitor wurde TIMP-1 durch Glukokortikoid-Behandlung auf mRNA-Ebene induziert und auch auf Proteinebene fand eine Mengenvermehrung statt. Dies lässt die Vermutung zu, TIMP-1 könnte wie TIMP-2 eine Rolle bei Aktivierung von MMP-2 spielen, da MMP-2 unter Glukokortikoidbehandlung nicht vermehrt exprimiert wird und trotzdem eine gesteigerte Aktivität zeigt. Möglicherweise schützt sich die „gestresste“ Zelle unter Glukokortikoid-Einfluss auch mit präventiver Synthese eines (wenig spezifischen) Inhibitors vor Selbstverdau.

T3: Interessanterweise zeigte sich auf Proteinebene auch eine Reduktion von TIMP-1-Menge nach T3-Behandlung bei unverändertem Spiegel spezifischer mRNA. Gründe dafür könnten verstärkter Abbau von TIMP-1 sein, Bindung von TIMP an Membranstrukturen oder Komplexbildung von MMP. Passend zur Arbeitshypothese einer antifibrotischen Potenz von T3 wäre die Verminderung der Menge an Inhibitoren und dadurch verstärkte proteolytische Aktivität von MMP. Nimmt man an, dass nicht MMP-2, sondern MMP-13 und MMP-3 durch T3 reguliert würden, könnte es nach Abbau von TIMP-1 zu verstärkter Aktivität beider MMP kommen, die nicht untersucht wurde. Wie bereits erwähnt bildet vorwiegend TIMP-2 Komplexe mit MMP-2, TIMP-1 hat eine höhere Affinität zu MMP-9 und besonders zu MMP-3 (Gomez et al. 1997).

## **5.8 Schlussfolgerung**

Der Mechanismus der myokardialen Fibrose bei Hypothyreose ist kompliziert und erst teilweise aufgeklärt. Einer der Teilaspekte dabei ist offensichtlich die positive Regulation von MMP durch Schilddrüsenhormone (siehe Abb. 4.6), die bei Hypothyreose nicht stattfinden kann. Dabei induziert T3 nicht die konstitutiv exprimierte Gelatinase MMP-2, sondern die Kollagenase MMP-13 und das Stromelysin MMP-3. Zusätzlich kommt es durch einen noch unbekanntem Mechanismus zur Reduktion von TIMP-1 mit vermuteter konsekutiver Wirksamkeitsverstärkung von MMP (siehe Kapitel 4.3.3, Abb. 4.12, 4.13).

War an Befunden an Mausosteoblasten ein solches Ergebnis schon vermutete worden (Pereira et al. 1999), so ist er jetzt erstmals experimentell mit molekularbiologischen Techniken belegt worden. Unter Berücksichtigung der Veränderung der Zusammensetzung myokardialer EZM bei interstieller Fibrose (vermehrte Deposition von Kollagen Typ I, verminderte Synthese von Kollagen Typ IV und Elastin) kommt es durch T3-Behandlung zu einer spezifischen Reaktion auf diese Art der Fibrose mit Bereitstellung der passenden proteolytischen Enzyme zum Abbau von Kollagen Typ I bzw. zur Aktivierung weiterer benötigter MMP. Als gängiges Medikament mit antientzündlicher- und antifibrotischer Wirkung, dessen Wirkmechanismus ebenfalls erst teilweise untersucht worden ist, verstärkt das Glukokortikoid Dexamethason die Aktivität von MMP-2; MMP-2 spielt als konstitutiv exprimierte Protease bei der Entstehung der Herzfibrose offensichtlich keine Rolle, im Unterschied zu anderen Fibrosen wie Beispielsweise der Lungenfibrose (Hayashi T et al. 1996).

## **5.9 Ausblick**

Kardiomyopathien durch Remodeling des Myokard spielen eine wichtige Rolle in der interventionellen Kardiologie. Die Möglichkeiten der rein symptomatischen Therapie sind begrenzt und in vielen Fällen hilft nur noch die Herztransplantation, für multimorbide Patienten ein sehr riskanter Eingriff. Risikoreduktion wie beispielsweise eine gute Einstellung des arteriellen Hypertonus können das Geweberemodelling aufhalten und teilweise rückgängig machen, ebenso eine Behandlung mit Proteaseinhibitoren wie ACE-Hemmern. Auch die Myokardfibrose bei der Hypothyreose als Grunderkrankung ist reversibel: wie die in dieser Arbeit dargestellten Befunde zeigen, könnte ein möglicher Grund dafür eine selektive Induktion von MMP sein, deren spezifisches Substrat das vermehrt anfallende Kollagen Typ I ist. Weitere umfangreiche Versuchsreihen mit MMP-1 und MMP-13 und anderen Kollagenasen in vitro könnten dies bestätigen. Was das Herausarbeiten der molekularen Mechanismen betrifft, könnte eine Transfektion von kardialen Fibroblasten und Kardiomyozyten mit Genen für MMP-1, -13 und TIMP-1 nützlich sein. Das könnte zeigen, dass T3 die Expression der genannten MMP und TIMP-1 induziert bzw. steigert. Promotor-Studien könnten weitere TRE in MMP identifizieren und die Funktionalität von T3-Rezeptoren an Promotoren von MMP beweisen. Interessant wäre auch das ergänzende Screening von Proben aus den Herzen hypothyreoter Tiere auf MMP-1 und MMP-13 und der Vergleich mit Proben aus erkrankten menschlichen Explantat- Herzen mit interstitieller Fibrose. Klinisch könnte ein Screening von Patientenserum auf

MMP-1, -13 und TIMP-1 im Vergleich mit den T4 / T3-Spiegeln durchgeführt werden: man würde erwarten, dass die Spiegel von MMP-1, MMP-13 und TIMP mit der Höhe der T3/T4-Spiegel korrelieren. Eine Prophylaxe des myokardialen Remodelings mit Schilddrüsenhormonen wäre klinisch denk- und machbar, auch eine Verwendung von wirksamen Analoga von Schilddrüsenhormonen. Fraglich wäre eine ausreichende Dosierung ohne eine Klinik der Hyperthyreose mit Kachexie und Tachykardie, welche für herzkranken Patienten unter Umständen tödlich verlaufen könnte.

## 6 Zusammenfassung

Eine länger bestehende Hypothyreose mit niedrigen Serumspiegeln des Schilddrüsenhormons T3 kann zur Myokardfibrose führen und dadurch erst eine diastolische Dysfunktion und letztendlich eine Herzinsuffizienz hervorrufen.

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind nur teilweise geklärt, es resultiert letztendlich eine Zunahme von Kollagenfasern und eine Änderung der Faserqualitäten der extrazellulären Matrix (EZM) des Bindegewebes im Herzmuskel. Die Bestandteile der EZM werden wie auch ihre abbauenden Proteasen, die Matrix Metalloproteinasen (MMP), von Fibroblasten synthetisiert. Eine T3-abhängige Regulation konnte für die Kollagensynthese gezeigt werden. Der Einfluss von T3 auf das MMP/TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) -System ist noch weitestgehend unbekannt. Um den hormonellen Einfluss von T3 auf die Aktivität der kardialen MMP zu untersuchen wurde ein Modell aus primären kardialen Fibroblasten vom adulten Schwein entwickelt. In diesem Zellmodell wurde im Vergleich der Einfluss von Glukokortikoiden, Estrogenen, Testosteron, dem Zytokin TNF $\alpha$  und T3 auf die Aktivität und Genexpression des MMP/TIMP-Systems untersucht.

Zum Nachweis spezifischer mRNA wurde die real-time-RT-PCR durchgeführt. Sowohl im Herzgewebe als auch in den kultivierten Fibroblasten konnten zwei Gelatinasen (MMP-2 und -9), zwei Kollagenasen (MMP-1 und -13), das Stromelysin MMP-3, die membrangebundene MT-MMP MMP-14 und TIMP-1 bis -4 nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Aktivität verschiedener MMP wurde die (Substrat-)Zymographie eingesetzt. Je nach eingesetztem Substrat können Gelatinasen, Kollagenasen oder auch die Kaseinolytische Aktivität von MMP-3 nachgewiesen werden. Da die MMP größtenteils in den Extrazellulärraum sezerniert werden wurde auch das Kultivierungsmedium der Zellen („konditioniertes Medium“) auf dessen gelatinolytische Aktivität hin untersucht.

Die Glukokortikoid-Stimulation führte zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung von MMP-2, die aber nicht auf eine Veränderung der Genexpression zurückzuführen war. Auch nach einer viertägigen Stimulation führten Glukokortikoide zu keiner deutlichen Veränderung der MMP-Genexpression, induzierten aber bereits nach einem Tag den Inhibitor TIMP-1. Diese Induktion konnte auch an den folgenden Tagen der Stimulation auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt werden. Die Behandlung mit Estrogen und Testosteron ergab eine nicht signifikante Aktivitätssteigerung von MMP-2, nach

Behandlung der Fibroblasten mit TNF $\alpha$  zeigte sich kaseinolytische Aktivität entsprechend dem Molekulargewicht von MMP-3.

Die Stimulation der Fibroblasten mit T3 über vier Tage zeigte eine leichte Aktivitätsminderung im Zymogramm und ebenfalls keine Veränderung der Menge an spezifischer MMP-mRNA. Erst nach einer Behandlung über 7 Tage in einem Hormon-freien Kulturmedium konnte für MMP-3 und MMP-13 eine signifikante Induktion durch T3 nachgewiesen werden. Diese Induktionen sind von besonderem Interesse, da beide MMP dafür bekannt sind, andere MMP zu aktivieren und eine Affinität zu Kollagen Typ-I haben. Darüber hinaus konnte auf Proteinebene mittels Western Blot eine starke Abnahme von TIMP-1 in den Fibroblasten nach viertägiger Behandlung mit T3 nachgewiesen werden. Insgesamt führen diese Veränderungen des MMP/TIMP-Systems zu einer erhöhten MMP Aktivität im Herzen sowie zu einem veränderten Affinitätsmuster für Kollagentypen passend zum Remodeling des Herzens bei interstitieller Fibrose.

Das wesentliche Ergebnis der Arbeit ist der Beweis einer hormonellen Regulation des MMP/TIMP-Systems im Herzgewebe. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind von komplexer Natur und beinhalten unter anderem posttranslationale Modifikationen.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit ein weiterer Mechanismus der antifibrotischen Wirkung von T3 über die Induktion der Kollagenase MMP-13 und des Stromelysins MMP-3 dargestellt werden.

## 7 Abkürzungen

AP-1: *activator protein-1*  
APS: Ammoniumpersulfat  
BDM: *2,3-Butanedione monoxime*  
BSA: Rinderalbumin (*bovine serum albumin*)  
DEPC: Diethylpyrocarbonat  
Dex: Dexamethason  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
DNA: Desoxyribonukleinsäure  
ECL: *enhanced chemiluminescence*  
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure  
ERE: responsives Element für Estrogene (*estrogen responsive element*)  
Ets: *erythroblastosis twenty six*  
EZM: extrazelluläre Matrix  
FCS: foetales Kälberserum (*fetal calf serum*)  
GRE: responsives Element für Glukokortikoide (*glucocorticoid responsive element*)  
h: Stunde  
HEPES: *N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure*  
IU: Enzymeinheit (*international units*)  
kDa: Kilodalton  
KM: Konditioniertes Medium  
Kon: Kontrolle  
l: Liter  
LAD: *left anterior descending artery*, A. interventricularis anterior  
mA: Milliampere  
min: Minuten  
MMP: Matrix Metalloproteinase  
mRNA: *messenger RNA* (Ribonukleinsäure)  
MT-MMP: *membrane type-matrix metalloproteinase*  
NFκB: *nuclear factor κ B*  
OD: optische Dichte  
PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
PBS: Phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung  
RNA: Ribonukleinsäure  
RP: Rettichperoxidase  
rpm: *rounds per minit*, Umdrehung pro Minute  
R-Sätze: Gefahrenhinweise  
RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)  
SD: Standardabweichung (*standard deviation*)  
SDS: Natriumdodecylsulfat (*sodiumdodecylsulfate*)  
sec: Sekunden  
S-Sätze: Sicherheitshinweise  
TBS: Trispuffergepufferte physiologische NaCl-Lösung  
T3: 3,5,3'-Triiod-L-thyronin  
T4: 3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin  
TEMED: N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin  
TIMP: *tissue inhibitor of metalloproteinases*  
TR: Schilddrüsenhormonrezeptor (*thyroid hormone receptor*)  
TRE: responsives Element für Schilddrüsenhormone (*thyroid hormone responsive element*)  
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
V: Volt

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 **Agocha A E**, Eghbali-Webb M. 1995. Molecular mechanisms of the remodeling of collagen matrix in the heart. In: Eghbali-Webb M (ed): Molecular Biology of Collagen Matrix in the heart. R.G. Landes Publishing Company, Austin, Texas. Springer Verlag
- 2 **Anversa P**, Olivetti G, Melissari M, Loud A V. 1980. Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat. *J Mol Cell Cardiol* **12**:781-95
- 3 **Aumailley M**, Gayraud B. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* **76**:253-65
- 4 **Baandrup U**, Ledet T, Rasch R. 1981. Experimental diabetic cardiomyopathy preventable by insulin treatment. *Lab Invest* **45**:169-73
- 5 **Barrett A J**, Rawlings N D, Woessner J F. 1998. In: Barrett A J, Rawlings N D, Woessner J F (Hrsg.). Academic Press, London (Handbook of Proteolytic Enzymes, S 1167-79)
- 6 **Birkedal-Hansen H**, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J. 1992. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**:197-250
- 7 **Bradford M M**. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54
- 8 **Brilla C G**, Janicki J S, Weber K T. 1991. Cardioprotective effects of lisinopril in rats with genetic hypertension. *Circulation* **83**: 1771-79
- 9 **Brinckerhoff C E**, Matrisian L M. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Bio* **3**: 207-14. Review
- 10 **Bültmann B D**, Kirkpatrick C J, Roessner A, Schneider J. 2001. Kapitel 19.5: Myokard. In: Böcker, Denk, Heitz (Hrsg.) Kapitel Herz, spezielle Pathologie. Urban & Fischer, München Jena (Pathologie, 2. Neubearb. Aufl., S 455-57)
- 11 **Butler G S**, Butler M J, Atkinson S J, Will J, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, Pia d'Ortho M, Murphy G. 1998. The TIMP2 Membrane Type Metalloproteinase „Receptor“ Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A. *J Biol Chem* **273**: 871-80
- 12 **Caulfield J B**, Borg T K. 1979. The collagen network of the heart. *Lab Invest* **40**:364-72
- 13 **Chen WJ**, Lin KH, Lee YS. 2000. Molecular characterization of myocardial fibrosis during hypothyroidism: evidence for negative regulation of the pro- $\alpha 1(I)$  collagen gene expression by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* **162**:45-55
- 14 **Coker M L**, Doscher M A, Thomas C V, Galis Z S, Spinale F G. 1999. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol* **277**: H777-87
- 15 **Coker M L**, Jolly J R, Joffs C, Etoh T, Holder J R, Bond B R, Spinale F G. 2001. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H543-51
- 16 **Danielsen C C**, Wiggers H, Andersen H R. 1998. Increased Amounts of Collagenase and Gelatinase in Porcine Myocardium Following Ischemia and Reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 1431-42
- 17 **Doering C W**, Jalil J E, Janicki J S, Pick R, Aghili S, Abrahams C, Weber T K. 1988. Collagen network remodeling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res* **22**:686-95



- 18 **Drenckhahn D.** 1994. Muskelgewebe. In: Benninghoff (Hrsg.), Systematik der Gewebe. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore (Anatomie, 15. Neubearb. Aufl., Bd I, S 167-97)
- 19 **Drenckhahn D,** Kugler P. 1994. Bindegewebe. In: Benninghoff (Hrsg.), Systematik der Gewebe. Urban & Schwarzenberg München Wien Baltimore. (Anatomie, 15. Neubearb. Aufl., Bd I, S 124-41)
- 20 **Eberhardt W,** Schulze M, Engels C, Klasmeier E, and Pfeilschifter J. 2002. Glucocorticoid-Mediated Suppression of Cytokine-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Rat Mesangial Cells: Involvement of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Ets Transcription Factors. *Mol Endocrinol* **16**:1752-66
- 21 **Etoh T,** Joffs C, Deschamps A M, Davis J, Dowdy K, Hendrick J, Baicu S, Murkherjee R, Manhaini M, Spinale F G. 2001. Myocardial and interstitial matrix metalloproteinase activity after acute myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**: H987-94
- 22 **Factor S M,** Minase T, Sonnenblick E H. 1980. Clinical and morphological features of human hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J* **99**:446-58
- 23 **Ferrans V J,** Thiedemann K U. 1983. Ultrastructure of the normal heart. In: Silver MD (Hrsg.) Churchill Livingstone, New York. (Cardiovascular Pathology, Bd. I, S 31-86)
- 24 **Fleischhauer K.** 1994. Herz-Kreislaufsystem.. In: Benninghoff (Hrsg.), Das Herz. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore (Anatomie, 15. Neubearb. Aufl., Bd I, S 617-50)
- 25 **Gearing A J,** Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson A H, Drummond A H, Galloway W A, Gilbert R, Gordon J L, Leber T M, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood, L M, Woolley, K. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**: 555-57
- 26 **Goldberg G I,** Marmer B L, Grant G A, Eisen A Z, Wilhelm S, He C S. 1989. Human 72-kilodalton collagen type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8207-11
- 27 **Gomez D E,** Alonso D F, Yoshiji H, Thorgeirsson U P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur Cell Biol* **74**: 111-22
- 28 **Goto S,** Miyazaki K, Funabiki T, Yasumitsu H. 1999. Serum-Free Culture Conditions for Analysis of Secretory Proteinases during Myogenic Differentiation of Mouse C2C12 Myoblasts. *Anal Biochem* **272**: 135-42
- 29 **Hawkes S P,** Li H, Taniguchi G T. 2001. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol Biol* **151**: 399-410
- 30 **Hayashi T,** Stetler-Stevenson W G, Fleming M V, Fishback N, Koss M N, Liotta A L, Ferrans V J, Travis W D. 1996. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **149**: 1241-56
- 31 **Hayashi Y,** Janssen O E, Weiss R E, Murata Y, Seo H, Refetoff, S. 1993. The relative expression of mutant and normal thyroid hormone receptor genes in patients with generalized resistance to thyroid hormone determined by estimation their specific messenger ribonucleic acid products. *J Clin Endocrinol Metab* **76**: 64-69
- 32 **He C,** Wilhelm S, Pentland A, Marmer B, Grant G, Eisen A, Goldberg G. 1989. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2632 -36
- 33 **Henriet P,** Blavier L, Declerck J A. 1999. Tissue inhibitors of metalloproteinase

- (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* **107**:111-19
- 34 **Itoh Y**, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. 2001. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* **20**: 4782-93
  - 35 **Jameson L J**, Weetman A P. 2003. Erkrankungen der Schilddrüse. In: M Dietel, J Dudenhausen, N Suttorp, E Braunwald, A S Fauci, D L Kasper, S L Hauser, D L Longo, J L Jameson (Hrsg). Endokrinologie. McGraw-Hill/ABW Wissenschaftsverlag, Deutschland-Österreich (Harrisons Innere Medizin, 15. Neubearb. Aufl., Bd. II, S 2255-59)
  - 36 **Karim M A**, Ferguson A G, Wakim B T, Samarel A M. 1991. In vivo collagen turnover during development of thyroxine-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* **260**:C316-26
  - 37 **Klein I**, Ojamaa K. 2001. Thyroid Hormone-Targeting the Heart. Review. *Endocrinology* **142**: 11-12.
  - 38 **Klein L E**, Sigel A V, Douglas J A, Eghbali-Webb M. 1995. Upregulation of Collagen Type I Gene Expression in the Ventricular Myocardium of Thyroidectomized Male and Female Rats. *J Mol Cell Cardiol* **28**:33-42
  - 39 **Kwan J A**, Schulze C J, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims D E, Sawicki G, Schulz R. 2004. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J* **18**: 690-92
  - 40 **Laemmli U K**. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85
  - 41 **Lazar M A**. 1993. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. Review. *Endocr Rev* **14**:184-93
  - 42 **Lee H W**, Klein L E, Raser J, Eghbali-Webb M. 1998. An activator protein-1 (AP-1) response element on pro alpha1(I) collagen gene is necessary for thyroid hormone-induced inhibition of promoter activity in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 2495-506
  - 43 **Liao X**, Thrasher J B, Pelling J, Holzbeierlein J, Sang QX A, Li B. 2003. Androgen Stimulates Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Human Prostate Cancer. *Endocrinology* **144**: 1656-63
  - 44 **Li Y Y**, Feldman A M, Sun Y, McTiernan C F. 1998. Differential Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Failing Human Heart. *Circulation* **98**:1728-34
  - 45 **Lindsey M L**, Goshorn D K, Squires C E, Escobar G P, Hendrick J W, Mingoa J T, Sweterlitsch S E, Spinale F G. 2005. Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc Res* **66**: 410-19
  - 46 **Lohi J**, Wilson C L, Rody J D, Parks W C. 2001. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J Biol Chem* **276**: 10134-44
  - 47 **Ludwig M G**, Basset P, Anglard P. 2000. Multiple Regulatory Elements in the Murine Stromelysin-3 Promoter. *J Biol Chem* **275**: 39981-90
  - 48 **Mall G**, Mattfeldt T, Möbius H J, Leonhard R. 1986. Stereological study on the rat heart in chronic alimentary thiamine deficiency- absence of myocardial changes despite starvation. *J Mol Cell Cardiol* **18**:193-201
  - 49 **Mall G**, Rambausek M, Neumeister A, Kollmar S, Vetterlein F, Ritz E. 1988. Myokardial interstitial fibrosis in experimental uremia-implications for cardiac compliance. *Kidney Int* **33**:804-11
  - 50 **Marin-Castaño M E**, Elliot S J, Potier M, Karl M, Striker L J, Striker G E, Csaky K

- G, Cousins S W. 2003. Regulation of Estrogen Receptor and MMP-2 Expression by Estrogens in Human Retinal Pigment Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 50-59
- 51 McCawley L J**, Matrisian L M. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* **13**:534-40
- 52 Moshal K S**, Tyagi N, Moss V, Henderson B, Steed M, Ovechkin A, Aru G M, Tyagi S G. 2005. Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure. *J Cell Mol Med* **9**: 704-13
- 53 Nagase H**, J F Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**:21491-94
- 54 Oliver G W**, Leferson J D, Stetler-Stevenson W G, Kleiner, D E. 1997. Quantitative Reverse Zymography: Analysis of Picogram Amounts of Metalloproteinase Inhibitors Using Gelatinase A and B Reverse Zymograms. *Anal Biochem* **244**:161-66
- 55 Overall C M**, Tam E, McQuibban G A, Morrison C, Wallon U M, Bigg H F, King A E, Roberts, C R. 2000. Domain interactions in the gelatinase A.TIMP-2.MT-MMP activation complex. The ectodomain of the 44-kDa form of membrane type-1 matrix metalloproteinase does not modulate gelatinase A activation. *J Biol Chem* **275**:39497-506
- 56 Pelzer T**, Shamim A, Wolfges S, Schumann M, Neyses L. 1997. Modulation of cardiac hypertrophy by estrogens. *Adv Exp Med Biol* **432**:83-89
- 57 Pereira R C**, Jorgetti V, Canalis E. 1999. Triiodthyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. *Am J Physiol* **277**: E496-501
- 58 Poche R**, Linder E. 1955. Untersuchungen zur Frage des Glanzstreifens des Herzmuskelgewebes beim Warmblüter und beim Kaltblüter. *Z Zellforsch* **43**:104-20
- 59 Powell D W**, Mifflin R C, Valentich J D, Crowe S E, Saada J I, West A B. 1999. Myofibroblasts, I: paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**: C1-C19
- 60 Pross C**, Faaroq M M, Lane J S, Angle N, Tomono C K, Xavier A E, Freischlag J A, Collins A E, Law R E, Gelabert, H A. 2002. Rat and human aortic smooth muscle cells display differing migration and matrix metalloproteinase activities in response to dexamethasone. *J Vasc Surg* **35**:1253-59
- 61 Sap J**, Munoz A, Schmitt J, Stunnenberg H, Vennström B. 1989. Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* **340**:242-44
- 62 Siwik D A**, Chang D LF, Collucci W S. 2000. Interleukin-1(beta) and Tumor Necrosis Factor (alpha) Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro. *Circ Res* **86**:1259-65
- 63 Sjöstrand F S**, Anderson C E, Dewey M M. 1958. Ultrastructure of the intercalated disc of frog, mouse and guinea-pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res* **1**:271-87
- 64 Sommer J R**. 1982. Ultrastructural considerations concerning cardiac muscle. Review. *J Mol Cell Cardiol* **14**: 77-83
- 65 Souza R R**. 2002. Aging of myokardial collagen. *Biogerontology* **3**:325-35
- 66 Spinale F G**. 2002. Bioactive Peptide Signaling Within the Myocardial Interstitium and the Matrix Metalloproteinases. *Circ Res* **91**:1082-84
- 67 Spinale F G**. 2002a. Matrix Metalloproteinases. Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. *Circ Res* **90**:520-30
- 68 Steffensen B**, Wallon U M, Overall C M. 1995. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native Type IV collagen. *J Biol Chem* **270**:11555-66

- 69 Sternlicht M D**, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:463-516
- 70 Strongin A Y**, Collier I, Bannikov G, Marmer B L, Grant G A, Goldberg G I. 1995. Mechanisms of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. *J Biol Chem* **270**:5331-38
- 71 Sussmann M A**. 2001. When the Thyroid Speaks, the Heart Listens. *Circ Res* **89**:557-59
- 72 Thiedemann K U**, Holubarsch C, Medugorac I, Jacob R. 1983. Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basis Res Cardiol* **78**:140-55
- 73 Tsuruda T**, Boerrigter G, Huntley B K, Noser J A, Cataliotti A, Costello-Boerrigter L C, Chen H H, Burnett Jr. J C. 2002. Brain Natriuretic Peptide is Produced in Cardiac Fibroblasts and Induces Matrix Metalloproteinases. *Circ Res* **91**:1127-34
- 74 Tsuruda T**, Costello-Boerrigter L C, Burnett Jr. J C. 2004. Matrix Metalloproteinases: Pathways of Induction by Bioactive Molecules. *Heart Failure Reviews* **9**:53-61
- 75 Tuckermann J P**, Reichardt H M, Arribas R, Richter K H, Schütz G. 1999. The DNA Binding-independent Function of the Glucocorticoid Receptor Mediates Repression of AP-1-dependent Genes in Skin. *J Cell Biol* **147**:1365-70
- 76 Wang W**, Schulze C J, Suarez-Pinzon W L, Dyck J RB, Sawicki G, Schulz R. 2002. Intracellular Action of Matrix Metalloproteinase-2 Accounts for acute Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Circulation* **106**:1543-49
- 77 Weber K T**, Clark W A, Janicki J S, Shroff S G. 1987. Physiological versus pathological hypertrophy and the pressure overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* **10**: S37-49
- 78 Weber K T**, Sun Y, Tyagi S C, Cleutjens J P. 1994. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* **26**:279-92
- 79 Weinberger C**, Thompson C C, Ong E S, Lebo R, Guol D J, Evans R M. 1986. The v-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324**:641-46
- 80 Woessner J**. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* **5**:2145-54
- 82 Yao J**, Eghbali M. 1992. Decreased Collagen Gene Expression and Absence of Fibrosis in Thyroid Hormone-Induced Myocardial Hypertrophy. Response of Cardiac Fibroblasts to Thyroid Hormone In Vitro. *Circ Res* **71**:831-39
- 83 Yu WH**, Woessner Jr. J F. 2000. Heparan Sulfate Proteoglycans as Extracellular Docking Molecules for Matrilysin (Matrix Metalloproteinase 7). *J Biol Chem* **275**:4183-91
- 84 Ziegelhoffer-Mihalovičová B**, Briest W, Baba H A, Raßler B, Zimmer H G. 2002. The expression of mRNA of cytokines and of extracellular matrix proteins in triiodothyronine-treated rat hearts. *Mol Cell Biochem* **247**:61-68
- 85 Zucker S**, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi H M, Hurewitz A M, Matrisian L, Boyd D, Nicolson G, Montana S. 1999. Measurement of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Blood and Tissues. Clinical and experimental applications. Review. *Ann N Y Acad Sci* **878**:212-27

## **9 Anhang**

### **Veröffentlichung**

Wesentliche Resultate der Doktorarbeit wurden präsentiert und publiziert:

Rathmann W., Henkel B. , Seitz H.-J. , Sultan K. R. , *Differential Regulation of cardiac metalloproteinases by glucocorticoids and thyroid hormones* , Posterpräsentation 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Thyroid Association ( 18.-22.September 2004). Istanbul , Türkei

### **Vortrag**

Rathmann W: *Matrix Metalloproteinases in the Porcine Heart*, GRK 336 Jahrestagung 2003, Schwerin

## **Danksagung**

Ich danke an erster Stelle meinen Eltern Axel und Renate Rathmann, die mir mein Studium ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, sowie meiner Familie und Uwe.

Ohne die Hilfe und Unterstützung sowie seelischen Beistand durch das Laborteam hätte ich meine Arbeit nicht beendet, vielen Dank Dr.N.Burhenne, A.Harneit, B.Henkel, M.Kröger, Dr.S.Mendach, Dr.M.Rajkovic, PD Dr.J.M.Weitzel, M.Wetzel, Dr.A.Wulf und G.Richter!

Meinen Freunden vielen Dank für Verständnis und Zuhören.

Ich danke meinem Doktorvater Prof.Dr.H.J.Seitz und meinem Betreuer Dr.K.R.Sultan für die Idee und Durchführung meiner Doktorarbeit sowie dem Graduiertenkolleg 336 und B.Schlutz für finanzielle Unterstützung und Informationsaustausch.

# Curriculum vitae

**Persönliche Daten:** Wiebke Rathmann, geboren am 2.2.1980 in Hamburg

## **Schulbildung:**

1986 – 1999 Rudolph-Steiner-Schule Hamburg-Wandsbek, Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

## **Studium:**

04/01 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg

03/03 Physikum (Note gut)

04/03 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit

02/06-02/07 Praktisches Jahr

06/07 Staatsexamen (Note sehr gut) und Approbation

## **Berufserfahrung:**

10/99 – 10/02 Pflegehilfskraft im Dialyse Kuratorium Hamburg e.V.

## **Weiterbildung:**

09/03 Teilnahme am „Intensivpraktikum „Molekularbiologie“ des DFG Graduiertenkolleg GRK 336

## **Studiumbegleitende Tätigkeiten:**

WS 02/03 Vorpräparand im Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

05/03 – 10/03 Studentische Hilfskraft im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

04/03 – 04/04 Kollegiatin im DFG-Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel“

04/04 – 07/04 Stipendiatin im DFG-Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und Molekularer Stoffwechsel“

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Angabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.