

Aus der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Institut für Geschlechterforschung in der Medizin (GiM)
eingereicht über das Institut für Tierpathologie des
Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Kardioprotektive Rolle von Melusin im Myokardialen Infarkt

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maika Korn
Tierärztin
aus Freital

Berlin 2010
Journal-Nr.: 3380

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Achim Gruber
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Vera Regitz-Zagrosek
Dritter Gutachter: PD Dr. rer. nat. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
hypertrophy, myocardium, myocardial infarction, genes, mice, animal models

Tag der Promotion: 15.06.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-806-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de



Es gibt mehr Ding' im Himmel und auf Erden,
als Eure Schulweisheit sich träumen lässt, Horatio.

William Shakespeare, *Hamlet*



Inhaltsangabe

1 Einleitung	9
1.1 Kardiomyopathien	9
1.1.1 Definition der Kardiomyopathien	9
1.1.2 Formen der Myokardhypertrophie	9
1.2 Melusin	10
1.3 Extrazelluläre Matrix	11
1.3.1 Aufbau der Extrazellulären Matrix	11
1.3.2 Kollagene	12
1.3.3 Matrixmetalloproteinasen	13
1.3.4 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen	15
1.4 Myokardinfarkt	15
1.5 Geschlechterunterschiede des myokardialen Remodeling	17
1.6 Fragestellung	22
2. Material	23
2.1 Tiere	23
2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien	23
2.3 Puffer und Lösungen	24
2.4 Oligonukleotide (Primer)	26
2.5 Antikörper	27
2.6 Sonstiges	27
2.6.1 Enzyme	27
2.6.2 Molekulare Marker	27
2.6.3 Kommerzielle Kit-Systeme	27
2.6.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien	28
2.7 Geräte	28
3. Methoden	29
3.1 Tiermodell der experimentellen Herzinsuffizienz	29
3.1.1 Herstellung Transgener Tiere	30
3.1.2 Myokardinfarkt (MI)	30
3.2 Echokardiographische Analyse	31
3.3 Organentnahme	31
3.4 Genexpressionsanalysen	32
3.4.1 Genexpression auf Transkriptebene	32

3.4.2 Proteinexpression	36
3.5 Histologische Untersuchung	42
3.5.1 Paraffineinbettung	42
3.5.2 Anfertigung der Schnitte	42
3.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	43
3.5.4 Sirius Red Färbung	44
3.5.5 Bestimmung des Kollagengehalts im Gewebe	44
3.5.6 Statistik	45
4. Ergebnisse	47
4.1. Mortalitätsrate nach Herz-Infarkt-Intervention (MI)	47
4.2. Morphologische Veränderungen nach MI	48
4.2.1 Körpergewicht	48
4.2.2 Herzgewicht	49
4.3 Morphologische Veränderungen nach MI - Echokardiographische Untersuchung	52
4.3.1 LV-Hinterwand	52
4.3.2 Septum-Dicke	53
4.3.3 LV-Masse	53
4.3.4. Endsystolischer und Diastolischer Durchmesser	54
4.3.5 Fractional Shortening	55
4.4. Genexpressionsanalyse	56
4.4.1 Hypertrophie-Marker	57
4.4.2 Kollagenexpression	60
4.4.3 Matrixmetalloproteinase-2 und -9 Expression	61
4.4.4 Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMPs)	62
4.5 Korrelation von morphologischen Parametern mit der Genexpression	65
4.5.1 Korrelationen von inflammatorischen und Stress-regulierten Genen	65
4.5.2 Korrelation von EZM und ihre Regulatoren	66
4.5.3 Korrelation von Genen zur Degradation der EZM	67
4.6 Proteinexpressionsdaten	68
4.7. Histologische Untersuchung der Fibrosierung nach MI	69
5. Diskussion	72
6. Zusammenfassung	88
7. Summary	90
8. Literatur	92

9. Abkürzungen	100
10. Appendix	102

1 Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

1.1.1 Definition der Kardiomyopathien

Kardiovaskuläre und maligne Tumor-Erkrankungen sind in den industrialisierten Ländern mit Abstand die häufigste Todesursache [1]. Eine der wesentlichen Ursachen für den plötzlichen Herztod und Herzinsuffizienz im jüngeren Alter stellen Kardiomyopathien dar [2]. Als Kardiomyopathie werden nach der WHO alle primären Erkrankungen des Myokards unbekannter Ursache bezeichnet, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen [3]. Die Hauptformen der Kardiomyopathien sind: hypertrophe Kardiomyopathie, dilatative Kardiomyopathie, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie und restriktive Kardiomyopathie.

1.1.2 Formen der Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie wird durch unterschiedliche Reize induziert. Während Trainingseffekte als physiologische Veränderung und Anpassung des Herzens anzusehen sind, entwickelt sich die pathologische kardiale Hypertrophie als Adaptation des Myokards, eine andauernde erhöhte Pumpleistung zur Kompensation eines krankhaften Zustandes zu erbringen [4]. Grundsätzlich können zwei Formen der pathologisch hypertrophen Reaktion unterschieden werden: Bei der konzentrischen Hypertrophie, die z.B. nach Druckbelastung auftritt, kommt es zu einer Zunahme der kontraktilen Einheiten, das heißt zum Breitenwachstum der Myozyten und demzufolge der Ventrikelwand [5]. Werden die kompensatorischen Fähigkeiten des Herzens überschritten, kommt es zur maladaptiven, exzentrischen Hypertrophie, welche durch ein stärkeres Längenwachstum der Myozyten gekennzeichnet ist und von einer Fibrosierung des Herzmuskels begleitet wird. In der Folge kann sich daraus eine Herzinsuffizienz mit Dilation des Herzens ergeben [6], da pathologische Hypertrophie auf lange Sicht zu weniger effizienter Arbeit der Herzmuskulatur führt. Desweiteren ist das Risiko für Arrhythmien deutlich erhöht [4]. Konzentrische und exzentrische Hypertrophie führen zu typischen Veränderungen in der Genexpression. Ferner laufen eine Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen in der Pathogenese der kardialen Hypertrophie parallel ab. Hierzu zählen unter anderem Apoptose von Kardiomyozyten, gestörte Kalzium-Homöostase, Umbau des Zytoskeletts und Sarkomers und ein Umbau der Gewebestruktur mit Fibrose im Interstitium. Diese Fibrose ist maßgeblich verantwortlich für

die Versteifung des Myokards und infolgedessen für die reduzierte Kontraktilität des Herzens. Der Begriff *Remodeling* fasst alle diese Umbauvorgänge des Herzens zusammen [7]. Demgegenüber ist die physiologische Hypertrophie, wie sie bei Sportlern auftritt, durch ein proportionales Wachstum der Muskelzellen ohne eine verstärkte Expression embryonaler Gene gekennzeichnet, die in der Regel nicht zur Herzinsuffizienz führt und reversibel ist.

1.2 Melusin

Brancaccio *et al.* isolierten Melusin erstmals als spezifisches Bindungsprotein der Integrinuntereinheiten $\beta 1A$ und $\beta 1D$ [8]. Integrine sind von zentraler Bedeutung in der Kommunikation zwischen der Zelle und der EZM. Sie spielen eine Rolle bei der Bindung als auch bei der Übertragung von Reizen aus dem Extra- oder Intrazellulärraum über Zellmembran hinweg durch die Aktivierung von Signalkaskaden.

Melusin wird ausschließlich in der Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert. Die höchsten Expressionsraten wurden nach Muskeltraumata in Mäusen in der Skelettmuskulatur und bei Neugeborenen nachgewiesen, wohingegen im Myokard während der embryonalen und juvenilen Entwicklung keine Expressionsänderung festgestellt werden konnte [8]. De Acetis *et al.* wiesen nach einwöchiger Druckbelastung des Herzens erhöhte Melusinspiegel bei Mäusen nach, die eine kompensatorische Hypertrophie entwickelten [9] und Kuncewicz *et al.* fanden Melusin in Mesangiumzellen der Niere [10]. In immunhistochemischen Färbungen konnte innerhalb der Muskelzelle gezeigt werden, dass Melusin in zwei, das Aktininband innerhalb der Z-Scheibe flankierenden Reihen angeordnet ist [8].

Entscheidend für die vorliegende Studie war die Notwendigkeit, weitere Erkenntnisse über die Rolle des Melusins bei der Entwicklung/Ausprägung der linksventrikulären Hypertrophie zu erlangen. Dieses nähere Verständnis kann hilfreich sein, um kardiale Hypertrophie therapeutisch zu beeinflussen, was klinisch von hoher Relevanz ist. Brancaccio *et al.* zeigten, dass Melusin im Herzen einen entscheidenden Einfluss bei der Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie bei erhöhter Druckbelastung zukommt [8]. Sie erzeugten Melusin-Knockout-Mäuse, deren Herz- und Skelettmuskulatur weder funktionell noch morphologisch verändert waren. Nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC), zeigten sich allerdings signifikante Unterschiede in der Hypertrophieentwicklung der Melusin-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Die Wildtypmäuse entwickelten eine konzentrische Hypertrophie, während die

Knockout-Tiere eine exzentrische Hypertrophie mit Dilatation des linken Ventrikels aufwiesen, was die Mortalität signifikant erhöhte.

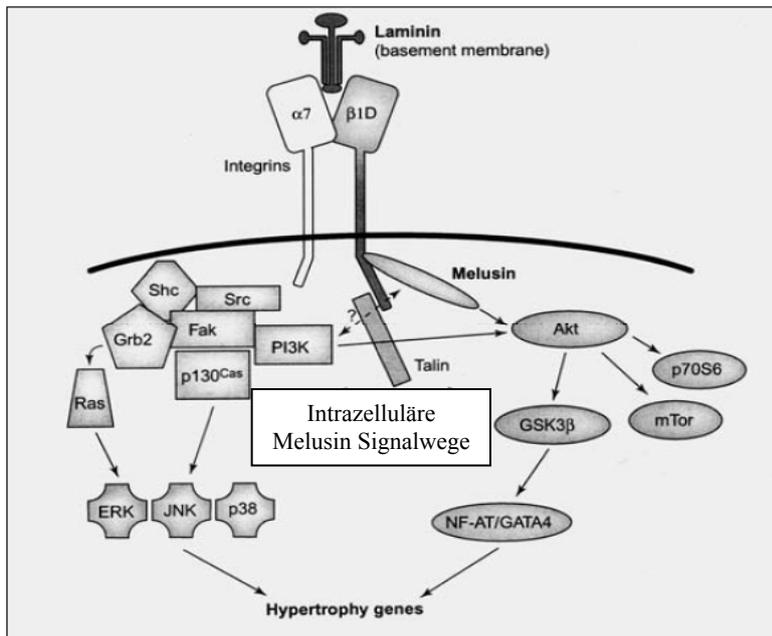


Abb.1: Integrinassozierte Signalwege nach mechanischer Druckbelastung des Herzens. (Modifiziert nach Tarone et Lembo 2003)

Brancaccio *et al.* schlußfolgerten, dass ein KO von Melusin wahrscheinlich durch eine verminderte Phosphorylierung zum abnormem Remodeling, also zu exzentrischer Hypertrophie mit Ventrikeldilatation und nachfolgend zum Herzversagen führt [11]. Dagegen suchen Barki-Harrington und Rockman die Ursache der verschlechterten Herzfunktion vielmehr in einer veränderten Homöostase zwischen der Aktivierung protektiver und pathologischer Signalwege. Gesichert erscheint, dass Melusin bei mechanischer Belastung des Herzens das Auftreten einer Dilatation des linken Ventrikels verzögert.

1.3 Extrazelluläre Matrix

1.3.1 Aufbau der Extrazellulären Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) bildet ein komplexes Geflecht aus Matrixkomponenten, welches die Kardiomyozyten, die Fibroblasten und die Kapillaren umgibt. Die EZM garantiert die strukturelle Integrität des Myokardgewebes und ist entscheidend an der Form und Funktion des Herzens beteiligt. Sie dient als Stützgewebe, unterstützt die Migration, das Wachstum und die Differenzierung der Zellen im Myokard [12]. Die Hauptbestandteile der EZM sind Kollagene vom Typ I und Typ III (siehe 1.3.2). Kollagene IV, V und VI finden sich

in kleineren Mengen [13, 14]. Als weitere Komponenten der EZM sind Adhäsionsproteine wie Fibronectin und Laminin, Anti-Adhäsionsproteine wie Osteopontin [15], sowie Gewebsflüssigkeit zu finden. Die Bestandteile der Gewebeflüssigkeiten (Wasser, Aminosäuren, Ionen, Vitamine, Hormone, Glukose und andere) stammen hierbei hauptsächlich aus dem Blutplasma. Alle Zellen, außer Erythrozyten, treten aktiv in Beziehung zur umgebenden EZM. Die Zell-Matrix-Verbindungen dienen der mechanischen Verankerung der Zellen. Sie haben darüber hinaus Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen wie Ernährung, Abwehr und Reparatur. Die Zusammensetzung der EZM wird durch wichtige Enzyme, insbesondere den Matrixmetalloproteinasen (MMPs, siehe 1.3.3) und den sog. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs siehe 1.3.4) reguliert. Entscheidenden Einfluss auf die Form und Funktion des Myokards haben Veränderungen im Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der Matrixkomponenten [16]. Störungen dieses Gleichgewichtes treten während des Remodeling-Prozesses auf [17]. Kardiale Fibroblasten bilden die Mehrheit der Zellen im Myokard und sind für die Synthese der EZM-Proteine, wie Kollagene, Zytokine, Wachstumsfaktoren und MMPs verantwortlich [13]. Während des kardialen Remodeling kommt es zu einer vermehrten Proliferation der kardialen Fibroblasten sowie zu einer gesteigerten Synthese und Ablagerung von Matrixkomponenten in der EZM. Auf diese Weise sind die kardialen Fibroblasten an den pathologischen Veränderungen des Herzens beteiligt [18].

1.3.2 Kollagene

Die vorherrschenden Kollagentypen sind sowohl im gesunden als auch im kranken Myokard Typ I und III [19-21]. Kollagen Typ I und III bilden Fasern mit typischer Tripelhelixstruktur, deren dichte Wicklung ausschlaggebend für die hohe Zugfestigkeit von Kollagenfasern ist. Kollagen Typ I erzeugt typische dicke, dicht gepackte Bündel und findet sich vor allem in Haut, Faserknorpel, Faszien und Sehnen. Es ist im gesamten Körper wie auch im Myokard, die vorherrschende Kollagen-Art und hauptsächlich für die mechanische Gewebebelastbarkeit verantwortlich. Kollagen Typ III bildet ein lockeres Netzwerk aus dünnen Fasern und kommt unter anderem in glatter Muskulatur, Arterien, Leber und Lunge vor. Es besitzt deutlich weniger mechanische Stabilität und bestimmt die Gewebeelastizität [22]. Zusätzlich zu den Typ I und III Kollagenen sind kleine Mengen Kollagen V an der Zellmembran und der Basalmembran der Gefäße verankert [23]. Die Funktionen des Kollagen-Netzwerkes sind vielseitig. In erster Linie dient es der stabilen Anordnung von Myozyten, Blut- und Lymphgefäßen und deren Verbindung untereinander. Es ist die Voraussetzung für die

Erhaltung der Gewebearchitektur und der Funktionsfähigkeit des Myokards. Weiterhin determiniert es die Dehnbarkeit und Steifheit des Myokards. Es ermöglicht während der Systole die Kraftübertragung von den einzelnen Myozyten auf die gesamte Herzkammer und verhindert während der Diastole die Überdehnung der Zellen und das „Ausleihen“ der Muskelfasern durch Überdehnung der Sarkomerstrukturen. Im physiologischen Zustand verhindert diese Gewebefestigkeit eine Dilatation und eine Ruptur der Herzwände [24, 25]. Das Kollagen-Netzwerk unterliegt einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der Synthese durch Fibroblasten und Myofibroblasten und der Degradation mittels sog. Matrixmetalloproteinasen [26]. Dieses Gleichgewicht erhält die Funktionsfähigkeit und Gewebestruktur des Myokards. Kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes, also einer unverhältnismäßigen Akkumulation von Kollagen bzw. zu einer verstärkten Kollagenolyse, ist das Herz schnell in seiner Funktionsfähigkeit eingeschränkt [27, 28]. Eine unproportionale Abnahme des Kollagenanteils im Herzgewebe führt zu einer Überdehnung, einer Dilatation mit Reduktion der Wanddicken und sogar Rupturgefahr [29-31]. Eine Akkumulation von Kollagen, in Form einer reaktiven oder reparativen Fibrose, erhöht hingegen die Gewebesteifheit und verhindert letztlich die Dehnung des Myokards in der Diastole [25, 27]. Während die natürliche Verschiebung der Myozyten gegeneinander immer schwieriger wird [32, 33], sind auch die Diffusion von Sauerstoff und die Erregungsleitung im Zuge der Systole gestört [34, 35].

1.3.3 Matrixmetalloproteinasen

Wie das Kollagen-Netzwerk, unterliegt auch die gesamte EZM einem ständigen Umbau [36, 37]. Zuständig für den Abbau sind v.a. die 1962 erstmalig von Gross und Lapiere beschriebenen Matrixmetalloproteinasen (MMP) [38]. Die MMP bilden eine Familie zinkabhängiger Endoproteasen, die strukturelle Domänen teilen, sich aber in ihrer Substratspezifität und ihrer Induzierbarkeit unterscheiden [38]. Derzeit sind mindestens 25 verschiedene MMP-Typen identifiziert worden, die nicht nur die Kollagene abbauen können, sondern zudem die Fähigkeit besitzen, Zelloberflächenmoleküle und andere Nichtmatrixproteine zu spalten [39]. Die MMP lassen sich in fünf Gruppen unterteilen [26].

Hierzu gehören:

1. die Kollagenasen
2. die Gelatinasen
3. die Stromelysine
4. die Membran-gebundenen MMP
5. die anderen MMP

Zur Gruppe der Kollagenasen gehören MMP-1 (interstitielle Kollagenase), MMP-9 (neutrophile Kollagenase), MMP-13 (Kollagenase 3) und MMP-18. Sie alle besitzen die Fähigkeit, die fibrillären Kollagene (Typ I, II, III) zu spalten, die aufgrund ihrer engen und stark quervernetzten Helix-Struktur extrem resistent gegen die Spaltung durch die meisten Proteasen sind [22]. Die nach dem Zerschneiden der Helixstruktur entstehende Gelatine wird durch die Gelatinasen der 2. Gruppe weiter abgebaut, wobei vermutet wird, dass sie zusätzlich die Fähigkeit besitzen, eigenständig die Spaltung fibrillären Kollagens zu initiieren und fortzuführen [40, 41]. Zu dieser Gruppe zählen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B). Gruppe 3 enthält die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) die sehr unterschiedliche EZM-Komponenten, unter anderem Proteoglykane, Laminin und Fibronectin abbauen können. Die Vertreter der 4. Gruppe sind die Membrangebundenen MMP (MT-MMP), die sowohl unterschiedliche EZM-Komponenten degradieren, als auch andere MMP aktivieren können. Gruppe 5 ist noch wenig erforscht [42]. Alle im Myokard vorhandenen Zellen sind in der Lage, ein oder mehrere MMP herzustellen und beteiligen sich am Umbau der EZM. Zu den am EZM Umbau beteiligten Zellen gehören insbesondere Myozyten, Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen, sowie die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen als Antwort auf einen entzündlichen Reiz [12]. Alle MMP werden als inaktive Präproenzyme, so genannte Zymogene, synthetisiert [43] und entweder an die Zellmembran gebunden oder extrazellulär ausgeschieden [7]. Diese Proenzyme werden unter anderem von kardialen Fibroblasten, Kardiomyozyten und Entzündungszellen synthetisiert, können aber ausschließlich von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gespeichert und bei Bedarf abgegeben werden [22]. MMP-9 wird z.B. von sich differenzierenden Granulozyten im Knochenmark gebildet, in den Granula zirkulierender neutrophiler Granulozyten gespeichert und nach Aktivierung durch Entzündungsmediatoren freigesetzt [44]. Der im Myokard stets vorliegende Proenzymool kann in kürzester Zeit aktiviert und mobilisiert werden [45, 46]. Die Aktivierung der MMP erfolgt über den sog. „Cystein-switch“-Mechanismus, bei dem durch Abspaltung von Zystein das zinkhaltige, aktive Zentrum des Enzyms demaskiert wird

[47]. Dieser Vorgang kann auf drei unterschiedlichen Wegen stattfinden. Hierzu zählen die schrittweise Aktivierung, an der Zelloberfläche durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) und die intrazelluläre Aktivierung [48]. Die Aktivierung an der Zelloberfläche wird als wesentliche Form während des perizellulären EZM-Abbaus im Zuge der Zellmigration gesehen [49, 50]. Aktivierte MMP durchlaufen, wenn nicht anderweitig gehemmt, eine Autokatalyse, die sie letztlich zu inaktiven Proteinfragmenten umbaut [51, 52]. Wichtige Regulatoren der MMP-Aktivität sind die endogenen „Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen“ (TIMP) [52, 53].

1.3.4 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinasen

Es wurden bis heute vier verschiedene TIMP-Typen identifiziert (TIMP-1 bis -4), die sowohl von Myozyten als auch anderen Zellen sezerniert werden [54]. Sie binden im Verhältnis 1:1 an aktive MMP und bilden mit diesen inaktive Komplexe. Die MMP-Hemmung geschieht, indem das aktive Zentrum durch ein TIMP-Molekül blockiert wird und damit keine Bindung zu anderen Matrixkomponenten mehr möglich ist [12]. Nach Lamparter et al. hemmen alle TIMP alle MMP, nur mit einer jeweils unterschiedlichen Affinität [22]. Einer anderen Studie nach zeigen sie eine gewisse Spezifität. So hemmt TIMP-1 zwar die meisten MMP, nicht aber MMP-2 und MT1-MMP. Bei TIMP-2 ist es MMP-9 welches nicht gebunden wird und TIMP-3 hemmt nur MMP-1, -2, -3, -9 und -13 [42]. TIMP-4, welches v.a. in adultem humanen Myokardium eine starke Expression zeigt und daher auch „Cardiac Inhibitor of Metalloproteinasen“ genannt wird, hemmt die Aktivität von MMP-1, -3, -7 und -9 [55-57]. Die TIMP, insbesondere TIMP-1, sind in der Lage durch die Stimulation der Fibroblasten die Kollagenablagerung zu fördern [58, 59].

1.4 Myokardinfarkt

Bei den kardialen Umbauvorgängen nach einem Herzinfarkt handelt es sich um einen Prozess zahlreicher, sich überlappender Ereignisse, in dem es zur Rekrutierung von Entzündungszellen, zur Degradation der vorliegenden Matrix, zum Aufbau einer neuen EZM und letztlich zur Formation einer reifen Infarktnarbe kommt. Das Remodeling führt zu einer funktionellen Anpassung mit mehr oder weniger ausgeprägter Herzinsuffizienz. Durch den Verschluss eines Koronargefäßes kommt es im Versorgungsgebiet zur Hypoxie und zu einem Absterben von Kardiomyozyten. Um Entzündungszellen die Migration in das Infarktgebiet zu ermöglichen, degradieren die im Myokard vorhandenen MMPs die vorliegende EZM, indem

ihre Pro-Formen aktiviert werden [60, 61]. Bereits anwesende bzw. eingewanderte Makrophagen und neutrophilen Granulozyten setzen weitere MMPs, Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die eine proteolytische Kaskade in Gang setzen [45, 46]. Sowohl Lindsey et al. als auch Tao et al. konnten unabhängig voneinander zeigen, dass die Aktivierung der MMPs, besonders von MMP-9, zeitlich eng mit der Akkumulation der Neutrophilen im Infarkt-Randgebiet korreliert [62, 63]. Das heißt, dass ein stärkeres Entzündungsausmaß zu einer größeren Zahl an Neutrophilen führt, die ihrerseits wieder verstärkt MMPs sezernieren und zu einer reduzierten Qualität und Quantität der EZM mit Zunahme der Infarktexpansion führen [63, 64]. Das Resultat ist eine rasche Dilatation mit steigendem LV-Durchmesser und zunehmender kardialer Dysfunktion. Die Ejektionsfraktion verringert sich nach einem MI signifikant [64, 65]. Der Grad der Dilatation ist abhängig von der initialen Infarktgröße, dem Umfang der Entzündungsantwort und dem ventrikulären Wandstress. Patienten mit einer ausgeprägten Dilatation haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, Komplikationen wie eine kongestive Herzinsuffizienz, ein Aneurysma und Ventrikelrupturen zu erleiden [66]. Eine Ventrikelruptur ist bei der Maus eine häufige Todesursache, die sich innerhalb der ersten zwei bis fünf Tage nach dem MI zuträgt [63] und ist das Resultat der zunehmenden Infarktexpansion, bedingt durch kontinuierlichen Wandstress bei gleichzeitiger Verdünnung und Schwächung des Myokards [64]. Es ist davon auszugehen, dass die Einwanderung der Entzündungszellen in den Infarkt- und Infarkttrandbereich, einhergehend mit einer massiven Sekretion von MMP, zu dieser Komplikation führt (Lindsey; 2001; Cavaşin, 2004; Cavaşin, 2006). Beteiligt scheint das gestörte Gleichgewicht zwischen der Degradation der EZM durch die MMPs und deren Hemmung durch ihre Inhibitoren, die TIMPs [42]. Im nicht-infarzierten Myokardareal kommt es durch die mechanische Belastung zu einer kompensatorischen Hypertrophie der intakten Kardiomyozyten [67, 68]. Die Dilatation des LV durch den Myokardinfarkt führt zu gesteigertem Wandstress. Vasodilatation wird durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bewirkt [28, 69], welche zusätzlich eine Proliferation von Fibroblasten mit der Folge einer reaktiven Fibrose nach sich zieht, zu der auch die TIMP beitragen [70]. Die Fibroblasten-Aktivierung wird sowohl von hämodynamischen Veränderungen als auch von hormonellen und Wachstums-Faktoren, Zytokinen und weiteren regulatorisch wirkenden Proteinen beeinflusst [71, 72]. Daher führen auch sehr kleine Infarktareale mit geringen funktionellen Einschränkungen zu einer erhöhten Kollagenablagerung [73]. Die Fibrose im Myokard stört die Integrität der Myozyten und kann zu einer gestörten Erregungsweiterleitung führen, da die Muskelfasern des Myokards

miteinander verbunden sind. Aus diesem Grund erfasst eine Erregung immer das gesamte Herz. Das Herz verhält sich wie ein funktionelles Synzytium, dessen rhythmische Erregung nicht auf neuronaler sondern ausschließlich auf muskulärer Aktivität (myogene Autorhythmie) beruht. Kommt es nun während der Depolarisation durch fibrotische Veränderungen zu einer verringerten Diffusionsgeschwindigkeit der Erregung, steigt die Gefahr des Auftretens von Arrhythmien und Transportprozesse im Gewebe werden gestört [74, 75]. Die fibrotischen Veränderungen erhöhen die Gewebesteifheit und reduzieren die Dehnbarkeit des Myokards, was zu diastolischer Dysfunktion führen kann. Die Folge ist eine verringerte Vorlast, die sich negativ auf die kardiale Pumpfunktion auswirkt. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die beim Remodeling nach einem MI ablaufenden Prozesse im Tiermodell mit denen des Menschen gut vergleichbar sind.

1.5 Geschlechterunterschiede des myokardialen Remodeling

Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Untersuchungen konnten geschlechtsspezifische Unterschiede während des kardialen Remodeling nach MI, bei der Aortenstenose (AS), der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) und Herzinsuffizienz zeigen [76-81]. Einige klinische Studie liefern Hinweise darauf, dass die kardialen Umbauprozesse der EZM im Myokard beider Geschlechter unterschiedlich und somit für beobachtete geschlechtsspezifische Unterschiede in der Herzfunktion mitverantwortlich sind. Untersuchungen an Patienten mit LVH, die durch eine hypertrophe Kardiomyopathie hervorgerufen wurde, konnten belegen, dass die Herzen der männlichen Patienten eine stärkere Verdickung der LV-Wand und einen signifikant höheren Kollagengehalt als die weiblichen Patienten aufwiesen [82,83]. Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten und Mäusen konnten die in der Klinik beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede im Zuge des kardialen Remodeling bestätigen. Dabei konnte nach einem induzierten MI oder einer AS eine stärkere Zunahme der linksventrikulären Wanddicke, eine stärkere Kollagendeposition sowie eine signifikant höhere MMP-2-Aktivität im Myokard der männlichen, im Vergleich zu den weiblichen Tieren, beobachtet werden [33,65,84-86]. Alle Untersuchungen gehen von einem geschlechterabhängigen Unterschied im kardialen Umbauprozess der EZM aus, der zu einem besseren Erhalt der Morphologie und zu einer besseren Funktion des weiblichen Herzens bei pathologischen Zuständen beiträgt.

Beispielsweise fanden Litwin *et al.* bei der echokardiographischen Untersuchung des Herzens nach einem MI bei Ratten Geschlechterunterschiede. Die Studie zeigte eine stärkere

Zunahme der Hinterwanddicke und auffälligere Abnormalitäten der diastolischen Ventrikelfüllung bei den Männchen im Vergleich zu den weiblichen Tieren [84]. Im Gegensatz dazu waren Dilatation und systolische Dysfunktion bei beiden Geschlechtern ähnlich ausgeprägt. Es wird davon ausgegangen, dass die Wanddickenzunahme den Wandstress reduziert, was allerdings auf Kosten der diastolischen Funktion bzw. Dehnbarkeit des Ventrikels geht. Geschlechterunterschiede im Mausmodell sind bis zum heutigen Zeitpunkt noch unzureichend untersucht. Zwei Studien beschäftigten sich bisher mit den kardialen Umbauvorgängen in der frühen Phase des Remodelings nach MI von Wildtyp-Mäusen [33, 87]. Sie untersuchten geschlechtsspezifische Unterschiede in morphologischen und funktionellen Herzparametern mittels Ultraschall und erforschten ferner die Entzündungsantwort, die MMP-Aktivierung, die Kollagen Degradation bzw. -akkumulation und das Rupturrisiko. Bei den Männchen wurde nach einer Woche eine höhere Mortalität durch Ruptur bei einem tendenziell größeren Infarktausdehnungsindex und einer höheren MMP-2-Aktivität beobachtet. Weiterhin waren die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Infarkttrandgebiet, die Dilatation und der Funktionsverlust des Herzens ebenfalls in den männlichen Tieren stärker ausgeprägt. Bei den Weibchen sank der Blutdruck und dadurch blieben die kardiale Nachlast, das heißt der periphere Widerstand, und die Herzfunktion besser erhalten. Die Autoren schlussfolgerten, dass besonders Qualität und Quantität der Entzündungsreaktion das Remodeling nach einem MI beeinflussen. Eine höhere Anzahl an Neutrophilen bei den Männchen führte demnach zu einer höheren MMP-Aktivierung, Kollagenolyse, Infarktausdehnung und zu einem ausgeprägteren Rupturrisiko. Im Gegensatz zu der Anzahl der Neutrophilen war jedoch die Anzahl der Makrophagen im Infarkttrandgebiet bei den weiblichen Tieren in der ersten Woche größer als bei den männlichen Tieren. Hier wurde vermutet, dass eine höhere Anzahl an Makrophagen bei den Weibchen den Abbau des nekrotischen Materials fördert [33]. Fang et al. diskutierten die These, dass die frühe Remodeling-Phase bei Männchen einen drastischeren Einfluss hat als bei den Weibchen [87]. Sie beschrieben eine höhere Anzahl Entzündungszellen, eine stärkere MMP-9-Aktivität und einen ausgeprägteren Kollagenabbau der Männchen. Zwei weitere Studien untersuchten den Einfluss der Geschlechtshormone auf das Remodeling nach einem MI mittels Kastration bzw. Hormonsupplementierung [64, 65]. Schwerpunkte lagen hier auf den Ultraschalluntersuchungen, der Entzündungszellinfiltration des Infarktgebietes und auf dem Kollagengehalt. Die Autoren stellten die These auf, dass sich Testosteron auf die kardiale Anpassung negativ auswirkt, während Östrogen protektiv wirkt. So erhöht die Supplementierung von Testosteron bei den kastrierten und nicht-kastrierten Weibchen die

Mortalität und Rupturrate in der frühen Phase nach einem MI signifikant. Bei den Männchen führte die Gabe von Östrogen allein zu einer moderaten Verbesserung der Prognose, während dieser positive Effekt durch eine Kastration noch einmal signifikant verstärkt wurde. Weiterhin vergrößerte die Testosterongabe bei den Weibchen das Ausmaß der Dilatation, während sich die kardiale Pumpfunktion signifikant verschlechterte. Einhergehend mit einer Zunahme der Einwanderung von Neutrophilen in den Infarkt-Randbereich erhöhte sich die Rupturrate, wohingegen sich keine Veränderungen des interstitiellen Kollagengehaltes feststellen lies. Östrogen hatte bei den Männchen den entgegengesetzten Effekt, wie sich an der verringerten Entzündungszellinfiltration, verringerten Dilatation und der Absenkung des Blutdruckes zeigte [64, 65]. Welchen Einfluss die Entwicklung der Fibrose auf den kardialen Funktionsverlust hat, wurde bereits häufig diskutiert. Während im Infarktbereich Zelltrümmer phagozytiert und Kollagene degradiert werden, kommt es im nicht-infarzierten Myokard zu einer zunehmenden Migration und Aktivierung von Fibroblasten. In Folge kommt es zu einer Zunahme des interstitiellen Kollagengehaltes was zu einer höheren Stabilität im Gewebe führt. So wurde im Mausmodell von Yang et al. gezeigt, dass die Anzahl der Fibroblasten ab dem vierten Tag nach einem MI signifikant erhöht war und weiterhin anstieg. Gleichzeitig nahm der interstitielle Kollagengehalt zu und erreichte einen Höchststand im vierten Monat nach dem MI [88]. Auch im Rattenmodell war ab dem siebten Tag eine Zunahme des Kollagengehaltes im nicht-infarzierten Myokard sichtbar [89]. Übereinstimmend mit histologisch sichtbaren Ergebnissen wurde sowohl beim Menschen als auch bei Ratte und Maus eine Zunahme der Genexpression von Prokollagen I, III und V nachgewiesen [45, 73, 89]. Der über Hydroxyprolinassay bestimmte Kollagengehalt war bei beiden Geschlechtern vergleichbar [33]. Zahlreiche Veröffentlichungen beschäftigten sich mit der Enzymaktivität der für den Matrixumbau verantwortlichen MMP und TIMP [45, 70, 75, 90], während das Wissen über die entsprechende Genexpression deutlich geringer ist. Auch die Expressionen der TIMPs sind bei der Maus bislang kaum erforscht. Einzig von Fang et al. gibt es eine Studie zur Genexpression von MMPs und TIMPs im kardialen Remodeling, wobei jedoch ein anderer Zeitraum und einen anderer Mäuse-Stamm (129sv) als in der hier vorliegende Studie (FVB/N) verwendet wurde [87]. Dies schränkt eine Vergleichbarkeit beider Studien deutlich ein. Es wird davon ausgegangen, dass v.a. das frühe Remodeling und das dabei beobachtete unterschiedliche Ausmaß der Entzündungsreaktion bei den Geschlechtern, einen entscheidenden prognostischen Faktor darstellt. Für diese Entwicklung sind MMP-2 und MMP-9 von besonderer Bedeutung, welches an Studien mit MMP-2 und MMP-9 KO Mäusen nachgewiesen wurde. Hier wurde gezeigt, dass ein Fehlen dieser MMPs das Remodeling

abschwächt. Ein MMP-9-KO ist durch eine geringere Leukozyten-Einwanderung, durch geringere Dilatation und durch ein fast vollständiges Ausbleiben von Ventrikelrupturen gekennzeichnet [29, 91]. Auch die MMP-2-KO Tiere zeigten weniger Rupturen, ein verringertes Ausmaß der Dilatation und die verminderte Degradation von Matrixbestandteilen [30, 92] was zu einer höheren Überlebensrate führte. Studien an TIMP-KO Mäusen zeigten hingegen einen entgegengesetzten Effekt. Im Falle von TIMP-1 und TIMP-3 zeigten Versuche an KO-Mäusen, dass es unabhängig von einem Myokard Infarkt zu einer spontanen linksventrikulären Dilatation und einer kardiomyozytären Hypertrophie kommt [93, 94]. Nach einem MI wird durch den Ausfall dieser hemmenden Faktoren der Remodeling-Prozess noch verstärkt und sowohl das LV-Volumen, das LV-Gewicht als auch der Myozytendurchmesser stiegen deutlich stärker an als bei Wildtyp-Tieren [95]. Bisherige Forschungsergebnisse bewiesen also den erheblichen Einfluss der MMPs und TIMPs, so dass es möglich erscheint, über ein besseres Verständnis der komplexen Zusammenhänge in dieser Richtung Therapiewege zu finden. Ziel ist es das Remodeling auf positive Weise zu beeinflussen. Es wurden hierbei zahlreiche Studien hinsichtlich der MMP-Inhibition durchgeführt, die viel versprechende Ergebnisse zeigten [91, 96]. Andererseits führte eine unkontrollierte MMP-Inhibierung jedoch dazu, dass die Entzündungszellen in den Infarktbereich gelangen und das nekrotische Material abbauen. Der Nekrosebereich ist ausgedehnter und es bleibt eine deutlich dickere Narbe zurück, die nicht durch ihren hohen, stabilen Kollagengehalt, sondern v.a. durch die Anwesenheit von Zelltrümmern auffällt [25]. Zudem wird die Neovaskularisation gestört, so dass es durch Hypoxie und verringerte Kontraktilität letztlich zu Herzversagen kommen kann [91]. Folglich ist es entscheidend, dass die Möglichkeit einer - vor allem zeitlich betrachteten- selektiveren Hemmung der MMPs gegeben ist, damit der Heilungsverlauf nicht gestört wird. Peterson et al. untersuchten den zeitlichen Prozess der MMP- und TIMP-Expression innerhalb von 16 Wochen nach der Infarktsetzung bei der männlichen Ratte und konnten interessanterweise zeigen, dass die mRNA-Expression und die Protein-Aktivität keineswegs immer miteinander übereinstimmten. So traten phasenweise Erhöhungen des MMP-Protein-Niveaus ohne erhöhte mRNA-Expression und erhöhte TIMP-mRNA-Spiegel ohne die gleichzeitige erhöhte Enzymaktivität auf [90]. Mehrere Studien belegen, dass MMP-9 während der ersten Tage nach einem MI, der vorherrschende MMP-Typ im Infarktgebiet ist [62, 97, 98]. Die MMP-9 Protein-Aktivität war bereits innerhalb von 24 Stunden nach einem MI erhöht, wofür hauptsächlich die gestiegene Anzahl infiltrierender Neutrophiler und Makrophagen verantwortlich gemacht wurden [63, 99]. Auch der Plasma-Spiegel war in dieser Zeit erhöht und wies Spitzenwerte am ersten und vierten Tag auf [100].

MMP-2-mRNA und Protein-Spiegel zeigten bei Ratten einen parallelen Verlauf während der ersten acht Wochen. Die Genexpression war bereits innerhalb der ersten 24 Stunden deutlich erhöht und zeigte ihren Höchststand am 14. Tag nach dem MI [90]. Bei Mäusen wurde ab dem vierten Tag eine signifikante Zunahme der MMP-2-Aktivität, freigesetzt durch Makrophagen, Fibroblasten und Kardiomyozyten, mit einem Höchstspiegel nach einer Woche, beschrieben. Der Protein-Spiegel blieb danach weiterhin erhöht [99, 101]. GU wurden im Mausmodell sowohl für MMP-2, als auch MMP-9 festgestellt. Die Männchen wiesen eine tendenziell höhere Enzym-Aktivität auf, die aber nur im Fall von MMP-2 nach einer Woche Signifikanz erreichte. Sie ging mit einer stärkeren Leukozytenmigration, Dilatation und einem ausgeprägteren Funktionsverlust einher [33]. Zusätzlich scheint es, dass MMP-2 und MMP-9 durch Veränderungen an der Basalmembran, die entscheidend für die Gefäßpermeabilität und LV-Hydratation verantwortlich ist, zum Remodeling beitragen. Die Folge ist eine Reduktion der molekularen Transportprozesse zwischen den Zellen und der Sauerstoffversorgung im Gewebe [74, 102]. Vanhoutte konnte zeigen, dass TIMP-1 das Wachstum von Fibroblasten *in vitro* stimuliert [12]. Ein KO war mit einem beschleunigten Remodeling verbunden und konnte durch eine pharmakologische MMP-Hemmung kompensiert werden [103]. Der TIMP-1 mRNA-Spiegel war im Mausmodell in der ersten Woche bei beiden Geschlechtern deutlich erhöht und am vierten Tag bei den Männchen signifikant höher als bei den Weibchen [87]. Im Ratten-Modell zeigte die Genexpression von TIMP-1 einen Höchstwert am ersten Tag und blieb auch anschließend oberhalb des Basis-Niveaus [89, 90]. Das Protein-Niveau hingegen war erst ab der zweiten Woche erhöht und bereits in der dritten Woche wieder auf das normale Niveau gesunken [90, 101]. Sowohl für TIMP-1 als auch für TIMP-2 weist alles darauf hin, dass sie in der frühen Remodeling-Phase einen weniger starken Einfluss ausüben als in der späteren. Der Genexpressions-Spiegel von TIMP-3 und TIMP-4 sind sowohl beim Herzversagen des Menschen als auch im Tiermodell nach einem MI verringert [87, 94]. Diese Entwicklung wies aber zumindest im Mausmodell keinerlei GU auf [87]. Unabhängig von der Genexpression reduzierte sich die Proteinaktivität von TIMP-4 in der ersten und achten Woche um über 50 % [90, 104].

1.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die potentiell kardioprotektive Rolle der Melusinexpression auf die hypertrophe Reaktion induziert durch MI untersucht werden. Desweiteren wird in diesem Modell der geschlechtsspezifische Einfluss untersucht. Melusin scheint aufgrund oben genannter Ergebnisse [11] in die Mechanotransduktion des Herzens involviert zu sein. Brancaccio zeigte, dass Mäuse, die Melusin nicht exprimierten, nach TAC eine im Vergleich zu Kontrolltieren veränderte myokardiale Reaktion zeigten und eine Dilatation des Herzens mit Herzinsuffizienz entwickelten. Die von Wildtyp-Tieren gezeigte kompensatorische konzentrische Hypertrophie fehlte. De Acetis et al. zeigten, dass eine Überexpression von Melusin nach TAC kardioprotektiv wirkt [9]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Rolle des Melusins bei der Pathogenese von kardialer Hypertrophie zu untersuchen. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen laufen parallel in der Pathogenese der Myokardhypertrophie ab. Hierzu zählen unter anderem Apoptose von Kardiomyozyten, gestörte Kalzium-Homöostase, Umbau des Zytoskeletts und des Sarkomers, sowie ein Umbau der Gewebestruktur mit Fibrose im Interstitium. Diese Fibrose ist maßgeblich verantwortlich für die Versteifung des Myokards und infolgedessen für die reduzierte Kontraktilität des Herzens. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene und Proteine der EZM und mehrere ihrer Regulatoren in ihrer Expression untersucht.

Folgende Arbeitsschritte umfasste die Studie:

1. Induktion einer myokardialen Hypertrophie durch Ligatur einer Koronararterie
2. phänotypische Charakterisierung der Mäuse durch Echokardiographie und Messung morphologischer Parameter
3. Untersuchung der Genexpression von Genen der EZM auf transkriptioneller Ebene durch quantitative RT-PCR
4. Untersuchung der Expression der EZM auf Proteinebene durch Western blotting
5. Histologische Untersuchung des Kollagengehaltes mit Sirius Red Färbung

2. Material

2.1 Tiere

Stamm der Mäuse: FVB/N

Genotypen der Mäuse: Wildtyp (WT) und Melusin-überexprimierende (Mel-TG) Mäuse

Klonierung und Zucht wurde mit Mäusen des Stammes FVB/N am Department of Genetics, Biology and Biochemistry, in Turin, Italien durchgeführt wie beschrieben (Brancaccio, Nat Med, 2002).

2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien

Substanz	Firma
Aceton	J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
Agarose (Elektrophorese)	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
APS	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
BCA	Pierce (Rockford, IL, USA)
β-Mercaptoethanol	Fluka (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Chloroform/ Trichlormethan	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
DAPI	Linaris (Wertheim, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Direkt Rot 80	Fluka/ Sigma Aldrich (MO, USA)
DTT	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EDTA	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Eosin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Essigsäure	Merck Darmstadt, Germany)
Ethidiumbromid (95%)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Formaldehyd (4%; pH 6,9)	Merck (Darmstadt, Germany)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Hämatoxylin Weigerts Lösung A	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin Weigerts Lösung B	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCL (37%), rauchend	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)

KCL	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
MgCl ₂	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NaCl	Merck (Darmstadt, Germany)
NaOH	Merck (Darmstadt, Germany)
Paraffin (Typ 6, 9)	Mikrom (Berlin, Deutschland)
Pikrinsäure	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PonceauS-Solution	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Roti-Load-1 (4x)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
RNAzol B/RNABee	Tell Test Inc. (Friendswood, TX, USA)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Sybr Green	Applied Biosystems (CA, USA)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Trizol Reagenz	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Methanol	Merck (Darmstadt, Germany)
NaCl	Merck (Darmstadt, Germany)
NaOH	Merck (Darmstadt, Germany)
KOH	Merck (Darmstadt, Germany)
Xylol	Merck (Darmstadt, Germany)

2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnungen	Zusammensetzung
Blocking Reagenz	5% Magermilchpulver in 1xTBS-T Puffer
Elektrophoresepuffer	25mM Tris
	250mM Glycin
	3,5mM SDS
DNA-Gel-Ladepuffer	30% Glycerin, 10mM EDTA (pH 8), 0,25% BPB
SDS-Gel-Ladepuffer	0,125 Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 4% SDS, 1,4 M β -Mercaptoethanol, 0,1v% BPB
PBS-T Puffer (10mM)	1 PBS-Tablette, pH 7,4 (Calbiochem)
	in 1L Wasser
	140mM NaCl
	3mM KCl
Proteinlysis Puffer	10mM Tris, pH7,5

	140mM NaCl
	1mM EDTA
	25% Glycerin
	0,5% SDS
	0,5% Nonident P-40
	100ng/µl Protein Inhibitor Cocktail
Stripping Puffer	25mM Glycin
	3,5mM SDS
	pH 2 mit Schwefelsäure 37% einstellen
TBE Laufpuffer (10x):	890mM Tris
	890mM Borsäure
	20mM EDTA
TBS-T Puffer	137mM NaCl
	20mM Tris
	0,1% Tween 20 (v/v)
Transferpuffer (nach Towbin[159])	193,7mM Glycin
	25mM Tris
	20% Methanol
Sammelgelpuffer	1M Tris, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5M Tris, pH 8,8
DNA-Agarosegel	1% bis 1,5% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer
SDS-Acrylamidgele	
(Trenngel 8%, 10%)	Tris (pH 8,8);10% SDS;10% APS; 10%Temed
(Sammelgel 4%)	Tris (pH 6,8); 10%SDS; 10% APS; 10% Temed; 2%Pyronin
Färbelösungen	
HE-Färbelösung	Hämatoxylin Weigerts Lösung A
	0,1% Eosin
	1 Tropfen Essigsäure
Sirius Rot-Lösung	Direkt Rot 80
	Pikrinsäure

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Gen	bp Länge	Sequenz
GAPDH	116	FW: TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG
		RV: CAT CGA AGG TGG AAG AGT GG
Nppa	140	FW: GGG GGT AGG ATT GAC AGG AT
		RV: ACA CAC CAC AAG GGC TTA GG
CTGF	130	FW: TTC CCG AGA AGG GTC AAG CT
		RV: TTG GGT CTG GGC CAA ATG T
TGFβ		FW: CCA AGG AGA CGG AAT ACA GG
		RV: GTT CAT GTC ATG GAT GGT GC
Col 1	136	FW: TGT AAA CAC CCC AGC GAA GAA
		RV: CTG AGT TGC CAT TTC CTT GGA
Col 3	117	FW: CTC ACC CTT CTT CAT CCC ACT CTT A
		RV: ACA TGG TTC TGG CTT CCA GAC AT
Col5	137	FW: CAG CTG AAG ATG CAA TCA AAG TTT
		RV: AAG ACC GTA CCA CAC AGG CTT ATT
TIMP-1	158	FW: GAC CAC CTT ATA CCA GCG TT
		RV: AAC TCT TCA CTG CGG TTC TG
TIMP 2	89	FW: CGT TTT GCA ATG CAG ACG TA
		RV: GAT GGG GTT GCC ATA GAT GT
TIMP 3	138	FW: CTT GGG CTT GTC GTG CTC
		RW: CTT CTT TCC CAC CAC TTT GG
TIMP 4	138	GAG GGA GAG CCT GAA TCA TCA CTA
		TAC CCA TAG AGC TTC CGT TCC A
MMP 2	154	FW: TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG
		RV: GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG
MMP 9	89	FW: GGA TGG TTA CCG CTG GTG
		RW: CTA CGG TCG GCG TCC ACT C
Osteopontin	101	FW: TGA CCC ATC TCA GAA GCA GAA TC
		RV: CAT TGG AAT TGC TTG GAA GAG TT

2.5 Antikörper

Identifizierung	Konzentrationsangabe ; Verdünnungsfaktor	Verdünnung in	Hersteller
Primäre Antikörper			
GAPDH	1000µg/ml;1:50.000	TBS-T	Chemicon
MMP-2	200µg/ml;1:4000	TBS-T	Abcam
MMP-9	200µg/ml;1:2000	TBS-T	Abcam
TIMP-1	200µg/ml;1:200	TBS-T	Santa Cruz
TIMP-3	200µg/ml;1:200	TBS-T	Santa Cruz
Sekundäre Antikörper			
Donkey anti mouse	400µg/ml/1:15 000	TBS-T	Dianova
Donkey anti rabbit	400µg/ml /1:10 000	TBS-T	Dianova

2.6 Sonstiges

2.6.1 Enzyme

DNase I	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Proteinase K	Invitek (Berlin, Deutschland)
Proteinaseinhibitorcocktail (PIC)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNase A	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNase Out	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Taq-Polymerase	Rapidozym (Berlin, Deutschland)

2.6.2 Molekulare Marker

DNA-Ladder	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

2.6.3 Kommerzielle Kit-Systeme

BCA protein assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
ECL Detektionskit	Amersham Biosciences, (NJ, USA)
Invisorb Spin Tissue Mini Kit	Invitek (Berlin, Deutschland)
FragELTMDNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem; Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.6.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Autoradiographiefilme	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Combitips	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml; 2,0ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eindeckmedium (Vectamount)	Vector/Linaris (Wertheim, Deutschland)
Falconröhrchen	BD Biosciences (Erembodegem, Belgium)
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kunststoffpipettenspitzen mit Filter	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Nitrozellulose, Hybond-ECL	MM-Papier Amersham Biosciences (NJ, USA)
Objektträger (Superfrost)	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Petrischalen	Techno Plastic Products (Schweiz)
Quarzküvetten	Hellma (Mülheim, Deutschland)

2.7 Geräte

Gerät	Firma
Abzug	Köttermann (Uetze, Deutschland)
Chemilumineszenz-Scanner Curix 60	Agfa (Köln, Deutschland)
Einbettautomat „Shandon Citadel 1000“	Thermo Electron Corporation
Geldokumentationsanlage	INTAS (Göttingen, Deutschland)
Homogenisator Fast Prep FP 120	Thermo Savant Thermo Inc. (USA)
Master Cycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss AxioVert, Leica Fluoreszenz
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter	Mettler, (Giessen, Deutschland)
Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
SDS-Gelsystem	BioRad (Hercules, CA, USA)

3. Methoden

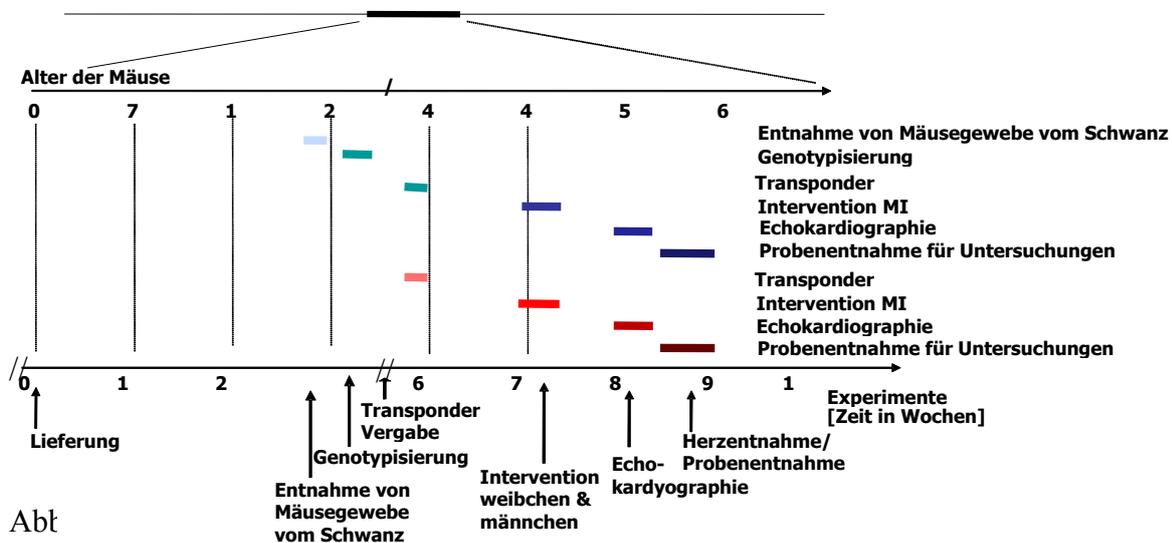
3.1 Tiermodell der experimentellen Herzinsuffizienz

Die Tiermodelle wurden von Prof. Hasenfuß und Prof. Wuttke (Georg August Universität Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die phänotypische Charakterisierung der Mäuse erfolgte in ihren Arbeitsgruppen. Für alle durchgeführten Versuche wurden Mäuse des Stammes FVB/N eingesetzt. Es wurden einerseits Wildtyp-Mäuse und andererseits Melusintransgene Tiere (Mel-TG) mit dem gleichen genetischen Hintergrund sowie in jedem Genotyp Mäuse weiblichen und männlichen Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden vor Beginn der Studie randomisiert, nach dem Geschlecht unterschieden und jeweils in acht Gruppen aufgeteilt:

1. Gruppe: WT-Mäuse scheinoperiert (sham) Weibchen
2. Gruppe: WT-Mäuse scheinoperiert (sham) Männchen
3. Gruppe: WT-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) Weibchen
4. Gruppe: WT-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) Männchen
5. Gruppe: Mel-TG-Mäuse scheinoperiert (sham) Weibchen
6. Gruppe: Mel-TG-Mäuse scheinoperiert (sham) Männchen
7. Gruppe: Mel-TG-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) Weibchen
8. Gruppe: Mel-TG-Mäuse mit Myokardinfarkt (MI) Männchen

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden jeweils mit demselben Operationsprozedere unterzogen jedoch ohne einen Infarkt zu induzieren. Die MI-Tiere wurden 14 Tage nach der Operation nach Einleitung einer Anästhesie und echokardiographischer Evaluation getötet. Die Organe wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die weitere Aufbewahrung bis zur Durchführung der molekularbiologischen und biochemischen Experimente erfolgte bei -80°C . Abbildung 4 veranschaulicht den Versuchsablauf der Studie.

Versuchsplan (Zeitachse)



3.1.1 Herstellung Transgener Tiere

Transgenetische Tiere wurden von Tarone et al. hergestellt, indem eine Sequenz bestehend aus Alpha-MHC-Promotor upstream einer menschlichen Melusin-cDNA mit myc-tag liegend, gefolgt von β -globin Intron und Poly-A-Rest, kloniert wurde. Das beschriebene cDNA-Konstrukt wurde mittels Mikroinjektion in fertilisierte Eier des FVB-Mausstammes integriert. Eine erfolgreiche transgenetische Integration wurde anschließend durch Southern Blots bestätigt.

3.1.2 Myokardinfarkt (MI)

Das Infarktmodell ist das am häufigsten genutzte Modell zur Untersuchung der experimentellen Herzinsuffizienz. Beim Eingriff waren die Tiere sieben Wochen alt. Der Eingriff wurde in einer Narkose mit Chloralhydrat/ Isofloran durchgeführt. Nach medianer Thorakotomie und Präparation des Herzens wurde im Bereich nach der Aufzweigung des Stammes der Arteria coronaria sinistra eine Ligatur angelegt, wodurch der Ramus interventricularis anterior verschlossen wurde. Der resultierende Myokardinfarkt entwickelte sich im Bereich der Vorderwand und betraf den linken Ventrikel. Eine erfolgreiche Ligatur stellte sich intraoperativ mit einer Abblassung des betroffenen Myokardareales dar. Die Entwicklung der CHI ist auf den Verlust von kontraktilem Gewebe zurückzuführen. Die

Infarkt Narbe wurde bei der Organentnahme 14 Tage nach dem Eingriff makroskopisch entfernt und getrennt aufbewahrt. Tiere der Kontrollgruppe wurden der gleichen Operation ohne Gefäßligatur unterzogen, einziger Unterschied war das Ausbleiben einer Ligation der LAD, so dass der Brustkorb, nach Eröffnung des Herzbeutels, ohne weitere Manipulationen wieder verschlossen wurde.

3.2 Echokardiographische Analyse

Alle Tiere wurden 14 Tage nach dem operativen Eingriff einer standardisierten echokardiographischen Untersuchung unterzogen, wie von Brancaccio beschrieben [11]. Es fand ein herkömmlicher Echokardiograph (Firma System Five Performance, General Electric Vingmed, Waukesha, Wisconsin) mit einer 10MHz-Sonde Verwendung. Es wurden Übersichtsaufnahmen der zweidimensionalen Kurzen-Achse des LV erstellt und in M-Mode-Bildern wurden enddiastolische und endsystolische Hinterwand- (PWTd, PWTs) und Septumdicke (IVSTd, IVSTs) bestimmt und die linksventrikulären enddiastolischen (LVEDD) und endsystolischen Diameter (LVESD) gemessen mittels eines computergesteuerten NIH Image Analysensystems (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Anschließend wurden Fractional shortening (FS) und relative Wanddicke (RWT) berechnet:

$$\%FS = [(LVEDD-LVESD)/LVEDD] \times 100$$

$$RWT = [(IVSd + PWd)/2] / (LVEDD/2)$$

3.3 Organentnahme

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Isofluran narkotisiert und noch unter Narkose mit einem Kehlschnitt entblutet. Sofort im Anschluss an den Kehlschnitt wurde der Brustkorb mit einer Schere geöffnet und das Herz präpariert. Das Herz wurde erst in einer Pufferlösung (PBS) gewaschen und von Blut befreit und dann gewogen.

3.4 Genexpressionsanalysen

3.4.1 Genexpression auf Transkriptebene

Um eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhalten, wird die RNA aus den Zellen isoliert. Denn nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden, liegen in diesem Moment als RNA vor. Im Anschluss erfolgt das Umschreiben der RNA in Desoxyribonukleinsäure cDNA durch Reverse Transkription, um letztendlich die Quantifizierung der cDNA durch real-time PCR zu gewährleisten.

RNA-Extraktion:

Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. Ein 20 – 30 mg großes Gewebestück wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben, das bereits zur Hälfte mit Lysis Matrix D und 600 µl RNAzol B versetzt ist. Das Gewebe wird im Fast Prep FP 120 bei Stufe 4.0, 20 sec lang homogenisiert. Dabei wird das Gewebe sowohl mechanisch als auch chemisch zerstört. Bei unzureichender Homogenisierung wird der Vorgang wiederholt. Anschließend werden weitere 400 µl RNAzol B hinzu gegeben. Die Proben lässt man 5 min auf Eis inkubieren, anschließend werden sie bei 4°C 30 min lang geschüttelt (Polymax 1040). Das gesamte Homogenat wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt, welches eine Denaturierung der Proteine bewirkt. Nach 2-minütigem heftigen Vortexen lässt man die Proben wieder für 5 min auf Eis inkubieren. Anschließend wird bei 4°C und 15.800 g 10 min lang zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Zur Fällung der RNA wird das gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben. Nochmals kurz vortexen und über Nacht bei -20 °C fallen lassen. Am nächsten Tag wird bei 4 °C und 15.800 g 30 min lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert und 1 ml 80 %-iges Ethanol hinzugegeben. Die Proben werden bei 4 °C und 7.500 g 5 min lang zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Waschvorgang mit Ethanol wird wiederholt und im Anschluss das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellets wird es in ca. 30 - 40 µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80 °C bis zur Konzentrationsmessung gelagert. Die RNA-Konzentrations- und Qualitätsmessung erfolgt im Agilent 2100 Bioanalyzer. Bei diesem Verfahren wird die RNA der Probe elektrophoretisch aufgetrennt und photometrisch detektiert. Anhand des entstehenden Elektropherogramms wird durch die an das Gerät angeschlossene Software ein Maß für die RNA-Integrität (RNA integrity number, RIN) berechnet. Die RIN kann zwischen 0 und 10 liegen, wobei die RNA-Integrität umso größer ist, je höher die RIN ist. Eine RIN

von 0 ist gleichbedeutend mit kompletter RNA-Degradation, während bei einer RIN von 10 die RNA keiner Degradation unterliegt.

Reverse Transkription (RT):

Da die DNA-Polymerase keine RNA amplifizieren kann, muss die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase - eine RNA-abhängige DNA-Polymerase - in cDNA umgeschrieben werden. Die erhaltene cDNA kann als Vorlage in einer anschließenden PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Somit kann man mit dieser cDNA nachweisen, ob das untersuchte Gen in der Zelle exprimiert wird. Für die cDNA-Synthese (Reverse Transkription) werden die isolierte RNA, ein Primer, eine Reverse Transkriptase und die 4 Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) benötigt. Als Primer werden sog. „random-Primer“ eingesetzt. 4 µl RNA-Material (125 ng/µl) werden mit 6 µl 0,1 % DEPC-Wasser aufgefüllt und mit 2 µl random-Primer (300 ng/µl) versetzt. Als Negativkontrolle dienen 10 µl DEPC-Wasser. Nach kurzem Zentrifugieren lässt man die Proben bei 70 °C im Thermoblock 10 min lang inkubieren, zentrifugiert wieder und stellt sie dann auf Eis. Nun werden zu jeder Probe 9 µl Mastermix hinzu gegeben, bestehend aus:

4 µl 5X PCR-Puffer
2 µl DTT (0,1 M)
1 µl RNasin (Konzentration?)
1 µl dNTP (10 mM)
1 µl SuperScript II (200 units/µl)

Das aktuelle Volumen jeder Probe beträgt nunmehr 21 µl. Nach kurzem Zentrifugieren werden die Proben 10 min bei RT und anschließend 50 min bei 42°C im Thermoblock inkubiert. Zum Denaturieren des Enzyms wird die Temperatur auf 95°C erhöht und die Proben für 5 min darin belassen. Zum Abkühlen wird das Material auf Eis gestellt. Nach letztmaligem Zentrifugieren werden die Proben abschließend auf 2 ng/µl verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Real Time PCR (RT-PCR):

Die RT-PCR erlaubt eine quantitative Analyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den genspezifischen Primern auch ein interkalierender fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green) zugegeben. Dadurch ist es möglich, die Menge der amplifizierten DNA im Verlauf der PCR zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf die Menge des exprimierten Genes in der untersuchten Probe zu ziehen. Der Vorteil der RT-PCR liegt darin, dass die Daten während des PCR-Prozesses kontinuierlich gewonnen werden und so nach jedem Amplifizierungszyklus die Menge an DNA bestimmt werden kann. Für die Quantifizierung wurde die Zunahme des Fluoreszenzsignals von SYBR-Green bei einer bestimmten Wellenlänge nach jedem Amplifikationszyklus gemessen. Die Zyklenanzahl, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergab den Ct-Wert (threshold cycle). Für die Quantifizierung der Menge an DNA-Kopien in der Probe wurde die Standardkurvenmethode benutzt. Die cDNA-Proben (2 ng/µl) werden nach folgendem Mastermix-Ansatz für die RT-PCR auf Eis in 96er Lochplatten pipettiert:

12,5 µl SYBR-Mix
1 µl Primer-Mix
0,0625 µl Taq-Polymerase (5 u/µl)
5 µl Template
Wasser ad 25 µl

Für den Primer-Mix werden die genspezifischen Forward- und Reverse-Primer in den Verhältnissen 1:1 bzw. 3:1 auf eine Endkonzentration von 5, 7,5 bzw. 15 pmol/µl zusammengegeben.

Der SYBR-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

10 X PCR-Puffer (100mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3)
50 mM MgCl₂
2 mM dNTP
10 X SYBR-Green I in 20 % DMSO und Wasser verdünnt
0,5 % NP 40 (v/v)
0,5 % Tween 20 (v/v)
ROX (Kristall mit 635,8 g/mol in ca. 50 ml Wasser gelöst)

Die 96er Lochplatte wird bei 4 °C kurz zentrifugiert und die PCR-Reaktion nach folgendem Programm im ABI-7000 gestartet:

	2-Schritt RT-PCR	3-Schritt RT-PCR
Denaturierung	10 min, 95 °C 15 sec, 95 °C	
Annealing	60sec, primerabh. Temperatur	
Elongation/Extension	-	30 sec, 72 °C

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach dem Temperaturoptimum der jeweils eingesetzten Primer. Je nach Zielgen variierten Primermix-Verhältnis, Schritt- sowie Zykluszahl. Im Anschluss an den Lauf wurde die Dissoziationskurve ermittelt. Hierfür wurden die Amplifikate schrittweise von 60°C auf 95°C erhitzt, die Doppelstränge dissoziieren und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigegeben. Der messbare Anstieg des Fluoreszenzsignals bei einer bestimmten Schmelztemperatur eines Amplifikats ist für jedes Zielgen unterschiedlich und dient der Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion. Durch Abgleich der Ct-Werte über die Standard-Ct-Werte der Eichgerade ermittelt das Programm die Menge an DNA des jeweiligen Zielgens. Die Mittelwerte eines jeden Doppelansatzes werden mit Hilfe der Excel-Office-Software auf die entsprechende Mittelwertprobe des Referenzgens/Housekeepinggens bezogen.

Statistik PCR

Die statistische Analyse zu sämtlichen vorliegenden Parametern erfolgt über das Programm SPSS 15.0 für Windows (Statistical Package for Social Sciences). Jegliche funktionellen wie auch morphologischen Daten werden als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) angegeben. Ein Unterschied zwischen den Gruppen wird auf seine Signifikanz geprüft. Dabei wird $p=0,05$ als statistisch signifikant definiert. Vergleiche zwischen unabhängigen Gruppen werden mit einfaktorieller ANOVA und anschließender Tukey-Korrektur untersucht.

3.4.2 Proteinexpression

Proteinextraktion

Es wurden von jedem Versuchstier Proteine aus Myokardgewebe der Herzkammer verwendet. Das Abwiegen der jeweiligen Menge Gewebepulver erfolgte auf Trockeneis. Die abgewogenen Mengen wurden im Fast Prep.Gerät homogenisiert und mechanisch aufgeschlossen. Der verwendete Protein-Extraktions Puffer enthielt:

Conc.	substance	stock	For 100 ml take:	function
10 mM	Tris, pH 7.5	1 M	1 ml	Buffer
140 mM	NaCl	5 M	2.8 ml	Osmolarity
1mM	EDTA	0.5 M	200 µl	Chelator
25%	Glycerol	100%	25 ml	Weight
0.5%	SDS	20%	Wird später dazugeg.	Lysis 1
0.5%	Nonident P-40	100%	500 µl	Lysis 2
			Per ml take:	
5 mM	DTT	0,1 M	10 µl	Disulfid distract.
0.5 mM	PMSF	50 mM	10 µl	Inh. 1
100 ng/ml	Aprotinin (PIC)	100 µg/ml	1 µl	Inh. 2
100 ng/ml	Leupeptin (PIC)	100 µg/ml	1 µl	Inh. 3
100ng/ml	Pepstatin (PIC)	100 µg/ml	1 µl	Inh. 4

Frisch zugegeben wird 25µl Proteaseinhibitor Cocktail (PIC) pro 350µl Protein-Extraktions-Puffer, um das Material im Fast Prep.Gerät zu homogenisieren. Nach der Homogenisation gibt man pro 100µl Puffer 1µl 10% SDS dazu und lässt die Proben 20 Minuten auf Eis lysieren. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 14.000rpm über zehn Minuten wird der wässrige Überstand in ein neues Eppi überführt und bei -80°C weggefroren.

Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration der einzelnen Gewebeprobe erfolgte nach dem von Bradford beschriebenen fotometrischen Verfahren. Die Proteinmessung erfolgt auf einer ELISA-Platte mit Flachboden im ELISA Platten Reader. Zur Erstellung der Standardkurve wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die fotometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt. Der Einfluss des Lösungsmittels der Proben wurde durch die Messung

ihrer optischen Dichte und Abzug bei jeder Probenmessung berücksichtigt. Als Farbstoffgemisch wurde PIERCE BCA Protein Assay Reagenz benutzt, in dem Mischverhältnis 1 Teil Reagenz B zu 50 Teilen Reagenz A.

Proteinexpressionsanalyse

Mit der Proteinexpressionsanalyse wurde die in einer Probe enthaltene Proteinmenge quantifiziert. Dazu wurden sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western Blot, Detektion mittels Chemilumineszenz und eine Bandendichtemessung durchgeführt.

SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Zur Auftrennung des Proteingemisches der homogenisierten Gewebeproben wurde eine SDS-PAGE in einem 1 mm dicken Gel entsprechend einem Protokoll von Towbin et al. durchgeführt [82]. Das verwendete Gel wurde jeweils am Tag des Versuchs hergestellt und setzte sich aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel zusammen. Das Trenngel wurde nach folgenden Vorgaben hergestellt:

	10% -iges Gel	12.5% -iges Gel	15% -iges Gel
30% Acrylamid Mix (Art. 3029.1, Fa. ROTH, Kühlschrank)	3.3 ml	4.0 ml	5.0 ml
1.5 M TRIS pH 8.8 (Gelplatz)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Wasser (Milipore Wasser)	4.0 ml	3.3 ml	2.3 ml
10% SDS (Gelplatz)	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED (Art. 2367.3, Fa. ROTH)	4 µl	4 µl	4 µl

Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

Stacking Gel (5%, 8 ml):

5.5 ml Wasser

1.3 ml 30% Acrylamid Mix

1 ml 1 M Tris, pH 6.8

80 μ l 10% SDS

80 μ l 10% APS

8 μ l TEMED

Anschließend polymerisierte das Gel 45 Minuten lang. Vor dem Beladen des Gels wurden die jeweiligen Verdünnungen und die benötigten Volumina berechnet. Von jeder Probe wurden 12,5 μ g Protein aufgetragen. Durch die vorangegangene Verdünnung der Probe auf 1 μ g Protein/ μ l Probe entspricht das 12,5 μ l Probe. Zu jedem Probenvolumen wurden 2,5 μ l Ladepuffer (Rotiloadpuffer, 0,625 M TRIS- HCl pH 6.8, Glycerol, 1% Bromphenolblau, 5% 2- Mercaptoethanol, 2% SDS, aqua dest.) sowie aqua dest. zum Vermeiden unterschiedlicher slot- Volumina hinzugefügt. Das β -Mercaptoethanol aus dem Ladepuffer und eine fünfminütige Erhitzung der Proben im Wasserbad bei 95°C garantierten eine ausreichende Denaturierung der Proteinproben. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde eine Apparatur der Firma BioRad verwendet. In die Elektrophoresekammer wurden 800 ml 1*TRIS-Glycin Elektrophoresepuffer (EP) eingefüllt (5fach konzentriert: 0,1 M TRIS, 1,25 M Glycin, 0,1% SDS, 900 ml aqua dest.). Während der Durchführung wurde die Elektrophoresekammer durch eine Eisumschichtung gekühlt, um eine Erhitzung des wärmeempfindlichen Polyacrylamidgels zu vermeiden. Die angelegte Spannung betrug während des Laufs im Sammelgel 80 V und wurde nach Eintreten der Proben in das Trenngel auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die erste Bande des Markers 0,5cm vom Ende des Trenngels entfernt war.

Western Blotting

Im Anschluss an die SDS- PAGE erfolgte mit Hilfe der Nassblot- Technik der Transfer der elektrophoretisch nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose- Membran (Hybond ECL, Firma GE Healthcare).

In den durchgeführten Versuchen wurde eine Stromstärke von 400 mA und 50 V für eine Blotdauer von 90 Minuten gewählt. Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Aufbau der verwendeten Blotkammer. Zum Einsatz kam eine Elektroblokkammer der Firma BioRad.

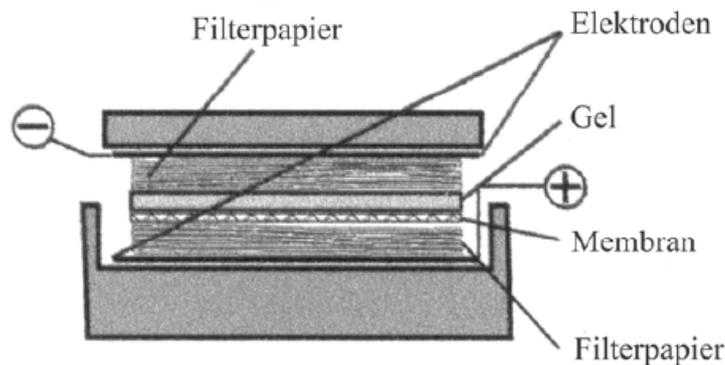


Abb. 3: Aufbau einer semidry-Blotkammer zur Durchführung eines Western Blot.

Nachdem die Gele aus der Gelkammer genommen wurden, wird das Sammelgel mit einem Skalpel abgeschnitten und das verbliebene Acrylamidgel für zehn Minuten in der Transferpufferwanne gespült, um das SDS zu entfernen. Dieser stört den Transfer. Die elektrische Leitfähigkeit des verwendeten Filterpapiers wird durch die Vorbehandlung mit Transferpuffer erreicht. Der Transferpuffer setzte sich aus 800 ml einer Lösung zusammen, die 0,1 M TRIS, 0,08 M Glycin und 0,37 g SDS enthielt. Nach Adjustierung auf pH 8,3 wurden 200 ml Methanol hinzugefügt. Bei der verwendeten Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL) handelt es sich um eine Kunststoffmembran, die für die Untersuchung von Proteinen optimiert wurde. Sie zeichnet sich durch eine hohe Robustheit und eine hohe Proteinbindungskapazität aus. Vor der Verwendung wurde die Membran für zwei Minuten in Reinst-Wasser und anschließend für 20 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Nach Einhängen des "Gel-Sandwichs" in die Blotapparat wird diese mit Eisakku zur Kühlung versehen, mit Transferpuffer aufgefüllt. Das Blotting läuft bei 100V und 200-300mA. Nach Beendigung des Western Blot wurde die Membran für 15 Minuten in einem PBS-T-Puffer gewaschen, der 80 mM Na₂HPO₄ anhydros, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl (jeweils Roth, Karlsruhe) und 1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) enthielt. Mit diesem Schritt wurden Rückstände des Transferpuffers entfernt. Zur Kontrolle der Proteinqualität auf der Membran wurde das Trenngel nach Ende des Western Blot mit Ponceau-Lösung (Fa.Sigma, Kat.P7767) gefärbt.

Detektion der Proteinbanden

Antikörperinkubation

Zur Untersuchung der kardialen Proteinexpression wurde je nach Gen ein jeweils spezifischer Primärantikörper verwendet, der in einem zweiten Inkubationsschritt mit einem Sekundärantikörper markiert wurde. Zu Beginn und im Verlauf des Nachweisprotokolls wurden vakante Proteinbindungsstellen der Nitrocellulose- Membran durch einen 5% Magermilchpulver enthaltenden PBS- T- Puffer abgesättigt. Die Inkubation mit dem spezifischen, polyklonalen Primärantikörper wurde in 10 ml Puffer (PBS- T, 5% Magermilchpulver) für 60 Minuten durchgeführt. Das Antikörperaliquot enthielt Anti-IgG in einer Konzentration von 0,2 µg/µl in einem PBS- Puffer. Nach drei Waschschritten in PBS- T wurde die Membran mit einem polyklonalen Sekundärantikörper für 20 Minuten inkubiert. Das Antikörperaliquot enthielt anti- rabbit-IgG in einer Konzentration von 5 µg/ml. Der Sekundärantikörper wurde laut Verdünnungsverhältnis im Inkubationspuffer eingesetzt. (siehe Tabelle 1).

Protein	Firma	Konzentration	2.Antikörper	Firma	Konzentration	kDa
GAPDH	Chemicon	1:50 000	D.a.Mouse	Dianova	1:15 000	36
	MAB 374			715-035-150		
MMP 2	abcam	1:4000	D.a.Mouse	Dianova	1:8000	63 (aktiv)
		4°C üN			1h RT	72 (pro MMP 2)
MMP 9	abcam	1:2000	D.a.Rabbit	Dianova	1:10000	92 (pro human) bzw. 102-105 (pro mouse) und 82 (active)
TIMP 1	Santa Cruz (H-150)	1:200	D.a.Rabbit	Dianova	1:10 000	22
		1h RT			1h RT	
TIMP 3	Santa Cruz (H-55)	1:200	D.a.Rabbit	Dianova	1:10 000	24 / 30
		1h RT			1h RT	

Tab. 1 Verdünnungsverhältnisse des Sekundärantikörpers im Inkubationspuffer

Detektion durch Chemilumineszenz

Die Detektionsreaktion basierte auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. Die Reaktionsreagenz (ECL Lösung, GE-Healthcare) wird vorbereitet, indem man Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 zusammengibt. Anschließend wird die Membran mit dem Farbstoffgemisch benetzt und vier Minuten ruhen gelassen. Währenddessen wird das Substrat

des gebundenen Sekundärantikörpers umgesetzt. Durch diese Reaktion kommt es zur Emission von Licht, das durch einen aufgelegten Film (KODAK Biomax, Fa.Sigma) detektiert wird. Die

Bandenschwärzung auf dem Film entspricht dabei der aufgenommenen Lichtintensität und ist abhängig von der gebundenen Antikörpermenge. Das Prinzip der Chemilumineszenzreaktion ist in **Abbildung 4** dargestellt.

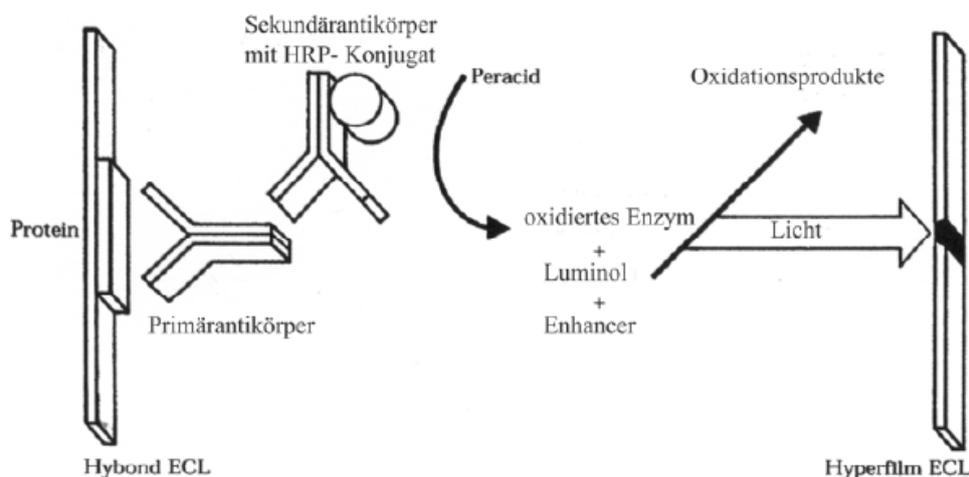


Abb. 4: Ablauf der Chemilumineszenzreaktion unter Einsatz eines Peroxidasekonjugates.
HRP = Meerrettich-Peroxidase

Quantifizierung der Proteinbanden

Für die Quantifizierung der Banden auf dem entwickelten Film wurde das Auswertungsprogramm AlphaEase verwendet. Dafür wurden die Filme gescannt und die resultierenden Dateien in AlphaEase importiert.

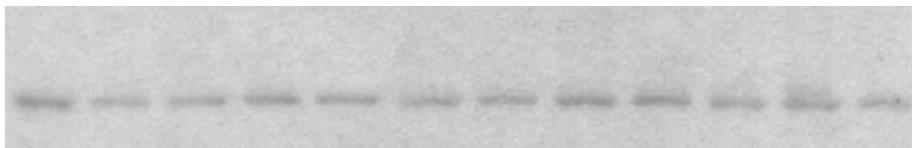


Abb. 5: Zur Bandenquantifizierung verwendeter Scan eines entwickelten Films.

Das Programm vergibt 256 Graustufen im ganzzahligen Bereich von 1 bis 256. Im Programm besteht die Möglichkeit eine region of interest (ROI) festzulegen. Eine ROI wurde zum einen unmittelbar um die Bande gelegt, zum anderen um das weitere Umfeld der Bande.

Das Vorgehen ist in *Abbildung 6* dargestellt.



Abb. 6: Markierung der region of interest (ROI) von Bande und Umgebung zur Quantifizierung der Bandendichte.

Die Bandenintensität des ROI wurde eingelesen und eine lokal definierte Hintergrundsignalintensität abgezogen.

3.5 Histologische Untersuchung

3.5.1 Paraffineinbettung

Die Einbettung der fixierten Herzen erfolgte bei unserem Kooperationspartner vor Ort, automatisiert im Paraffinkarussell. Zu Beginn wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%-iges, 80%-iges, 96%-iges und 3x 99,6%-iges Ethanol für jeweils eine Stunde). Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde in Xylol inkubiert, um den absoluten Alkohol zu entfernen und die Anlagerung des Paraffins zu ermöglichen. Im Anschluss wurde das Gewebe bei 60 °C zunächst 1,5 Std. in Paraffin 6 und dann 1,5 Std. in Paraffin gebadet, um es fest und schnittfähig zu machen. Zur besseren Handhabung wurde ein Paraffinblock, in welchem sich das Herz befand, angefertigt. Hierfür wurde das Gewebe der Einbettkassette entnommen und in einem Gießschälchen mit 56° C warmen Paraffin übergossen. Sobald dieses erkaltet war, konnte der Block aus dem Schälchen gelöst werden.

3.5.2 Anfertigung der Schnitte

Am Mikrotom werden die histologischen Schnitte gefertigt. 2 h vor Beginn lagert der Paraffinblock bei -20 °C, um auszuhärten. Zum Schneiden wird der Block parallel zur Klinge eingespannt. Dabei sorgt die geräteeigene Kühlvorrichtung für eine fortlaufende Kühlung des Materials. Die Schnittdicke wird auf 5 µm eingestellt. Der Schnitt schiebt sich dabei auf das Messer und kann von diesem mit einem vorher angefeuchteten Pinsel abgenommen werden. Die einzelnen Schnitte werden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20 °C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um möglichst glatt auf einen

Objektträger aufgezogen zu werden. Dazu wird dieser so tief und schräg in das Wasserbad gehalten, dass der Schnitt an der gewünschten Stelle aufgezogen werden kann. Zur Trocknung und zum besseren Haften kommen die Schnitte über Nacht in einen 37 °C warmen Brutschrank, danach werden sie in Objektträgerkästen bei RT aufbewahrt.

3.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Als Übersichtsaufnahme des Querschnittes und um dessen Architektur und pathologische Veränderungen beurteilen zu können, soll die HE-Färbung dienen. Zum Entparaffinieren kommen die Objektträger für 2 x 10 min in Xylol, einem organischen Lösungsmittel, welches das Paraffin aus dem Gewebe löst. Anschließend durchlaufen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe mit 100 %-, 96 %-, 80 %- und 70 %-igem Ethanol für je 5 min. Dies bewirkt eine Rehydratation des Gewebes, damit sich der wasserlösliche Farbstoff anlagern kann. Sodann erfolgt eine 2 x 5-minütige Waschung in destilliertem Wasser auf dem Schüttler. Die Objektträger werden aus dem Wasserbad genommen, die Flüssigkeit abgeklopft und für 10 min in Hämatoxylin inkubiert. Es färbt durch Elektroabsorption die Zellkerne blau. Der basische Farbstoff Hämatoxylin mit einem pH oberhalb des isoelektrischen Punktes (I.P.) der Zellkerne. Nach der Färbung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Das Erhöhen des pH-Wertes durch Spülen der Objektträger für ca. 30 min unter fließendem Leitungswasser bewirkt das sog. Bläuen der Zellkerne. Im folgenden Schritt wird durch das 2-minütige Einwirken von Eosin, 1:10 mit Millipore und 1 Tropfen Eisessig verdünnt, das Zytoplasma rot gefärbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt acidophile (basische) Strukturen rot. Die Schnitte werden in Millipore gewaschen bis sich die Zellkerne deutlich vom Bindegewebe abheben (ggf. unterm Mikroskop kontrollieren). Eine aufsteigende Alkoholreihe sorgt für die Dehydratation des Gewebes, das organische Lösungsmittel Xylol klärt das Gewebe. Nach dem Trocknen der Schnitte kann das Gewebe mit nicht-wässrigem Einschlussmedium (VectaMount Permanent Mounting Medium) eingedeckt und mit einem Deckglas (24 x 50 mm) verschlossen werden. Abschließend erfolgt das Versiegeln von Deckglas und Objektträger mit Nagellack. Es wird je eine Übersichtsaufnahme der HE-gefärbten Schnitte am Lichtmikroskop (Axiovert 25) mit 2,5er Objektiv bei Durchlicht gemacht und mit der Digitalkamera DSC-S75 Cybershot von Sony aufgenommen.

3.5.4 Sirius Red Färbung

Die Färbung diente der besseren Darstellung der kollagenen Anteile des Myokards. Kollagen stellte sich rot und die Muskelzellen gelb dar. Mittels Xylol wurde der Schnitt zunächst entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe wieder aus dem Gewebe ausgewaschen (96%-iges, 80%-iges, 70%-iges und 30%-iges Ethanol). Es folgten zwei Spülungen in destilliertem Wasser und im Anschluss eine 90-minütige Inkubation in 0,1%iger Siriusrot-Lösung (0,1 g Siriusrot Farbstoff gelöst in 100 ml Pikrinsäure, pH: 2,0). Nach Lufttrocknung wurde der Schnitt direkt in Xylol (10 Minuten.) gegeben und wieder entwässert. Abschließend wurde der trockene Schnitt mit einem Deckgläschen eingedeckelt und die Ränder mit klarem Nagellack versiegelt.

3.5.5 Bestimmung des Kollagengehalts im Gewebe

Zur digitalen Auswertung der einer Sirius Rot-Färbung unterzogenen histologischen Präparate wurde das Programm *ImageJ* (*National Institute of Health, NIH, USA*) herangezogen, um das Ausmaß der interstitiellen Fibrose beurteilen zu können. Die Gewebeschnitte wurden ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit mit einem Leica Mikroskop und einer Videokamera in 20-facher Vergrößerung im 1024x756-Pixel-RGB-Format und einer Farbqualität von 32 Bit fotografiert (Abbildung 7A). Aus zehn Einzelbildern der Präparate wurde mit dem Programm *ImageJ* ein Durchschnittsbild errechnet, um die kamerabedingten Artefakte zu minimieren. Für die Analyse der einzelnen Bilder wurde ein selbst programmiertes Makro verwendet, welches den Anteil kollagener Matrix pro Bild bestimmt. Dies geschieht, indem im Grenzwert (Threshold) –Modus eine Schwarz-/Weißgrenze zwischen 0 und 255 Graustufen festgelegt wird und die zu messenden Flächen dunkelgrau bis schwarz dargestellt werden (Abbildung 7B). Das Makro ermöglicht, die Flächen in einem bestimmten Größenbereich unter der Angabe eines minimalen (Abbildung 7C) und maximalen (Abbildung 7D) Grenzwertes zu vermessen. Der Hintergrund, welcher nicht durch Gewebe abgedeckt war, wurde berücksichtigt und nicht mit in die Kalkulation einbezogen.

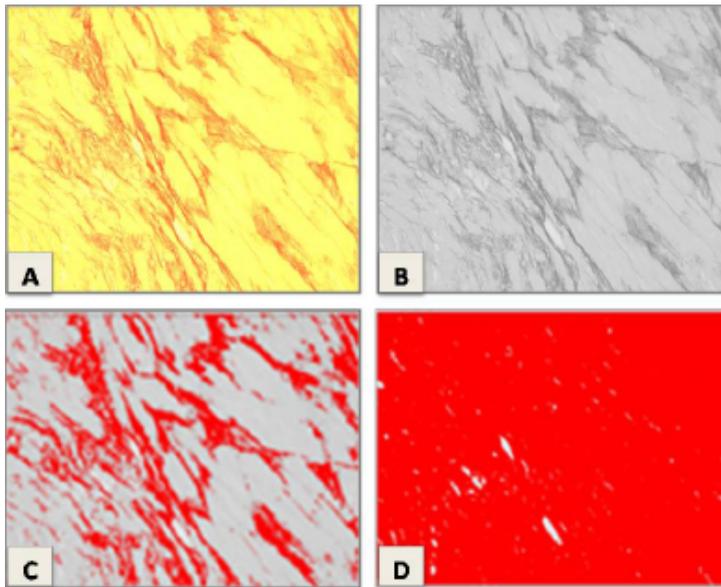


Abb. 7: *Abfolge der digitalen Bildanalyse der Sirius Red Färbung (aus Fliegner, D. Dissertation, HU Berlin, 2008)*

Auf diese Art und Weise wurden an jedem Sirius Rot gefärbten Gewebeschnitt zehn zufällig ausgewählte Ausschnitte vermessen. Alle Gewebeschnitte der zu untersuchenden Gruppen wurden mit den gleichen Einstellungen, vom gleichen Untersucher analysiert. Um den prozentualen Gesamtkollagengehalt, den so genannten „Fibrosescore“, zu berechnen, wurden die Daten der Bildanalyse mit folgender Formel kalkuliert:

$$\frac{\text{Teilflächeninhalt}}{\text{Gesamtflächeninhalt}} \times 100 = \% \text{ kollagene Strukturen}$$

Diese Berechnung wurde für jedes Bild durchgeführt. Danach wurden die Bilder den zugehörigen Gruppen zugeordnet und ein Mittelwert gebildet.

3.5.6 Statistik

Die statistische Auswertung der funktionellen Daten der Echokardiographie sowie der Gen- und Proteinexpression erfolgte mit dem “Statistical Package for Social Sciences”(SPSS 15.0) für Windows. Alle funktionellen und morphologischen Resultate wurden auf eine statistische Signifikanz überprüft. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei den funktionellen und morphologischen Daten sowie die Unterschiede bei den histologischen Ergebnissen wurden mit dem gepaarten t-Test und die Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe mit dem t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die Unterschiede aus den Gen- und Proteinexpressionsdaten wurden

mit Hilfe der ein- bzw. zweifaktoriellen ANOVA analysiert (siehe Appendix). Die arithmetischen Mittelwerte werden stets mit Standardabweichung angegeben. In den Graphen ist der Standardfehler als Fehlerbalken dargestellt.

4. Ergebnisse

Um das kardiale Remodeling eines hypertrophen Myokardwachstum zu charakterisieren wurden WT und transgenesen Melusin Mäuse einer Myokardinfarkt-Intervention unterzogen. Es wurden weibliche und männliche Tiere beider Genotypen untersucht. Die phänotypische Charakterisierung der Mäuse nach MI erfolgte in der Arbeitsgruppe unserer Kooperationspartner Prof. Hasenfuß und Prof. Wuttke, Georg August Universität Göttingen, Deutschland. Die Genexpressionsstudien auf RNA- und Proteinebene und die Histologie erfolgten am Institut für Geschlechterforschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Regitz-Zagrosek.

4.1. Mortalitätsrate nach Herz-Infarkt-Intervention (MI)

Insgesamt nahmen 247 Tiere an der Myokardinfarkt-Studie teil, davon 117 Weibchen und 130 Männchen. 153 Tiere wurden einer Myokardinfarkt-Intervention unterzogen, darunter 82 Männchen und 71 Weibchen. Einer sham-Operation als Vergleichsgruppe wurden 94 Tiere unterzogen, darunter 48 Männchen und 46 Weibchen.

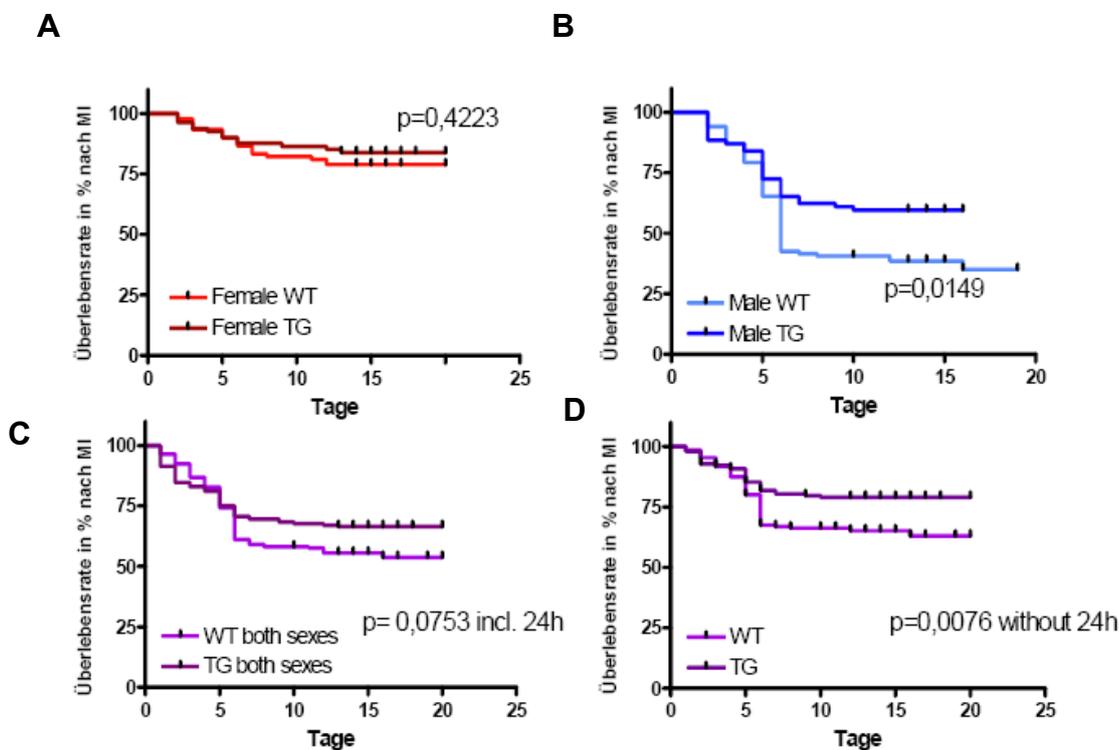


Abb. 8.: Überlebensraten in % nach Myokardinfarkt-Intervention. Getrennt nach Genotyp Wildtype (WT) und Transgen (TG) A. Weibchen B. Männchen C. Beide Geschlechter inklusive 24 Stunden post-MI D. Beide Geschlechter exklusive 24 Stunden

Es überlebten aus dem Gesamtlot von 247 Tieren insgesamt 151 Tiere, darunter 72 Männchen und 79 Weibchen.

Nach der Myokardinfarkt-Intervention der 153 Tiere überlebten davon 86 Tiere, das heißt 56% der Tiere (67 Tiere verstarben) und die Sham-Intervention der 94 Tiere überlebten 65 Tiere, das heißt 69% Tiere (29 Tiere verstarben). Insgesamt war die Mortalität nach einer Myokardinfarkt-Intervention bei den Männchen deutlich höher als bei den Weibchen (Abb.8A+B). Insgesamt starben 40 männliche Tiere und 27 weibliche Tiere nach Myokardinfarkt-Intervention. Die erhöhte Sterblichkeit in den ersten 24 Stunden post operationem lässt sich oft auf sekundäre Ursachen zurückführen, die mit dem operativen Eingriff in Zusammenhang stehen, z.B. erhöhter Blutverlust. Dies wurde in den Abbildungen 8A und 8B berücksichtigt. Bei beiden Geschlechtern zusammengenommen überlebten signifikant mehr transgene Tiere (Abb.8C+D) im Vergleich zum Wildtyp. Von den 124 transgenen Tieren zu Versuchsbeginn überlebten 79 Tiere (Sham + MI-Intervention) (45 Tiere starben). Von den 123 Wildtyptieren zu Versuchsbeginn überlebten 70 Tiere (Sham + MI-Intervention) (53 Tiere starben). Nach MI starben von den 75 dafür eingesetzten transgenen Tieren 31 Tiere (41%) und von den für MI-Intervention eingesetzten 70 WT-Tieren starben 42 Tiere (60%).

4.2. Morphologische Veränderungen nach MI

4.2.1 Körpergewicht

Um festzustellen, ob es durch den operativen Eingriff zu einem sich verändernden Allgemeinzustand der Tiere mit sich verschlechternder körperlicher Verfassung kam wurde das Körpergewicht kurz vor der Organentnahme ermittelt.

Das durchschnittliche Körpergewicht war in allen Gruppen stabil und änderte sich weder durch die Operation noch unterschied es sich wesentlich innerhalb der einzelnen Gruppen.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Männchen betrug 26,5g, das der Weibchen betrug durchschnittlich 21,23g. Die Männchen aller vier Gruppen wogen prä- und postoperativ signifikant mehr als die Weibchen.

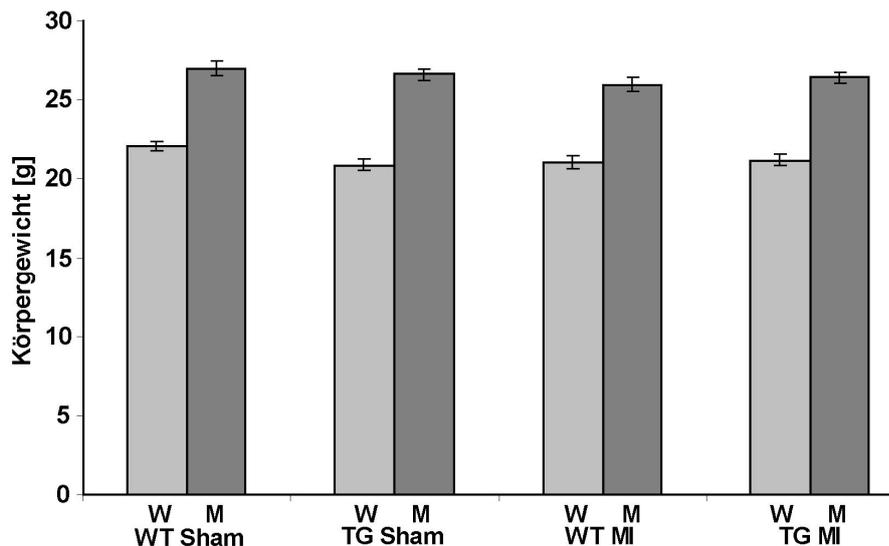


Abbildung 9. Körpergewicht der männlichen und weiblichen WT und TG Mäuse nach MI

4.2.2 Herzgewicht

Es wurde sowohl das Herz als auch der isolierte linke Ventrikel separat gewogen, um eine Aussage über die Zunahme des Gewichtes nach dem operativen Eingriff machen zu können. Dieser Wert diente auch als Vergleichswert zu der vom Ultraschallgerät ermittelten LV-Masse (siehe 4.3).

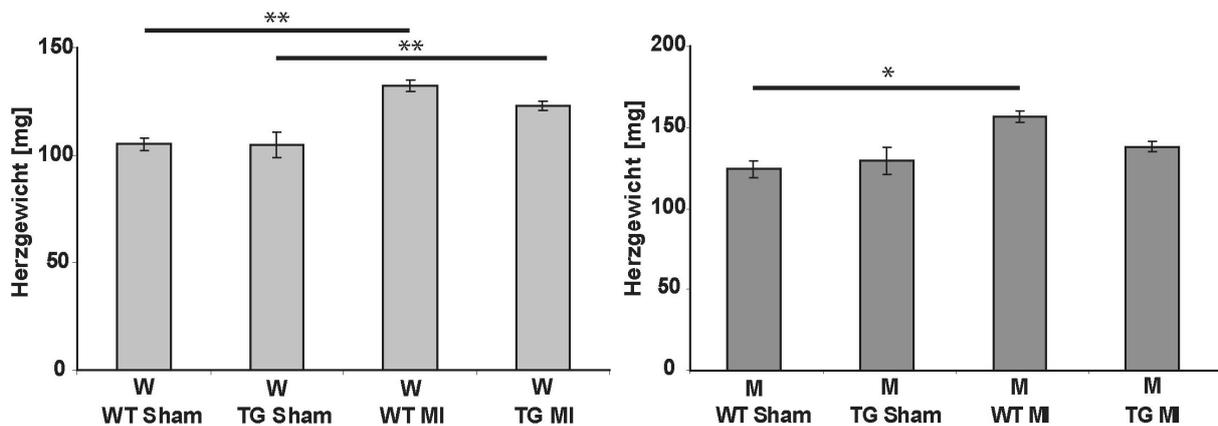


Abb. 10. Herzgewicht der WT und TG nach MI. **A.** männliche Mäuse, **B.** weibliche Mäuse

Die Herzen der MI-Tiere wogen signifikant mehr als die der dazugehörigen sham-Gruppe. Nach MI nahmen die Herzen der Melusin-Überexpressionstiere weniger an Gewicht zu als die Wildtyp-Tiere. In den Wildtyp-Tieren wogen nach MI sowohl die Herzen der Weibchen als auch die der Männchen um 26% mehr als bei den geschlechtsgleichen WT sham-Tieren. Während das Herzgewicht bei den transgenen Weibchen nach MI um 17% höher lag als bei

den transgenen sham-Weibchen wiegen die Herzen der transgenen Männchen nach MI nur 6% mehr als die der transgenen sham-Männchen.

Das Gewicht des isolierten linken Ventrikels verhielt sich analog zum Herzgewicht, jedoch war die prozentuale Zunahme post-MI in beiden Geschlechtern stärker.

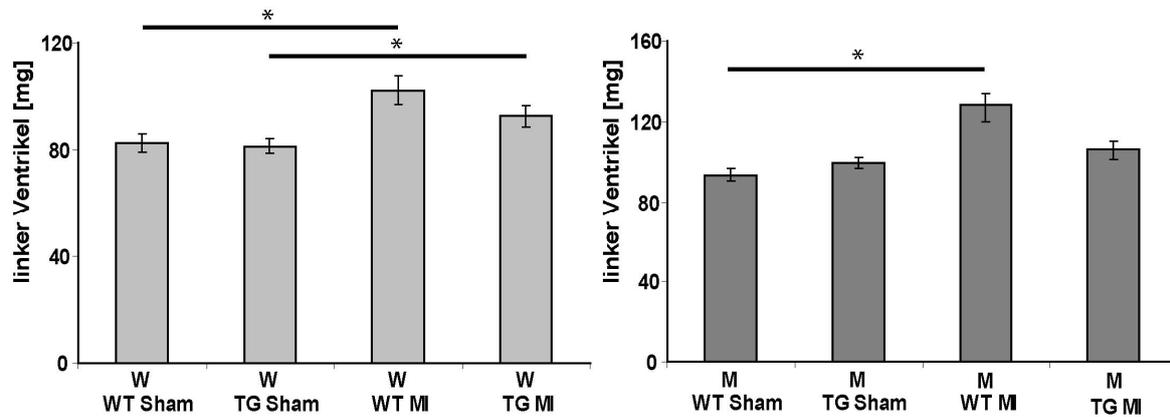


Abb. 11. Gewicht des linken Ventrikels nach MI. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse

Das LV-Gewicht der Wildtyp-Weibchen nach MI war mit $102,33 \pm 5,33$ mg zu $82,54 \pm 3,58$ mg (WT-sham-female) um 24% höher als das der Kontrollgruppe. Demgegenüber betrug die Differenz im LV-Gewicht von den transgenen Weibchen nach MI ($92,61 \pm 3,95$ mg) zu den der Kontrollgruppe ($81,46 \pm 2,7$ mg) nur 14%. Bei den Männchen stieg das LV-Gewicht nach MI im Verhältnis zu den Kontrolltieren stärker an. Das LV-Gewicht der Wildtyp-Männchen nach MI war mit $128,55 \pm 8,42$ mg zu $93,26 \pm 2,79$ mg (WT-sham-male) um 38% höher als in der Kontrollgruppe. Demgegenüber war die Differenz im LV-Gewicht von den transgenen Männchen nach MI zu den der transgenen sham-Männchen nur 7%. Im Vergleich LV-Masse der MI-Tiere zu LV-Masse der Kontrolltiere betrug die Differenz bei den transgenen Männchen (7% Differenz) signifikant weniger als bei den transgenen Weibchen (14%). Bei den Wildtyptieren war es genau andersherum. Hier war die Differenz (sham-Tiere im Vergleich zur MI-Gruppe) bei den Männchen viel höher (38%) als bei den Weibchen, die nur 23% Unterschied im LV-Gewicht zwischen MI- und sham-Tieren aufwiesen.

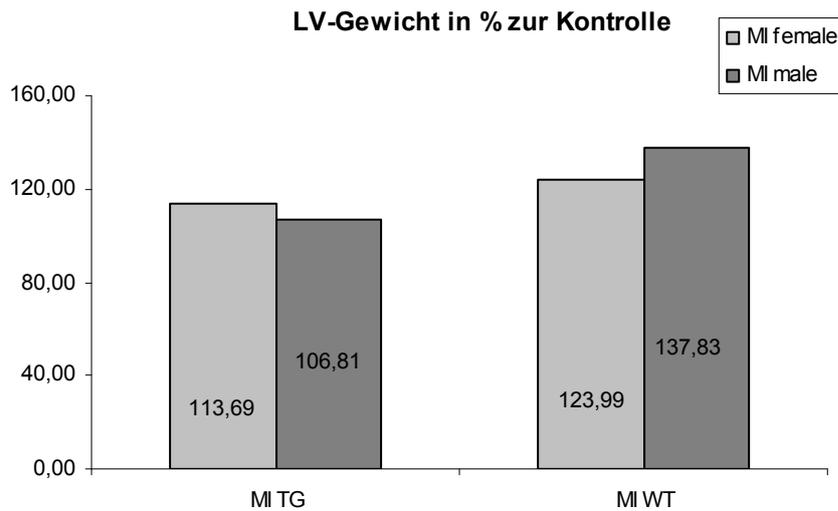


Abb. 12. LV-Gewicht in % im Vergleich zur Kontrolle

Das Verhältnis LV-Gewicht/Herzgewicht unterschied sich in den einzelnen Gruppen kaum. Weder zwischen Männchen und Weibchen noch zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren war ein signifikanter Unterschied auszumachen.

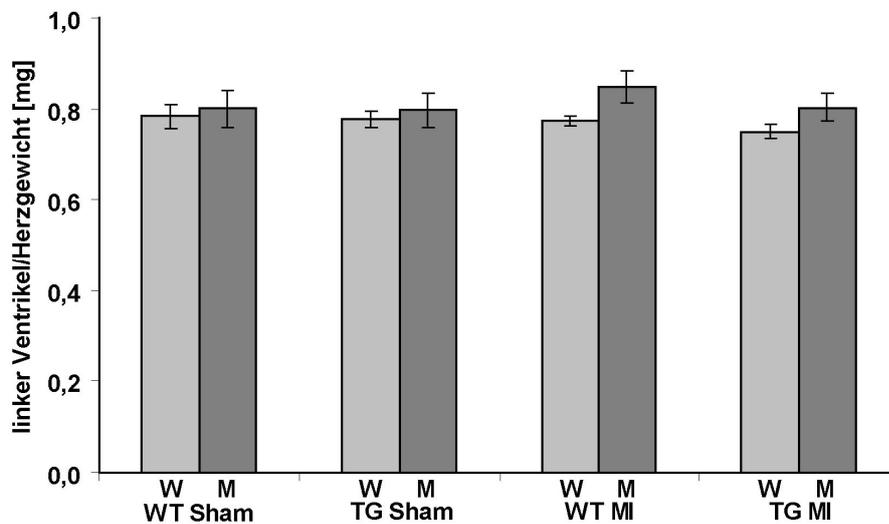


Abb. 13. Verhältnis des Gewichts des linken Ventrikels zum gesamten Herzgewicht. (Männlicher und weiblicher WT und TG Mäuse nach MI)

4.3 Morphologische Veränderungen nach MI - Echokardiographische Untersuchung

Die echokardiografische Untersuchung während des Versuchszeitraumes erlaubte eine Analyse der Herzfunktion und die Untersuchung der Hypertrophieprogression. Ultraschallmessungen wurden am Tage 14 nach der Operation durchgeführt. Im M-Mode wurde die Dicke der linksventrikulären Hinterwand und der Durchmesser in der Systole und in der Diastole gemessen. Errechnet wurde daraus die linksventrikuläre Masse. In B-Mode Bildern der langen parasternalen Achse wurde der innere Flächeninhalt und die Längsachse eines Querschnittes des linken Ventrikels in der Systole und in der Diastole gemessen. Hieraus wurden das Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion als funktionelle Parameter berechnet.

4.3.1 LV-Hinterwand

Die Hinterwanddicke wurde bestimmt, um eine eventuell eingetretene kompensatorische Hypertrophie feststellen zu können. Der Infarkt erstreckte sich auf die Vorderwand, weshalb die Hinterwanddicke als aussagekräftiger Parameter gewählt wurde.

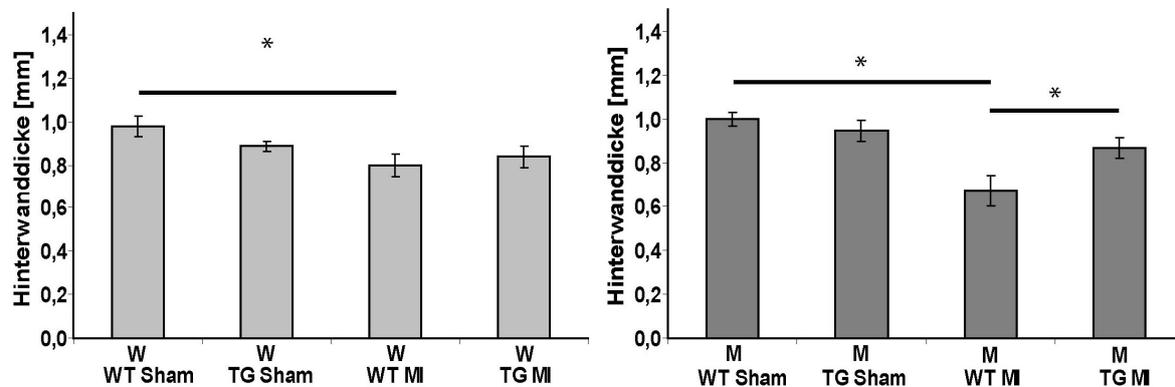


Abb. 14. *Hinterwanddicke nach MI. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse*

Die MI-Gruppen zeigten bei den Männchen eine deutliche Abnahme der Hinterwanddicke im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Bei den WT Männchen betrug die HW-Dicke im Vergleich zu der sham-Gruppe noch 67%. Die Differenz war bei den transgenen Tieren geringer. Die Hinterwanddicke der transgenen MI-Tiere betrug im Vergleich mit den sham-Männchen 90%. Die Hinterwanddicke nahm bei den transgenen Tiere im Vergleich mit den Wildtypen nach einem MI signifikant weniger ab.

Auch die Weibchen zeigten nach MI eine Abnahme der Hinterwanddicke. Jedoch war die Abnahme deutlich geringer ausgeprägt als bei den Männchen. Die WT MI-Tiere wiesen eine

Hinterwanddicke auf, die 82% der HW-Dicke der WT sham-Gruppe ausmachte. In den transgenen Weibchen betrug die Differenz nur 4%, während die HW-Dicke der MI-Tiere im Verhältnis zu den sham-Tieren 96% betrug.

4.3.2 Septum-Dicke

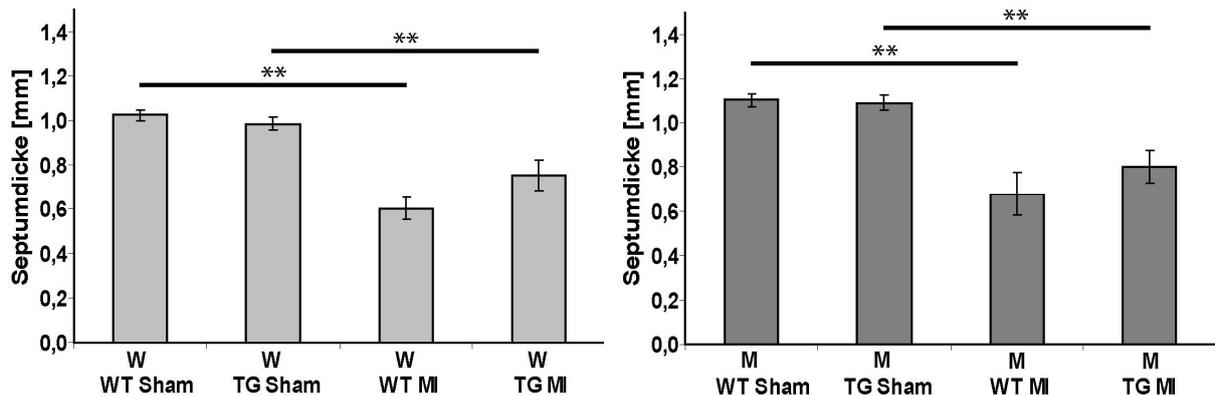


Abb. 15. *Septumdicke nach MI. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse*

4.3.3 LV-Masse

Die aus dem Durchmesser und den Wanddicken berechnete und gegen die Tibiallänge normalisierte LV-Masse kann mit dem gewogenen LV-Gewicht verglichen werden, um die Zuverlässigkeit der echokardiographischen Methode zu bestätigen. Zudem kann eine LV-Massenzunahme ein Indiz für eine Hypertrophie sein. Die echokardiographisch kalkulierten LV-Massen stimmten gut mit den nach der Organentnahme gewogenen LV-Gewichten überein. Bei beiden Geschlechtern waren die LV-Massen der MI-Gruppen signifikanter größer als die der Kontrollgruppen.

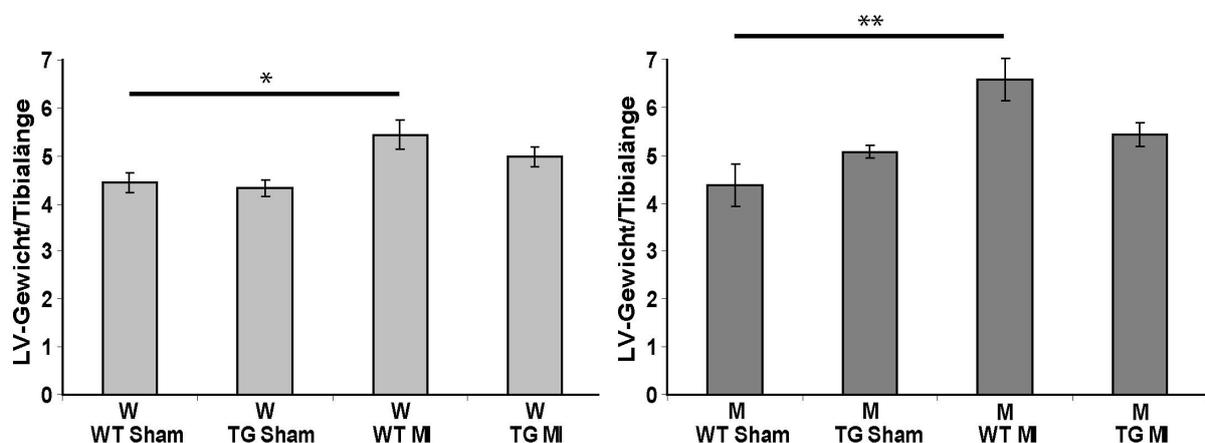


Abb. 16. *Verhältnis Gewicht Linker Ventrikel zur Tibiallänge. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse*

Bei den männlichen Tieren war der Unterschied post-MI deutlicher ausgeprägt als bei den Weibchen. Die LV-Massen-Zunahme nach MI war wiederum im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe bei den transgenen Tieren signifikant weniger markant (7%) als bei den Wildtyp-Tieren (50%), die Wildtyp-Tiere nahmen nach MI signifikant mehr an LV-Masse zu im Vergleich zur sham-Gruppe.

Bei den weiblichen Tieren ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den männlichen Tieren. Zwischen den sham-Gruppen gab es nur geringe Unterschiede in der nach Tibialänge normalisierten LV-Masse. Auch bei den Weibchen war die Differenz nach MI zur Kontrollgruppe bei den transgenen Tieren deutlich geringer als bei den Wildtyp-Tieren, aber mit 15% doppelt so hoch wie bei den männlichen Tieren der vergleichbaren Gruppe. Die Wildtyp-Tiere nahmen nach MI im Vergleich zu den sham-Tieren gleichen Geschlechts signifikant um 22% an LV Masse zu, doch im Vergleich mit den männlichen Wildtyp-Tieren (50% Zunahme) nahmen die linken Ventrikel der Weibchen weniger als die Hälfte an Masse zu.

4.3.4. Endsystolischer und Diastolischer Durchmesser

Die Längsachse des linken Ventrikels wurde am Ende der Systole und der Diastole bestimmt, um eine Aussage über das Ausmaß der Dilatation post-MI machen zu können und daraus die funktionellen Parameter des Herzens zu berechnen.

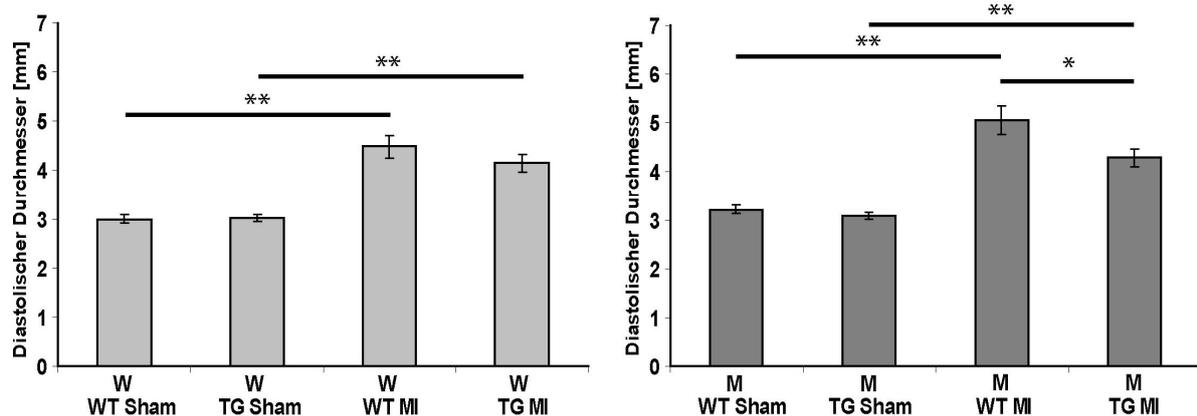


Abb. 17. Diastolischen Durchmessers nach MI. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse

Bei den weiblichen Tieren war sowohl im Diastolischen als auch im Endsystolischen Parameter post-MI ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen, während die Differenzen im Endsystolischen Diameter allerdings größer waren. Die sham-

Tiere wiesen vergleichbare Werte auf. Die transgenen Weibchen wiesen post-MI geringere Unterschiede zur Kontrollgruppe auf als die WT Weibchen.

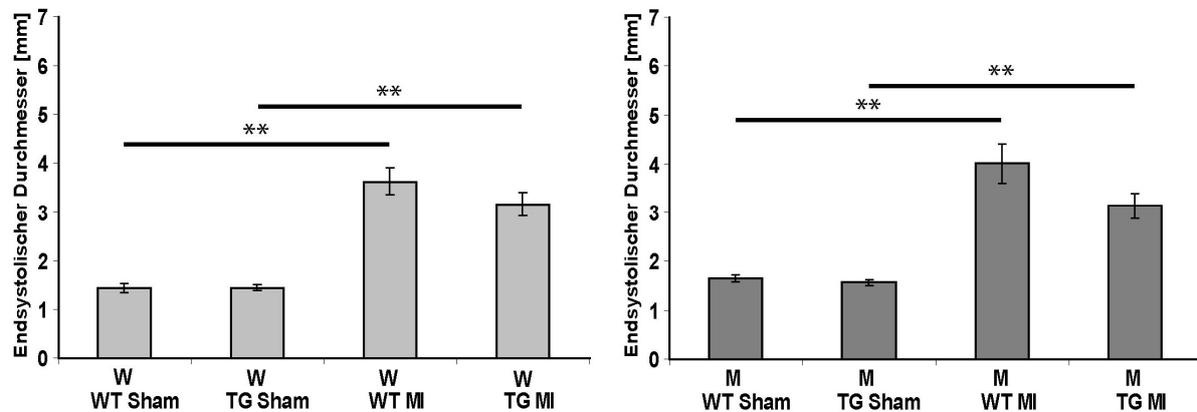


Abb. 18. *Endsystolischen Durchmessers nach MI. A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse*

Die männlichen Mäuse wiesen insgesamt (WT+TG Gruppe) höhere Werte auf als die gruppengleichen weiblichen Tiere, aber der Trend war vergleichbar. Post-MI war in beiden Parametern ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, der bei den transgenen Männchen weniger stark war. Die Kontrollgruppen hatten vergleichbare Werte sowohl im Diastolischen als auch im Endsystolischen Diameter.

4.3.5 Fractional Shortening

Aus den systolischen und diastolischen Parametern war es möglich, die Fractional Shortening zu bestimmen. Das Fractional shortening ist die prozentuale Differenz vom maximalen, also dem enddiastolischen Durchmesser des linken Ventrikels und dem minimalen, also dem endsystolischen Durchmesser und bezeichnet einen klinisch relevanten Parameter der kardialen Funktion. Es gibt einen Hinweis darauf, inwieweit die Herzfunktion nach einem MI erhalten bleibt bzw. trotz des Myokard-Verlustes kompensiert wird.

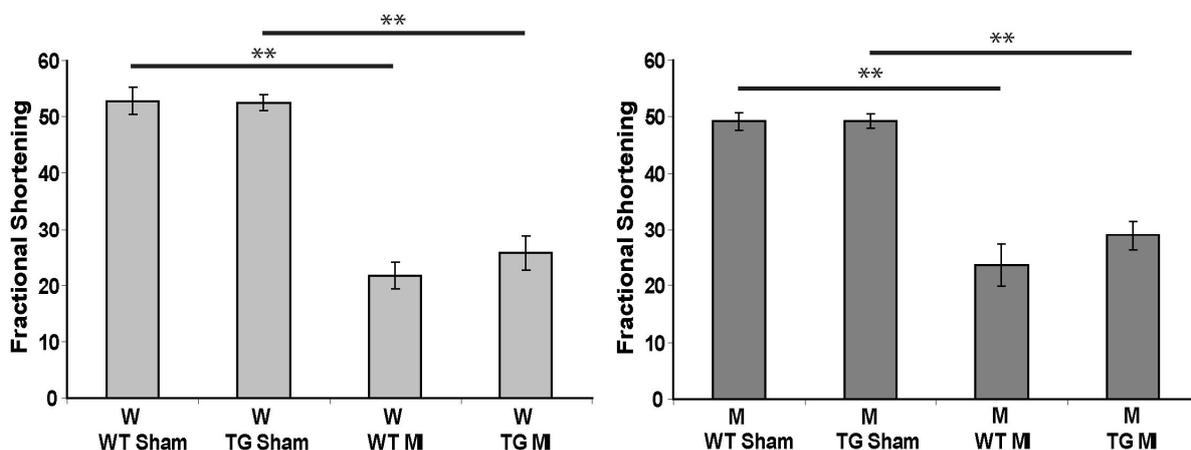


Abb. 19. *Fractional Shortening A. männliche Mäuse, B. weibliche Mäuse*

Bei den männlichen Tieren konnte nach MI in beiden Genotypen eine signifikante Abnahme des FS verzeichnet werden. Die FS-Werte in den Kontrollgruppen waren etwa gleich hoch (WT-sham-male 49,15; TG-sham-male 49,30). Nach MI nahm das FS in den transgenen Tieren weniger ab als in den Wildtyptieren. In den transgenen Männchen betrug das FS nach MI noch 58% des Wertes der transgenen Kontroll-Männchen. In den Wildtyptieren sank dieser Wert noch weiter ab, hier betrug das FS nach MI noch 47% der FS der Wildtyp-Kontrollmännchen.

Das FS der Weibchen verhielt sich vergleichbar. Nach MI zeigte sich in beiden Genotypen eine signifikante Abnahme des FS. Die Abnahme war in den transgenen Tieren schwächer ausgeprägt als in den Wildtyptieren. Das FS sowohl der transgenen als auch der Wildtyp-sham-Weibchen betrug 53% und war damit ähnlich hoch wie das der männlichen Tiere (49%). Nach MI betrug das FS in den Wildtypweibchen noch 41% des FS-Wertes der Kontrollgruppe. In den transgenen Tieren war die Abnahme schwächer ausgeprägt, hier betrug das FS nach MI noch 50% des Wertes der transgenen Kontrollgruppe.

Wenn man die Geschlechter miteinander vergleicht, fällt auf, dass das FS nach MI bei den transgenen Männchen am geringsten abnimmt (42%). Der stärkste Funktionsverlust ist bei den Wildtypweibchen zu beobachten (59% Funktionsverlust).

In den Wildtypgruppen ist kein Geschlechterunterschied in dem FS nach MI zu verzeichnen, bei den Männchen betrug es noch 47% der Kontrolltierfunktion und bei den Weibchen 41%.

4.4. Genexpressionsanalyse

Zum Versuchsendpunkt (14 Tage nach Intervention, siehe Methoden) wurden nach Organentnahme die Expressionen einiger wichtiger Gene und Proteine des kardialen Remodeling untersucht. Das kardiale Remodeling kann auf molekularbiologischer Ebene charakterisiert werden durch die Analyse der Genexpression von Hypertophiemarkern wie NPPA sowie von Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagene) und ihrer Regulatoren (MMPs, TIMPs). Die relative Genexpression wurde im Herzgewebe zwischen dem Infarktbereich und der Klappenebene im nicht infarzierten linken Ventrikelmyokard bestimmt. Die Genexpression wurde auf das Referenzgen GAPDH normalisiert. Und als die relative Genexpression dargestellt. Die RNA wurde mit Trizol isoliert (siehe 3.4.1). Die Qualität und Quantität wurde mit dem Bioanalyzer (Agilent) bestimmt und sie wurde durch reverse Transkription mit Superscript II in cDNA umgeschrieben (siehe 3.4.1).

Diese cDNA diente als template für eine quantitative RT-PCR mit SybrGreen im ABI.

Die relative Genexpression wurde mit der Standardkurvenmethode bestimmt und auf GAPDH als Haushaltsgen normaliert. Bei dem Vergleich von zwei Subgruppen (z.B. Wildtyp-sham-Männchen gegen Wildtyp-MI-Männchen) wurde eine ANOVA kombiniert mit einem Tukey's Test verwendet. Zudem wurde der Einfluß eines Faktors (z.B. Intervention) auf den gesamten Datensatz mittels 1-way-ANOVA und die Interaktion von Paaren der drei Faktoren (Geschlecht-Genotyp Intervention) mittels 2-way-ANOVA untersucht.

4.4.1 Hypertrophie-Marker

Eine erhöhte Druck- oder Volumenbelastung des Herzens sowie andere kardiale Stressfaktoren führen zur Induktion eines fetalen hypertrophie-assoziierten Genprogramms. Für die molekulare Bestimmung der Myokardhypertrophie wurde das Atriale Natriuretische Peptid (NPPA) als Markergen gewählt. Die Expression des Gens NPPA wird als Marker für die Induktion des embryonalen Genprogramms bei linksventrikulärer Hypertrophie betrachtet.

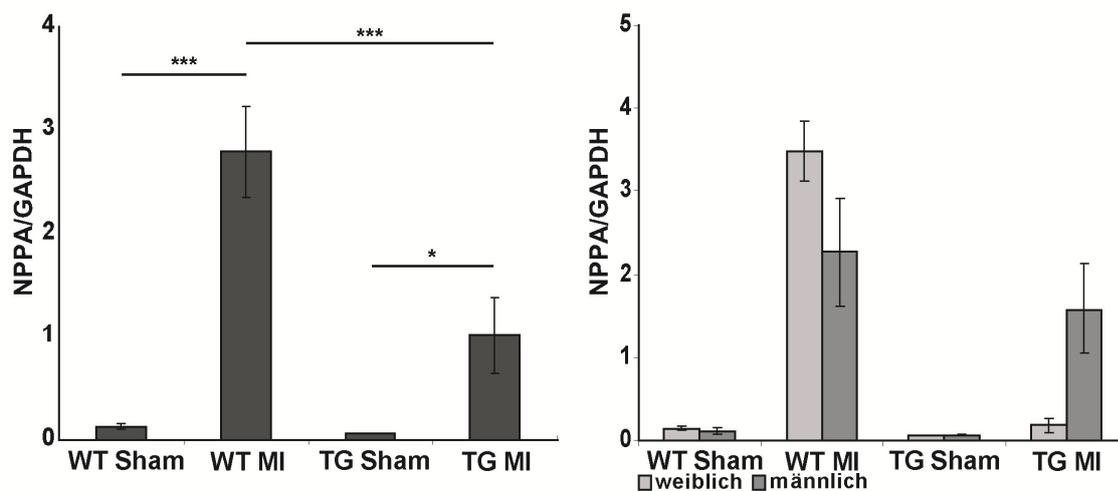


Abb. 20. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von NPPA in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nach MI erhöhte sich die Expression von NPPA in beiden Genotypen und Geschlechtern im Vergleich zur Kontrollgruppe. (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 16,1; $p = 6,34 \cdot 10^{-7}$). Das Ausmaß der Induktion war geschlechts- und genotypabhängig. In den weiblichen Tieren erhöhte sich die Expression um den Faktor 9,6 und in den männlichen Tieren um 18,0 nach MI (2-way-ANOVA Interaktion Geschlecht-Intervention $p = 0,047$).

In den Wildtyptieren erhöhte sich die Expression um den Faktor 21,6 und in den transgenen Tieren um 15,8 (2-way-ANOVA Interaktion Genotyp-Intervention $p=0,010$).

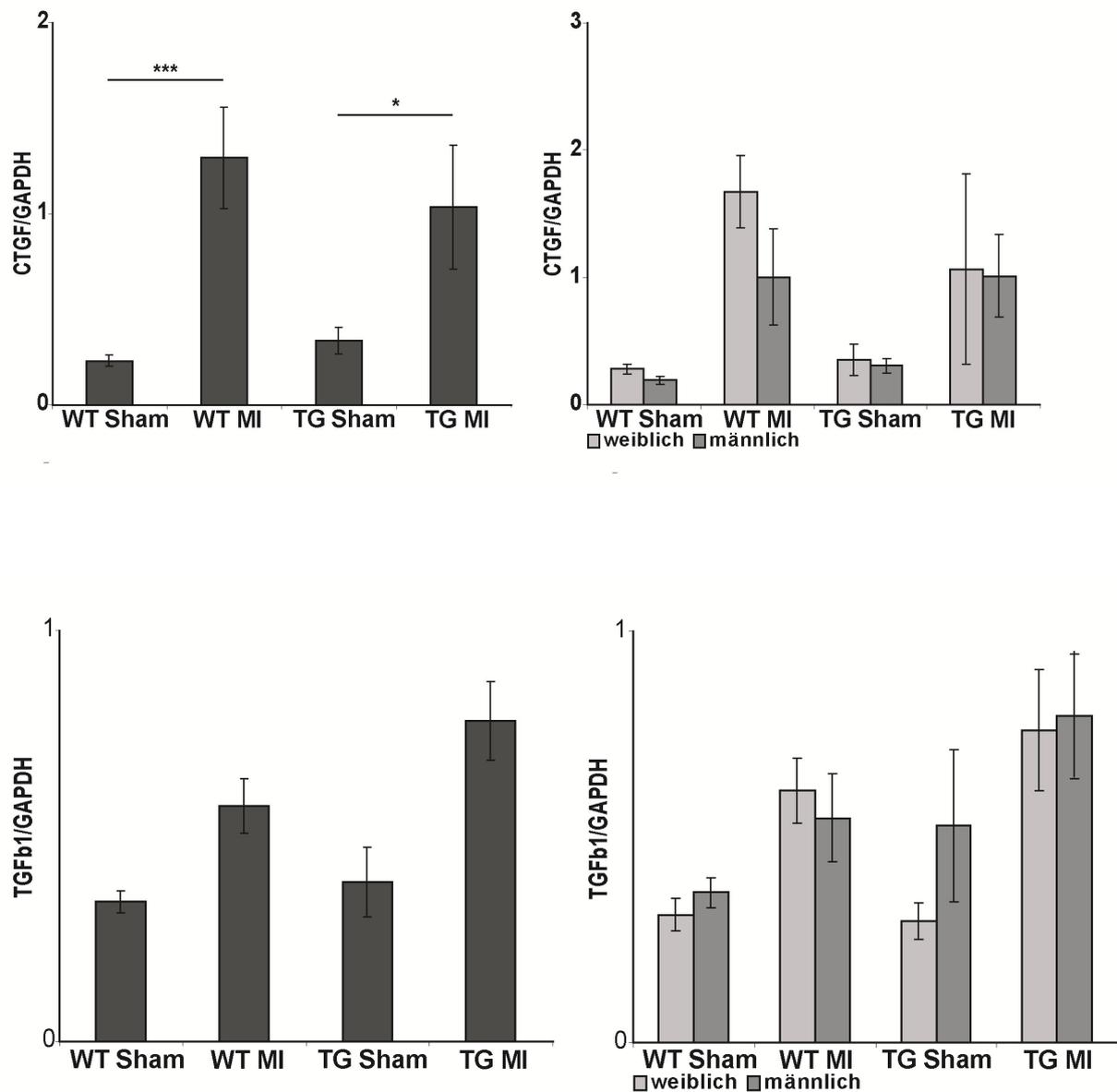


Abb. 21 Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von TGFβ-1 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Connective tissue growth factor ist ein endotheliales Protein, welches Proliferation und Migration stimuliert. Es ist Mediator des TGF-β, dass die Zellproliferation und die extrazelluläre Matrixproduktion fördert. In aktivierten Myofibroblasten, die verstärkt extrazelluläre Matrix produzieren, ist CTGF erhöht.

Die CTGF-Level gleichen sich in den sham-Gruppen. Nach MI steigt die Expression von CTGF in beiden Geschlechtern und Genotypen an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 4,3; $p=8,08e^{-5}$). Das Ausmaß der Induktion war dabei weder geschlechts- noch genotypabhängig. TGF β ist ähnlich wie CTGF ein Regulator der Gene des Remodeling und der EZM. Nach MI steigt TGF β in beiden Geschlechtern und Genotypen an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 2,0; $p=4,3e^{-5}$). Das Ausmaß der Induktion war dabei weder geschlechts- noch genotypabhängig.

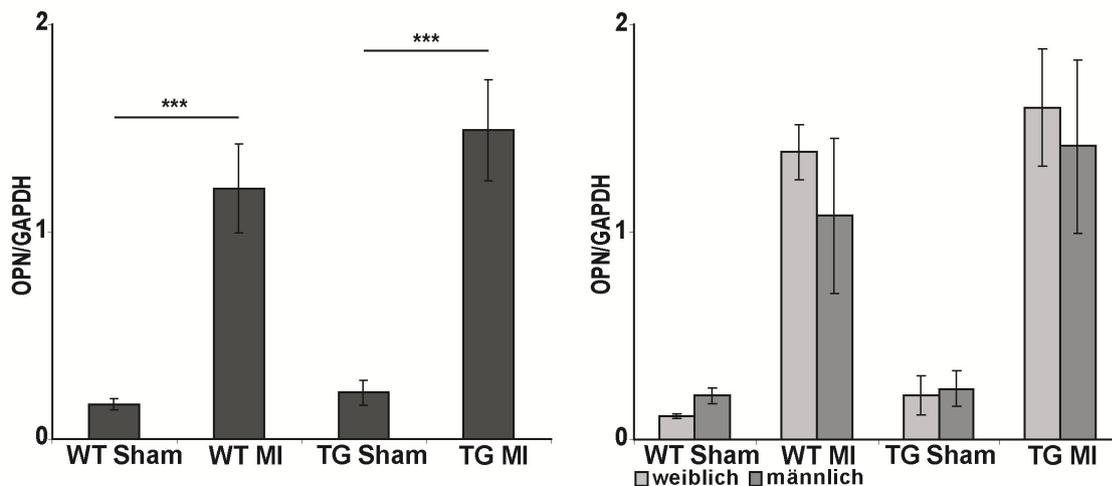


Abb. 22. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von Osteopontin in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Osteopontin ist ein matrizelluläres Glykoprotein, welches in der Hauptsache durch infiltrierende Makrophagen exprimiert wird. Im gesunden Herzmuskelgewebe ist es kaum zu finden. Die Expression steigt erst nach mechanischem Stress, bei Hypoxie oder durch Druck- bzw. Volumenüberlastung an. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass es bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz hochreguliert ist. OPN kontrolliert die EZM-Proteine qualitativ und quantitativ. Durch seinen Einfluß auf TGF- β und Matrixmetalloproteinasen fördert es myokardiales Remodeling und Fibrose.

Die Genexpressionsdaten von Osteopontin zeigte basal vergleichbar niedrige Werte in den sham-Gruppen. Nach Myokardinfarkt stieg die Expression in beiden Geschlechtern und in beiden Genotypen an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 7,5; $p=2,5e^{-9}$). Das Ausmaß der Induktion war weder genotyp- noch geschlechtsabhängig.

4.4.2 Kollagenexpression

Nach 14 Tagen wies die relative Genexpression von Col-1, Col-3 und Col-5 ein sehr ähnliches Expressionsmuster auf, lediglich die Signifikanzniveaus stiegen von Col-1 über Col-3 bis zu Col-5 an.

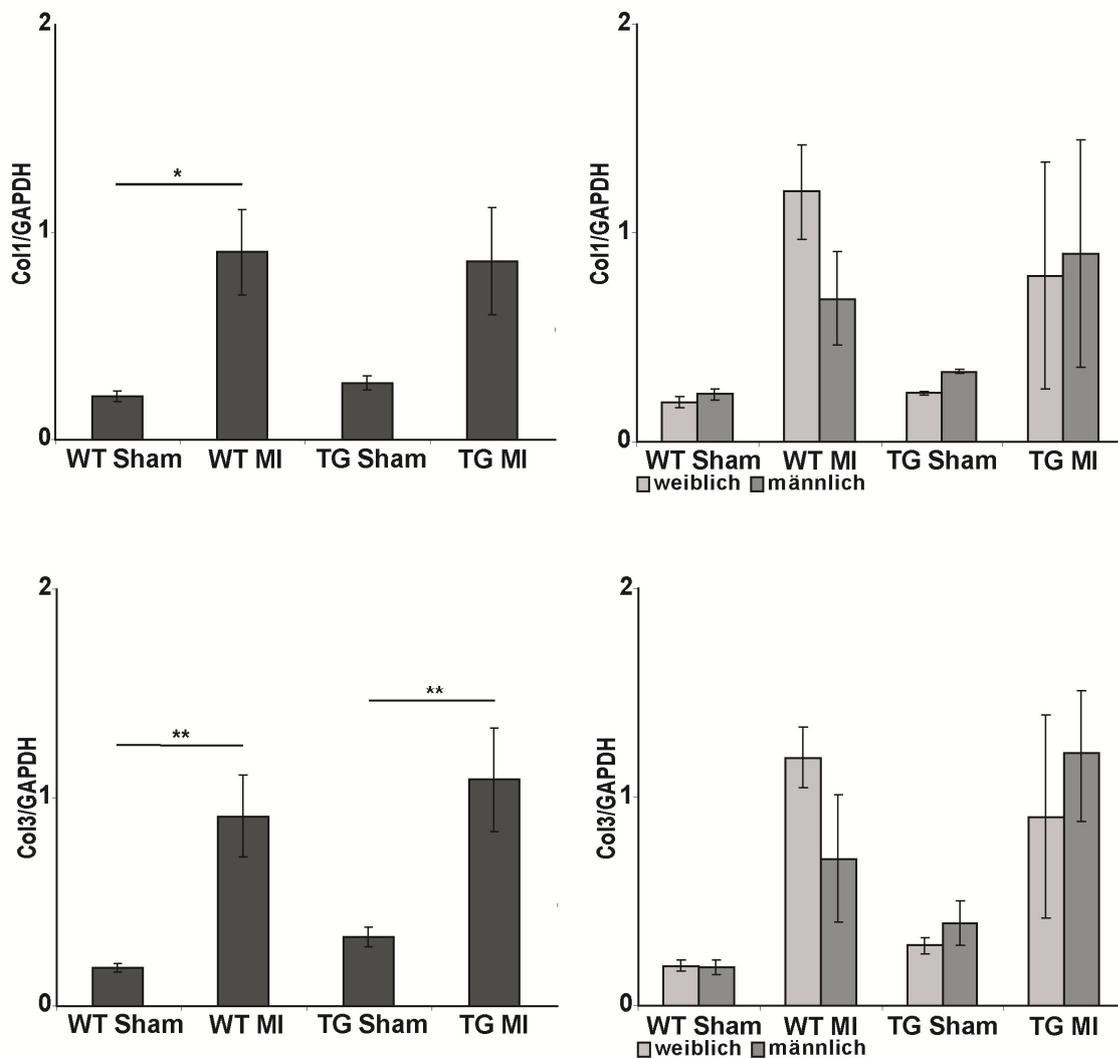


Abb. 23. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von Kollagen 1,3 und 5 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nach Myokardinfarkt stieg die relative Genexpression von Col-1 und Col-3 in beiden Geschlechtern und Genotypen stark an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 3,8; $p=0,011$). Das Ausmaß der Induktion war weder geschlechts- noch genotypabhängig.

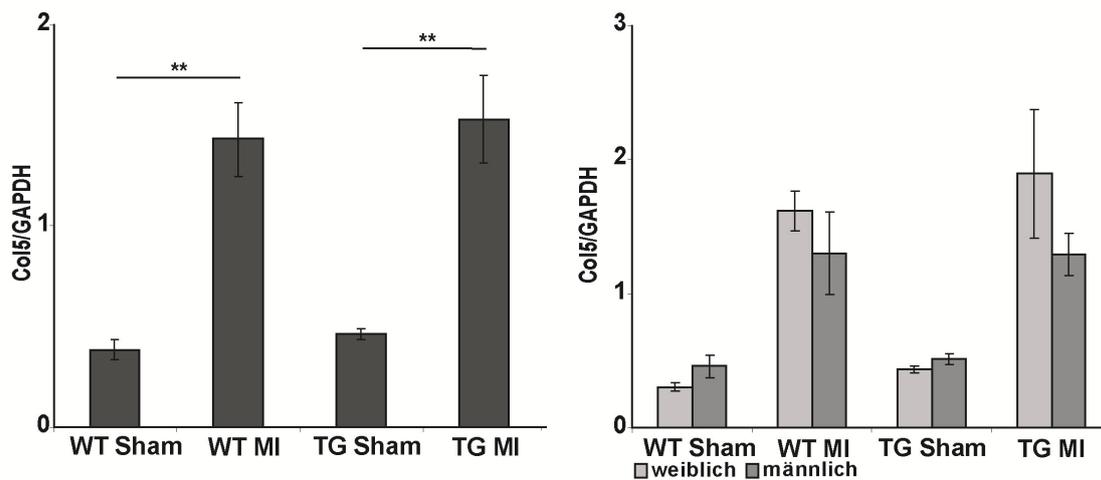


Abb. 24. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von Kollagen 5 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die relative Genexpression von Col-3 stieg ebenfalls nach Myokardinfarkt stark an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 4,4; $p = 3,33e^{-5}$). Das Ausmaß der Induktion war ebenso Geschlechter und Genotyp unabhängig.

4.4.3 Matrixmetalloproteinase-2 und -9 Expression

Die relative mRNA-Expression gibt Hinweise über die Regulation der Kollagenolyse und den vorherrschenden MMP-Typ während der Remodelingphase zwei Wochen nach Induktion des Myokardinfarkt.

Nach Myokardinfarkt stieg die relative Genexpression von MMP-2 stark an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 3,0; $p = 0,001$). Die Induktion war weder geschlechts- noch genotypabhängig. Nach Myokardinfarkt sank die relative Genexpression von MMP-9 ab (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 0,37; $p = 0,0002$). Die Induktion war weder geschlechts- noch genotypabhängig.

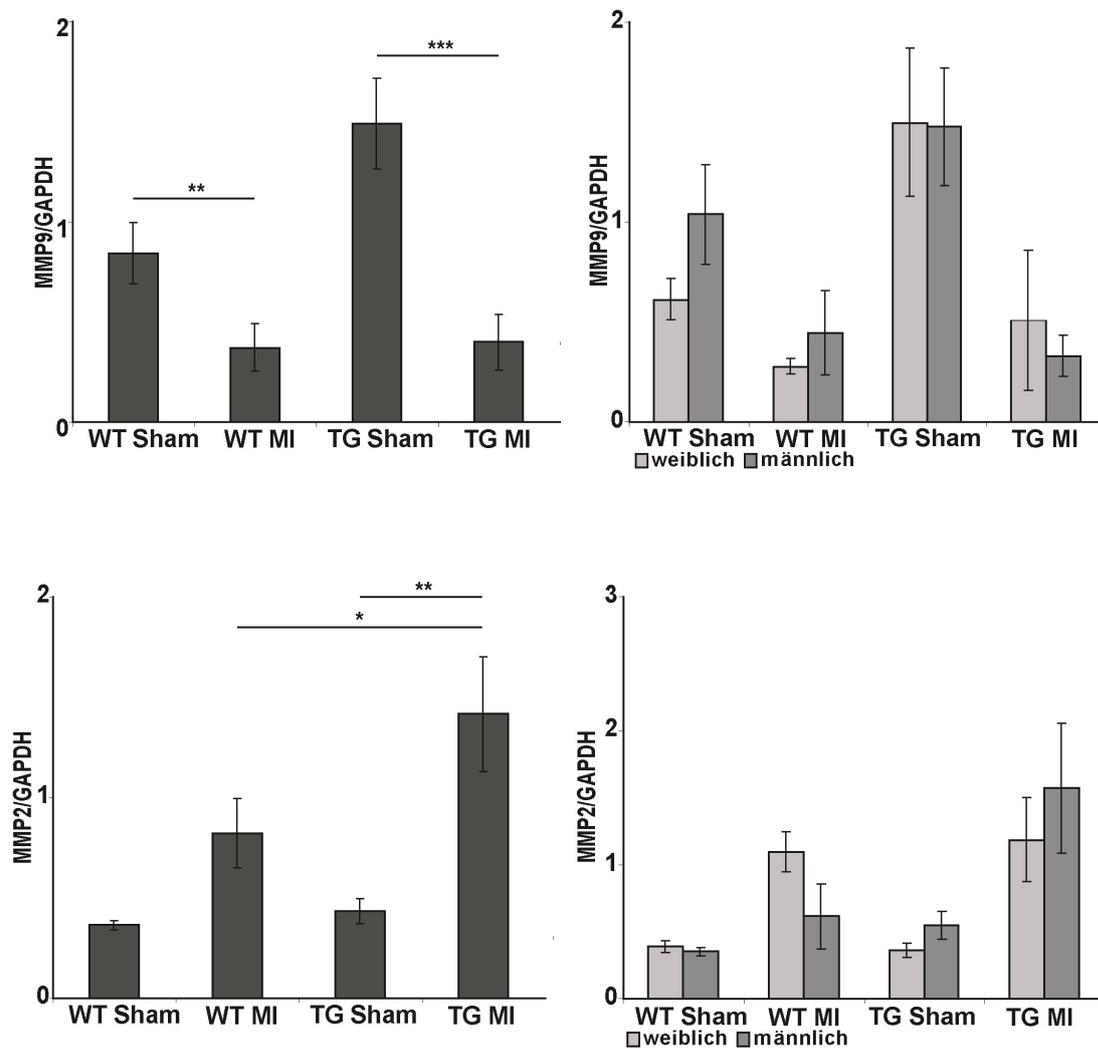


Abb. 25. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von MMP2 und MMP9 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.4 Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMPs)

Nach Myokardinfarkt stieg die relative Genexpression von TIMP-1 stark an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 6,4; $p=7,94e^{-6}$)

Das Ausmaß der Induktion war geschlechts- und genotypabhängig. In den weiblichen Tieren erhöhte sich die Expression um den Faktor 3,6 und in den männlichen Tieren um 7,4 nach MI (2-way-ANOVA Interaktion Geschlecht-Intervention $p=0,027$).

In den Wildtyptieren erhöhte sich die Expression um den Faktor 12,05 und in den transgenen Tieren um 3,03 (2-way-ANOVA Interaktion Genotyp-Intervention $p=0,00012$).

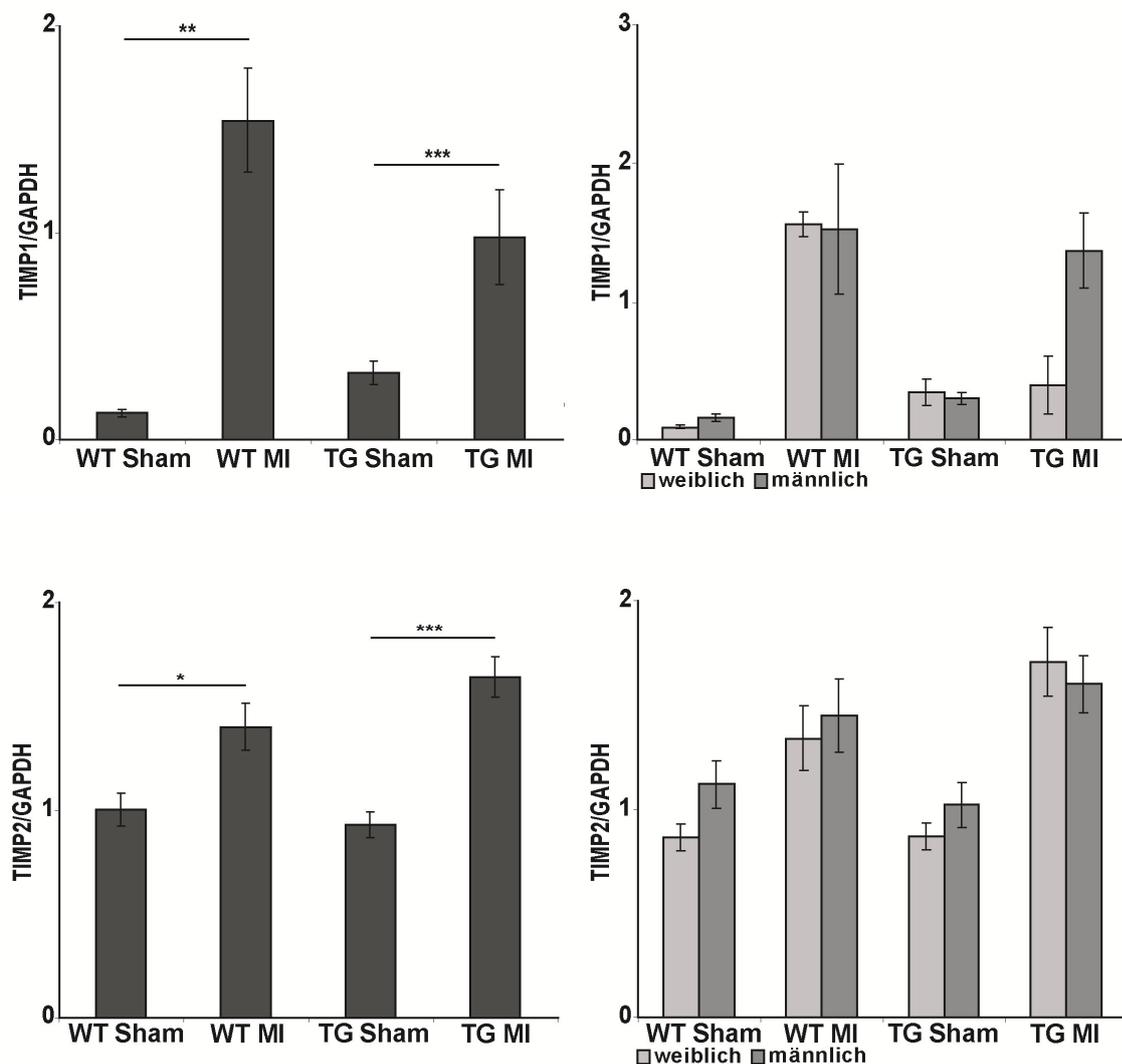


Abb. 26. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von TIMP-1 und TIMP-2 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. **A.** Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), **B.** gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nach Myokardinfarkt stieg die relative Genexpression von TIMP-2 in beiden Geschlechtern und Genotypen an (1-way-ANOVA Intervention Ratio: 1,6; $p = 2,7e^{-6}$). Die Induktion war weder geschlechts- noch genotypabhängig.

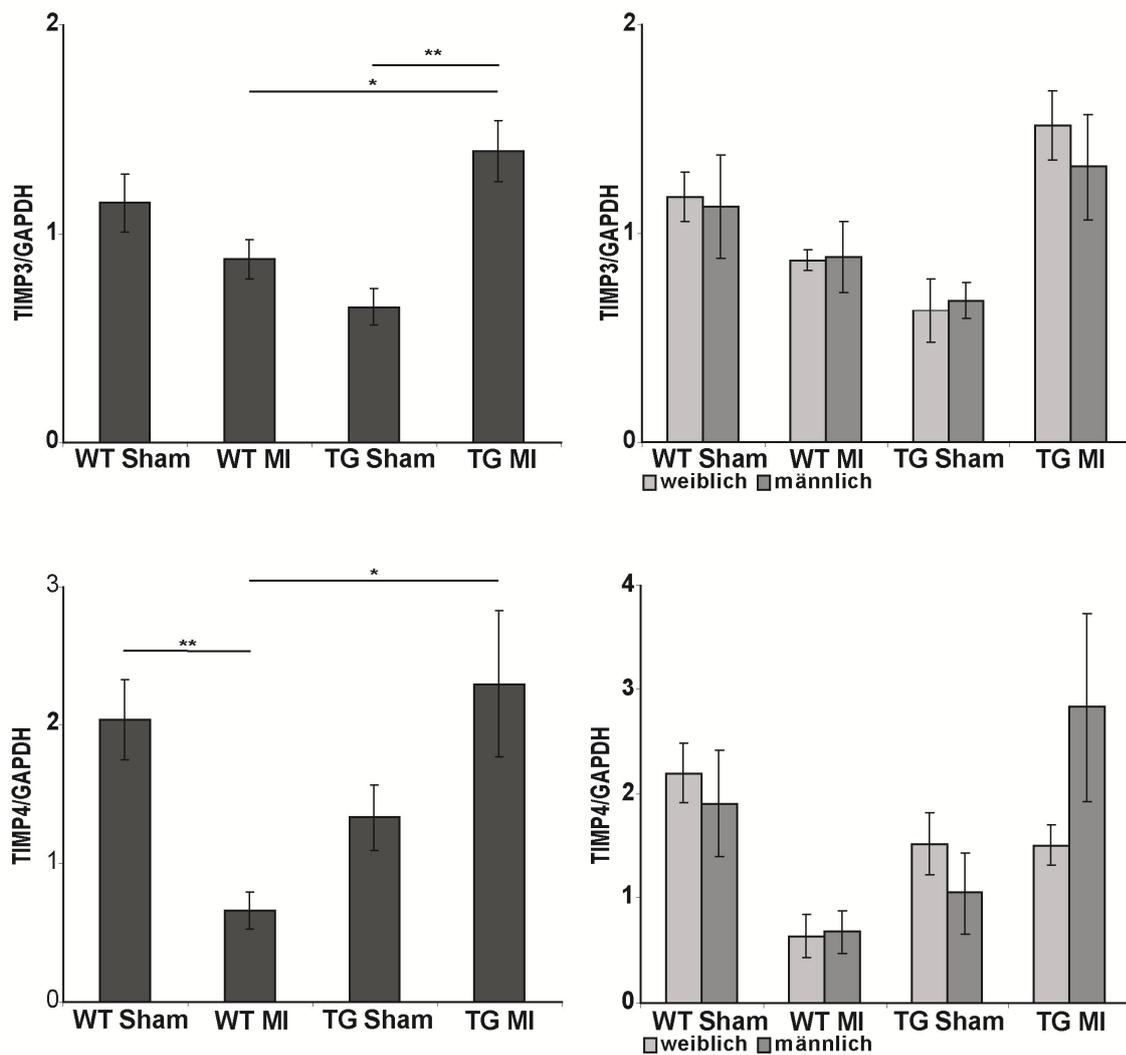


Abb. 27. Relative myokardiale Genexpression (normalisiert gegen GAPDH) von TIMP-3 und TIMP-4 in Sham Kontrollen im Vergleich zu MI Tieren. Die Genexpression wurde für WT und TG Mäuse mittels qRT-PCR gemessen. A. Gemittelte relative Genexpression in allen Versuchstiere (männlich und weiblich), B. gemittelte relative Genexpression getrennt in weiblichen und männlichen Versuchstiere. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$**

Die Expression von TIMP-3 nahm in den Wildtyp-Tieren nach MI ab ($r=0,77$), wohingegen sie bei den transgenen Tieren anstieg ($r=2,16$) (2-way-ANOVA Interaktion Genotyp-Intervention $p=0,0069$).

Nach Myokardinfarkt wurden in der relativen Genexpression von TIMP-4 weder in der 1-faktoriellen noch in der 2-faktoriellen ANOVA keine signifikanten Effekte detektiert. Im direkten Vergleich der Gruppen zeigte sich aber eine Reduktion der Expression nach MI in den Wildtyp-Tieren, wohingegen in den transgenen Tieren die Expression erhöht war (ANOVA kombiniert mit einem Tukey's Test).

4.5 Korrelation von morphologischen Parametern mit der Genexpression

Es wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient jeweils zwischen den phänotypischen Parametern (Fractional shortening, Endsystolischer Durchmesser, Diastolischer Durchmesser, Septumdicke, Körpergewicht, Hinterwanddicke, linksventrikuläre Masse, linksventrikuläre Masse zu Körpergewicht, Herzfrequenz) und den Genexpressionwerten auf Transkriptebene von NPPA, CTGF, OPN, TGF β 1, Col-1, Col-3, Col-5, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) berechnet (siehe Appendix). Die Gene, welche signifikant mit morphologischen Parametern korrelierten, werden im folgen dargestellt.

4.5.1 Korrelationen von inflammatorischen und Stress-regulierten Genen

Die Expression des Gens NPPA wird als Marker für die Induktion des embryonalen Genprogramms bei Hypertrophie betrachtet.

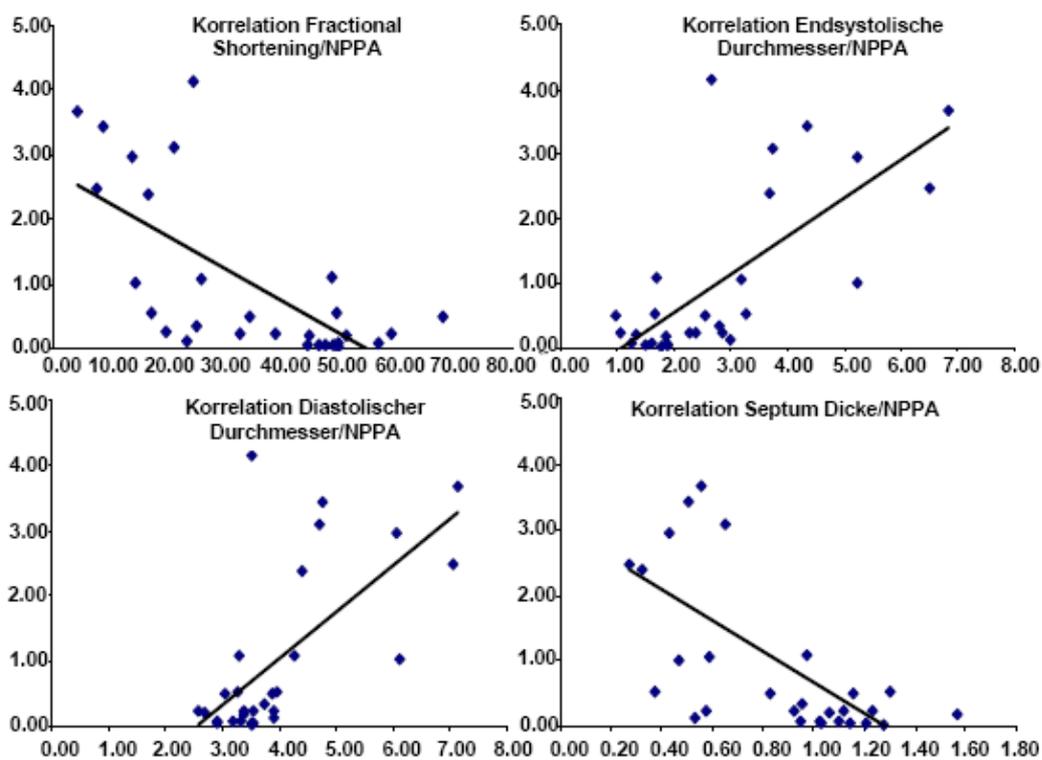


Abb. 28: Korrelationsanalyse von NPPA. Es wurde die Korrelation der Expression von NPPA mit den phänotypischen Parametern Fractional Shortening ($r^2=-0,68$; $p=0,00005$), endsystolischer Durchmesser ($r^2=0,71$; $p=0,000016$), diastolischer Durchmesser ($r^2=0,66$; $p=0,000098$) und Septumdicke ($r^2=-0,63$; $p=0,00025$) berechnet. Ordinate: Genexpression, Abszisse: Herzfunktionsparameter

Die Expression von NPPA stieg signifikant mit fortschreitendem Funktionsverlust (fractional shortening) des Herzens an ($r^2=-0,68$; $p=0,00005$). Mit steigender Expression von NPPA vergrößerte sich der endsystolische Durchmesser ($r^2=0,71$; $p=0,000016$) ebenso wie der diastolische Durchmesser ($r^2=0,66$; $p=0,000098$). Demgegenüber stieg die Expression von NPPA mit sinkender Septumdicke an ($r^2=-0,63$; $p= 0,00025$).

4.5.2 Korrelation von EZM und ihre Regulatoren

Mit fortschreitendem Funktionsverlust (fractional shortening) stiegen sowohl die Expression von Kollagen-1 ($r^2=-0,54$; $p=0,0025$), Collagen-3 ($r^2=-0,44$; $p=0,0016916$; ohne Abb.) und Kollagen-5 ($r^2=-0,62$; $p= 0,000334$) signifikant an. Ebenso verhielten sich OPN und CTGF, beide Regulatoren von Genen der extrazellulären Matrix, die mit steigendem Funktionsverlust stärker exprimiert wurden (OPN: $r^2=-0,54$; $p=0,002498$; CTGF: $r^2=-0,6$; $p=0,000581$).

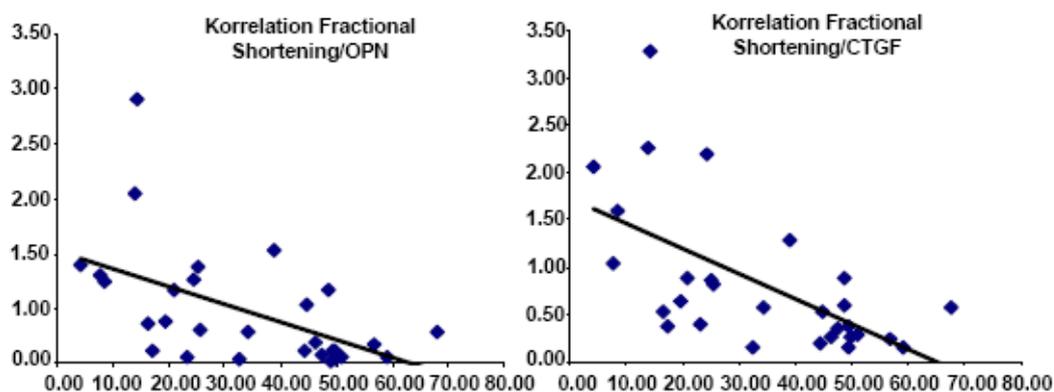


Abb. 29: Korrelationsanalyse von Genen der Extrazellulärmatrix und ihre Regulatoren. Es wurde die Korrelation des phänotypischen Parameters Fractional shortening mit der Expression von Osteopontin ($r^2=-0,54$; $p=0,002498$), CTGF ($r^2=-0,60$; $p=0,000581$) berechnet.

4.5.3 Korrelation von Genen zur Degradation der EZM

Die Degradation der Extrazellulärmatrix findet über Matrixmetalloproteinasen statt und wird durch ihre Inhibitoren, die TIMPs, maßgeblich beeinflusst. Mit steigendem Funktionsverlust (fractional shortening) sinkt die Expression von MMP-9 ($r^2=0,5$; $p=0,0057$). Umgekehrt verhält sich die Expression von TIMP-1, einer ihrer Inhibitoren, welche ansteigt je mehr die Funktion des linken Ventrikels verloren geht ($r^2=-0,65$; $p=0,000135$).

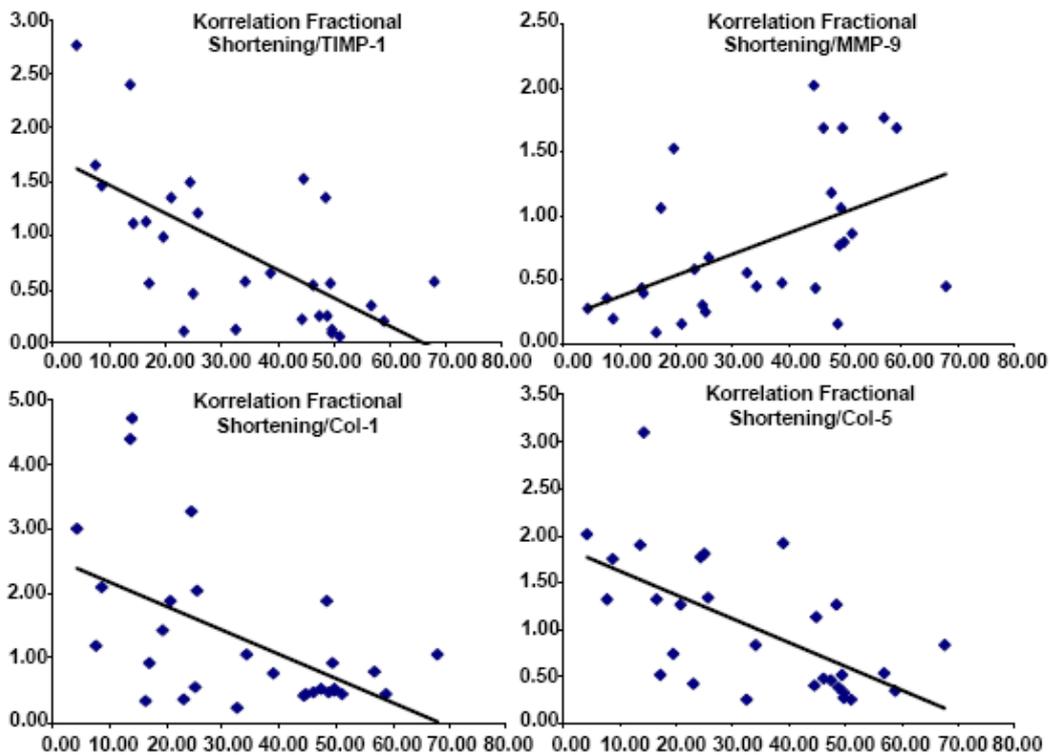


Abb. 30: Korrelationsanalyse von Genen zur Degradation der EZM. Es wurde die die Korrelation des phänotypischen Parameters Fractional shortening mit der Expression von Matrixmetalloproteinase-9 ($r^2=0,5$; $p=0,0057$), und einem ihrer Inhibitoren TIMP-1 ($r^2=-0,65$; $p=0,000135$) Col-1 ($r^2=-0,54$; $p=0,0025$) und Col-5 ($r^2=-0,62$; $p=0,000334$) berechnet. Abszisse: Genexpression, Ordinate: Herzfunktionsparameter

4.6 Proteinexpressionsdaten

Die relative Proteinexpression wurde im Herzgewebe zwischen dem Infarktbereich und der Klappenebene im nicht infarzierten linken Ventrikelmyokard bestimmt. Die Proteine wurden mit Proteinextraktionspuffer isoliert (siehe 1.3.4). Die Quantität wurde mit einem Bradford-Test bestimmt.

Mittels sodium-dodecyl-sulfate- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western Blot, Detektion mittels Chemilumineszenz und durch Bandendichtemessung wurde die Proteinexpressionsanalyse durchgeführt. Die relative Proteinexpression wurde mit einer Standardkurve und Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH bestimmt.

Bei dem Vergleich von zwei Subgruppen (z.B. Wildtyp-sham-Männchen gegen Wildtyp-MI-Männchen) wurde eine ANOVA kombiniert mit einem Tukey's Test verwendet. Zudem wurde der Einfluß eines Faktors (z.B. Intervention) auf den gesamten Datensatz mittels 1-way-ANOVA und die Interaktion von Paaren der drei Faktoren (Geschlecht-Genotyp Intervention) mittels 2-way-ANOVA untersucht.

Die Proteinexpression von Enzymen und Komponenten der Extrazellulären Matrix, die maßgeblich an Remodeling-Prozessen beteiligt sind, wurden einer Analyse unterzogen. Insbesondere waren dafür die Proteine der für den Um- und Abbau kollagener Strukturen verantwortlichen Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie deren Inhibitoren (TIMP) interessant.

Die relative Proteinexpression von TIMP-3 zeigte in den transgenen Tieren signifikant niedrigere Werte als in den Wildtyptieren (1-way ANOVA Ratio: 0,61; $p=0,0068$).

Das Ausmaß der Expression war weder geschlechts- noch interventionsabhängig.

In den Proteinexpressionen von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in allen Tieren konnten in der 1-way-ANOVA kein signifikanter Einfluss eines Parameters festgestellt werden.

Der direkte Vergleich der Subgruppen durch Tukey's Test lieferte weitere Ergebnisse. In der Proteinexpression von MMP-2 zeigte sich keine signifikante Abnahme nach MI in den Wildtyptieren (WT MI/ WT sham: $r^2=0,72$; $p= 0,232$). MMP-9 sank sowohl in den Wildtyptieren (WT-MI / WT-Sham: $r^2= 0,71$; $p= 0,053$) als auch in den transgenen Tieren (TG-MI/ TG-Sham: $r^2= 0,72$; $p= 0,206$) ab, allerdings gerade nicht signifikant. TIMP-1 zeigte nach MI in den Wildtyp- als auch in den transgenen Tieren einen Trend zur Abnahme, der ebenso nicht signifikant wurde (WT-MI/WT-Sham: 0,80; $p= 0,385$; TG-MI/TG-Sham: 0,74; $p=0,151$). Die Proteinexpression von TIMP-3 zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-Sham und transgenen Sham-Tieren (TG-Sham/WT-Sham: 0,55; $p=0,001$).

Nach MI wurde keine Signifikanz in der TIMP-3 Proteinexpression beobachtet (TG-MI/WT-MI: $r=0,68$; $p=0,886$).

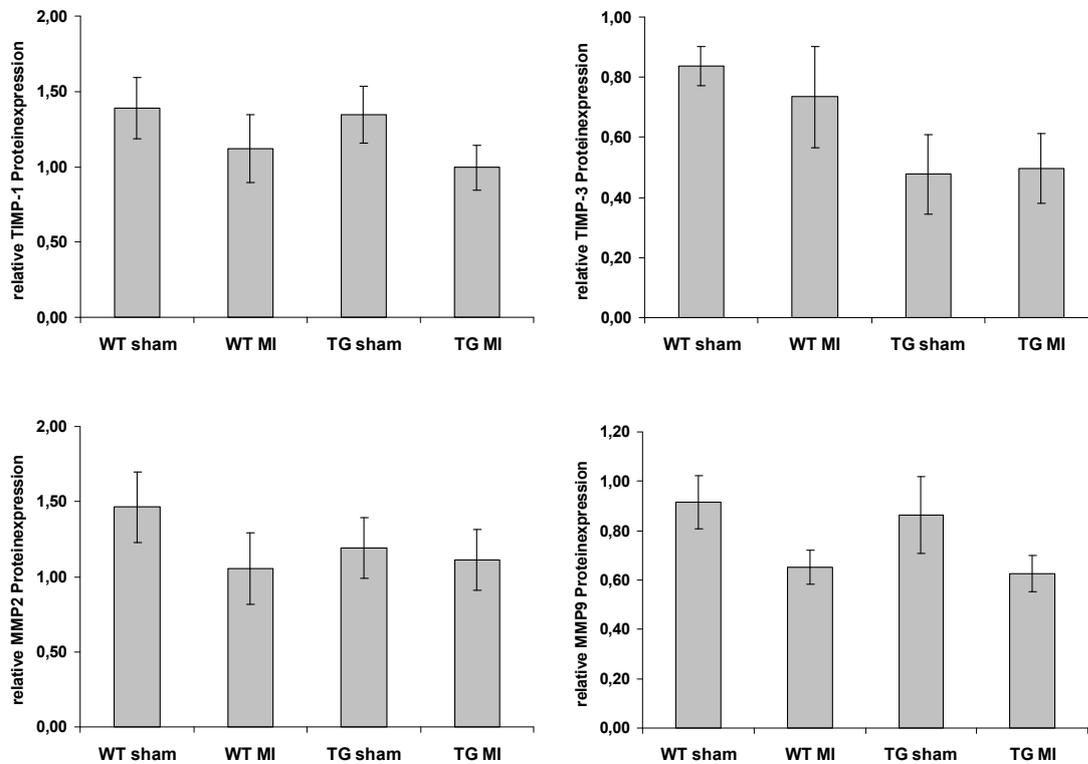


Abb. 31. Proteinexpression von MMPs 2 und 9, sowie von TIMP-1 und TIMP3. Proteinexpression wurde gegen die Expression von GAPDH normalisiert und als relative Proteinexpression dargestellt.

4.7. Histologogische Untersuchung der Fibrosierung nach MI

Zur Beschreibung struktureller Veränderungen im Myokard wurden Gewebeschnitte der linken Ventrikel der Tiere histologisch auf Fibrosebildung untersucht. Kollagenstrukturen wurden mit Sirius Rot angefärbt (zehn Schnitte pro Tier), um auf den Gesamtkollagengehalt der Tiere zu schließen. (siehe Abbildung 32)

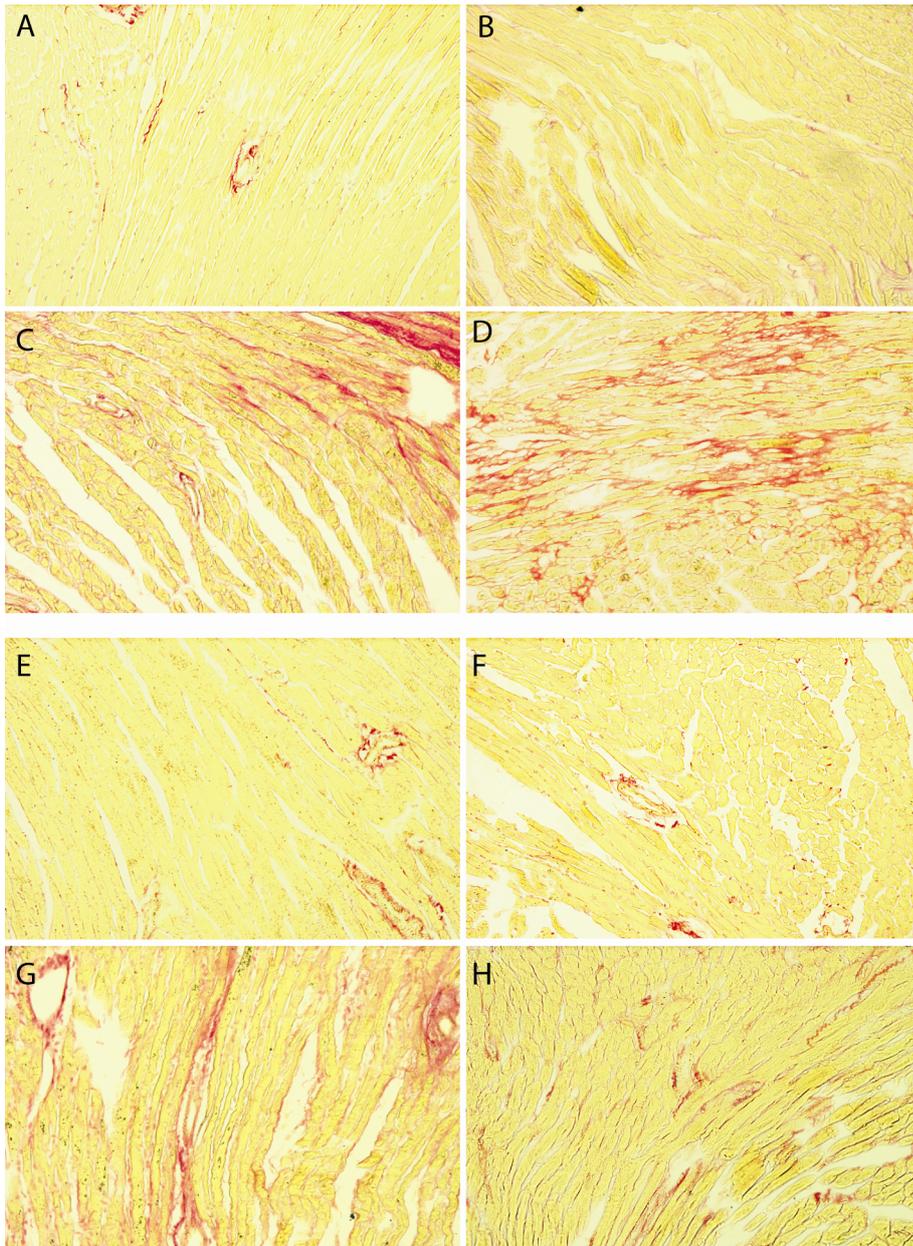


Abb. 32. Histologische Sirius Rot Färbung auf Schnitten vom linken Ventrikel. A. WT Maus männlich Sham, B. WT Maus weiblich Sham, C. WT Maus männlich MI, D. WT Maus weiblich MI, E. TG Maus männlich Sham, F. TG Maus weiblich Sham, G. TG Maus männlich MI, H. TG Maus weiblich MI.

Der sogenannte Fibrosescore wurde durch digitale Auswertung, wie unter 3.5.5 beschrieben, ermittelt (Abb.33)

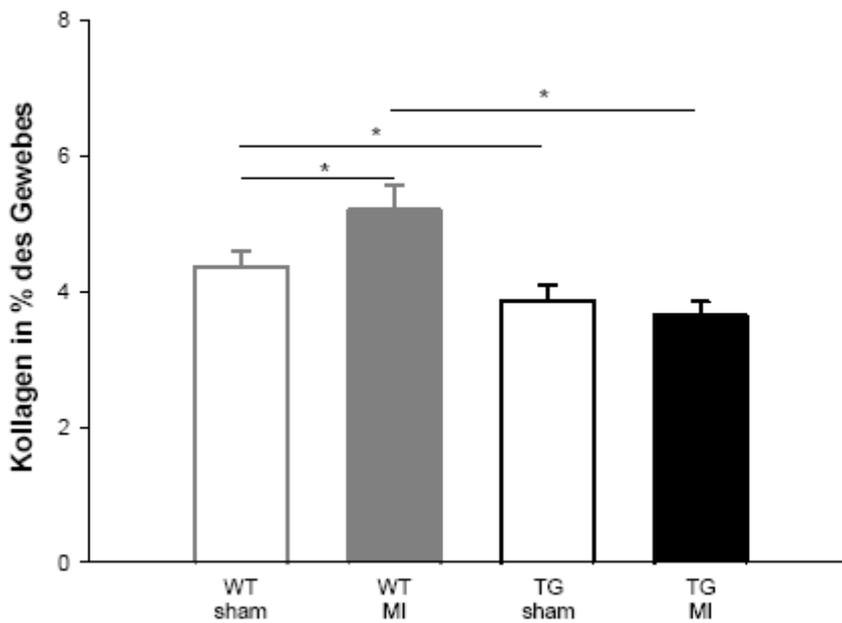


Abb. 33. Fibroscore (Kollagengehalt) des linken Ventrikels von WT und TG Melusin Mäusen nach MI

In der Wildtiergruppe stieg der Kollagengehalt im Gewebe nach MI signifikant an ($p < 0,05$). Der Kollagengehalt in den transgenen Mäusen veränderte sich in den transgenen Mäusen nur geringgradig und erreichte nicht das Signifikanzniveau.

Im direkten Vergleich zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren konnte sowohl zwischen den MI-Tieren als auch zwischen den sham-Tieren ein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Der Kollagengehalt der transgenen Tiere war sowohl in der sham-Gruppe als auch nach MI signifikant geringer als in der vergleichbaren Wildtypgruppe.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Melusin und Geschlecht bei der Pathogenese von kardialer Hypertrophie zu untersuchen. Schwerpunkte waren dabei einerseits die morphologischen und echokardiographischen Veränderungen des linken Ventrikels, seiner Funktion sowie die Einflüsse auf Gen- und Proteinexpression in Hinblick auf den Umbau der extrazellulären Matrix (EZM). Weiterhin wurde die interstitielle Fibrose mithilfe histologischer Färbungen bestimmt und quantifiziert.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigten erstens, dass Melusin überexprimierende Mäuse nach MI eine höhere Überlebensrate aufwiesen, wobei die Todesrate der Männchen generell höher war. Zweitens zeigte diese Arbeit, dass Melusinüberexpression die Gen- und Proteinexpression wesentlicher Gene der Extrazellulären Matrix (EZM) und ihrer Regulatoren beeinflusste, deren Induktion teils genotyp- als auch geschlechtsabhängig war. Übereinstimmend konnte eine signifikante Korrelation zwischen phänotypischen Parametern, also dem Funktionsverlust des Herzens und der Genexpression bestimmter Gene gezeigt werden.

Drittens konnte diese Arbeit durch histologische Untersuchungen unter Beweis stellen, dass die Fibrose nach MI in den Wildtyptieren wesentlich stärker ausgeprägt war als in den transgenen Tieren, was auf eine mögliche kardioprotektive Rolle von Melusin hindeutet. Geschlechterunterschiede wurden bei der Fibrosierung nicht beobachtet.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass kardiovaskuläre und maligne Tumor-Erkrankungen in den industrialisierten Ländern mit Abstand die häufigste Todesursache sind (Circulation Heart Disease and stroke statistic 2009, American Heart Association, 2009). Übereinstimmend mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die American Heart Association, dass im Jahre 2005 17,5 Millionen Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen eingetreten sind. Das sind 30 Prozent aller Todesfälle weltweit (Jahr 2005). Weiterhin geht die American Heart Association davon aus, dass 80 Millionen amerikanische Erwachsene, das entspricht einem von drei erwachsenen US-Bürgern, an kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) leiden. Koronare Herzerkrankungen sind dabei mit 16,8 Millionen geschätzten Erkrankten die zweithäufigste Krankheitsform, zu der wiederum 7,9 Millionen Herzinfarktpatienten zählen. Eine Vielzahl von Studien untersuchte Geschlechterunterschiede nach myokardialen Infarkt und in der Myokardhypertrophie, da längst bekannt ist, dass

kardiovaskuläre Erkrankungen Frauen und Männer auf unterschiedliche Art und Weise betreffen. Klinische Studien konnten zeigen, dass die wesentlichen Geschlechterunterschiede das Erscheinungsalter der Krankheit, die Symptomatik und den Krankheitsverlauf betreffen. Obwohl die Gründe dafür noch nicht hinreichend geklärt sind, scheint ein Einfluss der Geschlechtshormone wahrscheinlich. Eine Reihe von Studien belegt, dass eine Myokardhypertrophie durch Östrogen vermindert wird (van Eickels, *Circulation*, 2001; Babiker, *Physiol.*, 2007) und deutet auf eine kardioprotektive Wirkung von Östrogen hin.

Grundsätzlich bietet sich die Maus als Studienobjekt an, da sich gezeigt hat, dass Ergebnisse im wesentlichen auf den Menschen übertragbar sind. Das Mausmodell bringt gegenüber dem Rattenmodell den Vorteil mit sich, dass die Erzeugung transgener Tiere möglich ist. So können durch Knockout- bzw. Überexpressions-Zuchtlinien der Einfluss spezieller Gene auf spezifische Regulationspfade untersucht werden, wie dies im Falle von Melusin bereits gezeigt wurde. Brancaccio et al. zeigten, dass Mäuse, die Melusin nicht exprimierten, nach TAC eine im Vergleich zu Kontrolltieren veränderte myokardiale Reaktion aufwiesen und eine Dilatation des Herzens mit Herzinsuffizienz entwickeln. Die von Wildtyp-Tieren gezeigte kompensatorische konzentrische Hypertrophie fehlte. De Acetis et al. konnten wiederum zeigen, dass Melusin-überexprimierende Herzen selbst nach langandauernder Druckbelastung durch TAC-Operation konzentrische Hypertrophie beibehielten, während Wildtyp-LV längst deutlich ausgeprägte Dilatation mit verschlechterter Kontraktilität zeigten. Daraus kann geschlossen werden, dass Melusin ein bedeutender Faktor ist, der günstige Auswirkungen auf den Remodelingprozess des linken Ventrikels hat. Daher sollte in dieser Arbeit nun die Auswirkung von Melusin-Überexpression auf die Hypertrophie und das linksventrikuläre Remodeling der EZM näher untersucht werden und seine Rolle als potentieller kardioprotektiver Faktor weiter aufgeklärt werden, auch in Hinblick auf Geschlechterunterschiede. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, in der Maus *in vivo* eine pathologische linksventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen, beispielsweise durch pharmakologische Manipulation, abdominale bzw. transversale Aortenkonstriktion oder myokardialen Infarkt. In dieser Arbeit wurde eine Myokardhypertrophie durch Myokardinfarkt induziert, da nicht zuletzt anhand der oben erwähnten aktuellen statischen Erhebungen der American Heart Association gesagt werden kann, dass es aufgrund von weltweit steigenden MI-Patientenzahlen und anhaltend hohen Mortalitätsraten enormen Forschungsbedarf gibt. Grundlagenwissen von kardialen Umbauprozessen und Zusammenhänge kardioprotektiver Faktoren können Ausgangspunkt für die Entwicklung von

Medikamenten sein. Ein tiefgreifenderes Verständnis über die das weibliche Geschlecht schützenden Mechanismen kann ebenso dazu beitragen, diese Erkenntnisse therapeutisch nutzbar zu machen.

Zur Infarktinduktion wurde in Wildtyp-FVB Mäusen und Melusin-überexprimierenden FVB-Mäusen eine Ligatur der linken Koronararterie gesetzt. Diese pathologische Intervention führt zu einer Volumenüberlastung im linken Ventrikel, woraus sich die kardiale Hypertrophie in den unterschiedlichen Mäusestämmen entwickelt. Diese Methodik ist ein anerkanntes und reproduzierbares Modell zur Induktion einer volumenlast-induzierten Myokardhypertrophie. Diese ist in vielen Aspekten der humanen Myokardhypertrophie durch Myokardinfarkt vergleichbar. Bei der kardialen Adaptation an pathologische Umstände wie dem MI wurde ein Geschlechterunterschied auch im Mausmodell bislang mehrfach bestätigt (Cavasin, 2003; Cavasin, 2006). Dass die Veränderungen im Myokard der Maus nach dem Verschluss eines Koronargefäßes mit dem Menschen vergleichbar ist, zeigte bereits 1978 Zolotareva und Kogan (Zolotareva, 1978). Dennoch ist das Modell nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar, da das zu ligierende Blutgefäß in der Maus im Gegensatz zum Menschen im Myokard verborgen und selbst durch das Binocular nicht sichtbar ist (Icardo, 2001). Desweiteren tritt die Verengung eines Koronargefäßes beim Menschen nicht ad hoc auf, vielmehr handelt es sich um einen progredient zuspitzenden Prozess, der durch die zunehmende Arteriosklerose hervorgerufen wird. Beim experimentellen MI hat der Körper keine Zeit, sich auf die veränderte Situation einzustellen und wird davon regelrecht „überrollt“. Beim experimentellen Verschluss der linken anterior-deszendierenden Koronararterie kommt es zunächst zur Unterversorgung der im Versorgungsgebiet gelegenen Myozyten mit Sauerstoff, welche eine Gewebsnekrose zur Folge hat. Die sich anschließende myokardiale Heilung ist ein komplexer Prozess, in dem sich viele Ereignisse überlappen und parallel verlaufen. Entzündungszellen wandern in das infarzierte Myokard ein und degradieren das geschädigte Gewebe mithilfe von Matrixmetalloproteinasen (MMP). Desweiteren findet eine Deposition neuer Matrixkomponenten statt, deren Abschluss die Formation einer reifen Infarktnarbe darstellt (Cavasin, 2006). Das nicht-infarzierte Myokard reagiert darauf mit einer kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten. Durch Volumenüberlastung im linken Ventrikel und erhöhten Wandstress auf das noch intakte Myokard kommt es zu einer Aktivierung von Fibroblasten, die vermehrt Kollagen ausscheiden, welches sich verstärkt ablagert und zu höherer Gewebesteifigkeit führt, die wiederum die Gewebefunktion beeinträchtigt (Cleutjens, 2002). Je stärker die

Entzündungsantwort ausfällt, im Sinne einer höheren Anzahl an Neutrophilen und einer gesteigerten MMP-Expression, desto schlechter entwickelt sich die Qualität und Quantität der EZM aus und desto rascher folgen Dilatation mit steigenden LV-Volumen und zunehmender kardialer Dysfunktion (Tao, 2004; Cavin, 2006). Sowohl die Ejektionsfraktion als auch der kardiale Output verringern sich nach einem MI meist enorm (Cavin, 2003, Cavin, 2006). Das Ausmaß der Dilatation ist abhängig von der Größe des Infarktes, der Stärke des Entzündungsantwort und dem Wandstress.

Charakterisierung des Modells anhand morphologischer Parameter sowie deren genotypische und geschlechterspezifische Veränderungen

Die vorliegende Arbeit konnte die in der Literatur beschriebenen Umbauprozesse der EZM nach MI bestätigen und zusätzliche neue Erkenntnisse, vor allem die Rolle des Melusins und des Geschlechts betreffend, beitragen. Im Fokus des Interesses standen die morphologischen Veränderungen des linken Ventrikels sowie genetische Veränderungen, die den Umbau der EZM betreffen. Die sowohl beim Menschen als auch bei Ratte und Maus bereits nachgewiesene höhere **Mortalität** der männlichen Individuen wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Vor allem ab dem fünften Tag post operationem nimmt die Mortalität der Männchen noch einmal stark zu. Die erhöhte Sterblichkeit in den ersten 24 Stunden nach der MI-Induktion lässt sich oft auf sekundäre Ursachen zurückführen, die mit dem operativen Eingriff in Zusammenhang stehen, z.B. erhöhter Blutverlust, und musste mit berücksichtigt werden. Bei beiden Geschlechtern überlebten signifikant mehr transgene als Wildtypiere. Durchgeführte echokardiographische und molekularbiologische Untersuchungen können mögliche Ursachen für die höheren Überlebensraten der Melusin-überexprimierenden Tiere finden helfen. Überexpression von Melusin führt unter basalen Umständen zu einer moderaten, jedoch signifikanten Hypertrophie des linken Ventrikels (De Acetis, Circulation, 2005). Diese könnte unter anderem eine Erklärung für die bessere Überlebensrate der transgenen Tiere nach MI liefern, da eine leichte, basale Hypertrophie des linken Ventrikels einen verminderten Wandstress – vor allem bei Volumenüberlastung der Herzkammer – zur Folge hat, der vor Dilatation und Herzruptur schützt. Brancaccio zeigte außerdem, dass das Fehlen von Melusin eine reduzierte LVH bewirkt, die von Herzdilatation und Herzversagen begleitet wird (Brancaccio, Nature Medicine, 2002). In beiden Geschlechtern und beiden Genotypen wurde nach MI eine Zunahme sowohl des **Herz-** als auch des **LV-Gewichtes**

beobachtet, wobei der Trend dahin ging, dass die transgenen Tiere im Verhältnis zu den Wildtyp-Tieren weniger zunahmten. Dieser Trend war nicht signifikant. Die Zunahme des Herz- und des LV-Gewichtes lassen darauf schließen, dass es durch Myokardinfarkt zu dem beabsichtigten hypertrophen Wachstum des Ventrikelmyokards kam. Bereits Cavasin et al. konnten eine Zunahme des Herzgewichtes nach MI ohne bemerkenswerte Geschlechterunterschiede verzeichnen (Cavasin, 2003; Cavasin 2004). Der Validierung des vorliegenden Modells verhilft die Tatsache, dass gegenüber dem Herzgewicht das Körpergewicht nach MI relativ konstant blieb. Das durchschnittliche Körpergewicht war in allen Gruppen stabil und änderte sich weder durch die Operation noch unterschied es sich wesentlich innerhalb der einzelnen Gruppen. Die Männchen aller vier Gruppen wogen prä- und postoperativ mehr als die Weibchen, was geschlechterspezifische Ursachen hat.

Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Veränderungen des Herzgewichtes organspezifisch waren und nicht auf Veränderungen des Gesamtorganismus oder der Konstitution zurückzuführen sind, da sowohl Nahrungsverweigerung aufgrund schlechter gesundheitlicher Verfassung und mangelnden Allgemeinzustandes oder Ödembildung im Körper zu einer Zu- bzw. Abnahme des Körpergewichtes führen können. Das sich das Verhältnis **LV-Gewicht/Herzgewicht** in den einzelnen Gruppen kaum unterschied, lässt darauf schließen, dass die Zunahme des Herzgewichtes vorrangig aus der Zunahme des linken Ventrikels resultierte. Dies ist ebenso ein wichtiger Parameter zur Beweisführung, dass das MI-Modell die Anforderungen in der Praxis erfüllt. Die unterschiedliche Entwicklung der Herzhypertrophie zeigte sich auch in der echokardiographischen Untersuchung. Die aus dem Durchmesser und den Wanddicken berechnete und gegen die Tibiallänge normalisierte LV-Masse kann mit dem gewogenen LV-Gewicht verglichen werden, um die Zuverlässigkeit der echokardiographischen Methode zu bestätigen. Zudem kann eine LV-Massenzunahme ein Indiz für eine Hypertrophie sein. Die echokardiographisch kalkulierten LV-Massen stimmten gut mit den nach der Organentnahme gewogenen LV-Gewichten überein, was ein Indiz für die Sicherheit der echokardiographischen Parameter sein kann. Bei beiden Geschlechtern waren die LV-Massen der MI-Gruppen signifikanter größer als die der Kontrollgruppen. Dies bestätigt bestehende Erwartungen an das Infarktmodell, nach denen eine Hypertrophie des Herzens gleichsam mit einer Massenzunahme einhergeht. Die weiteren echokardiographisch gewonnenen Ergebnisse ließen über die Veränderungen an den Wanddicken des linken Ventrikels Rückschlüsse über das Stadium der Hypertrophie und eventuell bereits eingetretener Dilatation schließen. Die **Hinterwand – und Septumdicke** wurde bestimmt,

um eine eventuell eingetretene Hypertrophie feststellen zu können. Der Infarkt erstreckte sich auf die Vorderwand, weshalb sowohl Hinterwand- als auch Septumdicke als aussagekräftiger Parameter gewählt wurden. Die Hinterwanddicke änderte sich nur in den Wildtyp-Tieren nach MI signifikant, während sie in den transgenen Tieren zwischen MI und sham-Gruppe annähernd konstant blieb. In der Wildtierkohorte war die Hinterwanddicke nach MI signifikant kleiner als in der vergleichbaren sham-Gruppe. Die Septumdicke verringerte sich nach MI sowohl in den transgenen als auch den Wildtyp-Tieren signifikant. Dies lässt vermuten, dass die Tiere sich bereits in einem dilatativen Stadium befanden. Dies erscheint an Tag 14 nach Myokardinfarkt und aufgrund der Schwere des Phänotypes durchaus plausibel und der frühzeitige Übergang in die Dilatation lässt auf einen mit zunehmender Dauer dekompenzierten Status schließen. Es ist bekannt, dass es bei anhaltender Volumenüberlastung des linken Ventrikels und im Zuge des Remodelings nach MI zu einer funktionellen Adaptation mit mehr oder weniger ausgeprägter Herzinsuffizienz kommt. Bedeutendes Merkmal einer Herzinsuffizienz ist eine Dilatation des linken Ventrikels verbunden mit einer Störung der systolischen und diastolischen Funktion (Lips, Eur Heart, 2003). Diese scheint im vorliegenden Model bereits aufgetreten zu sein. Ein weiterer signifikanter Unterschied wurde bei der Veränderung der Hinterwanddicke nach MI zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren festgestellt, jedoch nur bei den männlichen Tieren. Bei diesen nahm die Hinterwanddicke nach MI in den transgenen Tieren signifikant weniger ab als in den Wildtyp-Tieren. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Melusin-Überexpression schon unter physiologischen Umständen eine leichte LV-Hypertrophie auslöst, die jedoch keine strukturellen und funktionellen Veränderungen nach sich zieht (De Acetis, Circ., 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass anhaltende Drucküberlastung nach TAC-Operation in den melusin-überexprimierenden Herzen zu einem Fortschreiten der Hypertrophie führt, die jedoch im Gegensatz zu den Wildtyp-LV konzentrisch bleibt unter Beibehaltung der vollen kontraktilen Funktion (De Acetis, Circ., 2005). Wildtyp-Tiere zeigen unter gleichen Bedingungen bereits deutliche LV-Dilatation und verschlechterte Kontraktilität. Schon Litwin et al., die als einzige bei beiden Geschlechtern die Veränderung der Wanddicken in vergleichbaren Zeiträumen untersuchte, beobachtete eine stärkere Ausprägung der Hypertrophie in den Weibchen und stellte nur bei den männlichen Tieren eine signifikante Veränderung der Wanddicken fest (Litwin, 1999). Sie ging mit einer ausgeprägteren kardialen Dysfunktion bei den Männchen einher. Unabhängig von den makroskopischen Veränderungen kommt es im nicht-infarzierten Myokard zu einer kompensatorischen

Hypertrophie der Kardiomyozyten. Mehrere Studien belegen, dass diese in den männlichen Tieren stärker ausgeprägt ist als in den weiblichen (Litwin, 1999; Cavin, 2004). Jedoch kann diese stärkere Hypertrophie der Kardiomyozyten den stärkeren Funktionsverlust der männlichen Herzen nicht kompensieren. Eine Erklärung hierfür könnte in Geschlechterunterschieden im Blutdruck oder der Kontraktilität zu finden sein. Cavin et al. beschrieben, dass sich der Blutdruck der Weibchen nach MI verringert hatte, während der der Männchen gleich hoch blieb (Cavin, 2003; Cavin, 2004). Ein höherer Blutdruck könnte ein wesentlicher Faktor sein, der den fortgeschrittenen Grad der Dilatation bei den Männchen erklärt. In der vorliegenden Studie wurde der Blutdruck allerdings nicht untersucht. Weiterhin kommt es durch infarktbedingten Myozytenverlust und durch Ausbildung der durch Infarktheilung nicht-kontraktilen Infarkt Narbe zur zunehmend systolischen Dysfunktion, die sich in verringerter Kontraktionskraft und voranschreitender Dilatation äußert (Lamparter, 2000; Weber, 1996). Um eine Aussage über das Ausmaß der Dilatation post-MI machen zu können und daraus die funktionellen Parameter des Herzens zu berechnen, wurde die Längsachse des linken Ventrikels am Ende der Systole und in der Diastole bestimmt. Bei allen Tieren war in beiden Genotypen sowohl im Diastolischen als auch im Endsystolischen Parameter post-MI ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Dies spricht dafür, dass die Herzen sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Dilatation befanden.

Die transgenen Tiere wiesen post-MI geringere Unterschiede zur Kontrollgruppe auf als die Wildtyp Tiere, was jedoch nur bei den männlichen Individuen im Diastolischen Durchmesser signifikant war. Aus den systolischen und diastolischen Parametern wurde die Ejektionsfraktion bestimmt. Die Ejektionsfraktion ist die prozentuale Auswurf fraktion vom maximalen, also dem enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels und bezeichnet einen klinisch relevanten Parameter der systolischen Funktion. Die Ejektionsfraktion ist von der Vor- und der Nachlast und daher vom Volumen abhängig. Sie gibt einen Hinweis darauf, inwieweit die Herzfunktion nach einem MI erhalten bleibt bzw. trotz Herzmuskel-Verlust kompensiert wird. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen hochsignifikanten Abfall der Ejektionsfraktion nach MI in beiden Genotypen und Geschlechtern. Zwar nahm die Ejektionsfraktion in den transgenen Tieren weniger ab als in den Wildtyp Tieren, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Zusammenfassend lassen die echokardiographischen Funktionsparameter darauf schließen, dass die Melusin-überexprimierenden Tiere besser gegen den Übergang in Richtung Dilatation und Herzversagen im Vergleich zu den Wildtyptieren geschützt waren.

Die kardioprotektive Wirkung von Melusin, welche einem Übergang von konzentrischer in Richtung exzentrischer Hypertrophie mit Dilatation und Herzversagen entgegenwirkt, wurde erstmals von Brancaccio et al. propagiert. Sie konnten in ihren Untersuchungen unter Beweis stellen, dass Melusin-KO-Mäuse einen typischen Verlauf eines Remodeling von exzentrischer Hypertrophie zeigten, wie die Vergrößerung der linken Ventrikelkammer ohne Veränderungen der relativen Wanddicken, progredient ansteigend von der zweiten zur vierten Woche nach TAC. Ferner ging die Dilatation des LV einher mit einem rapiden Funktionsverlust, der anhand der stetigen Abnahme des FS gemessen wurde (Brancaccio, *Nature Medicine*, 2002). Demgegenüber zeigten die Wildtyp-Kontrolltiere in Brancaccio's Studie nach TAC-Operation deutliche Merkmale einer konzentrischen Hypertrophie, nämlich ansteigende Septum- und Hinterwanddicken sowie verringerte endsystolische und diastolische Durchmesser bei einem Anstieg der relativen Wanddicken. Dass die vorliegenden Ergebnisse auch in den Wildtyp-Kontrolltieren Merkmale einer exzentrischen Hypertrophie mit einhergehender Dilatation aufweisen statt wie in Brancaccio's Studie konzentrisch zu bleiben, hängt mit dem Modell zusammen, da MI im Gegensatz zu TAC mit mehr oder minder großflächigem Substanz- und Kontraktilitätsverlust des linken Ventrikels verbunden ist. Somit ist die Ausgangssituation nach dem operativen Eingriff nach MI nicht mit der nach TAC zu vergleichen und erklärt den frühzeitigen Übergang in ein Stadium mit den Anzeichen einer Dilatation und deren beschleunigtes Fortschreiten. Erwartungsgemäß zeigten die transgenen Tiere aus vorliegender Studie einen verzögerten und milderen Verlauf beim Übergang in die Dilatation, was oben beschriebene echokardiographische Parameter deutlich machen. Hier konnte nun gezeigt werden, dass Melusin bei Volumen- statt Drucküberlastung, induziert durch MI statt TAC, denselben positiven Effekt hat. Zu ähnlichen Ergebnissen der echokardiographischen Untersuchung kommt auch De Acetis, die in ihrer Studie ebenfalls Melusin-überexprimierte Mäuse verwendete. Sie konnte mit ihren Daten unter Beweis stellen, dass Melusin-überexprimierende Mäuse ihre Fähigkeit zu konzentrischer, kompensatorischer Hypertrophie beibehalten und vor der Entstehung von Herzversagen geschützt sind. Dazu wurden Melusin-transgene und Wildtyptiere zwölf Wochen lang Aortic banding unterworfen und nach vier, acht und zwölf Wochen echokardiographische Untersuchungen vorgenommen, um die Herzstruktur und -funktion beurteilen zu können. Während vier Wochen nach Aortic banding in beiden Genotypen typische Zeichen einer konzentrischen Hypertrophie zu finden

waren wie Anstieg der Septum- und Hinterwanddicke sowie verringerter enddiastolischer Durchmesser (LVEDD), zeigte sich nach acht Wochen in den Wildtyptieren das Bild einer initialen exzentrischen Hypertrophie, welches sich nach zwölf Wochen noch stärker manifestierte. Dies wurde deutlich anhand der Reduktion der Septum- und Hinterwanddicke sowie einem Anstieg des LVEDD. In den transgenen Mäusen veränderte sich das Bild sowohl nach acht als auch nach zwölf Wochen kaum im Vergleich zum Status quo vier Wochen nach AB und sehr viel langsamer als bei den zeitlich vergleichbaren Wildtiergruppen.

Relative Genexpression 14 Tage nach MI

Um den Einfluss von Melusin auf die Hypertrophieentwicklung und auf Geschlechterunterschiede nach Volumenüberlastung des linken Ventrikels auf Transkriptebene zu eruieren und mit den Ergebnissen aus der echokardiographischen Untersuchung zu vergleichen, wurde die relative Genexpression bestimmt. Alle gemessenen Werte wurden mithilfe des Haushaltsgens GAPDH normalisiert. Untersucht wurde mRNA aus Gewebe des nicht infarzierten Myokards, entnommen zwischen dem Infarktbereich und der Klappenebene. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen laufen parallel in der Pathogenese der Myokardhypertrophie ab. Hierzu zählen unter anderem Apoptose von Kardiomyozyten, gestörte Kalzium-Homöostase, Umbau des Zytoskeletts und Sarkomers und ein Umbau der Gewebestruktur mit Fibrose im Interstitium. Diese Fibrose ist maßgeblich verantwortlich für die Versteifung des Myokards und infolgedessen für die reduzierte Kontraktilität des Herzens. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene der EZM und mehrere ihrer Regulatoren in ihrer Expression untersucht. Eine erhöhte Druck- oder Volumenbelastung des Herzens sowie andere kardiale Stressfaktoren führen zur Induktion eines fetalen hypertrophie-assoziierten Genprogramms. Die Expression des Gens NPPA wird als Marker für die Induktion des embryonalen Genprogramms bei linksventrikulärer Hypertrophie betrachtet. Erwartungsgemäß erhöhte sich die Expression von NPPA nach MI in beiden Geschlechtern und Genotypen signifikant. In den Wildtyptieren erhöhte sich die Expression um den Faktor 21,6 und in den transgenen Tieren um 15,8 (2-way-ANOVA Interaktion Genotyp-Intervention $p=0,01$). Dies passt zu den Ergebnissen von Brancaccio et al., die zeigen konnten, dass die Induktion der NPPA Expression in Melusin-KO-Mäusen in einem TAC-Modell signifikant niedriger war (Brancaccio, Nature Medicine, 2002). Interessanterweise zeigte sich ein Geschlechterunterschied in Bezug auf die Induktion der NPPA-Expression nach MI. Im

Vergleich aller weiblichen zu allen männlichen Tieren, das heisst transgener und Wildtyptiere zusammen, nahm die Expression der Männchen nach MI fast um das doppelte im Vergleich zu Weibchen zu (Faktor 9,6 weiblich vs. Faktor 18,0 männlich, 2-way-ANOVA Interaktion Geschlecht-Intervention $p=0,047$). Bei Betrachtung der Verteilung zwischen transgenen und Wildtyptieren fiel auf, dass der Unterschied der Induktion bei den Weibchen nach MI sehr groß war, wohingegen der Unterschied bei den männlichen Tieren weit weniger ausgeprägt war. Es fiel auf, dass die weiblichen Wildtyptiere nach MI 19-fach signifikant höhere Expressionswerte von NPPA erreichten als die transgenen Weibchen (3,48 NPPA female WT MI vs. 0,18 NPPA female TG MI), obwohl die sham Gruppen sowohl bei den Wildtypweibchen (0,15 NPPA female WT sham) als auch bei den transgenen Weibchen (0,06 NPPA female TG sham) vergleichbar niedrige Werte aufwiesen. Die männlichen Tiere hingegen wiesen sowohl nach MI (2,27 NPPA male WT MI vs. 1,57 NPPA male TG MI) als auch in den sham Gruppen (0,11 NPPA male WT sham vs. 0,07 NPPA male TG sham) keine so auffallenden Unterschiede auf wie bei den Weibchen beobachtet. Die geringere Induktion des Kardiomyopathiemarkers NPPA nach MI in den transgenen Weibchen weist auf eine kardioprotektive Rolle von Melusin hin. Es erfordert weitere Studien mit größeren Tierzahlen, um zu eruieren, wie dieser Geschlechterunterschied Melusin-überexprimierender Mäuse hinsichtlich Induktionsausmaß von NPPA nach MI zustande kommt.

Als Regulatoren der Gene der EZM und des Remodeling wurde die relative Genexpression von Connective tissue growth factor (CTGF) und Transforming-growth-factor- β (TGF- β) untersucht. CTGF ist ein endotheliales Protein, welches Proliferation und Migration stimuliert. Es ist Mediator des TGF- β , dass die Zellproliferation und die extrazelluläre Matrixproduktion fördert. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass in aktivierten Myofibroblasten, die verstärkt extrazelluläre Matrix produzieren, CTGF und TGF β in ihrer Expression erhöht sind (Bujak, *Cardiovasc Res.*, 2007; Dean, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2005). Nach MI steigt die Genexpression sowohl von CTGF als auch von TGF β an, was für die Aktivierung der Regulatoren der EZM spricht und zeigt, dass Umbauvorgänge im Rahmen eines Remodeling vor sich gingen. Das Ausmaß der Induktion war dabei weder geschlechts- noch genotypabhängig. Zwar zeigten sich in den Genexpressionswerten von CTGF nach MI in den transgenen Tieren ein Trend zu niedrigeren Werten als in den vergleichbaren Wildtyptieren, es wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Interessanterweise konnte De Acetis in ihren Untersuchungen mit Melusin-überexprimierenden Mäusen zeigen, dass 12 Wochen nach TAC die transgenen Tiere signifikant

niedrigere Werte von TGF β 1 aufwiesen als die vergleichbaren Wildtyptiere 12 Wochen nach TAC. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Gründe dafür können neben den verschiedenen Zeitqualitäten (12 Wochen vs. 2 Wochen post operationem) vorrangig in der unterschiedlichen Genese von TAC und MI zu finden sein und der damit einhergehenden unterschiedlichen Pathogenese. Besonders nach MI liegen in der Gesamtzellpopulation verhältnismäßig mehr Fibroblasten, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten vor, das heißt es liegen im Vergleich zur Ausgangszellpopulation und im Vergleich zur Zellpopulation nach AB deutlich mehr Nicht-Myozyten vor, die die relative Genexpression entsprechend beeinflussen.

Im Zusammenhang mit TGF β und CTGF als Regulatoren der EZM wurde auch die relative Genexpression von Osteopontin untersucht. Im Einklang mit dem Bild, welches die relativen Genexpressionen von NPPA, CTGF und TGF β vermitteln, stieg auch Osteopontin nach MI in beiden Geschlechtern und Genotypen signifikant an. Es ist bekannt, dass die Expression von Osteopontin erst nach mechanischem Stress, bei Hypoxie oder durch Druck- bzw. Volumenüberlastung induziert wird (Okamoto, Mol Cell Biochem, 2007). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz hochreguliert ist, es die EZM-Proteine qualitativ und quantitativ kontrolliert und durch seinen Einfluß auf TGF- β und Matrixmetalloproteinasen es myokardiales Remodeling und Fibrose fördert (Singh, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009).

Im Einklang mit dem histologisch erhöhten Kollagengehalt und dem gestiegenem Fibrosescore nach MI war die relative Genexpression von Kollagen-1 (Col-1), Kollagen-3 (Col-3) und Kollagen-5 (Col-5) erhöht. Die Expressionsmuster untereinander wiesen ein ähnliches Profil auf, lediglich das Ausmaß der Induktion nahm von Col-1 über Col-3 zu Col-5 zu, war aber weder geschlechts- noch genotypabhängig. In mehreren Studien wurde im Mausmodell ein Anstieg der Expression der Kollagene post-MI beschrieben (Spinale, Physiol Rev, 2007; Jugdutt, N Eng J Med, 2009; Dobaczewski, Cell tissue Res., 2006). Im gesunden Herzen und unter physiologischen Bedingungen ist Col-1 vorrangig für die mechanische Gewebebelastbarkeit verantwortlich, wohingegen Col-3 vielmehr die Gewebeelastizität bestimmt (Lamparter, 2000). Col-5 initiiert und reguliert die Fibrillogenese und den Einbau der Collagenfibrillen in die Matrix (Wenstrup, J Biol Chem., 2004). Um einen Einfluss von Melusin-Überexpression auf die Genexpression der Kollagene noch genauer beurteilen zu können, sind weitere Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten notwendig. Trotz der im Fibrosescore beobachteten schwächeren Kollagenakkumulation der transgenen Tiere, scheint

es 14 Tage post-MI keine genotypischen Unterschiede in der relativen Genexpression zu geben. Es ist zu vermuten, dass der Einfluss der Melusin-Überexpression auf die relative Genexpression, die zu einer schwächeren Kollagenakkumulation der transgenen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren führte, eher in einer früheren Remodeling-Phase hätte erfasst werden können. Cleutjens beschrieb, dass bei der Ratte, deren Remodelingprozesse langsamer ablaufen als die der Maus, Northern Blot Analysen mit RNA und Hybridisierung mit cDNA-Proben aus nicht-infarziertem Gewebe des linken Ventrikels nach MI, einen sehr frühzeitigen Anstieg von Procollagen-1 und Procollagen-3 post-MI um das 5- bis 15-fache zeigten. Typ-3-Procollagen-Level erreichten dabei bereits zwei Tage post-MI einen Peak, während der Typ-1-Procollagen-Peak vier Tage post-MI folgte (Cleutjens, *Am J Pathol*, 1995). Diese Daten geben Anhaltspunkt dafür, dass, um die Mechanismen der Kollagen-Genexpression erfassen zu können, Messungen insbesondere der ersten vier Tage miteinander verglichen werden müssten. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die zeigen, dass sich der ursprüngliche Kollagen-Verband unmittelbar nach MI auflöst und von einem starken Anstieg der Proteinexpression von Hydroxyprolin, einer Aminosäure, die vorrangig in Kollagenen gefunden wird, begleitet wird (Holmes, *Circulation*, 1994; Jugdutt, *Circulation*, 1996; McCormick, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1994; Sun, *J Lab Clin Med*, 2000). Judd und Wexler konnten beispielsweise in Raten nachweisen, dass der myokardiale Hydroxyprolin-Pegel am siebten Tag nach MI stark anstieg, was für eine Akkumulation von Kollagen spricht (Judd and Wexler, *Am J Physiol*, 1975). Genexpressions-Messungen in den ersten Tagen nach MI versprechen diesbezüglich mehr Klarheit, da in diesem Zeitraum der Grundstein für das Ausmaß der Dilatation und der Fibrose gelegt wird (Gaudron, 2001).

Die kardialen Umbauprozesse der EZM werden wesentlich durch **MMP und ihre Inhibitoren**, die **TIMP** vermittelt, welche wiederum den Abbau der EZM hemmen (Spinale, *Physiol Rev*, 2007). Für ein funktionelles Gesamtgefüge der EZM ist ein Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP Voraussetzung. Krankhafte Zustände, wie MI und Herzinsuffizienz, weisen ein unausgewogenes Verhältnis dieser beiden Gegenspieler auf (Spinale, *Circulation*, 2000; Spinale, *Circulation*, 2002). Steigt die TIMP-Expression im Verhältnis zur MMP-Expression an, kommt es zur vermehrten Akkumulation der Matrix, da die Aktivität der Kollagenasen durch diese inhibiert wird. Diese Inhibition ist irreversibel. Diese Arbeit fokussierte sich auf die Untersuchung von MMP-2 und MMP-9 und ihre Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4, da Knock-out-Studien bereits beweisen konnten, welchen erheblichen Einfluss diese beiden MMP im Remodeling des Herzens haben (Ducharme, 2000; Hayashidani, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003). Heymans konnte zeigen, dass ein MMP-9-KO in Mäusen zu verstärkter Dilatation und schlechterer Pumpfunktion des Herzens

fürte (Heymans, Nat Med, 1999). Romanic konnte durch einen MMP-9-KO die Ausdehnung des Infarktes signifikant verringern (Romanic, Cardiovasc Res, 2002). MMP-2 ist nach MI und bei Herzversagen deutlich überexprimiert und Hayashidani zeigt, dass die gezielte Entfernung von MMP-2 zum fast vollständigen Ausbleiben von Ventrikelrupturen, zur signifikanten Verbesserung des Fractional shortening in der echokardiographischen Untersuchung, zu signifikant geringerer Dilatation und zum deutlich besseren Überleben der Tiere nach MI führt (Hayashidani, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003). Eine weitere Untersuchung an MMP-2-transgenen Mäusen zeigte, dass die Überexpression von MMP-2 ohne weitere Eingriffe bereits ein Remodeling der kardialen EZM mit einer erhöhten Kollagenablagerung im LV des Herzens auslöste. Die Autoren schlussfolgerten, dass MMP-2 das kardiale Remodeling begünstigte und zu einer Erhöhung der Kollagenablagerung im LV beiträgt (Bergmann, Am Physiol Heart Circ Physiol, 2007). Es existieren weiterhin eine Reihe von klinischen und tierexperimentellen Studien, die zeigen, dass eine signifikante Erhöhung der mRNA und Proteinexpression sowie eine Steigerung der MMP-2-Aktivität in Zusammenhang mit den kardialen Umbauprozessen in diversen Herzerkrankungen steht (Sakata, Circulation, 2004; Gaertner, J Mol Cell Cardiol, 2005; Peterson, Cardiovasc Res, 2000; Fielitz, J Mol Med, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass 14 Tage nach MI die Genexpression von MMP-2 und MMP-9 gegenläufig war. Während die relative Genexpression von MMP-2 in beiden Geschlechtern und Genotypen signifikant erhöht war, war sie im Falle von MMP-9 in beiden Geschlechtern und Genotypen signifikant reduziert. Geschlechterunterschiede wurden nicht signifikant. Ebenso konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyptieren und den transgenen Tieren festgestellt werden. In Anbetracht des Zeitpunktes, den die Genexpression widerspiegelt, machen die gewonnenen Ergebnisse durchaus Sinn. MMP-9 hat eine entscheidendere Rolle in der frühen Phase nach einem MI, die jedoch zum angegebenen Zeitpunkt schon überschritten scheint. Direkt nach dem MI ist MMP-9 maßgeblich an der Verdünnung des Myokards und an der Dilatation des linken Ventrikels beteiligt. Es konnte nachgewiesen werden, dass MMP-9 bereits innerhalb von einem Tag nach MI eine deutlich gesteigerte Enzym-Aktivität aufweist (Lindsey, 2002; Tao, 2004). Es zeigte sich auch, dass MMP-9 innerhalb des ersten Woche nach MI seinen Expressionspeak erreichte und anschließend die Aktivität gleichmäßig wieder abnahm. In diesem Zeitraum bis zum siebten Tag nach MI steigerte sich die MMP-2-Expression nur geringfügig (Fang, 2007) und der MMP-2 Proteingehalt begann erst ab dem vierten Tag post-MI anzusteigen (Kawakami, 2004; Tao, 2004). Ähnliche Beobachtungen mit signifikant erhöhten MMP-2 und signifikant verringerten MMP-9 Expressionsniveaus wurden unabhängig von der vorliegenden Studie im eigenen Labor in einem TAC-Model neun Wochen post operationem eruiert (Fliegner, Dissertation, HU Berlin 2008). In den männlichen Tieren nahm die Expression nach MI im Vergleich zu den weiblichen Tieren doppelt so stark zu (2-way-ANOVA Interaktion Geschlecht-Intervention: $p=0,027$; Faktor 3,6 Weibchen vs. Faktor 7,4 Männchen). Der Einfluss des Genotypes nach MI zeigte in den transgenen Tieren eine viermal niedrigere TIMP-1

Expression im Vergleich mit den Wildtyptieren (2-way-ANOVA Interaktion Genotyp-Intervention $p=0,00012$; Faktor 12 Wildtyp vs. Faktor 3 Transgen). TIMP-1 bindet bevorzugt und hochaffin an MMP-9, gilt aber auch als Inhibitor aller MMP (Hamacher, Dtsch Med Wochenschr, 2004). TIMP-1 und ebenso TIMP-2 sind in der Lage, Fibroblasten zu stimulieren und die Kollagensynthese anzuregen (Lambert, 2004). Aus der Literatur geht hervor, dass ein KO von TIMP-1 zu einem beschleunigten Remodeling, zu einer Zunahme von Dysfunktion, Hypertrophie und enddiastolischem Volumen führt (Creemers, 2003). Und Ikonomidis konnte unter Beweis stellen, dass eine pharmakologische MMP-Inhibition vor diesen Entwicklungen schützt (Ikonomidis, 2005). Es wurde bereits mehrfach beobachtet, dass die Genexpression von TIMP-1 und TIMP-2 innerhalb der ersten Woche nach MI ansteigen, während die Umsetzung auf Proteinebene eine Woche zeitverzögert folgt (Peterson, 2000; Kawakami, 2004). Es liegt nahe, dass diese zeitliche Diskrepanz auf die Translation der mRNA und die Verarbeitung zum aktiven Enzym zurückzuführen ist. Die relative Genexpression von TIMP-2 stieg in der vorliegenden Studie nach MI in beiden Geschlechtern und in beiden Genotypen an, war jedoch nicht geschlechts- oder genotypabhängig reguliert. Im Fall von TIMP-3 und TIMP-4 wurden sowohl in der 1-way als auch in der 2-way-ANOVA-Statistik keine Signifikanzen erreicht, das heisst, weder Intervention, noch Genotyp oder Geschlecht wirkten auf die Expression dieser beiden Gene signifikanten Einfluss aus. Es zeigte sich allerdings im direkten Vergleich der Werte über Tukey's Test, dass die relative Genexpression von TIMP-3 nach MI in den transgenen Tieren signifikant anstieg, in den Wildtyptieren wurde dies nicht beobachtet. TIMP-4 hingegen zeigte im Tukey's Test, dass die Expression nach MI in den Wildtyptieren signifikant abnahm, wohingegen sich in den transgenen Tiere ein gegenläufiger Trend abzeichnete. Über TIMP-3 und TIMP-4 ist bekannt, dass die Genexpression nach MI sowohl im Menschen als auch im Tiermodell verringert ist (Fedak, 2004; Fang, 2007), während TIMP-4 im Myokard ohnehin hohe basale Expressionslevel aufweist und als „kardialer Inhibitor der MMP“ bekannt ist (Greene, 1996; Cox, 2004). Wie in der präsentierten Untersuchung wurden auch in der Studie von Fang et al. beide Geschlechter im Vergleich betrachtet. Jedoch stellten sich auch in deren Ergebnissen keine Geschlechterunterschiede heraus (Fang, 2007).

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit den phänotypischen Parametern zu vergleichen und Zusammenhänge festzustellen, wurde eine **Korrelationsanalyse** durchgeführt, in der der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet wurde. Es zeigte sich eine enge Korrelation jeweils zwischen den phänotypischen Parametern und den Genexpressionswerten auf Transkriptebene, welche die gewonnenen Ergebnisse auf Transkriptebene noch einmal unterstreicht. Die Expression von NPPA stieg signifikant mit fortschreitendem Funktionsverlust des Herzens, gemessen am fractional shortening, an ($r^2=-0,68$; $p=0,00005$). Mit steigender Expression von NPPA vergrößerte sich der endsystolische Durchmesser ($r^2=0,71$; $p=0,000016$) ebenso wie der diastolische Durchmesser ($r^2=0,66$; $p=0,000098$). Für NPPA ist im Menschen bekannt, dass es ein prognostischer molekularer Marker für die Schwere einer Herzerkrankung ist (Kjaer, Clin Physiol, 2001). Man kann anhand der Höhe der

Expression eine Aussage darüber treffen, wie sich die Krankheit entwickeln wird. Berendes konnte in klinischen Studien zeigen, dass NPPA bzw. das zugehörige prozessierte biologisch aktive Peptid, genannt ANP signifikant erhöht war bei Volumenüberlastung des Herzens in Patienten nach Bypass-Operation (Berendes, Anesth Analg, 2004). Und in Untersuchungen mit Kälbern wurde beobachtet, dass Tiere mit Koronarer Herzkrankheit signifikant höhere ANP-Plasmaspiegel aufwiesen als gesunde Tiere und dass die ANP-Konzentration eng mit LVEDP korrelierte (Hori, J Vet Intern Med, 2009). In den vorliegenden Ergebnissen konnte ebenfalls der enge Zusammenhang zwischen der relativen Genexpression von NPPA und dem fortschreitenden Funktionsverlust, gemessen an FS, dem Ausmaß der Dilatation, gemessen an endsystolischem und diastolischem Durchmesser sowie Septumdicke, gezeigt werden und untermauert die gewonnenen Daten aus der genmolekularen Analyse. In der durchgeführten Studie wurde eine enge Korrelation zwischen dem Funktionsverlust des Herzens und der Expression des prognostischen Kardiomyopathiemarkers NPPA nachgewiesen und eine signifikant schwächere Induktion von NPPA nach MI in Melusin-transgenen Mäusen detektiert, daher ist von einer kardioprotektiven Rolle Melusins auszugehen. In der Korrelationsanalyse konnte ferner gezeigt werden, dass auch die Gene der Extrazellulären Matrix und ihre Regulatoren positiv mit den funktionellen Parametern aus der echokardiographischen Untersuchung korrelierten. Alle gemessenen Kollagene (Col-1, $p=0,0025$; Col-3, $p=0,0016916$; Col-5, $p=0,000334$) korrelierten eng mit dem funktionellen Parameter FS. Erwartungsgemäß und stimmig korrelierten auch CTGF ($p=0,000581$) und OPN ($p=0,002498$), beides Regulatoren der EZM, eng mit FS. Bei der Korrelationsanalyse der MMP und ihren Inhibitoren, den TIMP, fiel auf, dass MMP-9 positiv mit FS korrelierte, das heißt, dass mit steigendem Funktionsverlust die relative Genexpression von MMP-9 abnahm ($r^2=0,5$; $p=0,0057$). Interessanterweise korrelierte TIMP-1 genau umgekehrt zu MMP-9 mit FS. Je stärker die Funktion des linken Ventrikels verloren ging, desto stärker war die Expression von TIMP-1, während die Expression von MMP-9 wie abnahm. Dass MMP-9 mit fortschreitendem Krankheitsverlauf herabreguliert wird, konnte auch in einer Studie bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz demonstriert werden, während andere MMP keine Veränderung ihrer Expression zeigten (Battle, Transplant Proc, 2007).

Um die Studie abzurunden und die gewonnenen Ergebnisse auf Genexpressionsebene weiter zu verfolgen, wurde die **Proteinexpression** von Enzymen und Komponenten der Extrazellulären Matrix, die maßgeblich an Remodeling-Prozessen beteiligt sind, einer Analyse unterzogen. Insbesondere waren dafür die Proteine der für den Um- und Abbau kollagener Strukturen verantwortlichen Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie deren Inhibitoren (TIMP) interessant. Die relative Proteinexpression von TIMP-3 zeigte in den transgenen Tieren signifikant niedrigere Werte als in den Wildtyp-Tieren (1-way ANOVA Ratio: 0,61; $p=0,0068$). Das Ausmaß der Expression war dabei weder geschlechts- noch interventionsabhängig. Kassiri zeigte in seinen Untersuchungen, dass TIMP-3-KO-Mäuse signifikant mehr interstitielle Fibrose, gesteigerte Synthese und Deposition von Typ-1-Kollagen, gesteigerte Aktivierung von Fibroblasten und MMP-2, aber nicht von MMP-9 zeigten

(Kassiri, *J Am Soc Nephrol*, 2009). Diese Ergebnisse stimmen mit den hier gewonnenen überein. Fedak beobachtete, dass der Verlust der Funktion von TIMP-3 in Mäusen zu gesteigerter spontaner LV-Dilatation, Hypertrophie der Kardiomyozyten und kontraktile Dysfunktion führte (Fedak, *Circulation*, 2004). Warum allerdings die transgenen Mäuse signifikant niedrigere Werte an TIMP-3 Protein aufwiesen, bleibt abzuklären. In den Proteinexpressionen von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 konnten in der ANOVA-Statistik keine Signifikanzen festgestellt werden. In der Analyse der Proteindaten mittels Tukey's Test, zeigten sich im Fall von MMP-9 ein Trend zur Abnahme nach MI, vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Genexpressionsanalyse. Die Auswertung der Proteindaten von MMP-2 und TIMP-1 lieferte nach Tukey's Test widersprüchliche Tendenzen im Vergleich zu den Beobachtungen aus der Genexpression. Ursachen dafür können in der geringeren Sensitivität der Western-Blot-Messungen im Vergleich zur quantitativen RT-PCR zu finden sein. Desweiteren findet Genregulation auf unterschiedlichen Ebenen statt, unter anderem auf der Transkriptionsebene, der Translationsebene und auf Ebene der Proteinstabilität. Auf diesen verschiedenen Ebenen läuft die Genregulation parallel, aber auch zeitversetzt ab und gerade auf der Ebene der Proteine sind Umsetzung aus RNA, Aktivierung und Abbau der Proteine zeitlich miteinander verknüpft, so dass Proteinexpressionsanalysen nur eine Momentaufnahme liefern. Eine weitere mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen Gen- und Proteinexpressionsdaten ist, dass für die Isolation von RNA und Proteinen heterogenes Gewebe verwendet wurde. Dies erschwert eine präzise Quantifizierung der Expression von speziellen Zell- bzw. Gewebetypen. Bei der quantitativen RT-PCR werden auch geringe Genexpressionsänderungen exponentiell amplifiziert und so dargestellt. Die direkten Antikörperbindungen in Western-Blot-Analysen lassen hingegen nur eine semi-quantitative Analyse zu. Um zu klären, inwieweit ein kardiales Remodeling nach MI zu Fibrose führt, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. An histologische Gewebefärbungen lassen sich deutlich klinisch relevante Veränderungen darstellen und sie sind letztendlich der aussagekräftigste Nachweis, um den aktuellen Zustand des Herzwebes wiederzugeben. Der Befund einer histologischen Untersuchung ist im klinischen Alltag die Methode der Wahl um die Situation eines Gewebes wiederzugeben. Auch wenn die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse die Genexpressionsdaten nicht exakt wiedergeben, zeigt der histologische Befund passend zu der Ermittlung der Genexpressionswerte einen höheren Fibrosescore nach MI in den Wildtyp-Tieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Remodeling und eine Deposition von EZM stattgefunden hat. Wie oben beschrieben, erklärt dies die höhere Genexpression der gemessenen Kollagene und die veränderte Homöostase der Expression ihrer Regulatoren (MMPs und TIMPs). Es ist bekannt, dass eine vermehrte Ablagerung von Kollagenen in der EZM zu einer gesteigerten

Steifheit des Herzmuskels und dadurch zu Kontraktilitätsstörungen und myokardialer Dysfunktion führt (Hess, *Circulation*, 1981; Jalil, *Circ Res*, 1989). In den transgenen Tieren lässt sich nach MI kein signifikant erhöhter Kollagengehalt feststellen im Vergleich zu den sham-operierten Tieren. Jedoch

wird im direkten Vergleich mit dem Kollagengehalt der Wildtyptiere nach MI deutlich, dass die Melusin-überexprimierenden Herzen einen signifikant niedrigeren Fibrosescore aufwiesen. Interessanterweise zeigt sich auch im direkten Vergleich der sham-Tiere der signifikant geringere Kollagengehalt der transgenen im Vergleich zu den Wildtyptieren. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchung von De Acetis et al., laut derer Melusin Überexpression gegen die Ablagerung und Anhäufung fibrotischen Materials im Herzen schützt (De Acetis, Circ Res, 2005). Vergleichbar mit dem Vorgehen in vorliegender Studie zeigten Sirius-Rot-Färbungen histologischer Schnitte von LV nach zwölf Wochen TAC-Intervention, dass die Schnitte der transgenen Tiere einen signifikant geringeren Kollagengehalt als die Wildtypmäuse hatten. Weiterhin zeigte sich in besagter Studie, dass die kapilläre Dichte, die beim kardialen Remodeling eine wesentliche Rolle spielt, in den transgenen LV deutlich höher war im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Parameter wurde hier jedoch nicht untersucht.

6. Zusammenfassung

Die Hypertrophie des Herzens bezeichnet ein durch eine physiologische oder pathologische Mehrbeanspruchung des Myokards bedingte Vergrößerung des Organs. Pathologische Ursachen beinhalten chronische Volumen- oder Druckbelastungen nach einem Myokardinfarkt und werden durch adaptive Prozesse des Myokards in Form von Hypertrophie und Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix kompensiert. Wenn die kompensatorischen Fähigkeiten des Herzens überschritten werden, kommt es zur maladaptiven, exzentrischen Hypertrophie, die von einer Fibrose des Herzmuskels begleitet wird. Insgesamt werden diese kardialen Umbauprozesse als „*Remodeling*“ bezeichnet.

Ein grundlegendes Verständnis von den Genen, welche das kardiale Remodeling bei einer pathologischen Hypertrophie steuern, hat daher zentrale klinische Bedeutung. Hierbei gelang es Brancaccio et al. in früheren Studien, Melusin als vielversprechendes Kandidatengen des kardialen Remodeling zu identifizieren und eine zentrale Bedeutung von Melusin bei hypertrophem Wachstum nachzuweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Melusin auf das kardiale Remodeling nach Induktion eines Myokardinfarktes zu untersuchen. Grundlage dieser Arbeit bildete dabei ein Mausmodell, in dem durch die Ligatur einer Koronararterie ein Myokardinfarkt (MI) induziert wurde. Die daraus folgende maladaptive kardiale Antwort wurde erstens sowohl durch morphologische als auch funktionelle Messungen charakterisiert. Zweitens wurde das kardiale Remodeling in Melusin-überexprimierenden Mäusen (Mel-TG) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) durch biochemische und molekularbiologische Techniken sowie durch den Einsatz von histologischen Verfahren charakterisiert. Drittens, da die Entwicklung und der Verlauf von Hypertrophien sich zwischen weiblichen und männlichen Mäusen in dem Umbau der extrazellulären Matrix unterscheiden, wurde das kardiale Remodeling geschlechtsspezifisch untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 14 Tage nach MI Mel-TG Mäuse generell eine höhere Überlebensrate aufwiesen als deren WT-Geschwister. Phänotypische Untersuchungen des Herzens zeigten weiterhin, dass nach MI Mel-TG Mäuse tendenziell ein geringeres Herzgewicht und ein geringeres linksventrikuläres hypertrophes Wachstum aufwiesen. Die Charakterisierung der Genexpression ergab, dass wesentliche nach MI deregulierte Gene in ihrer Expression von Melusin beeinflusst wurden. Unterschiede zwischen WT Mäusen und Mel-TG Tieren zeigte sich insbesondere für die Genexpression von Stressfaktoren wie NPPA, als auch für Regulatoren der extrazellulären Matrix wie MMP2, TIMP-2 und TIMP-3. Zudem

konnte eine signifikante Korrelation zwischen phänotypischen Parametern, also dem Funktionsverlust des Herzens und der Genexpression bestimmter Gene (z.B. NPPA als prognostischer Kardiomyopathiemarker) gezeigt werden. Histologisch konnte letztlich bewiesen werden, dass die Fibrose nach MI in den WT-Tieren wesentlich stärker ausgeprägt war als in den Mel-TG Tieren, was auf eine kardioprotektive Wirkung von Melusin schließen lässt. Die geschlechtsspezifische Untersuchung ergab, dass die Mortalitätsrate der Männchen nach MI generell höher war als bei den Weibchen. Weiterhin zeigten einige phänotypische Herzparameter (z.B. Fractional shortening) einen Einfluss des Geschlechts. Jedoch wurden keine Geschlechterunterschiede bei der Gen- und Proteinexpression sowie bei Fibrose beobachtet.

7. Summary

Cardioprotective effect of melusin in myocardial infarction

Cardiac hypertrophy is referred to a physiological and pathological increase in the heart's muscle mass and organ size. A myocardial infarction (MI) results in a pathological hypertrophy of the remaining cardiomyocytes to compensate for the damaged myocardium and pressure overload. Initially, cardiomyocytes alter their shape and extracellular matrix is remodelled to preserve cardiac function and normalizing systolic wall stress. After exceeding the compensatory ability of the heart remodelling leads to maladaptive cardiac hypertrophy which is accompanied by fibrosis of the myocardium. Therefore, basic knowledge of relevant genes which govern cardiac remodelling in pathological hypertrophy is of high clinical relevance. Recently, Brancaccio et al. identified melusin as a promising candidate gene for a modulator of cardiac hypertrophy and demonstrated a potential role of melusin for cardioprotection during chronic pressure overload.

This work aims at analysing the functional relevance of melusin for cardiac hypertrophic remodelling after experimental induction of myocardial infarction. Therefore, the present study was performed using a mouse model of myocardial infarction (left coronary artery ligation) to induce left ventricular hypertrophy. First, the maladaptive cardiac response post MI was evaluated by morphological, biochemical and molecular analysis in melusin overexpressing transgenic mice (Mel-TG) in comparison to wild type mice (WT). Second, since sex-differences concerning this matter have not been investigated before, remodelling of the extracellular matrix during pathological hypertrophy was studied sex-specific for male and female mice.

In summary 14 days post MI data showed that Mel-TG mice have a lower mortality rate in comparison to WT mice. Furthermore, phenotypical studies show that melusin overexpressing mice exhibit a smaller cardiac weight and a reduced left ventricular hypertrophic remodelling. Gene expression analysis of relevant target genes of extracellular matrix (ECM) degradation show differences in Mel-TG as compared to WT mice. Here, alterations in gene expression were observed for stress factors such as NPPA and regulators of the ECM homeostasis such as MMP2, TIMP-2 and TIMP-3. Analysis of phenotypical cardiac parameters and gene expression levels revealed strong inverse correlation between NPPA and fractional shortening. Finally histological staining demonstrated that fibrosis is reduced in melusin overexpressing mice as compared to wild type mice indicating together with the expression data a cardioprotective function.

Gender-specific analysis identified a higher mortality rate for males post MI and showed phenotypical differences for functional parameters of the heart between male and female mice. However, neither gender-specific differences in gene expression nor in fibrosis score were detected.

8. Literatur

1. Lloyd-Jones, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2009. **119**(3): p. 480-6.
2. Hayashi, T., et al., *Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(11): p. 2192-201.
3. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
4. Kahan, T. and L. Bergfeldt, *Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential*. Heart, 2005. **91**(2): p. 250-6.
5. Carabello, B.A., *Ten frequently asked questions about cardiac hypertrophy*. Cardiol Rev, 2003. **11**(5): p. 249-51.
6. Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* Circulation, 2004. **109**(13): p. 1580-9.
7. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.
8. Brancaccio, M., et al., *Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29282-8.
9. De Acetis, M., et al., *Cardiac overexpression of melusin protects from dilated cardiomyopathy due to long-standing pressure overload*. Circ Res, 2005. **96**(10): p. 1087-94.
10. Kunczewicz, T., et al., *Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in mesangial cells*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(3): p. 156-63.
11. Brancaccio, M., et al., *Melusin, a muscle-specific integrin beta1-interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload*. Nat Med, 2003. **9**(1): p. 68-75.
12. Vanhoutte, D., et al., *Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 604-13.
13. Manabe, I., T. Shindo, and R. Nagai, *Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2002. **91**(12): p. 1103-13.

14. Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl, *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(1): p. 40-51.
15. Bendall, J.K., et al., *Extracellular matrix and cardiac remodelling*. Arch Mal Coeur Vaiss, 2002. **95**(12): p. 1226-9.
16. Baudino, T.A., et al., *Cardiac fibroblasts: friend or foe?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1015-26.
17. Matrisian, L.M., *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling*. Trends Genet, 1990. **6**(4): p. 121-5.
18. Booz, G.W. and K.M. Baker, *Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 1995. **30**(4): p. 537-43.
19. Medugorac, I., *Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium*. Cardiovasc Res, 1980. **14**(9): p. 551-4.
20. Weber, D.R., E.D. Stroud, and S.M. Prescott, *Arachidonate metabolism in cultured fibroblasts derived from normal and infarcted canine heart*. Circ Res, 1989. **65**(3): p. 671-83.
21. Chapman, D., K.T. Weber, and M. Eghbali, *Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium*. Circ Res, 1990. **67**(4): p. 787-94.
22. Lamparter, S. and B. Maisch, [*Significance of matrix metalloproteinases in cardiovascular diseases*]. Z Kardiol, 2000. **89**(10): p. 949-57.
23. Maisch, B., *Extracellular matrix and cardiac interstitium: restriction is not a restricted phenomenon*. Herz, 1995. **20**(2): p. 75-80.
24. Weber, K.T., et al., *Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(3): p. 279-92.
25. Cleutjens, J.P. and E.E. Creemers, *Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction*. J Card Fail, 2002. **8**(6 Suppl): p. S344-8.
26. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
27. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy*. Clin Cardiol, 1993. **16**(5 Suppl 2): p. II10-4.
28. Weber, K.T., Y. Sun, and J.P. Cleutjens, *Structural remodeling of the infarcted rat heart*. Exs, 1996. **76**: p. 489-99.

29. Ducharme, A., et al., *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 55-62.
30. Hayashidani, S., et al., *Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(3): p. H1229-35.
31. Deschamps, A.M. and F.G. Spinale, *Disruptions and detours in the myocardial matrix highway and heart failure*. Curr Heart Fail Rep, 2005. **2**(1): p. 10-7.
32. Covell, J.W., *Factors influencing diastolic function. Possible role of the extracellular matrix*. Circulation, 1990. **81**(2 Suppl): p. III155-8.
33. Cavasin, M.A., et al., *Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice*. Life Sci, 2004. **75**(18): p. 2181-92.
34. Weber, K.T., C.G. Brilla, and S.E. Campbell, *Regulatory mechanisms of myocardial hypertrophy and fibrosis: results of in vivo studies*. Cardiology, 1992. **81**(4-5): p. 266-73.
35. Blangy, H., et al., *Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction*. Europace, 2007. **9**(9): p. 724-9.
36. Laurent, G.J., *Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass*. Am J Physiol, 1987. **252**(1 Pt 1): p. C1-9.
37. Kukacka, J., et al., *Matrix metalloproteinases and their function in myocardium*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005. **149**(2): p. 225-36.
38. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1014-22.
39. Gunasinghe, S.K., J. Ikonmidis, and F.G. Spinale, *Contributory role of matrix metalloproteinases in cardiovascular remodeling*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2001. **1**(2): p. 75-91.
40. Aimes, R.T. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5872-6.

41. Okada, Y., et al., *Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption*. Lab Invest, 1995. **72**(3): p. 311-22.
42. Creemers, E.E., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?* Circ Res, 2001. **89**(3): p. 201-10.
43. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
44. Hastay, K.A., et al., *Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 11421-4.
45. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
46. Li, Y.Y., C.F. McTiernan, and A.M. Feldman, *Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 214-24.
47. Springman, E.B., et al., *Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 364-8.
48. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases*. Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
49. Pei, D. and S.J. Weiss, *Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 244-7.
50. Sato, H., et al., *Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)*. FEBS Lett, 1996. **385**(3): p. 238-40.
51. Murphy, G. and V. Knauper, *Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?* Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 511-8.
52. Woessner, J.F., Jr., *MMPs and TIMPs. An historical perspective*. Methods Mol Biol, 2001. **151**: p. 1-23.
53. Baker, A.H., et al., *Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis*. J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1478-87.

54. Li, Y.Y., et al., *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart*. *Circulation*, 1998. **98**(17): p. 1728-34.
55. Greene, J., et al., *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(48): p. 30375-80.
56. Liu, Y.E., et al., *Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4)*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(33): p. 20479-83.
57. Li, Y.L., et al., *Regulatory role of extracellular matrix components in expression of matrix metalloproteinases in cultured hepatic stellate cells*. *Cell Struct Funct*, 1999. **24**(5): p. 255-61.
58. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
59. Lambert, E., et al., *TIMPs as multifacial proteins*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **49**(3): p. 187-98.
60. Cleutjens, J.P., et al., *The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions*. *Cardiovasc Res*, 1999. **44**(2): p. 232-41.
61. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(1): p. 31-47.
62. Lindsey, M., et al., *Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion*. *Circulation*, 2001. **103**(17): p. 2181-7.
63. Tao, Z.Y., et al., *Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. *Life Sci*, 2004. **74**(12): p. 1561-72.
64. Cavin, M.A., et al., *Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(5): p. H2043-50.
65. Cavin, M.A., et al., *Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(5): p. H1560-9.
66. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. *Circulation*, 1990. **81**(4): p. 1161-72.

67. Bishop, S.P., *The myocardial cell: normal growth, cardiac hypertrophy and response to injury*. Toxicol Pathol, 1990. **18**(4 Pt 1): p. 438-53.
68. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(7): p. 809-20.
69. Cohn, J.N. and W. Colucci, *Cardiovascular effects of aldosterone and post-acute myocardial infarction pathophysiology*. Am J Cardiol, 2006. **97**(10A): p. 4F-12F.
70. Lu, L., et al., *Molecular and cellular events at the site of myocardial infarction: from the perspective of rebuilding myocardial tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 907-13.
71. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms*. Cardiol Clin, 2000. **18**(3): p. 435-42.
72. Husse, B., et al., *Cyclical mechanical stretch modulates expression of collagen I and collagen III by PKC and tyrosine kinase in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(5): p. R1898-907.
73. Tsuda, T., et al., *Post-ischemic myocardial fibrosis occurs independent of hemodynamic changes*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 926-33.
74. Anversa, P., et al., *Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth*. Circ Res, 1986. **58**(1): p. 26-37.
75. Li, H.L., et al., *Targeted cardiac overexpression of A20 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction*. Circulation, 2007. **115**(14): p. 1885-94.
76. Liao, Y., et al., *Left ventricular hypertrophy has a greater impact on survival in women than in men*. Circulation, 1995. **92**(4): p. 805-10.
77. Krumholz, H.M., M. Larson, and D. Levy, *Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension*. Am J Cardiol, 1993. **72**(3): p. 310-3.
78. Weinberg, E.O., et al., *Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(1): p. 264-73.
79. Patten, R.D., et al., *17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload*. J Card Fail, 2008. **14**(3): p. 245-53.
80. van Eickels, M., et al., *17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(11): p. 2084-92.

81. Carroll, J.D., et al., *Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly*. *Circulation*, 1992. **86**(4): p. 1099-107.
82. Olivotto, I., et al., *Gender-related differences in the clinical presentation and outcome of hypertrophic cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(3): p. 480-7.
83. Varnava, A.M., et al., *Hypertrophic cardiomyopathy: the interrelation of disarray, fibrosis, and small vessel disease*. *Heart*, 2000. **84**(5): p. 476-82.
84. Litwin, S.E., et al., *Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling*. *Cardiology*, 1999. **91**(3): p. 173-83.
85. Gardner, J.D., G.L. Brower, and J.S. Janicki, *Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload*. *J Card Fail*, 2002. **8**(2): p. 101-7.
86. Brower, G.L. and J.S. Janicki, *Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(2): p. H674-83.
87. Fang, L., et al., *Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(5): p. 535-44.
88. Yang, E.V., et al., *Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression*. *J Neuroimmunol*, 2002. **133**(1-2): p. 144-50.
89. Sun, Y., et al., *Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats*. *J Lab Clin Med*, 2000. **135**(4): p. 316-23.
90. Peterson, J.T., et al., *Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 307-15.
91. Heymans, S., et al., *Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1135-42.
92. Matsumura, S., et al., *Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 599-609.
93. Roten, L., et al., *Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(1): p. 109-20.
94. Fedak, P.W., et al., *TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 2004. **110**(16): p. 2401-9.

95. Creemers, E.E., et al., *Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H364-71.
96. Mukherjee, R., et al., *Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition*. Circulation, 2003. **107**(4): p. 618-25.
97. Inokubo, Y., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome*. Am Heart J, 2001. **141**(2): p. 211-7.
98. Romanic, A.M., et al., *Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit*. Life Sci, 2001. **68**(7): p. 799-814.
99. Lindsey, M.L., et al., *Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 753-8.
100. Squire, I.B., et al., *Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction*. J Card Fail, 2004. **10**(4): p. 328-33.
101. Kawakami, R., et al., *Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction*. Circulation, 2004. **110**(21): p. 3306-12.
102. Borg, T.K. and J.B. Caulfield, *Collagen in the heart*. Tex Rep Biol Med, 1979. **39**: p. 321-33.
103. Ikonomidis, J.S., et al., *Accelerated LV remodeling after myocardial infarction in TIMP-1-deficient mice: effects of exogenous MMP inhibition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H149-58.
104. Camp, T.M., et al., *Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(6): p. 729-36.

9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua dest	destilliertes Wasser
BR	Block Reagenz
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
Ct	Threshold cycle (Zykenzahl)
D	Tage (days)
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
et al.	et alii (und Arbeitsgruppe)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FS	Fractional shortening
HG	Herzgewicht
HG/KW	Herzgewicht / Körpergewicht
HG/TL	Herzgewicht / Tibialänge
HF	Herzfrequenz
KG	Körpergewicht
LV	Linker Ventrikel
Mel-TG	Melusin-transgen
mg	Milligramm
MMP	Matrixmetalloproteinase
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mRNA	messenger (Boten) RNA
min	Minute
n (N)	Anzahl der Tiere
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sham	Scheinoperiert
T	Tween20
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
WT	Wildtyp (homozygot)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

10. Appendix

Proteinexpression

beide Geschlechter

t-Test p-Values	TIMP1	TIMP3	MMP2	MMP9
WT Sham vs WT MI	0,101	0,072	0,087	0,740
TG Sham vs TG MI	0,118	0,000	0,000	0,000
WT Sham vs TG Sham	0,560	0,290	0,672	0,611
WT MI vs TG MI	0,800	0,372	0,095	0,048

weibchen

t-Test p-Values	TIMP1	TIMP3	MMP2	MMP9
WT Sham vs WT MI	0,577	0,448	0,007	0,707
TG Sham vs TG MI	0,321	0,749	0,171	0,224
WT Sham vs TG Sham	0,184	0,134	0,203	0,072
WT MI vs TG MI	0,117	0,895	0,342	0,033

männchen

t-Test p-Values	TIMP1	TIMP3	MMP2	MMP9
WT Sham vs WT MI	0,080	0,680	0,994	0,009
TG Sham vs TG MI	0,058	0,833	0,598	0,409
WT Sham vs TG Sham	0,815	0,002	0,632	0,707
WT MI vs TG MI	0,717	0,203	0,987	0,185

männchen vs

weibchen

t-Test p-Values	TIMP1	TIMP3	MMP2	MMP9
WT Sham männchen vs weibchen	0,855	0,260	0,644	0,984
WT MI männchen vs weibchen	0,015	0,598	0,280	0,031
TG Sham männchen vs weibchen	0,686	0,183	0,379	0,345
TG MI männchen vs weibchen	0,208	0,434	0,579	0,192

Tabelle 4. p-Values der Proteinexpressionsdaten (t-test). Nach Geschlechtern sortiert.

	NPPA	OPN	CTGF	TGFb1	Col1	Col3	Col5	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	MMP2	MMP9
ESD	0.71 0.000016	0.65 0.000135	0.69 0.000035	-0.02 0.917982	0.64 0.000185	0.50 0.005746	0.68 0.000050	0.77 0.000001	0.40 0.031556	0.23 0.230031	-0.04 0.836780	0.15 0.437364	-0.49 0.006971
KG	0.12 0.54	-0.05 0.80	-0.08 0.68	0.11 0.57	-0.01 0.96	0.09 0.64	0.02 0.92	0.26 0.17	0.12 0.53	-0.18 0.35	-0.02 0.92	0.03 0.88	0.13 0.50
Septum- dicke	-0.63 0.000250	-0.39 0.0364800	-0.49 0.0697100	0.32 0.0905930	-0.52 0.0038360	-0.17 0.3779660	-0.44 0.0169160	-0.49 0.0069710	-0.21 0.2742230	-0.02 0.9179820	-0.01 0.9580000	0.16 0.4070550	0.35 0.0627070
diast.D.	0.66 0.000098	0.68 0.000050	0.70 0.000024	-0.01 0.958000	0.65 0.000135	0.52 0.003835	0.69 0.000035	0.77 0.000001	0.43 0.019902	0.27 0.156628	0.00 1.000000	0.16 0.400000	-0.47 0.010000
HW-Dicke	-0.32 0.09	-0.50 0.01	-0.42 0.02	-0.13 0.50	-0.40 0.03	-0.42 0.02	-0.41 0.03	-0.59 0.00	-0.33 0.08	-0.40 0.03	-0.06 0.75	-0.24 0.21	0.35 0.062707
Frac.Shor.	-0.68 0.0000650	-0.54 0.002498	-0.60 0.000581	0.00 1.000000	-0.54 0.002498	-0.44 0.016916	-0.62 0.000334	-0.65 0.000135	-0.36 0.055078	-0.16 0.407055	0.07 0.718232	-0.18 0.350121	0.50 0.005746
LVM	0.28 0.141256	0.61 0.000442	0.54 0.002498	0.28 0.141256	0.46 0.012048	0.54 0.002498	0.61 0.000442	0.42 0.023309	0.47 0.010092	0.29 0.127000	0.04 0.836780	0.36 0.055078	-0.29 0.127007
LVM/BW	0.20 0.298241	0.70 0.000024	0.64 0.000185	0.20 0.298241	0.51 0.004709	0.52 0.003836	0.64 0.000185	0.27 0.156628	0.40 0.030000	0.41 0.027179	0.05 0.790000	0.35 0.062707	-0.36 0.055078
BPM	-0.45 0.014310	-0.65 0.000135	-0.58 0.000974	-0.02 0.917982	-0.55 0.001995	-0.45 0.014310	-0.54 0.002498	-0.62 0.000334	-0.37 0.048198	-0.35 0.062707	-0.03 0.877229	-0.19 0.323542	0.35 0.062707

Tabelle 5. Daten der Korrelationsanalyse

		calc.												
		Septum- dicke	diastol. Diameter	Hinterv. dicke	endsystol. Diameter	Fraction- Short.	LVM	LVM/BW	h/r	HR				
Weiblich WT Sham	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
	MW	22.04	1.02	3.00	0.98	1.43	52.83	103.27	4.69	0.68	596.88			
	SEM	0.326	0.023	0.087	0.048	0.095	2.321	5.152	0.252	0.027	20.186			
Weiblich TG Sham	N	20.88421	0.986667	3.020877	0.884737	1.445263	52.5509	97.1398	4.608865	0.627377	596.1053			
	MW	0.35	0.03	0.08	0.02	0.07	1.51	4.74	0.18	0.02	15.10			
	SEM													
Weiblich WT MI	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
	MW	21.04	0.60	4.49	0.80	3.63	21.65	125.44	6.04	0.34	560.04			
	SEM	0.4397	0.0487	0.2293	0.0519	0.2806	2.4349	7.6253	0.4221	0.0312	21.2224			
Weiblich TG MI	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	MW	21.19	0.75	4.14	0.84	3.16	25.64	127.00	6.02	0.41	523.00			
	SEM	0.357	0.069	0.181	0.049	0.246	3.073	7.651	0.375	0.036	27.525			
TG / WT SHAM	g	0.948	0.963	1.007	0.906	1.011	0.995	0.941	0.982	0.926	0.999			
	mm	1.007	1.250	0.922	1.052	0.871	1.184	1.012	0.997	1.192	0.934			
	mm	0.955	0.588	1.497	0.815	2.536	0.410	1.215	1.287	0.506	0.938			
TG / WT TAC	g	1.015	0.763	1.372	0.947	2.186	0.488	1.307	1.307	0.651	0.877			
	mm													
	mm													
MI / SHAM WT	g	0.948	0.963	1.007	0.906	1.011	0.995	0.941	0.982	0.926	0.999			
	mm	1.007	1.250	0.922	1.052	0.871	1.184	1.012	0.997	1.192	0.934			
	mm	0.955	0.588	1.497	0.815	2.536	0.410	1.215	1.287	0.506	0.938			
MI / SHAM TG	g	1.015	0.763	1.372	0.947	2.186	0.488	1.307	1.307	0.651	0.877			
	mm													
	mm													
T-tests	KG	Septum- dicke	diastol. Diameter	Hinterv. dicke	endsystol. Diameter	Fraction- Short.	calc. LVM	LVM/BW	h/r	HR				
	KG	Septum- dicke	diastol. Diameter	Hinterv. dicke	endsystol. Diameter	Fraction- Short.	calc. LVM	LVM/BW	h/r	HR				
TG vs. WT SHAM	0.0210259	0.3029700	0.8646184	0.0981700	0.8950699	0.9194263	0.3876139	0.7842415	0.1487108	0.97588524				
	0.7946348	0.0832966	0.2396757	0.5631275	0.2172526	0.3149541	0.8860752	0.9727888	0.1721450	0.29333751				
	0.0766667	0.0000000	0.0000012	0.0150173	0.0000000	0.0000000	0.0210907	0.0095316	0.0000000	0.2164244				
MI vs. SHAM WT	0.5427366	0.0041291	0.0000057	0.3954594	0.0000010	0.0000000	0.0022986	0.0020714	0.0000091	0.0269768				

Tabelle 6. Daten und p-Werte der Echokardiographischen Untersuchung Weibliche Tiere

		calc.																																																																																																			
		Septum- dicke	diastol. Diameter	Hinterv. dicke	endsystol. Diameter	Fraction- Short.	LVM	LVM/BW	h/r	HR																																																																																											
Männlich WT Sham	g																																																																																																				
	N	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14																																																																																
	MW	27.00	1.10	3.22	1.00	1.65	49.15	123.71	4.59	0.66	587.50																																																																																										
	SEM	0.498	0.030	0.094	0.033	0.083	1.495	6.169	0.239	0.024	15.293																																																																																										
Männlich TG Sham	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16																																																																																
	MW	26.59	1.09	3.09	0.95	1.57	49.30	110.22	4.15	0.67	634.00																																																																																										
	SEM	0.400	0.034	0.080	0.045	0.062	1.194	4.327	0.158	0.034	12.274																																																																																										
Männlich WT MI	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18																																																																																
	MW	25.96	0.68	5.06	0.67	4.01	23.57	147.57	5.68	0.31	542.78																																																																																										
	SEM	0.4535	0.0969	0.2997	0.0691	0.3926	3.7549	7.8341	0.2698	0.0463	26.2960																																																																																										
Männlich TG MI	N	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24																																																																																
	MW	26.41	0.80	4.29	0.87	3.14	28.91	142.84	5.42	0.42	581.13																																																																																										
	SEM	0.328	0.073	0.191	0.049	0.250	2.619	4.442	0.176	0.035	23.886																																																																																										
	KG	Septum- dicke										diastol. Diameter										Hinterv. dicke										endsystol. Diameter										Fraction- Short.										calc. LVM										LVM/BW										h/r										HR																			
	g	mm										mm										mm										mm										%										mg										mg/g										h/r										bpm																			
TG / WT SHAM		1.015	1.029	1.010	0.980	1.053	0.961	1.009	0.994	0.987	0.987																																																																																										
TG / WT TAC		0.994	1.220	0.833	1.347	0.757	1.280	1.055	1.023	1.367	0.958																																																																																										
MI / SHAM WT		0.973	0.609	1.610	0.643	2.642	0.434	1.200	1.230	0.443	0.907																																																																																										
MI / SHAM TG		0.952	0.722	1.328	0.884	1.899	0.578	1.255	1.266	0.614	0.880																																																																																										
T-tests	KG	Septum- dicke										diastol. Diameter										Hinterv. dicke										endsystol. Diameter										Fraction- Short.										calc. LVM										LVM/BW										h/r										HR																			
		0.7138149										0.2629425										0.0299532										0.4554149										0.0217829										0.1307156										0.0197846										0.0064035										0.1904330										0.1663951									
		0.9077116										0.2682806										0.0444777										0.0232596										0.0502557										0.1977595										0.4929257										0.7639768										0.0804609										0.5916002									
		0.4270415										0.0023973										0.0000016										0.0000887										0.0000031										0.0000003										0.0003347										0.0000152										0.0000002										0.0256309									
		0.3057871										0.0012574										0.0009434										0.1566982										0.0000441										0.0000004										0.0022013										0.0017154										0.0000106										0.0446710									

Tabelle 7. Daten und p-Werte der Echokardiographischen Untersuchung Männliche Tiere

Gen	1-Weg ANOVA						2-WEG ANOVA							
	MI/sham		TG/WT		Weibchen/Männchen		Weibchen		Männchen		WT		TG	
	Ratio	p	Ratio	p-Wert	Ratio	p-Wert	MI / sham	MI / sham	MI / sham	p-Wert	sham	sham	sham	p-Wert
NPPA	16,06	6,34e-07 ***	0,60	0,0143 *	0,75	0,506	9,55	18,02	18,02	0,047084 *	21,62	15,82	0,011598 *	
OSP	7,47	2,49e-09 ***	1,87	0,343	0,97	0,735	10,76	5,86	5,86	0,359	7,28	6,67	0,744	
CTGF	4,33	8,08e-05 ***	1,25	0,689	1,19	0,467	4,77	4,60	4,60	0,563	5,58	3,10	0,101	
TGFb1	1,95	4,26e-05 ***	1,50	0,120	0,86	0,312	2,35	1,71	1,71	0,211	1,69	2,01	0,557	
Col1	3,82	0,0112 *	1,38	0,788	0,99	0,789	5,13	3,21	3,21	0,669	4,31	3,14	0,114	
Col3	4,42	3,33e-05 ***	1,78	0,228	0,90	0,873	4,81	4,31	4,31	0,569	4,94	3,30	0,0801,	
Col5	3,67	8,6e-10 ***	1,48	0,335	1,10	0,880	5,79	2,78	2,78	0,285	3,74	3,34	0,428	
TIMP1	6,41	7,94e-06 ***	1,12	0,833	0,59	0,102	3,60	7,38	7,38	0,026748 *	12,05	3,03	0,000120	
TIMP2	1,57	2,70e-06 ***	1,21	0,386	0,88	0,129	1,88	1,41	1,41	0,315	1,40	1,76	0,275	
TIMP3	1,19	0,255	1,10	0,950	1,01	0,740	1,40	1,13	1,13	0,442	0,77	2,16	0,00697 **	
TIMP4	0,89	0,105	1,32	0,069	0,85	0,978	0,67	1,16	1,16	0,291	0,32	1,73	0,070	
MMP2	3,05	0,00126 **	2,01	0,060	0,88	0,672	3,36	3,01	3,01	0,727	2,27	3,28	0,925	
MMP9	0,37	0,000239 ***	1,15	0,496	0,97	0,512	0,36	0,33	0,33	0,830	0,44	0,27	0,217	

Tabelle 8. ein- und zweifaktorielle ANOVA Genexpression auf Transkriptebene

Gen	1-Weg ANOVA						2-WEG ANOVA							
	MI/sham		TG/WT		Weibchen/Männchen		Weibchen		Männchen		WT		TG	
	Ratio	p	Ratio	p-Wert	Ratio	p-Wert	MI / sham	MI / sham	MI / sham	p-Wert	MI / sham	MI / sham	MI / sham	p-Wert
TIMP1	0,77	0,127	0,91	0,918	1,28	0,197	1,02	0,54	0,54	0,194	0,80	0,74	0,571	
TIMP3	0,80	0,373	0,62	0,00683 **	1,02	0,74696	0,90	0,89	0,89	0,25143	0,88	1,04	0,7457	
MMP2	0,76	0,286	0,89	0,562	1,07	0,443	0,58	1,10	1,10	0,271	0,72	0,94	0,43	
MMP9	0,72	0,547	0,92	0,3421	0,96	0,547	0,79	0,65	0,65	0,951	0,71	0,73	0,2915	

Tabelle 9. ein- und zweifaktorielle ANOVA Proteinexpression

11. Danksagung

Ich möchte allen Menschen, die direkt oder indirekt zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen tiefsten Dank aussprechen.

An Frau Prof. Regitz-Zagrosek geht mein besonderer Dank für die Gelegenheit, meine Promotion unter ihrer Leitung durchführen zu können, für die Vergabe des Themas, für die Unterstützung, die kritischen und konstruktiven Anregungen während der wöchentlichen Besprechungen und für ihr beispielhaftes Vorbild, dass Frauen in Führungspositionen alles erreichen können.

Frau Dr. rer. nat. Carola Schubert möchte ich herzlich für die unmittelbare Betreuung im wissenschaftlichen Alltag, für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und für die angenehme Zusammenarbeit und ihre Menschlichkeit in allen Lebenslagen danken.

An alle Mitarbeiter des Centers for Cardiovascular Research richte ich ein Dankschön für die gute und unvergessliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. med. vet. Achim Gruber danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin und für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ganz besonderen Dank schulde ich meinem „Agent undercover“, der die beste Wissenschaftlerin aus mir herausholte, die in mir steckt, dessen Neugier und Zuversicht mir Auftrieb gaben und das „Feuer der Begeisterung“ in mir immer wieder neu entfachten. Wie wunderbar, dass wir Zeit unseres Daseins „Lebensforscher“ bleiben werden.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden und all den Menschen, die mir nahe stehen und danach streben, Körper, Geist und Seele zu meistern, die meinen Weg erhellt haben und auf deren Schultern ich stehe. Dieses behütete Gefühl im Kreise meiner „Wahlfamilie“ hat entscheidend zu meiner Entwicklung und dadurch zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich in Liebe und Respekt Renate danken für die Lektionen in Achtsamkeit, Klarheit und dem richtigen Unterscheidungsvermögen. Karsten danke ich für seine inspirierende Begleitung auf meinen Lebensbahnen. Und ein besonderer Dank geht an Alexander, der mir auf meinem Weg mehr geholfen hat, als er ahnt.

Mein tiefster Dank gilt meinen geliebten Eltern und Großeltern, meinem Schwesterherz Rica und meiner gesamten Familie, die mich bewusst und unbewusst zu dem Menschen machten, der ich heute bin. Nicht zuletzt in dieser Arbeit spiegelt sich Eure Liebe, Euer Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten, Eure Unterstützung und Eure Geduld wieder.

„Unsere tiefste Angst ist nicht, dass wir einer Sache nicht gewachsen sind.

Unsere tiefste Angst ist, dass wir unermüßlich mächtig sein könnten.

Es ist unser Licht, das wir fürchten, nicht unsere Dunkelheit.“

Nelson Mandela

12.Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 15.06.2010

Maika Korn